

# Разработка дуплексной петлевой изотермической амплификации LAMP для детекции *Listeria monocytogenes*

А.Г.Шевяков, И.Ю.Щит, В.Н.Борзенков, С.Ф.Бикетов, С.С.Ветчинин

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Листерииоз – заболевание, вызываемое *Listeria monocytogenes*, – представляет значительную угрозу жизни и здоровью людей с ослабленной иммунной системой, пожилых и новорожденных. Заболевание проявляется в виде различных патологий центральной нервной системы, менингоэнцефалита, сепсиса, может приводить к выкидышу. Основной путь заражения – алиментарный. Для контроля качества пищевых продуктов необходима разработка новых высокоспецифичных методов контроля патогенных листерий.

В работе показана возможность высокоспецифичного и чувствительного обнаружения патогенных *L. monocytogenes* с помощью петлевой изотермической амплификации LAMP. Этот метод позволяет амплифицировать небольшое количество копий целевой ДНК с высокой специфичностью, эффективностью и скоростью в изотермических условиях с использованием набора из четырех специально подобранных праймеров и ДНК-полимеразы, способной проводить амплификацию с вытеснением матричной цепи. В связи с этим значительно смягчаются требования к используемому оборудованию, так как отсутствует необходимость в термоциклировании, и квалификации персонала. Предложенный метод позволяет обнаружить  $1,7 \cdot 10^1$  КОЕ/мл патогенных листерий при использовании двух наборов специально подобранных праймеров для LAMP – Lm-prfa и Lm-iap.

**Ключевые слова:** листериоз, *Listeria monocytogenes*, петлевая изотермическая амплификация, LAMP

**Для цитирования:** Шевяков А.Г., Щит И.Ю., Борзенков В.Н., Бикетов С.Ф., Ветчинин С.С. Разработка дуплексной петлевой изотермической амплификации LAMP для детекции *Listeria monocytogenes*. Бактериология. 2023; 8(3): 48–55. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-48-55

## Development of duplex loop isothermal LAMP amplification for the detection of *Listeria monocytogenes*

A.G.Shevyakov, I.Yu.Shchit, V.N.Borzenkov, S.F.Biketov, S.S.Vetchinin

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Listeriosis – a disease caused by *Listeria monocytogenes*, poses a significant threat to the life and health of people with weakened immune systems, the elderly and newborns. The disease manifests itself in the form of various pathologies of the central nervous system, meningoencephalitis, sepsis, can lead to miscarriage. The main way of infection is alimentary. To control the quality of food products, it is necessary to develop new highly specific methods for controlling pathogenic listeria.

The paper shows the possibility of highly specific and sensitive detection of pathogenic *L. monocytogenes* using loop isothermal amplification – LAMP. This method allows amplification of a small number of copies of the target DNA with high specificity, efficiency and speed under isothermal conditions using a set of four specially selected primers and DNA polymerase capable of amplification with displacement of the matrix chain. In this regard, the requirements for the equipment used are significantly reduced, since there is no need for thermal cycling. The proposed method makes it possible to detect  $1,7 \cdot 10^1$  CFU/ml of pathogenic listeria using two sets of specially selected primers for LAMP – Lm-prfa and Lm-iap.

**Key words:** listeriosis, *Listeria monocytogenes*, loop isothermal amplification, LAMP

**For citation:** Shevyakov A.G., Shchit I.Yu., Borzenkov V.N., Biketov S.F., Vetchinin S.S Development of duplex loop isothermal LAMP amplification for the detection of *Listeria monocytogenes*. Bacteriology. 2023; 8(3): 48–55. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-48-55

### Для корреспонденции:

Шевяков Антон Георгиевич, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
E-mail: shevyakov@obolensk.org

Статья поступила 20.06.2023, принята к печати 29.09.2023

### For correspondence:

Anton G. Shevyakov, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation  
E-mail: shevyakov@obolensk.org

The article was received 20.06.2023, accepted for publication 29.09.2023

Современные методы производства и дистрибуции продуктов питания дают возможность в короткие сроки изготовить и поставить в торговые сети значительные объемы разнообразных пищевых продуктов. Недостаточный микробиологический контроль на этапах производства и хранения может привести к контаминации продуктов патогенными микроорганизмами и вызвать вспышку заболевания у потребителей на большой территории. В связи с вышеуказанным значительный интерес представляет разработка способов быстрой, высокоточной и чувствительной диагностики патогенных микроорганизмов [1].

Одним из представителей группы алиментарных патогенов является *Listeria monocytogenes* – грамположительная бактерия, факультативный анаэроб, вызывающая серьезные спорадические и эпидемические заболевания листериозом у людей. Бактерии *L. monocytogenes* широко распространены в окружающей среде, встречаются на всех континентах (найжены в почве, донных отложениях, сточных водах, на поверхности растений), обладают способностью размножаться в широком диапазоне температур (от -1,5 до +45°C), значений pH (5–11), устойчивы к гипертоническим условиям (до 10% NaCl) [2].

Носительство листерий у животных в фермерских хозяйствах, животноводческих компаниях практически невозможно устранить. Большинство растительных, особенно сочных, кормов содержат эти бактерии. Животные, выращиваемые на подобных кормах, являются источником контаминации листериями как внешней среды, так и продуктов животноводства. Например, мастит коров, вызванный листериями, может протекать бессимптомно и приводить к заражению молока. Таким образом, клинически здоровые животные могут являться источником контаминации пищевого сырья, а в дальнейшем и конечной продукции.

