

УДК 616.013

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ТИПИРОВАНИЯ E.COLI - MLST И СЕРОТИПИРОВАНИЯ

Д. Б. Бабенко¹, А. А. Турмухамбетова¹, Н. Е. Ауенов²

¹Карагандинский государственный медицинский университет, г. Караганда, Казахстан;

²Государственный медицинский университет города Семей, г. Семей, Казахстан.

Актуальность и цель: Методы субвидового типирования позволяют проводить анализ генетического родства (клональности) между штаммами микроорганизмов одного вида и установить возможную эпидемиологическую связь между источниками инфицирования, факторами передачи возбудителя. Определение и сравнение результатов серологического и мультилокусного секвенирования типирований на основе полногеномных данных E.coli.

Материал и методы исследования: Определение серологических вариантов и МЛСТ типов E.coli проводилось на основе полногеномных данных с использованием веб ресурса центра геномной эпидемиологии (www.genomicepidemiology.org). Разрешающая способность, а также согласованность результатов проводилась на основании Rand и adj.Wallace индексов.

Результаты и обсуждения: Исследование, проведенное на основе полногеномных данных E.coli с определением МЛСТ и серотипов продемонстрировало разрешающую способность на уровне (95-96%). Конкордантность между результатами, полученными двумя методами, составило 83,9% (95% ДИ 80,2-86,5). Предсказательная способность для МЛСТ на основе O:H генотипов 76%, для серотипов используя данные МЛСТ составило 92,2%

Вывод: При схожей разрешающей способности серотипирования и МЛСТ (95-96%), согласованность результатов в целом составило 84%. При этом, в отношении одних сиквент типов наблюдается однозначное соответствие серотипов, в тоже время как для других МЛСТ типов характерна неоднородная картина серотипов.

Ключевые слова: Конкордантность, дискриминирующая способность, серотипирование, МЛСТ.

COMPARATIVE EVALUATION OF TYPING METHODS FOR E.COLI - MLST AND SEROTYPING

D. B. Babenko¹, A. A. Turmukhambetova¹, N. Ye. Aukenov²

¹ Karaganda State Medical University, Karaganda, Kazakstan;

² Semey State Medical University, Semey, Kazakstan.

Background and Objectives: Subspecies typing methods allow to carry out of genetic relationship (clonality) analysis between strains within species and to establish a possible epidemiological link between the source of infection, the factors of transmission. Identify and compare the results of serological and multilocus sequencing typing data based on E.coli genomes.

Material and methods: Determination of serotypes and MLST types of E.coli have been done based on genome-wide data using a web resource Center of Genomic Epidemiology (www.genomicepidemiology.org). Discriminatory power and concordance of the results was calculated using Rand and adj.Wallace indeces.

Results and Discussion: Research based on the genome-wide data E.coli with determination MLST and serotypes demonstrated the same level of discriminating ability (95-96%). Concordance between the results obtained by the two methods was 83.9% (95% CI 80,2-86,5). The predictive ability for the MLST-based O:H serotypes was 76%, for serotypes using MLST data was 92.2%

Conclusion: While resolution power of serotyping and MLST analysis were at same level (95-96%), the concordance of the results was was 84%. There was very good conformity between some MLST types and serotypes, at the same time, other MLST types were characterized with different serotypes.

Keywords: MLST, serotypes, discriminatory power, concordance.

E.COLI - MLST ТИПТЕУ ЖӘНЕ СЕРОТИПТЕУ ӘДІСТЕРІН САЛЫСТЫРМАЛЫ БАҒАЛАУ

Д. Б. Бабенко¹, А. А. Турмухамбетова¹, Н. Е. Ауқенов²

¹ Қарағанды Мемлекеттік медицина университеті, Қарағанды қ., Қазақстан;

² Семей қаласының Мемлекеттік медицина университеті, Семей қ., Қазақстан.

Маңыздылығы және мақсаты: субвидтік типировалдық әдіспен бір түрде микроорганизмдер штаммалар арасында және індет жұқтыру көзі мүмкін болатын эпидемиологиялық байланысты енгізу, қоздырғыштын таралу факторлары генетикалық тұқымдастықты талдау. Серологиялық және мультилокустық секвенировалдық типировалды полногендық деректерін E.coli анықтау және қортындысын салыстыру.

