

УДК 618.3-06+579.869.1.08

Молекулярно-генетические особенности и эпидемиологическая значимость штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных от беременных женщин и из абортного материала в дальневосточном регионе России

Е.А. Зайцева¹, Н.М. Пуховская², Ю.С. Мусатов², Л.И. Иванов²,
С.А. Ермолаева³, Г.П. Сомов¹

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток

² Хабаровская противочумная станция Роспотребнадзора, Хабаровск

³ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

В работе изучена коллекция штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из абортированных плодов (n=13) и от беременных женщин (n=4) в дальневосточном регионе России. Из 17 изученных штаммов 11 относились к сероварианту 4b, 5 – к сероварианту 1/2a и один изолят принадлежал к сероварианту 1/2b. Определение нуклеотидной последовательности фрагментов генов *inlA*, *inlB* и *prs* позволило разделить изоляты на две непересекающиеся группы, соответствующие описанным ранее филогенетическим линиям. Изоляты *L. monocytogenes*, относящиеся ко второй филогенетической линии, демонстрировали генетическую гомогенность по всем трем

изученным генам. Все штаммы первой филогенетической линии, выделенные из абортированных плодов, имели одинаковую аллель фрагмента, кодирующего так называемый LRR-домен, гена *inlA*, хотя различались по генам *inlB* и *prs*. Изоляты *L. monocytogenes* первой филогенетической линии, выделенные от беременных женщин без клинических проявлений листериоза, имели отличающиеся аллели *inlA*, кодирующие белок с аминокислотными заменами.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, листериоз, интернарины, ген *prs*, филогенетические особенности.

Контактный адрес:

Елена Александровна Зайцева
690087, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1
НИИЭМ СО РАМН
Тел./факс: (4232) 44-11-47
Эл. почта: zaytseva@mail.primorye.ru

Molecular Genetic Characteristics and Epidemiological Significance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Pregnant Women and Aborted Fetuses in the Far East Region of Russia

E.A. Zaitseva¹, N.M. Pukhovskaya², Yu.S. Musatov², L.I. Ivanov², S.A. Ermolaeva³, G.P. Somov¹

¹ Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Vladivostok, Russia

² Khabarovsk antiplague station, Khabarovsk, Russia

³ Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

L. monocytogenes strains isolated from aborted fetuses (n=13) and pregnant women (n=4) in the Far East region of Russia were studied. Of 17 tested strains, 11 were serovar 4b, 5 – serovar 1/2a and 1 – serovar 1/2b. Based on the sequence of *inlA*, *inlB* and *prs* genes all these isolates were divided into 2 non-overlapping groups that correspond to the known phylogenetic lines. *L. monocytogenes* isolates belonging to the second phylogenetic line were genetically homogenous on these 3 genes. All the

first phylogenetic line strains isolated from aborted fetuses had similar allele of the fragment encoding LRR domain of *inlA* gene; however they carried different *inlB* and *prs* genes. The first phylogenetic line *L. monocytogenes* isolated from the pregnant women with no symptoms of listeriosis carried different alleles of *inlA* gene that encode the protein with amino acid substitutes.

Key words: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, internalins, *prs* gene, phylogenetic properties.

Введение

Листерия – инфекционное заболевание человека, связанное с употреблением пищевых продуктов, контаминированных грамположительной бактерией *Listeria monocytogenes*. Листерия может проявляться в виде гастроэнтерита, септицемии, менингита, менингоэнцефалита, реже в виде уретрита, вагинита, пиелита и др. Установлено, что наибольшую опасность листерия представляет для лиц с низкими показателями Т-клеточного звена иммунитета. Это, прежде всего, люди, страдающие онкологическими заболеваниями; инфекцией, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ); лица, длительное время получавшие кортикостероидные препараты, и др. Особую группу риска при листериозе составляют беременные женщины, у которых инфицирование *L. monocytogenes* может приводить к самопроизвольным абортам и мертворождению, чаще на последнем триместре беременности [1, 2].

В настоящее время известно, что большая часть случаев заболеваний листериозом у людей связана лишь с тремя (4b, 1/2a, 1/2b) из 13 серовариантов *L. monocytogenes* [2, 3]. До 90% всех эпидемических вспышек листериоза в мире вызвано *L. monocytogenes*, серовариант 4b [1, 2, 4, 5]. Считается, что листерия этого сероварианта наиболее адаптирована к размножению в клетках млекопитающих [2]. Штаммы *L. monocytogenes* 4b серовара, вероятно, обладают и высокой вирулентностью, обуславливающей более выраженный инфекционный процесс.

