

УДК 579.869.1.083.18

## Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes*

Т.И. Карпова<sup>1</sup>, С.А. Ермолаева<sup>1</sup>, И.В. Лопырев<sup>1</sup>, Н.С. Бродина<sup>1</sup>,  
И.С. Тартаковский<sup>1</sup>, Х.А. Васкес-Боланд<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Университет Комплутенсе, Испания

Идентификация *Listeria monocytogenes* в клинических образцах часто затруднена вследствие морфологических и биохимических особенностей возбудителя листериоза. В работе на 66 штаммах листерий сравнивались традиционные биохимические и бактериологические методы идентификации *L. monocytogenes* с полимеразной цепной реакцией (ПЦР) и с оригинальным бактериологическим методом, основанным на сопоставлении лецитиназной активности культуры в присутствии или отсутствии активированного угля. В ПЦР с праймерами, направляющими амплификацию фрагмента гена

*plcA*, выявлена 100% специфичность и высокая чувствительность, свидетельствующие о целесообразности более широкого применения этого метода. У 89% штаммов *L. monocytogenes* обнаружена специфическая индукция лецитиназной активности при добавлении в среду активированного угля. В то же время у всех штаммов листерий, не принадлежавших к *L. monocytogenes*, а также у ряда патогенных бактерий других родов такого феномена не наблюдалось.

**Ключевые слова:** *Listeria monocytogenes*, идентификация, лецитиназная активность, ПЦР.

### New Methods for Identification of *Listeria monocytogenes*

T.I. Karpova<sup>1</sup>, S.A. Ermolaeva<sup>1</sup>, I.V. Lopirev<sup>1</sup>, N.S. Brodinova<sup>1</sup>, I.S. Tartakovskii<sup>1</sup>, J.A. Vazquez-Boland<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Epidemiology and Microbiology Named Under N.F. Gamaleya RAMS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> University Complutense, Spain

Identification of *Listeria monocytogenes* in clinical specimens is often complicated because of morphological and biochemical properties of this pathogen. In present article the traditional bacteriological methods of identification of *L. monocytogenes* are compared with PCR and original method of identification based on induction of lecithinase activity in the presence of activated charcoal. In the PCR with specific to the gene *plcA* primers there

was 100% specificity and high sensitivity. At the same time in 89% of *L. monocytogenes* strains the specific induction of lecithinase activity by activated charcoal has been shown, when no such a phenomenon have been observed in non-*monocytogenes* *Listeria* and other bacteria studied.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, identification, lecithinase activity, PCR.

#### Введение

Широко распространенная в природе грамположительная бактерия *Listeria monocytogenes* относит-

ся к числу факультативных внутриклеточных паразитов. Вызываемая ею инфекция, *листериоз*, хотя не является широко распространенной, однако характеризуется тяжестью клинического течения и высокой летальностью (до 30% от числа выявленных случаев) [1, 2].

В последние годы в мире наблюдается значительный рост числа заболевших листериозом, особенно лиц пожилого возраста, на фоне сопутствующих заболеваний или иммуносупрессивной терапии. Большую опасность листерии представляют

Контактный адрес:

Ермолаева Светлана Александровна

НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, ул. Гамалеи 18, Москва, 123098

Тел: (095) 193-63-71

Факс: (095) 190-74-01

E-mail: sveta@ermolaeva.msk.su

для беременных женщин и новорожденных. Они обуславливают выкидыши, мертворождения, а также развитие пороков плода, менингитов, сепсиса и пневмонии у новорожденных.

Диагностика листериоза нередко бывает затруднена вследствие чрезвычайного разнообразия клинических манифестаций. Чаще всего выявляются поражения центральной нервной системы (менингиты и менингоэнцефалиты), часто – сепсис и эндокардиты (10%). Листерийная инфекция осложняется также развитием остеомиелитов, воспаления суставов и пневмоний.

В Российской Федерации в 1992–1999 гг. зарегистрировано 477 случаев листериоза, из них 119 – в Москве, 120 – в Ивановской области, 71 – в Тульской, 37 – в Волгоградской, меньшее число, чаще всего 2–4 случая – в других областях и республиках [3].

В то же время в США заболеваемость листериозом составила около 1600 случаев в год [4]. В большинстве развитых стран отмечается 4–8 случаев заболеваний листериозом в год на 1 млн населения [2].

