

Гены, кодирующие факторы инвазии у штаммов *Listeria monocytogenes*, изолированных в Европейской части и Дальневосточном регионе России

Е. А. Зайцева¹, С. А. Ермолаева², Г. П. Сомов¹

¹ – Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, г. Владивосток

² – Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф. Гамалеи РАМН, г. Москва

Автор для корреспонденции: Ермолаева Светлана Александровна, НИИЭМ им.Н.Ф.

Гамалеи РАМН, Москва, ул. Гамалеи 18, тел. (095)190-4375. Факс (095)193-6183

Email: sveta@ermolaeva.msk.su

Резюме

Гены, кодирующие факторы инвазии у штаммов *Listeria monocytogenes*, изолированных в Европейской части и Дальневосточном регионе России

Е. А. Зайцева¹, С. А. Ермолаева², Г. П. Сомов¹

Коллекция из 76 штаммов *L. monocytogenes*, выделенных от людей, животных и из пищевых продуктов, была проанализирована с помощью ПЦР на присутствие генов, кодирующих факторы инвазии, относящиеся к семейству интерналинов. Полученные результаты показывают, что штаммоспецифический полиморфизм спектра интерналинов коррелирует с источником выделения штамма.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, интерналины, ПЦР

Key words: *Listeria monocytogenes*, internalins, PCR

The collection of 76 *L. monocytogenes* strains isolated from humans, animals and food products was screened with PCR to reveal genes, which encode invasion factors of the internalin family. Obtained results demonstrated the correlation between the strain specific polymorphism of the revealed internalin genes and the source of the strain.

Грам-положительная бактерия *Listeria monocytogenes* широко распространена в природе и является частым контаминантом пищевых продуктов. У человека и животных *L. monocytogenes* может вызывать тяжелую инфекцию, получившую название листериоз, и проявляющуюся в виде менингитов, менингоэнцефалитов, септициемий, абортос и мертворождений. Однако, как среди людей, так и у домашних животных, неоднократно было описано бессимптомное листериозное носительство, что свидетельствует о возможности длительной персистенции листерий в организме [4, 13, 14].

В организм человека листерии попадают с контаминированной пищей, активно проникая в клетки кишечного эпителия. После пересечения эпителиального барьера кишечника листерии распространяются вглубь лежащие ткани и с током крови попадают во внутренние органы. Распространение листерий в организме обусловлено их способностью паразитировать внутри эукариотических клеток. Листерии способны проникать в различные типы клеток, в том числе, в клетки эпителия и эндотелия. Активная инвазия в непрофессиональные фагоциты происходит в результате взаимодействия продуцируемых листериями белков с поверхностными рецепторами эукариотических клеток, что приводит к индукции в клетке-хозяине каскада сигнальных событий, вызывающих перестройки связанного с мембраной актинового цитоскелета и формирование фагосомы [4, 7].

Основную роль в инвазии играют поверхностные и секретируемые белки листерий, которые относятся к семейству интерналинов [7, 8]. Белки, относящиеся к этому семейству, характеризуются наличием двух специфических доменов: LRR (leucine-rich-repeat) домена, гомологичного выявленному у ряда эукариотических белков, и домена В [6]. По крайней мере для двух интерналинов, InlA и InlB, были установлены специфические мишени на поверхности эукариотических клеток, взаимодействие с которыми позволяет бактерии индуцировать собственный фагоцитоз клеткой [7]. Ими являются, соответственно, E-кадгерин и рецептор фактора роста гепатоцитов Met. E-

кадгерин является трансмембранным гликопротеином, специфическим для эпителиальных клеток. Met присутствует на поверхности гепатоцитов и я других клеток. Таким образом, наличие или отсутствие того или иного поверхностного белка влияет на специфичность взаимодействия *L. monocytogenes* с определенным типом клеток, и, следовательно, может влиять на установление инфекции.

