УДК 579.869.1:579.25

# Типирование *Listeria monocytogenes* на основе полиморфизма генов факторов патогенности

Т.И. Карпова[1], Т.Е. Фирсова[2], Л.В. Родина[3], В.М. Котляров[2], И.С. Тартаковский[1], С.А. Ермолаева[1]

[1]*Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия*
[2]*Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН, Покров, Россия*
[3]*Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора г. Москвы, Россия*

Методом *полимеразной цепной реакции* (ПЦР), комбинированной с анализом *полиморфизма длины рестрикционных фрагментов* (ПЦР–ПДРФ), показано существование штаммоспецифического полиморфизма участка хромосомы *Listeria monocytogenes*, который содержит гены *prfA* и *plcA*, кодирующие факторы патогенности. Полученные данные подтверждают наличие в виде *L. monocytogenes* по крайней мере двух филогенетических линий, существование которых предполагалось рядом авторов на основании анализа последовательностей других участков генома [1, 4]. Показано преобладание определенного ПЦР–ПДРФ спектра в зависимости от источника выделения штамма (клиника, продукты питания). Установлено также, что штаммы с существенными изменениями в исследуемой области (уменьшение размера фрагмента ПЦР по сравнению с ожидаемым или полное его отсутствие) являются невирулентными.

**Ключевые слова**: *Listeria monocytogenes*, полимеразная цепная реакция, рестрикционный анализ.

## Typing of *Listeria monocytogenes* on the Basis of Polymorphism of Genes Encoding the Pathogenecity Factors

T.I. Karpova[1], T.E. Firsova[2], L.V. Rodina[3], V.M. Kotlyarov[2], I.S. Tartakovski[1], S.A. Ermolaeva[1]

[1] *Research Institute of Epidemiology and Microbiology named under N.F. Gamaleya of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia*
[2] *Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology of Russian Academy of Agricultural Sciences, Pokrov, Russia*
[3] *State Center of Epidemiological Control, Moscow, Russia*

*Polymerase chain reaction* (PCR) and *restriction fragment length polymorphisms* (RFLP) analysis revealed polymorphism of *prfA* and *plcA* genes, encoding the pathogenecity factors in strains of *Listeria monocytogenes*. Phylogenetic analysis confirmed the presence of at least two distinct evolutionary *L. monocytogenes* lines, existing of which was suggested in a number of studies based on analysis of other chromosomal DNA sites [1, 4]. There was shown to be a predominance of certain virulence-associated genes polymorphisms depending on type of sample (hospital environment, foods). The *L. monocytogenes* strains with a large number of sequence differences in this region (smaller than expected size of targeted DNA fragment or its absence) were found to be avirulent.

**Key words**: *Listeria monocytogenes*, polymerase chain reaction, restriction analysis.

Контактный адрес:
Светлана Александровна Ермолаева
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18
НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН
Тел: (095) 193-63-71
Факс: (095) 190-74-01
Эл. почта: sveta@ermolaeva.msk.su

## Введение

Относящиеся к одному виду патогенные микроорганизмы часто обладают одинаковым набором факторов патогенности, основными биохимическими и геномными характеристиками. Однако потомки различных клонов одного вида обладают определенной вариабельностью на генотипическом и фенотипическом уровнях, которая, с одной стороны, позволяет их различить, а с другой стороны, обусловливает появление хорошо известного феномена штаммоспецифических различий вирулентности, описанного для широкого спектра бактериальных патогенов [1, 2].

Этиологическим агентом листериоза является грамположительная бактерия *Listeria monocytogenes*, которая может служить примером эпидемиологической связи вирулентности с определенными клональными линиями. Так, более 90% штаммов *L. monocytogenes*, изолированных при спорадических случаях листериоза, принадлежат всего к 3 серогруппам из 9 существующих – 1/2a, 1/2b и 4b [3].

Более того, подавляющее большинство штаммов, ставших причиной крупных эпидемических вспышек, формируют очень узкую группу, характеризующуюся принадлежностью к серогруппе 4b и всего к 2 риботипам из 23 выявленных к настоящему времени [4].

Таким образом, очевидно, что некоторые клональные линии *L. monocytogenes* обладают повышенным тропизмом по отношению к человеку, и их выявление и идентификация, в частности в продуктах питания, которые являются основным фактором передачи листериоза, имеет важное эпидемиологическое значение.

Среди современных методов дифференциации бактериальных штаммов большое распространение получили *методы рестрикционного анализа последовательности ДНК*, основанные на чувствительности рестриктаз, ферментов, расщепляющих ДНК в местах с определенной последовательностью нуклеотидов, к единичным нуклеотидным заменам в узнаваемой последовательности.

