

УДК 579:57.083:576.85

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДОВ *LISTERIA MONOCYTOGENES* И *LISTERIA IVANOVII*

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Мастиленко Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Ковалева Елена Николаевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 8(8422)559547

e-mail: elkov@pochta.ru

Ключевые слова: детекция, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, мультиплексная ПЦР в режиме «реального времени».

Статья посвящена вопросу разработки мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени» для генетической дифференциации патогенных видов листерий, являющихся причиной пищевого листериоза. Авторами показано, что использование праймеров и флуоресцентных зондов с красителями R6G и Fam, фланкирующих фрагмент гена *prfA* позволяют проводить детекцию бактерий видов *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii*.

Введение

На сегодняшний день листериоз имеет эпидемиологическое и эпизоотологическое значение не столько как классическая нозологическая единица, характеризующаяся традиционными инфекционными показателями, связанными с инфекционной болезнью овец и, как следствие, теоретически возможным заражением специалистов по профессиональным показателям (животноводы, ветеринарные врачи), а в первую

очередь как пищевая инфекция людей [1]. Рассмотрение листериоза в данном ракурсе можно объяснить как биологическими особенностями листерий, так и появившимся в последнее время широким спектром продуктов питания человека, в том числе растительного происхождения [2].

Повышение жизненного уровня людей, улучшение медицинского обслуживания привело к увеличению продолжительности жизни и понижению детской смерт-

ности, что повлекло за собой (по сравнению с серединой 50-х годов XX века) расширение спектра людей, входящих в первую группу риска – люди с пониженным иммунитетом, недоношенные дети, ВИЧ-инфицированные больные, люди, перенесшие пересадку органа и принимающие иммунодепрессанты.

Комплекс биологических свойств листерий, обусловленный в первую очередь сапрофитной природой (способность существовать и размножаться в температурном диапазоне от +4°C до –20°C – в условиях хранения в холодильниках) и высокой вирулентностью (до 62% у людей первой группы риска), выводит данный микроорганизм в группу наиболее коварных, а инфекцию наименее прогнозируемых [1, 2].

Для листерий характерна сложная таксономическая структура. В настоящее время род *Listeria* включает 7 видов: *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.grayi*, *L.murrayi*, *L.innocua*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri*. Установлено, что наибольшую опасность для человека представляют листерии вида *L.monocytogenes*, в связи с этим существующие методы и тесты направлены на выявление бактерий именно этого вида с целью исключения в пищевом сырье и продуктах питания. Фенотипические свойства листерий видов *L.ivanovii*, *L.grayi*, *L.murrayi*, *L.innocua*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri* недостаточно определены, а по некоторым показателям аналогичны бактериям *L.monocytogenes*, что может приводить к неточной идентификации, а значит, и к ошибочному заключению по экспертной проверке пищевого сырья (и/или продуктов питания), рекомендации к уничтожению или перевода его в категорию непищевого.

Основными средствами диагностики листериоза в России являются бактериологические методы, требующие значительных трудовых и временных затрат. Поэтому остро встает задача создания современных экспрессных высокочувствительных и специфичных средств и методов индикации и идентификации листерий различных видов [3].

Одним из путей преодоления указанных трудностей является разработка и использование систем на основе методов выявления генома возбудителя с использованием полимеразной цепной реакции

(ПЦР) [4, 5, 6, 7]. Данный подход позволит идентифицировать присутствие возбудителя листериоза в пищевом сырье и продуктах питания [8, 9, 10].

Цель исследований - разработка мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени» для генетической дифференциации патогенных видов листерий

Объекты и методы исследований

Работа была выполнена на базе отдела молекулярной биотехнологии кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им П.А. Столыпина.

В работе использованы штаммы *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.innocua*, *L.grayi*, *L.murrayi* из музея кафедры. Для выделения ДНК использовали «ДНК–сорб–АМ» («ИнтеЛабСервис», Москва), в основе метода лежит лизис бактериальных клеток, сорбция ДНК на силикагеле и отмывка ДНК спиртово-солевым буфером. В работе были использованы олигонуклеотиды *LMC-f* TCGATTAACGGGAAGCTCGG, *LMC-r* AACAGCTGAGCTATGTGCGA, *LIV-f* GCTCAGATATCACGCAGCTT, *LIV-r* AGCTGTCCGCAAATGAACCT и флуоресцентные зонды *LMC-oligo* TGCAGGAGTTAGGCTATTCAAGCGGT - R6G-BHQ2, *LIV-oligo* TCCAAGCTTTGCAAAGCAAGTTTCA - Fam-BHQ1. Для амплификации в работе использовали «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ с Taq–ДНК–полимеразой и ингибирующими активностью фермента антителами» (состав набора: дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, 2.5 мМ, 500 мкл; 10–кратный ПЦР буфер, 500 мкл; MgCl₂, 25 мМ, 500 мкл; Taq ДНК–полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами, 5 Е/мкл, 50 мкл; деионизированная вода, 2x1,7 мл.) («Синтол», Москва), а также детектирующий амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология», Москва).