Помимо InlA и InlB семейство интерналинов включает ряд менее изученных белков. К ним относятся секретируемый белок InlC, а также поверхностные белки InlG, InlH, InlE, InlF [5, 10, 11]. InlC необходим для эффективной инвазии *L. monocytogenes* в человеческие эпителиальные клетки [11]. Роль других интерналинов в вирулентности *L. monocytogenes* до настоящего времени не установлена.

Не все штаммы *L. monocytogenes* содержат полный набор генов, кодирующих интерналины [9]. Наличие или отсутствие генов, кодирующих InlG и InlH, закреплено филогенетически [9]. Изменения в спектре других интерналинов является штаммоспецифическим. В настоящей работе нами было проведено изучение спектра генов, кодирующих интерналины, у штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из различных источников, с целью установления корреляции между наличием тех или иных интерналинов и способностью *L. monocytogenes* к длительной персистенции в организме.

Материалы и методы.

В работе были использованы ранее описанные штаммы *L. monocytogenes*, выделенные на территории Дальневосточного региона и Европейской части России из различных источников [1, 2, 12]. Всего было использовано 76 штаммов, из них: выделенных от больных - 4, бессимптомных носителей - 4, диких грызунов - 19 (выделены на территории Дальнего Востока), морских гидробионтов - 24 (выделены на территории Дальнего Востока), а также из продуктов питания – 27 (в том числе 11, выделенных на территории Дальневосточного региона, и 16, выделенных в Европейской

части России). *L. monocytogenes* культивировали на агаризованной среде ГРМ№1 (Оболенск) при 37°C.

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали бактериальные лизаты, приготовленные как описано в [3].

ПЦР осуществляли с праймерами, указанными в таблице 1. Нуклеотидные последовательности открытых рамок считывания (ОРФ), кодирующих интералины, были получены из базы данных ListiList (<http://www.pasteur.fr>), содержащей последовательность генома штамма EGDe, который был использован в данной работе как положительный контроль. Праймеры были выбраны в 5' и 3' областях открытых рамок считывания с помощью программы Oligo38. Положение праймеров относительно стартовой позиции ОРФ и размеры получаемых продуктов указаны в таблице 1. ПЦР осуществляли на амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Москва) по следующей программе: 1й цикл – 94°C, 2 мин; 5 циклов – 94°C, 20 сек, 55°C, 20 сек, 72°C, 20 сек; 25 циклов – 94°C, 5 сек, 55°C, 5 сек, 72°C, 5 сек. Продукты ПЦР разделяли на 1% агарозном геле в буфере ТАЕ и окрашивали бромистым этидием.

Результаты и обсуждение.

Штаммы *L. monocytogenes*, использованные в работе, можно разделить на несколько групп, в соответствии с источниками их выделения. Первую группу составляют штаммы, выделенные от больных людей с клиническими проявлениями листериоза. Ко второй группе мы отнесли штаммы, выделенные от здоровых носителей. Третью группу составляют штаммы листерий, изолированные из животных разного филогенетического происхождения: грызунов и морских гидробионтов. Эти три группы объединяют штаммы *L. monocytogenes*, выделенные из макроорганизмов. Бактерии этих штаммов должны быть полностью адаптированы для внутриклеточного размножения, однако наборы поверхностных и секретируемых белков, необходимых для инвазии, у них могут отличаться. Эти различия могут влиять на развитие инфекции, а также на специфичность

в отношении вида хозяина. К четвертой группе мы отнесли штаммы, выделенные из продуктов питания, которые могут относительно долго циркулировать в окружающей среде, не имея контактов с потенциальными хозяевами.