Полное расщепление анализируемой ДНК отдельными рестриктазами приводит к образованию определенного набора фрагментов, число и размер которых соответствуют положению последовательностей, узнаваемых этими рестриктазами (сайтов рестрикции). Любая мутация, изменяющая последовательность нуклеотидов сайта рестрикции, уничтожает этот сайт, что приводит к полиморфизму длины рестрикционных фрагментов. Этот метод детекции мутаций в геномной ДНК получил название метода *полиморфизма длины рестрикционных фрагментов* (ПДРФ) – *restrction fragments length polymorphism* (RFLP).

Комбинирование ПДРФ с *полимеразной цепной реакцией* (ПЦР) позволяет судить о полиморфизме определенных участков генома, в том числе важных для вирулентности [5, 6].

Гены, кодирующие основные факторы патогенности *L. monocytogenes*, образуют кластер, так называемый «островок патогенности», размером около 10 тыс. пар нуклеотидов на хромосомной ДНК, последовательность которой недавно определена для штамма EGD [7].

Важнейшую роль в вирулентности листерий играет белок PrfA, необходимый для экспрессии всех остальных факторов патогенности [8]. Ген *prfA* расположен на «островке патогенности» рядом с геном *plcA*, кодирующим фосфолипазу PI-PLC – секретируемый фактор патогенности. В данной работе область гена *prfA* выбрана в качестве мишени для ПЦР–ПДРФ-анализа для оценки возможности его использования при дифференциации штаммов *L. monocytogenes*.

## Материал и методы исследования

### *Использованные штаммы и условия их культивирования*

В работе использованы 30 штаммов *L. monocytogenes* (см. таблицу). Ряд из них принадлежит к типовым коллекциям, остальные выделены из указанных источников и ранее описаны в цитируемых работах.

Листерии культивировали на агаризованной или в жидкой среде *Brain Heart Infusion* – BHI (Difco Lab., Inc, USA) при температуре 37°C.

### *Подготовка образцов и проведение ПЦР*

Образцы подготавливали, как описано нами ранее [12], за исключением того, что предшествующую лизису ферментативную обработку бактериальных клеточных стенок осуществляли в присутствии 0,2 мг/мл лизоцима в течение 1 ч. ПЦР проводили в буфере, поставляемом с Taq-полимеразой (Бионем, Россия), в присутствии 1,5 мМ $MgCl_2$ и 250 мкМ дНТФ с праймерами Lmp3: 5′-ACATTTGTCACTGCATCTCCG, Lmp4: 5′-CATGTTGTTCGCACCCAGTTC в термоциклере «Терцик» (ДНК-технология, Россия) по программе быстрого регулирования при температуре 94°C – 2 мин; затем 5 циклов при температуре 94°C – 20 с, 60°C – 20 с, 72°C – 20 с и 30 циклов при температуре 94°C – 5 с, 60°C – 5 с, 72°C – 5 с.

Концентрацию ампликонов проверяли путем электрофореза аликвоты на агарозном геле.

Таблица 1. **Штаммы *Listeria monocytogenes*, использованные в исследовании**

| № | Штамм | Серогруппа, источник выделения | ПЦР–ПДРФ тип | Ссылка |
|---|---|---|---|---|
| 1 | EGD [а] | 1/2a | A | Типовая коллекция |
| 2 | CLIP 75936 | 1/2a | A | Типовая коллекция |
| 3 | PAM 79 | 1/2a, окружающая среда | –[б] | [9] |
| 4 | SLCC 2755 | 1/2b | B | Типовая коллекция |
| 5 | PAM 62 | 1/2b, продукты питания | B1 | [9] |
| 6 | NCTC 5105 | 3a | A | Типовая коллекция |
| 7 | SLCC 2540 | 3b | B | » |
| 8 | NCTC 10528 | 4ab | –[в] | » |
| 9 | NCTC 10527 | 4b | B | » |
| 10 | P14 | 4b, клинический | B | [10] |
| 11 | NCTC 10888 | 4d | B | Типовая коллекция |
| 12 | PL 4082 | 4b | B | [9] |
| 13 | GIM 16 [г] | Продукты питания | B | [9] |
| 14 | GIM 87 | » | A | [9] |
| 15 | GIM 88 | » | A | [9] |
| 16 | GIM 90 | » | A | [9] |
| 17 | GIM 91 | » | A | [9] |
| 18 | GIM 92 | » | A | [9] |
| 19 | GIM 98 (20) | » | A | [9] |
| 20 | GIM 114 (26) | » | A | [9] |
| 21 | GIM 114 (31) | » | A | [9] |
| 22 | GIM 129 (3) | » | A | [9] |
| 23 | GIM 132 (5) | » | C | [9] |
| 24 | GIM 136 (3) | » | B | [9] |
| 25 | 31-T | » | B | [11] |
| 26 | 24-T | » | A | [11] |
| 27 | 35-T | » | A | [11] |
| 28 | 74-T | » | A | [11] |
| 29 | 56-T | » | B | [11] |
| 30 | GIM 1300 | Клинический | B | [10] |

