

Генетическое разнообразие и патогенный потенциал *Legionella pneumophila*, выделенных на отдельных территориях Российской Федерации

Э.А.Светоч, Н.К.Фурсова, Е.И.Асташкин, Б.В.Ерусланов, И.П.Мицевич, Н.Н.Карцев,
А.В.Попова, О.В.Коробова, И.А.Дятлов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболensk, Московская область, Российская Федерация

Изучены фено- и генотипические свойства 39 изолятов *Legionella pneumophila*, выделенных из образцов воды систем горячего водоснабжения общественных зданий г. Сочи ($n = 33$) и шести других городов России ($n = 6$). Все 39 изолятов имели типичные культурально-морфологические и ферментативные свойства, образовывали биопленки, были чувствительными к антибиотикам и принадлежали к серогруппам 1 и 2–14. Изоляты серогруппы 1 были вирулентными для морских свинок. Выделенные в г. Сочи легионеллы принадлежали к 8 сиквенс-типам (ST) и 9 RAPD-генотипам. Идентифицированы как ранее описанные в России ST1 и ST87, так и новые для страны сиквенс-типы: ST366, ST1324, ST1326, ST1354, ST1376 и ST1434. Доминирующими сиквенс-типами были ST1, ST366 и ST87: они были выделены в 13 из 15 зданий (87% случаев); 5 минорных ST были выделены в 20% зданий. Большинство изолятов содержали в своих геномах пять генов вирулентности: *lvh*, *rtx*, *hsp60*, *dot* и *mip*, за исключением изолятов ST1326 и ST1354, которые несли 4 гена вирулентности – *rtx*, *hsp60*, *dot* и *mip*. Выделенные в других городах России *L. pneumophila* принадлежали к сиквенс-типам ST1, ST366, ST252 и к новому ST2813. Легионеллы наиболее распространенного в мире сиквенс-типа ST1 серогруппы 1 характеризовались наиболее выраженной способностью к биопленкообразованию.

Представленные в работе данные показывают, что мониторинг *L. pneumophila* в образцах воды систем горячего водоснабжения, изучение принадлежности их к серогруппам и сиквенс-типам позволяют с большей вероятностью оценить патогенный потенциал выделенных легионелл и провести необходимые мероприятия по их элиминации из водных источников, предупредив тем самым возможное заражение человека.

Ключевые слова: *Legionella pneumophila*, сиквенс-типы, гены вирулентности, биопленки

Для цитирования: Светоч Э.А., Фурсова Н.К., Асташкин Е.И., Ерусланов Б.В., Мицевич И.П., Карцев Н.Н., Попова А.В., Коробова О.В., Дятлов И.А. Генетическое разнообразие и патогенный потенциал *Legionella pneumophila*, выделенных на отдельных территориях Российской Федерации. Бактериология. 2022; 7(4): 10–23. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-10-23

Genetic diversity and pathogenic potential of *Legionella pneumophila* isolated in certain territories of Russian Federation

E.A.Svetoch, N.K.Fursova, E.I.Astashkin, B.V.Yerusanov, I.P.Mitsevich, N.N.Kartsev,
A.V.Popova, O.V.Korobova, I.A.Dyatlov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region,
Russian Federation

In this work, we studied the phenotypic and genotypic properties of 39 *Legionella pneumophila* isolates isolated from water samples of hot water supply systems of public buildings in Sochi ($n = 33$) and six other cities of Russian Federation ($n = 6$). All 39 isolates had typical cultural-morphological and enzymatic properties, formed biofilms, were sensitive to antibiotics and belonged to serogroups 1 and 2–14. Isolates of the serogroup 1 were virulent in guinea pigs. *Legionella* isolated in Sochi

Для корреспонденции:

Фурсова Надежда Константиновна, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 360-079
E-mail: fursova@ obolensk.org

Статья поступила 26.10.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 360-079
E-mail: fursova@ obolensk.org

The article was received 26.10.2022, accepted for publication 28.12.2022

belonged to 8 sequence types (STs) and 9 RAPD genotypes. Previously described in Russian Federation ST1 and ST87 and novel sequence types for the country – ST366, ST1324, ST1326, ST1354, ST1376, and ST1434 – were identified in the study. The dominant sequence types were ST1, ST366 and ST87; they were identified in 13 out of 15 buildings, i.e. in 87% of cases; 5 minor STs were allocated in 20% of the buildings. Major isolates contained five virulence genes in their genomes: *lvh*, *rtx*, *hsp60*, *dot*, and *mip*, with the exception of isolates ST1326 and ST1354, which carried 4 virulence genes – *rtx*, *hsp60*, *dot*, and *mip*. *L. pneumophila* isolated in other cities of the Russian Federation belonged to sequence types ST1, ST366, ST252, and to the new ST2813. *Legionella* of the most common ST1 sequence type in the world, serogroup 1, they were characterized by the greatest ability to biofilm formation.

The data presented in the work show that monitoring *L. pneumophila* in water samples of hot water supply systems, studying their belonging to serogroups and sequence types makes it possible to more likely assess the pathogenic potential of isolated *Legionella* and take the necessary measures to eliminate them from water sources, thereby preventing possible human infection.

Key words: *Legionella pneumophila*, sequence-type, virulence genes, biofilm

For citation: Svetoch E.A., Fursova N.K., Astashkin E.I., Yeruslanov B.V., Mitsevich I.P., Kartsev N.N., Popova A.V., Korobova O.V., Dyatlov I.A. Genetic diversity and pathogenic potential of *Legionella pneumophila* isolated in certain territories of Russian Federation. *Bacteriology*. 2022; 7(4): 10–23. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-10-23

Легионеллезная инфекция (болезнь легионеров), известная уже более 30 лет, регистрируется во многих странах мира, в том числе в Российской Федерации (РФ), и по-прежнему представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения [1]. Инфекция может протекать в виде как спорадических случаев, так и крупных эпидемических вспышек [2]. Крупная и пока единственная вспышка легионеллеза в РФ произошла в 2007 г. в г. Верхняя Пышма Свердловской области (Уральский федеральный округ (УФО)), во время которой заболело более 100 человек, 5 из них умерло [3].

Основной возбудитель легионеллеза – *Legionella pneumophila*, представитель рода *Legionella*, насчитывающего на сегодня 50 видов, подавляющее большинство из которых циркулирует в природной среде и непатогенны для человека [4]. Бактерии вида *L. pneumophila* являются причиной легионеллеза приблизительно в 9 %, в 10% случаев болезнь могут вызывать виды *L. micdadei*, *L. longbeachae*, *L. dunoffii*, *L. bozemanii* и др. [5]. Вид *L. pneumophila* включает в себя 15 серогрупп, среди которых доминирующая роль в этиологии легионеллеза принадлежит серогруппе 1. С этой серогруппой связывают до 80% случаев всех форм легионеллезной инфекции: внебольничной, внутрибольничной и легионеллеза путешественников [6]. Отличительной биологической особенностью серогруппы 1 является вирулентность для морских свинок – экспериментальной модели, на которой лучше всего воспроизводятся картина легионеллезной пневмонии и патогенез инфекции, во многом напоминающие аналогичные патологические процессы при легионеллезе человека [7]. *L. pneumophila* серогрупп 2–15 в основном вызывают внутрибольничную инфекцию, поражая преимущественно иммунокомпрометированных пациентов, нередко вызывая у них летальный исход [8]. Легионеллы серогрупп 2–15, в отличие от серогруппы 1, непатогенны для морских свинок [9].

Успех профилактики легионеллезной инфекции во многом зависит от проведения систематического мониторинга легионелл в естественных и искусственных, создаваемых человеком, водных системах, благоприятных для персистенции и размножения микроба, а также от оценки патогенного потенциала выделяемых из водной среды легионелл [10]. Особого внимания заслуживают искусственные водные системы, в которых, в отличие от большинства природных,

концентрация легионелл может достигать опасного для человека уровня [11]. Важную роль в поддержании высоких концентраций патогена в искусственных водных системах играет способность легионелл образовывать биопленки, в составе которых микроб проявляет большую устойчивость к повреждающим факторам, в том числе к температуре, дезинфектантам и антибиотикам [12]. Образование аэрозолей из водных источников с эпидемически значимой концентрацией возбудителя и их аспирация являются основной причиной легионеллезной инфекции у человека.

Для оценки потенциальной опасности для человека изолятов *L. pneumophila*, выделяемых из водных систем, у них изучают фенотипические свойства, включая принадлежность к серогруппе, чувствительность к антибиотикам, способность к образованию биопленок, вирулентность для лабораторных животных. Кроме того, в их геномах исследуют наличие детерминант вирулентности, важных для возбудителя болезни легионеров, и определяют сиквенс-тип (ST) [European Guidelines, 2012]. К наиболее известным генам вирулентности, используемым исследователями для оценки патогенного потенциала легионелл, относят локусы *dot* и *lvh*, кодирующие компоненты системы секреции IV типа, важной для размножения патогена внутри клеток макроорганизма [13]; локус *rtx*, кодирующий белки, участвующие в процессах адгезии, цитотоксичности и формировании пор [14]; ген *hsp60*, который контролирует синтез 60 кДа белка теплового шока (Hsp60), способствующего инвазии легионелл и стимулирующего экспрессию цитокинов макрофагами [15]. Кроме того, исследуют ген *mip*, кодирующий 24 кД белок внешней мембраны «macrophage infectivity potentiator», который имеется у всех видов рода *Legionella* и обеспечивает их выживание в клетке-хозяине [16]. В ряде работ, кроме перечисленных выше, исследуются и другие гены вирулентности легионелл [17, 18].

Определение сиквенс-типа у *L. pneumophila* на основании мультилокусного секвенирования генов «домашнего хозяйства» (MLST), контролирующего отдельные звенья метаболизма в клетках, позволяет исследователю выявлять не только генетическое разнообразие легионелл, выделяемых из клинического материала и объектов внешней среды, но и оценить их эпидемическую значимость для человека, используя для этого сведения о сиквенс-типах, представленных в базе данных по sbt-типированию (Sequence-Based

Typing). Сиквенс-типирование *L. pneumophila* в сочетании с определением их принадлежности к серологической группе в настоящее время считается диагностическим референс-стандартом при расследовании этиологической причины вспышек легионеллезной инфекции [19]. Дальнейшее накопление данных о сиквенс-типах, выделяемых из клинического материала, будет способствовать выявлению наиболее опасных для человека генетических линий возбудителя, циркулирующих в определенных географических регионах. Это также, возможно, позволит установить связь между сиквенс-типом возбудителя и тяжестью течения вызываемого им заболевания.

Цель исследования – молекулярно-генетическая и фенотипическая характеристика изолятов *L. pneumophila*, выделенных в 2014 г. из образцов воды систем горячего водоснабжения зданий общественного назначения г. Сочи и других городов РФ, оценка потенциальной опасности их для человека; обобщение литературных данных по разнообразию сиквенс-типов *L. pneumophila*, выделенных за все время наблюдений в РФ, с 2005 по 2019 г.