Листерии часто обнаруживаются на предприятиях, производящих продукты питания. Проникновение возбудителя в производственные цепочки происходит как с исходным сырьем, так и при перемещении людей и аппаратов внутри производства. Благодаря способности закрепляться и образовывать биопленки на поверхностях, встречающихся в производстве пищевых продуктов, *L. monocytogenes* может реконтаминировать продукты, прошедшие стерилизационную обработку. Недостаточный контроль за санитарными условиями и/или непродуманная организация производственной цепочки может привести к появлению очага контаминации готовой продукции. Несоблюдение холодовой цепи при доставке и хранении продуктов в розничной торговле также может приводить к значительному увеличению количества этих микроорганизмов в случае контаминации [3].

Особенностью листериоза является полиморфизм клинических проявлений – поражение центральной нервной системы (ЦНС), миндалин, лимфатических узлов, печени, селезенки. Бактерии, проникнув через стенку кишечника в кровеносные сосуды, с током крови могут попасть в различные отделы ЦНС, преодолевая барьерные механизмы, и вызывать менингит, менингоэнцефалит, в редких случаях – такие тяжелые осложнения, как гидроцефалия и внутримозговые кровоизлияния [4]. Основным путем заражения листериозом – алиментарный, в результате употребления контаминированных пищевых продуктов, реже воды из открытых

источников, растений. Особо стоит отметить возможность трансплацентарного инфицирования плода от матери. Листериоз характеризуется высоким уровнем госпитализации и смертности (среди групп риска может достигать 30–50%). Основную опасность это заболевание представляет для людей с нарушениями в работе иммунной системы, проходящих курс иммуносупрессии, пожилых, беременных женщин и новорожденных. Мета-анализ исследований вспышек листериоза за последние 20 лет показывает значительную долю перинатального листериоза с показателем смертности, достигающим до 50% при общем уровне около 30% [5].

При контроле пищевых продуктов на загрязненность патогенными микроорганизмами предусматривается отсутствие микроорганизмов *L. monocytogenes* в 25 г продуктов массового назначения и в 50–100 г продуктов детского и специального питания [6].

Для обнаружения патогенных листерий используют ряд методов: культуральные с биохимической идентификацией, молекулярно-генетические, иммунологические, биопробы на мышах. Культуральная идентификация – точный метод, требующий около 2–3 дней культивирования бактерий на селективных средах, после чего проводят морфологическое, биохимическое, серологическое подтверждение принадлежности выделенной культуры к патогенным листериям. Этот подход признан золотым стандартом, однако требует значительных трудозатрат и времени, что не удовлетворяет современным потребностям в быстром результате. Следует отметить, что бактерии, выделяемые из анализируемых образцов, могут находиться в стрессовом состоянии после воздействия экстремальных внешних условий (pH, осмолярность, температура) и может потребоваться некоторое дополнительное время для восстановления нормального роста. В результате культуральный метод диагностики бактерий в исследуемом образце может дополнительно затягиваться и усложняться.

Молекулярно-генетические методы заключаются в различных вариантах амплификации ДНК специально отобранных генов-мишеней с последующей детекцией полученного ампликона. Основным лабораторным методом является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Диагностика методом ПЦР получила повсеместное распространение и широко используется в различных лабораториях. Скорость проведения исследования в сравнении с культуральным методом значительно выше, так как для получения необходимого в диагностике количества бактерий не требуется длительное культивирование. Тем не менее этот метод не лишен недостатков. При проведении ПЦР-диагностики требуется хорошо оснащенная лаборатория с квалифицированным персоналом, сама реакция чувствительна к пробоподготовке образца (широкий спектр веществ-примесей ингибируют амплификацию). В связи с этим разработка молекулярно-генетических методов не остановилась на ПЦР и были предложены некоторые другие способы амплификации нуклеиновых кислот. Одним из таких методов является изотермическая амплификация [7].

Изотермическая амплификация – привлекательная альтернатива ПЦР, поскольку для нее не требуется дорогостоящее оборудование и сложная пробоподготовка образцов, требования к квалификации оператора более мягкие.

Реакцию можно проводить на месте отбора проб, в полевых условиях, у постели больного. Описано несколько методических подходов для проведения изотермической амплификации. Среди них наиболее широко изучена и применяется петлевая изотермическая амплификация LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) [8]. В отличие от ПЦР, в методе LAMP используется ДНК-полимераза (например, Bst), способная синтезировать дочернюю копию нуклеиновой кислоты при фиксированной температуре. Отличительной особенностью этого метода является высокая толерантность к ингибиторам амплификации, которые затрудняют или блокируют амплификацию методом ПЦР. С помощью этого метода возможно обнаружение нуклеиновых кислот различных патогенов, например малярии [9], возбудителей особо опасных инфекций [10], вирусной РНК ВИЧ с помощью LAMP с обратной транскрипцией [11], геном-модифицированных организмов [12], ДНК человека в криминалистике [13].

В литературе описаны различные варианты использования изотермической амплификации в диагностике патогенных листерий. В качестве генов-мишеней авторы использовали гены *iap* [14], *hlyA* [15], *prfA* [16], *lmo0753* [17], *lmo0460* [18] и некоторые другие.

Известно, что выживание *L. monocytogenes* в неблагоприятных условиях желудочно-кишечного тракта зависит от различных механизмов поддержания гомеостаза. Набор генов, обеспечивающих вирулентность и поддержание гомеостаза клеток *L. monocytogenes*, находится в регулоне вирулентности PrfA. Нуклеотидная последовательность *prfA* уникальна для семейства *Listeriaceae* [16]. Ген *iap* кодирует белок р60, выполняющий функции пептидогликангидролазы и участвующий в процессе деления листерий. Уровень секреции белка р60 напрямую влияет на патогенность листерий [19]. Нуклеотидная последовательность гена *iap* также имеет уникальные участки, специфичные для *L. monocytogenes*, что позволяет использовать его в молекулярной диагностике. В данной работе исследована возможность использования комбинации наборов праймеров к нуклеотидным последовательностям *prfA* и *iap* *L. monocytogenes* для высокоспецифичной диагностики с помощью LAMP.

