

DOI: 10.26693/jmbs06.02.115

УДК 616.981.136-036.2-07-08

Зюзін В. О., Тузова О. В., Френкель Ю. Д.,

Мунтян Л. Я., Зюзін Д. В.

### ГЕНОТИПУВАННЯ ЛІСТЕРІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ (ПЛР) ТА ЙОГО ЕПІДЕМІОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Чорноморський національний університет імені Петра Могили,  
Миколаїв, Україна

victor.zuzin.2018@gmail.com

У статті висвітлені питання генотипування лістерій за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та його епідеміологічне значення. Відомо, що молекулярно-генетичні методи дозволяють виявити специфічні мікробні патогени, маркери вірулентності, гени антимікробної стійкості швидше і з більшою чутливістю, ніж традиційні культуральні методи. В зв'язку з цим актуальною є розробка методів детекції і методів генотипування за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Для детекції і генотипування лістерії все більшого значення набуває технологія ДНК-чипів, яка дозволяє значно розширити можливості молекулярної детекції. Технологія чипів може бути використана, як для одночасної ідентифікації цілого спектра патогенних мікроорганізмів, так і для визначення генетичних маркерів вірулентності, відношення до антибіотиків, субтипуювання, а також для визначення якості мікроорганізмів у зразках. Спрощеним варіантом технології ДНК-чипів є мультиплексна (чисельна) полімеразна ланцюгова реакція, яка використовується для детекції і генотипування лістерій. Як показали проведені дослідження, для виявлення *Listeria spp.* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції доцільно використовувати ген *iap* (Invasive associated protein), відомий для 6 видів лістерій, який кодує протеїн Р 60, що є загальним для всіх видів лістерії, включаючи *L. murrayi*. Проведений комп'ютерний аналіз дозволив виділити ділянки з 100% рівнем гомології, з яких були відібрані праймери для полімеразної ланцюгової реакції – детекції всіх видів лістерії. Ділянки геномів, що характеризуються 100% гомології, були обрані для подальшого аналізу і позначення наборів праймерів. Послідовності сконструйованих праймерів List 1 і List 2 дозволили визначити 6 видів лістерій (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*). Збільшення довжини праймера веде до підвищення

специфічності полімеразної ланцюгової реакції. Чим більше довжина праймера, тим менша питома вага однієї помилки неспареного нуклеотиду. Ступінь гомології праймерів є ключовим параметром, що позначає «якість» набору праймерів.

Встановлено, що суттєвим недоліком переважної більшості діагностик з використанням полімеразної ланцюгової реакції – тест-систем є відсутність внутрішнього контролю ампліфікації. Негативний результат полімеразної ланцюгової реакції може бути наслідком відсутності в клінічному матеріалі фрагмента геному лістерій, а також тим, що в результаті полімеразної ланцюгової реакції продукт не був синтезований з інших причин, таких як: помилки оператора, помилково визначені концентрації реакційної суміші та параметрів температурних режимів полімеразної ланцюгової реакції.

Помилково негативні результати можуть бути викликані також факторами, які інгібують термостабільну ДНК-полімеразу. В свою чергу до такого інгібування ферменту, який відповідає за ампліфікацію, приводить підвищена кількість ДНК-матриць та попередня обробка клінічних зразків. Показано, що 80% клінічних зразків містять субстанцію, яка приводить до інгібування ДНК-полімерази. Тому необхідно використовувати внутрішній контроль, позитивний результат реакції якого вказує на успішне проведення ампліфікації, тобто на відсутність помилкового позитивного результату.

Існує декілька причин того, чому точність полімеразної ланцюгової реакції не досягає 100%. Точність залежить від технології (різновиду) полімеразної ланцюгової реакції – методу, який використовується (звичайна чи флюоресцентна методика), детекції ампліконів, полімеразна ланцюгова реакція однородна чи гніздова, гніздова в одній пробірці чи в двох пробірках, а також рівня якості обстеження (в першу чергу, від технічних параметрів

ампліфікатора). Використані тест-системи можуть застосовуватись для полімеразних ланцюгових реакцій – детекцій, і рекомендовані як стандартні набори праймерів для визначення і міжвидового тестування лістерій, що має велике значення для своєчасного проведення відповідних протиепідемічних заходів при лістеріозі.

**Ключові слова:** генотипування, лістерії, полімеразна ланцюгова реакція, епідеміологічне значення.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дана робота є фрагментом комплексної НДР «Вплив небезпечних екологічних факторів на морфо-функціональний стан вісцеральних систем організму», № держ. реєстрації 0118U0033395.