Материалы и методы

Изоляты *Legionella pneumophila*

Основная часть изолятов ($n = 33$) была выделена при нашем участии в январе–феврале 2014 г. в г. Сочи (Южный федеральный округ (ЮФО)) из образцов воды систем горячего водоснабжения 15 зданий общественного назначения. Остальные изоляты легионелл ($n = 6$) были выделены в 2016 г. в Ростове-на-Дону (ЮФО) ($n = 2$), Калининграде (Северо-Западный федеральный округ (СЗФО)) ($n = 1$), Санкт-Петербурге (СЗФО) ($n = 1$), Мурманске (СЗФО) ($n = 1$) и Хабаровске (Дальневосточный федеральный округ (ДВФО)) ($n = 1$). Все изоляты хранятся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур ФБУН ГНЦ ПМБ (ГКПМ-Оболенск) в лиофильно высушенном состоянии (табл. 1).

Видовая идентификация *L. pneumophila* была подтверждена в реакции латекс-агглютинации со специфичными диагностикумами (Oxoid, Англия), ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, РФ), на масс-спектрометре MALDI-TOF (Bruker, Германия) и в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени со специфичными праймерами («Амплисенс», Москва, РФ). Выращивали культуры на легионелбакагаре (ЛБА) с ростовыми добавками (ГНЦ ПМБ, Оболенск, РФ) в атмосфере 2,5% CO₂ при температуре 37°C в течение 24–48 ч.

Определение ферментативной активности

Каталазную и оксидазную активность, способность расщеплять гиппурат натрия, желатину, сбраживать углеводы, вызывать аутофлюоресценцию и образовывать коричневый пигмент на среде, содержащий тирозин, продуцировать β-лактамазу изучали у изолятов *L. pneumophila* методами, опубликованными в работах [20, 21].

Определение биопленкообразования

Способность изолятов *L. pneumophila* формировать монобиопленки в условиях *in vitro* определяли по методу, описан-

Таблица 1. Изоляты *L. pneumophila* и источники их выделения

ST	Источник	Температура, °С	Дата	Город, здание
366*	кран	60	20.01.2014	Сочи, №1, отель
1	кран	41	21.01.2014	Сочи, №2, отель
1	душевой рожок	43	23.01.2014	Сочи, №3, аэропорт
1	душевой рожок	55	23.01.2014	Сочи, №4, санаторий
366*	кран 1	60	24.01.2014	Сочи, №5, санаторий
366*	кран 2	50	24.01.2014	Сочи, №5, санаторий
366*	кран 3	45	24.01.2014	Сочи, №5, санаторий
366*	кран 4	50	24.01.2014	Сочи, №5, санаторий
366*	кран 5	45	24.01.2014	Сочи, №5, санаторий
1324	кран 1	55	25.01.2014	Сочи, №6, отель
1434	кран 2	55	25.01.2014	Сочи, №6, отель
1324	душевой рожок	56	25.01.2014	Сочи, №6, отель
1326	кран 4	52	27.01.2014	Сочи, №7, отель
1326	душевой рожок	53	27.01.2014	Сочи, №7, отель
1326	кран 1	52	27.01.2014	Сочи, №7, отель
1326	кран 2	52	27.01.2014	Сочи, №7, отель
1326	кран 3	50	27.01.2014	Сочи, №7, отель
1326	душевой рожок	50	27.01.2014	Сочи, №7, отель
1	кран 1	62	30.01.2014	Сочи, №8, отель
1	кран 2	60	30.01.2014	Сочи, №8, отель
366*	кран	57	28.01.2014	Сочи, №9, санаторий
87	душевой рожок	52	28.01.2014	Сочи, №9, санаторий
87	кран 1	28	29.01.2014	Сочи, №11, отель
87	кран 2	53	13.02.2014г.	Сочи, №11, отель
1354	кран 5	53	31.01.2014	Сочи, №12, база отдыха
1354	кран 3	53	31.01.2014	Сочи, №12, база отдыха
1354	душевой рожок	53	31.01.2014	Сочи, №12, база отдыха
366*	кран 4	53	31.01.2014	Сочи, №12, база отдыха
1354	кран 1	52	31.01.2014	Сочи, №12, база отдыха
87	кран 2	55	10.02.2014	Сочи, №12, база отдыха
366*	кран	52	31.01.2014	Сочи, №13, база отдыха
1	кран 3	33	03.012.2014	Сочи, №14, дворец спорта
1376	кран 3	50	03.02.2014	Сочи, №15
New	кран	н/д	н/д	Мурманск
2813	кран	н/д	н/д	Ростов-на-Дону
366*	кран	н/д	н/д	Хабаровск
252	кран	н/д	н/д	Калининград
1	душевой рожок	н/д	н/д	Санкт-Петербург
3М	2-14	1	н/д	Ростов-на-Дону
ATCC 33152	1	36	2013	LGS STANDARTS, England

ному Карповой Т.И. с соавт. [22]. Культуру *L. pneumophila* выращивали на среде ЛБА с цистеином в течение 48 ч при температуре 37°C, готовили микробную суспензию с концентрацией примерно 109 м.к. (по Мак-Фарланду) в стерильном физиологическом растворе. По 0,1 мл приготовленной суспензии вносили в 0,1 мл протеозопептонного бульона, разлитого в лунки планшета для иммунологических исследований (по 4 лунки каждого штамма). Планшеты с содержимым инкубировали в течение 96 ч при температуре 28°C. Затем содержимое лунок осторожно удаляли, лунки дважды промывали дистиллированной водой и добавляли в них 150 мкл дистиллированной воды и 15 мкл 1%-го спиртового раствора кристаллвиолета. Планшеты с содержимым инкубировали при температуре 20°C в течение 45 мин. Далее краситель удаляли, лунки дважды промывали дистиллированной водой. В отмытые от несвязавшейся краски лунки вносили по 0,2 мл этилового спирта и выдерживали в течение 45 мин при комнатной температуре. Интенсивность окрашивания спирта в лунках оценивали на фотометре Multiskan EX (Thermo, Голландия) при длине волны 540 нм. Эксперимент повторяли трижды. Средние арифметические значения оптической плотности окрашенного спирта обрабатывали по программе ANOVA в MS Excel.

Степень биопленкообразования оценивали относительно контрольных лунок планшета без культуры микроорганизма по критериям Rodrigues et al., 2010 [23]: отсутствие биопленки при $OD_t \leq OD_k$, слабое биопленкообразование при $OD_k < OD_t \leq 2 \times OD_k$; средняя степень биопленкообразования при $2 \times OD_k < OD_t \leq 4 \times OD_k$; сильно выраженное биопленкообразование при $4 \times OD_k < OD_t$, где OD_t – оптическая плотность тестируемого образца, OD_k – оптическая плотность контрольного образца.

Определение чувствительности к антимикробным препаратам

Чувствительность легионелл к антимикробным препаратам шести функциональных групп – макролидам, фторхинолонам, рифампинам, тетрациклинам, карбапенемам, фениколам – определяли диско-диффузионным методом. Полученные результаты интерпретировали в соответствии с рекомендациями EUCAST V.12.0, 2022. (<http://www.eucast.org>).

Определение вирулентности

Вирулентность изолятов *L. pneumophila* оценивали на морских свинках живой массой 250–300 г, полученных из питомника лабораторных животных «Андреевка» Научного центра биомедицинских технологий Российской академии наук (пос. Андреевка, Солнечногорский р-н, Московская обл., РФ). Животных заражали внутрибрюшинно 1 мл суспензии, содержащей $1,5 \times 10^7$ КОЕ/мл клеток легионелл. Каждым изолятом заражали двух животных. На протяжении всего срока наблюдения (10 дней) у морских свинок измеряли температуру, отмечали общее состояние, поведение, аппетит, проявление клинических симптомов болезни. В случае гибели инфицированного животного его вскрывали, из селезенки и легких готовили мазки-отпечатки, окрашивали их по Граму и микроскопировали. Одновременно по 0,2 мл 10%-й взвеси селезенки погибшего животного высевали на ЛБА и посевы

выращивали при температуре 37°C в течение 24–48 ч. Выросшие культуры идентифицировали на принадлежность к *L. pneumophila* в реакции латекс-агглютинации. Если животные в течение 10 дней после заражения оставались живыми, их умерщвляли в атмосфере CO₂, вскрывали и исследовали паренхиматозные органы на наличие легионелл так же, как от павших животных. Все эксперименты с морскими свинками проводили в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных [24].

Серологическое типирование

Принадлежность изолятов *L. pneumophila* к серологической группе определяли в реакции латекс-агглютинации со специфическими диагностикумами производства фирмы Oxoid (Англия) и ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk, РФ).

Молекулярно-генетическое типирование

Для молекулярно-генетического анализа изолятов *L. pneumophila* использовали два метода: RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) с помощью случайных праймеров OPA11 и Wil2 в условиях, описанных Zimmer [25], и sbt-типирование (Sequence-Based Typing), в соответствии с протоколом Европейской сети надзора за легионеллезом (European Legionnaires Disease Surveillance Network/ELDSNet), основанном на амплификации 7 генов «домашнего хозяйства» (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *tompS*, *proA* и *neuA*) с помощью специфичных праймеров и программы амплификации, описанных ранее Quero et al. [26].

Филогенетический анализ

Дендрограмма, отражающая генетические взаимосвязи изученных изолятов *L. pneumophila*, была сконструирована на основании сравнения последовательностей ДНК генов, используемых для sbt-типирования, с помощью программного обеспечения Mega 6 (<https://www.megasoftware.net/>). Филогенетическая реконструкция была представлена с помощью метода «neighbor-joining», основанного на двухпараметровой модели нуклеотидных замен, ветви были генерированы бутстрапированием 1000 репликаций [27].

ПЦР-детекция генов вирулентности

У изолятов *L. pneumophila* детектировали гены вирулентности *dot*, *lvh* и *rtx*, *hsp60* и *mip* с помощью специфичных праймеров, ранее описанных в работах [13–15, 28].

Секвенирование ДНК и биоинформатический анализ

Секвенирование последовательностей ДНК осуществляли с помощью набора реактивов ABI PRISM®BigDye™ Terminator v.3.1 kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, США). Очищенные продукты анализировали на автоматическом ДНК-секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, США) в ООО SYNTOL (Москва, РФ). Идентификацию аллелей 7 генов «домашнего хозяйства» для SBT-типирования выполняли с помощью веб-ресурса Sequence-Based Typing protocol for typing of *Legionella pneumophila* VERSION 5.0 (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/Legionella-sbt>). Компьютерный анализ последовательностей ДНК проводили с помощью программы Vector NTI 9 (Invitrogen, США).