## Материалы и методы исследования

### Штаммы микроорганизмов

В работе использовали 52 штамма листерий: *L. monocytogenes* ( $n = 37$ ), *L. innocua* ( $n = 5$ ), *L. ivanovii* ( $n = 3$ ), *L. seeligeri* ( $n = 2$ ), *L. welshimeri* ( $n = 2$ ), *L. grayi* ( $n = 3$ ) и 6 штаммов гетерологичных бактерий, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Штаммы листерий культивировали в листериозном питательном бульоне ПБЛ (ГНЦ ПМБ, Россия), гетерологичные штаммы выращивали в жидком бульоне LB (Becton-Dickinson, США) при 37°C с перемешиванием. Для определения концентрации бактерий готовили 10-кратные серийные разведения ночной культуры штамма *L. monocytogenes* NCTC11994, отбирали по 100 мкл и высевали на чашки Петри с агаризованной питательной средой ПАЛ (Оболенск) в трех повторах. Через 48 ч культивирования при 30°C проводили визуальный подсчет колоний.

### Пробоподготовка образцов

Для выделения бактериальной ДНК использовали ночную культуру в жидкой питательной среде. Аликвоту культурального бульона объемом 1,0 мл центрифугировали при 12 000 г 3 мин, бактериальный осадок ресуспендировали в 100 мкл буфера TE (10 мМ Трис-Cl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0). Полученную суспензию прогревали при 100°C в течение 5 мин для извлечения ДНК. После центрифугирования при 12 000 г в течение 3 мин полученный супернатант использовали в LAMP. Для определения чувствительности использовали серийные разведения ночной культуры *L. monocytogenes* NCTC11994 после определения концентрации на агаризованной среде в диапазоне  $1 \cdot 10^1$ – $1 \cdot 10^5$  КОЕ/мл. Выделение ДНК проводили по указанной выше методике. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную деионизованную воду.

### Праймеры и условия проведения амплификации

Нуклеотидные последовательности генов *prfA* и *iap* брали из базы данных GenBank. Для *prfA*: AJ002742.1, JN703902.1, JN703901.1, JN703896.1, EU294568.1, EU294523.1, EU294567.1, CAA43524.1. Для *iap*: AF532293.1, AF532227.1, JF967604.1, JF967601.1, AF532287.1, AF532277.1, AF532259.1, JF967606.1. Множественное выравнивание с определением консенсуса нуклеотидной последовательности проводили с помощью программы MegAlignPro 17.3 (DNASTAR, США). Поиск и анализ видоспецифических праймеров к *L. monocytogenes* проводили с помощью веб-сервиса «Primer Explorer V5» (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>). Выбранные нуклеотидные последовательности представлены в табл. 1. Синтез праймеров осуществляли в компании «Евроген» (Россия).

На рис. 1, 2 приводится расположение LAMP-праймеров на нуклеотидных последовательностях целевых участков генов *prfA* и *iap* соответственно.

### Изотермическая амплификация

Реакция LAMP проводилась в объеме 25 мкл с использованием по 0,2 μM F3 и B3, по 1,6 μM FIP и BIP, 2,5 мкл 10x буферного раствора для LAMP (New England Biolabs, США),

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров к генам *prfA* и *iap*

Table 1. Nucleotide sequences of primers for genes *prfA* and *iap*

Ген-мишень / Target gene	Название праймера / Primer name	Нуклеотидная последовательность / Nucleotide sequence
<i>prfA</i>	Lm-prfa Lm-prfaF3	GATCCACAAGAATATTGTATTTCC
	Lm-prfaB3	GCTCAGTAGTCTTTTAGTTCCG
	Lm-prfaFIP	CCAGACATTATAACGAAAGCACCTAAA GCTTACAAGTATTAGCGAGA
	Lm-prfaBIP	GATACAGAACATCGGTTGGCTATTTG ATAACGTATGCGGTAG
<i>iap</i>	Lm-iap Lm-iapF3	GAAAAGCTTATTCATGGGGT
	Lm-iapB3	CGTAGATACCAACGTGAGAA
	Lm-iapFIP	GGAGATCCCGCTTTAGCAAATCTTT CGGACCAACTACATTTGATTG
	Lm-iapBIP	CGCACAAATACGCTAGCACTACATTTCC GCTACCATAGTCAAAGA

