

Дифференциация шести видов листерий с помощью ПЦР-ПДРФ анализа ITS-последовательностей, локализованных между генами 16S и 23S рРНК

Э.А.Светоч¹, Е.И.Асташкин¹, В.Н.Борзенков¹, О.И.Тазина¹,
Н.Н.Карцев¹, Н.Р.Ефимочкина², И.П.Мицевич¹, Н.К.Фурсова¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация;

²ФГБУ «НИИ питания РАН», Москва, Российская Федерация

Предлагаемый метод дифференциации шести видов бактерий рода *Listeria* основан на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS-локуса), расположенного между генами 16S и 23S рРНК. ITS-локус амплифицировали с помощью специфичных праймеров G1 и L1 и последовательно гидролизировали эндонуклеазами рестрикции BseMII, Scal и TasI. Длины рестрикционных фрагментов анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Данная схема позволила на первом этапе дифференцировать листерии патогенного для человека вида *Listeria monocytogenes*, на втором – листерии вида *Listeria innocua*, а на третьем – остальные четыре вида листерий – патогенный для животных *Listeria ivanovii* и непатогенные *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* и *Listeria grayi*.

Ключевые слова: *Listeria* spp., ПЦР-ПДРФ анализ, ITS-локус, 16S-23S рРНК

Для цитирования: Светоч Э.А., Асташкин Е.И., Борзенков В.Н., Тазина О.И., Карцев Н.Н., Ефимочкина Н.Р., Мицевич И.П., Фурсова Н.К. Дифференциация шести видов листерий с помощью ПЦР-ПДРФ анализа последовательностей ДНК между генами 16S и 23S рРНК. Бактериология. 2017; 2(1): 46–53. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-46-53

Differentiation of six *Listeria* species using the PCR-RFLP analysis of DNA sequences located between 16S and 23S ribosomal RNA genes

E.A.Svetoch¹, E.I.Astashkin¹, V.N.Borzenkov¹, O.I.Tazina¹,
N.N.Kartsev¹, N.R.Efimochkina², I.P.Mitsevich¹, N.K.Fursova¹

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation;

²Science-Research Institution of Nutrition Russian Academy of Medical Science, Moscow, Russian Federation

Method for six *Listeria* species differentiation is based on the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the internal transcribed spacer (ITS-locus) located between 16S and 23S rRNA genes has been designed. The ITS-locus was amplified using G1 and L1 specific primers (Drebot et al., 1996) and was hydrolysed by three restriction endonucleases, BseMII, Scal, and TasI. The lengths of restriction fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis. This scheme allowed differentiating the pathogenic for human *Listeria monocytogenes* on the first stage, nonpathogenic *Listeria innocua* – on the second stage and remaining four listeria species (animal pathogen *Listeria ivanovii* and nonpathogenic *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* and *Listeria grayi*) – on the third stage.

Keywords: *Listeria* spp., PCR-RFLP analysis, ITS-region of 16S-23S rRNA genes

For citation: Svetoch E.A., Astashkin E.I., Borzenkov V.N., Tazina O.I., Kartsev N.N., Efimochkina N.R., Mitsevich I.P., Fursova N.K. Differentiation of six *Listeria* species using the PCR-RFLP analysis of DNA sequences located between 16S and 23S ribosomal RNA genes. Bacteriology. 2017; 2(1): 46–53. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-46-53

Для корреспонденции:

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: n-fursova@yandex.ru, fursova@obolensk.org

Статья поступила 20.12.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, PhD (Biol.), Head of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: n-fursova@yandex.ru, fursova@obolensk.org

The article was received 20.12.2016, accepted for publication 15.03.2017

Бактерии рода *Listeria* относятся к грамположительным факультативным анаэробам, включают в себя шесть широко распространенных видов *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, а также менее распространенные виды *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis* и *L. fleischmannii* [1–5]. Вид *L. monocytogenes* является этиологическим агентом листериоза, патогенен для человека и жвачных животных. Листериоз может протекать в инвазивной форме с поражением репродуктивной системы [6], центральной нервной системы и других органов с уровнем смертности 20–30% [7], а также в неинвазивной форме – в виде гастроэнтерита [8]. Вид *L. ivanovii*, являющийся широко известным патогеном для жвачных животных, в последние годы относят к патогенам человека – после описанного в 2010 г. случая инфекции у человека с трансплантированной почкой [9]. Кроме того, редкие случаи инфицирования человека описаны для видов листерий *L. grayi*, *L. seeligeri* и *L. innocua* [10–12]. Учитывая тот факт, что листерии достаточно широко распространены в природе и способны выживать и длительно сохраняться в пищевых продуктах [13, 14], непатогенные листерии рассматриваются как резервуар и потенциальный источник генов антибиотикорезистентности, которые могут быть переданы патогенным листериям путем горизонтального переноса [15]. Поэтому видовая идентификация представителей рода *Listeria*, выделяемых от больных людей и животных, а также из пищевых продуктов и окружающей среды, представляет большой практический и теоретический интерес.