Таблица 2. Генотипические свойства изолятов *L. pneumophila*

Изолят	Серогруппа	Аллельный профиль SBT							ST	RAPD	Гены вирулентности	Номер в базе данных SBT
		<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>				
ATCC 33152	1	3	4	1	1	14	9	1	36	B	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
007	1	1	4	3	1	1	1	1	1	A	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V9861
0030	1	1	4	3	1	1	1	1	1	A	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V9862
0034	1	1	4	3	1	1	1	1	1	A	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V9863
0225, 0228, 0303	1	1	1	4	3	1	1	1	1	A	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
004, 0042, 0263, 0264, 0155, 0169	2–14	2	10	3	3	9	4	6	366	C ₁	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
0156	2–14	2	10	3	3	9	4	6	366	C ₁	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V9866
0073	2–14	5	1	22	30	6	10	203	1324	D	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V10085
0075	2–14	5	1	22	30	6	10	203	1324	D	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
0074	2–14	12	15	11	18	11	12	201	1434	E	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V10086
0146	2–14	3	10	1	28	14	9	207	1326	F	<i>rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V10086
0147, 0148, 0149, 0245, 0248	2–14	3	10	1	28	14	9	207	1326	F	<i>rtx hsp60 dot mip</i>	
0177	2–14	2	10	3	28	9	4	13	87	G	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V9968
0209, 0444, 0403	2–14	2	10	3	28	9	4	13	87	G	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
0249	2–14	2	10	24	28	4	4	207	1354	C ₂	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V10088
0250, 0251, 0253	2–14	2	10	24	28	4	4	207	1354	C ₂	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
0252, 0262	2–14	2	10	3	3	9	4	6	366	C ₃	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
0308	2–14	1	4	3	16	2	1	208	1376	H	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V10089
1P	2–14	2	10	15	47	9	3	-	New	G ₁	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
2P	1	17	10	15	3	2	3	11	2813	G ₂	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V13044
4K	1	2	10	3	3	9	4	6	366	G ₃	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V13041
5X	1	22	4	3	1	1	30	1	252	H ₃	<i>rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V13042
6C	1	1	4	4	1	1	1	1	1	H ₂	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V13043
3M	2–14	1	4	3	1	1	1	1	1	H ₁	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V13040

SBT – Sequence-Based Typing; ST – сиквенс-тип; RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA; New – новый сиквенс-тип, не идентифицирован.

Размещение в базе данных

В базе данных SBT-*Legionella pneumophila* размещены сиквенс-типы 16 штаммов, которым присвоены регистрационные номера: EULV9861, EULV9862, EULV9863, EULV10085, EULV10086, EULV10087, EULV9966, EULV9968, EULV10088, EULV9967, EULV10089, EULV13040, EULV13041, EULV13042, EULV13043, EULV13044 (табл. 2).

Результаты исследования

Культурально-морфологические и ферментативные свойства

Изученные изоляты *L. pneumophila* (табл. 1) на среде ЛБА с ростовыми добавками через 2 суток культивирования образовывали матовые некруглой формы колонии («ground glass») величиной 1,5–2 мм в диаметре. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдали тонкие, длиной 2–3 мкм, грамотрицательные палочки. Изоляты обладали каталазной активностью, были оксидазоотрицательны, ферментировали крахмал, гидролизировали гиппурат натрия. Они обладали желатиназной и β-лактамазной активностями, образовывали пигмент на среде с тирозином, восстанавливали нитриты, не сбрасывали углеводов и не вызывали аутофлюоресценции. Таким образом, изоляты, независимо от источника и географического места их выделения, имели

типичные для *L. pneumophila* культуральные, морфологические и ферментативные признаки. Каких-либо атипичных свойств у данной группы легионелл обнаружено не было.

Образование биопленок

15 изолятов после 96 ч культивирования при температуре 28°C в протеозопептонном бульоне образовывали биопленки с разной степенью интенсивности (рис. 1).

В наибольшей степени эта способность была выражена у двух изолятов *L. pneumophila* сиквенс-типа ST1, принадлежащих к серогруппе 1: для изолята 0225 (№13), выделенного из воды систем горячего водоснабжения г. Сочи, и у изолята 6C (№2) из г. Санкт-Петербурга. В то же время у изолята 3M (№6) этого же сиквенс-типа (ST1), но принадлежащего к серогруппе 2–14, из г. Ростова-на-Дону, уровень биопленкообразования был почти в 2 раза ниже, чем у изолятов 0225 (№13) и 6C (№2). Сравнительно высокая способность к биопленкообразованию была отмечена для изолята 0042 (№8) сиквенс-типа ST366, выделенного в г. Сочи, и изолята 2P (№5) впервые описанного нами сиквенс-типа ST2813, ассоциированного с серогруппой 2–14. Среднюю способность к биопленкообразованию проявлял изолят 0177 (№12) сиквенс-типа ST87, принадлежащий к серогруппе 2–14.

Таблица 3. Сравнение характеристик сиквенс-типов *L. pneumophila*, выделенных в г. Сочи и других городах РФ

ST	RAPD-тип (количество изолятов)	Серогруппа	Гены вирулентности					Наличие вирулентности	OD ₅₄₀	Степень биоленкообразования	Город (здания)
			<i>lvh</i>	<i>rtx</i>	<i>hsp60</i>	<i>dot</i>	<i>mip</i>				
ST1	A (n = 6)	1	+	+	+	+	+	+	1,80 ± 0,18	высокая	Сочи (2–4, 8, 14)
ST366	C ₁ (n = 6) C ₃ (n = 2)	2–14	+	+	+	+	+	-	0,76 ± 0,06	высокая	Сочи (1, 3–5, 9, 12)
ST87	G (n = 4)	2–14	+	+	+	+	+	-	0,48 ± 0,03	средняя	Сочи (10–12)
ST1326	F (n = 6)	2–14	-	+	+	+	+	-	0,61 ± 0,05	высокая	Сочи (7)
ST1354	C ₂ (n = 4)	2–14	-	+	+	+	+	-	0,63 ± 0,05	высокая	Сочи (12)
ST1324	D (n = 2)	2–14	+	+	+	+	+	-	0,65 ± 0,05	высокая	Сочи (6)
ST1434	E (n = 1)	2–14	+	+	+	+	+	-	0,61 ± 0,04	высокая	Сочи (6)
ST1376	H (n = 1)	2–14	+					-	0,55 ± 0,03	средняя	Сочи (15)
ST?	G1 (n = 1)	2–14	+	+	+	+	-	-	0,52±0,04	средняя	Мурманск
ST2813	G ₂ (n = 1)	1	+	+	+	+	+	+	0,60 ± 0,04	высокая	Ростов-на-Дону
ST1	H ₁ (n = 1)	2–14	+	+	+	+	-	-	0,57 ± 0,04	высокая	Ростов-на-Дону
ST366	G ₃ (n = 1)	1	+	+	+	+	+	+	0,54 ± 0,04	высокая	Хабаровск
ST252	H ₃ (n = 1)	1	-	-	+	+	+	+	0,59 ± 0,04	высокая	Калининград
ST1	H ₂ (n = 1)	1	+	+	+	+	+	+	0,98 ± 0,07	высокая	Санкт-Петербург

ST – сиквенс-тип; RAPD – RAPD-тип; OD₅₄₀ – показатель степени биоленкообразования: единицы оптической плотности окрашенного кристаллвиолетом этилового спирта при длине волны 540 нм; «+» – наличие; «-» – отсутствие; ST? – сиквенс-тип не определен.

Чувствительность к антимикробным препаратам

Все 39 изолятов *L. pneumophila* были чувствительны к эритромицину, кларитромицину, азитромицину, ципрофлоксацину, рифампицину и хлорамфениколу – антибиотикам, которые используют в терапии легионеллеза. Они также были чувствительны к тетрациклину и меропенему.

Серотипирование изолятов *L. pneumophila*

На основании результатов латекс-агглютинации со специфичными диагностикумами выделенные изоляты *L. pneumophila* были отнесены к двум серологическим группам: 1

(n = 10) и 2–14 (n = 29) (табл. 2). Изоляты серогруппы 1 были выделены из образцов воды горячего водоснабжения 5 из 15 общественных зданий г. Сочи: двух отелей (здания №№ 2, 8), санатория (здание №4), международного аэропорта (здание №3) и ледового дворца спорта (здание №14). Изоляты этой серогруппы были выделены также в гг. Калининграде, Санкт-Петербурге, Ростове-на-Дону и Хабаровске. Культуры *L. pneumophila* серогруппы 2–14 были изолированы в 11 зданиях г. Сочи: шести отелях (здания №№ 1, 6–8, 10, 11), двух базах отдыха (здания №№ 12, 13) и пассажирском судне (№15). В двух отелях (здания №№ 8, 11) одновременно были изолированы *L. pneumophila* серогруппы 2–14 и 1. Изоляты серогруппы 2–14 были выделены также в Ростове-на-Дону и Мурманске.

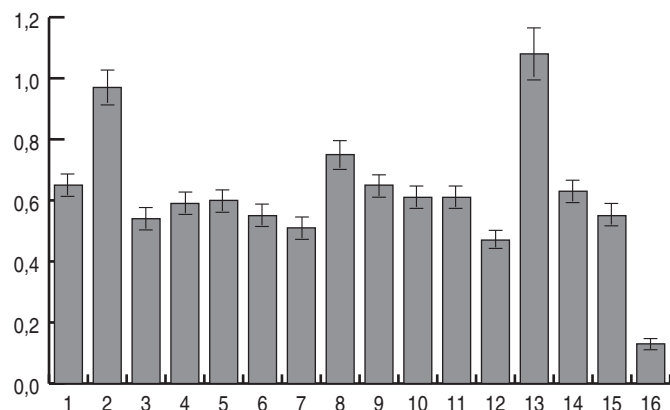


Рис. 1. Степень биоленкообразования у изолятов *L. pneumophila* разных сиквенс-типов в протеозопептонном бульоне после 96 ч инкубирования при температуре 28°C. OD₅₄₀ – единицы оптической плотности окрашенного кристаллвиолетом этилового спирта при длине волны 540 нм.

1 – ATCC33152 (ST36, сер. 1); 2 – 6C (ST1, сер. 1); 3 – 4K (ST366, сер. 1); 4 – 5X (ST252, сер. 1); 5 – 2P (ST2813, сер. 1); 6 – 3M (ST1, сер. 2–14); 7 – 1P (ST н/о, сер. 1); 8 – Д042 (ST366, сер. 2–14); 9 – 0073 (ST1324, сер. 2–14); 10 – 0074 (ST1434, сер. 2–14); 11 – 0146 (ST1326, сер. 2–14); 12 – 0177 (ST87, сер. 2–14); 13 – 0225 (ST1, сер. 1); 14 – 0249 (ST1354, сер. 2–14); 15 – 0308 (ST1376, сер. 2–14); 16 – контроль (питательная среда).

