

УДК 579.869.1:57.083.1:577.2.08

## СПОСОБ БЫСТРОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *LISTERIA* И ПАТОГЕННОГО ВИДА *LISTERIA MONOCYTOGENES* С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

С.М. Стародумова<sup>1</sup>, Е.А. Зайцева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова СО РАМН (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

<sup>2</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

**Ключевые слова:** листерии, лабораторная диагностика, молекулярно-генетический метод, праймеры.

### THE WAY OF A QUICK IDENTIFICATION OF BACTERIA GENUS *LISTERIA* AND PATHOGENIC SPECIES OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* BY MEANS OF THE MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

S.M. Starodumova<sup>1</sup>, E.A. Zaitseva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology of the SB of the Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation), <sup>2</sup> Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation)

**Background.** The wide polymorphism of the *Listeria* microbes and impermanence of their biochemical and biological characteristics inherent to the freshly isolated cultures of *Listeria* requires the development of quite new approaches to their typing.

**Methods.** Investigated possibility of the use of the multiplex polymerase chain reaction (PCR) with primers limiting the sequences of genes of Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase (*prs*) and Phosphatidylinositol-specific phospholipase (*plcA*) for a quick identification of bacteria genus *Listeria* along with a quick differentiation of the pathogenic species of *Listeria monocytogenes*. Assessment of efficacy of the PCR tested on 117 *Listeria* cultures isolated from the different foodstuff and organs of the murine rodents.

**Results.** The use of the multiplex PCR enabled to relate 38 of *Listeria* cultures to genus *L. monocytogenes* while the rest to genus *Listeria* spp. that coincided with the results of microbiological typing and testing by means of LISTER System.

**Conclusions.** The proposed multiplex PCR system enables to relatively quickly (within 3 hours) to screen for the *Listeria*-suspected colonies and to simultaneously identify *L. monocytogenes* in the samples under research and can be used for monitoring *Listeria* infection during microbiological and biological research.

**Keywords:** *Listeria*, laboratory diagnostics, molecular genetic method, primers.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 1, p. 95–97.

Многочисленные вспышки листериоза в ряде стран мира, связанные с употреблением в пищу инфицированных продуктов питания, а также частота носительства возбудителя у людей и его широкое распространение в окружающей среде требуют разработки новых подходов к типированию листерий с целью выявления наиболее значимых, вирулентных штаммов [1, 3, 4, 7, 8, 10–12].

В современной лабораторной диагностике листериоза широко используются молекулярно-генетические методы, которые значительно ускоряют процесс идентификации *Listeria monocytogenes* по сравнению с длительным бактериологическим исследованием. Особое место среди этих методов занимает полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее варианты – гнездовая ПЦР, мультиплексная ПЦР и др. [8, 14]. Мультиплексная

ПЦР позволяет одновременно амплифицировать несколько генов-мишеней, что существенно расширяет возможности традиционного метода.

Для выявления бактерий рода *Listeria* и идентификации патогенного вида *L. monocytogenes* в настоящее время в качестве мишеней для ПЦР используют различные гены - 16S и 23S рРНК, *prs*, *gyrB*, *rpoB*, *hly*, *inlA* и *inlB*, *plcA*, *iap* и др. [2–7, 10–13]. Важно отметить, что выпускаемые в настоящее время коммерческие тест-системы определяют только один вид листерий – *L. monocytogenes*. В это же время существует объективная необходимость в создании тест-систем, позволяющих на начальных этапах исследования выявлять другие виды этого рода с одновременной идентификацией патогенной *L. monocytogenes*. Особенно важным представляется обнаружение в продуктах питания *L. innocua*, которая, часто встречаясь одновременно с *L. monocytogenes*, рассматривается как индикатор возможного присутствия последней [4]. Поэтому для исследователей, занимающихся лабораторной диагностикой листериоза, важно иметь в своем арсенале метод, позволяющий быстро и эффективно проводить мониторинг листериоза, выявляя не только *L. monocytogenes*, но и другие виды этого микроорганизма.

Цель работы – отработать тест-систему в формате «мультиплекс» для выявления бактерий рода *Listeria* и патогенного вида *L. monocytogenes* в одной реакции.

**Материал и методы.** В работе использовали 117 культур листерий, выделенных из различных объектов окружающей среды (продукты питания, органы мышевидных грызунов), и референтные штаммы листерий из коллекции лаборатории экологии патогенных бактерий НИИЭМ СО РАМН: *L. monocytogenes* EGD, *L. ivanovii* NCTC 11846, *L. innocua* SLCC 3379, *L. seeligeri* SLCC 5921, *L. welshimeri* SLCC 5334 и *L. grayi* 17.