Для идентификации и выяснения таксономического положения различных бактерий многими исследователями широко используется изучение их рибосомных рибонуклеиновых кислот (рРНК) и генов, кодирующих рРНК [16–18], в том числе – представителей рода *Listeria* [19–21]. Последовательности генов рРНК у листерий достаточно консервативны, что не позволяет использовать их для дифференциации данных видов. Менее консервативными являются последовательности межгенных регионов, в том числе – внутренний транскрибируемый спейсер (ITS-локус), расположенный между генами 16S и 23S рРНК [22–24]. Анализ нуклеотидных последовательностей ITS-локуса генов 16S и 23S рРНК *in situ* показал, что они отличаются у наиболее распространенных шести видов листерий, а также у разных серотипов *L. monocytogenes* [25].

Цель данной работы – разработка алгоритма идентификации видов листерий на основе анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированных ITS-локусов, расположенных между генами 16S и 23S рРНК (ПЦР-ПДРФ); апробация алгоритма на референс-штаммах листерий и использование разработанного подхода для видовой идентификации штаммов *Listeria spp.*, выделенных из пищевых продуктов и окружающей среды в 2008–2016 гг.

Материалы и методы

Выделение бактериальных изолятов. Выделение культур листерий из клинического материала, образцов пищевых продуктов и смывов из окружающей среды проводили согласно ГОСТ Р 51921-2002 «Продукты пищевые. Мето-

ды выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*» и Методическим указаниям МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах». Видовую идентификацию осуществляли на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия).

Штаммы микроорганизмов. В работе использованы 94 штаммов листерий из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (табл. 1): *L. monocytogenes* ($n = 59$), *L. innocua* ($n = 21$), *L. seeligeri* ($n = 2$), *L. welshimeri* ($n = 4$), *L. ivanovii* ($n = 3$) и *L. grayi* ($n = 5$). Хранение культур осуществляли в лиофильно высушенном виде при температуре +4°C, а также в 20%-ном глицерине при температуре –80°C. Культивирование листерий проводили на агаризованных селективно-диагностических питательных средах: PALCAM agar (HiMedia, Индия), Oxford agar (Oxoid, Великобритания), ПАЛ агар (Оболенск, Россия), мясо-пептонный агар (МПА) с 1% глюкозы (Оболенск, Россия), триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) (HiMedia, Индия), триптиказо-соевый агар (TSA) (HiMedia, Индия), мясо-пептонный бульон (МПБ) с 1% глюкозы (Оболенск, Россия), триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB) (HiMedia, Индия), триптиказо-соевый бульон (TSB) (HiMedia, Индия). Посевы инкубировали при температуре +37°C в течение 24–48 ч. Морфологию листерий изучали с помощью окраски мазков культур по Граму, определяли наличие или отсутствие у бактерий капсул и спор, их подвижность при температурах +22 и +37°C.

Биохимические свойства изучали по способности бактерий ферментировать углеводы (маннит, ксилозу, маннозу и рамнозу) на средах Гисса; образовывать зоны просветления при посеве на поверхность кровяного агара (β -гемолитическая активность); проявлять лецитиназную активность на средах с активированным углем и без угля, проявлять каталазную и нитратредуцирующую активности, а также с помощью КАМП-теста (Camp-test).

Амплификация ДНК. В качестве матрицы для проведения ПЦР использовали клеточные термолизаты [26]. Амплификацию ДНК проводили с помощью олигонуклеотидных праймеров G1 (5' GAAGTCGTAACAAGG 3'), специфичного к 3'-концу гена 16S рРНК, и L1 (5' CAAGGCATCCACCGT 3'), специфичного к 5'-концу гена 23S рРНК [23] в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 3 мкл 10 × Taq-буфера с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM MgCl_2 , 5 мкл 2,5 mM раствора каждого дНТФ, по 10 пкМ каждого праймера, 0,8 ед. Taq-полимеразы и 1 мкл клеточного лизата. Программа амплификации: начальная денатурация при 94°C в течение 2 мин; 30 циклов, состоящих из денатурации при 94°C в течение 45 с, отжига при 55°C в течение 30 с, элонгации при 72°C в течение 40 с; завершающая элонгация при 72°C в течение 10 мин.