Зеттреу әдістер және материал: Генді эпидемиологиялық (www.genomicpidemiology.org) орталық қорын қолдану негізінде толық гендік деректер және МЛСТ түрлері E.coli серологиялық нұсқаны анықтау өткізілді.

Rand және adj.Wallace индекстерінің негізінде рұқсат етілген және сонымен бірге келісімді нәтижелер өткізілді.

Нәтижелер және сараптау: толық гендік E.coli негізді деректері МЛСТ және серотиптер (95-96%) мөлшерінде зерттеу өткізілген. Конкордантық екі талдаудың арасындағы алынған нәтиже 83,9% (95% ДИ 80,2-86,5) байқалды. МЛСТ үшін алдын ала зейіндеу O:H генотиптер негізінде 76 % , серотиптерге МЛСТ деректерін қолданғанда 92,2% құрады.

Тұжырым: ұқсас рұқсат берілген серотивтік және МЛСТ (95-96%) келісімді нәтижелер толық 84% құрады. Содан бір сиквенсті үлгілері қатынастарының бір қалыпты серотивтер сәйкестегі байқалады, сол кезде басқа МЛСТ типтерінен біркелкі серотивтердің суреті мінезделген.

Түйінді сөздер: бағыттастық, кемсітуші қабілетілік, серотивтер, МЛСТ.

Библиографическая ссылка:

Бабенко Д. Б., Турмухамбетова А. А., Ауқенов Н. Е. Сравнительная оценка методов типирования E.coli - MLST и серотипирования // Наука и Здравоохранение. 2015. № 6. С. 77-82.

Babenco D. B., Turmukhambetova A. A., Aukenov N. Ye. Comparative evaluation of typing methods for E.coli - MLST and serotyping. *Nauka i Zdravooxranenie* [Science & Healthcare]. 2015, 6, pp. 77-82.

Бабенко Д. Б., Турмухамбетова А. А., Ауқенов Н. Е. E.coli - MLST типтеу және серотиптеу әдістерін салыстырмалы бағалау // Ғылым және Денсаулық сақтау. 2015. № 6. Б. 77-82.

Актуальность. Бактерии вида *Escherichia coli* являются доминирующими представителями непатогенной факультативной флорой желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека [14]. Однако встречаются штаммы E.coli с определенным набором факторов патогенности (токсины, колицины, гемолизины и другие) которые способны вызывать широкий спектр заболеваний в организме человека, поражая не только пищеварительную, но и моче-половую, сердечно-сосудистую и нервную системы [2, 9]. Данные крупного

многоцентрового исследования (Global Enteric Multi-Center Study (GEMS)) показали ведущую роль энтеротоксигенной кишечной палочки в развитии тяжелой формы диареи у детей [10]. Более того энтеропатогенные и некоторые штаммы энтеротоксигенных E.coli ассоциированы с повышенным уровнем летальности, что указывает на значимую роль кишечной палочки в развитии диарейных заболеваний на глобальном уровне [3]. Факторы патогенности, механизмы колонизации, клиническая симптоматика, степень и

тяжесть диарейных заболеваний могут отличаться, иллюстрируя разнообразие *E.coli*.

В зависимости от сочетания типов антигенов - O-Аг (термостабильный соматический), H-Аг (термолабильный жгутиковый), кишечные палочки дифференцируются на серологические типы (серовары) [14]. Классическое серотипирование основано на модифицированной реакции агглютинации Kauffman с использованием антисывороток [4]. О антиген являясь частью липополисахарида внешней мембраны грам-негативных бактерий выполняет роль мишени как для иммунной системы, так и для бактериофагов. На современном этапе серотипирование можно проводить с использованием молекулярно-генетического подхода, когда с помощью ПЦР проводится детекция генов, вовлеченных в биосинтез O-Аг (например, *wzx* и/или *wzy* генов) и H-Аг (*flhC* ген) [4, 20]. На данный момент известны более 190 варианта O-Аг [19] и 53 H-Аг [20], однако лишь небольшое количество сероваров ассоциированы с заболеваниями человека. В отношении некоторых серологических вариантов (например, STEC O157: H7), серотипирование является информативным, но бывают случаи, когда наблюдается кросс-реактивность между антигенами или неспособность определить серотип в отношении некоторых сероваров. Тем не менее, было показано [21] что серотипирование на основе антигенов кишечной палочки является полезным методом детекции патогенных штаммов *E.coli* в клинических образцах, в продуктах питания и штаммов выделенные с окружающей среды.