Микробиологические исследования проводили на средах с использованием методов, рекомендованных ГОСТ Р 51921–2002 и МУК 4.2.1122–02 для выявления листерий.

**Молекулярно-генетические методы.** В работе использовались олигонуклеотидные праймеры, синтезированные фирмой «Евроген», г. Москва (табл.). Праймеры, ограничивающие фрагменты изучаемых генов, были выбраны в 5'- и 3'-областях открытых рамок считывания с помощью программы Oligo38.

Определение принадлежности выделенных культур к бактериям рода *Listeria* проводили методом

Зайцева Елена Александровна – д-р мед. наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ТГМУ; e-mail: elza200707@mail.ru

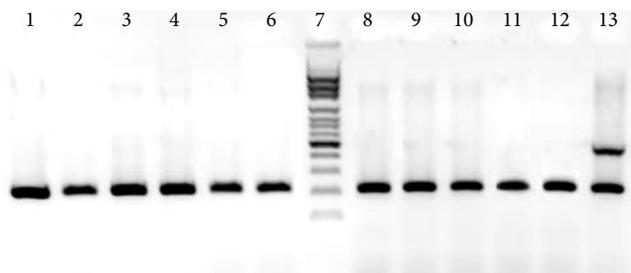


Рис. 1. Электрофорез продуктов амплификации ДНК референтных штаммов листерий с одной парой праймеров  $prs_1$ - $prs_2$  (1-6 – 211 п.н.) и двумя парами праймеров  $prs_1$ - $prs_2$  и  $plc_1$ - $plc_2$  (8-12 – 211 п.н., 13 – 211 и 476 п.н.): 1, 13 – *L. monocytogenes* EGD; 2, 8 – *L. ivanovii* NCTC 11846; 3, 9 – *L. innocua* SLCC 3379; 4, 10 – *L. seeligeri* SLCC 5921; 5, 11 – *L. welshimeri* SLCC 5334; 6, 12 – *L. grayi* 17; 7 – ДНК-маркер (100 bp Ladder, Axysgene, США).

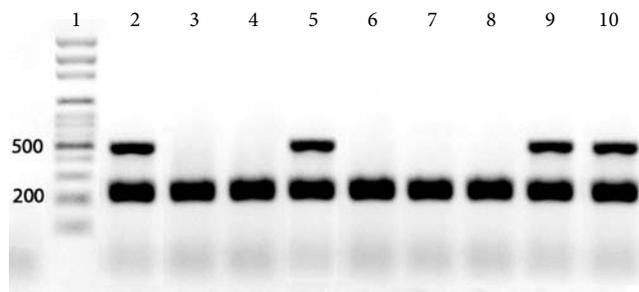


Рис. 2. Электрофорез продуктов мультиплексной ПЦР с ДНК различных культур листерий:

1 – ДНК-маркер (100 bp Ladder, Axysgene, США), 2 – *L. monocytogenes* EGD (положительный контроль, 211 и 476 п.н.), 3 – *L. innocua* SLCC 3379 (положительный контроль, 211 п.н.), 4-10 – продукты амплификации ДНК культур листерий, выделенных из продуктов питания.

амплификации ДНК бактерий при помощи ПЦР с праймерами  $prs_1$ - $prs_2$  для определения гена *prs*, кодирующего родоспецифический белок общего метаболизма – фосфорибозилпирофосфатсинтазу, нуклеотидная последовательность которого была получена из базы данных ListiList (<http://www.pasteur.fr>), содержащей последовательность генома штамма *L. monocytogenes* EGD<sub>e</sub> (табл. 1), как описано [2].

Идентификацию выделенных культур листерий до вида *L. monocytogenes* проводили при помощи тест-системы «ЛИСТЕР» («Интерлабсервис», Россия) согласно рекомендациям производителя, а также с помощью видоспецифических для *L. monocytogenes* праймеров  $plc_1$ - $plc_2$  по программе, описанной Е.А. Зайцевой [2].

Типирование культур листерий с помощью мультиплексной ПЦР проводили с использованием бактериальных лизатов, приготовленных из суточных культур листерий по методике, описанной Е.А. Зайцевой [1]. Реакционная смесь (25 мкл) содержала 1-кратный ПЦР-буфер: 75 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 20 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fermentas, Литва), 2 мМ MgSO<sub>4</sub> («Интерлабсервис», Россия), по 20 пМ каждого праймера, 0,25 мМ смеси дНТФ (Fermentas, Литва), 5 ед. Taq-полимеразы («Бионем», Россия) и 1 мкл бактериального лизата. ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по программе быстрого регулирования: 1 цикл при температуре 94 °С – 2 мин, затем 35 циклов при температуре 94 °С – 5 с, 60 °С – 5 с, 72 °С – 5 с.