Вирулентность изолятов *L. pneumophila* для морских свинок

Как показали наши исследования, все десять изолятов *L. pneumophila* серотипа 1, выделенные из образцов воды общественных зданий г. Сочи и других городов РФ, оказались вирулентными для морских свинок: животные после заражения их дозой $1,5 \times 10^7$ КОЕ заболели и погибли. Первые клинические признаки болезни у животных проявлялись на 3–4-е сутки после инфицирования: повышенная температура (39,5–41,0°C), вялость, малоподвижность, отсутствие аппетита (не принимали корм); в последующие дни у животных наступало состояние протрации, поражались глаза, на 5–8-е сутки болезни они погибали. При вскрытии у павших морских свинок наблюдали перитонит со скудным фибринозным экссудатом, гиперемию париентальной брюшины с резкой инъекцией сосудов. Печень и селезенка были увеличены с фибринозным налетом на капсуле. В селезенке встречались мелкие очаги некроза. В мазках-отпечатках из селезенки, окрашенных по Граму, отмечали сотни тонких грамотрицательных палочек; от всех павших животных на

среде ЛБА с ростовыми и селективными добавками были выделены культуры, которые давали положительную латекс-агглютинацию со специфическими диагностикумами для определения *L. pneumophila* серотипа 1 и не реагировали с диагностикумом для определения серотипов 2–14.

У животных, зараженных изолятами *L. pneumophila* серогруппы 2–14, на протяжении всего срока наблюдения (10 суток) клинических симптомов болезни не отмечали. При вскрытии умерщвленных животных визуальных патологических изменений внутренних органов не было, в мазках-отпечатках из селезенок, окрашенных по Граму, бактериальные клетки отсутствовали. Выделить на ЛБА культуры легионелл из органов умерщвленных животных также не удалось. Следовательно, в эксперименте не было получено каких-либо свидетельств о вирулентности изолятов *L. pneumophila* серогруппы 2–14 для морских свинок, т.е. они были авирулентными для данного вида животных.

Генотипирование изолятов *L. pneumophila*, выделенных в г. Сочи

Результаты генотипирования изолятов *L. pneumophila*, представленные в табл. 2, 3, показывают, что выделенные из образцов воды систем горячего водоснабжения общественных зданий г. Сочи легионеллы ($n = 33$) принадлежат к 8 сиквенс-типам и 9 RAPD-генотипам. Среди легионелл идентифицированы как ранее описанные в РФ сиквенс-типы ST1 и ST87, так и новые для страны сиквенс-типы: ST366, ST1324, ST1326, ST1354, ST1376 и ST1434. Самыми распространенными сиквенс-типами *L. pneumophila*, выделенными в г. Сочи, являлись сиквенс-типы ST1 и ST366. Изоляты сиквенс-типа ST1 были выделены в 5 из 15 обследованных зданий: двух отелях, санатории, международном аэропорте и ледовом дворце спорта (здания №№ 2, 3, 4, 8 и 14, см. табл. 1, 3). Все изоляты ($n = 6$) этого сиквенс-типа имели одинаковый RAPD-генотип А и принадлежали к серогруппе 1 (табл. 2). Изоляты *L. pneumophila* сиквенс-типа ST366 ($n = 9$) также были выделены из образцов воды 5 из 15 обследованных зданий (табл. 1, 3). При этом 5 из 9 изолятов этого сиквенс-типа были выделены из образцов воды, взятых в разных точках (кранах) одного здания (№5), остальные четыре изолята – из образцов воды четырех зданий (№№ 1, 9, 12, 13) (табл. 1, 3). Все изоляты сиквенс-типа ST366 принадлежали к серогруппе 2–14, однако, в отличие от изолятов сиквенс-типа ST1, были отнесены к двум RAPD-генотипам: 7 изолятов – к генотипу С1, два других – к генотипу С3 (табл. 2, 3).

Следующими по частоте встречаемости в образцах воды общественных зданий были изоляты *L. pneumophila* сиквенс-типа ST87 ($n = 4$), выделенные в 3 из 15 зданий (№№ 10–12), изоляты имели одинаковый RAPD-генотип (G) и принадлежали к серогруппе 2–14 (табл. 2, 3).

Изоляты легионелл сиквенс-типов ST1326 ($n = 6$), ST1354 ($n = 4$), ST1324 ($n = 2$), ST1434 ($n = 1$) и ST1376 ($n = 1$) встречались редко: каждый из них был выделен только из образцов воды одного здания (табл. 1, 3). Все указанные минорные сиквенс-типы имели свои оригинальные RAPD-генотипы и принадлежали к серогруппе 2–14 (табл. 2, 3). Из этой группы сиквенс-типов обращает на себя внимание сиквенс-тип ST1326, который был определен у изолята, выделенного

из образцов воды, взятых в 6 разных точках системы горячего водоснабжения одного здания (№7) (табл. 1), что может говорить о высоком колонизационном потенциале этого сиквенс-типа.

Сиквенс-типы *L. pneumophila*, идентифицированные в других городах России

Изоляты *L. pneumophila* ($n = 6$) были выделены из образцов воды систем горячего водоснабжения пяти городов РФ: Калининграда, Санкт-Петербурга, Мурманска, Ростова-на-Дону и Хабаровска. Результаты SBT-генотипирования показали, что изолят 5X, выделенный в г. Калининграде (СЗФО), принадлежит к ранее не описанному в РФ сиквенс-типу ST252; изолят 6С, выделенный в г. Санкт-Петербурге (СЗФО), – к сиквенс-типу ST1. Оба сиквенс-типа, ST252 и ST1, были ассоциированы с серогруппой 1. У изолята 1P, выделенного в г. Мурманске (СЗФО), сиквенс-тип установить не удалось, поскольку у него не определился седьмой ген «домашнего хозяйства» – *neuA*. В г. Ростове-на-Дону (ЮФО) были изолированы две культуры легионелл: изолят 2P и изолят 3M. Изолят 2P был отнесен нами к новому сиквенс-типу, зарегистрированному в базе данных по SBT-типированию *L. pneumophila* под номером EULV13044 как сиквенс-тип ST2813; изолят этого нового сиквенс-типа принадлежал к серогруппе 1. Второй изолят, 3M, относился к сиквенс-типу ST1 и принадлежал к серогруппе 2–14. Изолят 4K, выделенный в г. Хабаровске (ДВФО), принадлежал к впервые описанному в РФ сиквенс-типу ST366, который, как отмечалось выше, был одним из доминирующих сиквенс-типов *L. pneumophila* в г. Сочи. Однако, в отличие от изолятов сиквенс-типа ST366 серогруппы 2–14, выделенных в г. Сочи, изолят 4K принадлежал к серогруппе 1. Все 6 изолятов, описанных выше, имели уникальные RAPD-генотипы (табл. 2, 3).

Детекция генов вирулентности *L. pneumophila*

Детерминанты вирулентности были определены у 39 изолятов *L. pneumophila*, включая 33 изолята, выделенных в г. Сочи, и 6 изолятов, выделенных в пяти других городах РФ. Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что выделенные в г. Сочи изоляты шести сиквенс-типов, в том числе доминирующих ST1, ST366 и ST87 и минорных ST1324, ST1434 и ST1376, содержали все пять определяемых в работе детерминант вирулентности: *lvh*, *rtx*, *hsp60*, *dot* и *tip*. У изолятов минорных сиквенс-типов ST1326 и ST1354 было выявлено только четыре гена вирулентности – ген *lvh* у них отсутствовал. У выделенных в гг. Ростове-на-Дону, Хабаровске и Санкт-Петербурге изолятов 3M, 4K и 6С, имевших соответственно сиквенс-типы ST1, ST366 и ST1, также были идентифицированы все пять генов вирулентности. Детектируемые гены вирулентности были обнаружены и у изолята 2P (г. Ростов-на-Дону) нового сиквенс-типа ST2813, и у изолята 1P (г. Мурманск) неидентифицированного сиквенс-типа. У изолята 5X сиквенс-типа ST252 (г. Калининград) были детектированы лишь четыре гена вирулентности – ген *lvh*, так же как и у минорных сиквенс-типов ST1326 и ST1354 (г. Сочи), отсутствовал.

Таким образом, из 10 изученных нами сиквенс-типов *L. pneumophila* семь (ST1, ST366, ST87, ST1324, ST1434,

Таблица 4. Количество изолятов *L. pneumophila* детектированных в данной работе сиквенс-типов в других странах мира (база данных SBT *L. pneumophila* на 12.07.2019).

ST	Страны мира	Источники выделения	
		Клинический материал, шт.	Окружающая среда, шт.
ST1	Многие страны мира	915	713
ST87	13 стран: Германия, Испания, Бельгия, Латвия, Канада, Франция, Польша, Дания, Израиль, Греция, Япония, Чехия, Швеция	20	43
ST252	4 страны: США, Тайвань, Франция, Нидерланды	6	1
ST366	4 страны: Италия, Великобритания, Латвия, Канада,	3	5
ST1324	8 стран: Канада, Великобритания, Чехия, Германия, Китай, Франция, Швейцария, Латвия	15	12
ST1326	3 страны: Великобритания, Канада, Германия	4	5
ST1354	5 стран: Чехия, Латвия, Германия, Канада, Япония	2	22
ST1376	3 страны: Германия, Чехия, Швеция	3	9
ST1434	2 страны: Швейцария, Китай	1	2
ST2813 (новый)	Данные отсутствуют	0	0

ST – сиквенс-тип.

ST1376 и ST2813) были ассоциированы с пятью детектируемыми генами вирулентности (*lvh*, *rtx*, *hsp60*, *dot* и *mip*), а три сиквенс-типа (ST1326, ST1354 и ST252) – с четырьмя, так как у них отсутствовал важный для возбудителя легионеллеза ген *lvh*.

В табл. 3 отражены основные характеристики сиквенс-типов *L. pneumophila*, выделенных в г. Сочи и других городах РФ. Выявленные между ними различия по частоте распространения в системах горячего водоснабжения, по всей вероятности, отражают и разную их этиологическую значимость в качестве возбудителей легионеллезной инфекции. В табл. 4 представлены данные по частоте встречаемости детектированных нами сиквенс-типов *L. pneumophila* в других странах мира, с учетом источника их выделения (клинический материал или окружающая среда). Такие сведения важны для оценки патогенного потенциала каждого выявленного нами сиквенс-типа.

Из табл. 4 следует, что изоляты *L. pneumophila* доминирующих в г. Сочи сиквенс-типов ST1 и ST87 довольно часто выделялись во многих странах мира, как из клинического материала, так и из объектов окружающей среды. Особенно это касается сиквенс-типа ST1, ассоциированного с серогруппой 1. Два минорных (в г. Сочи) сиквенс-типа ST1324 и ST1354 выявлены в девяти и пяти странах соответственно, в то время как доминирующий в г. Сочи сиквенс-тип ST366 и минорные сиквенс-типы ST1326, ST1434 и ST1376 – лишь в нескольких странах и представлены в базе данных незначительным числом изолятов. Это же справедливо и в отношении изолята сиквенс-типа ST252, выделенного в г. Калининграде. Тем не менее важно отметить тот факт, что все детектированные в нашей работе сиквенс-типы *L. pneumophila*, включая минорные (за исключением нового сиквенс-типа, описанного впервые в данном исследовании), были выделены в других странах мира не только из объектов окружающей среды, но и из клинического материала.

