

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.

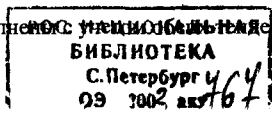
2003-А  
19160

### 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 Бioneer и 10x буфера, поставляемого совместно с ферментом. Реакционная смесь включала 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 (ПДРФ).** 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).

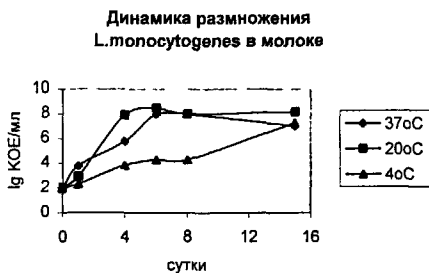


Рис. 1.

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).

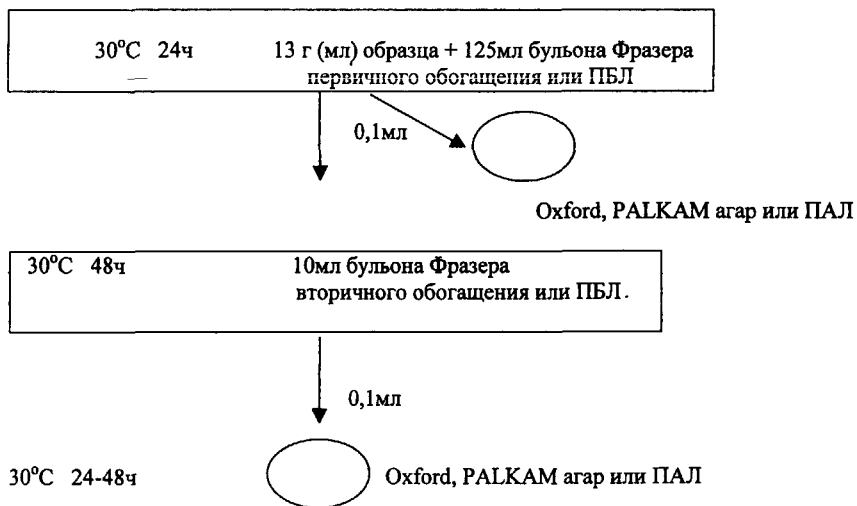
Для выделения листерий из продуктов питания в подготовленные флаконы со 125 мл бульона (*Listeria Selective Broth*) после стерилизации вносили селективные добавки непосредственно перед внесением образца. Измельченный в асептических условиях продукт добавляли к подготовленному бульону и интенсивно перемешивали. 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 пересева 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 ВНИ (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 ВНИ (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.

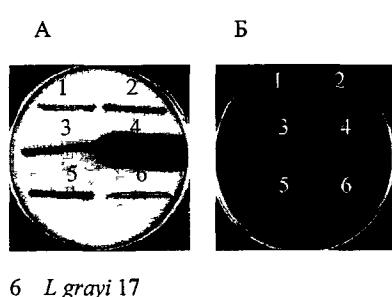


Рис.3. Индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля 1 – *L.monocytogenes* NCTC10527; 2 – *L.welshimeri* SLCC 5334; 3 – *L.innocua* ATCC 33090; 4 – *L.ivanovii* ATCC19119; 5 – *L.seeligeri* SLCC5921;

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.

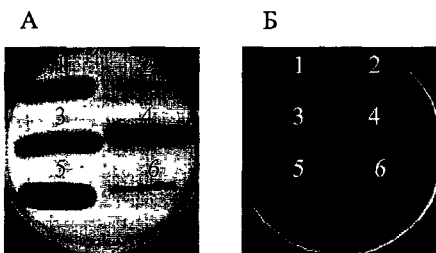


Рисунок 3. Сравнение лецитиназной активности *L.monocytogenes* и ряда бактерий, принадлежащих к другим родам. 1 – *St.aureus*; 2 – *Ent.faecalis*; 3 – *St.epidermis*; 4 – *E.coli*; 5 – *St.haemoliticus*; 6 – *L.monocytogenes*

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.