Метод мультилокусное секвенирование типирование (МЛСТ) стал общепринятым методом субвидового типирования патогенных штаммов *Escherichia coli* [1, 8, 11, 15, 16, 18]. Принцип МЛСТ основан на секвенировании внутренних фрагментов выбранных генов (как правило в качестве мишени секвенирования используют гены домашнего хозяйства), аллели которых используют в качестве единиц измерения при сравнении и поэтому данный метод не имеет недостатков характерных фингерпринт методов (ERIC PCR, PFGE и др.) [13]. Внутренние фрагменты генов секвенируются, и для уникальных генетических последовательностей присваивается уникаль-

ный номер аллеля. В итоге, для каждого штамма *E.coli* при МЛСТ анализе формируется аллельный (цифровой) профиль по 7-8 генам, в зависимости от схемы МЛСТ типирования. Портативность и воспроизводимость МЛСТ анализа позволяет легко сравнивать полученные MLST типы между лабораториями [5, 12]. Более того, цифровая кодировка MLST данных позволило создать глобальную базу данных с веб интерфейсом (www.mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli), что внесло большой вклад в понимание глобальной эпидемиологии «успешных» клонов.

Цель работы: определение серотипов и МЛСТ типов на основе полногеномных данных *E.coli*, а также количественно оценить дискриминирующую способность и конкордантность результатов полученные для МЛСТ и серотипированием.

Материал и методы исследования:

3496 геномов *E.coli*, включая завершённые и опубликованные, а также в виде контигов/скаффолдов были получены из публичной базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Определение MLST типа, а также сероваров *E.coli* на основе полногеномных данных проводилось с использованием веб ресурса центра геномной эпидемиологии (<http://www.genomicpidemiology.org/>).

Индекс Симпсона (Simpson's index) [17] использовался для оценки дискриминирующей способности методов типирования. Конкордантность результатов серотипирования и мультилокусное секвенирование типирование оценивалась с помощью Wallace коэффициента [7].

Кластеризация MLST типов с целью определения клональных комплексов проводилась с использованием алгоритма eBURST [6]. MLST типы которые отличаются всего на 1 аллель из 7 формировали клональный комплекс.

Результаты и обсуждения

В результате МЛСТ анализа на основе 3496 геномов кишечной палочки сиквенс типы были успешно определены в 82,5% случаев. Для серотипирования на основе O- и H-антигенов процент определения серотипов

составил 68,2%. МЛСТ анализ определил 341 уникальных типов в то время как для серотипирования уникальных О:Н типов было

392 из 2003. Наиболее 10 часто встречающихся МЛСТ и серотипов представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Частота МЛСТ и серотипов определенные на основе геномных данных E.coli.

МЛСТ тип	количество изолятов	% изолятов	Серотипы	количество изолятов	% изолятов
11	345	17,2	O157:H7	347	17,3
10	139	6,9	O17:H18	99	4,9
73	139	6,9	O6:H1	91	4,5
95	120	6	O1:H7	62	3,1
69	98	4,9	O104:H4	54	2,7
678	55	2,7	O111:H8	51	2,5
16	50	2,5	O16:H48	51	2,5
12	32	1,6	O6:H16	35	1,7
17	30	1,5	O8:H9	33	1,6
328	20	1	O4:H5	31	1,5

Анализ на основе индекса Симпсона выявил схожую дискриминирующую способность между серотипированием на

основе О- Н- антигенов (0,96 (95%ДИ; 0,954-0,965)) и МЛСТ (0,952 (95%ДИ; 0,946-0,957)) (таблица 2).