В последнее время установлено, что внутри вида *L. monocytogenes* выделяются три филогенетические линии, отличающиеся по эпидемиологическому

потенциалу, каждая из которых объединяет штаммы, принадлежащие к определенным серовариантам [4, 6, 7]. Так, Wiedmann и соавт. [6] в первую филогенетическую линию относят *L. monocytogenes* серовариантов 1/2b, 3b, 4b и 4d, во вторую линию – серовариантов 1/2a, 1/2c, 3a и в третью – 4a и 4ab, подчеркивая, что в эпидемическом плане наиболее опасной является первая линия. Вместе с тем, при скрининге продуктов питания, проводимом как в нашей стране, так и за рубежом, отмечалось, что наиболее часто продукты контаминированы штаммы *L. monocytogenes*, относящиеся ко второй филогенетической линии, в то время как штаммы, относящиеся к первой линии, составляют менее 30% от общего числа изолированных штаммов листерий [4, 8]. Эти данные также указывают на более выраженные вирулентные свойства штаммов *L. monocytogenes*, относящихся к первой филогенетической линии.

В работах ряда зарубежных авторов показана характерная принадлежность определенных аллелей к той или иной филогенетической линии для генов, кодирующих факторы патогенности листерий, необходимые им в процессе внутриклеточного паразитирования (интерналина, листериолизин О, белок Р60 и др.) [7, 9]. В нашей стране до настоящего времени работ по характеристике внутривидовой вариативности факторов патогенности у *L. monocytogenes* и определению их связи с источниками выделения не проводилось.

Вместе с тем есть данные, что развитие определенных клинических проявлений листериоза обуславливается, в первую очередь, активностью некоторых факторов патогенности *L. monocytogenes*.

Так, на основании анализа эпидемиологических данных и экспериментов с культурами человеческих трофобластов (клеток внешнего слоя плаценты) было сделано предположение об особой роли в развитии внутриутробной инфекции интерналина А – поверхностного белка листерий, относящегося к семейству интерналинов [10]. Интерналин А взаимодействует с рецептором Е-кадгерином, расположенным на поверхности трофобластов, которые находятся в непосредственном контакте с материнской кровью. Это взаимодействие позволяет *L. monocytogenes* проникать в трофобласты и переходить через плацентарный барьер. Полноразмерная копия интерналина А необходима для взаимодействия с Е-кадгерином. Однако связано ли это взаимодействие с определенными вариантами интерналина А, в настоящее время неизвестно. Не изучена также роль и других факторов инвазии, в частности интерналина В.

Целью настоящей работы явилась оценка филогенетической принадлежности, эпидемиологической значимости и молекулярно-генетических особенностей, характеризующих факторы инвазии изолятов *L. monocytogenes*, выделенных из клинического материала на Дальнем Востоке России.

Материал и методы исследования

Штаммы и условия культивирования. В работе исследовали 17 культур *L. monocytogenes* (табл. 1), изолированных из абортного материала и от беременных женщин во Владивостоке (n=4) и Хабаровске (n=13) в 1993-2005 гг. [11–13]. В качестве питательной среды для роста и культивирования *L. monocytogenes* использовали питательный агар ГРМ № 1, на котором культивировали бактерии при 37 °С в течение 24 ч.

Серотипирование. Антигенные свойства культур определяли в линейной реакции агглютинации с помощью типовой поливалентной и моновалентных (I и II серотипов) листериозных сывороток, изготовленных во ВНИИВВиМ (Покров).

Выявление серогруппоспецифических маркеров с помощью ПЦР. Серогруппоспецифические маркерные гены выявляли с помощью мультиплекс-ПЦР метода, предложенного Doumith и соавт. [14]. Для проведения ПЦР использовали бактериальные лизаты, приготовленные из суточных культур листерий. Для этого 1–2 колонии *L. monocytogenes* вносили в 50 мкл 1х буфера для амплификации (Бионем), перемешивали на вортексе, добавляли по 2 мкл лизоцима (50 мг/мл, Serva) и термостатировали в течение 30 мин при 37 °С. Затем в пробы вносили по 2 мкл протеиназы К (10 мг/мл, Sigma) и инкубировали 1 час при 56 °С. Протеиназу К ина-

ктивировали кипячением проб в течение 10 мин, после чего образцы замораживали. В ПЦР брали 1 мкл лизата. В работе использовались олигонуклеотидные праймеры [14], перечисленные в табл. 1. Реакционная смесь содержала все пары праймеров в концентрации 1 мкМ, 0,3 мМ дНТФ, 1,5 мМ MgCl₂, 5 ед Tag-полимеразы (Бионем). ПЦР проводили по следующей программе: 1-й цикл – 94 °С, 3 мин; 35 циклов – 94 °С, 40 с, 53 °С, 1 мин 15 с, 72 °С, 1 мин 15 с; 1 цикл – 72 °С, 7 мин.

