

КАРПОВА Татьяна Игоревна

Идентификация и типирование *Listeria monocytogenes* на основе особенностей полиморфизма и экспрессии генов факторов патогенности

03.00.07 -- микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Государственном Учреждении Научно-исследовательском институте
эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи РАМН

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор **Тартаковский И.С.**

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор **Бойченко М.Н.**

Доктор медицинских наук, профессор **Бондаренко В.М.**

Ведущая организация:

Кафедра микробиологии Российской Медицинской Академии последипломного
образования МЗ РФ

Защита состоится «28» ноября 2003 г. в 11ч. на заседании
диссертационного совета Д 001.007.01 в ГУ Научно-исследовательском институте
эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи РАМН
(123098, г.Москва, ул.Гамалеи,18)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИЭМ им Н.Ф.Гамалеи РАМН

Автореферат разослан «27» октября 2003 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Русакова Е.В.

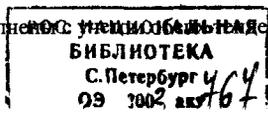
2003-А
19160

Актуальность работы:

Возбудитель листериоза *Listeria monocytogenes* был открыт в 20-х годах прошлого века во время вспышки заболевания у лабораторных животных (Seeliger H.P.R., 1988). Однако интерес к листериям значительно вырос в 80-ые годы, когда были зарегистрированы эпидемические вспышки и многочисленные спорадические случаи заболевания, связанные с употреблением в пищу контаминированных продуктов. Возбудитель листериоза выделяется из целого ряда продуктов (сыры, различные мясные, куриные и рыбные полуфабрикаты для еды «быстрого приготовления», салаты и т.д.) (Farber J.M., Peterkin P.I., 1991). Хотя по числу выявляемых случаев листериоз уступает другим пищевым инфекциям, таким, например, как сальмонеллез и дизентерия, он существенно превосходит их по тяжести клинического течения и проценту летальных исходов. Листериоз может проявляться в таких тяжелых клинических формах как менингиты, менингоэнцефалиты, сепсис, аборт и мертворождения, при этом 90% больных нуждаются в госпитализации. Летальность при листериозе достигает 20-30%. Все это делает листериоз одной из важнейших пищевых инфекций 21 века.

В настоящее время можно выделить две основные тенденции, определяющие прогресс в изучении роли листерий в инфекционной патологии человека и совершенствовании профилактики листериоза за последние годы. Одна тенденция связана с возрастающим значением продуктов питания в возникновении случаев эпидемического и спорадического листериоза и, соответственно, с необходимостью разработки методов эффективного мониторинга за листериями в продуктах питания на этапах изготовления и хранения. Вторая тенденция связана с существенным прогрессом в изучении роли молекулярно-генетических детерминант патогенности листерий во взаимодействии с эукариотической клеткой и изучением системы генетической регуляции экспрессии факторов патогенности возбудителя.

Исследования, проведенные в данной работе, выполнены в соответствии с



и направлены на создание современной схемы идентификации и типирования листерий, выделяемых из продуктов питания, на основе изучения особенностей экспрессии и полиморфизма генов факторов патогенности и включения их в систему оценки микробиологической безопасности продуктов питания.

Цель работы: на основе изучения особенностей полиморфизма и экспрессии генов факторов патогенности разработать методы быстрой идентификации и типирования листерий и включить их в схему оценки микробиологической безопасности продуктов питания.

Задачи исследования:

1. Отработать оптимальную методику выделения и получить коллекцию штаммов листерий из продуктов питания.
2. Разработать эффективные методы видовой идентификации листерий, используя особенности экспрессии генов факторов патогенности.
3. Оценить возможность включения разработанных методов в современную схему мониторинга микробиологической безопасности продуктов питания.
4. Разработать метод типирования листерий на основе изучения особенностей геномного полиморфизма.

Научная новизна работы:

- разработан принципиально новый метод идентификации *L. monocytogenes*, основанный на выявлении индукции лецитиназной активности в присутствии активированного угля;
- с помощью разработанного метода продемонстрирована возможность быстрой и достоверной дифференциации *L. monocytogenes* от непатогенных листерий на примере коллекции штаммов листерий, выделенных из продуктов питания;

- показано, что сочетание лецитиназного теста и полимеразной цепной реакции с видоспецифическими праймерами *plc1*, *plc2* в настоящее время является наиболее эффективным и надежным способом дифференциации *L. monocytogenes* от непатогенных листерий;
- методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) выявлено существование двух филогенетических линий у вида *L. monocytogenes*, к первой из которых (тип А) относятся штаммы серогрупп 1/2a, 1/2c, 3a, а ко второй (типы В и В1) - штаммы серогрупп 1/2b, 4b, 4d;
- впервые продемонстрировано, что последовательность гена *prfA*, кодирующего основной регулятор генов патогенности, содержит нуклеотидные замены, консервативные для каждой из филогенетических линий;
- впервые проведена оценка частоты встречаемости представителей разных филогенетических линий листерий в зависимости от источника выделения, показавшая преобладание штаммов, относящихся к первой линии, среди пищевых изолятов (72%), в то время как среди клинических изолятов преобладали штаммы, относящиеся ко второй линии (67%);

Практическая значимость:

- разработанный метод идентификации *L. monocytogenes* на основании индукции лецитиназной активности в присутствии активированного угля (патент №2196827 от 20.01.2003г) включен в Государственный стандарт и Методические указания МЗ РФ;
- разработана система рестрикционного анализа, позволяющая определить принадлежность выделенного штамма листерий к определенной филогенетической линии и оценить его возможную эпидемиологическую значимость.

Апробация диссертационной работы состоялась на научной конференции отдела медицинской микробиологии ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН (28 июня 2003 г.). Материалы диссертации доложены на Всероссийской конференции с международным участием «Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека» (Москва, 21-23 апреля

1999); IV международной конференции МАКМАХ «Антимикробная терапия» (Москва, 18-21 июня 2001); VIII съезде Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 26-26 марта 2002).

Объем и структура диссертации. Работа выполнена на 98 страницах машинописного текста и иллюстрирована 10 рисунками и 12 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 129 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Штаммы и среды, использованные в работе. В работе использовали штаммы приведенные в таблице 1.