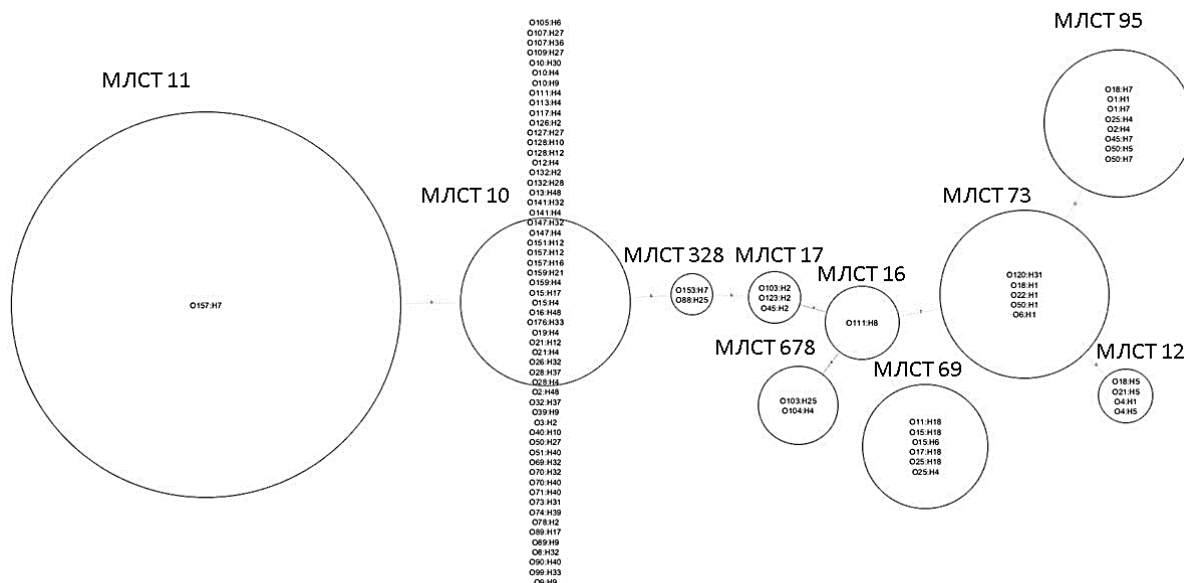
Таблица 1.

Оценка дискриминирующей способности методов типирования.

Маркер	количество уникальных вариантов	Индекс Симпсона	95% ДИ
О:Н серотип	392	0,96	(0,954-0,965)
О-Аг	138	0,949	(0,944-0,955)
Н-Аг	43	0,902	(0,893-0,911)
МЛСТ тип	341	0,952	(0,946-0,957)
icd ген	85	0,913	(0,908-0,918)
gyrB ген	94	0,913	(0,908-0,919)
fumC ген	84	0,908	(0,902-0,914)
mdh ген	67	0,89	(0,884-0,896)
adk ген	84	0,885	(0,877-0,892)
purA ген	66	0,862	(0,854-0,869)
recA	61	0,837	(0,825-0,849)

Симметричный показатель конкордантности для 2003 изолятов между МЛСТ и серотипами показал 83,3% совпадение (adj.Rand индекс 0,833; 95% ДИ; 0,802-0,865). Несимметричный показатель конкордантности рассчитанный на основе adj.Wallace коэффициенте показал 76% вероятность предсказания серотипа на основе МЛСТ и 92,2% для МЛСТ используя О:Н серотип.

Сравнение МЛСТ типов и серотипов показало однородную картину соответствия между МЛСТ и серотипом в одних случаях (например, МЛСТ11 и O157:H7) и неоднозначную картину в других случаях, когда одному МЛСТ типу соответствуют множество серотипов, как в случае 10 МЛСТ типа (Рисунок 1).



Выводы:

1. МЛСТ и серотипирование на основе O:H антигенов обладают схожей разрешающей способностью (порядка 95-96%) типирования бактерий E.coli.
2. Предсказательная способность (конкордантность) серотипирования для определения МЛСТ типа составила 92,2%, в то время как определение O:H серотипа на основе мультилокусного секвенирования типирования не превысил 76%.
3. Сравнение МЛСТ данных и серотипирования выявило что определенным МЛСТ типам соответствуют определенные серотипы (например для 11 МЛСТ типа соответствует O157:H7), в тоже время, существуют МЛСТ типы для которых характерны множество различных O:H серотипов.