Подготовка образцов для секвенирования. Нуклеотидные последовательности генов, кодирующих белки – интерналины А и В (*inlA* и *inlB*), и гена *prs*, кодирующего консервативный для рода *Listeria* белок фосфорибозилпирофосфатсинтазу, были получены из базы данных ListiList (<http://www.pasteur.fr>), содержащей последовательность генома штамма EGDe. Этот штамм (серовариант 1/2a), а также штамм *L. monocytogenes* P14 (серовариант 4b) использованы в данной работе как положительные контроли. Праймеры, ограничивающие фрагменты генов *inlA* и *inlB*, кодирующих LRR-домены (Leucine Rich Repeat), были выбраны с помощью программы Oligo38. Положение праймеров относительно стартовой позиции ОРФ и размеры получаемых продуктов указаны в табл. 2.

Амплификацию осуществляли по следующим программам: 1) для пары праймеров *inlA*₁-*inlA*₂ – 1 цикл – 94 °С, 2 мин; 5 циклов – 94 °С, 5 с, 55 °С, 5 с, 72 °С, 5 с; 25 циклов – 94 °С, 1 с, 55 °С, 1 с, 72 °С, 1 с; 1 цикл – 72 °С, 5 мин; 2) для пары праймеров *inlB*₁-*inlB*₂ – 1 цикл – 94 °С, 2 мин; 5 циклов – 94 °С, 5 с, 60 °С, 5 с, 72 °С, 5 с; 25 циклов – 94 °С, 1 с, 60 °С, 1 с, 72 °С, 1 с; 1 цикл – 72 °С, 5 мин; 3) для пары праймеров *prs*₁-*prs*₂ – 1 цикл – 94 °С, 2 мин; 5 циклов – 94 °С, 5 с, 50 °С, 5 с, 72 °С, 5 с; 25 циклов – 94 °С, 1 с, 50 °С, 1 с, 72 °С, 1 с; 1 цикл – 72 °С, 5 мин. Концентрацию ампликонов проверяли путем электрофореза на агарозном геле в сравнении со стандартным маркером (1 kb DNA Ladder, Fermentas). Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью набора GFXtm PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham). Секвенирование фрагментов ДНК проводилось в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта в Центре «Геном» (Москва).

Анализ нуклеотидных последовательностей. Последовательности, полученные в результате секвенирования, были прочитаны с помощью программы Chromas v.1.45 (Conor McCarthy). Множественное выравнивание последовательностей было осуществлено с помощью программы ClustalW 1.83.XP [15]. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета про-

Таблица 1. Характеристика штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из клинического материала на Дальнем Востоке России

Штамм	Источник выделения	Год выделения	Серо-вариант*	Серо-вариант**	Фило-генетическая линия***	Специфические маркеры серогруппы****					<i>inlA</i> аллель	<i>inlB</i> аллель
						<i>Lmo</i> 0737	<i>Lmo</i> 1118	<i>ORF</i> 2819	<i>ORF</i> 2110	<i>prfA</i> аллель		
VIMNA004	Абортированный плод	2005	2	4b	1	-	-	+	+	1	1	1
VIMNA005	Абортированный плод	2005	2	4b	1	-	-	+	+	1	1	1
VIMNA006	Абортированный плод	2005	2	4b	1	-	-	+	+	1	1	1
VIMNA007	Абортированный плод	2005	2	4b	1	-	-	+	+	1	1	2
VIMNA008	Абортированный плод	2005	2	4b	1	-	-	+	+	1	1	1
VIMNA009	Абортированный плод	2005	2	4b	1	-	-	+	+	2	1	3
VIMNA010	Абортированный плод	2005	2	4b	1	-	-	+	+	2	1	4
VIMNA011	Абортированный плод	2005	2	4b	1	-	-	+	+	2	1	3
VIMNA015	Абортированный плод	2005	2	4b	1	-	-	+	+	2	1	3
VIMNA017	Абортированный плод	2005	2	4b	1	-	-	+	+	2	1	3
VIMNA034	Абортированный плод	2005	1	1/2a	2	+	-	-	-	3	4	6
VIMNA036	Абортированный плод	2005	1	1/2a	2	+	-	-	-	3	4	6
VIMNA038	Абортированный плод	2005	1	1/2a	2	+	-	-	-	3	4	6
VIMVN234	Беременная женщина	1993	2	4b	1	-	-	+	+	1	2	1
VIMVN071	Беременная женщина	2004	1	1/2b	1	-	-	+	+	2	3	5
VIMVN325	Беременная женщина	1993	1	1/2a	2	+	-	-	-	3	4	6
VIMVN333	Беременная женщина	1993	1	1/2a	2	+	-	-	-	3	4	6

