

Виговська Л. М.

УДК 636.09: 577.213 / . 215-07 : 579.669.1

РОЗРОБЛЕННЯ ЗАСОБУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК БАКТЕРІЙ ВИДУ LISTERIA MONOCYTOGENES МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Л. М. ВИГОВСЬКА, кандидат ветеринарних наук,
 старший науковий співробітник

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: lmvygovska@gmail.com

Анотація. Основним методом виявлення *L. monocytogenes* є мікробіологічний, однак із-за особливостей біологічних властивостей збудника (різна активність продукування лістеріолізину О (ЛОО), поширення L-форм) за допомогою цього методу не завжди можна виявити або підтвердити належність збудника до виду *L. monocytogenes*. Співробітниками УЛЯБП АПК розроблюється засіб індикації *Listeria monocytogenes* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Метою даної роботи було визначення специфічності та чутливості праймерів для детекції *L.*

monocytogenes методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, в тому числі L-форм *L. monocytogenes* сферопластного та протопластного типів. Робота проводилася з використанням референтних штамів актуального виду найбільш актуальних серотипів 1/2А, 1/2В, 3А, 4В. В статті наведено результати визначення специфічності та чутливості праймерів по відношенню до *L. monocytogenes* вказаних серотипів, а також L-форм *Listeria monocytogenes*.

Ключові слова: *Listeria monocytogenes*, L-форми, біологічні властивості, полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі

Актуальність. Одним з пріоритетних завдань ветеринарної медицини є поліпшення якості продуктів харчування і сировини, захист країни від заносу збудників, розробка та виробництво засобів діагностики і профілактики інфекційних захворювань людини і тварин. Серед обов'язкових досліджень харчових продуктів тваринного походження, що регламентовані міжнародними вимогами, є детекція збудників

токсикоінфекцій, зокрема *Listeria monocytogenes*.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Лістеріоз (*Listeriosis*) - зооантропонозне інфекційне захворювання, що характеризується проявом різноманітних клінічних симптомів як у тварин, так і у людей та високою летальністю. Головну небезпеку в розповсюдженні лістеріозу являють хворі тварини, контаміновані корми та продукти харчування [1, 2]. Особливістю

Виговська Л. М.

лістеріозу являється тривале лістеріоносійство, носії збудника можуть відігравати певну роль у виникненні та збереженні стаціонарних вогнищ хвороби. В останні роки під впливом антропогенного тиску зазнають змін біологічні властивості збудників харчових токсикоінфекцій [3, 4]. Рід *Listeria* належить до родини *Listeriaceae*, класифікація якої базується на філогенетичному аналізі. До роду включені 16 видів, серед яких найбільш актуальним в етіології лістеріозу є *L. monocytogenes*, одним з специфічних факторів патогенності якої є термолабільний гемолізін лістеріолізін O – гемолізін, який обумовлює руйнування мембрани фаголізисом, його вважають основним фактором вірулентності лістерій. [5, 6]. Однак відомо, що при певних умовах активність продукування лістеріолізіну O знижується, що призводить до ускладнення диференціальної діагностики при бактеріологічних дослідженнях. Крім *L. monocytogenes* цей фактор патогенності є у *L. ivanovii* та *L. seeligeri*, що важливо враховувати при проведенні мікробіологічних досліджень та конструюванні видоспецифічних праймерів. Розрізняють 16 серологічних варіантів лістерій (в залежності від комбінації соматичних і джгутикових антигенів). Найбільш вивчена антигенна структура в *L. monocytogenes*, серологічні варіанти 4b, 1/2b, 1/2a

викликають 90% всіх лістеріозів людини, найбільш патогенним є 4b. На сьогодні одним із прогресивних альтернативних методів індикації збудників інфекційних захворювань є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), який дає можливість виявляти ДНК збудника у тих випадках, коли мікробіологічні методи не забезпечують його виявлення та ідентифікацію [7, 8].