Таблица 1

| № п/п | штамм | серогруппа или описание | источник выделения |
|-------|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 1. | Listeria monocytogenes | | любезно предоставлен |
| 2. | SLCC 2755 | 1/2b | J.A.Vazquez-Boland, |
| 3. | CLIP 75936 | 1/2a | University Complutence, |
| 4. | NCTC 5348 | 1/2c | Spain |
| 5. | NCTC 5105 | 3a | тот же |
| 6. | SLCC 2540 | 3b | тот же |
| 7. | SLCC 2479 | 3c | тот же |
| 8. | NCTC 5214 | 4a | тот же |
| 9. | NCTC 10528 | 4ab | тот же |
| 10. | NCTC 10527 | 4b | тот же |
| 11. | ATCC 19116 | 4c | тот же |
| 12. | ATCC 19118 | 4c | тот же |
| 13. | NCTC 10888 | 4d | тот же |
| 14. | PAM 62 | 1/2b, продукты питания | тот же |
| 15. | PAM 487 | | тот же |
| 16. | P 14 | 4b, клинический | тот же |
| 17. | NG 602 | 4b | (Ermolaeva et al , 1997) |
| 18. | GIM – 16 | | данная работа |
| 19. | GIM – 87 | | тот же |
| 20. | GIM – 88 | | тот же |
| 21. | GIM – 90 | | тот же |
| 22. | GIM – 91 | | тот же |
| 23. | GIM – 92 | | тот же |
| 24. | GIM – 98/20 | | тот же |
| 25. | GIM – 129/3 | | тот же |
| 26. | GIM – 114/24 | | тот же |
| 27. | GIM – 132/5 | | тот же |
| 28. | GIM – 136/3 | | тот же |
| 29. | GIM – 1300 | | тот же |
| 30. | 24 – Т | | любезно предоставлен |
| 31. | 31 – Т | | ЦГСЭН Тульск обл. |
| 32. | 35 – Т | | тот же |
| 33. | 56 – Т | | тот же |
| 34. | 74 – Т | | тот же |
| 35. | PK – 9 | | тот же |
| 36. | PK 2/ч | 4b | любезно предоставлен акад |

| | | | |
|-----|---------------------|------|-------------------------|
| 36. | PK 2/y | 4b | Г.П.Сомовым, НИИЭМ |
| 37. | 1549/1 | | г.Владивостока |
| 38. | 1549/3 | 4b | тот же |
| 39. | 1553/1 | 4b | тот же |
| 40. | 1553/2 | 4b | тот же |
| 41. | 1553/4 | 4b | тот же |
| 42. | 870 | 1/2a | тот же |
| | Listeria innocua | | тот же |
| 43. | SLCC 3379 | | тот же |
| 44. | NCTC 11188 | | любезно предоставлен |
| 45. | ATCC 33090 | | J.A.Vazquez-Boland, |
| | Listeria ivanovii | | University Complutence, |
| 46. | ATCC 19119 | | Spain |
| 47. | NCTC 11846 | | |
| 48. | SLCC 2379T | | тот же |
| | Listeria seeligeri | | тот же |
| 49. | SLCC 5921 | | тот же |
| 50. | SLCC 3954 | | |
| | Listeria welshimeri | | тот же |
| 51. | SLCC 5334 | | тот же |
| | Listeria grayi | | |
| 52. | 17 | | тот же |
| | | | тот же |
| | | | тот же |

Listeria spp. выращивали в жидкой или агаризованной среде Brain-Heart Infusion (“Difco”) при 37°C в течение ночи на круговой качалке. Также выращивали *Listeria* spp. на селективных дифференциально-диагностических средах: бульон Фразера с селективными добавками (“Hi-media”), бульон ПБЛ I и ПБЛ II (Оболенск), Оксфорд и Палкам Агар с селективными добавками (“Hi-media”), ПАЛ (Оболенск) при 30° С 24 – 48 ч (см. ниже). Для определения ферментации сахаров использовали бульон с бромкрезоловым пурпурным (“Hi-media”), инкубируя при 37°C в течение 7 дней. Кроме того, для определения лецитиназной активности выращивали *Listeria* spp. на среде ГРМ №1 (Оболенск) с лецитином и 0,5% активированным углем.

Выделение штаммов *Listeria* spp из продуктов питания. Выделение *Listeria* spp проводилось в целом как описано в (Hitchins A.D., 1995). Идентификация выделенных клонов проводилась как описано в том же руководстве и подтверждалась с помощью API тестов (BioMerieux, France).

Приготовление сред и определение лецитиназной активности. Для определения лецитиназной активности среды готовили следующим образом. Перед стерилизацией к

агаризованной среде добавляли порошкообразный активированный уголь до концентрации 0,2 – 1%. Желток куриного яйца разводили в 100 мл физиологического раствора и добавляли 5% по объему к стерилизованному и охлажденному до 40 – 45°C питательному агару. Аналогично готовили агар с добавлением желтка, но без добавления активированного угля. Исследуемые штаммы высевали короткими штрихами (по 15-20 клонов на одну чашку Петри). Инкубировали 48 ч при температуре 37°C. Активность определяли через двое суток по появлению зон помутнения вокруг подросшего штриха.

Приготовление лизатов *Listeria spp.* для проведения ПЦР. Лизаты для ПЦР были приготовлены, как описано Ермолаевой С.А.(1994).

Полимеразная цепная реакция. ПЦР проводили с использованием Taq-полимеразы фирмы Бионем и 10х буфера, поставляемого совместно с ферментом. Реакционная смесь включала 1.5 mM MgCl₂, 1mM dNTP, 15 пмоль праймеров. В работе были использованы пары праймеров Plc-1, Plc-2 и Prs-1, Prs2 (см. Табл. 2). Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл. На смесь наслаивали минеральное масло в объеме 15 мкл. Амплификация проводилась в термоциклере Терцик (ДНК-технология) по программе быстрого регулирования. Амплифицированную ДНК анализировали гель-электрофорезом в 1% агарозном геле в трис-ацетатном буфере в присутствии 0,5 мкг/мл бромистого этидия.

Осаждение продукта ПЦР для рестрикционного анализа. К 50 мкл ПЦР-продукта добавляли 50 мкл воды и 90 мкл теплого раствора 20% ПЭГ6000-2.5 M NaCl. Смешивали на Vortexe. Инкубировали 10 мин при 37°C. Осаждали на микроцентрифуге 5 мин при максимальных оборотах. Добавляли 200мкл 75% этанола, не взбалтывая осадок. Центрифугировали 1 мин, удаляли этанол. Сушили на столе 5-10 мин. Суспендировали осадок в 10-40 мкл деионизованной воды в зависимости от концентрации ампликона.

Метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦРФ). Рестриксию ДНК осуществляли эндонуклеазами Hind III, Cla I, BamH I, EcoR I производства Fermentas (Литва) в соответствующих буферах в объеме 20 мкл в течение двух часов

при 37°C: 10 мкл

Таблица 2

| Наименование | Нуклеотидный состав праймера | Характеристика мишени |
|--------------|------------------------------|---|
| PLS1 | AGGGGGCCATTTTGTATAAG | Направляют амплификацию участка, размером 474 н п, гена фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазы C plcA |
| PLS2 | ATCGTTGCTGTTTGTCTCGT | |
| PRS1 | GCATTGCGTGAAGCTGGGCAAC | Фрагмент размером 211 н п. гена <i>prs</i> , кодирующего белок фосфорибозилпиروفосфатсинтазу, не связанного с вирулентностью, консервативного для всех видов листерий |
| PRS2 | CAGAAGCATTTTCATGAAC | |
| LMP3 | CATGTTGTTCCACCCAGTTC | Фрагмент хромосомы <i>L. monocytogenes</i> , размером 2862 н.п., содержащий гены <i>prfA</i> и <i>plcA</i> , кодирующие регуляторный белок PrfA и фосфолипазу PI-PLC; и фрагмент гена <i>hly</i> , кодирующий листериолизин O |
| LMP4 | ACATTTGTCACATCTCCG | |

ПЦР-продукта, 2 мкл буфера, 1мкл рестриктазы и 7 мкл деионизованной воды.

Рестрицированную ДНК анализировали гель-электрофорезом в 0,8% агарозном геле в трис-ацетатном буфере в присутствии 0,5 мкг/мл бромистого этидия.

Определение нуклеотидной последовательности фрагмента хромосомы *L. monocytogenes*, содержащего ген *prfA*. Образцы для секвенирования были получены в ПЦР с праймерами Lmp3, Lmp 4 (Табл. 2). Секвенирование проводилось в Центре Совместного Пользования «Геном». Сравнение последовательностей и анализ присутствия сайтов рестрикции осуществлялось с помощью программ PCGene и Clone. Исходная последовательность использованного района листериозной хромосомы была получена из базы данных генома штамма EGD, находящейся в институте Пастера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

1. Отработка методики выделения листерий из продуктов питания.

Нами была показана на примере молочных продуктов возможность длительного сохранения и размножения *L. monocytogenes* в молоке в широком диапазоне температур. Уже через 7 дней инкубации концентрация возбудителя достигала потенциально опасной

величины ($10^6 - 10^8$ КОЕ/мл), которая сохранялась в течение 2 месяцев (Рис. 1).



Рис. 1.

Выделение листерий из ранее стерильного молока, при отсутствии посторонней микрофлоры, не представляет сложности и не требует селективных сред и дополнительных методов. В то же время выделение листерий из продуктов, контаминированных листериями в естественных условиях, значительно сложнее. Наши попытки выделить листерии из продуктов питания различного происхождения на традиционных средах, используемых для культивирования возбудителя и (или) выделения листерий из стерильного клинического материала (ликвор, кровь) - кровяной агар или агар Хоттингера, а также использование какого-либо одного селективного фактора (холодовое обогащение, теллурит калия) были безуспешными. Только применение сочетания бульона обогащения и селективной твердой среды, обязательно содержащей эскулин, хлорид лития и антибиотики, позволило наладить и стандартизовать выделение листерий из продуктов питания различного происхождения. Важно, что эффективность выделения зависела не от источника изготовления среды (Оболенск, Россия; Хай Медиа Индия), а от строгого соблюдения схемы исследования продуктов питания (Рис. 2).

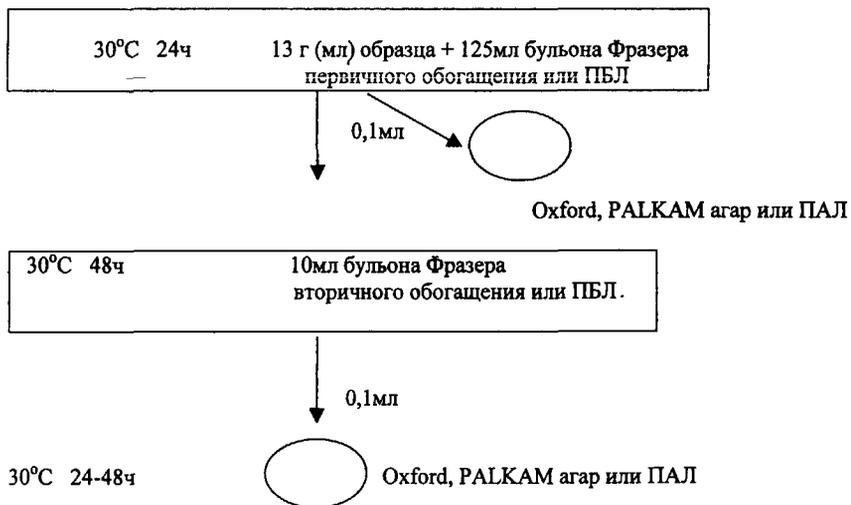
Для выделения листерий из продуктов питания в подготовленные флаконы со 125 мл бульона (*Listeria Selective Broth*) после стерилизации вносили селективные добавки непосредственно перед внесением образца. Измельченный в асептических условиях продукт добавляли к подготовленному бульону и интенсивно перемешивали. Инкубировали в течение суток при 30°C. Из каждого флакона петлей переносили на

Oxford агар или PALKAM. Инкубировали 48 ч и выявляли колонии с потемнением среды вокруг. После инкубирования производили отбор подозрительных характерных колоний (с потемнением). Не менее 5 колоний из каждого образца пересевали на триптико-соевый агар с дрожжевым экстрактом до отдельных колоний, так как на селективных средах с антибиотиками сопутствующие микроорганизмы могут проявлять слабый рост, но присутствовать вместе с листериями.

Однако, после посева на питательный агар для получения чистой культуры и последующей микроскопии не все микроорганизмы оказывались грамположительной палочкой. Потемнение вызывали и грамположительные кокки (по литературным данным энтерококки). Однако потемнение среды, вызываемое энтерококками, имело зеленоватый оттенок в отличие от буро-коричневого, вызываемого листериями.

Всего в работе было проверено 172 образца продуктов питания различного происхождения по разработанной схеме. Из них: мяса и фарша – 48; колбасных изделий, сосисок, ветчины – 44; молочных продуктов, сыра и творога – 39; кур, куриной кулинарии (фарш, котлеты, шницель) – 21; овощных салатов – 10; рыбы - 10.