Примечание: * – классификация, принятая в РФ;

** – международная классификация;

*** – обозначение филогенетической линии дается в соответствии с приведенным в работе [6];

**** – маркерные гены, набор которых специфичен для определенных серогрупп, описаны в [7].

Таблица 2. **Использованные праймеры**

Ген-мишень	Прямой праймер	Обратный праймер	Размер продукта, п.н.
<i>Lmo0737</i>	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691
<i>Lmo1118</i>	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	CGGCTTGTTCGGCATACTTA	906
<i>ORF2819</i>	AGCAAAAATGCCAAAACTCGT	CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471
<i>ORF2110</i>	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597
<i>prs</i>	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	AGAAGTGGGTGCGAACAACATG	618
<i>inlA</i>	TAACGGGACAAATGCTCAGGC	TGTTAAACTCGCCAATGTGCC	653
<i>inlB</i>	TTTTCAGATGATGCTTTTGC	ATAGCGGGTTAAGTTGACTGC	621

Таблица 3. **Характеристика нуклеотидного состава фрагментов генов *inlA*, *inlB* и *prs* у клинических изолятов *L. monocytogenes***

Ген	Длина фрагмента, п.н.	Число			π	Число замен	
		полиморфных сайтов	мутаций	аллелей		синонимических	несинонимических
<i>inlA</i> (n=17)	653	15	15	4	0,00817	10	5
<i>inlB</i> (n=17)	621	48	49	6	0,03442	32	17
<i>prs</i> (n=17)	618	21	21	3	0,01504	21	0

Примечание: π – мера нуклеотидной изменчивости изучаемой последовательности, определяемая как среднее число нуклеотидных замен на один сайт в попарном сравнении последовательностей на данной выборке изолятов [19].

грамм DnaSP version 4.10 [16]. Построение дендрограмм было осуществлено с помощью программы Mega version 3.1 [17]. Нуклеотидные последовательности были депонированы в GenBank (accession no. EF056129 – EF056137, EF056170 – EF056178).

Результаты исследования

Серотипирование коллекции *L. monocytogenes*. Отечественная серологическая классификация выделяет в виде *L. monocytogenes* две серогруппы, в то время как в мировой классификации их насчитывается 13 [2, 3]. Мы определили, что, согласно отечественной серологической классификации, большинство выделенных культур листерий относилось ко второй серогруппе, которая объединяет сероварианты 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e и 7.