**Вступ.** Лістеріоз – інфекційне захворювання, яке є серйозною проблемою в патології людини. Лістеріоз характеризується різноманітною клінічною картиною, домінуючим ураженням осіб, які мають ослаблену резистентність організму. В першу чергу на лістеріоз хворіють вагітні, новонароджені, діти раннього віку, особи з імунodefіцитними станами, люди похилого віку.

Збудник лістеріозу – грампозитивні бактерії роду *Listeria monocytogenes*, широко розповсюджені в зовнішньому середовищі. Вони стійкі до впливу багатьох факторів навколишнього середовища, здатні тривалий час зберігатися в ґрунті, воді, та інших об'єктах. В останні роки спостерігається підвищення уваги до проблеми лістеріозу в зв'язку з тим, що ці мікроорганізми за сучасними даними здатні викликати захворювання у багатьох видів тварин і людей. У звіті Всесвітньої організації охорони здоров'я на XI міжнародному симпозиумі, що відбувся в Копенгагені в 1992 році, було затверджено положення, що лістеріоз, як харчова інфекція, має всесвітнє поширення, вимагає розробки системи індикації лістерій в продуктах харчування і адекватних профілактичних заходів. На даний час в Україні відсутні нормативні законодавчі акти про обов'язкову реєстрацію захворювань на лістеріоз, що не дозволяє об'єктивно оцінити його поширеність, епідеміологічні та клінічні особливості, рівень соціального й економічного збитків, що завдаються лістеріозною інфекцією. В нашій країні не проводиться плановий бактеріологічний контроль харчових продуктів і сировини, тому невідомий рівень контамінації їх лістеріями, потребують вдосконалення методів лабораторних досліджень, недостатньо вивчена циркуляція лістерій у зовнішньому середовищі. Вирішення ряду актуальних проблем, пов'язаних із даною інфекцією, можливе лише на базі подальшого вивчення шляхів поширення, патогенного потенціалу збудника, епідемі-

ологічної та мікробіологічної характеристики лістеріозу.

Правильна діагностика лістеріозу будується на обліку епідеміологічних даних, клінічної картини і лабораторних досліджень, яким приділяється провідне значення. З лабораторних методів дослідження для діагностики лістеріозу головним є методи виявлення лістерій у клінічному матеріалі від хворих [1, 2, 3]. Серед серологічних методів діагностики лістеріозу знайшло застосування реакції аглютинації (РА), реакція зв'язування комплекменту (РЗК), реакція непрямой гемаглютинації (РНГА), імуоферментний аналіз (ІФА) і т.п. [1, 2]. З'явився ряд принципово нових методів діагностики лістеріозної інфекції – використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), гібридизації ДНК (чи РНК), електромагнітне виділення лістерій [4, 5].

До відкриття ПЛР існуючі системи внутрішньовидового серотипування і серосубтипування лістерій значною мірою залежали від наявності і якості моноклональних антитіл. Типування з цими реагентами вимагало багаторазових аналізів, але вони не перекривали діапазон антигенної варіабельності лістерій. Тим часом усе частіше з'являються публікації, присвячені детекції лістерій за допомогою полімеразної ланцюгової реакції [5, 6, 7].

**Метою даної роботи** було вивчення генотипування лістерій за допомогою ПЛР та його епідеміологічного значення.

**Матеріал та методи дослідження.** Проби на лістерії з об'єктів зовнішнього середовища забиралися з води відкритих водойм, стічних вод тваринних приміщень, м'ясокомбінатів, міських комунальних стоків, ґрунту, питної води з водогінної мережі, житлових будинків, питної води із шахтних колодязів. Забір матеріалу, його доставка і дослідження проводилися відповідно до діючих інструкцій. Об'єм проб води з відкритих водойм, шахтних колодязів і водогінної мережі і стічних вод складав 0,5 л. Проби ґрунту в кількості 1 кг відбиралися на ділянках колективних і державних господарств, а також земельних ділянках, що виділялися для особистого користування міського населення. Відбір, транспортування і зберігання проб харчових продуктів, харчової сировини і змивів проводилися згідно «Методичних вказівок по санітарно-бактеріологічному контролю на підприємствах громадського харчування і торгівлі харчовими продуктами» [8].