Рис.2 Схема выделения *L.monocytogenes* из продуктов питания.



В результате было выделено 49 культур листерий. Из них: *Listeria monocytogenes* – 14 штаммов (8%), *Listeria innocua* – 32 штамма (18,5%), *Listeria welshimeri* – 3 штамма (менее 2%). Использование данной схемы позволило выделить листерии в 30% образцов (табл.3). Выявленный уровень контаминации продуктов соответствует данным многих зарубежных исследований (Farber J.M., Peterkin P.I., 1991) и свидетельствует о том, что контаминация листериями продуктов питания в Российской Федерации столь же высока, как и за рубежом; предлагаемая схема выделения листерий в полной мере отвечает задачам эффективного мониторинга возбудителя в продуктах питания.

Таблица 3

| Наименование групп продуктов | Число исследованных образцов продуктов питания (% от общего числа образцов) | | | |
|--|---|-----------------------|----------------|------------------------------------|
| | Всего | Свободных от листерий | Всего листерий | В том числе <i>L.monocytogenes</i> |
| 1.Мясо и мясная кулинария | 48 (100%) | 29 (60,4%) | 19 (39,6%) | 5 (10,4%) |
| 2.Мясо птицы и кулинария | 21 (100%) | 9 (43%) | 12 (57%) | 2 (9,5%) |
| 3.Мясные продукты готовые к употреблению | 44 (100%) | 28 (63,6%) | 16 (36,4%) | 6 (13,6%) |
| 4.Молочные продукты | 39 (100%) | 38 (97,4%) | 1 (2,6%) | – |
| 5.Овощные салаты | 10 (100%) | 10 (100%) | – | – |
| Итого: | 162(100%) | 114(70,4%) | 48 (29,6%) | 13(8%) |

2. Разработка метода лецитиназной активности для идентификации *L.monocytogenes*.

Не менее важной задачей, чем выделение листерий, является быстрая дифференциация патогенного для человека вида *L.monocytogenes* от 5 других непатогенных видов листерий. В наших исследованиях из 48 выделенных культур только 13 штаммов (28%) принадлежат к *L.monocytogenes*. Остальные культуры, как показала последующая идентификация, относились к *L.welshimeri* и *L.innocua*, особенно часто

контаминирующим продукты. В данном случае серологическая идентификация не работает, поскольку упомянутые виды листерий имеют существенное число общих антигенных детерминант с *L.monocytogenes*. Получившие наибольшее распространение методы дифференциации, основанные на ферментации углеводов и определении гемолитической активности, дают надежные результаты только при объединении в соответствующую панель типа API Listeria, что в значительной степени удорожает идентификацию листерий.

Нами разработан принципиально новый метод, основанный на определении лецитиназной активности на среде с добавлением активированного угля. Ранее С.А.Ермолаевой с соавт. было показано, что секретируемый самими листериями продукт, выполняющий функции ауторепрессора, может быть устранен из среды гидрофобным сорбентом, в частности активированным углем (Ермолаева С.А. и др., 2000). При этом происходит активация генов патогенности и, соответственно, увеличение уровня экспрессии факторов патогенности в среде, в том числе лецитиназы. Наши исследования показали, что в присутствии активированного угля у *L.monocytogenes* наблюдается четко выраженная лецитиназная активность, которая при выращивании на агаризованных средах наблюдается в виде плотной зоны помутнения вокруг роста культуры. Нами были подобраны оптимальные концентрации активированного угля и куриного желтка, которые на среде ГРМ №1 (Оболенск, Россия) позволяли четко дифференцировать *L.monocytogenes* от непатогенных листерий.

Условия индукции лецитиназной активности были отработаны на 16 штаммах *L.monocytogenes*, полученных из коллекций NCTC, SLCC, ATCC, НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи (штаммы 1-16, Табл. 1). Была использована агаризованная среда Brain Heart Infusion (BHI, Difco); активированный уголь (Merck) добавлялся до концентраций от 0,2% до 1%. У 11 проверенных штаммов выявлена лецитиназная активность в присутствии 0,5% угля и выше, у 2 штаммов - в присутствии 0,2% и более (Таблица 4).

Два штамма (SLCC2540 и NCTC10528) не обладали лецитиназной активностью в присутствии активированного угля вплоть до 1% и, видимо, вообще не активировались. Один штамм (NCTC5105) демонстрировал лецитиназную активность как в присутствии, так и при отсутствии активированного угля. Согласно полученным результатам, оптимальной для наблюдения изменения продукции лецитиназы на агаризованных средах является концентрация 0,5%.

Таблица 4. Штаммоспецифическая зависимость индукции лецитиназной активности у *L monocytogenes* от концентрации активированного угля

| Всего изучено штаммов | Лецитиназная активность выявляется | | | Лецитиназная активность не выявляется |
|-----------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|
| | Независимо от угля | При 0,2% и выше угля | При 0,5% и выше угля | |
| 16 | 1 (6%) | 2 (12,5%) | 12 (69%) | 2 (12,5%) |

Хотя на среде ВН1 (Difco) наблюдалась четко выраженная индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля, тем не менее эта среда не является оптимальной для масштабных исследований в силу причин экономического характера. Поэтому был исследован ряд других сред, представленных на отечественном рынке. Результаты представлены в таблице 5. Оптимальные результаты, помимо среды ВН1 (Difco), были получены со средой ГРМ №1 (Оболенск). При добавлении к этой среде желтка куриного яйца (см. Материалы и Методы) штаммы дикого типа без угля не демонстрировали лецитиназной активности, а в присутствии 0,5% активированного угля демонстрировали четко различимую активность уже через 24 часа в виде плотной зоны помутнения шириной 2-4мм, которая спустя 48 часов достигала ширины 6-10мм (Рис.3). На других протестированных средах индукции лецитиназной активности не наблюдалось, или наблюдалось нечеткое исчезающее гало, трудное для интерпретации.

Таблица 5. Лецитиназная активность *L.monocytogenes* в присутствии 0,5% активированного угля на различных питательных средах

| Среда | Лецитиназная активность |
|--|-------------------------|
| Brain Heart Infusion (Difco Lab., USA) | + |
| Brain Heart Infusion (BioMerieux, France) | - |
| Brain Heart Infusion (HiMedia Lab.Ltd., India) | - |
| Listeria Selective Broth (HiMedia Lab.Ltd., India) | - |
| MYP (HiMedia Lab.Ltd., India) | - |
| ГРМ №1 (ННПГИП, Оболенск, Россия) | + |

В работе использовался активированный уголь фирмы Merck и отечественного производства. Различий в лецитиназной активности при использовании отечественного и импортного угля не было.