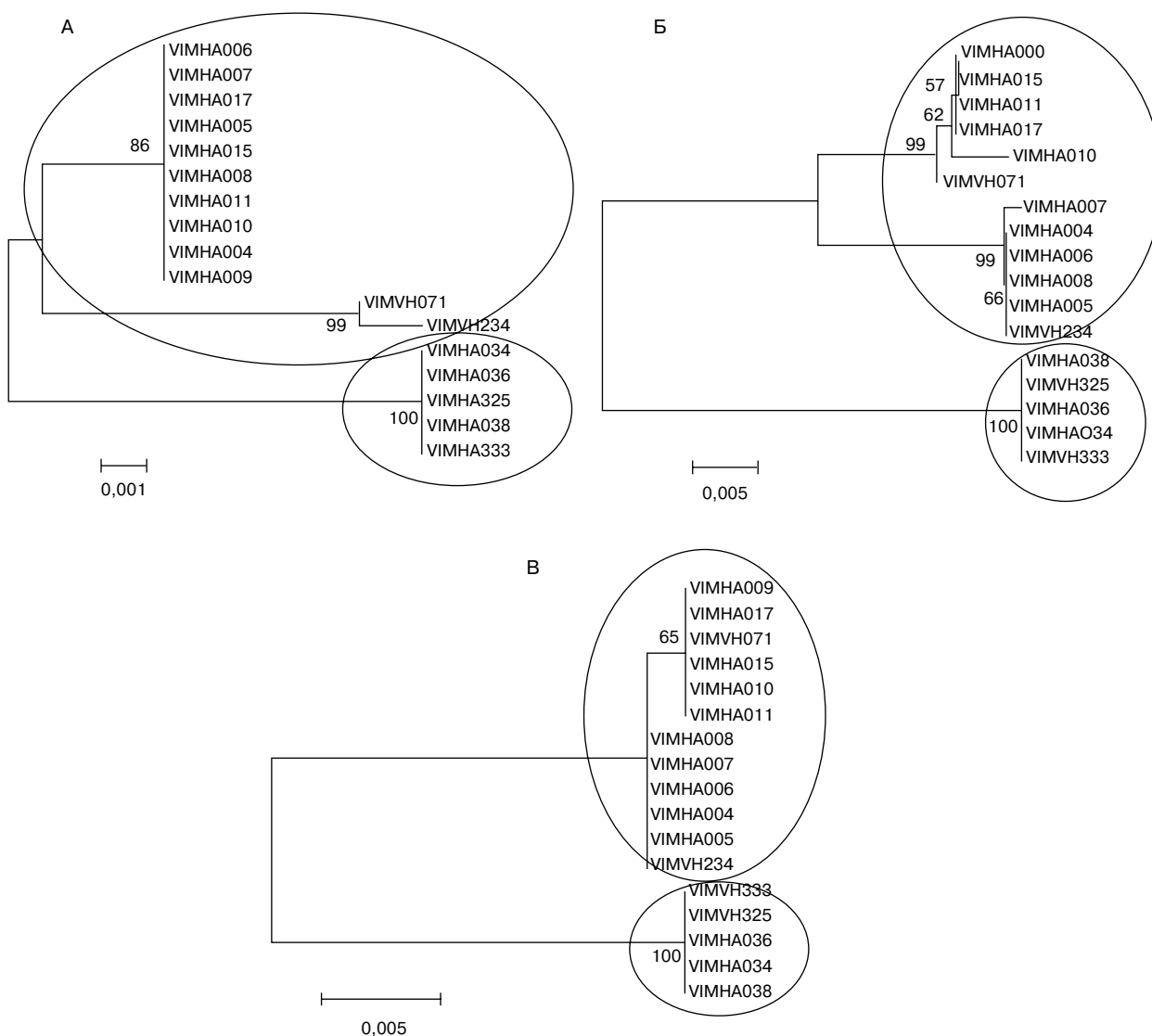
Для определения серологической принадлежности наших штаммов согласно мировой классификации мы использовали мультиплекс-ПЦР метод [14]. Этот метод основан на корреляции между серогрупповой принадлежностью изолята *L. monocytogenes* и наличием специфических открытых рамок считывания в его геноме. Полученные результаты свидетельствовали, что большинство штаммов *L. monocytogenes* (65%) относилось к сероварианту 4b, пять культур (29%) принадлежали к сероварианту 1/2a, одна культура – к сероварианту 1/2b (см. табл. 1).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *inlA*, *inlB* и *prs* у исследованных изолятов *L. monocytogenes*.

Для получения информации о специфичности последовательностей генов *inlA* и *inlB*, кодирующих факторы инвазии *L. monocytogenes*, мы осуществили частичное секвенирование этих генов, определив последовательность фрагментов, кодирующих LRR-домены. Было установлено, что именно LRR-домены определяют возможность взаимодействия интерналинов с рецепторами эукариотических клеток [18]. Следовательно, вариации в последовательности секвенированных фрагментов могут отражать специфичность взаимосвязи интерналинов с человеческими рецепторами.

Одновременно мы определили последовательность гена *prs*, кодирующего у бактерий рода *Listeria* белок общего метаболизма – фосфорибозилпирофосфатсинтазу в качестве контрольного маркера, вариации в котором не связаны с адаптивной вариативностью, характерной для генов, кодирующих факторы патогенности.

Для оценки нуклеотидного разнообразия генов использовали следующие параметры, суммированные в табл. 3: 1) число полиморфных сайтов, т.е. сайтов, в которых у одного или более штаммов имеются замены по сравнению с другими штаммами коллекции; 2) число мутаций, т.е. число замен,



Дендрограммы, построенные для фрагментов следующих генов: А – фрагмент гена *inlA*, кодирующий LRR-домен; Б – фрагмент гена *inlB*, кодирующий LRR-домен; В – фрагмент гена *prs*. Овалами выделены кластеры, образованные изолятами *L. monocytogenes*, относящиеся к одной филогенетической линии.

наблюдающихся в полиморфных сайтах; 3) число аллелей. Также мы использовали численную меру π [19], которая определяется как среднее число нуклеотидных замен на один сайт в попарном сравнении последовательностей и позволяет оценивать нуклеотидное разнообразие безотносительно к длине анализируемого фрагмента.