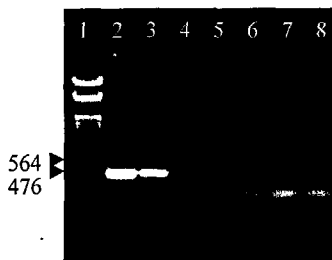


Рисунок 5. Определение чувствительности ПЦР с праймерами Plc1, Plc2 на лизатах штамма *L.monocytogenes* NCTC10527. Стрелками указаны: соответствующий фрагмент маркера молекулярного веса (564 н.п.) и амплифицированный фрагмент (476 н.п.). 1 – маркер молекулярного веса, ДНК фага лямбда, обработанная рестриктазами *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.

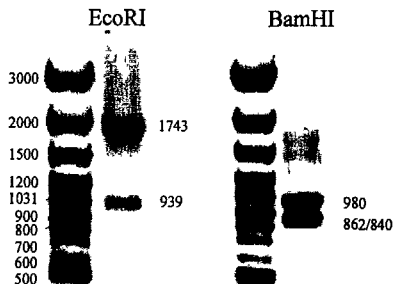
Важнейшую роль для вирулентности листерий играет белок PrfA, который необходим для экспрессии всех остальных факторов патогенности. Ген *prfA* расположен на «островке патогенности» рядом с геном *plcA*, кодирующим фосфолипазу PI-PLC, секретлируемый фактор патогенности. Область гена *prfA* была выбрана 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 (ПДФ) 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).

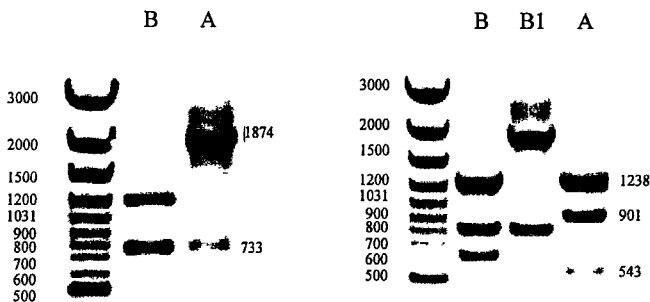
Нами было проведено частичное секвенирование фрагментов ПЦР штаммов NCTC10527 и GIM132/5, принадлежащих к группам В и В1, соответственно. Мы обнаружили у обоих штаммов ряд нуклеотидных замен по сравнению с последовательностью штамма EGD. В том числе были обнаружены нуклеотидные замены, приводящие к изменению 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 «молчашими».

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 ).



Профили рестрикции фрагмента Lmp3-Lmp4 рестриктазами EcoRI и BamHI.



Штаммоспецифический полиморфизм фрагмента Lmp3 – Lmp4 при рестрикции ClaI и HindIII.

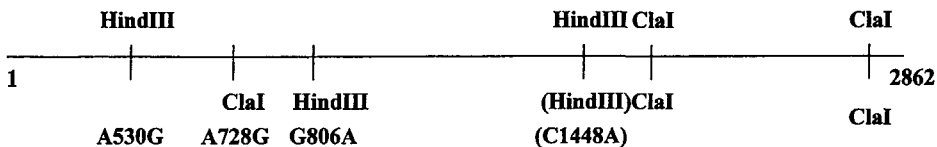


Рис. 6. Схема расположения ClaI и HindIII сайтов рестрикции в зависимости от принадлежности к группе А (сайты указаны над чертой) или к группе В (сайты указаны под чертой).

В нижней части указаны нуклеотидные замены у штаммов группы В, приводящие к изменению положения сайтов рестрикции.

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.