Описанная коллекция штаммов *L. monocytogene* была проанализирована с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на присутствие генов, кодирующих интерналин. Для того чтобы избежать ложно отрицательных результатов, связанных с возможной дивергенцией последовательностей в некодирующих участках ДНК, ограничивающих открытые рамки считывания (ОРФ), специфические для каждого гена праймеры были выбраны непосредственно внутри ОРФ (Табл. 1). На ДНК большинства исследованных штаммов *L. monocytogenes* в ПЦР был получен продукт предсказанного размера, что свидетельствует о консервативности генов, кодирующих интерналин. Однако, для ряда штаммов листерий продукт ПЦР не наблюдался, что свидетельствует либо об отсутствии изучаемого гена, либо о существенных изменениях в его последовательности.

Анализ исследованных штаммов *L. monocytogenes*, выявил особенности встречаемости генов, кодирующих отдельные интерналин (Табл. 2). Среди генов, присутствие которых характерно для представителей вида *L. monocytogenes*, независимо от филогенетической линии (гены *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlE*, *inlF*), только ген, кодирующий InlA, был выявлен у всех исследованных штаммов без исключения. Однако на ДНК двух штаммов, выделенных из пищевых продуктов, полученный в ПЦР фрагмент имел меньшую длину, чем у типового штамма, что свидетельствовало о наличии делеции в последовательности гена *inlA* у этих штаммов. Анализируя результаты, полученные при выявлении генов *inlB*, *inlC*, *inlE*, следует отметить, что все штаммы *L. monocytogenes*, выделенные из эукариотических организмов, включая человека, обладали этими генами (Табл. 2). Штаммы, у которых данные гены не выявлялись методом ПЦР, были обнаружены только среди изолятов из продуктов питания. Всего из продуктов питания

было изолировано два независимых друг от друга штамма, у одного из которых ген *inlC*, а у второго гены *inlB*, *inlE* отсутствовали или были изменены настолько, что при проведении ПЦР на ДНК этих штаммов не было получено продукта. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что продукты генов *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlE* необходимы *L. monocytogenes* при взаимодействии с эукариотическим организмом. В условиях же сапрофитического существования, которое ведут бактерии, размножающиеся на продуктах питания, наличие полноценных копий генов, кодирующих интернарины, не является необходимым условием. Это приводит к появлению штаммов, утративших консервативный аллель исследуемых генов.

Встречаемость гена *inlF*, который, согласно ранее опубликованным исследованиям [9] также является консервативным для вида *L. monocytogenes*, существенно отличалась от вышеописанных генов (Табл.2, 3). Все штаммы, выделенные от людей, как с клиническими проявлениями листериоза, так и носителей без признаков заболевания, обладали полноразмерной копией гена *inlF*. Однако на ДНК 28 % штаммов, извлеченных из животных, в ПЦР продукта получено не было. Среди выделенных от животных штаммов *L. monocytogenes*, дающих продукт в ПЦР с праймерами, специфичными для *inlF*, штаммы, выделенные от грызунов, давали продукт стандартного размера, а среди изолятов из морских гидробионтов большинство (18 из 21) давали продукт удлиненного или укороченного размера (Табл. 3). Среди штаммов, выделенных из продуктов питания, положительный результат в реакции ПЦР был получен на ДНК чуть более половины штаммов (55,5 %). Размер полученного в ПЦР продукта соответствовал стандартному размеру у всех штаммов, за исключением одного. Таким образом, проведенный скрининг показал широкую вариабельность в размере гена *inlF*. Отсутствие продукта ПЦР для ряда штаммов указывает либо на возможность утраты этого гена без влияния на внутриклеточное размножение в животных, либо высокую вариабельность его последовательности. Интересно отметить, что аллель гена *inlF*, дающий укороченный

продукт в ПЦР, преобладал среди штаммов, выделенных из морских гидробионтов. Данный аллель не встречался среди изолятов из других источников. Не исключено, что наблюдаемые вариации в размере и/или последовательности гена *inlF* отражают вклад продукта этого гена в тропизм бактерий к определенному хозяину. Проведенные *in vitro* исследования не выявили роли продукта этого гена в адгезии и инвазии к ряду клеточных линий человека и лабораторных мышей [10]. Однако это не исключает возможности вклада продукта гена *inlF* и других мало охарактеризованных интерналинов во взаимодействия с клетками других типов или представителями других классов многоклеточных организмов.