[а] Штаммы 1–11-й любезно предоставлены Dr. J.A. Vazquez-Boland, University of Bristol, Великобритания.
[б] Штаммы 12–30-й – из коллекции лаборатории легионеллеза НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Россия.
[в] Продукт ПЦР размером 1500 н. п. (пояснения в тексте).
[г] ПЦР с использованными праймерами не дала продукта (пояснения в тексте).

### *Проведение рестрикционного анализа*

В работе использовали рестриктазы Hind III, Cla I, BamH I, EcoR I производства «Fermentas» (Литва). Полученные в ПЦР ампликоны переосаждали следующим образом: к 50 мкл продукта ПЦР добавляли 50 мкл дистиллированной воды, 90 мкл 20% ПЭГ 6000 – 2,5 М NaCl, тщательно перемешивали, инкубировали 10 мин при температуре 37°С и осаждали ДНК центрифугированием в микроцентрифуге СМ-50 (Elmi, Латвия) при максимальных оборотах в течение 3 мин. Осадок промывали 70% этанолом, просушивали и растворяли в 10–40 мкл дистиллированной воды в зависимости от концентрации ампликона.

Рестрикцию проводили в объеме 20 мкл в течение 2 ч в условиях, рекомендованных производителем.

### *Секвенирование*

Для секвенирования использовали праймеры Prf1 – 5′-TCAACTAACATATATTATTCC, Prf2 – 5′-CATCGGTTGGCTATTATAAT, Prf3 – 5′-CTAGGCTGTATGAAACTTG, Prf4 – 5′-CTTGGTGAAGCAATCGTACGC, Plc3 – 5′-GGAGCATACTGACGAGGTGTG.

Секвенирование проводили в Центре коллективного пользования «Геном». Сравнение последовательностей и анализ присутствия сайтов рестрикции осуществляли с помощью программ PCGene

6.70, IntelliGenetics Inc. и Clone Manager 2.1, Scientific and Educational Software.

Исходную последовательность использованного района листериозной хромосомы получили из базы данных генома штамма EGD, находящейся в Институте Пастера, Франция (http://www.pasteur.fr).

### Оценка вирулентности

Качественную оценку вирулентности проводили по результатам конъюнктивальной пробы на морских свинках.

Культуру листерий, выросшую на агаризованной среде в течение 12 ч, смывали стерильным физиологическим раствором и доводили концентрацию до $10^9$ КОЕ/мл путем сравнения с соответствующим стандартом мутности (ГИСК им. Л.А. Тарасевича) и последующим титрованием на питательной среде. На конъюнктиву глаза морской свинки наносили 2 капли суспензии, после чего производили легкий массаж век ватным тампоном. Пробу с каждым штаммом ставили на 2 морских свинках, за которыми наблюдали в течение месяца.

Количественную оценку вирулентности осуществляли путем заражения 5–7-дневных куриных эмбрионов. Заражали 10-кратными разведениями в стерильном физиологическом растворе испытуемого штамма, выращенного в течение ночи на агаризованной среде. На каждое разведение использовали 4 эмбриона.

В аллантоисную полость вводили 0,2 мл взвеси бактерий, после чего эмбрионы инкубировали при температуре 37°С в течение 24 ч. В качестве контроля вводили стерильный физиологический раствор. Титр определяли по методу Кербера [13].

## Результаты исследования

### Анализ штаммов L. monocytogenes в ПЦР

Использованные праймеры Lmp3 и Lmp4 направляли синтез фрагмента хромосомы *L. monocytogenes*, содержащего гены *prfA* и *plcA*, кодирующие регуляторный белок PrfA и фосфолипазу PI-PLC, и фрагмента гена *hly*, кодирующего листериолизин О (рис. 1).