Филогенетический анализ

Сравнительный анализ суммарного пула нуклеотидных последовательностей семи генов, используемых при SBT-

типировании *L. pneumophila*, показывает, что изученные нами изоляты формируют на дендрограмме две дискретные филогенетические группы (рис. 2).

В одну группу входят изоляты трех доминирующих, часто встречающихся в г. Сочи сиквенс-типов ST1, ST87 и ST366, а также изоляты сиквенс-типов ST1, ST366 и ST252 и нового сиквенс-типа ST2813, выделенных в гг. Ростове-на-Дону, Санкт-Петербурге, Калининграде и Хабаровске, а также контрольный штамм *L. pneumophila* ATCC33152 сиквенс-типа ST36. Вторую филогенетическую группу формируют минорные, редко выявлявшиеся в г. Сочи изоляты ($n = 14$) пяти сиквенс-типов: ST1324, ST1326, ST1354, ST1376 и ST1434. Данные филогенетического анализа свидетельствуют не только о генетическом разнообразии популяции *L. pneumophila*, циркулирующих в системах горячего водоснабжения г. Сочи, но и о существовании среди этой популяции легионелл отдельных генетически родственных групп (линий), роль которых в этиологии легионеллеза может быть различной.

Сиквенс-типы *L. pneumophila*, детектированные в РФ за все время наблюдений (2005–2019 гг.)

Генетический мониторинг (SBT-типирование) *L. pneumophila* начали проводить в РФ с 2005 г., когда в г. Верхняя Пышма Свердловской обл. произошла крупная вспышка легионеллезной инфекции [29]. Представленные ниже данные по сиквенс-типам *L. pneumophila*, выявленных в РФ за все время наблюдений, получены на основании анализа работ российских исследователей и базы данных по SBT-типированию *L. pneumophila*. Как следует из рис. 3, за все время наблюдений в различных географических и климатических зонах РФ были выявлены легионеллы 66 сиквенс-типов: ST1, ST7, ST9, ST17, ST36, ST42, ST51, ST59, ST80, ST87, ST110, ST114, ST145, ST146, ST147, ST191, ST246, ST252, ST292, ST308, ST310, ST319, ST320, ST321, ST322, ST323, ST324, ST325, ST326, ST327, ST329, ST338, ST366, ST377, ST423, ST498, ST500, ST514, ST515, ST516, ST517, ST518, ST519, ST520, ST521, ST522, ST536, ST554, ST586, ST587, ST588, ST589, ST590, ST677, ST683, ST684,

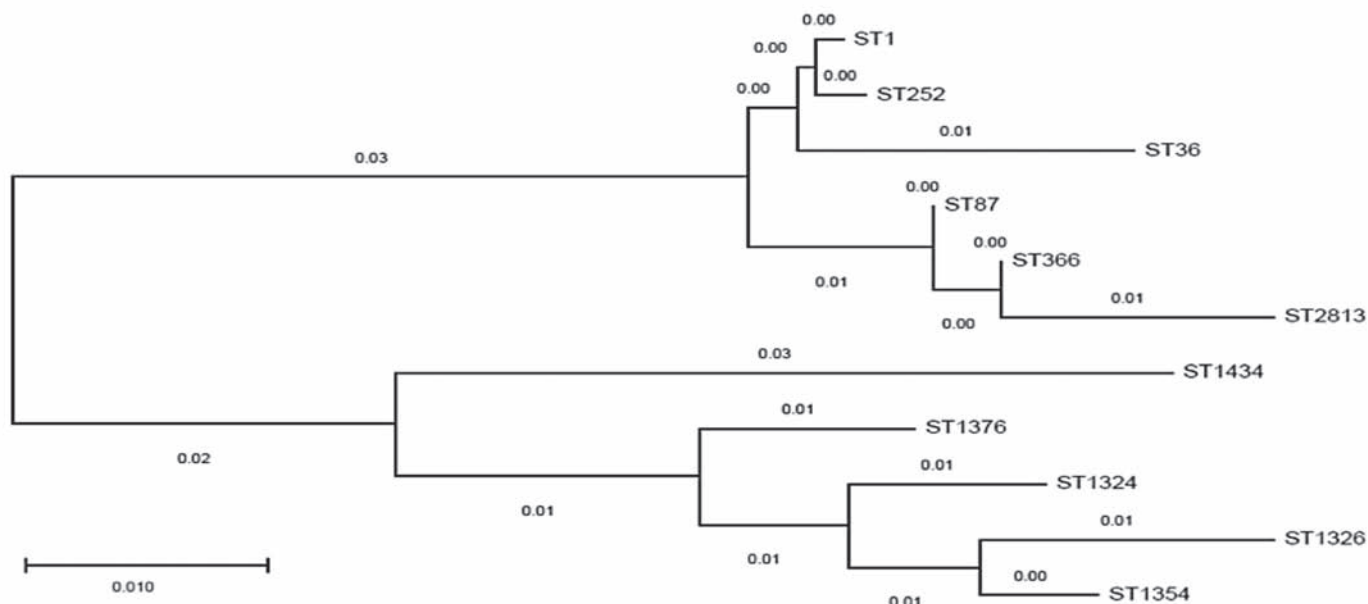


Рис. 2. Дендрограмма сиквенс-типов *L. pneumophila*.

ST727, ST728, ST729, ST1324, ST1326, ST1434, ST1354, ST1376, ST1489 и ST2813. Среди них только восемь сиквенс-типов были ассоциированы с клиническими изолятами: ST146 и ST308 изолятов, выделенных от больных при эпидемической вспышке легионеллеза в г. Верхняя Пышма; ST500 изолята, выделенного от пациента, больного легионеллезом путешественников, в г. Казани (Приволжский федеральный округ); ST36, ST42 и ST87 изолятов, выделенных от умерших людей при внутрибольничном легионеллезе в г. Москва [30]; ST1489 и ST110 клинических изолятов, происхождение которых не известно. Остальные 58 сиквенс-типов были ассоциированы с изолятами *L. pneumophila*, выделенными из различных объектов окружающей среды, в основном из образцов воды систем горячего водоснабжения общественных зданий, градирен промышленных предприятий и бассейнов.

Наибольшее число сиквенс-типов *L. pneumophila* ($n = 43$) было выявлено в УФО: в гг. Верхняя Пышма, Екатеринбург, Первоуральске и Артемовске. В ЦФО (г. Москва, Московская и Тверская области) было идентифицировано 15 сиквенс-типов *L. pneumophila*, в ЮФО (гг. Сочи и Ростов-на-Дону) – 9 сиквенс-типов, в том числе один новый, идентифицирован-

ный нами сиквенс-тип ST2813. В Ханты-Мансийском автономном округе (УФО) детектировано четыре сиквенс-типа, в республике Татарстан – два сиквенс-типа. По одному сиквенс-типу было выявлено в гг. Калининграде, Санкт-Петербурге и Хабаровске. Важно отметить, что из 66 сиквенс-типов, детектированных в РФ за все время наблюдений, 21 сиквенс-тип был ассоциирован с эпидемически важной серогруппой 1: ST1, ST7, ST9, ST36, ST42, ST59, ST110, ST145, ST159, ST246, ST252, ST308, ST320, ST324, ST366, ST498, ST500, ST515, ST521, ST729, ST1489 и ST2813 (рис. 3).

Анализ сиквенс-типов *L. pneumophila*, выявленных в трех разных регионах РФ (УФО, ЦФО и ЮФО), указывает на существенные различия в структуре циркулирующих в этих регионах сиквенс-типов. Так, из 43 сиквенс-типов, выявленных в УФО, только один ST87 встречался в двух других регионах: ЦФО и ЮФО. Из 17 сиквенс-типов, выявленных в ЦФО, только два (ST1 и ST87) были детектированы в ЮФО. Следует заметить, что оба эти сиквенс-типа относятся к группе сиквенс-типов *L. pneumophila*, наиболее часто встречающихся во многих странах мира. Дальнейшие исследования по изучению разнообразия сиквенс-типов *L. pneumophila*, циркулирующих в округах РФ, позволят приблизиться к ответу на вопрос, насколько географическое положение региона, его климатические условия могут влиять на генетическое разнообразие формирующихся в регионах популяций *L. pneumophila*.

Обсуждение

В январе-феврале 2014 г. в г. Сочи, столице XIV Зимних Олимпийских Игр, был проведен одномоментный мониторинг *L. pneumophila* в образцах воды систем горячего водоснабжения 50 общественных зданий города. В результате исследований из образцов воды 15 обследованных зданий (т.е. в 30% случаев) были выделены 33 изолята *L. pneumophila*. Кроме того, были изучены свойства еще шести культур *L. pneumophila*, выделенных в других регионах РФ. Все 39 изученных изолята имели типичные для *L. pneumophila* культуральные, морфоло-

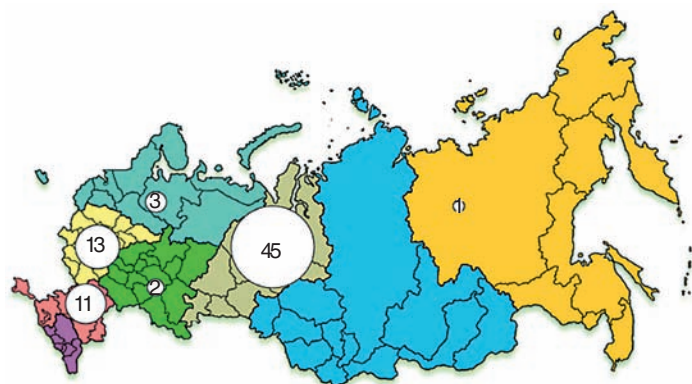


Рис. 3. Количество изолятов *L. pneumophila*, выделенных в федеральных округах РФ: Уральском ($n = 45$), Центральном ($n = 13$), Южном ($n = 11$), Северо-Западном ($n = 3$), Приволжском ($n = 2$) и Дальневосточном ($n = 1$).

гические и ферментативные свойства. Изоляты были чувствительны к эритромицину, кларитромицину, рифампицину и хлорамфиниолу – основным антибиотикам, применяемым для лечения легионеллеза. Следует заметить, что в РФ, как и в других странах, до настоящего времени не было сообщений о выделении легионелл, устойчивых к антибиотикам, хотя во всех странах уже длительное время широко используют антимикробные препараты. Отрицательные результаты по обнаружению антибиотикорезистентных *L. pneumophila*, тем не менее, не являются основанием для прекращения мониторинговых исследований их чувствительности к антимикробным препаратам, поскольку сегодня мы не можем исключить внезапного появления резистентных легионелл в опасных для человека водных объектах.