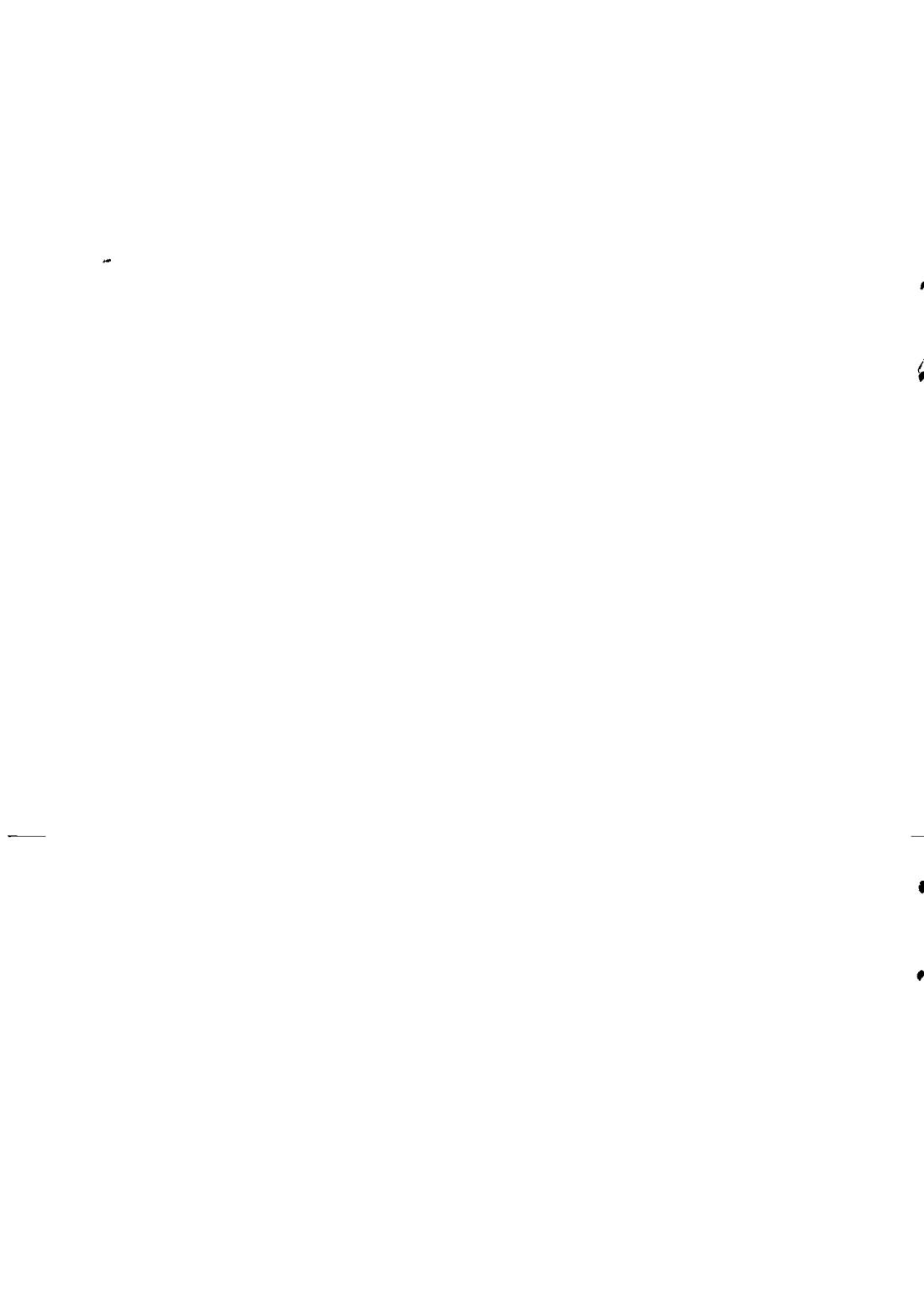
#### **Список работ по теме диссертации.**

