

УДК: 579.834.115Leptospira:57.083.18

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛЕПТОСПИР МЕТОДАМИ МУЛЬТИЛОКУСНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ И ПРЯМОГО БЕЛКОВОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ

М.Б. Шаракшанов, Н.В. Бренёва

*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск*

Апробированы современные методы идентификации лептоспир с помощью мультилокусного сиквенс-типирования и прямого белкового профилирования с использованием технологии масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным разделением.

Проведена проверка рабочей коллекции лептоспир ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Выявлено два штамма с

таксономической ошибкой. Определены изменения в последовательностях гена *sucA* у шести штаммов.

Ключевые слова: *Leptospira*, идентификация.

**LEPTOSPIRA CULTURES IDENTIFICATION BY
MULTILOCUS SEQUENCING AND DIRECT PROTEIN PROFILING**

M.B. Sharakshanov, N.V. Breneva

Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Irkutsk

Modern methods of Leptospira identifying including multilocus sequence typing and direct protein profiling using the technology of mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight and division were tested.

*Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor Leptospira working collection checking revealed two strains with a taxonomic error and six strains with changes in the *sucA* gene sequences.*

Keywords: *Leptospira*, identification.

Род *Leptospira* подразделяется на 19 видов, из которых восемь патогенных, шесть промежуточных и пять сапрофитических [7]. Среди патогенных лептоспир насчитывается более 250 сероваров, объединенных в 25 серогрупп. При этом штаммы одной серогруппы могут относиться к разным видам лептоспир. Следует учитывать, что для проведения полноценного эпидемиологического анализа и дальнейшего изучения выделенных культур необходимо достоверное определение таксономической принадлежности возбудителя болезни, а современная систематика лептоспир создает определенные трудности в их идентификации.

До недавнего времени изучение выделенных культур заключалось в фенотипической идентификации лептоспир, включающей в себя дифференциацию патогенных и непатогенных культур бактериологическим методом, определение серогрупповой принадлежности в реакции микроагглютинации (РМА) с типовыми сыворотками, определение серовара в РМА с моноклональными антителами или в перекрестной РМА с гипериммунными сыворотками. Такие исследования являются довольно трудоемкими и длительными по времени. В наше время идентификация микроорганизмов получила новый толчок в развитии благодаря появлению генетических методов. К их несомненным достоинствам относятся высокая производительность, специфичность, низкая стоимость расходных материалов и возможность применения как в диагностике, так и в расширенном изучении возбудителей инфекционных заболеваний.

Широкое применение нашла идентификация микроорганизмов методами мультилокусного секвенс-типирования (Multilocus Sequence Typing – MLST) и прямого белкового профилирования MALDI-ToF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry – масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным разделением). Принципы методов соответственно заключаются в определении генетических локусов генов «домашнего хозяйства» [2, 6] и сопоставлении полученных белковых спектров исследуемых микроорганизмов с масс-спектрами существующих баз данных [5].

Цель исследования: апробация современных методов идентификации и проверка рабочей коллекции лептоспир ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Материалы и методы

В работе использовался 41 штамм лептоспир (табл. 1), из которых пять выделены от мелких млекопитающих в природных очагах Иркутской области и Приморского края в 2012-2014 гг. (108-I, 34-PT, 4-I, 5-I, 50-PT) и три непатогенные (*Bairam Ali*, *EMJH86*, *Patoc I*). Все штаммы культивировались на среде EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris, Becton Dickinson, USA) и инкубировались в течение недели в термостате при 28 °С, с последующей проверкой роста в темном поле микроскопа методом «раздавленная капля». При удовлетворительном росте микроорганизмы концентрировались скоростным центрифугированием (12100-17000 g в течение 5-15 минут) до получения видимого осадка, который далее использовался для анализа.

Подготовка образцов и их последующий анализ проводились по общепринятой методике с использованием пересинтезированных пар праймеров для ПЦР-амплификации внутренних фрагментов семи генов домашнего хозяйства по схеме MLST [3] и по протоколу для изолированных колоний бактерий в случае метода MALDI-ToF MS [4].

Таблица 1.