По мнению большинства специалистов, низкий уровень выявления больных листериозом в России не отражает истинной картины заболеваемости и во многом объясняется неудовлетворительным качеством лабораторной диагностики этой инфекции и отсутствием эффективной системы санитарно-эпидемиологического надзора за ее распространением [1, 5].

Результаты эпидемиологических исследований в ряде стран показали, что распространение листериоза связано преимущественно с заражением продуктов питания, поскольку сама технология их приготовления нередко чревата опасностью контаминации листериями и их размножения до высоких концентраций [2, 4]. В связи с этим в России в 2001 г. введен в действие гигиенический норматив ГН 2.3.2 Министерства здравоохранения РФ, регламентирующий безопасность продуктов питания в отношении возбудителя листериоза.

На наш взгляд, основная проблема, которую придется решать микробиологическим лабораториям, занимающимся выделением листерий, будет связана с быстрой, эффективной и недорогой дифференциацией *L. monocytogenes* от непатогенных видов, часто выявляемых в пищевых продуктах, а также от морфологически сходных бактерий, которые имеют схожие биохимические характеристики, например способность к гидролизу эскулина – основного селективного компонента, входящего в состав сред для выделения листерий.

Сегодня все большее развитие получают совре-

менные молекулярно-биологические методы мониторинга листерий, такие, как *гибридизация* и *полимеразная цепная реакция* (ПЦР) [1]. Однако для многих практических лабораторий использование этих методов будет связано с материальными затратами и соответствующим обучением специалистов.

Изучение биологии и генетики вирулентности возбудителя листериоза дает возможность совершенствования традиционных бактериологических методов идентификации. Начиная с середины 80-х годов прошлого века, когда количество работ в этом направлении стало лавинообразно увеличиваться, были установлены факторы патогенности листерий, необходимые для проявления их вирулентных свойств.

Один из важных факторов патогенности *L. monocytogenes* – лецитиназа (фосфатидилхолин-специфичная фосфолипаза) [6]. Этот фермент необходим для выживания и размножения листерий в инфекционном процессе. Однако при культивировании на средах, содержащих лецитин, лецитиназная активность у *L. monocytogenes* не определяется или выявляется чрезвычайно слабо [7]. Это связано с негативной регуляцией, которой подвергаются все гены патогенности *L. monocytogenes* [8, 9].

Результаты недавних исследований показали, что негативная регуляция осуществляется путем накопления в среде экстраклеточного продукта, продуцируемого *L. monocytogenes* в ходе роста культуры [10]. Этот продукт, выполняющий функции ауторепрессора, может быть устранен гидрофобным сорбентом, например активированным углем. При этом активируются гены патогенности и соответственно возрастает действие факторов патогенности в среде, в том числе и лецитиназы. Этот феномен использован нами для разработки принципиально нового метода дифференциации *L. monocytogenes* как от непатогенных листерий, так и от бактерий других родов, которые в клиническом материале морфологически напоминают листерии.

## Материал и методы исследования

**Использованные штаммы и среды.** В работе использованы типовые штаммы *Listeria* spp. (табл. 1), и штаммы *Listeria* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* из коллекции лаборатории легионеллеза НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН.

Принадлежность всех штаммов к указанным видам подтверждена с помощью соответствующих API тестов (bioMerieux, Франция). В работе использованы среды, перечисленные в табл. 4.

Таблица 1. Типовые штаммы *Listeria spp.*, использованные в исследовании

Штамм	Серогруппа
<i>L. monocytogenes</i>	
CLIP 75936	1/2a
SLCC 2755	1/2b
NCTC 5348	1/2c
NCTC 5105	3a
SLCC 2540	3b
SLCC 2479	3c
NCTC 5214	4a
NCTC 10528	4ab
NCTC 10527	4b
P14	4b
ATCC 19116	4c
ATCC 19118	4c
NCTC 10888	4d
<i>L. ivanovii</i>	
ATCC 19119	
SLCC 2379T	
<i>L. seeligeri</i>	
SLCC 5921	
SLCC 3954	
<i>L. innocua</i>	
ATCC 33090	
<i>L. welshimeri</i>	
SLCC 5334	
<i>L. grayi</i>	
17	

#### Определение ферментативной активности.

Для определения лецитиназной активности среды готовили следующим образом. Перед стерилизацией к агаризованной среде добавляли порошкообразный активированный уголь до концентрации 0,2–1%, как указано в тексте. Желток куриного яйца разводили в 150 мл физиологического раствора и добавляли 5% по объему к стерилизованному и охлажденному до температуры 40–45°C питательному агару. Аналогично готовили агар с добавлением желтка, но без добавления активированного угля. Исследуемые штаммы высевали короткими штрихами. Инкубировали 48 ч при температуре 37°C.