Рестрикция ПЦР-продуктов. Амплифицированный образец ДНК (~1 мкг) осаждали 2,5 объемами 96%-ного этанола с добавлением 0,1 объема 3 M-ного Na-ацетата и выдерживали при температуре 20°C в течение 1 ч; центрифугировали при 16 000 g в течение 15 мин; промывали осадок 70%-ным этанолом; высушивали при 50°C в течение 10 мин и ресуспендировали в 50 мкл буфера TE. ДНК (100–150 нг) гидролизировали каждой из рестриктаз BseMII, Scal и Tsp509I («Fermentas», Литва) в 20 мкл реакционной смеси, содержа-

Таблица 1. Характеристика штаммов листерий, использованных в работе

Вид <i>Listeria</i>	Штамм	Год выделения	Источник выделения	Ферментация сахаров						Усиление гемолиза		Гидролиз лецитина	
				Маннит	Ксилоза	Манноза	Рамноза	Бета-гемолиз	КАМП-тест	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	без угля	с углем
<i>L. grayi</i>	C214	НД	НД	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	МКМ1	2010	Мясо-костная мука	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	МКМ2А	2010	Мясо-костная мука	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	МКМ2Б	2010	Мясо-костная мука	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. innocua</i>	МКМ3	2010	Мясо-костная мука	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	NCTC11288	1979	Мозг коровы	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	K644	2003	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	1	2003	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	1-36	2003	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2	2003	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	3-1	2003	Фарш	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	4-2	2003	Полуфабрикаты	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	381	2004	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	382	2004	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	СМ1	2004	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	29ИП	2004	Колбаса	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	32ИП	2004	Смыв с разделочной доски	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2012-1	2012	Тушка цыпленка	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2012-9	2012	Мясной фарш	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2012-22	2012	Мясной фарш	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2012-30	2012	Мясной фарш	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	МСЧ-164	2012	Сельдь	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	С-П 114/7	2013	Продукты	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	С-П 115/7	2013	Продукты	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
ББ3	2016	Печень птицы	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	
ББ4	2016	Печень птицы	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	
<i>L. ivanovii</i>	4912	2008	НД	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
	11840	2008	НД	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
	ATCC19119	НД	НД	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	EGD-e	1926	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	NCTC10527	1967	Дериват NCTC10225	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	GIM003	НД	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	A	НД	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	766	НД	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	NCTC10357	1926	Кролик	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	С664	НД	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	С52	НД	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	NCTC11994	1986	Мягкий сыр	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	NCTC7973	1926	Морская свинка	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	4908	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	4909	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	4910	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	4913	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	944	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	№2	2004	Говядина	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	№4	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	№6	2004	Полуфабрикаты мясные	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	М-1	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	М-2	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	М-3	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	М-5	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	М-6	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	4ИП	2004	Колбаса сырокопченая	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	12ИП	2004	Колбаса сырокопченая	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	13ИП	2003	Свинина охлажденная	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	20ИП	2003	Смыв с оборудования	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
46ИП	2004	Смыв с оборудования	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
53ИП	2003	Смыв с оборудования	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
61ИП	2004	Смыв с инвентаря	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
766ИП	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
4486	2012	Колбаски	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
4701	2012	Тушки цыплят	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
ББ1	2015	Печень птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
ББ2	2015	Печень птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	

Таблица 1. Продолжение

Вид <i>Listeria</i>	Штамм	Год выделения	Источник выделения	Ферментация сахаров						Усиление гемолиза		Гидролиз лецитина	
				Маннит	Ксилоза	Манноза	Рамноза	Бета-гемолиз	КАМП-тест	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	без угля	с углем
<i>L. monocytogenes</i>	1	2015	Сердце КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	2	2015	Сердце КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	3	2015	Сердце КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	4	2015	Сердце КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	5	2015	Сердце КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	8	2015	Сердце КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	16	2015	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	19	2015	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	20	2015	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	17	2015	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	28	2015	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	5-1	2016	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	6-2	2016	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	5-2	2016	Убойный цех КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	2-2	2016	Убойный цех КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	21	2016	Убойный цех КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	12	2016	Убойный цех КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	1-2	2016	Убойный цех КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	OP513/2	2016	Умерший человек	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	OP517/7	2016	Умерший человек	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
B2016/1	2016	Котлеты	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
B2016/2	2016	Котлеты	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
Тв2016/1	2016	Ликвор больного	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
Тв2016/2	2016	Ликвор больного	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
<i>L. seeligeri</i>	NCTC11856	1983	Почва	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	SLCC5981	НД	НД	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>L. welshimeri</i>	4911	2008	НД	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-
	10	2008	НД	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-
	47	2004	Смыв с рабочего стола	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-
	ИП	2004	Минтай замороженный	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-