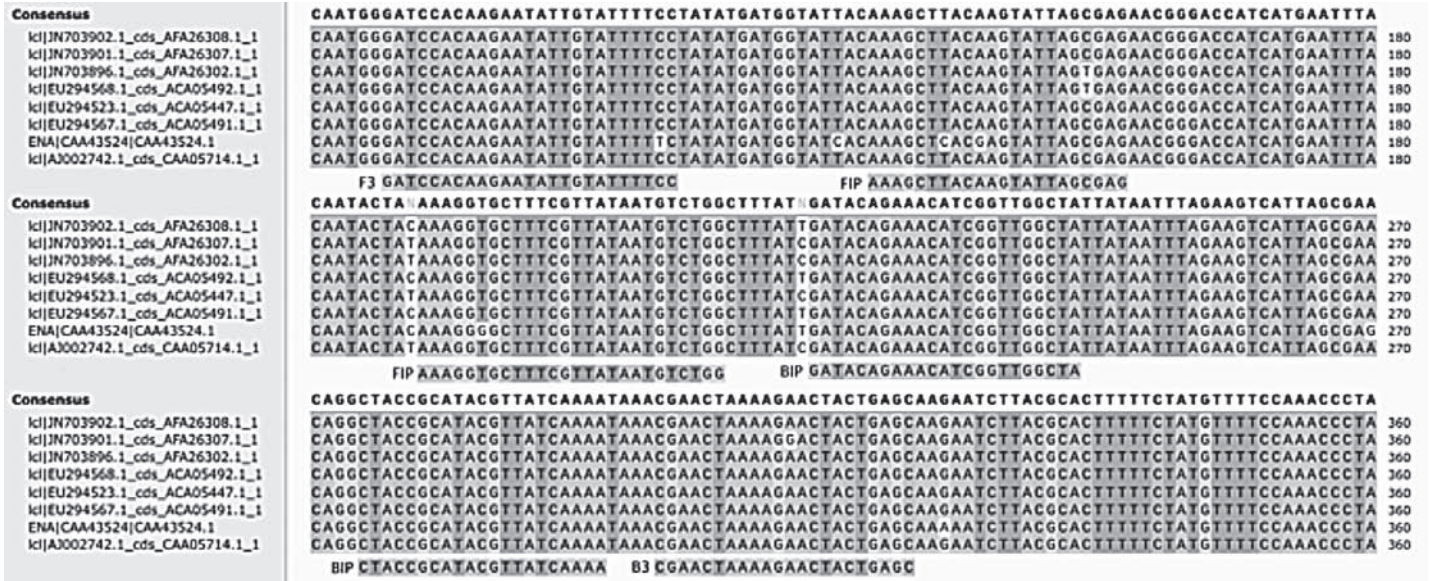


Рис. 1. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей *prfA* нескольких штаммов *L. monocytogenes* и праймеров для LAMP. Для поиска праймеров использовали участок 91–360 н.о. *prfA*. Оттенками серого обозначены разные нуклеотиды.  
 Fig. 1. Multiple *prfA* nucleotide sequence alignment of several *L. monocytogenes* strains and LAMP primers. To search for primers, the 91–360 nt *prfA* region was used. Shades of gray represent different nucleotides.

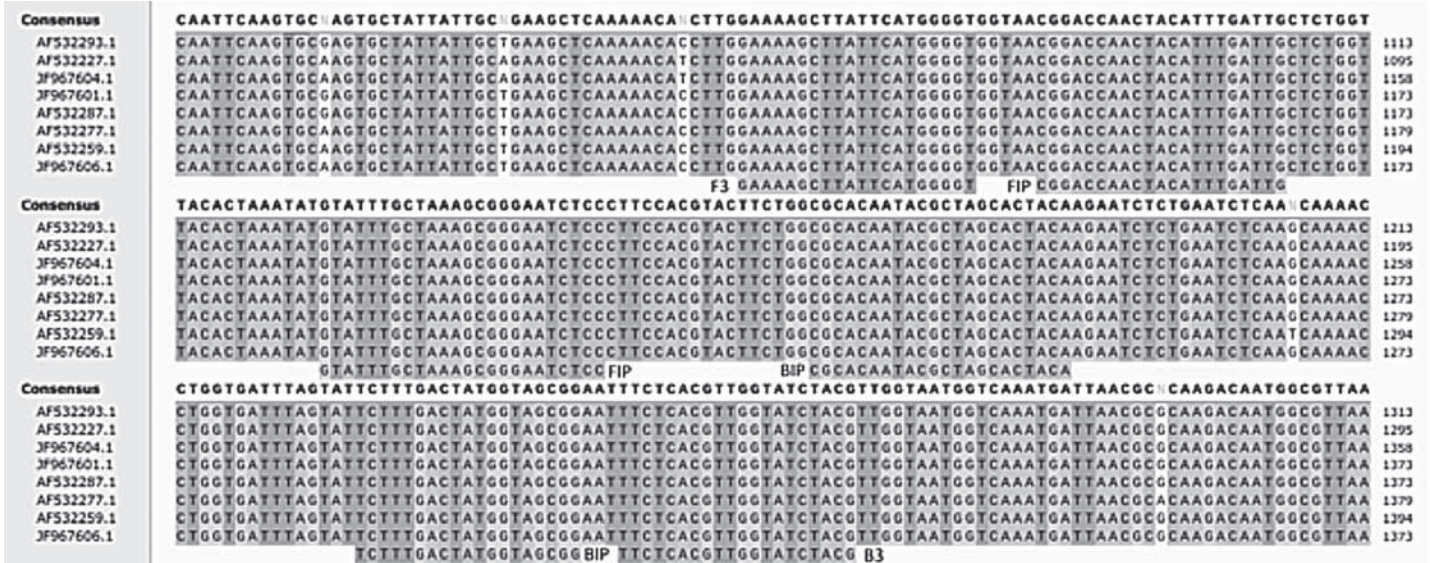


Рис. 2. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *iap* нескольких штаммов *L. monocytogenes* и праймеров для LAMP. Для поиска праймеров использовали участок 1140–1360 н.о. *iap*. Оттенками серого обозначены разные нуклеотиды.  
 Fig. 2. Multiple alignment of the *iap* gene nucleotide sequences of several *L. monocytogenes* strains and primers for LAMP. To search for primers, the 1140–1360 nt *iap* region was used. Shades of gray represent different nucleotides.

1,4 мМ дНТФ (NEB, США), 0,8 М бетаина (Sigma-Aldrich, США), 8 IU полимеразы Bst (NEB, США) и 5 мкл образца ДНК. Стерильной деионизованной водой доводили объем до 25 мкл. В качестве отрицательного контроля использовали воду для инъекций, для положительного контроля использовали ДНК, выделенную из штамма *L. monocytogenes* 12 ИП. Реакция проводилась при 63°C 45 мин и останавливалась прогревом до 80°C 2 мин. Нагрев проводили в твердотельном термостате «Гном» («ДНК-технологии», Россия).