Согласно компьютерному анализу, последовательности хромосомы штамма EGD, относящегося к серогруппе 1/2а, ожидали получить фрагмент длиной 2862 *нуклеотидных пар* (н.п.) Скрининг имеющейся у нас коллекции штаммов показал присутствие этого фрагмента после проведения ПЦР на лизатах всех штаммов, за исключением двух (рис. 2).

ПЦР с лизатом штамма РАМ 79 (серогруппа 1/2а) приводила к появлению укороченного продукта размером около 1500 н. п.

С лизатом штамма NCTC 10528 (серогруппа 4ab) ПЦР не давала продукта. С целью устранения возможных причин, связанных с наличием ингибирующих примесей в лизате, из этого штамма была выделена ДНК. Однако использование очищенной ДНК не привело к появлению продукта в ПЦР. РАМ 79 и NCTC 10528 были исключены из рестрикционного анализа и использовались в дальнейшем только для определения вирулентности.

### Рестрикционный анализ фрагмента, полученного в ПЦР

Проведено фрагментирование продуктов ПЦР рестриктазами EcoR I, BamH I, Cla I и Hind III, наличие сайтов рестрикции для которых было показано компьютерным анализом последовательности штамма EGD (рис. 1).

При использовании рестриктаз EcoR I и BamH I рестрикция продуктов ПЦР всех штаммов приводила к появлению ожидаемых фрагментов размерами 1743, 939 и 980, 862, 840 н. п. соответственно (рис. 3).

Однако при использовании рестриктазы Cla I штаммы разделились на 2 группы – А и В (рис. 4, табл. 1).

К группе А отнесли штаммы, которые демонстрировали тот же спектр фрагментов, что и штамм EGD, а именно 3 фрагмента массой 1874, 733 и 75 н. п., последний из которых был виден только на полиакриламидном геле.

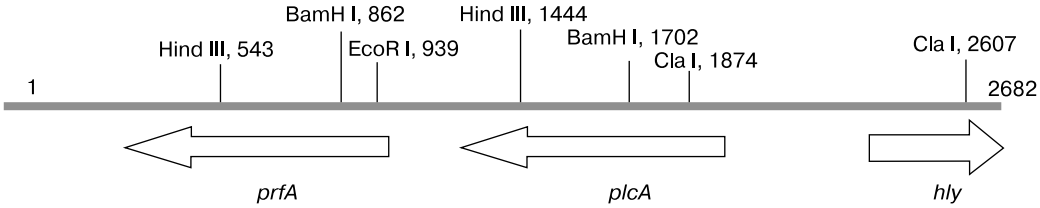


**Рис. 1**. Фрагмент хромосомы *L. monocytogenes*, амплифицируемый в ходе ПЦР с праймерами Lmp3 – Lmp4. Указаны положение и направление считывания генов *prfA*, *plcA* и *hly*. Положение сайтов рестрикции указано на основании компьютерного анализа последовательности штамма EGD [7]

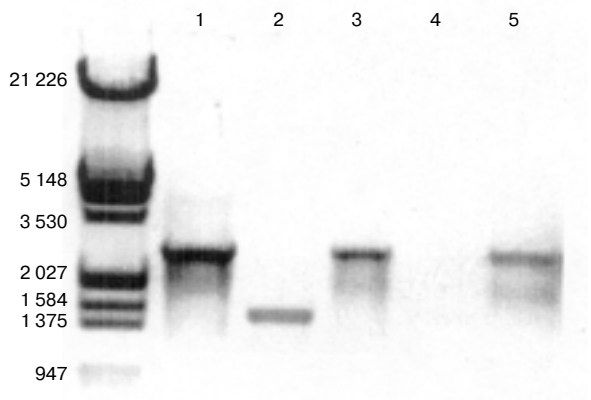


**Рис. 2**. Ампликоны, полученные в результате ПЦР с праймерами Lmp3 – Lmp4 (фрагмент Lmp3 – Lmp4), на лизатах штаммов: 1 – EGD, 2 – PAM 79, 3 – NCTC 10527, 4 – NCTC 10528, 5 – PAM 62. Слева указаны размеры фрагментов маркерной ДНК в н. п.