Использованные культуры лептоспир и результаты их идентификации

№	Strain	Species	Serogroup	Результат идентификации MLST	Результат идентификации MALDI-TOF
1	Каширский	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
2	AB 1245	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Идентифицирован до вида	Не исследован
3	Akiyami A	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
4	BairamAli	<i>L. biflexa</i>	Bairamali	Не исследован	Не идентифицирован
5	Ballico	<i>L. interrogans</i>	Australis	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
6	Castellon 3	<i>L. orgpetersenii</i>	Ballum	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
7	CZ 214	<i>L. noguchi</i>	Panama	Не исследован	Внесен в базу как референсный спектр
8	Djasiman	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Идентифицирован до штамма	Идентифицирован до вида
9	EMJH86	<i>L. inadai</i>	Lyme	Не исследован	Не идентифицирован
10	Ezh-1	<i>L. interrogans</i>	Australis	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
11	Hebdomadis	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Идентифицирован до штамма	Идентифицирован до вида
12	HS 26	<i>L. kirschneri</i>	Bataviae	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
13	Kabura	<i>L. kirschneri</i>	Hebdomadis	Идентифицирован до штамма	Идентифицирован до вида
14	Li 130	<i>L. inadai</i>	Manhao	Не исследован	Идентифицирован до рода
15	LSU 1945	<i>L. noguchi</i>	Louisiana	Не исследован	Идентифицирован до рода
16	Moskva V	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
17	Mus 24	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Идентифицирован до штамма	Не исследован
18	M 20	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
19	M20-11	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Не исследован	Идентифицирован до вида
20	M20-17	?	Icterohaemorrhagiae	Идентифицирован до штамма	Идентифицирован до рода
21	M84	<i>L. orgpetersenii</i>	Sejroe	Идентифицирован до вида	Идентифицирован до вида
22	Patoc I	<i>L. biflexa</i>	Semarang	Не идентифицирован	Внесен в базу как референсный спектр

23	Perepelitsin	L. orgpetersenii	Tarassovi	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
24	Poi	L. borgpeterseni	Poi	Идентифицирован как другой штамм	Идентифицирован до вида L. interrogans
25	Pomona	L. interrogans	Pomona	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
26	RGA	L. interorgans	Icterohaemo rrhagiae	Не исследован	Внесен в базу как референсный спектр
27	Salinem	L. interrogans	Pyrogenes	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
28	Sari	L. orgpetersenii	Mini	Не исследован	Внесен в базу как референсный спектр
29	Sarmin	L. weillii	Sarmin	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
30	Veldrat Bataviae 46	L. orgpetersenii	Javanica	Не исследован	Внесен в базу как референсный спектр
31	Vleermuis 3668	L. kirschneri	Cynopteri	Идентифицирован как другой штамм	Идентифицирован до вида L. interrogans
32	10	L. inadai	Lyme	Не исследован	Внесен в базу как референсный спектр
33	108-I	L. orgpetersenii	Javanica	Идентифицирован до вида	Не исследован
34	1322 P	L. kirschneri	Grippotyphosa	Идентифицирован до вида	Идентифицирован до вида
35	34-PT	L. orgpetersenii	Javanica	Идентифицирован до вида	Не исследован
36	3705	L. interrogans	Sejroe	Идентифицирован до штамма	Внесен в базу как референсный спектр
37	4-I	L. orgpetersenii	Javanica	Идентифицирован до вида	Идентифицирован до вида
38	493	?	Icterohaemo rrhagiae	Не исследован	Идентифицирован до рода
39	50-PT	L. kirschneri	Grippotyphosa	Идентифицирован до вида	Не исследован
40	5-I	L. orgpetersenii	Javanica	Идентифицирован до вида	Идентифицирован до вида
41	5621	L. interorgans	Pomona	Идентифицирован до штамма	Идентифицирован до рода

Результаты и обсуждение

Результаты апробации современных методов MLST и MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации штаммов представителей рода *Leptospira* с неопределенным таксономическим положением идентичны, методы отличаются высокой производительностью с эффективной видовой дифференциацией.