Анализ полученных последовательностей показывает, что у изученной группы клинических изолятов *L. monocytogenes* наибольшее нуклеотидное разнообразие демонстрировал ген *inlB* ($\pi=0,03442$, имея 49 замен, из них 32 – синонимических и 17 – несинонимических), а наименьшее – ген *inlA* ($\pi=0,00817$, который имеет 15 замен, в т.ч. 10 – синонимических, 5 – несинонимических), в то время как ген *prs* занимал промежуточное положение

($\pi=0,01504$, имея 21 замену, в том числе 21 синонимическую) (см. табл. 3).

Отсутствие несинонимических замен в последовательности гена *prs*, кодирующего белок общего метаболизма, подтверждает сделанное выше замечание об отсутствии адаптивной variability и отражает аминокислотную стабильность этого белка для изолятов *L. monocytogenes*, эволюционирующих в разных условиях. Наличие несинонимических замен у генов, кодирующих интернарины, свидетельствует о селективном отборе вариантов, более адаптированных для выживания в определенных условиях и, поскольку интернарины принадлежат к факторам патогенности, для паразитирования в определенных хозяевах.

Филогенетическое разделение среди клинических изолятов *L. monocytogenes*. С целью получения более глубокого представления о разнообразии изучаемых нуклеотидных последовательностей, для каждого гена были построены дендрограммы, отражающие степень идентичности аллелей (см. рисунок). Как можно заметить, исследованные клинические изоляты *L. monocytogenes* разделялись на две группы по каждому из генов. Группы, образованные изолятами *L. monocytogenes*, коррелировали с их серогрупповой принадлежностью, что соответствует описанному выше делению вида *L. monocytogenes* на клональные линии [4, 6, 7].

Было отмечено, что изоляты, относящиеся к первой филогенетической линии, образовывали два кластера на каждой из дендрограмм (см. рисунок). Одни и те же изоляты *L. monocytogenes* образуют кластеры на дендрограммах генов *inlB* и *prs*. В каждом из кластеров есть изоляты, как выделенные от беременных женщин без клинических проявлений, так и выделенные из абортных плодов. Напротив, на дендрограмме гена *inlA* один кластер включает только изоляты *L. monocytogenes*, выделенные из абортных плодов, причем все они относятся к одной аллели гена *inlA* (аллель 1, см. табл. 1). Второй кластер включает изоляты, полученные от беременных женщин (два изолята, каждому из которых соответствует своя аллель, аллели 2 и 3, см. табл. 1).

Таким образом, среди изолятов первой филогенетической линии наблюдается определенная корреляция между развитием внутриутробной инфекции и аллелью гена *inlA*, но не генов *inlB* и *prs*.

Для оценки вариабельности, вызванной независимым эволюционированием филогенетических линий, мы провели анализ нуклеотидного разнообразия изучаемых генов индивидуально для изолятов *L. monocytogenes* каждой линии (табл. 4). Из анализа параметров, приведенных в табл. 4, видно, что штаммы *L. monocytogenes*, относящиеся ко второй филогенетической линии ($n=5$), характеризуются генетической однородностью по всем трем исследованным генам.

Среди штаммов *L. monocytogenes* первой филогенетической линии ($n=12$) минимальную вариабельность демонстрирует ген *prs* ($\pi=0,00088$), две аллели которого различаются всего одной заменой, а максимальную вариабельность вновь демонстрирует *inlB* ($\pi=0,01505$). У пяти аллелей гена *inlB* отмечается 19 замен, из них 13 – синонимических и 6 – несинонимических.

Обсуждение результатов исследования

Установлено, что некоторые клональные линии *L. monocytogenes* обладают повышенным тропизмом по отношению к организму человека, и их выявление и идентификация имеют существенное эпидемиологическое значение [4, 6–8]. Поэтому в настоящее время существует необходимость исследования, с использованием современных молекулярно-генетических методов, штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из клинического материала, для оценки их эпидемиологической значимости и выявления генетических отличий между штаммами листерий, вызывающих разные формы инфекции.

Таблица 4. Характеристика нуклеотидного состава фрагментов генов *inlA*, *inlB* и *prs* у изолятов *L. monocytogenes*, принадлежащих к разным филогенетическим линиям

Филогенетическая линия	Ген	Число			π	Число замен		Несинонимические замены
		полиморфных сайтов	мутаций	аллелей		синонимических	несинонимических	
Первая линия ($n = 12$)	<i>inlA</i>	8	8	3	0,00350	6	2	Ser142Thr* Ser187Asn*
	<i>inlB</i>	19	19	5	0,01505	13	6	Glu71Phe** Ser72Asn** Ile88Val** Leu137Ile** Leu163Phe** Met250Thr**
	<i>prs</i>	1	1	2	0,00088	1	0	
Вторая линия ($n = 5$)	<i>inlA</i>	0	0	1	0	0	0	
	<i>inlB</i>	0	0	1	0	0	0	
	<i>prs</i>	0	0	1	0	0	0	

* – левая аминокислота соответствует первой аллели гена *inlA*, найденного у изолятов, выделенных из абортированных плодов;

** – левая аминокислота соответствует аллели гена *inlB*, найденного у изолята VIMHA009.

В работе мы изучили коллекцию изолятов *L. monocytogenes*, выделенных из клинического материала в дальневосточном регионе России. Наши исследования показали, что среди клинических изолятов *L. monocytogenes* преобладал серовариант 4b, который в эпидемиологическом плане считается наиболее опасным. Действительно, штаммы именно этого сероварианта вызвали наибольшее число случаев инфицирования плодов, приведших к выкидышам на 25–30-й неделе у беременных женщин в Хабаровске. Проведенный сравнительный анализ фрагментов генов *inlA*, *inlB* и *prs* дал некоторое представление о природе штаммов, связанных с развитием патологии беременности в данном географическом регионе.

На основании анализа нуклеотидных последовательностей трех генов изоляты листерий на дендрограммах распределились на две отличные друг от друга ветви, коррелирующие с их серогрупповой принадлежностью (см. рисунок). Наши результаты подтверждают данные других исследователей о наличии внутри вида *L. monocytogenes* не менее двух эволюционно сложившихся линий, которые могут существенно различаться между собой [4, 6, 7]. Среди нашей коллекции преобладали изоляты первой филогенетической линии ($n=12$), пять изолятов *L. monocytogenes* относились ко второй и не было изолятов третьей линии (см. табл. 1).

Для оценки вариабельности генов внутри филогенетических линий мы провели анализ нуклеотидного разнообразия изучаемых генов индивидуально для изолятов *L. monocytogenes* каждой линии (см. табл. 4).

Отмечено, что внутри каждой линии ген *prs*, кодирующий консервативный для рода *Listeria* белок фосфорибозилпирофосфатсинтазу, продемонстрировал минимальное нуклеотидное разнообразие, что является характерным для генов общего метаболизма. У изолятов, относящихся к второй филогенетической линии, последовательности фрагментов генов *inlA* и *inlB* также были консервативны. Отсутствие вариабельности среди изолятов второй филогенетической линии свидетельствует о ее генетической стабильности. Это позволяет предположить, что эпидемиологическая значимость штаммов *L. monocytogenes*, относящихся к второй линии, будет связана скорее с возможностью их накопления в продуктах питания до высоких концентраций, приводящих к возникновению sporadических случаев листериоза, чем с возможностью отбора особо вирулентных штаммов – потенциальных возбудителей эпидемических вспышек. Данное предположение согласуется с эпидемиологическими данными, которые свидетельствуют, что со

штаммами *L. monocytogenes*, относящимися к второй филогенетической линии, связаны преимущественно sporadические случаи заболевания листериозом, несмотря на то, что они наиболее часто контаминируют продукты питания, чем штаммы, относящиеся к первой линии [4, 6, 7, 9].

Все изоляты *L. monocytogenes*, относящиеся к первой филогенетической линии, выделенные из абортированных плодов, имели одинаковую аллель гена *inlA*, хотя различаются по *inlB* и гену *prs*. Изоляты первой линии, выделенные от беременных женщин без клинических проявлений листериоза, имели отличающиеся аллели *inlA*, кодирующие белок с аминокислотными заменами (см. табл. 4). Эти данные дают возможность предположить, что развитие внутриутробной инфекции у беременных женщин может быть связано с определенными аллелями гена *inlA*. В пользу этого предположения свидетельствуют также результаты анализа нуклеотидного разнообразия штаммов всей коллекции, которые выявили минимальную вариабельность *inlA* даже по сравнению с геном общего метаболизма *prs*. Наше предположение подтверждается также сравнением результатов, полученных в данной работе только для штаммов, ассоциированных с патологией у беременных, с данными, полученными в работе [20] на штаммах коллекции, включающей изоляты из разных источников. В нашей коллекции значение величины π , являющейся численной мерой нуклеотидного разнообразия, для гена *inlA* в два раза меньше, чем для гена *prs*, в то время как у штаммов коллекции M. Wiedmann с сотр. [20] наблюдается обратное соотношение. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о значимости гена *inlA* как маркера штаммов *L. monocytogenes*, представляющих повышенную эпидемиологическую опасность для беременных женщин в отношении развития листериоза у плода.