Присутствие генов *inlG* и *inlH* связано с принадлежностью изолята к определенной филогенетической линии [9]. Действительно, наличие или отсутствие продуктов ПЦР, специфичных для генов *inlG* и *inlH*, коррелировало для большинства штаммов (Табл. 2). У одного штамма *L. monocytogenes*, выделенного от больного и четырех штаммов, изолированных из продуктов питания, в ПЦР определялось присутствие гена *inlG*, в то время как продукт, специфичный для гена *inlH*, отсутствовал. Изучение роли продуктов генов *inlG* и *inlH* во внутриклеточной инфекции показало, что эти белки не только не являются необходимыми в процессе внутриклеточной инфекции, но напротив, частично подавляют адгезию и инвазию *L. monocytogenes in vitro* [5]. Интересно, что эти гены были выявлены у трех из четырех штаммов листерий, изолированных от здоровых носителей, в то время как среди штаммов, изолированных от больных людей с клиническими проявлениями листериоза, ген *inlG* был выявлен у одного из четырех штаммов, а ген *inlH* не был выявлен ни у одного штамма. Хотя имеющаяся статистика по клиническим изолятам явно недостаточна, чтобы делать определенные выводы, вместе с тем полученные данные свидетельствуют в пользу того, что развитие инфекции может быть связано скорее с отсутствием, чем с присутствием данных генов. Важно также отметить,

что гены *inlG* и *inlH* не выявлялись у подавляющего большинства штаммов *L. monocytogenes*, изолированных из животных.

Таким образом, проведенный в данной работе анализ присутствия генов, кодирующих факторы адгезии и инвазии – интерналины, позволил сделать нам ряд выводов, касающихся необходимости отдельных интерналинов в установлении и развитии листериозной инфекции. Во-первых, наши данные свидетельствуют в пользу того, что белки InlA, InlB, InlC, InlE являются необходимыми для персистенции *L. monocytogenes* внутри макроорганизмов, причем это, по-видимому, касается не только человека, но и филогенетически удаленных от него видов животных. Во-вторых, на основании анализа размера продукта ПЦР мы сделали вывод, что белок InlF проявляет вариабельность в размере и, возможно, последовательности, коррелирующую с источником выделения. Дальнейшие исследования планируются для определения вклада InlF в штаммоспецифический тропизм *L. monocytogenes* к определенным хозяевам. Наконец, наши данные свидетельствуют о том, что белки InlG и InlH не являются необходимыми для установления листериозной инфекции. Полученные в данной работе результаты позволяют разработать методы направленного скрининга изолятов *L. monocytogenes* с целью определения их эпидемиологической значимости, а также закладывают основу для проведения исследований, направленных на установление механизмов экологической пластичности *L. monocytogenes*, позволяющих этой бактерии паразитировать в исключительно широком круге эукариотических хозяев.

Благодарности.

Работа была поддержана грантом Президента РФ (МД-2518.2005.4).

Литература

1. Зайцева Е.А., Бузолева Л.С., Терехова В.Е. и др. Изоляция *Listeria monocytogenes* из различных объектов в Приморском крае и их биологические свойства. Эпидемиол. инф. болезни. 2002. (1): 47-49
2. Зайцева Е.А. Распространение бактерий рода *Listeria* на территории Приморского края. Ветер. патол. 2004. (3): 29-32
3. Карпова Т.И., Фирсова Т.Е., Родина Л.В. и др. Типирование *Listeria monocytogenes* на основе полиморфизма генов факторов патогенности. Клини. Микр. Антимикр. Хим. 2003. 5:251-258
4. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М. Медицина для всех, 2002.
5. Bergmann B., Reffelsbauer D., Kuhn M. et al. InlA- but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. Mol. Microbiol. 2002. 43: 557-575
6. Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L., and Cossart, P. Surface proteins and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. Trends Microbiol 2002. 10: 238-244
7. Cossart, P., Bierne, H. The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. Inf Immun 2001. 13:96-103
8. Cossart, P., Sansonetti, P.J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. Science 2004. 304:242-248
9. Doumith M., Cazalet C., Simoes N. et al. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. Inf. Immun. 2004. 72: 1072-1083
10. Dramsi S., Dehoux P., Lebrun M. et al. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. Inf. Immun. 1997. 65: 1615-1625