Для определения гемолитической активности использовали колумбийский агар (Columbia Blood Agar Base, HiMedia Lab. Ltd, Индия), в который добавляли 5% крови. Гемолитическую активность определяли после 48 ч инкубации при температуре 37°C.

Ферментацию маннита, рамнозы, раффинозы и D-ксилозы определяли по образованию кислоты в среде Purple Broth Base (HiMedia), содержащей 1% сахара, при температуре 37 °C в течение 7 дней.

Таблица 2. Штаммоспецифическая зависимость индукции лецитиназной активности у *L. monocytogenes* от концентрации активированного угля, n=26

Лецитиназная активность	Частота, n (%)
Выявляется:	
независимо от угля	1 (≈4)
при концентрации угля 0,2% и выше	2 (≈8)
при концентрации угля 0,5% и выше	21 (≈81)
Не выявляется	2 (≈8)

Наличие каталазы определяли по образованию газа при суспендировании изолированной колонии в 3% растворе перекиси водорода на предметном стекле, а подвижность – уколом в 0,35% агар *Listeria Motility Medium* (HiMedia) при температуре 22 °C и 37 °C в течение 48 ч.

**Подготовка образцов и проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР).** 100 мкл 12-часовой культуры, выращенной в сердечно-мозговом бульоне (Difco) при температуре 37 °C и шуттелирования с частотой 185 в минуту, осаждали центрифугированием при 12 000 об./мин в течение 3 мин. Ресуспендировали в 500 мкл буфера следующего состава: 10 mM Трис HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА, 20% раствор сахарозы, содержавшего 20 мг/мл добавленного непосредственно перед употреблением лизоцима (Serva). Инкубировали при температуре 37 °C в течение 18–20 ч.

Затем сферопласты осаждали центрифугированием, как описано выше, ресуспендировали в 500 мкл буфера: 10 mM Трис HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА, 3% раствор Тритона X-100, включавшего 125 мкг/мл добавленной перед употреблением протеиназы K, и инкубировали в течение 1 ч при температуре 56 °C. Лизаты кипятили в течение 10 мин для инактивации протеиназы K. В ПЦР использовали 1 мкл лизата.

ПЦР проводили с праймерами Plc1: 5'-AGGGGGCCATTTTGTATAAG и Plc2: 5'-ATCGTTGCTGTTTTGCTCGGT в амплификаторе Терцик (ДНК-технология) при температуре отжига праймеров 55°C, как описано нами ранее [11].

#### Результаты исследования

**Характеристика штаммов *Listeria spp.*, использованных в работе.** Всего использовали 66 штаммов листерий, принадлежавших ко всем 6 видам, входящим в настоящее время в род *Listeria*. Видовая принадлежность штаммов подтверждена с помощью API *Listeria* тестов (BioMerieux, Франция).

Исследовали признаки, рекомендуемые в раз-

Таблица 3. Характеристика штаммов *Listeria* spp., использованных в работе, %

Вид, количество изученных штаммов	Каталаза (+)	Подвижны при температуре		Гемолитические	Ферментируют				Положительно в ПЦР*
		22°C	37°C		маннит	рамнозу	раффинозу	ксилозу	
<i>L. monocytogenes</i> , n=26	100	100	0	96	0	100	0	0	100
<i>L. innocua</i> , n=31	100	100	87	0	0	93,5	0	0	0
<i>L. welshimeri</i> , n=4	100	75	0	0	0	75	0	100	0
<i>L. seeligeri</i> , n=2	100	100	0	100	0	0	0	100	0
<i>L. ivanovii</i> , n=2	100	100	0	100	0	0	0	100	0
<i>L. grayi</i> , n=1	100	0	0	0	100	0	0	0	0

\*С праймерами, специфическими для *L. monocytogenes* (см. текст).