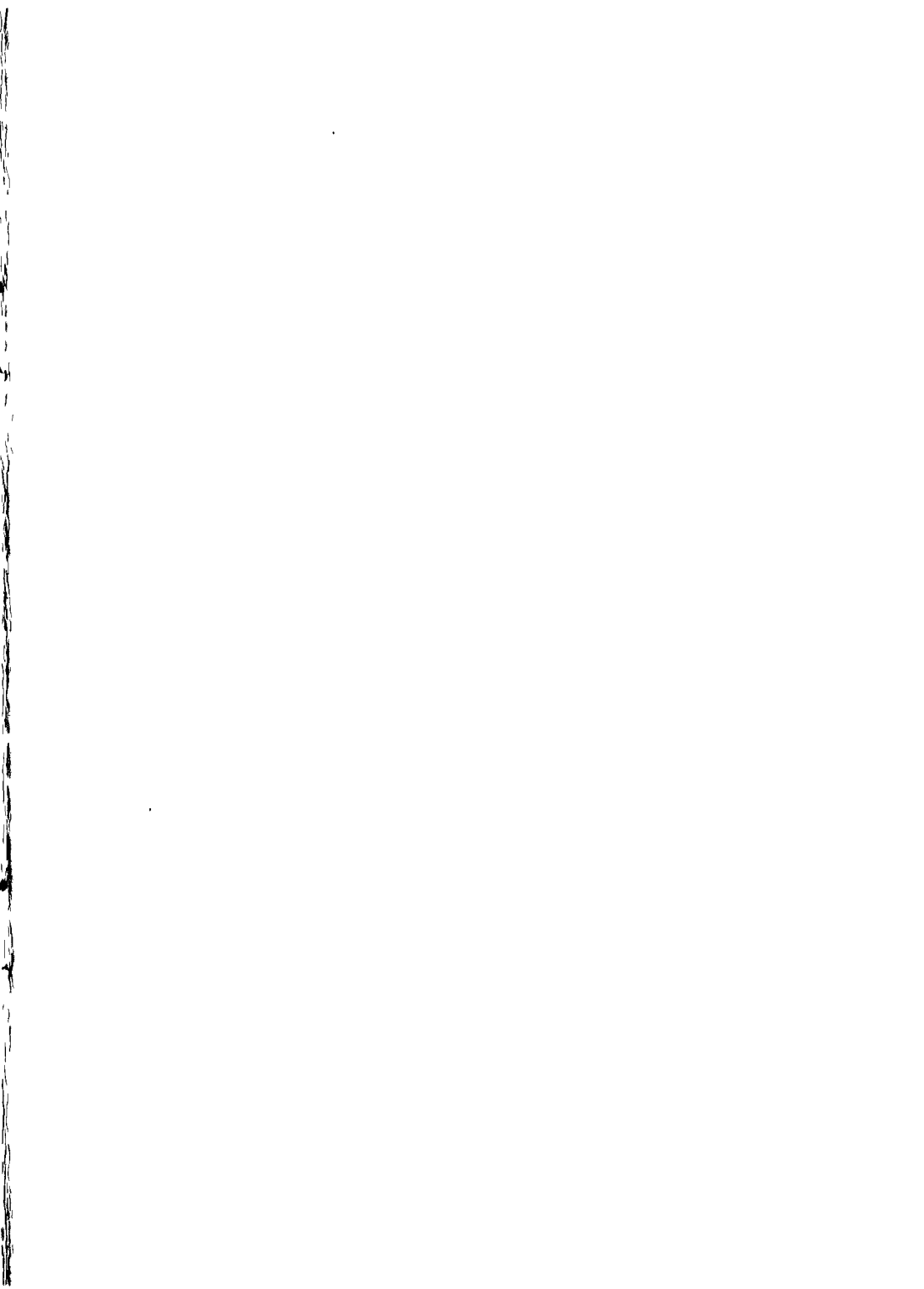
1. И.Л.Жилина, Н.М.Шустрова, Т.И.Карпова Выделение листерий из клинического материала и изучение их чувствительности к антибиотикам // Клинич. лаб. диагностика. 1998. №9. С.12.
2. Т.И.Карпова, Н.М.Шустрова, А.Е.Снегирева, И.Б.Куваева, И.С.Тартаковский Особенности размножения листерий в молочных продуктах. 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