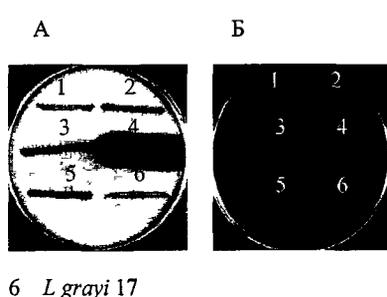


Рис.3. Индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля 1 – *L.monocytogenes* NCTC10527; 2 – *L.welshimeri* SLCC 5334; 3 – *L.innocua* ATCC 33090; 4 – *L.ivanovii* ATCC19119; 5 – *L.seeligeri* SLCC5921;

6 *L.grayi* 17

В отличие от *L.monocytogenes*, у других видов листерий, имеющих ген лецитиназы, *L.ivanovii* и *L.seeligeri*, специфической индукции лецитиназной активности в зависимости от присутствия активированного угля не наблюдается (рис. 3). Это, по-видимому, связано с межвидовыми различиями в регуляции экспрессии факторов патогенности. Имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют в пользу того, что причиной увеличения уровня продукции лецитиназы и других факторов патогенности у *L.monocytogenes* является активация положительного регулятора экспрессии факторов патогенности PrfA.

Регуляторный белок PrfA высоко гомологичен у *L.monocytogenes*, *L.ivanovii* и *L.seeligeri*, однако в его последовательности у этих трех видов есть аминокислотные замены, вероятно, влияющие на его функциональные свойства. Биохимически очень близкий к *L.monocytogenes* вид *L.innocua*, как и другие виды листерий, за исключением перечисленных выше, не имеет в своем геноме гена, кодирующего лецитиназу и не способен к гидролизу лецитина независимо от присутствия активированного угля. Таким образом, сравнение лецитиназной активности в присутствии и в отсутствии активированного угля позволяет надежно дифференцировать возбудителя листериоза от непатогенных листерий, что особенно важно при анализе штаммов, выделенных из продуктов питания.

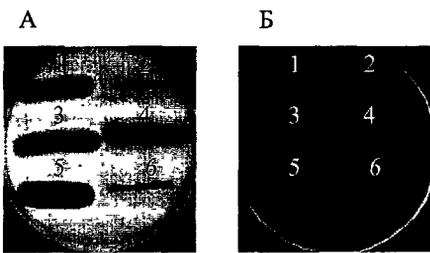


Рисунок 3. Сравнение лецитиназной активности *L.monocytogenes* и ряда бактерий, принадлежащих к другим родам. 1 – *St.aureus*; 2 – *Ent.faecalis*; 3 – *St.epidermis*; 4 – *E.coli*; 5 – *St.haemoliticus*; 6 – *L.monocytogenes*

В клинических образцах возбудитель листериоза морфологически может быть сходен с различными кокками и дифтероидами. Известны случаи ложной идентификации энтерококков, стафилококков и коринебактерий как *L.monocytogenes*, и наоборот. Индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля позволяет надежно дифференцировать листерий от не продуцирующих лецитиназу *Enterococcus* и *Escherichia coli* (рис.4). Напротив, отсутствие лецитиназной активности на среде, не содержащей угля, отличает возбудитель листериоза от стафилококков. Это позволяет рассматривать индукцию лецитиназной активности в зависимости от присутствия активированного угля как практически значимый способ для дифференциации

патогенного вида *L. monocytogenes* от представителей рода *Listeria* и других морфологически сходных бактерий.

Разработанный метод был применен для анализа штаммов, выделенных из продуктов питания и объектов окружающей среды на территории России (Москва, Тульская область, Владивосток). Всего было проверено 26 штаммов (штаммы 17-42, табл.1), охарактеризованных как *L. monocytogenes* биохимическими методами и в ПЦР. Все, кроме одного, исследованные штаммы не обладали лецитиназной активностью на среде ГРМ№1, содержащей желток куриного яйца, и демонстрировали четкую индукцию лецитиназной активности при использовании 0.5% концентрации угля. Единственный штамм 870 мел., выделенный из окружающей среды (г.Владивосток), не показывал индукции лецитиназной активности в присутствии угля. Таким образом, 96,2 % штаммов дикого типа, изолированных из независимых источников, демонстрировали индукцию лецитиназной активности в присутствии угля. Это свидетельствует о практической применимости разработанного метода.

3. Идентификация листерий методом ПЦР.

Наряду с лецитинажным тестом для идентификации *Listeria* spp. нами был разработан метод ПЦР с родоспецифическими и видоспецифическими праймерами. В видоспецифической ПЦР системе были использованы ранее описанные праймеры (Ермолаева С.А., 1994), направляющие амплификацию фрагмента гена *plsA*, кодирующего синтез одного из основных факторов патогенности – фосфатидилинозитол-специфичную фосфолипазу.

Родоспецифические праймеры направляли амплификацию фрагмента гена *prs*, кодирующего белок фосфорибозилпирофосфатсинтазу, несвязанный с патогенностью консервативный белок, необходимый в общем метаболизме бактериальной клетки. Родоспецифические праймеры *prs1*, *prs2* были подобраны в данной работе на основе сравнительного анализа последовательностей гена *prs* у *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* и *L. ivanovii*. Сравнение последовательностей гена *prs* из *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L.*

seeligeri и *L. ivanovii*, хранящихся в Genebank, с помощью программы Blast, выявило высокую степень консерватизма этого гена в роде *Listeria*. В результате из последовательности гена *L. monocytogenes* были выбраны праймеры *prs1* и *prs2*, которые имели не более трех замен в последовательностях других видов. Продукт ПЦР с праймерами *prs1* и *prs2* был получен для всех видов листерий, кроме *L. grayi*, что, по-видимому, связано с её более удалённым филогенетическим положением.