Мета дослідження. Визначення специфічності, чутливості та відтворюваності засобу індикації *Listeria monocytogenes* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

Матеріали та методи дослідження. Біологічні властивості штамів *L. monocytogenes* вивчали відповідно до ДСТУ ISO 11290-1:2003 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахування *Listeria monocytogenes*. Частина 1. Використовували поживні середовища та реагенти виробництва компанії Himedia. Виготовлення та контроль якості поживних середовищ здійснювали відповідно до ДСТУ EN ISO 11133:2014 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Готування, вироблення, зберігання, випробування культуральних середовищ.

Для конструювання праймерів використовували ділянку гену *HlyA*, що кодує бактеріальний токсин лістеріолізін за даними

Виговська Л. М.

Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI). Нуклеотидну послідовність праймерів та флуоресцентних зондів для *L. monocytogenes* було підібрано із використанням програми Primer Express (Applied Biosystems). Перевірку специфічності засобу проводили з використанням референтних зразків та польових ізолятів *L. monocytogenes* сероваріантів 1/2A, 1/2B, 3A, 4B в S- та L- формах протопластного та сфероластного типів; в якості негативних контролів використовували референтні та польові зразки *Listeria*: *L. ivanovii*, *L. seligeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. welshimeri*, *L. innocua*; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Rhodococcus equi*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Erysipelothrix rhusiopathiae* 19, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*. З метою встановлення чутливості засобу шляхом серійних розведень від 1×10^7 до 1×10^1 КУО/см³ отримували послідовні десятикратні концентрації гомологічних зразків. Показником відтворюваності засобу було триразове повторення одержаних результатів зі співпаданням результатів в усіх пробах (n=3). Для екстракції нуклеїнової кислоти 1 см³ підшошеної бактеріальної культури центрифугували при 13,5 тис. об/хв. впродовж 2 хв. і видаляли супернатант. Бактеріальний осад

ресуспендували у 200 мкл ТЕ-буферу та інкубували у термостаті за температури 95°C впродовж 5 хв. Далі клітинний дебрис осаджували центрифугуванням при 5,0 тис. об/хв. впродовж 2 хв. і відбирали 180-190 мкл супернатанту, який використовували у ПЛР. Реакцію ампліфікації проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл, яка включала: ПЛР буфер, 2,5 мМ MgCl₂, 2,0 мМ кожного із дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 мкМ прямого і зворотнього праймерів, 0,25 мкМ флуоресцентного зонду (міченого барвником FAM) та по 0,25 од Taq-ДНК-полімерази. Ампліфікацію проводили із наступним температурним профілем: 94°C – 5 хв. – активація полімерази, та 45 циклів (95°C – 0,20 с. – денатурація ДНК, 56°C – 0,20 с. відпалювання праймерів, 72°C – 0,30 с. елонгація ланцюгів ДНК).

Основним критерієм оцінки отриманих результатів є визначення граничного циклу (Ct), що характеризує певний цикл полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, на якому відмічається статистично достовірне збільшення флуоресценції порівняно із фоновим рівнем.

Результати дослідження та їх обговорення. Для визначення специфічності праймерів до *L. monocytogenes* в якості гомологічних зразків було відібрано 9 штамів *L. monocytogenes*, виділених на території

Виговська Л. М.