Дослідження клінічного лістеріозу від хворих, які знаходилися на лікуванні на базі терапевтичного відділення Безвідкладної медичної допомоги (м. Миколаїв), із різноманітною клінічною картиною захворювання і діагнозом (гострі кишкові інфекції, ангіна, інфекційний мононуклеоз, сепсис) проводилися у тих, що мали симптоматику захворювання,

підозрілу на лістеріоз. У даних хворих у залежності від діагнозу був взятий матеріал (випорожнення, відокремлюване зіва, кров) для дослідження на наявність лістерій.

Забір, транспортування і збереження клінічного матеріалу робили згідно методичних рекомендацій «Про уніфікацію мікробіологічних (бактеріологічних) методів дослідження, застосованих у клініко-діагностичних лабораторіях лікувально-профілактичних установ» [9].

Морфологічні дослідження патогістологічних змін в органах піддослідних тварин проводили згідно «Методичних рекомендацій з лабораторної діагностики лістеріозу у тварин і людей» [10].

**Методи та типування лістерій.** Методика первинного посіву і схема лабораторного дослідження для виявлення збудника лістеріозу з об'єктів навколишнього середовища і клінічного матеріалу виконувалася відповідно до методичних рекомендацій «Про порядок проведення лабораторних досліджень на лістеріоз в установах санітарно-епідеміологічної служби при харчових токсикоінфекціях» [11].

Морфологічні, культурні та біохімічні властивості з використанням набору живильних середовищ, тестів і умов культивування мікроорганізмів проводили згідно «Методичних рекомендацій з лабораторної діагностики лістеріоза тварин і людей» [10] і методичних рекомендацій «Isolation and identification of *Listeria monocytogenes*» [12].

Диференціацію видів лістерій проводили відповідно до характеристик, які використовуються для їхньої ідентифікації [11]. Ідентифікацію виділених культур лістерій проводили за допомогою полівалентних і моноспецифічних сироваток I III серогрупи і лістеріозних бактеріофагів відповідно до настанов організації-виробника [11]. Використання в роботі для детекції і генотипування лістерій полімеразної ланцюгової реакції було засновано на тім, що всі знову секвеновані послідовності нуклеїнових кислот і білків заносяться в міжнародні бази даних, до яких відноситься EMB (European Molecular Biology Laboratory Data Library, 1997, Німеччина), Gen Bank USA), DDBJ (DNA Data Bank of Japan, Японія), SWISS PROT – банк білкових послідовностей, Brookhaven Bank – банк третинних структур білків і нуклеїнових кислот і ін. У базах даних EMB, Gen Bank і DDBJ представлено сім видів лістерій: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. gravi*, *L. murrayi*.

Для аналізу геному лістерій використовували пакет прикладних програм Gene Bee. Цей пакет спрямований на рішення теоретичних задач молекулярної біології. Основна мета аналізу, що забезпечується пакетом, складається в одержанні інформації про еволюційну і функціональну осо-

бливість біополімерів на підставі порівняння їхньої первинної структури з банком відомих послідовностей. Пакет Gene Bee з'єднує в собі сучасні алгоритми з привабливим інтерфейсом послідовника і має модульну структуру. Множинне вирівнювання і статистичний аналіз множинного вирівнювання виконується за допомогою модулів. Для добору праймерів з обліком їхніх термодинамічних характеристик була використана програма Oligo.

**Результати дослідження.** Молекулярно-генетичні методи дозволяють виявити специфічні мікробні патогени, маркери вірулентності, гени антимікробної стійкості швидше і з більшою чутливістю, ніж традиційні культуральні методи [13, 14, 15].

В зв'язку з цим актуальною є розробка методів детекції і методів генотипування за допомогою ПЛР.

Використання ПЛР аналізу для детекції патогенної для людини *L. monocytogenes* в продуктах харчування, розробленими раніше методами виявилось малоефективним, оскільки *L. monocytogenes* ростуть і при температурі рефрижератора. Навіть низька початкова кількість бактерій може досягти високого рівня перед споживанням продукту. Тому для детекції і генотипування лістерій все більшого значення набуває технологія ДНК-чипів, яка дозволяє значно розширити можливості молекулярної детекції. Технологія чипів може бути використана для одночасної ідентифікації цілого спектра патогенних мікроорганізмів, для визначення генетичних маркерів вірулентності, відношення до антибіотиків, субтипівання, а також для визначення якості мікроорганізмів у зразках. Спрощеним варіантом технології ДНК-чипів є мультиплексна (чисельна) ПЛР, яка нами була використана в даному дослідженні для детекції і генотипування лістерій. Як показали проведені дослідження, для виявлення *Listeria spp.* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції доцільно використовувати ген *iap* (Invasive associated protein), відомий для 6 видів лістерій, який кодує протеїн p 60, що є загальним для всіх видів лістерії, включаючи *L. murrayi* [14, 15].