Результаты исследований

Для бактерий вида *L.monocytogenes* были определены несколько участков генов, среди которых видоспецифичным оказался *prfA*, фланкирующий протеин-регулятор листериолизина, а для бактерий вида *L.ivanovii* видоспецифичным оказался участок гена, кодирующего протеин позитивной регуляции листериолизина.

В системе BLAST ресурса NCBI Gene-

Таблица 1
Программа для амплификации ДНК

№ цикла	Шаг	Температура	Длительность	Детекция	Количество повторов
1	1	95°C	5 мин		1
2	1	95°C	10 сек	*	40
	2	55°C	20 сек		
	3	72°C	10 сек		
3	1	72°C	2 мин		1

Таблица 2
Ct Fam/Hex при RT-PCR проб с содержанием ДНК *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.innocua*, *L.grayi*, *L.murrayi*

№ лунки	Идентификатор пробы	Ct, Fam	Ct, Hex
A1	<i>L.ivanovii</i> .5a (Lister)	25,8	
A2	<i>L.ivanovii</i> .5b (Lister)	30,2	
A3	<i>L.innocua</i> .6a (Lister)		
A4	<i>L.innocua</i> .c-644 (Lister)		
A5	<i>L.grayi</i> . (Lister)		
A6	<i>L.murrayi</i> . (Lister)		
A7	<i>L.monocytogenes</i> .k-1 (Lister)		23,5
A8	<i>L.monocytogenes</i> .11944 (Lister)		25,6
B1	<i>L.monocytogenes</i> .9-130 (Lister)		20,4
B2	<i>L.innocua</i> .1 (Lister)		
B3	<i>L.monocytogenes</i> .9-127 (Lister)		23,4
B4	<i>L.monocytogenes</i> .9-72 (Lister)		22,1
B5	<i>L.monocytogenes</i> .10522 (Lister)		25,2
B6	<i>L.monocytogenes</i> .766 (Lister)		22,6
B7	<i>L.monocytogenes</i> .139 (Lister)		23,0
B8	<i>L.monocytogenes</i> .9-72 (Lister)		26,2
C1	K+ <i>L.ivanovii</i> . (Lister)	25,9	
C2	K+ <i>L.monocytogenes</i> . (Lister)		26,6
C3	K- (Lister)		

Bank нами были определены полные нуклеотидные последовательности участков генов для молекулярно-генетической идентификации и дифференциации вышеуказанных микроорганизмов.

После дизайна праймеров, были определены олигонуклеотидные зонды с включением флуоресцентных меток, индивидуальных для *L.monocytogenes* и *L.ivanovii*.

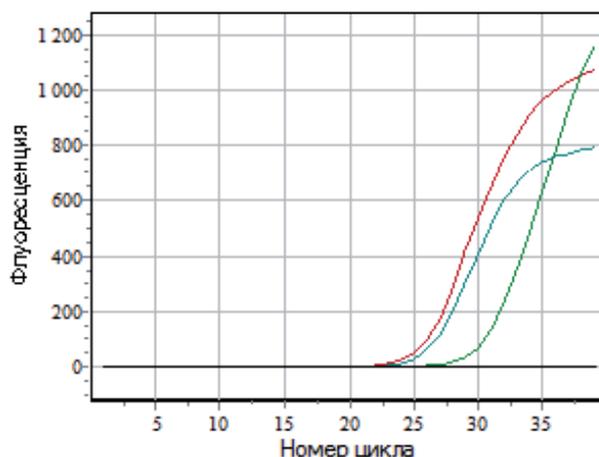


Рис. 1 – Кривая роста флуоресцентного сигнала по каналу Fam

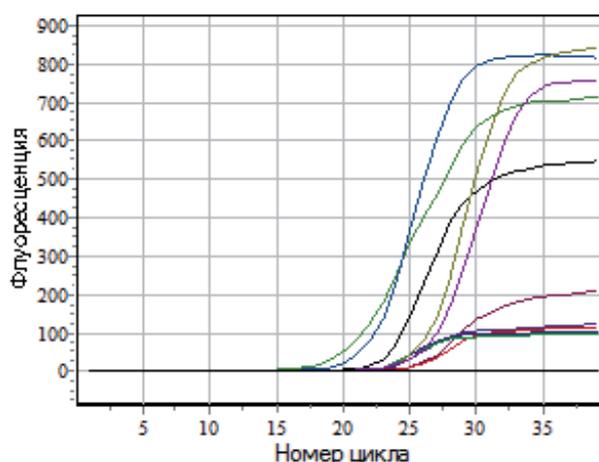


Рис. 2 – Кривая роста флуоресцентного сигнала по каналу Hex

Так, флуоресцентный сигнал, свидетельствующий об амплификации специфического фрагмента генома *L.monocytogenes*, детектируется по каналу Hex (краситель R6G), а *L.ivanovii* по каналу Fam (краситель Fam).