України, Польщі та референтний штам *L. monocitogenes* ATCC 19112. Штами відносяться до 4 сероваріантів: сероваріанту 4b - *L. monocytogenes* 4b НК 2009(L 1/10, Україна), *L. monocytogenes* 4b (Р 2010Польща); *L. monocytogenes* 4В К(Україна); сероваріанту 1/2a - *L. monocytogenes* 1/2a НК 2009 (L 2/10, Україна); сероваріанту 1/2b - *L. monocytogenes* 1/2b Р 2010 (Польща), *L. monocytogenes* 3А К 2007 (Україна). Також визначали специфічність та чутливість праймерів по відношенню до L-форм сферопластного (*L. monocytogenes* УЛЯБП АПК 2/6/3А (сероваріант 3А, Україна), *L. monocytogenes* УЛЯБП АПК 2/6/4b (сероваріант 4b, Україна)) та протопластного (*L. monocytogenes* (УЛЯБП АПК 2/6/3А, сероваріант 3А, Україна)) типів. Культури в S-формі (*L. monocitogenes* ATCC 19112, 4b (Х/к 2/9), 4b (П 2/10), 1/2a (Х/к 2/9), 1/2b (П 2/10), 3А (Х/к 2/7)) мали типові для виду культурально-морфологічні, ферментативні ознаки, більшість штамів проявляли гемолітичні властивості. На 24 годину культивування за температури 37⁰С культури утворювали на середовищах *Palcam* та *Oxford* характерні колонії S-форми, розміром до 1,5 мм в діаметрі;

на 48 годину культивування колонії набували вигляду гудзика: по центру колоній утворювалося поглиблення у вигляді воронки. В біохімічному відношенні штамми були каталазопозитивні, ферментували глюкозу та рамнозу з утворенням кислоти без газу. На колумбійському агарі з овечою кров'ю в добових культур (крім штаму *L. monocytogenes* 3А (Х/к 2/7) проявлялась β-гемолітична активність. *L. monocytogenes* УЛЯБП АПК 2/6/3А (L-форма сферопластного типу) на середовищах *Palcam* та *Oxford* утворювала L-колонії типу В: в центральній зоні колонії вростають в агар та мають прозору фестончасту периферичну зону; в біохімічному відношенні – каталазопозитивна, ферментувала глюкозу та рамнозу з затримкою, на мінімальному рівні; β-гемолітичної активності не проявляла. L- - культури протопластного типу (*L. monocytogenes* УЛЯБП АПК 2/6/3А та *L. Monocytogenes* УЛЯБП АПК 2/6/4b) росли на поверхні агару, колонії мали дуже дрібні розміри, каталазопозитивні, із значною затримкою ферментували глюкозу на мінімальному рівні, не ферментували рамнозу та не проявляли β-гемолітичної активності (табл. 1).

Виговська Л. М.

1. Біологічні властивості штамів *L. Monocytogenes* (n=5)

№	Штами	Походження штамів	Форма колоній на середовищі Palcam	Каталаза	Глюкоза	раманоза	Гемолітичні властивості
1	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	ATCC	S-	+	+	+	+
2	<i>L. monocytogenes</i> 4b (X/к 2/9)	Україна	S-	+	+	+	+
3	<i>L. monocytogenes</i> 4b (П 2/10)	Польща	S-	+	+	+	+
4	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a (X/к 2/9)	Україна	S-	+	+	+	+
5	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b (П 2/10)	Польща	S-	+	+	+	+
6	<i>L. monocytogenes</i> 3A (X/к 2/7)	Україна	S-	+	+	+	-
7	<i>L. monocytogenes</i> (УЛЯБП АПК 2/6/3А)	Україна	L- (тип В)	+	±	±	-
8	<i>L. monocytogenes</i> (УЛЯБП АПК 2/6/3А)	Україна	L-(тип А)	+	±	-	-
9	<i>L. monocytogenes</i> (УЛЯБП АПК 2/6/4b)	Україна	L-(тип А)	+	±	-	-

Примітка: + -позитивний результат; ± - затримка реакції; - негативний результат

Результати визначення дослідними штамми лістерій інших специфічності та відтворюваності видів (*L. ivanovii* , *L. seeligeri* , *L. innocua*, *L. welchimeri*) та штамми засобу для індикації *Listeria monocytogenes* методом ПЛР в інших родів (*Bacillus subtilis*, реальному часі відображені в таблиці *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* 2. випробовувані праймери виявилися *Pasteurella multocida*, *Rodococcus equi*, специфічними по відношенню до всіх *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*) не відмічали. Були отримані дослідних штамів *Listeria* задовільні результати відтворюваності *monocytogenes* в S- та L-формах засобу: дослідження в трьох повторах (серологічні варіанти 1/2a, 1/2a, 4b, показали співпадіння результатів в 3A), використаних в якості усіх досліджених пробах (табл. 2). позитивних зразків. Перехресних реакцій з гетерологічними зразками -

Виговська Л. М.