личных руководства для идентификации листерий и определения их видовой принадлежности (табл. 3). Все без исключения штаммы были каталазоположительными (устойчивый признак), что отличает листерии от представителей родов *Lactobacillus* и *Erysipelothrix* [7]. Все штаммы *L. monocytogenes* были подвижны в полужидком агаре при температуре 22°C и неподвижны при 37°C. Гемолиз наблюдался на чашках с кровью у штаммов всех 3 видов, которые являются гемолитическими, – *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*.

У *L. ivanovii* гемолитическая активность выражена гораздо более ярко, чем у двух других видов, у которых гемолиз был схожим. У одного штамма *L. monocytogenes* гемолитическая активность не выявлялась.

В табл. 3 приведены данные о ферментации 4 сахаров, входящих в цветной ряд API Listeria и рекомендованных для внутривидовой дифференциации руководством Комитета по пищевым продуктам и лекарственным средствам (FDA, США) [12]. Согласно полученным результатам, по гидролитической активности в отношении лишь 4 сахаров *L. monocytogenes* практически невозможно дифференцировать от непатогенного вида *L. innocua*.

Штаммы *Listeria* spp. были проверены в ПЦР с видоспецифическими праймерами, направляющими амплификацию фрагмента гена *plcA*, кодирующего необходимую для вирулентности *L. monocytogenes* фосфатидилинозитолспецифичную фосфолипазу [11].

При первоначальном изучении листериозных культур использовали несколько иные условия проведения лизиса клеток, чем указано в материале и методах исследования. Именно время обработки клеток лизоцимом, ферментом, разрушающим бактериальную стенку, было сокращено до 1 ч. Однако ряд штаммов не мог быть лизирован в таких условиях. Это приводило к тому, что штаммы, идентифицированные другими методами как *L. monocyto-*

*genes*, давали в ПЦР отрицательный результат. Увеличение времени обработки лизоцимом до 16–20 ч улучшило лизис плохо лизируемых штаммов.

Ранее мы определили чувствительность используемой системы на препаратах очищенной ДНК [11]. Она составляла 125 фг. Чувствительность ПЦР, проводимой на лизатах, составила 1000 бактериальных клеток в образце (рис. 1). При исследовании выделенных культур среднее число клеток в реакции составляло  $10^5$ . Все штаммы *L. monocytogenes* давали положительный результат в ПЦР. Листерии, принадлежавшие к другим видам, в ПЦР давали отрицательный результат.

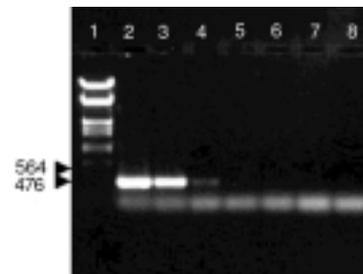


Рис. 1. Определение чувствительности ПЦР с праймерами *Plc1*, *Plc2* на лизатах штамма *L. monocytogenes* NCTC 10527. Стрелками указаны соответствующий фрагмент маркера молекулярной массы (564 нп) и амплифицированный фрагмент (476 нп). 1 – маркер молекулярной массы, ДНК фага лямбда, обработанная рестриктазами *EcoRI*, *Hind III*; 2 –  $10^5$  клеток в образце; 3 –  $10^4$  клеток; 4 –  $10^3$  клеток; 5 – 100 клеток; 6 – 10 клеток; 7 – 1 клетка; 8 – отрицательный контроль

**Индукция лецитиназной активности у *L. monocytogenes* в присутствии активированного угля** связана со специфическими регуляторными механизмами, контролирующими экспрессию факторов патогенности. Поэтому она характерна для всех штаммов дикого типа этого вида микроорганизмов.