Электрофорез продуктов амплификации осуществляли в 1,7% агарозном геле в сравнении со стандартным маркером (100 bp DNA Ladder, Axysgene, США). Гель проявляли и фотографировали при помощи геледокументирующей системы Gel Doc XR (BioRad, США).

**Результаты исследования.** Первоначально все исследуемые культуры листерий были дифференцированы микробиологическим методом, который показал, что 38 культур принадлежали к виду *L. monocytogenes*, а 79 культур относились к другим видам рода *Listeria*. При помощи ПЦР, используя каждую пару праймеров ( $prs_1$ - $prs_2$  и  $plc_1$ - $plc_2$ ) в отдельности, а также тест-систему «ЛИСТЕР» («Интерлабсервис», Россия), мы подтвердили результаты, полученные микробиологическим методом. Поэтому в качестве основы для

мультиплексной ПЦР-системы, позволяющей одновременно амплифицировать фрагменты генов *prs* и *plcA*, использовали праймеры  $prs_1$ - $prs_2$  и  $plc_1$ - $plc_2$ . На первом этапе работы в серии экспериментов были оптимизированы условия реакции: концентрация ионов магния, концентрация праймеров, температурно-временные режимы ПЦР.

Возможность одновременного применения праймеров  $prs_1$ - $prs_2$  и  $plc_1$ - $plc_2$  в мультиплексной ПЦР проверили на референтных штаммах листерий. Было установлено, что мультиплексная ПЦР с этими праймерами приводит к образованию специфических продуктов амплификации (фрагмент длиной 211 п.н. специфичен для всех видов листерий и два фрагмента – длиной 211 п.н. и 476 п.н. – для *L. monocytogenes*), соответствующих теоретически рассчитанному для данных пар праймеров (рис. 1).

Анализ результатов мультиплексной ПЦР на основе разработанной тест-системы, как и микробиологический метод и тест-система «ЛИСТЕР», показал, что 38 культур принадлежали *L. monocytogenes*, а остальные 79 – другим видам листерий (рис. 2).

**Обсуждение полученных данных.** Разработанные к настоящему времени различные коммерческие тест-системы на основе ПЦР специфичны в отношении *L. monocytogenes*, и не позволяют определить присутствие других *Listeria* spp. Ген *prs*, кодирующий родоспецифический белок общего метаболизма бактерий рода *Listeria* фосфорибозилпирофосфатсинтазу, и ген *plcA*, кодирующий видоспецифический белок *L. monocytogenes* – фосфатидилинозитол-специфичную фосфолипазу, давно используются в качестве мишеней для молекулярно-генетического типирования листерий [2, 3, 6, 11].

В ходе эксперимента было установлено, что амплификация ДНК штамма *L. monocytogenes* EGD с двумя парами праймеров ( $prs_1$ - $prs_2$  и  $plc_1$ - $plc_2$ ) приводит к образованию двух продуктов – фрагментов длиной 211 и 476 п.н. Эти длины фрагментов соответствуют длинам, теоретически рассчитанным для амплифицируемых участков генов *prs* и *plcA*, соответственно. Амплификация ДНК штаммов других видов листерий (*L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*)

с теми же парами праймеров приводит к образованию лишь одного продукта – фрагмента длиной 211 п.н., соответствующего участку гена *prs*. Таким образом, сочетание этих праймеров в одной реакции не приводит к образованию неспецифических продуктов амплификации и может быть использовано в мультиплексной ПЦР.

Предлагаемая мультиплексная ПЦР-система позволяет сравнительно быстро (за 3 часа от начала исследования) провести скрининг подозрительных на листерии колоний и одновременно идентифицировать *L. monocytogenes* в исследуемых образцах.

#### Литература

1. Зайцева Е.А., Пуховская Н.М., Мусатов Ю.С. [и др.] Молекулярно-генетические особенности и эпидемиологическая значимость штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных от беременных женщин и из абортного материала в дальневосточном регионе России // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2007. Т. 9, № 1. С. 81–89.
2. Зайцева Е.А. Система анализа микробиологических и молекулярно-генетических маркеров для выявления высоко-вирулентных штаммов *Listeria monocytogenes*: дис. д-ра мед. наук. М., 2010. 299 с.
3. Карпова Т.И., Ермолаева С.А., Лопырев И.В. [и др.] Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes* // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2001. Т.3. С. 266–273.
4. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех, 2002. 200 с.
5. Bubert A., Hein I., Rauch M. [et al.] Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. Vol. 65, No.10. P. 4688–4692.
6. Doumith M., Buchrieser C., Glaser P. [et al.] Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR // *J. Clin. Microbiol.* 2004. Vol. 42. P. 3819–3822.
7. Lehner A., Loncarevic S., Wagner M. [et al.] A rapid differentiation of *Listeria monocytogenes* by use of PCR–SSCP in the listeriolysin O (*hlyA*) locus // *J. Microbiol. Methods.* 1999. Vol. 34, No. 3. P. 165–171.
8. Liu D. [ed.] *Handbook of Listeria monocytogenes* // USA: CRC Press, 2008. 552 p.
9. Marranzano M., Pitrolo S., Vicari O. [et al.] Presence of *Listeria*