**Анализ продуктов реакции LAMP**  
 Ампликоны LAMP определяли визуально по свечению интеркалирующего красителя SYTO 82 (Invitrogen, США) при

ультрафиолетовом (УФ) облучении в трансиллюминаторе (Vilber Lourmat, Франция) и светодиодом UV-LED (Китай), излучающим УФ ближнего диапазона. О положительной реакции судили по появлению интенсивного желто-зеленого свечения. Амплифицированный продукт также определяли с помощью электрофореза в 1,0%-м агарозном геле.

**Результаты исследования и их обсуждение**

В данном исследовании была изучена возможность применения набора праймеров в диагностике патогенных листерий. Точность и специфичность диагностики с помощью LAMP зависит от выбора генов-мишеней и подбора прайме-

Таблица 2. Результаты изотермической амплификации ДНК панели штаммов патогенных листерий и гетерологичных бактерий

Table 2. Results of isothermal amplification of DNA from a panel of pathogenic listeria strains and heterologous bacteria]

Вид и штамм исследованных микроорганизмов / Type and strain of the investigated microorganisms	Набор праймеров / Primer kit		Итог / Result	
	Lm-iap	LM-prfa		
<i>L. monocytogenes</i>	4ИП	+	+	+
	12ИП	+	+	+
	13ИП	+	+	+
	20ИП	+	+	+
	46ИП	+	+	+
	53ИП	+	+	+
	61ИП	+	+	+
	EGD-e	+	+	+
	NCTC10527	+	+	+
	NCTC10357	+	+	+
	NCTC11994	-	+	+
	NCTC7973	+	+	+
	766	+	+	+
	766ИП	+	+	+
	C52	+	+	+
	C664	-	+	+
	M-1	+	+	+
	M-2	-	+	+
	M-3	+	+	+
	M-4	+	+	+
	M-5	-	+	+
	M-6	+	+	+
	944	+	+	+
	4486	+	+	+
	4701	+	+	+
	4908	+	-	+

	4909	+	+	+
	4910	+	+	+
	4913	+	+	+
	OP513/2	+	+	+
	OP517/7	+	+	+
	B2016/1	+	+	+
	B2016/2	+	+	+
	Тв2016/1	+	+	+
	Тв2016/2	+	-	+
	ATCC19111	+	+	+
	ATCC7644	+	+	+
<i>L. innocua</i>	NCTC11288	-	-	-
	K664	-	-	-
	29ИП	-	-	-
	32ИП	-	-	-
	МСЧ-164	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	4912	-	-	-
	ATCC19119	-	-	-
	NCTC11840	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	SLCC3954	-	-	-
	NCTC11856	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	4911	-	-	-
	47ИП	-	-	-
<i>L. grayi</i>	ATCC25401	-	-	-
	C214	-	-	-
	МКМ1	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC14579	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC14028	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	-	-	-
<i>Escherichia coli O157</i>	ATCC43888	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	C79	-	-	-
<i>Brucella abortus</i>	19	-	-	-

ров к ним. Использование генов *prfA* и *iap* *L. monocytogenes* обусловлено их необходимостью для выживания и развития инфекционного процесса в организме хозяина.

Предварительно проводили оптимизацию условий изотермической амплификации в диапазоне температур 60–67°C. Определили, что оптимальной температурой являлось 63°C, при которых скорость реакции оптимальна.

Диагностика штаммов патогенных листерий с помощью LAMP показала, что совместное использование выбранных наборов праймеров к генам *prfA* и *iap* обеспечивало выявление всех 37 исследованных штаммов *L. monocytogenes* и отсутствие взаимодействия с непатогенными листериями и гетерологичными бактериальными штаммами (табл. 2). При этом инклюзивность отдельных наборов Lm-iap и LM-prfa составляла 89,19 и 94,59% соответственно (табл. 3). Однако профиль выявления штаммов патогенных листерий для наборов праймеров не пересекался. Таким образом, использование смеси наборов праймеров обеспечивал амплификацию целевых генов минимум одним из них.

Гель-электрофоретический анализ демонстрировал характерный рисунок в виде лестницы, сформированный ампликонами ДНК различной длины (рис. 3, 4).

При использовании интеркалирующего красителя SYTO-82 определили продукты амплификации непосредственно

Таблица 3. Результаты определения инклюзивности и эксклюзивности наборов праймеров Lm-iap и LM-prfa  
 Table 3. Results of determining the inclusivity and exclusivity of the Lm-iap and LM-prfa primer sets

	Lm-iap	LM-prfa	Lm-iap + LM-prfa
Число достоверно положительных результатов / The number of reliably positive results	33/37	35/37	37/37
Инклюзивность / Inclusivity	89,19%	94,59%	100%
Число достоверно отрицательных результатов / The number of reliably negative results	21/21	21/21	21/21
Эксклюзивность / Exclusivity	100%	100%	100%

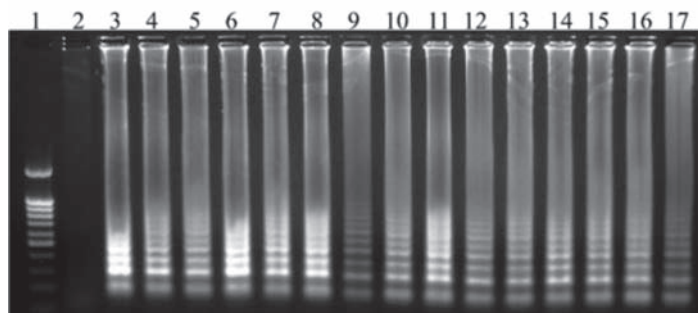


Рис. 3. Гель-электрофорез продуктов амплификации смеси наборов праймеров Lm-prfa и Lm-iap.