Особый интерес, на наш взгляд, представляют результаты, полученные при изучении сиквенс-типов изолятов *L. pneumophila*, циркулировавших в январе–феврале 2014 г. в системах горячего водоснабжения г. Сочи. Как оказалось, выделенные в этот период изоляты *L. pneumophila* были представлены сравнительно незначительным числом сиквенс-типов – всего восемью сиквенс-типами, которые различались между собой по частоте их выявления в исследуемых образцах воды (табл. 3). Три сиквенс-типа (ST1, ST366 и ST87) являлись доминирующими: они были выделены из образцов воды 12 из 15 «легионелла-позитивных» зданий (табл. 3), т.е. в 80% случаев. При этом изоляты сиквенс-типов ST1 и ST366 были выделены каждый в пяти различных зданиях, а изоляты сиквенс-типа ST87 – в трех зданиях. Изоляты пяти минорных сиквенс-типов (ST1324, ST1326, ST1354, ST1376 и ST1434) были выявлены в трех зданиях, т.е. в 20% случаев, причем каждый сиквенс-тип был идентифицирован только в пробах воды одного здания (табл. 1, 3). Разница в частоте обнаружения изолятов легионелл доминирующих и минорных сиквенс-типов косвенно говорит об их существенных биологических и генетических различиях. О генетических различиях этих двух групп сиквенс-типов свидетельствует также их филогенетический анализ: на дендрограмме (рис. 1) доминирующая и минорная группы формируют две дискретные ветви. Следовательно, в январе–феврале 2014 г. системы горячего водоснабжения 15 из 50 общественных зданий г. Сочи были «оккупированы» преимущественно тремя филогенетически близкими сиквенс-типами *L. pneumophila*: ST1, ST366 и ST87.

Изоляты *L. pneumophila* доминирующего сиквенс-типа ST1 ($n = 6$) были выделены в 5 из 15 «легионелла-позитивных» зданий г. Сочи, т.е. в 33% случаев. Несмотря на разные источники выделения, все 6 изолятов ST1 имели один RAPD-генотип D и относились к серогруппе 1; в их геномах присутствовали все пять детектируемых генов патогенности: *lvh*, *rtx*, *hsp60*, *dot* и *mip*, все изоляты вызывали гибель морских свинок (табл. 3). Для изолята этого сиквенс-типа была отмечена самая высокая интенсивность биопленкообразования, которая, вероятно, и обеспечивает колонизационную активность легионелл этого сиквенс-типа (рис. 1). *L. pneumophila* сиквенс-типа ST1, как это следует из базы данных по SBT-типированию, широко распространены во многих странах мира, как в клиническом материале при различных формах легионеллеза, так и в объектах внешней среды. Изоляты ST1 очень часто ассоциированы с серогруппой 1,

которая, как известно, является основной этиологической причиной групповых и спорадических случаев легионеллезной инфекции. Таким образом, циркулировавшие в системе горячего водоснабжения общественных зданий г. Сочи изоляты *L. pneumophila* сиквенс-типа ST1 серогруппы 1 представляли реальную опасность для людей.

Изоляты *L. pneumophila* сиквенс-типа ST366 ($n = 9$), как и изоляты ST1, были выделены в 5 зданиях: 5 изолятов из пяти разных точек забора воды одного здания, остальные четыре – по одному изоляту из каждого из четырех зданий (табл. 1, 3). Столь высокая колонизационная активность легионелл сиквенс-типа ST366 согласуется с их сравнительно высокой способностью в опытах *in vitro* образовывать биопленки (рис. 1). Изоляты сиквенс-типа ST366, в отличие от других детектированных в работе сиквенс-типов, оказались генетически неоднородными и подразделялись на два RAPD-генотипа: 7 изолятов имели генотип C1, два других – генотип C3 (табл. 2, 3). Деление изолятов на два RAPD-генотипа свидетельствует, что современная схема SBT-типирования *L. pneumophila* на основе семи генов «домашнего хозяйства» в отдельных случаях не может дискриминировать генетически близкие изоляты легионелл. Не исключено, что потребуются дальнейшее совершенствование этой системы путем расширения набора генов для SBT-типирования, как это произошло в 2007 г., когда в схему шестигенного SBT-типирования *L. pneumophila* был включен новый седьмой ген [31]. Все 9 изолятов ST366 принадлежат к серогруппе 2–14, что отличает их от изолятов этого сиквенс-типа, представленных в базе данных по SBT-типированию *L. pneumophila* [32, 33], которые ассоциированы исключительно с серогруппой 1. Изученные нами изоляты ST366 имели в своих геномах, как и изоляты ST1, те же 5 детектируемых генов вирулентности, тем не менее эти изоляты были непатогенными для морских свинок (табл. 3). Свойства изученных нами изолятов ST366 и сведения, представленные в базе данных, свидетельствуют о биологическом и генетическом разнообразии изолятов этого сиквенс-типа и, возможно, об их различной роли в патологии человека. Данные о распространении *L. pneumophila* ST366 весьма ограничены: на 12 июля 2019 г. они были выявлены в четырех странах: Италии, Великобритании, Латвии и Канаде (табл. 4) и представлены в базе всего 8 изолятами, три из которых клинические, а пять выделены из окружающей среды; все 8 изолятов принадлежали к серогруппе 1. Поскольку данные о выделении изолятов ST366 серогруппы 2–14 из клинического материала в базе данных отсутствуют, делать заключение о патогенном потенциале изученных нами изолятов сиквенс-типа ST366 серогруппы 2–14 пока преждевременно. Необходимы дальнейшие наблюдения за *L. pneumophila* ST366 серогруппы 2–14.

Изоляты *L. pneumophila* сиквенс-типа ST87 ($n = 4$), составляющие вместе с изолятами ST1 и ST366 доминирующую группу и имеющие с ними, как это видно из дендрограммы (рис. 2), филогенетическое родство, были выделены из образцов воды 3 из 15 «легионелла-позитивных» зданий г. Сочи (табл. 3), т.е. в 20% случаев. Все 4 изолята ST87 были отнесены к одному RAPD-генотипу G и к серогруппе 2–14, что говорит об одном источнике легионелл этого сиквенс-типа для трех зданий. Как и у изолятов ST1 и ST366, у них

были детектированы все 5 генов вирулентности, тем не менее они были непатогенными для морских свинок; изоляты этого сиквенс-типа были способны формировать *in vitro* биопленку, но интенсивность ее образования была низкой. В базе данных по SBT-типированию *L. pneumophila* сиквенс-типа ST87 на 12 июля 2019 г. были представлены 63 изолятами, выделенными в 10 странах Европейского союза, а также в РФ, Канаде, Японии и Израиле (табл. 4). Из 63 изолятов 20 были выделены из клинического материала при различных формах легионеллеза: внебольничном, нозокомиальном и легионеллезе путешественников. Российскими исследователями была установлена прямая связь между штаммами *L. pneumophila* ST87, выделенными из образцов воды системы горячего водоснабжения Гематологического центра г. Москвы (РФ), и групповой вспышкой ($n = 4$) легионеллеза среди больных отделения реанимации и интенсивной терапии, закончившейся для них летально [30]. Приведенные выше данные являются веским основанием для того, чтобы сделать заключение о серьезном патогенном потенциале изученных нами изолятов *L. pneumophila* сиквенс-типа ST87, выделенных из образцов воды систем горячего водоснабжения г. Сочи, для людей.

Изоляты *L. pneumophila* минорных сиквенс-типов ST1324, ST1326, ST1354, ST1376 и ST1434, каждый из которых был выделен из образцов воды только одного здания г. Сочи, имели свои, характерные только для них, RAPD-генотипы и принадлежали к серогруппе 2–14 (табл. 2, 3). Все они были способны образовывать в условиях *in vitro* биопленки (рис. 1). На дендрограмме легионеллы минорных сиквенс-типов формируют одну ветвь, что говорит об их филогенетическом родстве (рис. 2). В то же время изоляты минорных сиквенс-типов можно разделить на две подгруппы: изоляты, которые в своих геномах содержат все пять генов вирулентности (сиквенс-типы ST1324, ST1376 и ST1434), и изоляты, в геномах которых отсутствует ген *lvh* (сиквенс-типы ST1326 и ST1354). Изоляты ST1324, ST1376 и ST1434 представлены в базе данных по SBT-типированию 15, 2 и 3 изолятами соответственно. Сиквенс-типы ST1324 были выделены в 6 странах: Великобритании, Канаде, Германии, Франции и Китае, изоляты ST1434 – в Чехии и Китае, изоляты ST1376 – в Германии (табл. 4). Все три сиквенс-типа *L. pneumophila* были определены у изолятов, выделенных как из клинического материала, так и из объектов внешней среды. Полученные нами данные о свойствах изолятов ST1324, ST1376 и ST1434, выделенных в г. Сочи, и сведения об этих сиквенс-типах, представленные в базе данных, говорят об их патогенном потенциале для человека, хотя знания об этих сиквенс-типах, особенно ST1376 и ST1434, на сегодня весьма ограничены. Изоляты *L. pneumophila* ST1326, ST1354, не имеющие гена вирулентности *lvh*, представлены в базе данных по SBT-типированию, соответственно, 7 и 13 изолятами, выделенными из объектов внешней среды и из клинического материала (табл. 4). Поскольку в изолятах этих сиквенс-типов отсутствует ген вирулентности *lvh*, судить об их патогенном потенциале не представляется возможным.