2. Визначення специфічності та відтворюваності засобу для індикації

Listeria monocytogenes методом ПЛР в реальному часі (n=3).

Зашифрований номер	Зразки	Результат повтору		
		1	2	3
1	<i>L. ivanovii</i>	негативний	негативний	негативний
2	<i>L. seeligeri</i>	негативний	негативний	негативний
3	<i>L. innocua</i>	негативний	негативний	негативний
4	<i>L. welchimeri</i>	негативний	негативний	негативний
5	<i>L. monocytogenes</i> 4b (X/к 2/9)	23,95	23,88	23,92
6	<i>L. monocytogenes</i> 4b (П 2/10)	22,61	22,58	22,60
7	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	23,47	23,44	23,46
8	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a (X/к 2/9)	22,71	22,69	22,70
9	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b (П 2/10)	27,61	27,59	27,60
10	<i>L. monocytogenes</i> 3A (X/к 2/7)	16,05	16,04	16,05
11	<i>L. monocytogenes</i> (УЛЯБП 2/6/3А, протопластний тип)	16,22	16,20	16,21
12	<i>L. monocytogenes</i> (УЛЯБП АПК 2/6/4b, протопластний тип)	15,68	15,66	15,67
13	<i>L. monocytogenes</i> (УЛЯБП АПК2/6/3А, сферопластний тип)	16,26	16,25	16,26
14	<i>Bacillus subtilis-44p</i>	негативний	негативний	негативний
15	<i>Salmonella enteritidis</i>	негативний	негативний	негативний
16	<i>Pasteurella multocida</i>	негативний	негативний	негативний
17	<i>Rodococcus equi</i>	негативний	негативний	негативний
18	<i>Yersinia enterocolitica</i>	негативний	негативний	негативний
19	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (F 50)	негативний	негативний	негативний
20	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC № 25923	негативний	негативний	негативний

Чутливість розроблених протопластного типу; *L. monocytogenes* УЛЯБП 2/6/3А в *L*-формі визначали шляхом постановки серії серійних розведень культур: *L. monocytogenes* (АТСС 19112, 4b (X/к 2/9), 1/2a (X/к 2/9), 1/2b (П 2/10), 3А (X/к 2/7) в *S* –формі; *L. monocytogenes* (УЛЯБП 2/6/3А, УЛЯБП АПК 2/6/4b) в *L*- формі маюнку 1 відображено результати реакції ампліфікації серійних розведень *L. monocytogenes* УЛЯБП 2/6/3А (*L*- форми протопластного типу) від 1×10^7 до 1×10^1 КУО/см³.