Таблица 4. **Лецитиназная активность *L. monocytogenes* в присутствии 0,5% активированного угля на различных питательных средах**

Среда	Лецитиназная активность
Brain Heart Infusion (Difco Lab., США)	+
Brain Heart Infusion (bioMerieux, Франция)	–
Brain Heart Infusion (HiMedia Lab. Ltd, Индия)	–
Listeria Selective Broth (HiMedia Lab. Ltd, Индия)	–
МУР (HiMedia Lab. Ltd, Индия)	–
ГРМ № 1 (ННПГИП, Оболенск, Россия)	+

Таблица 5. **Лецитиназная активность *Listeria* spp. при выращивании на среде ГРМ № 1, содержащей и не содержащей активированный уголь**

Вид, количество изученных штаммов	Гидролизуют лецитин, %	
	независимо от угля	только в присутствии угля
<i>L. monocytogenes</i> , n = 26	4	89
<i>L. innocua</i> , n = 31	0	0
<i>L. welshimeri</i> , n = 4	0	0
<i>L. seeligeri</i> , n = 2	0	0
<i>L. ivanovii</i> , n = 2	100	0
<i>L. grayi</i> , n = 1	0	0

По данным М.Т. Ripio и соавт. [8], в присутствии 0,2% активированного угля в жидкой сердечно-мозговой среде (Difco) индукция лецитиназной активности наблюдалась у всех 103 исследованных штаммов *L. monocytogenes* дикого типа. Однако мы столкнулись с тем, что поведение штаммов различается при выращивании на агаризованной среде.

Нами проверена индукция лецитиназной активности у 26 штаммов *L. monocytogenes* при выращивании на агаризованной сердечно-мозговой среде (Difco), содержащей желток куриного яйца в качестве источника лецитина, в присутствии от 0,2 до 1% активированного угля. У 20 проверенных штаммов выявлена лецитиназная активность в присутствии 0,5% угля и выше, у 2 штаммов – в присутствии 0,2% и более (табл. 2). Два штамма (SLCC 2540 и NCTC 10528) не обладали лецитиназной активностью в присутствии активированного угля вплоть до 1% и, видимо, вообще не активировались. Один штамм (NCTC 5105) демонстрировал лецитиназную активность как в присутствии, так и при отсутствии активированного угля. Согласно полученным результатам, оптимальной для наблюдения из-

менения продукции лецитиназы на агаризованных средах является концентрация 0,5%.

Хотя на сердечно-мозговой среде (Difco) наблюдалась четко выраженная индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля, тем не менее эта среда не является оптимальной для масштабных исследований в силу причин экономического характера. Поэтому были исследованы другие среды, представленные на отечественном рынке (табл. 4).

Оптимальные результаты помимо с сердечно-мозговой средой (Difco) получены и со средой ГРМ № 1 (Оболенск). При добавлении к этой среде желтка куриного яйца (см. материал и методы исследования) штаммы дикого типа без угля не проявляли лецитиназной активности, а в присутствии 0,5% активированного угля демонстрировали четко различимую активность уже через 24 ч в виде плотной зоны помутнения шириной 2–4 мм, которая спустя 48 ч достигала 6–10 мм. На других протестированных средах индукции лецитиназной активности не было или наблюдалось нечеткое исчезающее гало, трудное для интерпретации.

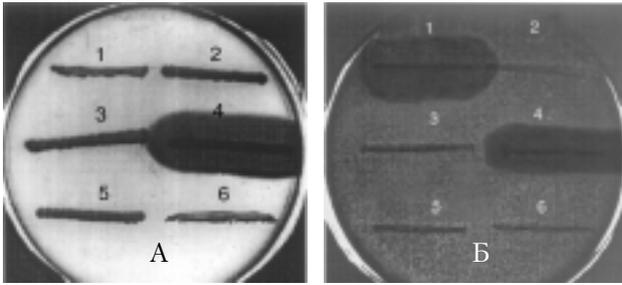
В работе использовали активированный уголь фирмы «Merck» и отечественный. Различий в лецитиназной активности при использовании отечественного и импортного угля не было.

**Индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля характерна только для *L. monocytogenes*.** Важный вопрос – поведение других видов листерий в присутствии активированного угля. Только два вида листерий, отличных от *L. monocytogenes*, имеют в своем геноме ген, кодирующий лецитиназу [13]. Это патогенный вид *L. ivanovii* и непатогенный – *L. seeligeri*.

На среде ГРМ № 1 с желтком оба исследованных штамма *L. ivanovii* проявляли лецитиназную активность как при отсутствии активированного угля, так и в его присутствии (табл. 5, рис. 2). Непатогенные виды листерий, включая два штамма *L. seeligeri*, не обладали лецитиназной активностью независимо от присутствия угля.