При генотипировании шести изолятов *L. pneumophila*, выделенных в других регионах РФ (табл. 3) показано, что два из них (3М из г. Ростова-на-Дону и 6С из г. Санкт-Петербурга) принадлежали к сиквенс-типу ST1, изолят 5Х из г. Калинин-

града – к сиквенс-типу ST252. Изолят 4К, выделенный в г. Хабаровске, отнесен к сиквенс-типу ST366, но, в отличие от изолятов ST366, выделенных в г. Сочи, к серогруппе 1, так же как изоляты этого сиквенс-типа, выделенные в других странах. Изолят 2Р из г. Ростова-на-Дону принадлежал к новому сиквенс-типу ST2813, зарегистрированному нами в базе данных по SBT-типированию *L. pneumophila* под номером EULV13044. У изолята 1Р из г. Мурманска установить сиквенс-тип не удалось (табл. 2). Изоляты 6С, 5Х, 4К и 2Р сиквенс-типов ST1, ST252, ST366 и нового сиквенс-типа ST2813 отнесены к серогруппе 1, а изолят 3М сиквенс-типа ST1 – к серогруппе 2–14. Изоляты всех сиквенс-типов, за исключением ST252, в своих геномах содержали все пять детектируемых генов вирулентности, тем не менее вирулентными для морских свинок оказались лишь изоляты серогруппы 1, в том числе изолят сиквенс-типа ST252, не имеющий гена *lvh*. Вирулентность изолята ST252 для морских свинок говорит об отсутствии прямой связи между наличием в штамме гена вирулентности *lvh* и его патогенностью для морских свинок. Все 6 описанных изолятов, в том числе изолят нового сиквенс-типа ST2813, были способны формировать в условиях *in vitro* биопленки, эта способность в наибольшей степени была выражена у изолята сиквенс-типа 1, выделенного в г. Санкт-Петербурге. Каждый из 6 изолятов имел специфичный только для него RAPD-генотип. Учитывая данные о свойствах изолятов 3М, 6С и 4К, относящихся к сиквенс-типам ST1 и ST366 и принадлежащих к серогруппе 1, а также сведения об этих сиквенс-типах в базе данных по SBT-типированию *L. pneumophila*, можно говорить о потенциальной опасности их для человека. Изоляты ST252, согласно базе данных по SBT-типированию *L. pneumophila* на 12 июля 2019 г., выделены в четырех странах (США, Тайвань, Франция и Нидерланды) и представлены 7 штаммами, шесть из которых являются клиническими. Выделенный нами изолят ST252 серогруппы 1, как мы уже отмечали, хотя и был вирулентным для морских свинок, но у него отсутствовал важный для легионелл ген вирулентности *lvh*, поэтому судить о его патогенном потенциале для людей сложно. Свойства изолята нового сиквенс-типа ST2813 серогруппы 1 также предполагают наличие у него патогенного потенциала для человека, хотя только дальнейшие исследования могут подтвердить или опровергнуть этот прогноз.

Проведенный нами анализ литературных данных по SBT-типированию *L. pneumophila* в РФ показывает, что за весь период наблюдений (2005–2019 гг.) в нашей стране было детектировано 66 разных сиквенс-типов *L. pneumophila*, из которых только 8 были выделены из клинического материала. Наибольшее число сиквенс-типов выявлено в УФО ($n = 43$), в ЦФО и ЮФО было выявлено 15 и 9 сиквенс-типов соответственно (рис. 3). Примечательно, что перечень *L. pneumophila* разных сиквенс-типов, выделенных в этих регионах, сильно различался. Этот факт позволяет высказать предположение, что географическое расположение региона, его климатические условия оказывают существенное влияние на генетическое разнообразие формирующихся в регионах популяций *L. pneumophila*, в том числе на состав (набор) сиквенс-типов.

Одновременное использование для генотипирования *L. pneumophila* двух методов – SBT и RAPD-типирования –

позволило нам выявить интересный факт: изоляты одного и того же сиквенс-типа и одной и той же серогруппы, но выделенные в разных регионах РФ, не были генетически идентичными, они принадлежали к разным RAPD-генотипам. Так, изоляты сиквенс-типа ST1 ($n = 6$) серогруппы 1, выделенные из образцов воды систем горячего водоснабжения г. Сочи, отнесены к RAPD-генотипу А, в то время как изолят этого же сиквенс-типа и этой же серогруппы, но выделенный в г. Санкт-Петербурге, принадлежал к RAPD-генотипу H2; к третьему RAPD-генотипу отнесен изолят сиквенс-типа ST1 серогруппы 2–14, выделенный в г. Ростове-на-Дону. Генетически различаются и изоляты сиквенс-типа ST366 серогруппы 2–14, выделенные в г. Сочи, среди которых 6 изолятов имели RAPD-генотип С1, а два – С3; другой RAPD-генотип (G3) имел изолят ST366 серогруппы 1, выделенный в г. Хабаровск. Каковы генетические отличия изолятов *L. pneumophila*, имеющих один и тот же сиквенс-тип, но различающихся по RAPD-генотипу, и как эти отличия могут влиять на их биологические свойства, в том числе на их патогенный потенциал для человека, вероятно, можно будет понять после биоинформатического анализа результатов полногеномного секвенирования таких изолятов.

Основной причиной циркулирования *L. pneumophila* в системах горячего водоснабжения г. Сочи, вероятнее всего, явилась сравнительно невысокая температура воды в них (диапазон температур составлял от 28 до 61°C) (табл. 1), которая была вполне благоприятной для роста и размножения легионелл. Об этом свидетельствует тот факт, что последующее повышение температуры горячей воды в г. Сочи до 80°C позволило освободить системы горячего водоснабжения от легионелл [34]. Мониторинг *L. pneumophila* в системах горячего водоснабжения, изучение принадлежности их к серогруппе и сиквенс-типу позволяет с большей долей вероятности оценить патогенный потенциал выделенных легионелл и провести необходимые мероприятия по их элиминации из водных источников, предупредив тем самым возможное возникновение легионеллезной инфекции.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of Rospotrebnadzor

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Онищенко ГГ, Покровский ВИ, Тартаковский ИС, Малеев ВВ, Лазикова ГФ, Чистякова ГГ, и др. Современные взгляды на эпидемиологию легионеллеза: алгоритм действия при эпидемических вспышках и профилактическом мониторинге. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008;2:1-10.
2. Онищенко ГГ, Демина ЮВ, Тартаковский ИС. Современная концепция организации эпидемиологического надзора за легионеллезной инфекцией. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009;5:85-91.
3. Тартаковский ИС, Гинцбург АЛ, Лазикова ГФ, Чистякова ГГ, Демина ЮВ, Карпова ТИ, и др. Стандарты лабораторной диагностики легионеллеза и их применение во время эпидемической вспышки пневмоний в г. Верхняя Пышма. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008;2:16-20.
4. Hern LT, Tee WY, Khan TM. *Legionella pneumophila* - the causative agent of Legionnaires' disease. PMMB. 2021;4:1-12.
5. Chambers ST, Slow S, Scott-Thomas A, Murdoch DR. Legionellosis Caused by Non-*Legionella pneumophila* Species, with a Focus on *Legionella longbeachae*. Microorganisms. 2021;9(2):291-8. DOI: 10.3390/microorganisms9020291
6. Gattuso G, Rizzo R, Lavoro A, Spoto V, Porciello G, Montagnese C, et al. Overview of the Clinical and Molecular Features of *Legionella Pneumophila*: Focus on Novel Surveillance and Diagnostic Strategies. Antibiotics (Basel). 2022 Mar 9;11(3):370. DOI: 10.3390/antibiotics11030370
7. Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. Clin Microbiol Rev. 2010 Apr;23(2):274-98. DOI: 10.1128/CMR.00052-09
8. Keše D, Obreza A, Rojko T, Kišek TC. *Legionella pneumophila*-Epidemiology and Characterization of Clinical Isolates, Slovenia, 2006–2020. Diagnostics (Basel). 2021 Jul 2;11(7):1201. DOI: 10.3390/diagnostics11071201
9. Christensen LM, Sule P, Cirillo SLG, Strain M, Plumlee Q, Adams LG, Cirillo JD. Legionnaires' Disease Mortality in Guinea Pigs Involves the p45 Mobile Genomic Element. J Infect Dis. 2019 Oct 8;220(10):1700-1710. DOI: 10.1093/infdis/jiz340
10. Тартаковский ИС, Синопальников АИ, Демина ЮВ, Груздева ОА. Профилактика легионеллеза как основа для нового направления профилактики нозокомальных инфекций. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2010;12(4):273-283.
11. Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, et al. *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. Appl Environ Microbiol. 2005 Oct;71(10):5805-13. DOI: 10.1128/AEM.71.10.5805-5813.2005
12. Sciuto EL, Laganà P, Filice S, Scalese S, Libertino S, Corso D, et al. Environmental Management of *Legionella* in Domestic Water Systems: Consolidated and Innovative Approaches for Disinfection Methods and Risk Assessment. Microorganisms. 2021 Mar 11;9(3):577. DOI: 10.3390/microorganisms9030577
13. Segal G, Russo JJ, Shuman HA. Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. Mol Microbiol. 1999 Nov;34(4):799-809. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01642.x.
14. Cirillo SL, Bermudez LE, El-Etr SH, Duhamel GE, Cirillo JD. *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence. Infect Immun. 2001 Jan;69(1):508-17. DOI: 10.1128/IAI.69.1.508-517.2001
15. Fernandez RC, Logan SM, Lee SH, Hoffman PS. Elevated levels of *Legionella pneumophila* stress protein Hsp60 early in infection of human monocytes and L929 cells correlate with virulence. Infect Immun. 1996 Jun;64(6):1968-76. DOI: 10.1128/iai.64.6.1968-1976.1996.
16. Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Engleberg NC. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. Infect Immun. 1989 Apr;57(4):1255-62. DOI: 10.1128/iai.57.4.1255-1262.1989
17. Talapko J, Frauenheim E, Juzbašić M, Tomas M, Matić S, Jukić M, et al. *Legionella pneumophila*-Virulence Factors and the Possibility of Infection in Dental Practice. Microorganisms. 2022 Jan 24;10(2):255. DOI: 10.3390/microorganisms10020255
18. Chauhan D, Shames SR. Pathogenicity and Virulence of *Legionella*: Intracellular replication and host response. Virulence. 2021 Dec;12(1):1122-44. DOI: 10.1080/21505594.2021.1903199
19. Pancer K. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water distribution systems as a complementary element of risk