Лизаты были приготовлены так, как описано в Материалах и методах. При первоначальном изучении листериозных культур использовали несколько иные условия проведения лизиса клеток, а именно, используемая концентрация лизоцима, фермента, разрушающего бактериальную стенку, была 20 мг/мл. Однако ряд штаммов не мог быть лизирован в таких условиях. Это приводило к тому, что штаммы, идентифицированные другими методами как *L. monocytogenes*, давали в ПЦР отрицательный результат. Лецитиназный же метод показывал положительный результат, то есть давал зону помутнения вокруг роста данной культуры, предположительно *L. monocytogenes*, на плотной среде с лецитином. После изменения условий лизиса культуры, с уменьшением концентрации лизоцима до 0,2 мг/мл, клеточная стенка бактерий лизировала и результат ПЦР коррелировал с другими методами дифференциации листерий.

Ранее определенная чувствительность используемой видоспецифической системы с праймерами *plc1*, *plc2* на препаратах очищенной ДНК (Ермолаева С.А., 1994) составляла 125 фг. Чувствительность ПЦР, проводимой на лизатах, составила 10^3 бактериальных клеток в образце (рис.5). При исследовании выделенных культур среднее число клеток в реакции составляло 10^5 . Все штаммы *L. monocytogenes* давали положительный результат в ПЦР. Листерии принадлежащие к другим видам, в ПЦР с праймерами *Plc1*, *Plc2* давали отрицательный результат.

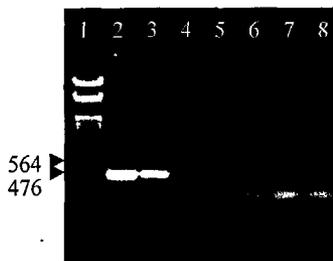


Рисунок 5. Определение чувствительности ПЦР с праймерами Plc1, Plc2 на лизатах штамма *L.monocytogenes* NCTC10527. Стрелками указаны: соответствующий фрагмент маркера молекулярного веса (564 н.п.) и амплифицированный фрагмент (476 н.п.). 1 – маркер молекулярного веса, ДНК фага лямбда, обработанная рестриктазами *EcoRI*, *Hind* III; 2 – 10^5 клеток в образце; 3 – 10^4 клеток; 4 – 10^3 клеток; 5 – 100 клеток; 6 – 10 клеток; 7 – 1 клетка; 8 – отрицательный контроль.

Родоспецифические праймеры позволяли успешно дифференцировать представителей рода *Listeria* от бактерий других родов. Анализ 52 штаммов, выделенных из различных источников с помощью традиционных (ферментация углеводов, гемолитическая активность) методов, определения лецитиназной активности и ПЦР показал, что из совокупности применявшихся методов сочетание лецитиназного теста и ПЦР в настоящее время является наиболее надежным, простым и эффективным для быстрой идентификации патогенных для человека листерий.

4.Типирование *L. monocytogenes* на основе полиморфизма генов факторов патогенности.

Более 90% штаммов *L. monocytogenes*, изолированных при спорадических случаях листериоза, принадлежат всего к трем серогруппам из девяти существующих: 1/2a, 1/2b и 4b (Wiedman M. et al., 1996). Более того, подавляющее большинство штаммов, явившихся причиной крупных эпидемических вспышек, формируют очень узкую группу, характеризующуюся принадлежностью к серогруппе 4b и всего двум риботипам из 23 выявленных к настоящему времени (там же). Таким образом, очевидно, что некоторые

клональные линии *L. monocytogenes* обладают повышенным тропизмом по отношению к людям, и их выявление и идентификация, в частности, в продуктах питания, которые являются основным фактором заражения листериозом, имеют большую эпидемиологическую значимость.

Важнейшую роль для вирулентности листерий играет белок PrfA, который необходим для экспрессии всех остальных факторов патогенности. Ген *prfA* расположен на «островке патогенности» рядом с геном *plcA*, кодирующим фосфолипазу PI-PLC, секретлируемый фактор патогенности. Область гена *prfA* была выбрана в качестве мишени для анализа с целью оценки возможности его использования для дифференциации штаммов *L. monocytogenes*. Мы предполагали вероятность того, что область гена, продукт которого непосредственно контролирует уровень экспрессии факторов патогенности, имеет определенные различия у разных клональных линий. В качестве метода был использован метод полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) участка хромосомы, содержащего гены *prfA* и *plcA*. Анализируемые фрагменты синтезировались в ПЦР с использованием в качестве матрицы лизатов штаммов из коллекции ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН.

Анализ был проведен на коллекции из 42 штаммов *L. monocytogenes*, перечисленных в Табл.1. Все, за исключением двух, штаммы исследованной коллекции давали в ПЦР с праймерами Lmp3, Lmp 4 ожидаемый продукт размером 2 862 н.п. Набор ферментов рестрикции, который был использован в этой работе, был определен на основе анализа последовательности этой области у штамма EGD, геном которого был секвенирован. Всего было использовано 4 фермента рестрикции. В результате проведенного рестриционного анализа штаммы были разделены на два типа А и В, причем в последнем был выделен подтип В1. Штаммы типа А имели рестриционный спектр, аналогичный типовому штамму EGD, а штаммы типа В отличались положением сайтов узнавания рестриктазами ClaI и HindIII (рис.6).

Нами было проведено частичное секвенирование фрагментов ПЦР штаммов NCTC10527 и GIM132/5, принадлежащих к группам В и В1, соответственно. Мы обнаружили у обоих штаммов ряд нуклеотидных замен по сравнению с последовательностью штамма EGD. В том числе были обнаружены нуклеотидные замены, приводящие к изменению сайтов рестрикции: А→G в положении 530 от начала фрагмента, А→G в положении 728 и G→А в положении 806 (Рис.6). Кроме того, у штамма GIM132/5 мы нашли замену С→А в положении 1448, которая картируется в последовательности гена *plcA* (Рис.6). Замены в положениях 728 и 806 приводили к возникновению последовательностей, узнаваемых рестриктазами Cla I и Hind III, соответственно, а замены в положениях 530 у обоих штаммов и 1448 у штамма GIM132/5 наоборот, к исчезновению последовательности, узнаваемой рестриктазой Hind III. Таким образом, секвенирование штаммов NCTC 10527 и GIM132/5 позволило нам создать для типов В и В1 рестриктные карты, которые отличались от штамма EGD положением Hind III сайтов, и наличием дополнительного сайта для ClaI (Рис.6).

Таким образом, разделение произошло благодаря существованию у штаммов группы В единичных нуклеотидных замен в последовательности гена *prfA*. В тоже время ни одна из замен не приводила к изменению в последовательности самого белка PrfA, т.е. замены были так называемыми «молчащими».