щей 1 ед. эндонуклеазы рестрикции, инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Фрагменты ДНК анализировали с помощью электрофореза в 3,5%-ном агарозном геле, окрашивали раствором 0,5 мкг/мл бромистого этидия и отмывали в дистиллированной воде в течение 10 мин при активном покачивании на шейкере. Размеры рестрикционных фрагментов определяли с помощью программного обеспечения Quantity One Software на приборе Gel Doc XR System 170-8170 (Bio-RAD, США). В качестве маркера молекулярных масс фрагментов ДНК использовали «Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder» (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 и 50 п.н.) (Fermentas, Литва).

Секвенирование последовательностей ДНК. Секвенирование нуклеотидных последовательностей ПЦР-продуктов проводили методом Сэнгера на оборудовании ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США) в ООО «SENTOL» (Москва, Россия).

Биоинформационный анализ проводили с помощью компьютерных программ Vector NT19 (Invitrogen, США), CHROMAS (Technelysium, США) веб-ресурса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Последовательности генов, размещенные в базе данных GenBank. В базе данных GenBank размещены нуклеотидные последовательности ITS областей *L. monocytogenes* (KC179818, KC179819 и KC179820; *L. innocua* (KC179821 и

KC179822); *L. ivanovii* (KC179823); *L. welshimeri* (KC192764 и KC238306) и *L. grayi* (KC250008).

Результаты и обсуждение

Известно, что гены, кодирующие рРНК, присутствуют в геномах бактерий в нескольких копиях, каждая из которых способна независимо накапливать мутации. Поэтому в некоторых штаммах листерий описаны несколько различающихся последовательностей ITS-локусов, расположенных между генами 16S и 23S рРНК. Так, в штамме *L. innocua* Clp11262 описаны три последовательности 16S/23S рРНК. Анализ данных, представленных в базе данных GenBank, показал, что у *L. monocytogenes* идентифицированы 8 вариантов ITS-локусов, у *L. innocua* – 7 вариантов, у *L. ivanovii* – один вариант, у *L. seeligeri* – два варианта, у *L. welshimeri* 6 вариантов; у *L. grayi* – один вариант. В ходе исследования проведен биоинформационный анализ 50 последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS-локуса), локализованного между генами 16S и 23S рРНК в геномах, размещенных в базе данных GenBank 48 штаммов: *L. monocytogenes* (n = 22), *L. innocua* (n = 7), *L. ivanovii* (n = 2), *L. seeligeri* (n = 10), *L. welshimeri* (n = 6), и *L. grayi* (n = 1) (табл. 2).

Внутривидовое разнообразие ITS-локусов у листерий незначительно по сравнению с межвидовыми различиями этих

Таблица 2. Перечень последовательностей ITS-локусов генов 16S-23S рРНК из базы данных GenBank, использованных для биоинформационного анализа

Типы ITS-локусов	Рестрикционные эндонуклеазы/Размеры фрагментов ДНК			Ссылка на базу данных GenBank
	BseMII	Scal	Tsp509I	
<i>L. monocytogenes</i> 1	199; 134	218; 115	176; 118; 39	AL591974; U44062; FR733642; FR733645; FR733644; FR733643; CP003414; FM242711; AE017262; FR720325; FR733646; FR733651; AY684791
<i>L. monocytogenes</i> 2	199; 134	218; 115	176; 118; 39	L05172; U78980
<i>L. monocytogenes</i> 3	199; 134	218; 115	180; 114; 39	CP002816
<i>L. monocytogenes</i> 4	199; 134	218; 115	180; 114; 39	FM211688
<i>L. monocytogenes</i> 5	199; 134	218; 115	180; 114; 39	CP001175
<i>L. monocytogenes</i> 6	199; 134; 18	236; 115	194; 114; 39	U44063
<i>L. monocytogenes</i> 7	201; 134	220; 115	176; 120; 39	AF514303
<i>L. monocytogenes</i> 8	200; 134	219; 115	180; 115; 39	AF514302
<i>L. innocua</i> 1	334	219; 115	177; 118; 39	U57914
<i>L. innocua</i> 2	334	219; 115	177; 118; 39	AL596164; AL596170
<i>L. innocua</i> 3	334	219; 115	177; 118; 39	AL596173
<i>L. innocua</i> 4	334	219; 115	177; 118; 39	AL596172
<i>L. innocua</i> 5	334	219; 115	177; 118; 39	U57915
<i>L. innocua</i> 6	334	219; 115	177; 118; 39	GQ919063
<i>L. innocua</i> 7	334	219; 115	177; 118; 39	GQ919062
<i>L. ivanovii</i> 1	334	334	183; 112; 39	FR687253; U57913; U78981
<i>L. seeligeri</i> 1	334	334	234; 39; 33; 28	FN557490; U57916; U78984; DQ065845; DQ065843; DQ065842; DQ065840; DQ065841; DQ065839; GQ919064
<i>L. seeligeri</i> 2	334	334	234; 39; 33; 28	DQ065844
<i>L. welshimeri</i> 1	333	333	180; 61; 53; 39	HQ389226
<i>L. welshimeri</i> 2	333	333	180; 61; 53; 39	AM263198
<i>L. welshimeri</i> 3	333	333	180; 53; 39; 33; 28	U78982
<i>L. welshimeri</i> 4	333	333	180; 61; 53; 39	GQ919065
<i>L. welshimeri</i> 5	333	333	180; 61; 53; 39	U57917
<i>L. welshimeri</i> 6	333	333	294; 39	DQ065846
<i>L. grayi</i> 1	322	322	322	U78983