1 – маркеры молекулярного веса (100–10 000 п.н.) «СибЭнзим» (Россия), 2 – отрицательный контроль, 3 – *L. monocytogenes* 12ИП, 4 – *L. monocytogenes* 13ИП, 5 – *L. monocytogenes* 46ИП, 6 – *L. monocytogenes* 61ИП, 7 – *L. monocytogenes* EGD-е, 8 – *L. monocytogenes* NCTC10527, 9 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 10 – *L. monocytogenes* NCTC7973, 11 – *L. monocytogenes* 766ИП, 12 – *L. monocytogenes* C664, 13 – *L. monocytogenes* M-1, 14 – *L. monocytogenes* M-2, 15 – *L. monocytogenes* M-5, 16 – *L. monocytogenes* 4908, 17 – *L. monocytogenes* Тв2016/2.

Fig. 3. Gel electrophoresis of amplification products of a mixture of primer sets Lm-prfa and Lm-iap.

1 – molecular weight marker (100–10 000 p.p.) СибЭнзим (Russia), 2 – отрицательный контроль, 3 – *L. monocytogenes* 12ИП, 4 – *L. monocytogenes* 13ИП, 5 – *L. monocytogenes* 46ИП, 6 – *L. monocytogenes* 61ИП, 7 – *L. monocytogenes* EGD-е, 8 – *L. monocytogenes* NCTC10527, 9 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 10 – *L. monocytogenes* NCTC7973, 11 – *L. monocytogenes* 766ИП, 12 – *L. monocytogenes* C664, 13 – *L. monocytogenes* M-1, 14 – *L. monocytogenes* M-2, 15 – *L. monocytogenes* M-5, 16 – *L. monocytogenes* 4908, 17 – *L. monocytogenes* Тв2016/2.

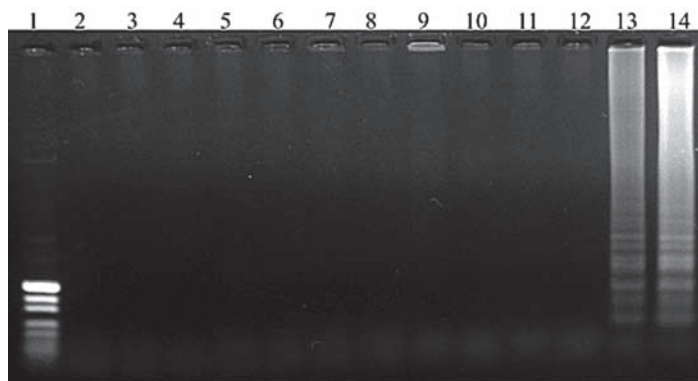


Рис. 4. Гель-электрофорез продуктов амплификации LAMP с набором праймеров Lm-iap для патогенных и непатогенных листерий, гетерологичных штаммов.

1 – маркеры молекулярного веса (100–1000 п.н.) «СибЭнзим» (Россия), 2 – отрицательный контроль, 3 – *B. cereus* ATCC14579, 4 – *S. enteritidis* ATCC14028, 5 – *S. aureus* ATCC6538, 6 – *E. coli* O157 ATCC43888, 7 – *L. innocua* NCTC11288, 8 – *L. ivanovii* ATCC19119, 9 – *L. seeligeri* SLCC3954, 10 – *L. welshimeri* 47ИП, 11 – *L. grayi* ATCC25401, 12 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 13 – *L. monocytogenes* 12 ИП, 14 – *L. monocytogenes* ATCC7644.

Fig. 4. Gel electrophoresis of LAMP amplification products with a set of Lm-iap primers for pathogenic and non-pathogenic listeria, heterologous strains.

1 – molecular weight markers (100–1000 p.p.) СибЭнзим (Russia), 2 – negative control, 3 – *B. cereus* ATCC14579, 4 – *S. enteritidis* ATCC14028, 5 – *S. aureus* ATCC6538, 6 – *E. coli* O157 ATCC43888, 7 – *L. innocua* NCTC11288, 8 – *L. ivanovii* ATCC19119, 9 – *L. seeligeri* SLCC3954, 10 – *L. welshimeri* 47ИП, 11 – *L. grayi* ATCC25401, 12 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 13 – *L. monocytogenes* 12 ИП, 14 – *L. monocytogenes* ATCC7644.

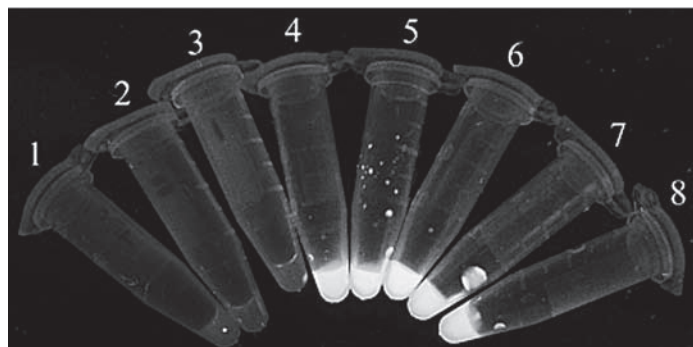


Рис. 5. Свечение интеркалирующего красителя SYTO-82 под УФ-облучением трансиллюминатора, 75% мощности. 1 – *L. seeligeri* SLCC3954, 2 – *L. ivanovii* ATCC19119, 3 – отрицательный контроль, 4 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 5 – *L. monocytogenes* 12 ИП, 6 – *L. monocytogenes* ATCC7644, 7 – *L. monocytogenes* C664, 8 – *L. monocytogenes* Тв2016/2.