Эти данные свидетельствуют о существовании в патогенном виде *L.monocytogenes* по крайней мере двух филогенетических линий, и в этом наши данные подтверждают опубликованные ранее работы зарубежных исследователей (Wiedman M. et al., 1996) в которых существование этих линий было предположено на основе анализа генов других факторов патогенности, причем только с одной из них, линией, имеющей в наших обозначениях спектр типа В, связано более 90% случаев заболевания листериозом (Farber J.M., Peterkin P.I., 1991).

Анализ связи между принадлежностью штамма к определенной филогенетической линии и источником выделения на примере имеющейся коллекции штаммов *L. monocytogenes* показал, что, действительно, 67 % клинических изолятов принадлежат к типу В, в то время как среди штаммов, выделенных из продуктов питания, к этому типу относится менее 20%.

Таким образом, полученные в данной работе результаты свидетельствуют о существенном уровне контаминации продуктов питания патогенными листериями и позволяют рекомендовать эффективные методы идентификации и типирования листерий на основе изучения особенности экспрессии и полиморфизма генов факторов патогенности.

Выводы:

1. Впервые в Российской Федерации проведена систематическая оценка уровня контаминации продуктов питания листериями. Выявлено присутствие листерий в 29,6% исследованных продуктов, из них в 26,7 % случаев присутствовал возбудитель листериоза *Listeria monocytogenes* (8% от общего числа исследованных продуктов), в остальных случаях выявлялись непатогенные *Listeria spp.*
2. Способность листерий к длительному сохранению и размножению в молоке (до 2 месяцев) показана путем анализа динамики размножения *L. monocytogenes* в молочных продуктах при различной температуре.
3. Разработан принципиально новый метод дифференциации *L. monocytogenes* от непатогенных листерий, основанный на определении индукции гидролиза лецитина в присутствии активированного угля, добавляемого в питательную среду.
4. На коллекции штаммов листерий, выделенных из продуктов питания, показано, что сочетание методов определения лецитиназной активности и амплификации с

видоспецифическими праймерами к гену *plcA* является наиболее надежным способом дифференциации *L. monocytogenes* от непатогенных листерий.

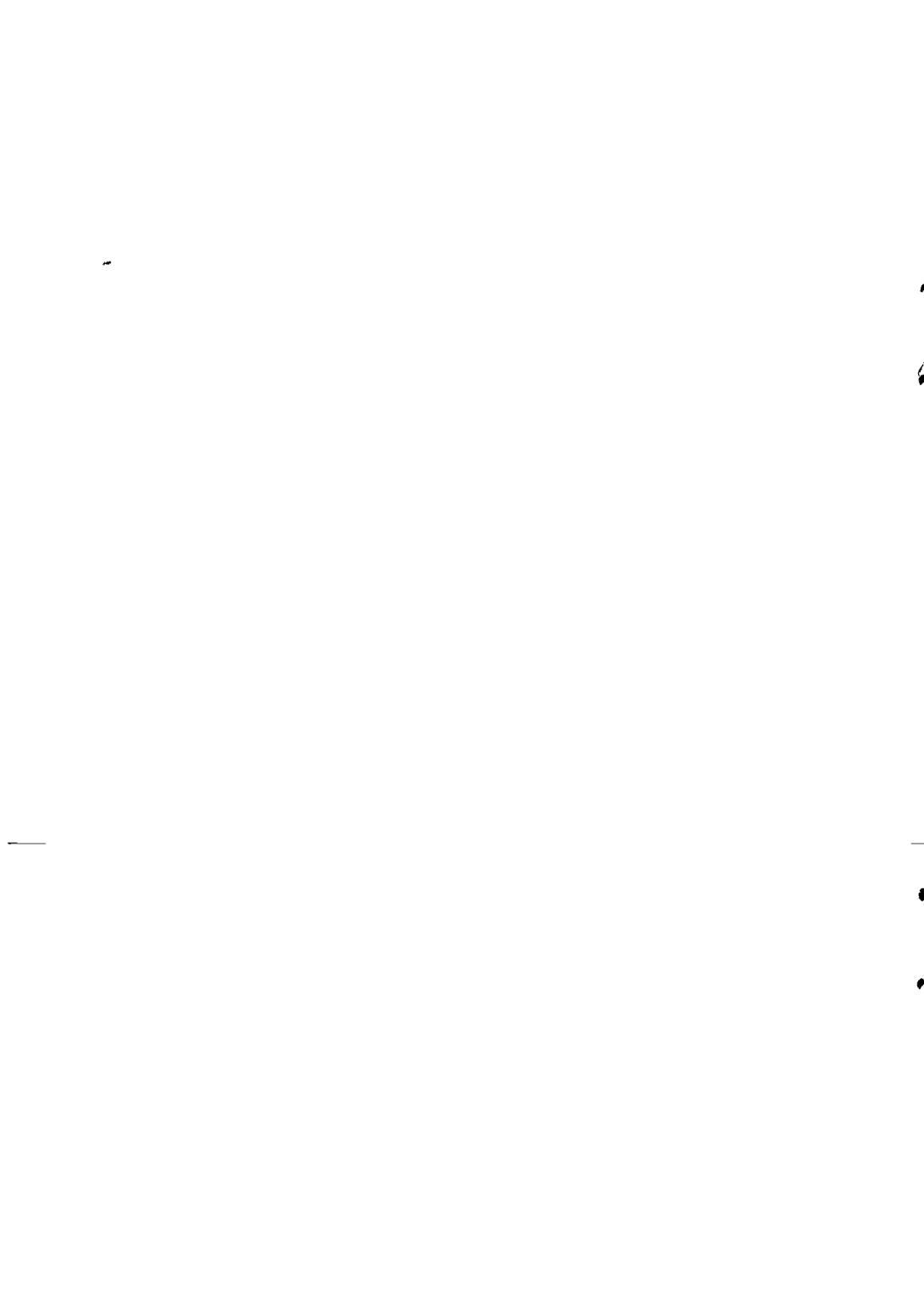
5. Разработан новый метод типирования штаммов *L. monocytogenes* на основе анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) синтезированного в ПЦР участка хромосомы, содержащего гены патогенности *prfA* и *plcA*. Разработанный метод выявляет принадлежность выделенного штамма листерий к определенной филогенетической линии и позволяет определить его потенциальную эпидемиологическую значимость.