локусов, что позволило нам разработать алгоритм дифференциации видов листерий на основе анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) ПЦР-продуктов, амплифицированных с помощью специфичных праймеров G1 и L1 [23]. Олигонуклеотидные праймеры G1 и L1 комплементарны последовательностям 3'-конца гена 16S рРНК и 5'-конца гена 23S рРНК, рРНК соответственно. С помощью данных праймеров происходит наработка двух ПЦР-продуктов – «малого» размером ~300 п.н. и «большого» размером ~600 п.н., что объясняется наличием генов изолейциновой тРНК или аланиновой тРНК, встроенных в некоторые копии 16S/23S рРНК ITS-локусов [25]. Объектом разработанного ПДРФ-анализа является ПЦР-продукт размером ~300 п.н., однако анализ одинаково эффективен как для «малого» фрагмента ДНК, изолированного из геля, так и в присутствии «большого» фрагмента, который не гидролизуются используемыми в анализе рестрикционными эндонуклеазами.

Первый этап алгоритма гидролиз ПЦР-продуктов эндонуклеазой рестрикции BseMII – позволяет дифференцировать листерии патогенного для человека вида *L. monocytogenes*, поскольку их ПЦР-продукты гидролизуются данной рестриктазой, а ПЦР-продукты листерий других видов – нет (табл. 2, рисунок). Второй этап алгоритма – гидролиз ПЦР-продуктов, негидролизующихся на первом этапе, эндонуклеазой рестрикции Scal. На этом этапе идентифицируются листерии вида *L. innocua*, так как только для их ПЦР-продуктов характерно наличие гидролиза. Третий этап алгоритма – обработка ПЦР-продуктов эндонуклеазой рестрикции Tsp509I, которая позволяет идентифицировать остальные четыре вида листерий – патогенный для животных

L. ivanovii и непатогенные *L. seeligeri*, *L. welshimeri* и *L. grayi*. При этом ПЦР-продукты *L. grayi* не гидролизуются, а ПЦР-продукты *L. ivanovii*, *L. seeligeri* и *L. welshimeri* гидролизуются с образованием фрагментов характерных размеров (табл. 1, рисунок).

Разработанный подход верифицирован на референс-штаммах и использован для идентификации 94 штаммов листерий, выделенных из пищевых продуктов в ходе исследования в 2003–2013 гг.: *L. grayi* ($n = 5$), *L. innocua* ($n = 21$), *L. ivanovii* ($n = 3$), *L. monocytogenes* ($n = 59$), *L. seeligeri* ($n = 2$) и *L. welshimeri* ($n = 4$). Совпадение результатов Видовая идентификация, проведенная с помощью культуральных и микробиологических методов, масс-спектрометрии и ПДРФ-ПЦР анализа полностью совпала. Важно отметить, что описанный алгоритм ПЦР-ПДРФ анализа 16S/23S рРНК ITS-локусов листерий является относительно простым и может быть использован специалистами для быстрой дифференциации патогенных и непатогенных представителей данного рода.