По данным ряда предварительных экспериментов по оптимизации протокола проведения ПЦР нами была составлена программа амплификации для термоциклеров с детекцией в режиме «реального времени» (табл. 1).

Для подтверждения видоспецифичности работы праймеров в эксперименте были использованы штаммы бактерий видов *L.innocua*, *L.grayi*, *L.murrayi*. Результаты обработки данных экспоненциального роста флуоресценции по каналам Fam и Hex отражены в табл. 2.

При проведении ПЦР в процессе эксперимента наблюдался экспоненциальный рост флуоресцентных сигналов по каналам Fam и Hex, соответствующих каждому из определяемых возбудителей. Результаты представлены на рис. 1 и 2.

Выводы

В результате экспериментов нами определены праймеры и флуоресцентные зонды с красителями R6G и Fam для *L.monocytogenes* и *L.ivanovii* соответственно. В процессе оптимизации программы амплификации (95°C–5 мин – 1 цикл; 95°C–10 сек, 55°C–20 сек, 72°C–10 сек – 40 циклов; 72°C–2 мин – 1 цикл) была доказана специфичность праймеров и олигонуклеотидных зондов для указанных возбудителей. Мультиплексный формат ПЦР в режиме «реального времени» позволяет проводить одновременную амплификацию и детекцию *L.monocytogenes* и *L.ivanovii* в одной пробирке при использовании двухканальных термоциклеров (Fam и Hex).

Библиографический список

1. Листерии и листериоз: [монография] / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, Д.В. Колбасов, Т.И. Кольпикова, Ю.О. Селянинов, И.Ю. Егорова. – Ульяновск: Ульяновская ГСХА, 2008. – 168 с.
2. Джей, Дж. М. Современная пищевая микробиология / Дж. М. Джей, М. Дж. Лесснер, Д.А. Гольден. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 887 с.
3. Васильев, Д.А. Листерийные Бактериофаги: [научное издание] / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, С.Н. Золотухин. – Ульяновск: НИИЦМиБ, Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – 66 с.
4. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* Meningoencephalitis by Real-Time PCR for the *hly* Gene / Alban Le Monnier, Eric Abachin, Jean-Luc Beretti, Patrick Berche, Samer Kayal // J. of Clinical Microbiol. – 2011. – 49, № 11. – P. 3917 – 3923.
5. Serogroup-Related PCR Typing of *Listeria monocytogenes* 4b Isolates / Bixing Huang, Ningxia Fang, Karolina Dimovski, Xian Wang, Geoff Hogg, John Bates // J. of Clinical Microbiol. – 2011. – 49, № 1. – P. 426 – 429.
6. Real-Time PCR Assay To Differentiate Listeriolysin S-Positive and -Negative Strains of *Listeria monocytogenes* / Evelyn M. Clayton, Colin Hill, Paul D. Cotter, R. Paul Ross // Appl. And Environ. Microbiol. – 2011. – 77, № 1. – P. 163 –171.
7. Stress- and Growth Rate-Related Differences between Plate Count and Real-Time PCR Data during Growth of *Listeria monocytogenes* / Franziska Reichert-Schwillinsky, Carmen Pin, Monika Dzieciol, Martin Wagner, Ingeborg Hein // Appl. And Environ. Microbiol. – 2009. – 75, № 7. – P. 2132 – 2138.
8. Васильева, Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 3 (23). – С. 46-51.
9. Использование количественной ПЦР для идентификации *Bordetella bronchiseptica* / Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Ю.Б. Васильева, Д.Г. Сверкалова // Молекулярная диагностика – 2010: Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 24-26 ноября, 2010. – Москва, 2010. – С.68 – 70.
10. Определение эффективности разработанных зондов в реакции РВ-ПЦР для повышения специфичности выявления *Bordetella bronchiseptica* / А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Д.Г. Сверкалова / Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций: материалы международной конференции, Санкт-Петербург, 5 – 7 июня 2013 года. – Санкт-Петербург: НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. – «Инфекция и иммунитет». – Т.3. – №2. – С. 152.