Проведений комп'ютерний аналіз дозволив виділити ділянки з 100% рівнем гомології, з яких були відібрані праймери для ПЛР-детекції всіх видів лістерій.

Ділянки геномів, що характеризуються 100% гомології, були обрані для подальшого аналізу і позначення наборів праймерів. Послідовності сконструйованих праймерів List 1 і List 2 дозволили визначити 6 видів лістерій (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*).

При створенні наборів праймерів було враховано кілька обставин. По перше, збільшення

довжини праймера веде до підвищення специфічності ПЛР-аналізу. По друге, чим більша довжина праймера, тим менша питома вага 1 помилки неспареного нуклеотиду. Сконструйовані Інститутом мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України (м. Харків) праймери мали довжину 20–25 нуклеотидів. Обчислені за допомогою програми Оліго температура плавлення праймерів для детекції, а також для генотипування лістерій, приведена в **таблиці 1**. Ступінь гомології праймерів є ключовим параметром, що позначає «якість» набору праймерів, праймери List 1 і List 2 характеризуються 96% і 100% рівнем гомології відповідно.

**Таблиця 1** – Температура плавлення праймерів для детекції і генотипування лістерій

Праймер	Довжина (пара основ)	Число помилок			
		0	1	2	3
List 1	25	51,2	46,4	44,6	36,8
List 2	20	55,7	49,7	43,7	37,7
List 3	25	52,7	47,9	43,1	38,3
List 4	21	57,8	52,0	46,3	40,6
List 5	24	50,2	45,2	40,2	35,2
List 6	25	48,8	44,0	39,2	34,4
List 7	21	52,0	46,3	40,6	34,9
List 11	20	50,5	44,5	38,5	32,5
List 12	24	50,5	45,5	40,5	35,5
List 13	20	51,0	45,0	39,0	33,0
List 14	24	47,2	42,2	37,2	32,2

Аналіз результатів, приведених в **таблиці 2**, показує, що наявність одного неспареного нуклеотиду в комплексі праймер-однотичастий продукт ПЛР веде до зниження температури плавлення приблизно на 5 °С, двох неспарених нуклеотидів – приблизно на 10 °С і т.д. З експериментальних досліджень плавлення нуклеїнових кислот відомо, що ширина діапазону температури плавлення коротких олігонуклеотидів довжиною двадцять – сорок нуклеотидів (якими є переважно більшість праймерів для ПЛР-детекції) складає 10 °С.

**Таблиця 2** – Розмір амплікону при детекції лістерій за допомогою ПЛР з праймерами List 1- List 2

Бактерія	Набір праймерів	
	List 1- List 2	
	Результат аналізу	Розмір ПЛР-продукта
<i>L. monocytogenes</i>	+	1437
<i>L. ivanovii</i>	+	1575
<i>L. seeligeri</i>	+	1572
<i>L. grayi</i>	+	1539
<i>L. innocua</i>	+	1446
<i>L. welshimeri</i>	+	1575

**Примітка:** «+» – позитивний результат ПЛР аналізу – наявність бактерій *Listeria spp.*

Це означає, що праймер буде відпалюватись на однотичастому ампліконі і продукт реакції буде синтезуватися за умови правильного вибору температури при наявності не більше двох неспарених нуклеотидів у комплексі праймер-однотичастий амплікон.

Суттєвим недоліком переважної більшості діагностиків з використанням ПЛР-тест-систем є відсутність внутрішнього контролю ампліфікації. Негативний результат ПЛР-аналізу може бути наслідком не відсутності в клінічному матеріалі фрагмента геному лістерій, а тим, що ПЛР-продукт не був синтезований з інших причин. Помилки оператора, помилково визначені концентрації компонентів реакційної суміші та параметрів температурних режимів ПЛР можуть бути такими причинами. Помилково негативні результати можуть бути викликані також факторами, які інгібують термостабільну ДНК-полімеразу. В свою чергу до такого інгібування ферменту, який відповідає за ампліфікацію, приводить дуже велика кількість ДНК-матриці, попередня обробка клінічних зразків. Показано, що 80% клінічних зразків споконвічно містять субстанції, котрі приводять до інгібування ДНК-полімерази. Тому необхідно використовувати внутрішній контроль, позитивний результат реакції якого вказує на успішне проведення ампліфікації, тобто на відсутність помилково негативного результату. Матрицею для внутрішнього контролю може бути інший фрагмент чи локус ДНК, що містить сайти для зв'язування праймерів, але знаходяться вони один від одного на відстані, яка відрізняється на 100-200 п.н. від фрагмента, що ампліфікується. Амплікон, що утвориться на такій матриці, буде меншим за розміром, ніж головний амплікон [15].