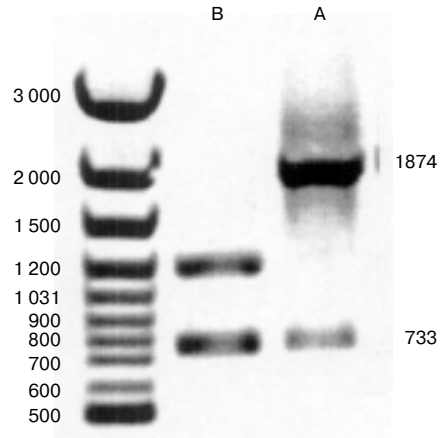


**Рис. 4**. Штаммоспецифический полиморфизм фрагмента Lmp3 – Lmp4 при рестрикции Cla I. Принадлежность штаммов к группам А или В указана в табл. 1. Слева приведены размеры фрагментов маркерной ДНК (в н. п.), справа – размеры фрагментов штаммов группы А, вычисленные по опубликованной последовательности штамма EGD

Штаммы группы В имели отличный спектр, содержавший 4 полосы, по-видимому, из-за дополнительного сайта рестрикции, разбивавшего полосу размером 1874 н. п. на 2 с приблизительными размерами 1150 и 700 н. п., вычисленными на основе сравнения с маркерной ДНК.

Таким образом, штаммы группы В имели в спектре 4 полосы размерами порядка 1150, 700, 733 и 85 н. п., из которых (733 и 700 н. п.) из-за практически одинакового размера при электрофорезе сливались в одну.

При фрагментировании рестриктазой Hind III штаммы групп А и В демонстрировали отличающиеся спектры.

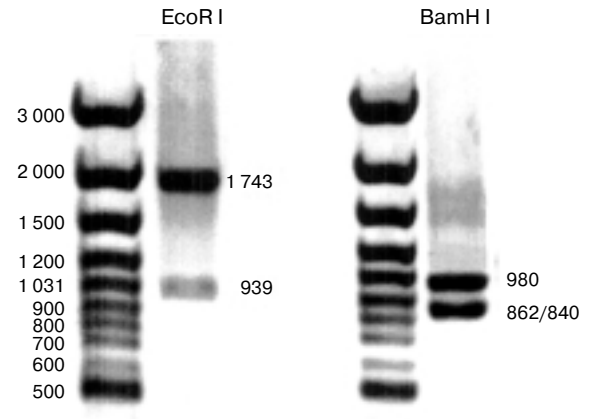


**Рис. 3.** Профили рестрикции фрагмента Lmp3 – Lmp4 рестриктазами EcoR I и BamH I. Левые дорожки – маркерная ДНК, размеры фрагментов указаны в н. п.

Штаммы группы А имели в спектре, вычисленном на основе последовательности штамма EGD, 3 полосы размерами 1238, 901 и 543 н. п. Штаммы группы В имели полосу, совпадавшую по размеру с самой тяжелой полосой 1238 н. п., и, кроме нее, 2 фрагмента с приблизительными размерами 800 и 650 н. п. (рис. 5).

Среди штаммов группы В был выделен еще один подтип, отличавшийся исчезновением полос молекулярной массой 1238 и 800 н. п., видимо, в результате потери сайта рестрикции, поскольку отсутствие этих полос сопровождалось появлением полосы массой около 1850 н. п. Этот подтип обозначили как группу В1.

### *Определение сайтов изменчивости у полученных групп*

Проведено частичное секвенирование фрагментов ПЦР штаммов NCTC 10527 и GIM 132 (5), принадлежащих к группам В и В1 соответственно. У обоих штаммов обнаружили ряд нуклеотидных замен по сравнению с последовательностью штамма EGD, в том числе нуклеотидные замены, приводящие к изменению сайтов рестрикции: A→G в положении 530 от начала фрагмента, A→G в положении 728 и G→A в положении 806 (рис. 6).

У штамма GIM 132 (5) нашли замену C→A в положении 1448, которая картируется в последовательности гена *plcA* (рис. 1, 6).

Замены в положениях 728 и 806 приводили к возникновению последовательностей, узнаваемых рестриктазами Cla I и Hind III соответственно, а за-

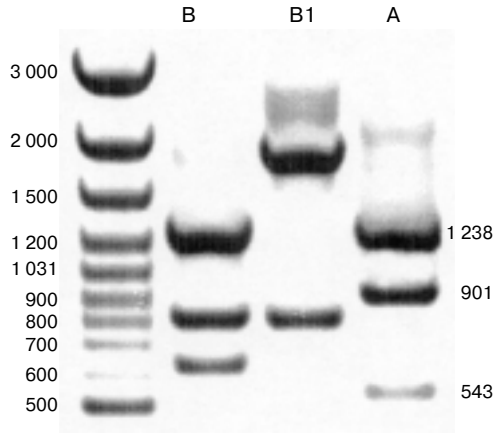


**Рис. 5**. Штаммоспецифический полиморфизм фрагмента Lmp3 – Lmp4 при рестрикции Hind III. Внутри группы B выделена группа B1 (пояснения в тексте). Слева указаны размеры фрагментов маркерной ДНК (в н. п.), справа – размеры фрагментов штаммов группы A, вычисленные по опубликованной последовательности штамма EGD

мены в положениях 530 у обоих штаммов и 1448 у штамма GIM 132 (5) – наоборот, к исчезновению последовательности, узнаваемой рестриктазой Hind III.