Таким образом, индукция лецитиназной активности, по-видимому, характерна только для *L. monocytogenes*, но не для других видов листерий.

Бактериологическая характеристика листерий в клинических образцах иногда бывает затруднена



**Рис. 2.** Индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля характерна для *L. monocytogenes*, но не для других *Listeria* spp. Культуры выращивали при температуре 37°C в течение 48 ч на среде ГРМ № 1, содержащей желток куриного яйца: А – без угля, Б – в присутствии 0,5% активированного угля. 1 – *L. monocytogenes* NCTC 10527, 2 – *L. welshimeri* SLCC 5334, 3 – *L. innocua* ATCC 33090, 4 – *L. ivanovii* ATCC 19119, 5 – *L. seeligeri* SLCC 5921, 6 – *L. grayi* 17

из-за изменчивости этого возбудителя и склонности его к образованию кокковидных форм. Мы сравнили поведение ряда бактерий, морфологически сходных с листериями, на среде ГРМ № 1 с желтком при отсутствии и в присутствии 0,5% активированного угля.

Как видно из данных табл. 6 и на рис. 3, у исследованных микроорганизмов не наблюдалось эффекта появления лецитиназной активности в зависимости от присутствия активированного угля. *Enterococcus faecalis* и *Escherichia coli* не проявляли лецитиназной активности. Исследованные стафилококки, напротив, на используемой среде как в присутствии, так и при отсутствии активированного угля характеризовались лецитиназной активностью, образуя плотные зоны помутнения непосредственно около штриха культуры и зоны просветления далее.

### Обсуждение результатов исследования

Для дифференциации листерий от представителей других родов бактерий используют морфологические признаки, а также тесты на каталазу и по-

движность [7, 12]. Для листерий характерна каталазоположительность, и хотя сообщалось об изоляции каталазоотрицательных штаммов *L. monocytogenes*, в нашем исследовании все штаммы демонстрировали положительную каталазную реакцию.

Что касается подвижности (в полужидком агаре листерии подвижны при температуре 18–25°C и неподвижны при 37°C), то, хотя действительно все штаммы *L. monocytogenes* соответствовали этому признаку, 87% штаммов *L. innocua* были подвижны и при температуре 37°C и при 20°C, а один из 4 штаммов *L. welshimeri* оставался неподвижным при комнатной температуре.

Другие методы бактериологической идентификации, позволяющие, в частности, дифференцировать патогенные и непатогенные виды листерий, часто дают противоречивые результаты. Характерный  $\beta$ -гемолиз на кровяном агаре у значительного числа штаммов *L. monocytogenes* выражен слабо, так что наличие гемолитической активности остается под вопросом. Один из 26 штаммов *L. monocytogenes* вообще не проявлял гемолитической активности.

Наилучшие результаты для дифференциации листерий получены с использованием теста API *Listeria* (bioMerieux) и в ПЦР. Однако API тест является слишком дорогим для рутинной диагностики листериоза. Использование же только некоторых сахаров, входящих в «цветной ряд», не позволяло достоверно дифференцировать представителей рода *Listeria* друг от друга.

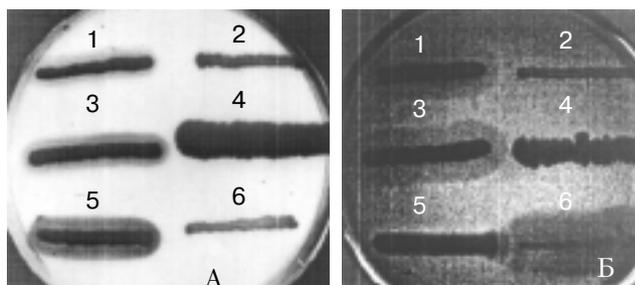
Специфичность и высокая чувствительность ПЦР подтверждены на чрезвычайно широком спектре микроорганизмов, в том числе на патогенных листериях. Проводя анализ имеющейся коллекции, мы столкнулись, однако, с неожиданной проблемой – плохим лизисом некоторых штаммов листерий, грозящих, в частности, ложноотрицательными результатами.

