

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. Стародумова¹, Е.А. Зайцева^{1,2}

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

² 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. Starodumova¹, E.A. Zaitseva^{1,2}

¹ 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), ² 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

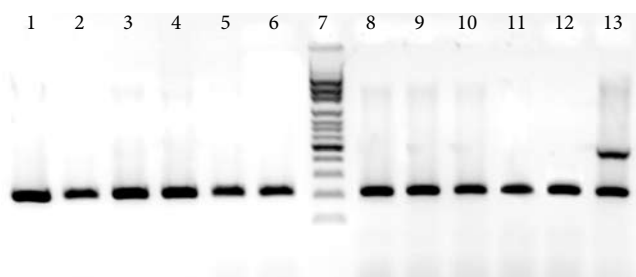


Рис. 1. Электрофорез продуктов амплификации ДНК референтных штаммов листерий с одной парой праймеров prs_1 - prs_2 (1-6 – 211 п.н.) и двумя парами праймеров prs_1 - prs_2 и plc_1 - plc_2 (8-12 – 211 п.н., 13 – 211 и 476 п.н.): 1, 13 – *L. monocytogenes* EGD; 2, 8 – *L. ivanovii* NCTC 11846; 3, 9 – *L. 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).

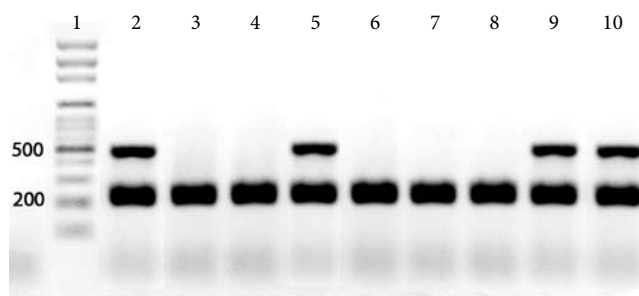


Рис. 2. Электрофорез продуктов мультиплексной ПЦР с ДНК различных культур листерий:

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_e (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 $(NH_4)_2SO_4$ (Fermentas, Литва), 2 мМ $MgSO_4$ («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.

References:

- Zaitseva E.A., Pukhovskaya N.M., Musatov Yu. S. [et al.]. Molecular and genetic features and epidemiological significance of strains *Listeria monocytogenes* isolated from pregnant women and abortion material in the Far East region of Russia // Clin. microbiol. antimicrob. chemotherapy. 2007. Vol. 9, No. 1. P. 81–89.
- Zaitseva E.A. Analysis system of microbiological and molecular-genetic markers for detection of highly virulent strains *Listeria monocytogenes*: dis. doc. med. sciences. M., 2010. 299 p.
- Karpova T.I., Ermolaeva S.A., Lopyrev I.V. [et al.]. New methods for identifying *Listeria monocytogenes* // Clin. microbiol. antimicrob. chemotherapy. 2001. Vol. 3. P. 266–273.
- Tartakovskiy I.S., Maleev V.V., Ermolaeva S.A. *Listeria*: role in human infectious pathology and laboratory diagnostics. M.: Medicine for everyone, 2002. 200 p.
- 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.
- 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.
- 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.
- Liu D. [ed.]. Handbook of *Listeria monocytogenes* // USA: CRC Press, 2008. 552 p.
- 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.

- Meinersmann R., Phillips R., Wiedmann M. [et al.]. Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hyper-variable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages // Appl. Environ. Microbiol. 2004. Vol. 70, No. 4. P. 2193–2203.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Received 2012.04.12.

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

С.М. Стародумова¹, Е.А. Зайцева^{1,2}

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

² 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 фосфорибозилпиридофосфатсинтазы (*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. Раповка¹, А.Ф. Пономарев¹, С.Е. Гаврина², Л.С. Денисенко², Е.С. Рогаткина², О.К. Шкуратова², С.П. Иванов², О.А. Соболевская¹

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

² 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. Rapovka¹, A.F. Ponomarev¹, S.E. Gavrina², L.S. Denisenko², E.S. Rogatkina², O.K. Shkuratova², S.P. Ivanov², O.A. Sobolevskaya¹

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

Соболевская Ольга Анатольевна – канд. мед. наук, ассистент кафедр госпитальной хирургии ТГМУ; 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 40–50th. 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.