References:

- 1 Choi S. Y., Jeon Y. S., Lee J. H. et al. Multilocus sequence typing analysis of Shigella flexneri isolates collected in Asian countries // J Med Microbiol. 2007. Vol 56 (Pt 11). P. 1460-6.
- 2 Croxen M. A. and Finlay B. B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity // Nat Rev Microbiol. 2010. Vol 8(1). P. 26-38.
- 3 Croxen M. A., Law R. J., Scholz R. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli // Clin Microbiol Rev. 2013. Vol.26(4). P. 822-80.

- 4 DebRoy C., Roberts E., and Fratamico P. M. Detection of O antigens in Escherichia coli. // Anim Health Res Rev. 2011. Vol.12(2). P. 169-85.
- 5 Enright M. C. and Spratt B. G. Multilocus sequence typing // Trends Microbiol. 1999. Vol. 7(12). P. 482-7.
- 6 Feil E. J., Li B. C., Aanensen D. M. et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data// J Bacteriol. 2004. Vol.186(5). P.1518-30.
- 7 Fowlkes E. B. and Mallows C. L. A method for comparing two hierarchical clusterings // J. Am. Stat. Assoc. 1983. Vol.(78). P. 553-569.
- 8 Jenke C., Lindstedt B. A., Harmsen D., et al. Comparison of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and multilocus sequence typing for differentiation of hemolytic-uremic syndrome-associated Escherichia coli (HUSEC) collection strains // J Clin Microbiol. 2011. Vol.49(10). P. 3644-6.
- 9 Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. Pathogenic Escherichia coli // Nat Rev Microbiol. 2004. Vol.2(2). P. 123-40
- 10 Kotloff K. L., Nataro J. P., Blackwelder W. C. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study // Lancet. 2013. Vol.382(9888). P. 209-22.

- 11 Lacher D. W., Steinsland H., Blank T. E. et al. Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling // *J Bacteriol.* 2007. Vol.189(2). P. 342-50.
- 12 Maiden M. C., Bygraves J. A., Feil E. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. Vol.95(6). P. 3140-5.
- 13 Maiden M. C., Jansen van Rensburg M. J., Bray J. E. et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics // *Nat Rev Microbiol.* 2013. Vol.11(10). P. 728-36.
- 14 Nataro J. P., Kaper J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli* // *Clin Microbiol Rev.* 1998. Vol.11(1). P. 142-201.
- 15 Okeke I. N., Wallace-Gadsden F., Simons H. R. et al. Multi-locus sequence typing of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Nigerian children uncovers multiple lineages // *PLoS One.* 2010. Vol.5(11). P.14093.
- 16 Sadowy E., Sienko A., Hryniewicz W. Comparison of multilocus variable-number tandem-repeat analysis with multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for *Enterococcus faecalis* // *Pol J Microbiol.* 2011. Vol.60(4). P. 335-9.
- 17 Simpson E. H. Measurement of species diversity // *Nature.* 1949. P. 163-688.
- 18 Steinsland H., Lacher D. W., Sommerfelt H. et al. Ancestral lineages of human enterotoxigenic *Escherichia coli* // *J Clin Microbiol.* 2010. Vol.48(8). P. 2916-24.
- 19 Stenutz R., Weintraub A., Widmalm G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens // *FEMS Microbiol Rev.* 2006. Vol.30(3). P. 382-403.
- 20 Wang L., Rothemund D., Curd H. et al. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene // *J Bacteriol.* 2003. Vol.185(9). P. 2936-43.
- 21 Wang Q., Ruan X., Wei D. et al. Development of a serogroup-specific multiplex PCR assay to detect a set of *Escherichia coli* serogroups based on the identification of their O-antigen gene clusters // *Mol Cell Probes.* 2010. Vol.24(5). P. 286-90.

Контактная информация:

Бабенко Дмитрий Борисович – докторант PhD, научный сотрудник лаборатории коллективного пользования КГМУ, г. Караганда, Казахстан

Почтовый адрес: 100008, Казахстан, г. Караганда, ул. Гоголя 40.

E-mail: streampost@gmail.com

Телефон: 87072577977.