В то же время ряд авторов сообщает о проведении ПЦР с использованием листериозных клеток, добавляемых в реакционную смесь без предварительной обработки литическими ферментами [14]. Плохой лизис, очевидно, связанный со строением клеточной стенки, является штаммоспецифическим признаком. Этот вопрос, по-видимому, заслуживает дальнейшего изучения, так как длительная предварительная обработка образца существенно увеличивает время анализа и сводит на нет одно из основных преимуществ ПЦР – быстроту получения результата.

Недавно было продемонстрировано, что в присутствии активированного

**Таблица 6. Лецитиназная активность бактерий, не принадлежащих к роду *Listeria*, на среде ГРМ № 1, содержащей и не содержащей активированный уголь**

Вид, количество изученных штаммов	Гидролизуют лецитин, %	
	независимо от угля	только в присутствии угля
<i>Escherichia coli</i> , n=6	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> , n=5	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> , n=6	100	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> , n=3	100	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , n=1	100	0



**Рис. 3.** Сравнение лецитиназной активности *L. monocytogenes* и ряда бактерий, принадлежащих к другим родам. Культуры выращивали при температуре 37°C в течение 48 ч на среде ГРМ № 1, содержащей желток куриного яйца: А - без угля, Б - в присутствии 0,5% активированного угля. 1 - *S. aureus*, 2 - *E. faecalis*, 3 - *S. epidermidis*, 4 - *E. coli*, 5 - *S. haemolyticus*, 6 - *L. monocytogenes*

угля существенно возрастает продукция практически всех факторов патогенности *L. monocytogenes*, в том числе обладающих легко выявляемым фенотипическим проявлением гемолизина листерий - листериолизина и лецитиназы [7, 10]. Однако уровень индукции этих факторов в присутствии активированного угля значительно отличается.

Так, в питательном сердечно-мозговом бульоне (Difco) в присутствии активированного угля гемолитическая активность штамма NCTC 10527 увеличивается в 10 раз, а лецитиназной - почти в 250 раз [10]. Это заставило нас использовать именно лецитиназную активность при разработке метода дифференциации *L. monocytogenes* на агаризованных средах.

Увеличение продукции факторов патогенности в присутствии активированного угля связано с адсорбцией им, а следовательно, с устранением из среды культивирования ауторепрессорного продукта, вырабатываемого самими листериями [10]. Поэтому этот эффект не должен был бы зависеть от состава среды культивирования. Тем не менее мы наблюдали существенную разницу в индукции лецитиназной активности на разных средах, в том числе на средах одного наименования, выпускаемых разными фирмами-изготовителями. Пока этот вопрос детально не исследован, однако можно предположить несколько возможных объяснений.

В о - п е р в ы х, компоненты среды могут влиять на адсорбционную емкость угля, в частности, адсорбирующие его свойства могут быть значительно уменьшены присутствием в среде даже следовых количеств детергентов.

В о - в т о р ы х, наблюдаемый эффект увеличения лецитиназной активности связан не только с количеством продуцируемой лецитиназы, но и с ее

энзиматической активностью, зависящей от влияния ряда внешних факторов, концентрация которых в среде может варьировать [12].

Анализ коллекции штаммов *L. monocytogenes* показал, что индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля характерна для большинства штаммов. Три штамма, два из которых не индуцировались в присутствии угля, а один характеризовался постоянной продукцией лецитиназы, принадлежат к коллекциям NCTC и SLCC. Для штаммов, в течение ряда лет хранившихся в коллекциях и многократно пересевавшихся на искусственных питательных средах, характерно накопление мутаций, влияющих на продукцию факторов патогенности [15].

В нашей лаборатории проводится картирование мутаций, приведших к изменениям в индукции лецитиназной активности у перечисленных штаммов. Предварительные данные свидетельствуют, что конститутивная продукция лецитиназы у штамма NCTC 5105 сопровождается также увеличенной продукцией других факторов патогенности.

В отличие от *L. monocytogenes* для других видов листерий, имеющих ген лецитиназы, *L. ivanovii* и *L. seeligeri*, специфической индукции лецитиназной активности в зависимости от присутствия активированного угля не наблюдалось. Это, по-видимому, связано с межвидовыми различиями в регуляции экспрессии факторов патогенности.