При проверке лептоспир из рабочей коллекции ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора методом MLST все исследуемые культуры удалось идентифицировать до вида, 19 референсных штаммов идентифицированы в соответствии с их паспортными данными. Выявлена таксономическая ошибка в коллекции. Так, два штамма полученные в 1983

г. из ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф.Гамалеи *L. borgpetersenii* Poi и *L. kirschneri* *Vleermuis* 3668 идентифицированы как другие штаммы, а именно *L. borgpetersenii* Poi идентифицирован как *L. interrogans* Naam, а *L. kirschneri* *Vleermuis* 3668 – как *L. interrogans* Salinem.

Также в ходе исследований определены изменения в последовательностях гена *sucA* у шести штаммов, что привело к формированию новых сиквенс-типов – ST (табл. 2).

Таблица 2.

Список штаммов со спонтанной мутацией

№	Strain	Species	Serovar	Serogroup	glm U	pnt A	suc A	tpiA	pfk B	mre A	cai B	ST
1	Akiyami A	<i>L. interrogans</i>	autumnalis	Autumnalis	1	12	8	3	10	6	19	New
2	Ballico	<i>L. interrogans</i>	australis	Australis	6	13	3	2	13	2	6	New
3	Moskva V	<i>L. kirschneri</i>	grippotyphosa	Grippotyphosa	19	20	1	22	31	18	23	New
4	M 20	<i>L. interrogans</i>	copenhageni	Icterohaemorrhagiae	1	1	8	2	10	4	8	New
5	Pomona	<i>L. interrogans</i>	pomona	Pomona	3	3	2	3	4	5	16	New
6	Salinem	<i>L. interrogans</i>	pyrogenes	Pyrogenes	1	1	13	5	12	2	9	New

Разработаны методологические подходы идентификации MALDI-TOF MS. Метод идентификации апробирован на 16 штаммах, из них девять определено до вида, пять до рода, и два непатогенных штамма *Bairam Ali* и *EMJH86* не идентифицированы, но при построении дендрограмм отнесены к кластеру непатогенных лептоспир вместе с референсным штаммом *Patoc I* [1].

При мультилокусном секвенировании идентификация свежевыведенных культур лептоспир не представляет трудностей, однако при масс-спектрометрии рекомендуется исследовать адаптированные к питательным средам культуры.

Выводы

Апробированные методики идентификации представителей рода *Leptospira* с использованием технологии мультилокусного секвенирования и MALDI-TOF масс-спектрометрического белкового профилирования:

1. Показывают совпадающие результаты и взаимодополняют друг друга
2. Дают возможность идентифицировать лептоспиры с достоверностью до вида, а иногда и до штамма (MLST)
3. Могут быть использованы для контроля рабочей коллекции лептоспир в связи с отсутствием других достоверных методов их дифференциации.

Литература

1. Бренева Н.В., Афанасьев М.В., Шаракшанов М.Б. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ клеточных белков в идентификации представителей рода *Leptospira* // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. - 2014. - № 4. – С. 36-43.
2. van Belkum A., Tassios P.T., Dijkshoorn L. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology // Clin Micro Biol Infect. -2007. - Vol. 13 (Suppl. 3). - P. 1-46.
3. Boonsilp S., Thaipadungpanit J., Amornchai P. et al. A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species // PLoS Negl Trop Dis. - 2013. - Vol. 7 (1). e. 1954.

4. Bruker Daltonics GmbH. MALDI Biotyper 3.0 User Manual. Revision 2 - February 2011. - 184 p.
5. Djelouadji Z., Roux V., Raoult D. et al. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Leptospira* organisms // Vet. Microbiol. - 2012. - Vol. 158. – P. 142-146.
6. Maiden M.S. Multilocus Sequence Typing of Bacteria // Ann Rev Microbiol. - 2006. - Vol. 60. - P. 561-588.
7. Paster B.J. Phylum XV. Spirochaetes Garrity and Holt 2001 / Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. - Springer, 2010. - Vol. 4. - P. 471-566.

Сведения об авторах

Шаракианов Мунко Баярович, отдел эпидемиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, врач-эпидемиолог

Бренёва Наталья Владимировна, кандидат медицинских наук, отдел эпидемиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, ведущий научный сотрудник