Заключение

В результате проведенных исследований разработан алгоритм дифференциации шести видов листерий с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-ПЦР) внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS-локусов) генов 16S/23S рРНК, включающий в себя три последовательных этапа гидролиза ПЦР-продуктов, наработанных с помощью специфичных праймеров G1 и L1, эндонуклеазами рестрикции BseMII, Scal и TasI. Алгоритм верифицирован на контрольных штаммах и

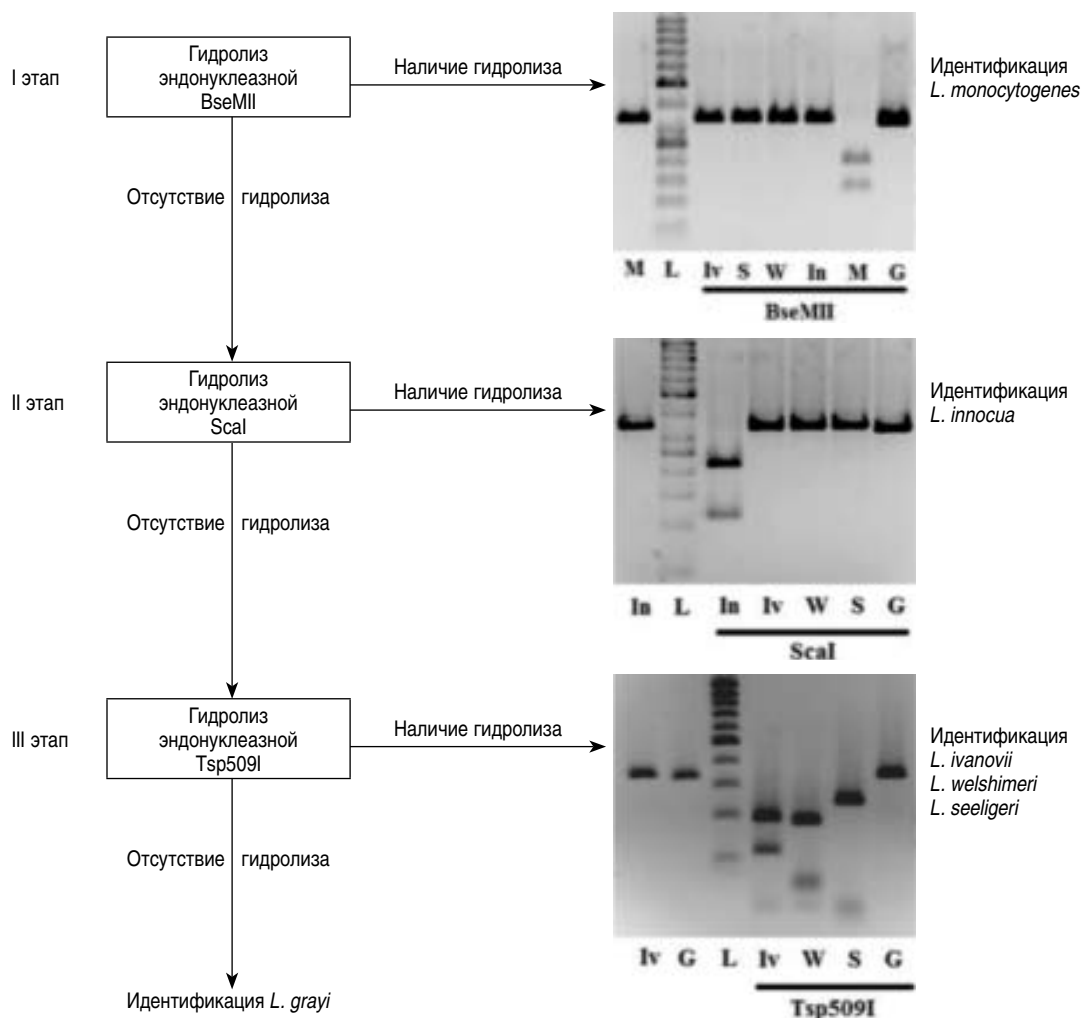


Рисунок. Алгоритм ПДРФ-ПЦР анализа внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) генов 16S-23S рибосомной РНК листерий: L – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК «Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder» (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 и 50 п.н.) (Fermentas, Литва); M – *L. monocytogenes*; In – *L. innocua*; Iv – *L. ivanovii*; S – *L. seeligeri*; W – *L. welshimeri*; G – *L. grayi*. Горизонтальной чертой отмечены образцы, гидролизованные соответствующей эндонуклеазой рестрикции.

апробирован для идентификации штаммов листерий, выделенных из пищевых продуктов в ходе исследований в 2003–2013 гг.: *L. grayi* (n = 5), *L. innocua* (n = 21), *L. ivanovii* (n = 3), *L. monocytogenes* (n = 59), *L. seeligeri* (n = 2) и *L. welshimeri* (n = 4); совпадение результатов ПДРФ-ПЦР-идентификации с результатами идентификации, проведенной с помощью микробиологических тестов и MALDI-TOF, составило 100%.

Работа выполнена в рамках Федеральной НИР №049 «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» и в рамках работ по Постановлению Правительства РФ №1448.