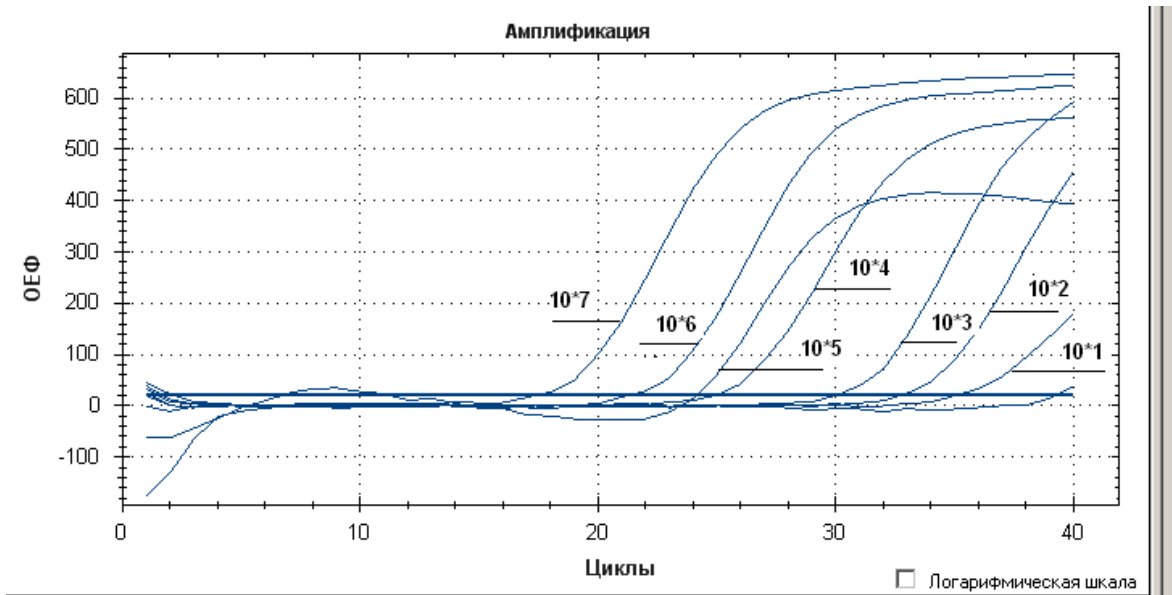


Рис. 1. Визначення чутливості засобу для індикації *Listeria monocytogenes* методом ПЛР в реальному часі для штаму *L. monocytogenes* УЛЯБП 2/6/3А.

Отримані результати показали збіжність у чутливості засобу (поріг чутливості засобу становив 1×10^1 КУО/см³) для всіх досліджених культур в S – та L- формах протопластного та сферопластного типів.

Висновки.

1. Розроблений засіб для виявлення ДНК бактерій *Listeria monocytogenes* методом ПЛР в реальному часі забезпечував виділення ДНК бактерій виду *Listeria monocytogenes* сероваріантів 1/2А, 1/2В, 3А, 4В.

2. Засіб забезпечував виявлення ДНК *L. monocytogenes* сероваріанту 3А L-формах протопластного та сферопластного типів та сероваріанту 4В в L- формі протопластного типу.

Список використаних джерел

1. Invasive Listeriosis in the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004-2009: Further

3. Перехресних реакцій з гетерологічними зразками інших видів не реєстрували.

4. Поріг чутливості засобу забезпечував детекцію ДНК досліджених культур *L. monocytogenes* у зразках з мінімальною концентрацією збудника 1×10^1 КУО/см³.

Подальші дослідження будуть спрямовані на валідацію засобу з використанням комерційних наборів.

Targeted Prevention Needed for Higher-Risk Groups / B. J. Silk [et al.] // Clinical Infectious Diseases. – 2012. – Vol. 54. – P. 396–404.

Виговська Л. М.

2. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products / A. Kasalika [et al.] // *Biotechnology in Animal Husbandry*. – 2011. – Vol. 27, № 3. – P. 1067–1082.

3. *Listeria rocourtiae* sp. nov. / A. Leclercq [et al.] // *Intern. J. of systematic and evolutionary microbiol.* – 2010. – Vol. 60. – P. 2210–2214.

4. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes / M. W. Schmid [et al.] // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2005. – Vol. 28. – P. 1–18.

5. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in foods as determined by quantitative PCR / K. Rantsiou [et al.] // *Intern. J. of Food Microbiology*. – 2008. – Vol. 121. – P. 99–105.

6. Churchill R. L. T. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food / R. L. T. Churchill [et al.] // *J. of Microbiological Methods*. – 2006. – Vol. 64. – P. 141–170.

7. Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes* / D. Liu [et al.] // *Intern. J. of Food Microbiology*. – 2004. – Vol. 91. – P. 297–304.