- assessment of legionellosis in Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2013;20(3):436–40.
20. Карпова ТИ, Тартаковский ИС. Особенности эпидемиологии и лабораторной диагностики легионеллеза. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2015;4(13):51–58.
 21. Тартаковский ИС, Галстян ГМ, Карпова ТИ, Катрыш СА, Дронина ЮЕ, Садретдинова ОВ. Методические особенности диагностики легионеллезной пневмонии в лечебно-профилактических учреждениях. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2012;14(2):100–6.
 22. Карпова ТИ, Дронина ЮЕ, Тартаковский ИС, Романова ЮМ, Гинцбург АЛ. Природные биопленки легионелл и их роль в эпидемиологии инфекции: методы изучения и моделирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008;2:13–6.
 23. Rodrigues LB, Dos Santos LR, Tagliari VZ, Rizzo NN, Trenhago G, de Oliveira AP, et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Braz J Microbiol*. 2010 Oct;41(4):1082–5. DOI: 10.1590/S1517-838220100004000029
 24. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academy Press., Copyright 1996. ISBN 0-309-05377-3
 25. Zimmer M, Barnhart H, Idris U, Lee MD. Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. *Avian Dis*. 2003 Jan-Mar;47(1):101–7. DOI: 10.1637/0005-2086(2003)047[0101:DOCJSI]2.0.CO;2
 26. Quero S, Párraga-Niño N, Sabria M, Barrabeig I, Sala MR, Jané M, et al. *Legionella* SBT applied directly to respiratory samples as a rapid molecular epidemiological tool. *Sci Rep*. 2019 Jan 24;9(1):623. DOI: 10.1038/s41598-018-36924-w
 27. Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013 Dec;30(12):2725–9. DOI: 10.1093/molbev/mst197
 28. Yong SF, Tan SH, Wee J, Tee JJ, Sansom FM, Newton HJ, Hartland EL. Molecular Detection of *Legionella*: Moving on From mip. *Front Microbiol*. 2010 Nov 11;1:123. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00123
 29. Воронина ОЛ, Кунда МС, Лунин ВГ, Карпова ТИ, Тартаковский ИС. Молекулярно-генетическое типирование штаммов *Legionella pneumophila* и *Legionella* spp., выделенных на территории Российской Федерации. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2008;10(2):154–62.
 30. Тартаковский ИС, Адгамов РР, Ермолаева СА, Дронина ЮЕ, Карпова ТИ, Галстян ГМ, и др. Методические особенности диагностики легионеллезной пневмонии в лечебно-профилактических учреждениях. Часть 2. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013;15(3):166–72.
 31. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol*. 2007 Jun;45(6):1965–8. DOI: 10.1128/JCM.00261-07
 32. Rousseau C, Ginevra C, Simac L, Fiard N, Vilhes K, Ranc AG, et al. A Community Outbreak of Legionnaires' Disease with Two Strains of *L. pneumophila* Serogroup 1 Linked to an Aquatic Therapy Centre. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Jan 20;19(3):1119. DOI: 10.3390/ijerph19031119
 33. Zhan XY, Zhu QY. Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolates from environmental water samples and clinical samples using a five-gene sequence typing and standard Sequence-Based Typing. *PLoS One*. 2018; 13(2):e0190986. DOI: 10.1371/journal.pone.0190986
 34. Кузькин БП, Куличенко АН, Волынкина АС, Ефременко ДВ, Кузнецова ИВ, Котенев ЕС, и др. Применение современных методов генотипирования возбудителей инфекционных болезней в условиях оперативной работы специализированной противозидемической бригады в период проведения XXII Олимпийских Зимних Игр и XI Паралимпийских Зимних Игр. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015;2:119–22.
- ## References
1. Onishchenko GG, Pokrovsky VI, Tartakovskii IS, Maleev VV, Lazikova GF, Chistyakova GG, et al. Modern views on the epidemiology of legionellosis: operations procedure during epidemic outbreaks and preventive monitoring. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2008;2:1–10. (In Russian).
 2. Onischenko GG, Demina YuV, Tartakovskiy IS. Modern conception of organization of epidemiological surveillance for legionella infections. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2009;5:85–91. (In Russian).
 3. Tartakovskii IS, Ginzburg AL, Lazikova GF, Chistyakova GG, Demina YuV, Karpova TI, et al. Standards for laboratory diagnostics of legionellosis and their application during epidemic outbreak of pneumonia in town Verkhnyaya Pyshma. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2008;2:16–20. (In Russian).
 4. Hern LT, Tee WY, Khan TM. *Legionella pneumophila* – the causative agent of Legionnaires' disease. *PMMB*. 2021;4:1–12.
 5. Chambers ST, Slow S, Scott-Thomas A, Murdoch DR. Legionellosis Caused by Non-*Legionella pneumophila* Species, with a Focus on *Legionella longbeachae*. *Microorganisms*. 2021;9(2):291–8. DOI: 10.3390/microorganisms9020291
 6. Gattuso G, Rizzo R, Lavoro A, Spoto V, Porciello G, Montagnese C, et al. Overview of the Clinical and Molecular Features of *Legionella pneumophila*: Focus on Novel Surveillance and Diagnostic Strategies. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Mar 9;11(3):370. DOI: 10.3390/antibiotics11030370
 7. Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Apr;23(2):274–98. DOI: 10.1128/CMR.00052-09
 8. Keše D, Obreza A, Rojko T, Kišek TC. *Legionella pneumophila* – Epidemiology and Characterization of Clinical Isolates, Slovenia, 2006–2020. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Jul 2;11(7):1201. DOI: 10.3390/diagnostics11071201
 9. Christensen LM, Sule P, Cirillo SLG, Strain M, Plumlee Q, Adams LG, Cirillo JD. Legionnaires' Disease Mortality in Guinea Pigs Involves the p45 Mobile Genomic Element. *J Infect Dis*. 2019 Oct 8;220(10):1700–1710. DOI: 10.1093/infdis/jiz340
 10. Tartakovskiy IS, Sinopalnikov AI, Demina YuV, Gruzdeva OA. Prevention of legionellosis as a basis for the new approach to prophylaxis of hospital-acquired infections. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;12(4):273–283. (In Russian).
 11. Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, et al. Legionella contamination in hot water of Italian hotels. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Oct;71(10):5805–13. DOI: 10.1128/AEM.71.10.5805-5813.2005
 12. Sciuto EL, Laganà P, Filice S, Scalese S, Libertino S, Corso D, et al. Environmental Management of *Legionella* in Domestic Water Systems: Consolidated and Innovative Approaches for Disinfection Methods and Risk Assessment. *Microorganisms*. 2021 Mar 11;9(3):577. DOI: 10.3390/microorganisms9030577
 13. Segal G, Russo JJ, Shuman HA. Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*. 1999 Nov;34(4):799–809. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01642.x
 14. Cirillo SL, Bermudez LE, El-Etr SH, Duhamel GE, Cirillo JD. *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence. *Infect Immun*. 2001 Jan;69(1):508–17. DOI: 10.1128/IAI.69.1.508-517.2001
 15. Fernandez RC, Logan SM, Lee SH, Hoffman PS. Elevated levels of *Legionella pneumophila* stress protein Hsp60 early in infection of human monocytes and L929 cells correlate with virulence. *Infect Immun*. 1996 Jun;64(6):1968–76. DOI: 10.1128/iai.64.6.1968-1976.1996
 16. Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Engleberg NC. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect Immun*. 1989 Apr;57(4):1255–62. DOI: 10.1128/iai.57.4.1255-1262.1989
 17. Talapko J, Frauenheim E, Juzbašić M, Tomas M, Matić S, Jukić M, et al. *Legionella pneumophila* – Virulence Factors and the Possibility of Infection in Dental Practice. *Microorganisms*. 2022 Jan 24;10(2):255. DOI: 10.3390/microorganisms10020255

18. Chauhan D, Shames SR. Pathogenicity and Virulence of *Legionella*: Intracellular replication and host response. Virulence. 2021 Dec;12(1):1122-44. DOI: 10.1080/21505594.2021.1903199
19. Pancer K. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water distribution systems as a complementary element of risk assessment of legionellosis in Poland. Ann Agric Environ Med. 2013;20(3):436-40.
20. Karpova TI, Tartakovskiy IS. The features of epidemiology and laboratory diagnostics of legionellosis. Infectious Diseases. News, Opinions, Training. 2015;4(13):51-58. (In Russian).
21. Tartakovskiy IS, Galstyan GM, Karpova TI, Katrysh SA, Dronina YuE, Sadretdinova OV. Methodology issues of legionella pneumonia diagnosis in medical institutions. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2012;14:100-6. (In Russian).
22. Karpova TI, Dronina YuE, Tartakovskii IS, Romanova YuM, Clnzburg AL. Legionella natural biofilms and their role in epidemiology of the infection: methods of study and modelling. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2008;2:13-6. (In Russian).
23. Rodrigues LB, Dos Santos LR, Tagliari VZ, Rizzo NN, Trenhago G, de Oliveira AP, et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. Braz J Microbiol. 2010 Oct;41(4):1082-5. DOI: 10.1590/S1517-838220100004000029
24. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academy Press., Copyright 1996. ISBN 0-309-05377-3
25. Zimmer M, Barnhart H, Idris U, Lee MD. Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. Avian Dis. 2003 Jan-Mar;47(1):101-7. DOI: 10.1637/0005-2086(2003)047[0101:DOCJSI]2.0.CO;2
26. Quero S, Párraga-Niño N, Sabria M, Barrabeig I, Sala MR, Jané M, et al. *Legionella* SBT applied directly to respiratory samples as a rapid molecular epidemiological tool. Sci Rep. 2019 Jan 24;9(1):623. DOI: 10.1038/s41598-018-36924-w
27. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipki A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013 Dec;30(12):2725-9. DOI: 10.1093/molbev/mst197
28. Yong SF, Tan SH, Wee J, Tee JJ, Sansom FM, Newton HJ, Hartland EL. Molecular Detection of *Legionella*: Moving on From mip. Front Microbiol. 2010 Nov 11;1:123. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00123
29. Voronina OL, Kunda MS, Lunin VG, Karpova TI, Tartakovskii IS. Molecular and genetic typing of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. strains isolated in the Russian Federation. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2008;10(2):154-62. (In Russian).
30. Tartakovskiy IS, Adgamov RR, Ermolaeva SA, Dronina YuE, Karpova TI, Galstyan GM, et al. Methodology issues of legionella pneumonia diagnosis in medical institutions (part 2). Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2013;15(3):166-72. (In Russian).
31. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):1965-8. DOI: 10.1128/JCM.00261-07
32. Rousseau C, Ginevra C, Simac L, Fiard N, Vilhes K, Ranc AG, et al. A Community Outbreak of Legionnaires' Disease with Two Strains of *L. pneumophila* Serogroup 1 Linked to an Aquatic Therapy Centre. Int J Environ Res Public Health. 2022 Jan 20;19(3):1119. DOI: 10.3390/ijerph19031119
33. Zhan XY, Zhu QY. Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolates from environmental water samples and clinical samples using a five-gene sequence typing and standard Sequence-Based Typing. PLoS One. 2018; 13(2):e0190986. DOI: 10.1371/journal.pone.0190986
34. Kuzkin BP, Kulichenko AN, Volynkina AS, Efremenko DV, Kuznetsova IV, Kotenev ES, et al. Modern methods application of genotyping of infectious diseases pathogens in the context of operational work of specialized anti-epidemic team during the XXII Olympic Winter Games and XI Paralympic Winter Games. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2015;2:119-22. (In Russian).

Информация о соавторах:

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Асташкин Евгений Ильич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
E-mail: ast.ev@mail.ru

Ерусланов Борис Васильевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
E-mail: eruslanov@obolensk.org

Мицевич Ирина Петровна, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
E-mail: mitzevich_i_p@obolensk.org

Карцев Николай Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
E-mail: kartsev@obolensk.org

Попова Анастасия Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
E-mail: popova_nastya86@mail.ru

Коробова Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
E-mail: korobova@obolensk.org

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Edward A. Svetoch, PhD, DSc (Veterinary Sciences) Professor, Chief Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Evgeny I. Astashkin, MD, PhD, Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Boris V. Eruslanov, MD, PhD, DSc, Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Irina P. Mitzevich, Senior Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Nikolay N. Kartsev, MD, PhD, Senior Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Anastasiya V. Popova, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of the Laboratory for Molecular Diagnostics and Genetically Engineered Drugs, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Olga V. Korobova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Laboratory for Biological Trials, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, MD, PhD, DSc, Professor, Director of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор