

УДК 579.869.1:577.2.083

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ *LISTERIA MONOCYTOGENES* МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Е.А. Зайцева¹, С.А. Ермолаева²¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),² НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 18)**Ключевые слова:** листерии, серотипирование.

DIFFERENTIATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* STRAINS BY THE METHOD OF MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

E.A. Zaytseva¹, S.A. Yermolaeva²¹ Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation), ² Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named by N.F. Gamaleya of the Russian Academy of Medical Science (18 Gamalei St. Moscow 123098 Russian Federation)**Background.** Recently the great interest is given to studying of bacteria *Listeria monocytogenes* in connection with its increasing role in perinatal and neonatal pathology, ability to cause severe forms of diseases, massive contamination and accumulation in food.**Methods.** The strains of *L. monocytogenes* allocated in the Far East and in the European part of Russia are used. Antigen properties of cultures were defined in linear reaction of agglutination by typical polyvalent and monovalent (1st and 2nd serotypes) Russian listerious serum. Further serotyping was done by multiplex polymerase chain reaction (PCR).**Results.** The research done by the method of multiplex PCR have allowed to characterize the structure of populations of *L. monocytogenes*, than linear reaction of agglutination and to show the prevalence of epidemically important serotype 4b in the Far East. So, 39 from 52 cultures (75%) of *L. monocytogenes* allocated in the Far East were 4b serovariant, 10 cultures – were 1/2a serovariant, 2 cultures – 1/2b serovariant and 1 culture – 1/2c serovariant. Among the isolated in the European part of Russia 7 of 17 cultures (41.2%) were 1/2a serovariant, 5 cultures – 4b serovariant, 3 cultures – 1/2c serovariant and 2 cultures – 1/2b serovariant.**Conclusions.** By the use of the method of multiplex polymerase chain reaction the variety of the *Listeria* strains circulating in different geographical territories was shown, with the differentiation of epidemically significant and dangerous to the human clonal variants of the microorganism. This method can be used in practical and scientific works for differentiation and estimation of the variety of *Listeria* cultures.**Keywords:** *Listeria*, serotyping.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 3, p. 40–42.

В последнее время большое значение придается изучению листериоза, вызываемого грамположительными бактериями *Listeria monocytogenes*, в связи с их возрастающей ролью в перинатальной и неонатальной патологии, способностью вызывать тяжелые формы заболевания, массивной контаминацией и накоплением в пищевых продуктах [2, 4, 6, 7]. Известно, что бактерии вида *L. monocytogenes* имеют сложную антигенную структуру и делятся на 13 серологических вариантов [2, 8]. Большая часть случаев листериоза связана с серовариантами 4b, 1/2a, 1/2b, причем эпидемические вспышки чаще всего вызываются серовариантом 4b [2–6]. Считается, что листерии этого сероварианта наиболее адаптированы к размножению в клетках

млекопитающих, чем штаммы серовара 1/2 [2]. Не исключено, что серовар 4b обладает и уникальными вирулентными свойствами. Кроме того, установлено, что не только гены, кодирующие поверхностные детерминанты, но и некоторые другие фрагменты генома этого микроорганизма могут быть специфическими для различных серогрупп *L. monocytogenes* [3].

Целью настоящего исследования было определение серологической вариабельности изолятов *L. monocytogenes* для оценки их эпидемической значимости.

Материал и методы. В работе использованы штаммы *L. monocytogenes*, выделенные из клинического материала, животных и объектов окружающей среды (почва, вода, пищевые продукты) на Дальнем Востоке (112 изолятов) и в Европейской части (34 изолята) Российской Федерации. Антигенные свойства культур определялись в линейной реакции агглютинации с помощью типовой поливалентной и моновалентных (1-го и 2-го серотипов) листериозных сывороток, изготовленных во ВНИИВВиМ (г. Покров). Дальнейшее серотипирование проводили с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) на основе олигонуклеотидных праймеров (табл.) [3].

Для ПЦР использовали бактериальные лизаты, приготовленные как описано ранее [1]. Реакционная смесь содержала все пары праймеров в концентрации 1 мМ, 0,3 мМ дНТФ, 1,5 мМ MgCl₂, 5 ед. Таг-полимеразы («Бионем»). ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология») 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.

Аmplифицированные фрагменты ДНК разделяли в 1 % агарозном геле в трис-ацетатном буфере,

Таблица

Праймеры, использованные в работе

Ген-мишень	Праймеры		Размер продукта, пн
Lmo 0737	Прямой	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	691
	Обратный	ACGATTTCTGCTTGCCATTC	
Lmo 1118	Прямой	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	906
	Обратный	CGGCTTGTTTCGGCATACTTA	
ORF 2819	Прямой	AGCAAAATGCCAAACTCGT	471
	Обратный	CATCACTAAAGCCTCCCATTTG	
ORF 2110	Прямой	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	597
	Обратный	CATCCATCCCTTACTTTGGAC	

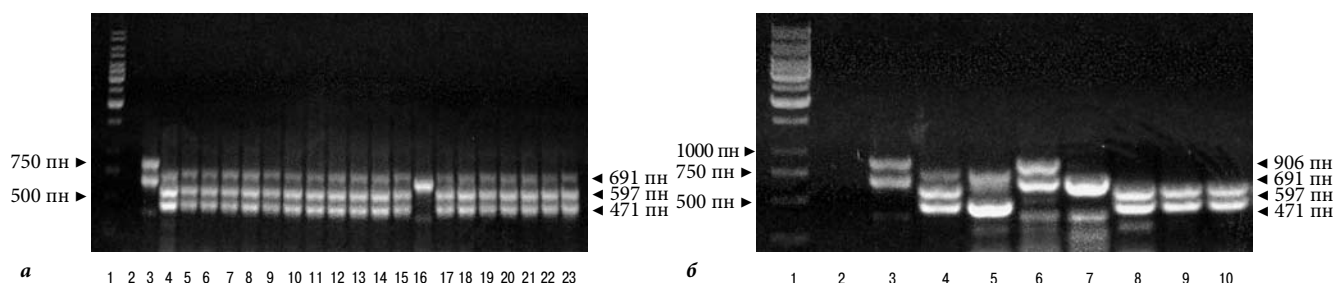


Рис. Серогрупповая принадлежность культур *L. monocytogenes*, полученных из клинического материала (а), органов грызунов и морских гидробионтов (б):

а: 1 – маркер 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 2 – отрицательный контроль; 3 – положительный контроль – штамм EGD-e (серовариант 1/2a); 4 – положительный контроль – штамм P14 (серовариант 4b); 5–13 – культуры, изолированные из органов грызунов (серовариант 4b); 14–23 – культуры, изолированные из морских гидробионтов на Дальнем Востоке (14, 15, 17–23 – серовариант 4b, 16 – серовариант 1/2a);

б: 1 – маркер 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 2 – отрицательный контроль; 3 – положительный контроль – штамм EGD-e (серовариант 1/2a); 4 – положительный контроль – штамм P14 (серовариант 4b); 5–10 – культуры, изолированные из пищевых продуктов (5 – серовариант 1/2b, 6 – серовариант 1/2c, 7 – серовариант 1/2a, 8–10 – серовариант 4b).

окрашивали бромистым этидием и просматривали в ультрафиолетовом свете, оценивая молекулярную массу полученных участков ДНК в сравнении со стандартным маркером (1 kb DNA Ladder производства «Бионем»).

Результаты исследования. Первоначально проведено серотипирование изолятов по классическому серологическому методу с применением диагностической системы, выпускаемой в Российской Федерации. Установлено, что культуры *L. monocytogenes* агглютинировались двумя сыворотками и относились к 1-й (49,6 %) и 2-й (50,4 %) серогруппам. Эти культуры были изолированы из разнообразных источников (клинического материала, органов животных, объектов окружающей среды, пищевых продуктов). Небольшая часть из них (15 культур), выделенных из органов грызунов, морских гидробионтов и пищевых продуктов, агглютинировались одновременно двумя сыворотками, что свидетельствовало о наличии у них общих антигенов.

46,8 % дальневосточных культур принадлежали ко 2-й серогруппе (изоляты из клинического материала, из органов грызунов и морских гидробионтов, объектов окружающей среды). Культуры, изолированные из пищевых продуктов, в большинстве случаев (72,2 %) относились к 1-й серогруппе.

Среди листерий, изолированных в европейской части Российской Федерации, преобладали культуры, принадлежащие к 1-й серогруппе (24,5 %), и реже всего (3,5 % изолятов) встречались культуры 2-й серогруппы. Культуры, изолированные в Европейской части страны и относившиеся к 1-й серогруппе, были выделены из различных пищевых продуктов импортного и отечественного производства, клинических образцов и органов животных.

Исследования, выполненные с помощью метода мультиплексной ПЦР, позволили более детально охарактеризовать структуру популяции *L. monocytogenes*, распространенной на разных территориях России, и, прежде всего, установить преобладание эпидемически значимого сероварианта 4b на Дальнем Востоке. Так, 39 из 52 культур (75 %) *L. monocytogenes*, выделенных на Дальнем Востоке, относились к сероварианту 4b, 10 культур – к сероварианту 1/2a, 2 культуры – к сероварианту 1/2b и 1 культура – к сероварианту 1/2c.

Среди изолированных в Европейской части России 7 из 17 культур (41,2 %) относились к сероварианту 1/2a, 5 культур – к сероварианту 4b, 3 культуры – к сероварианту 1/2c и 2 культуры – к сероварианту 1/2b.

При анализе серогрупповой принадлежности *L. monocytogenes*, изолированной в Дальневосточном регионе, в зависимости от источников выделения, отмечено, что чаще всего серовариант 4b встречался среди изолятов из клинического материала, органов грызунов и морских гидробионтов. Среди изолятов, полученных из пищевых продуктов, в большинстве случаев отмечались сероварианты 1/2a, 1/2b и 1/2c, реже – серовариант 4b (рис.). Похожие результаты получены и для изолятов *L. monocytogenes*, выделенных из пищевых продуктов в Европейской части страны.

Обсуждение полученных данных. С целью оценки вариативности и эпидемической значимости изолятов *L. monocytogenes*, выделенных из разнообразных источников в Дальневосточном регионе и в европейской части России, нами были использованы методы серо- и молекулярно-генетического типирования. Метод серотипирования широко применяется в настоящее время для характеристики штаммов *L. monocytogenes*. В России выпускают сыворотки двух типов – 1-го и 2-го («Покровветбиопрепарат», НИИВВиМ), – которые позволяют оценить антигенную принадлежность листерий к двум серогруппам, в то время как за рубежом идентифицируют до 13 серовариантов [2, 8]. Важно подчеркнуть, что особенностью отечественной серологической диагностики является то, что сероварианты с 1/2a по 3c, используемые в международной классификации, объединены в 1-ю, а остальные – во 2-ю серогруппу [2].

Анализ антигенной структуры *L. monocytogenes* с использованием отечественных сывороток двух типов показал относительно низкую специфичность данной системы дифференциации. Для определения серологической принадлежности культур, согласно мировой классификации, нами использован метод мультиплексной ПЦР, основанный на корреляции между серогрупповой принадлежностью изолята и наличием специфических открытых рамок считывания в его геноме [3].

Полученные результаты показали определенную вариабельность серовариантов среди культур *L. monocytogenes* в Дальневосточном регионе и в европейской части России. Следует отметить, что среди культур, изолированных на территории Дальнего Востока с 1997 по 2008 г., отмечалось превалирование сероварианта 4b, что в эпидемическом плане является неблагоприятным признаком. Чаще всего культуры листерий этого сероварианта на Дальнем Востоке выделяли из макроорганизмов (клинического материала от людей, органов грызунов, морских гидробионтов). Среди пищевых изолятов в большинстве случаев встречались сероварианты 1/2a, 1/2b, 1/2c, реже – серовариант 4b.

Таким образом, выполненные исследования с помощью метода мультиплексной ПЦР, показали разнообразие культур *L. monocytogenes*, циркулирующих на разных географических территориях России с дифференциацией эпидемически значимых и опасных для человека штаммов. Этот метод можно рекомендовать для использования в практической и научной работе для дифференциации и выявления разнообразия культур листерий.

Литература

1. Зайцева Е.А., Пуховская Н.М., Мусатов Ю.С. [и др.] Молекулярно-генетические особенности и эпидемиологическая значимость штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных от беременных женщин и из абортного материала в дальневосточном регионе России // Клини. микробиол., антимикроб. химиотер. 2007. Т. 9, № 1. С. 81–89.
2. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех, 2002. 200 с.

3. Doumith M., Buchrieser C., Glaser P. [et al.] Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR // J. Clin. Microbiol. 2004. Vol. 42. P. 3819–3822.
4. Farber J.M., Peterkin P.I. *Listeria monocytogenes*, a food borne parasite // Microbiol. Rev. 1991. Vol. 55, No. 3. P. 476–511.
5. Piffaretti J.C., Kressebuch H., Aeschbacher M. [et al.] Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. Vol. 86. P. 3818–3822.
6. Schuchat A., Swaminathan B., Broome C.V. Epidemiology of human listeriosis // Clin. Microbiol. Rev. 1991. Vol. 4, No. 2. P. 169–183.
7. Schlech W. F. Foodborne Listeriosis // Clin. Infect. Dis. 2000. Vol. 31. P. 770–775.
8. Seeliger H.P.R., Hohn K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species // Methods in microbiology / T. Bergan and J.R. Norris (ed.). London: Academic Press, 1979. Vol. 13. P. 31–49.

Поступила в редакцию 14.03.2011.

Дифференциация штаммов *Listeria monocytogenes* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции

Е.А. Зайцева¹, С.А. Ермолаева²

¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), ² НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 18)

Резюме. Проведена оценка серологической вариабельности и эпидемической значимости штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных на Дальнем Востоке и в европейской части России. С помощью метода мультиплексной полимеразной цепной реакции показано разнообразие штаммов листерий, циркулирующих на разных географических территориях, с дифференциацией эпидемически значимых и опасных для человека клональных вариантов микроорганизма. Этот метод может быть использован в практической и научной работе для дифференциации и оценки разнообразия культур листерий.

Ключевые слова: листерии, серотипирование.

УДК 616.314.17-008.1-084

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕДИКАМЕНТОЗНОГО ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ПРИ ПАРОДОНТИТЕ ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

В.Ф. Михальченко¹, А.Т. Яковлев², М.С. Патрушева¹

¹ Волгоградский государственный медицинский университет (400141, г.Волгоград, пл. Павших Борцов, 1),

² Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт (400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7)

Ключевые слова: стоматологические индексы, десневая жидкость, ферменты, затраты.

SUBSTANTIATION OF THE CHOICE OF THE MEDICAMENTOUS TREATING-AND-PROPHYLACTIC COMPLEX AT MILD PARODONTITIS

V.F. Mihalchenko¹, A.T. Yakovlev², M.S. Patrusheva¹

¹ Volgograd State Medical University (1 Bortsov square Volgograd 400141 Russian Federation), Volgograd Research Anti-plague Institute (7 Golubinskaya St. Volgograd 400131 Russian Federation)

Background. Now in the pharmaceutical market the considerable quantity of medicamentous complexes for treatment and preventive maintenance of parodontal diseases is presented. The research objective – comparison of the efficiency of treatment and cost at use of the stomatologic treatment-and-prophylactic complexes “Asepta”, “Vivax” and “Wood balm”.

Methods. 106 patients of 20–35 years old with mild chronic generalized parodontitis depending on the used treatment-and-pro-

phylactic complex have been divided into three groups. Treatment duration – 14 days. Control examinations were done in 7, 14, 60, 120 and 180 days after the treatment beginning. In all cases the index estimation of the parodont state and the estimation of the alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase and phosphor lipase A2 activity levels in the gingival liquid were done. Calculated the ratio of expenses and efficiency.

Results. In 7 days after the beginning of treatment at patients of all groups clinical improvement was shown. Level of hygiene of the oral cavity without authentic distinctions between groups has considerably raised and remained at good level till the end of the follow-up period. The most expressed positive dynamics and peak of treatment efficiency were noted at the patients using “Asepta”. Initial hyperactivity of enzymes was normalized during the follow-up period but was similar to control only at “Asepta” group. The maximum expenses for efficiency unit were 24.85 roubles at “Vivax” use. At “Asepta” and “Wood balm” series use this index was 4.70 and 4.10 roubles, respectively.