Итак, секвенирование штаммов NCTC 10527 и GIM 132 (5) позволило создать для типов B и B1 рестриктные карты, отличавшиеся от штамма EGD положением Hind III сайтов и наличием дополнительного сайта для Cla I (рис. 6).

### *Определение вирулентности штаммов, принадлежащих к разным группам, на основе полиморфизма генов prfA–plcA*

Штаммы делили на вирулентные и невирулентные на основании результатов конъюнктивальной пробы на морских свинках. Для этого опыта были выбраны штаммы: из группы A – NCTC 5105, из группы B – SLCC 2540 (серогруппа 3b) и PL 4082 (серогруппа 4b), из группы B1 – PAM 62 (серогруппа 1/2b). В анализ также был включен штамм PAM 79, дающий укороченный фрагмент в ПЦР с праймерами Lmp3-Lmp4, и штамм NCTC 10528, не дающий фрагмента в ПЦР с этими праймерами.

Штаммы NCTC 5105, PL 4082 и PAM 62 на 3-й день вызвали местный воспалительный процесс в виде гнойного кератоконъюнктивита, прекратившегося на 10-й день, после которого наблюдалось помутнение роговицы в течение месяца (срок наблюдения). Штаммы PAM 79 и NCTC 10528 не вызывали видимых изменений у подопытных животных.

Таким образом, штаммы PAM 79 и NCTC 10528 являлись невирулентными.

Для количественной оценки вирулентности штаммов SLCC 2540 и PL 4082, относящихся к группе B, и PAM 62, относящегося к группе B1, использовали модель куриных эмбрионов, наиболее чувствительной из всех использованных. Заражение дозами, превышавшими 10 бактериальных клеток, приводило к 100% летальности для штамма PL 4082.

При оценке $LD_{50}$ на этой модели получены следующие результаты: для штамма SLCC 2540, относящегося к серогруппе 3b, $LD_{50}$ составила 10 КОЕ, для штамма PL 4082, принадлежащего к серогруппе 4b, – 1 КОЕ, для штамма PAM 62, принадлежащего к серогруппе 1/2b, – 18 КОЕ.

## Обсуждение результатов исследования

Исследование показало существование штаммоспецифического полиморфизма участка хромосомы *L. monocytogenes*, содержащего гены *prfA* и *plcA*. Рестрикционный анализ полученного в ПЦР фрагмента, содержавшего эти гены, позволил разбить штаммы на 2 группы – A и B.

Штаммы, относящиеся к группе A, обладали рестрикционным спектром, аналогичным таковому у типового штамма EGD, геномная последовательность которого полностью определена [7].

Штаммы группы B отличались наличием дополнительного сайта узнавания для рестриктазы Cla I и появлением нового Hind III сайта, сопровождаемого исчезновением другого.

Все эти изменения были связаны с «молчащими» единичными нуклеотидными заменами в последовательности гена *prfA*, не приводящими к аминокислотным заменам в белковом продукте. Кроме того, в группе B была выявлена подгруппа, обозначенная B1, характеризующаяся исчезновением Hind III сайта также вследствие единичной нуклеотидной замены, произошедшей в последовательности гена *plcA*. Это изменение нуклеотидной последовательности приводит к аминокислотной замене Ala247Ser в C-концевой части фосфолипазы PI-PLC, кодируемой этим геном. C-концевая область листериозной фосфолипазы является наименее консервативной по отношению к гомологичным белкам грамположительных бактерий *Bacillus cereus* и *B. thuringiensis*, а также эукариотическим PI-PLC [14].

Прослежена связь между ПЦР–ПДРФ-типом и принадлежностью к серогруппе. К группе A относились штаммы, принадлежавшие к серогруппам 1/2a и 3a, к группам B и B1 – штаммы, принадлежавшие к серогруппам 1/2b, 3b, 4b и 4d.