Литература/References

- Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol.* 2006;55:645-59. DOI: 10.1099/jmm.0.46495-0
- Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, et al. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J System Evolut Microbiol.* 2010;60:1280-8. DOI: 10.1099/ijms.0.014118-0
- Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PAD, Le Flèche-Matéos A, Roche SM, et al. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J System Evolut Microbiol.* 2010;60:2210-14. DOI: 10.1099/ijms.0.017376-0
- Bertsch D, Rau J, Eugster MR, Haug MC, Lawson PA, Lacroix C, et al. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int J System Evolut Microbiol.* 2013;63:526-32. DOI: 10.1099/ijms.0.036947-0
- Halter LE, Neuhaus K, Scherer S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int J System Evolut Microbiol.* 2013;63:641-7. DOI: 10.1099/ijms.0.036830-0
- Charlier C, Goffinet F, Azria E, Leclercq A, Lecuit M. Inadequate management of pregnancy-associated listeriosis: lessons from four case reports. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(3):246-9. DOI: 10.1111/1469-0691.12281
- Rocourt J, Hogue A, Toyofuku H, Jacquet C, Schlundt J. *Listeria* and listeriosis: Risk assessment as a new tool to unravel a multifaceted problem. *Am J Infect Control.* 2001;29(4):225-7. DOI: 10.1067/mic.2001.115681
- Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis.* 2013;13:11. DOI: 10.1186/1471-2334-13-11
- Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechaï F, Mamzer-Bruneel MF, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(1):136-8. DOI: 10.3201/eid1601.091155

10. Rapose A, Lick SD, Ismail N. *Listeria grayi* bacteremia in a heart transplant recipient. *Transplant Infect Dis.* 2008;10:434-6. DOI: 10.1111/j.1399-3062.2008.00333.x
11. Rocourt J, Hof H, Schrettenbrunner A, Malinverni R, Bille J. Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult. *Schweiz Med Wochenschr.* 1986;116:241-8.
12. Perrin M, Bemer M, Delamare C. Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5308-9.
13. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.* 2007;9(10):1236-43. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.011
14. Little CL, Sagoo SK, Gillespie IA, Grant K, McLauchlin J. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in selected retail ready-to-eat foods in the United Kingdom. *J Food Prot.* 2009;72:1869-77.
15. Katharios-Lanwermyer S, Rakic-Martinez M, Elhanafi D, Ratani S, Tiedje JM, Kathariou S. Coselection of cadmium and benzalkonium chloride resistance in conjugative transfers from nonpathogenic *Listeria* spp. to other *Listeriae*. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(21):7549-56. DOI: 10.1128/AEM.02245-12
16. Collins-Thompson DL, Slade PJ, Goethals M. Use of low molecular mass RNA profiles to identify lactic acid bacteria and related organisms associated with foods. *Int J Food Microbiol.* 1991;14:135-43.
17. Ji YE, Kempell KE, Colston MJ, Cox RA. Nucleotide sequences of the spacer-1, spacer-2 and trailer regions of the *rrn* operons and secondary structures of precursor 23S rRNAs and precursor 5S rRNAs of slow-growing mycobacteria. *Microbiology.* 1994;140(7):1763-73. DOI: 10.1099/13500872-140-7-1763
18. Kupradit C, Rodtong S, Ketudat-Cairns M. Development of a DNA microarray for simultaneous detection of multiple foodborne pathogenic bacteria in fresh chicken meat. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013;29(12):2281-91. DOI: 10.1007/s11274-013-1394-1
19. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1994;32:335-51.
20. Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:945-52.
21. Xiao L, Zhang L, Wang HH. Critical issues in detecting viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time reverse transcriptase PCR. *J Food Prot.* 2012;75(3):512-7. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-346
22. Barry T, Collieran G, Glennon M, Dunican LK, Gannon F. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1991;1:51-6.
23. Drebrot M, Neal S, Schlech W, Rozee K. Differentiation of *Listeria* isolates by PCR amplicon profiling and sequence analysis of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer loci. *J Appl Bacteriol.* 1996;80:174-8.
24. Gurtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol.* 1996;142:3-16. DOI: 10.1099/13500872-142-1-3
25. Graham TA, Golsteyn-Thomas EJ, Thomas JE, Gannon VP. Inter- and intraspecies comparison of the 16S-23S rRNA operon intergenic spacer regions of six *Listeria* spp. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(3):863-9. DOI: 10.1099/00207713-47-3-863
26. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin J, et al. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(3):647-53.
27. Böhme K, Fernández-No IC, Barros-Velázquez J, Gallardo JM, Cañas B, Calo-Mata P. Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis.* 2011;32(21):2951-2965. DOI: 10.1002/elps.201100217
28. Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, et al. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science.* 2001;294(5543):849-852. DOI: 10.1126/science.1063447
29. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leukocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J Path Bact.* 1926;29:407-39.
30. Steinweg C, Kuenne CT, Billion A, Mraheil MA, Domann E, Ghai R, et al. Complete genome sequence of *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic member of the genus *Listeria*. *J Bacteriol.* 2010;192(5):1473-4. DOI: 10.1128/JB.01415-09