Предполагается особая роль продукта гена *inlA* – белка интерналина А в развитии патологии плода на основании экспериментального изучения инвазии листерий в трофобласты [10]. Полученные нами данные подтверждают важную роль интерналина А и указывают на то, что штаммы *L. monocytogenes*, несущие определенные аллели гена *inlA*, представляют угрозу развития патологии беременности.

Недавно было установлено, что непосредственный контакт интерналина А с узнаваемым им рецептором эпителиальных клеток Е-кадгерином осуществляется через так называемый LRR-домен [2, 20–22]. У другого белка листерий – интерналина В, играющего роль в инвазии гепатоцитов, имеется аналогичный домен, вовлеченный во взаимодей-

твие интерналина В с эукариотическим рецептором фактора роста гепатоцитов Met [18, 21, 22]. На основании этой роли LRR-доменов мы предполагали, что особенности в последовательности ДНК генов *inlA* и *inlB*, характерные для штаммов *L. monocytogenes*, изолированных из клинического материала, могут быть выявлены именно у фрагментов, кодирующих LRR-домены. Выявленные нами закономерности в последовательности фрагмента гена *inlA*, кодирующего LRR-домен, свидетельствуют об объективности выдвинутого нами предположения.

В целом, полученные данные подчеркивают необходимость особого внимания к инфицированию листериями лиц из групп риска, а также сви-

детельствуют о необходимости проведения бактериологического мониторинга за листериозной инфекцией у беременных женщин. Кроме того, полученные в работе результаты позволяют разработать методы направленного скрининга изолятов *L. monocytogenes* с целью определения их эпидемиологической значимости, позволяющего исключить инфицирование плодов высоковирулентными штаммами *L. monocytogenes*. В то же время они закладывают основу для проведения дальнейших исследований, направленных на установление молекулярных механизмов, позволяющих *L. monocytogenes* вызывать заболевания с чрезвычайно разнообразными клиническими проявлениями у пациентов, относящихся к различным группам риска.

Литература

1. Farber J.M., Peterkin P.I. *Listeria monocytogenes*, a food borne parasite. *Microbiol Rev* 1991; 55:476-511.
2. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех; 2002.
3. Seeliger H.P.R., Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiol* 1979; 13:31-49.
4. Piffaretti J.C., Kressebuch H., Aeschenbacher M., et al. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:3818-22.
5. Schuchat A., Swaminathan B., Broome C.V. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:169-83.
6. Wiedmann M., Bruce J.I., Keating C., et al. Ribotypes and virulence gene polymorphism suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect Immun* 1997; 65:2707-16.
7. Doumith M., Cazalet C., Simoes N., et al. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect Immun* 2004; 72:1072-83.
8. Карпова Т.И., Фирсова Т.Е., Родина Л.В. и др. Типирование *Listeria monocytogenes* на основе полиморфизма генов факторов патогенности. *Клин Микр Антимикр Химиотер* 2003; 5:251-258.
9. Rasmussen O.F., Skouboe P., Dons L., et al. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology* 1995; 141:2053-61.
10. Lecuit M., Nelson D.M., Smith S.D., et al. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: Role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:6152-7.
11. Быстрова А.Н., Беленева И.А. Листерии и листериоз. *Вестник ДВО РАН* 1995; 3:62-65.
12. Пуховская Н.М., Мусатов Ю.С., Иванов Л.И. и др. ПЦР-диагностика листериоза в перинатальной патологии. *Матер. Российской научно-практической кон-*
- ференции «Генодиагностика инфекционных болезней». «Сосновка». Новосибирская область, Россия, 2005; 146-148.
13. Зайцева Е.А., Сомов Г.П. Микробиологическая характеристика *Listeria monocytogenes*, изолированных из различных биотических и абиотических объектов в Приморском крае. *Журн микробиол* 2006; 2:3-6.
14. Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3819-22.
15. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acid Res* 1994; 22:4673-80.
16. Rozas J., Sanches-Del Barrio J.C., et al. DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 2003; 19:2496-7.
17. Kumar S., Tamura T., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004; 5:150-63.
18. Marino M., Braun L., Cossart P., et al. A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria* internalins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:8784-8.
19. Nei, M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:5269-73.
20. Nightingale K.K., Windham K., Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *J Bacteriol* 2005; 187:5537-51.
21. Dussurget O., Pizarro-Cerda J., Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol* 2004; 58:587-610.
22. Cossart P., Bierne H. The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 2001; 13:96-103.
23. Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:584-640.