В последнее время опубликованы работы, в которых методами риботипирования, мультилокус-

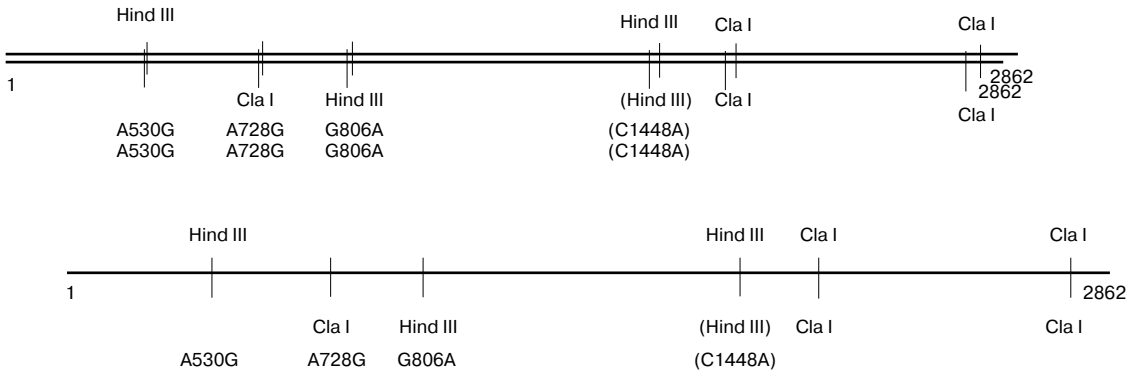


**Рис. 6.** Расположение Cla I и Hind III сайтов рестрикции в зависимости от принадлежности к группе А (сайты указаны над чертой) или к группе В (сайты указаны под чертой). В нижней части приведены нуклеотидные замены у штаммов группы В, приводящие к изменению положения сайтов рестрикции. В скобках указана замена, приводящая к исчезновению Hind III сайта у штаммов подгруппы В1

ного ферментного анализа и гель-электрофореза в переменном поле показано наличие в виде *L. monocytogenes* 3 филогенетических линий, каждая из которых объединяет штаммы, принадлежащие к определенным серогруппам.

К первой линии относятся штаммы, принадлежащие к серогруппам типа а и с, ко второй – b и d, к третьей – 4а, серогруппа, занимающая уникальную позицию [4, 6].

Полученные результаты показывают связь между принадлежностью штамма к определенной филогенетической линии и нуклеотидной последовательностью центрального регуляторного элемента системы генов патогенности *prfA*. Штаммы, отнесенные по ПЦР–ПДРФ-спектру к группе А, принадлежат, по-видимому, к первой филогенетической линии, относящиеся к типам В и В1 – ко второй филогенетической линии.

Характерная принадлежность определенных аллелей к той или иной филогенетической линии также показана для генов, кодирующих листериолизин О, интерналин и белок Р60 – факторы патогенности листерий, необходимые в процессе внутриклеточного паразитизма [6]. Анализ этих данных свидетельствует об отсутствии горизонтального переноса генов между клональными линиями *L. monocytogenes*.

В нашем распоряжении был всего одни штамм, относившийся к третьей филогенетической линии, – NCTC 10528 (серогруппа 4ab). Однако именно с этим штаммом нам не удалось получить продукта в ПЦР, что, по-видимому, связано с существенными изменениями в исследуемой области. Согласно данным по риботипированию и секвенированию 16S РНК, представители этой линии составляют изолированную группу в составе вида *L. monocytogenes*, и некоторые исследователи предлагают выделить ее в отдельный подвид [4].

Некоторые важные фенотипические характеристики листериозных штаммов, такие, как вирулентность или тропизм к той или иной экологической нише, коррелируют с той или иной филогенетической линией.

Так, представители первой филогенетической линии наиболее часто выделяются из продуктов питания. В то же время подавляющее большинство случаев листериоза у людей связано с представителями второй филогенетической линии. Заболевания животных практически в равной степени связаны с представителями всех трех линий, однако представители третьей филогенетической линии ни разу не были документированы как возбудители инфекции у человека [4, 15].

Из исследованных нами штаммов 18 были выделены из продуктов питания, из них 12 имели ПЦР–ПДРФ-спектр типа А и, следовательно, относились к первой филогенетической линии *L. monocytogenes*. Ко второй линии были отнесены 6 штаммов, поскольку имели ПЦР–ПДРФ-спектр типа В, причем у 2 из них выявлен спектр подтипа В1, который не обнаружен у штаммов из других источников. Оба исследованных штамма клинического происхождения имели спектр типа В и отнесены ко второй филогенетической линии.