11. Engelbrecht F., Chun S.K., Ochs C. et al. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to a family of internalins. *Mol. Microbiol.* 1996. 21: 823-837
12. Ermolaeva S., Karpova T., Novella S. et al.. A simple method for the rapid identification of *Listeria monocytogenes* based on the induction of lecithinase activity by charcoal. *Int.J.Food Microbiol.* 2003. 82:87-94
13. Farber J.M., Peterkin P.I. *Listeria monocytogenes*, a food borne parasite. *Microbiol Rev* 1991; 55:476-511.
14. Vazquez-Boland J. A., Kuhn, M., Berche et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001 14:584-640

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Ген-мишень	Прямой праймер	Обратный праймер	Размер продукта	Положение ^a
<i>inlA</i>	5' GTATTTGGCAGCGGAGTATGG	5'GGTGCААТТААAGCGCCAGTC	1280 пн	52 - 1311
<i>inlB</i>	5' ААСТGGCGАТАGCGАТААТGC	5' ТАТССGCGТСССТGCTTCTAC	1213 пн	20-1212
<i>inlC</i>	5' ААСGАССААСGССТАТТААСС	5' TAGCCTCAGTCTCCCAACG	745 пн	110-834
<i>inlE</i>	5' СТСGGАААAGCGGATGТААС	5' TTGCGGAATAAAACTAAGCC	1308 пн	175-1462
<i>inlG</i>	5' TCACGGATCCAGCATTAGCG	5' TGCACCTCCGATGAAAAGCG	1296 пн	143-1418
<i>inlH</i>	5' GTTCGGGCAGAGAGCATCACG	5' GTTGGATCATCGGGATTCGGG	1379 пн	97-1455
<i>inlF</i>	5' АААТССААAGCCGGTGACACC	5' АТСGTTTCAGGCGCAATTAGC	1555 пн	35-1569

^a - указано положение 5'-конца прямого и 3'-конца обратного праймеров относительно первого нуклеотида ОРФ

Таблица 2. Встречаемость генов, кодирующих интерналины, у исследованных штаммов *L. monocytogenes* (показан процент штаммов, у которых методом ПЦР было выявлено наличие указанного гена)

Ген	Больные люди с клиническими проявлениями листериоза (n=4)	Здоровые носители (n=4)	Животные (n=43)	Продукты (n=27)
<i>inlA</i>	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>inlB</i>	100 %	100 %	100 %	96 %
<i>inlC</i>	100 %	100 %	100 %	96 %
<i>inlE</i>	100 %	100 %	100 %	96 %
<i>inlF</i>	100 %	100 %	72 %	55,5 %
<i>inlG</i>	25 %	75 %	2,3 %	55,5 %
<i>inlH</i>	0	75 %	2,3 %	30 %

Таблица 3. Вариабельность гена *inlF* у штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из различных источников.

Продукт ПЦР с праймерами <i>inlF1-inlF2</i>	Больные люди с клиническими проявлениями листериоза (n=4)	Здоровые носители (n=4)	Животные (n=43)		Продукты (n=27)
			грызуны (n=19)	морские гидробионты (n=24)	
нормальный	100 %	100 %	84 %	4 %	52 %
укороченный	0	0	0	71 %	0
удлинённый	0	0	0	4 %	3,7 %
отсутствует	0	0	16 %	21 %	44,3 %