- spp. in vegetables // *Ann. Ig: Med. Rev. e communita.* 1996. Vol.8, No. 5. P. 531–535.
10. Meinersmann R., Phillips R., Wiedmann M. [et al.] Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. Vol. 70, No. 4. P. 2193–2203.
11. Nightingale K., Windham K., Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods // *J. Bacteriol.* 2005. Vol. 187, No. 16. P. 5537–5551.
12. Sallen B., Rajoharison A., Desvarenne S. [et al.] Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria species* // *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 1996. Vol. 46. P. 669–674.
13. Sue D., Fink, D., Wiedmann, M. [et al.] SigmaB-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment // *Microbiology.* 2004. Vol. 150. P. 3843–3855.
14. Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P. [et al.] *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants // *Clin. Microbiol. Rev.* 2001. Vol. 14, No. 3. P. 584–640.

Поступила в редакцию 12.04.2012.

#### Способ быстрой идентификации бактерий рода *Listeria* и патогенного вида *Listeria monocytogenes* с помощью мультиплексной ПЦР

С.М. Стародумова<sup>1</sup>, Е.А. Зайцева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова СО РАМН (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

<sup>2</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

**Резюме.** Исследована возможность применения мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, ограничивающими участки генов фосфорибозилпирофосфатсинтазы (*prs*) и фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазы (*plcA*), для быстрой идентификации бактерий рода *Listeria* с одновременной дифференциацией патогенного вида *Listeria monocytogenes*. Оценка эффективности метода проведена на 117 культурах листерий, выделенных из разнообразных продуктов питания и органов мышевидных грызунов. В соответствии с результатами мультиплексной ПЦР 38 культур листерий были отнесены к виду *L. monocytogenes*, а остальные 79 – к *Listeria* spp. Данный способ можно использовать для мониторинга листериозной инфекции в работе микробиологов и бактериологов.

**Ключевые слова:** листерии, лабораторная диагностика, молекулярно-генетический метод, праймеры.

УДК 616.34-009.11

## О НЕКОТОРЫХ КОМПЕНСАТОРНЫХ ОСОБЕННОСТЯХ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА

В.Г. Раповка<sup>1</sup>, А.Ф. Пономарев<sup>1</sup>, С.Е. Гаврина<sup>2</sup>, Л.С. Денисенко<sup>2</sup>, Е.С. Рогаткина<sup>2</sup>, О.К. Шкуратова<sup>2</sup>, С.П. Иванов<sup>2</sup>, О.А. Соболевская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

<sup>2</sup> Приморская краевая клиническая больница № 1 (690091, г. Владивосток, ул. Алеутская 57)

**Ключевые слова:** запор, каловый камень, сигмовидная кишка.

### ON THE ISSUE OF SOME COMPENSATORY FEATURES OF COLON

V.G. Rapovka<sup>1</sup>, A.F. Ponomarev<sup>1</sup>, S.E. Gavrina<sup>2</sup>, L.S. Denisenko<sup>2</sup>, E.S. Rogatkina<sup>2</sup>, O.K. Shkuratova<sup>2</sup>, S.P. Ivanov<sup>2</sup>, O.A. Sobolevskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation), <sup>2</sup> Primorsky Krai Regional Clinical Hospital No. 1 (57 Aleutskaya St. Vladivostok 690091 Russian Federation)

Соболевская Ольга Анатольевна – канд. мед. наук, ассистент кафедр госпитальной хирургии ТТМУ; e-mail: osobolevskaya@mail.ru

**Summary.** Constipation is one of the most widespread human diseases. Women amount at least 70–80% of all patients having constipation, and for the first time the disease develops during pregnancy more than in 50% of cases while at the age of 18–20 it develops in 20% of cases. Men often have constipation in their 40–50<sup>th</sup>. Submitted to consideration are three unique clinical observations of constipation resulted in solid fecaliths that led to two cases of the surgical judgment.

**Keywords:** constipation, fecaloma, sigmoid colon.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 1, p. 97–98.