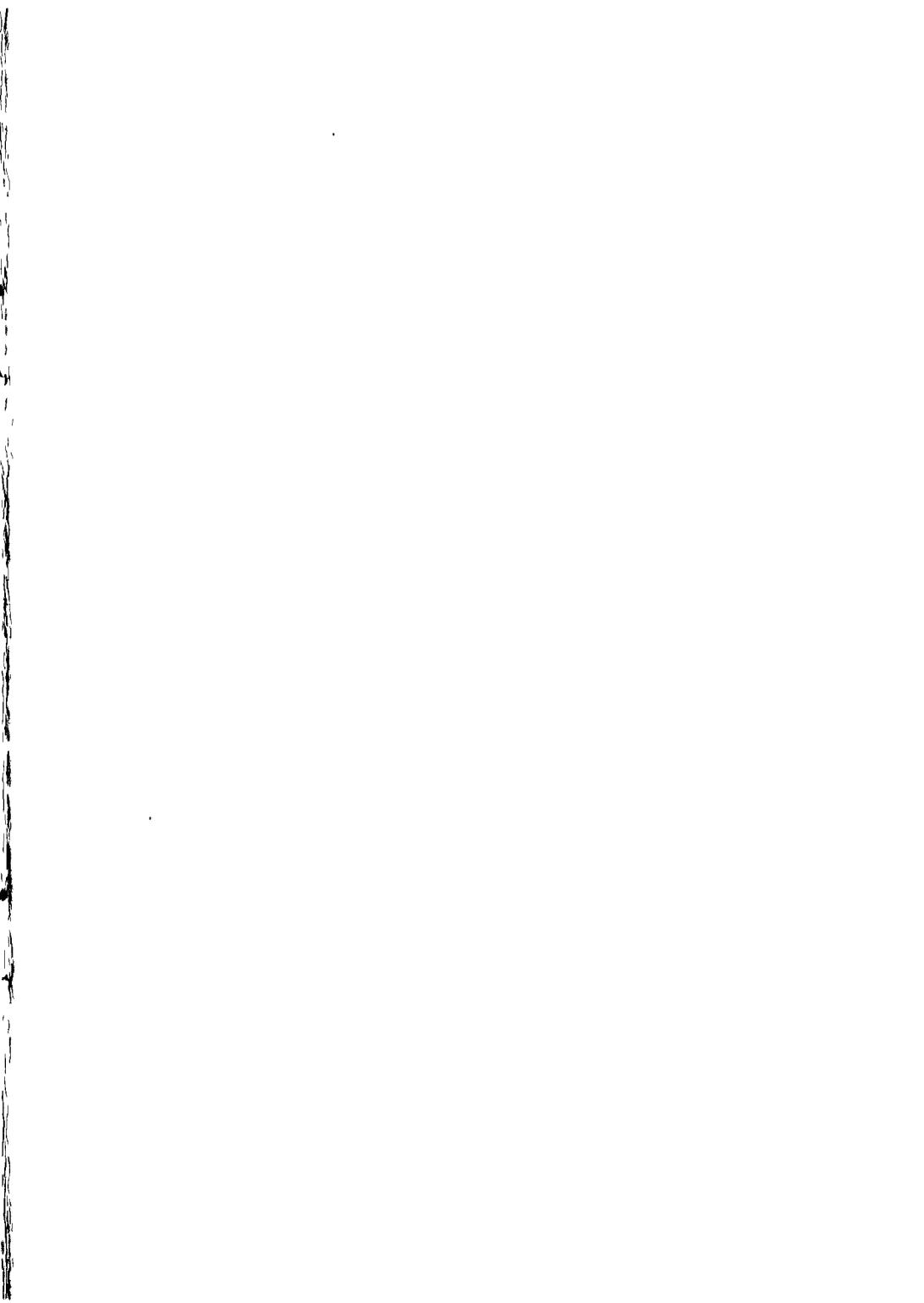
Список работ по теме диссертации.

1. И.Л.Жилина, Н.М.Шустрова, Т.И.Карпова Выделение листерий из клинического материала и изучение их чувствительности к антибиотикам // Клинич. лаб. диагностика. 1998. №9. С.12.
2. Т.И.Карпова, Н.М.Шустрова, А.Е.Снегирева, И.Б.Куваева, И.С.Тартаковский Особенности размножения листерий в молочных продуктах. Всероссийская конференция с международным участием «Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека». Москва, 21-23 апреля 1999 г., с.20.
3. Т.И.Карпова, Н.М.Шустрова, А.Е.Снегирева, С.А.Шевелева, И.Б.Куваева, И.С.Тартаковский Размножение листерий в молочных продуктах // ЖМЭИ.2001.№1.С.80-81.
4. Карпова Т.И., Ермолаева С.А., Лопырев И.В., и др. Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes* // Клин. Микр. Антимикр. Хим. 2001; 3; с.266-273.
5. Тартаковский И.С., Шевелева С.А., Карпова Т.И., Шустрова Н.М., Ермолаева С.А., Снегирева А.Е., Куваева И.Б. Методические подходы к выделению и

- идентификации листерий в продуктах питания. Сб. Профилактическая медицина - практическому здравоохранению. Вып.1. часть 11.М., 2001; с.92-94.
6. Ермолаева С.А., Карпова Т.И., Тартаковский И.С. Метод дифференциации возбудителя листериоза. Сб. тез. IV Международной конференции МАКМАХ «Антимикробная терапия». г.Москва, 20-21 июня 2001. С.13
 7. Карпова Т.И., Ермолаева С.А., Тартаковский И.С., Салова Н.Я., Голованова Т.И., Шестиперова Т.И. Новый метод идентификации *Listeria monocytogenes*, основанный на определении гидролиза лецитина в присутствии активированного угля // Материалы VIII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Москва. 2002. С.283
 8. Тартаковский И.С., Карпова Т.И., Попова Т.А., и др. Оценка эффективности новых методов идентификации листерий при исследовании продуктов питания в Тульской области. Материалы научно-практических конференций, посвященных 55-летию сотрудничества ММА им. И.М.Сеченова и здравоохранения Тульской области. Москва – Тула. 2002; С. 300-301
 9. S. Ermolaeva, T. Karpova, S. Novella, et al. A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal. Int J Food Microbiol 2003; 82; С.87-94
 10. Карпова Т.И., Фирсова Т.Е., Родина Л.В., Котляров В.М., Тартаковский И.С., Ермолаева С.А. Типирование *Listeria monocytogenes* на основе полиморфизма генов факторов патогенности. Клини. Микр. Антимикр. Хим. 2003; 3; С.251-258







2003-A

19160

#19160