Fig. 5. Luminescence of SYTO-82 intercalating dye under UV irradiation of a transilluminator, 75% power. 1 – *L. seeligeri* SLCC3954, 2 – *L. ivanovii* ATCC19119, 3 – отрицательный контроль, 4 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 5 – *L. monocytogenes* 12 ИП, 6 – *L. monocytogenes* ATCC7644, 7 – *L. monocytogenes* C664, 8 – *L. monocytogenes* Тв2016/2.

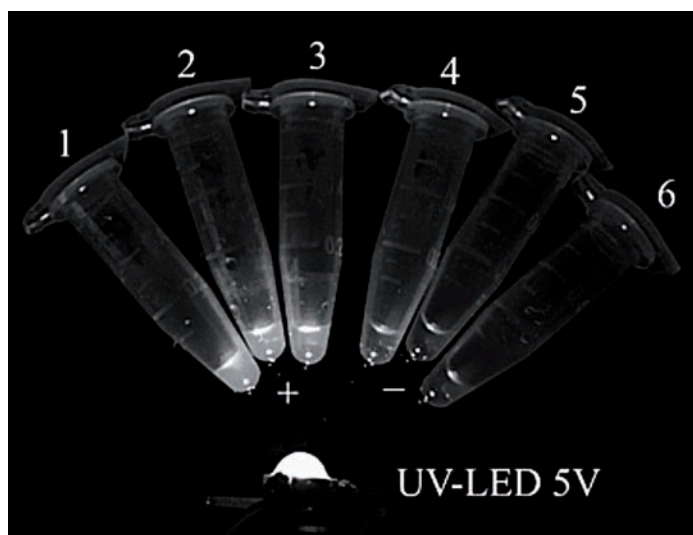


Рис. 6. Облучение продуктов амплификации LED-источником ближнего УФ-излучения. 1 – *L. monocytogenes* 12ИП, 2 – *L. monocytogenes* ATCC7644, 3 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 4 – отрицательный контроль, 5 – *L. ivanovii* ATCC19119, 6 – *L. seeligeri* SLCC3954.

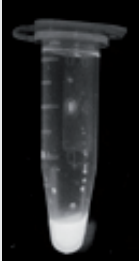
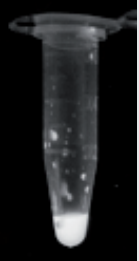




Fig. 6. Irradiation of the products of amplification with a near-UV LED source. 1 – *L. monocytogenes* 12ИП, 2 – *L. monocytogenes* ATCC7644, 3 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 4 – negative control, 5 – *L. ivanovii* ATCC19119, 6 – *L. seeligeri* SLCC3954.

после изотермической амплификации при облучении УФ-светом (рис. 5).

Облучение микропробирок с продуктами реакции UV-LED источником ближнего УФ-света, запитанного от портативной 5В батареи, также позволило достоверно выявить положительные образцы (рис. 6).

Проверка чувствительности предложенного набора праймеров Lm-iap и LM-prfa с использованием интеркалирующего красителя SYTO-82 в качестве репортера показала возможность выявления ДНК патогенных листерий вплоть до концентрации  $1,7 \cdot 10^1$  КОЕ/мл (табл. 4).

Таблица 4. **Определение предела чувствительности набора праймеров в LAMP с помощью интеркалирующего красителя SYTO-82**  
 Table 4. **Determination of the sensitivity limit of a primer set in LAMP using the SYTO-82 intercalation dye**

Количество бактерий, КОЕ/мл / <i>Bacteria count, CFU/ml</i>	1,7•10 <sup>5</sup>	1,7•10 <sup>4</sup>	1,7•10 <sup>3</sup>	1,7•10 <sup>2</sup>	1,7•10 <sup>1</sup>	1,7•10 <sup>0</sup>
Результат LAMP / <i>Result of LAMP</i>						

Применение дуплексного подхода при диагностике патогенных листерий методом изотермической амплификации позволило выявить все исследованные штаммы, в то время как индивидуальное использование наборов праймеров не давало необходимой инклюзивности. В результате возможно предположить, что использованный подход является более информативным для диагностики *L. monocytogenes*.

Простота реализации и экспрессность, визуальная качественная регистрация позволяют использовать изотермическую амплификацию в качестве внелабораторного метода анализа.

### Заключение

В данной работе изучена возможность применения петлевой изотермической амплификации LAMP в качестве дополнения к стандартным методам диагностики патогенных листерий.

В результате тестирования панели штаммов *L. monocytogenes*, а также гетерологичных бактериальных штаммов с помощью предложенного набора праймеров для LAMP была показана возможность использования смеси праймеров для специфической диагностики патогенных листерий. Чувствительность метода составляла 1,7•10<sup>1</sup> КОЕ/мл. Продемонстрирована возможность получения 100%-й инклюзивности при условии сохранения специфичности диагностики. Кроме того, уменьшается время проведения диагностики по сравнению с культуральным методом и не требуется дорогостоящее оборудование.

В доступной литературе сведений, свидетельствующих об использовании предложенных наборов праймеров, не обнаружено.

Полученные данные позволяют использовать предложенную методику для проведения ускоренной диагностики патогенных листерий в условиях ограниченного технического оснащения лабораторий.

В настоящее время изотермическая амплификация нашла применение в диагностике различных патогенных микроорганизмов и вирусов. Разработка и совершенствование LAMP для диагностики патогенных листерий открывает широкие перспективы для тестирования бактерий в пищевых продуктах.

### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках Государственного задания по НИОКР 1.1.13

### Funding information

The work was carried out within the framework of the State R&D assignment 1.1.13

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

### Литература / References

1. The Lancet Gastroenterology Hepatology. Food safety really is everyone's business. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019 Aug;4(8):571. DOI: 10.1016/S2468-1253(19)30202-X
2. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis*. 2013 Jan 10;13:11. DOI: 10.1186/1471-2334-13-11
3. Buchanan RL, Gorris LGM, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*. 2018;88:236-236. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.01.004
4. Liang JJ, He XY, Ye H. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* with hydrocephalus and intracranial hemorrhage: A case report and review of the literature. *World J Clin Cases*. 2019 Feb 26;7(4):538-547. DOI: 10.12998/wjcc.v7.i4.538
5. De Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, Havelaar A, Speybroeck N. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014 Nov;14(11):1073-1082. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70870-9
6. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов «Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.3.2.1078-01». 2002. / *Gigienicheskie trebovaniya bezопасnosti i pishchevoi tsennosti pishchevykh produktov «Sanitarno-epidemiologicheskie pravila i normativy SanPiN 2.3.2.1078-01»*. 2002. (In Russian).
7. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 Mar;27(3):224-43. DOI: 10.1080/15257770701845204
8. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
9. Burdino E, Calleri G, Ghisetti V. Added value of loop-mediated isothermal amplification technology (LAMP) in real life for the diagnosis of malaria in travellers. *J Travel Med*. 2019 Oct 14;26(7):taz052. DOI: 10.1093/jtm/taz052
10. Shchit IY, Ignatov KB, Kudryavtseva TY, Shishkova NA, Mironova RI, Marinin LI, et al. The use of loop-mediated isothermal DNA amplification for the detection

- and identification of the anthrax pathogen. *Mol Gen Microbiol ViroL*. 2017; 32(2):100-108. DOI: 10.3103/S0891416817020094
11. Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Virol Methods*. 2008 Aug;151(2):264-270. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.04.011
  12. Hardinge P, Kiddle G, Tisi L, Murray JAH. Optimised LAMP allows single copy detection of 35Sp and NOST in transgenic maize using Bioluminescent Assay in Real Time (BART). *Sci Rep*. 2018 Dec 4;8(1):17590. DOI: 10.1038/s41598-018-36207-4
  13. Watthanapanituck K, Kiatpathomchai W, Chu E, Panvisavas N. Identification of human DNA in forensic evidence by loop-mediated isothermal amplification combined with a colorimetric gold nanoparticle hybridization probe. *Int J Legal Med*. 2014 Nov;128(6):923-31. DOI: 10.1007/s00414-014-1018-9
  14. Zhan LZ, Song DF, Gu Q, Yan TT, Ma CC. Reverse transcription – loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of pathogenic *Listeria monocytogenes* in meat products. *Can J Microbiol*. 2019 Dec;65(12):913-921. DOI: 10.1139/cjm-2019-0114
  15. Tang MJ, Zhou S, Zhang XY, Pu JH, Ge QL, Tang XJ, Gao YS. Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by loop-mediated isothermal amplification. *Curr Microbiol*. 2011 Dec;63(6):511-6. DOI: 10.1007/s00284-011-0013-3
  16. Cho A-R, Dong H-J, Seo K-H, Cho S. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Listeria monocytogenes prfA* in milk. *Food Science and Biotechnology*. 2014;23(2):467-474. DOI: 10.1007/s10068-014-0064-x
  17. Nathaniel BR, Ghai M, Druce M, Maharaj I, Olaniran AO. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay targeting *Imo0753* gene for detection of *Listeria monocytogenes* in wastewater. *Lett Appl Microbiol*. 2019 Oct;69(4):264-270. DOI: 10.1111/lam.13200
  18. Liu Z, Zhu J, Xia X, Wang L, Yang C, Li X. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Based on *Imo0460* Sequence for Detection of *Listeria monocytogenes*. *J of Food Safety*. 2015;35(3):362-369. DOI: 10.1111/jfs.12183
  19. Faith NG, Kathariou S, Neudeck BL, Luchansky JB, Czuprynski CJ. A P60 mutant of *Listeria monocytogenes* is impaired in its ability to cause infection in intragastrically inoculated mice. *Microb Pathog*. 2007 May-Jun;42(5-6):237-41. DOI: 10.1016/j.micpath.2007.01.004

**Информация о соавторах:**

Щит Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Борзенков Валерий Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ветчинин Сергей Сергеевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

**Information about co-authors:**

Irina Yu. Shchit, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Valery N. Borzenkov, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Antimicrobial Drugs, Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey F. Biketov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey S. Vetchinin, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

**НОВОСТИ НАУКИ****Методы искусственного интеллекта, используемые для получения моделей устойчивости к антибиотикам**

Устойчивость к антибиотикам представляет собой растущую медицинскую проблему, поскольку необработанные наборы клинических данных недостаточно используются в качестве средства отслеживания масштаба проблемы. Исследователи искали закономерности устойчивости к антибиотикам в базе данных «Лидерство и надзор за антимикробными испытаниями» (ATLAS). ATLAS содержит 6,5 млн минимальных ингибирующих концентраций (МИК) для 3919 пар патоген-антибиотик, выделенных у 633 тыс. пациентов в 70 странах в период с 2004 по 2017 год. Искли anomalies в данных, при которых МИК могли смещаться по методологическим, а не клиническим или микробиологическим причинам, и обнаружили артефакты в более чем 100 парах патоген-антибиотик. Используя информационно-оптимальную методологию кластеризации для классификации патогенов на группы с низкой и высокой чувствительностью к антибиотикам, ATLAS был использован для прогнозирования изменений устойчивости. Динамика последних демонстрирует сложные закономерности с повышением МИК и некоторым снижением, в результате чего МИК субпопуляций могут расходиться. Мы также идентифицируем патогены с риском развития клинической резистентности в ближайшем будущем.



Catalán P, Wood E, Blair JMA, et al.

Seeking patterns of antibiotic resistance in ATLAS, an open, raw MIC database with patient metadata. *Nat Commun*. 2022 May 25;13(1):2917. DOI: 10.1038/s41467-022-30635-7