Имеющиеся данные свидетельствуют в пользу того, что причиной увеличения уровня продукции лецитиназы и других факторов патогенности у *L. monocytogenes* является активация положительного регулятора экспрессии факторов патогенности PrfA [8]. Регуляторный белок PrfA высокоомологичен у *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* и *L. seeligeri*. Однако в его последовательности у этих 3 видов есть аминокислотные замены, вероятно, влияющие на его функциональные свойства.

Биохимически очень близкий к *L. monocytogenes* вид *L. innocua*, как и другие виды листерий, за исключением перечисленных, не имеет в своем геноме гена, кодирующего лецитиназу [13]. Это позволяет надежно дифференцировать возбудителя листериоза от непатогенных листерий, что особенно важно при анализе штаммов, выделенных из продуктов питания.

В клинических образцах возбудитель листериоза морфологически может быть сходен с различными кокками и дифтероидами. Известны случаи ложной идентификации энтерококков, стафилококков и коринебактерий как *L. monocytogenes* и наоборот. Индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля позволяет надежно

дифференцировать листерии от непродуцирующих лецитиназу *Enterococcus* spp. и *Escherichia coli*. Напротив, отсутствие лецитиназной активности на среде, не содержащей угля, отличает возбудитель листериоза от стафилококков.

Приведенные результаты нашей работы позволяют рассматривать индукцию лецитиназной активности в зависимости от присутствия активированного угля как практически значимый способ

дифференциации патогенного вида *L. monocytogenes* от представителей рода *Listeria* и других морфологически сходных бактерий.

**Благодарности.** Авторы выражают признательность фирме «HiMedia Laboratories Ltd» за бесплатно предоставленные образцы питательных сред.

## Литература

1. Тартаковский И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. Клинический микробиологический журнал 2000; 2:20-30.
2. Farber J.M., Peterkin P.I. *Listeria monocytogenes*, a food borne parasite. Microbiol Rev 1991; 55:476-511.
3. Котляров В.М., Бакулов И.А. Листерииоз – нейроинфекция животных и людей. В кн.: Материалы международной научно-практической конференции «Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, Крейтцфельдта–Якоба и другие прионные болезни; листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена», Россия. Покров; 2001. с.105-13.
4. Mead P.S., Slutsker L., Diez V., et al. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infect Dis 1999; 5:607-26.
5. Подунова Л.Г., Ясинский А.А., Опочинский Э.Ф. и др. Анализ деятельности центров Госсаннадзора РФ по лабораторной диагностике листериоза. В кн: Инфекционный сборник статистических и аналитических материалов. Раздел 2. Москва; 2000.
6. Vazquez-Boland J.A., Kocks C., Dramsi S., et al. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. Infect Immun 1992; 60:219-30.
7. Бакулов И.А., Васильев Д.А. Листерииоз как пищевая инфекция. Вопросы диагностики и профилактики. Учебное пособие. Ульяновск; 1991.
8. Ripio M.T., Dominguez-Bernal G., Suarez M., et al. Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. Res Microbiol 1996; 147:371-84.
9. Ермолаева С.А., Белый Ю.Ф., Тартаковский И.С. Изменение уровня экспрессии факторов вирулентности *Listeria monocytogenes* под влиянием внешних условий. Мол ген микробиол вирусол 2000; 1:17-9.
10. Ermolaeva S.A., Belyi Yu.F., Tartakovskii I.S. Characteristics of induction of virulence factor expression by activated charcoal in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol Lett 1999; 174:137-41.
11. Ермолаева С.А. Получение рекомбинантной фосфатидил-инозитол специфичной фосфолипазы С *Listeria monocytogenes* и оценка ее диагностической значимости [диссертация]. Москва; 1994.
12. Hitchins A.D. FDA Bacteriological Analytical Manual, *Listeria monocytogenes*. 8th edition. 1995.
13. Gouin E., Mengaud J., Cossart P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a non-pathogenic species. Infect Immun 1994; 62:3550-3.
14. Destro M.T., Leitao M.F., Farber J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. Appl Environ Microbiol 1996; 62:705-11.
15. Pine L., Weaver R.E., Carlone G.M., et al. *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 and NCTC 7973 contain a non-hemolytic, nonvirulent variant. J Clin Microbiol 1987; 25:2247-51.