8. Zhou X. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* using oligonucleotide primers targeting actA gene / X. Zhou, X. Jiao // *Food Control*. – 2005. – Vol. 16. – P. 125–130

References

1. Invasive Listeriosis in the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004-2009: Further

Targeted Prevention Needed for Higher-Risk Groups / B. J. Silk [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 54. – P. 396–404.

2. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products / A. Kasalika [et al.] // *Biotechnology in Animal Husbandry*. – 2011. – Vol. 27, № 3. – P. 1067–1082.

3. *Listeria rocourtiae* sp. nov. / A. Leclercq [et al.] // *Intern. J. of systematic and evolutionary microbiol.* – 2010. – Vol. 60. – P. 2210–2214.

4. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes / M. W. Schmid [et al.] // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2005. – Vol. 28. – P. 1–18.

5. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in foods as determined by quantitative PCR / K. Rantsiou [et al.] // *Intern. J. of Food Microbiology*. – 2008. – Vol. 121. – P. 99–105.

6. Churchill R. L. T. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food / R. L. T. Churchill [et al.] // *J. of Microbiological Methods*. – 2006. – Vol. 64. – P. 141–170.

7. Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes* / D. Liu [et al.] // *Intern. J. of Food Microbiology*. – 2004. – Vol. 91. – P. 297–304.

8. Zhou X. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* using oligonucleotide primers targeting actA gene / X. Zhou, X. Jiao // *Food Control*. – 2005. – Vol. 16. – P. 125–130

**РАЗРАБОТКА СРЕДСТВА ДЛЯ
ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК БАКТЕРИЙ
ВИДА LISTERIA
MONOCYTOGENES МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ
ВРЕМЕНИ**

Л. Н. Выговская

Аннотация. Основным методом выявления *L. monocytogenes* является микробиологический, однако из-за особенностей биологических свойств возбудителя (разная активность выработки листериолизину О (ЛОО), распространение L-форм) с помощью этого метода не всегда можно выявить и подтвердить принадлежность возбудителя к виду *L. monocytogenes*. Сотрудниками УЛЯБП АПК разрабатывается средство индикации *Listeria monocytogenes* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Целью данной работы было определение специфичности и чувствительности праймеров для детекции *L. monocytogenes* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, в том числе L-форм *L. monocytogenes* сферопластного и протопластного типов. Работа проводилась с использованием референтных штаммов актуального вида наиболее актуальных серотипов 1 / 2А, 1 / 2В, 3А, 4В. В статье приведены результаты определения специфичности и чувствительности праймеров по отношению к *L. monocytogenes* указанных серотипов, а также L-форм *Listeria monocytogenes*.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, L-формы, биологические свойства,

полимеразная цепная реакция в реальном времени.

**DEVELOPMENT OF THE MEANS
FOR IDENTIFICATION OF DNA OF
LISTERIA MONOCYTOGENES
TYPES BY THE REAL-TIME
POLYMERIZATION CHAIN
REACTION**
L. Vygovska

Abstract. The main method for detecting *L. monocytogenes* is microbiological, but because of the peculiarities of the biological properties of the pathogen (different activity of producing listeriolysin O (LOO), the spread of L-forms), this method does not always allow to identify and confirm the identity of the pathogen to the species *L. monocytogenes*. The staff of ULANP AIC is developing a means for indicating *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction in real time. The purpose of this work was to determine the specificity and sensitivity of primers for the detection of *L. monocytogenes* by the polymerase chain reaction in real time, including L-forms of *L. monocytogenes* spheroplastic and protoplast types. The work was carried out using referential strains of the actual type of the most relevant serotypes 1 / 2A, 1 / 2B, 3A, 4B. The work was carried out using referential strains of the actual type of the most relevant serotypes 1 / 2A, 1 / 2B, 3A, 4B. The article presents the results of determining the specificity and sensitivity of primers in relation to *L. monocytogenes* of these serotypes, as well as L-forms of *Listeria monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*, L-forms, biological properties, polymerase chain reaction in real time