При оценке вирулентности на качественном уровне не выявлено существенных отличий как среди представителей второй филогенетической линии, так и между представителями первой и второй линий. При дополнительном исследовании вирулентности на модели куриных эмбрионов обнаружена в 10 раз более низкая 50% летальная доза заражения представителем серогруппы 4b, чем с

представителями других серогрупп, относившихся ко второй филогенетической линии. Именно представители серогруппы 4b наиболее опасны для человека, так как практически все крупные эпидемические вспышки листериоза, связанные с употреблением контаминированных продуктов питания, обусловлены штаммами этой серогруппы [3, 15].

Интересно отметить, что при параллельном определении вирулентности на новорожденных мышах нами не выявлено различий между представителями различных серогрупп (данные не приведены). Вероятно, куриные эмбрионы являются более чувствительной и специфической моделью при оценке вирулентности штаммов *L. monocytogenes*.

Изучение вирулентности показало также, что штаммы с существенными изменениями в исследуемой области – уменьшение размера исследуемого фрагмента по сравнению с ожидаемым или полное его отсутствие – являются невирулентными. Очевидно, это связано с той важной ролью, которую играют продукты генов *prfA* и *plcA* в вирулентности *L. monocytogenes*.

Делеция гена *prfA* приводит к потере вирулентности, что объясняется незаменимостью продукта этого гена для экспрессии практически всех факторов патогенности [8]. К этим факторам принадлежит и продукт гена *plcA*, фосфолипаза PI-PLC, являющаяся секретируемым белком, необходимым для жизнедеятельности листерий внутри эукариотической клетки – необходимого этапа инфекционного процесса [14].

Таким образом, использованная нами система рестрикционного анализа фрагмента хромосомной ДНК *L. monocytogenes* позволяет судить о принадлежности выделенного штамма к определенной филогенетической линии, а отсутствие или существенное уменьшение размера продукта с большой степенью вероятности свидетельствует о непатогенности штамма.

**Благодарность.** Работа поддержана INTAS (грант 2000-471) и РФФИ (грант 02-04-49506). Авторы благодарят за поддержку *Региональный общественный фонд содействия отечественной медицине*.

**Литература**

1. Piffaretti J.C., Kressebuch H., Aeschenbacher M., et al. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogene*s causing epidemic disease. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:3818-22.
2. Quentin R., Huet H., Wang F.S., et al. Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotyping and serotyping: identification of multiple virulent clones that cause invasive neonatal disease. J Clin Microbiol 1995; 33:2576-81.
3. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех; 2002.
4. Wiedmann M., Bruce J.L., Keating C., et al. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogene*s lineages with differences in pathogenic potential. Infect Immun 1997; 65:2707-16.
5. Vines A., Reeves M.W., Hunter S., Swaminathan B. Restriction fragment length polymorphism in four virulence-associated genes of *Listeria monocytogene*s. Res Microbiol 1992;143:281-94.
6. Rasmussen O.F., Skouboe P., Dons L., et al. *Listeria monocytogene*s exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. Microbiology 1995;141:2053-61.
7. Glaser P., Frangeul L., Buchrieser C., et al. Comparative genomics of *Listeria* species. Science 2001;294:849-52.
8. Chakraborty T., Leimeister-Wachter M., Domann E., et al. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogene*s requires the product of the *prfA* gene. J Bacteriol 1992;174:568-74.
9. Ermolaeva S., Karpova T., Novella S., et al. A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogene*s based on induction of lecithinase activity by charcoal. Int J Food Microbiol 2003;82:87-94.
10. Ripio, M.T., Dominguez-Bernal G., Suarez M., et al. Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogene*s in response to a change in the extracellular medium composition. Res Microbiol 1996;147:371-84.
11. Тартаковский И.С., Карпова Т.И., Попова Т.А. и др. Оценка эффективности новых методов идентификации листерий при исследовании продуктов питания в Тульской области. Тез. докл. науч.-практ. конф., посвященной 55-летию сотрудничества ММА им. И.М. Сеченова и здравоохранения Тульской обл.; 2002. с. 300-1.
12. Карпова Т.И., Ермолаева С.А., Лопырев И.В. и др. Новые методы идентификации *Listeria monocytogene*s. Клин микробиол антимикроб химиотер 2001;3:266-73.
13. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина; 1972.
14. Mengaud J., Braun-Breton C., Cossart P. Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogene*s: a novel type of virulence factor? Mol Microbiol 1991;5:367-72.
15. Farber J.M., Peterkin P.I. *Listeria monocytogene*s, a food borne parasite. Microbiol Rev 1991;55:476-511.