Информация о авторах:

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Асташкин Евгений Ильич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии и биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Борзенков Валерий Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии и биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Тазина Ольга Ивановна, лаборант-исследователь лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Карцев Николай Николаевич, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Ефимочкина Наталья Рамазановна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «НИИ питания»
Адрес: 109240, Москва, Устьинский пр., 2/14
Телефон: (495) 698-5346

Мицевич Ирина Петровна, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Information about authors:

Edward A. Svetoch, Dr. Sci. (Vet.), professor, Chief Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Eugeny I. Astashkin, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Valery N. Borzenkov, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Olga I. Tazina, Assistant Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Nikolay N. Kartsev, Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Natalia R. Efimochkina, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher of FGBUN Scientific Research Institute of Nutrition, the Ministry of Health
Address: 2/14, pr. Ustyinsky, Moscow, 109240, Russian Federation
Phone: (495) 698-5346

Irina P. Mitsevich, Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

100 лет бактериологии

В первом номере первого тома «Journal of Bacteriology» была опубликована передовая статья В.Т.Седжвика – первого президента Общества Американских Бактериологов «Рождение новой науки – бактериологии».

Silhavy T.J.

*The Journal of Bacteriology Is 100.
Journal of Bacteriology. 2016;198(1):1-3.*

FOREWORD

THE GENESIS OF A NEW SCIENCE,—BACTERIOLOGY

W. T. SEDGWICK, Sc.D.

First President, Society of American Bacteriologists

"Die Bakteriologie ist ein Kind der jüngsten Zeit."—FRAENKEL, 1886.

Sciences are not made but born, and lineage often sheds light upon development. It was an acute observation of the late C. S. Peiree that some of the most fruitful of modern sciences have been bred by the crossing of older ones. Mathematical astronomy, physical chemistry, physiological psychology, astrophysics are examples, and the same thing is true of the applied sciences, as witness electrical, chemical and sanitary engineering; bio-chemistry; electro-chemistry.

«Умная стратегия», используемая бактериями в борьбе с вирусами

Ученые из Рокфеллеровского Университета Jon McGinn и Luciano Marraffini исследовали, каким образом иммунная система микробов «организует» процесс запоминания вирусных атак.

Подобно людям, бактерии попадают под воздействие вирусов и полагаются на свою иммунную систему в защите от них. Иммунная система бактерий, известная как CRISPR, помогает микробам «запоминать» вирусы, обеспечивая противодействие вирусам в будущем. CRISPR была открыта в середине нулевых, и именно тогда ученые заметили нечто необычное: иммунная система последовательно записывает вирусные атаки, помещая последнюю атаку вируса на первое место в череде генетически кодируемых событий.

Исследователи из Рокфеллеровского Университета нашли объяснение, почему микробы хранят свои иммунологические «записи» именно таким образом. Микробные системы CRISPR запоминают вирусы, захватывая генетические фрагменты вирусов и храня их подобно бусинам на нитке (система CRISPR постоянно образует кластеры, перемежающиеся полиндромными повторами). При повторной встрече клетки именно с этим вирусом, CRISPR-ассоциированные ферменты (Cas) используют эти фрагменты (спейсеры) для узнавания и расщепления этого вируса. Благодаря такой точности, одна из таких систем, CRISPR-Cas9, стала мощным инструментом редактирования геномов.

Установлено, что небольшая часть бактериального генома, «лидерная последовательность», отвечает за переадресацию самого позднего вирусного фрагмента на первую позицию в системе CRISPR. При изменении этой последовательности система CRISPR прекращает добавлять новые спейсеры во фронтальной части и в дальнейшем начинает вставлять их по направлению вниз. Бактерии, у которых спейсеры установлены неправильно, еще в состоянии защитить себя при небольшой концентрации фагов, но чувствительны к высокой концентрации фага.

Полученные результаты могут послужить толчком к разработке биотехнологии нового типа на основе CRISPR, которую пока еще можно отнести к области фантастики.

McGinn J., Marraffini L.A.

*CRISPR-Cas Systems Optimize Their Immune Response by Specifying the Site of Spacer Integration.
Mol Cell. 2016 Nov 3;64(3):616-623. doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.038*