Частіше для внутрішнього контролю використовують інший, незалежний набір праймерів. Оскільки усі види лістерій мають ідентичний ген *iar*, розроблений набір праймерів List 1 – List 2 можна з успіхом використовувати як внутрішній контроль ампліфікації. При цьому синтезований амплікон розміром 1,5 kb можна легко відрізнити від менших по розмірах ампліконів після ПЛР-детекції патогенних лістерій і генотипування 6 видів лістерій. Температури плавлення праймерів List 1 – List 2, а отже і їхні температури відпалювання підібрані приблизно рівними температурі плавлення праймерів List 3 – List 4, що дозволяє проводити ампліфікацію різних локусів геному лістерій при однакових температурних параметрах реакції.

Наявність високо консервативних фрагментів дозволило сконструювати набір праймерів List 3 – List 4 для детекції *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* та *L. ivanovii*. Ізолят *L. innocua* не виявив високо консервативних фрагментів з вищенаведеними видами лістерій. Набори праймерів List 1 – List 2

і List 3 – List 4 створені таким чином, температури плавлення збігаються з точністю  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  (табл. 1). Це дозволяє, при умові коректного вибору температури відпалювання, проводити мультиплексну ПЛР з одночасним виявленням 6-ти видів лістерій та диференційовану детекцію патогенних лістерій (*L. monocytogenes*) та лістерій, які містять ген цитолізіну (*L. seeligeri*, *L. ivanovii*). Розміри продуктів ПЛР-детекції патогенних лістерій з праймерами List 3 – List 4 приведені в таблиці 3.

**Таблиця 3** – Розмір ампліконів при детекції лістерій за допомогою ПЛР з праймерами List 3 – List 4

Вид лістерій	Набір праймерів	
	List 3 – List 4	
	Результат аналізу	Розмір ПЛР-продукту
<i>L. monocytogenes</i>	+	707
<i>L. ivanovii</i>	+	707
<i>L. seeligeri</i>	+	707

**Примітка:** «+» – позитивний результат ПЛР аналізу – наявність бактерій *Listeria spp.*

На сучасному етапі для міжвидового та внутрішньовидового типування лістерій використовують різноманітні біохімічні, серологічні, молекулярно-біологічні методи фаготипування, антибіотико-резистентне типування та ін. [16].

Однак для того, щоб встановити джерело інфекції, виявити шляхи її розповсюдження та механізми зараження, необхідно провести виключно точну внутрішньовидову характеристику виділених мікроорганізмів. До недавнього часу епідеміологічного типування лістерій найбільш часто використовували методи, які дозволяють виявляти антигенні властивості штамів бактерій, які порівнюються.

По цій схемі штами *L. monocytogenes* розділяють на дві основні серогрупи (1/2 та 4), які включають сировари (відповідно 1/2а, 1/2в, 1/2с, 4а, 4в, 4с, 4д, 4е). При цьому цифрою прийнято позначати О-антиген, а буквами латинського алфавіту – Н-антиген [15].

Однак, не дивлячись на позитивні моменти, при такому серотипуванні не перекривається весь діапазон антигенної варіабельності лістерій. Тому в останній час для подолання цих труднощів були запропоновані молекулярні методи на основі аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ), визначення плазмідного профіля штамів мультилокусного ферментного аналізу з використанням техніки гель-електрофорезу в пульсуючому полі. В той час як за допомогою рестриктаз, які широко використовуються для розрізання тетрануклеотидів, і стандартного варіанту гель-електрофорезу одержують складні для аналізу патерни геномної ДНК мікроорганізмів.

При використанні рестриктаз з низкою частотою рестрикції (гексануклеотидних), ПДРФ дає відносно прості профілі геномного порівняння штамів.

Сучасні молекулярно-генетичні методи з використанням ПЛР дозволяють здійснювати визначення інфекційних агентів, проводити диференційну детекцію патогенних мікроорганізмів і їх генотипування [13, 14, 15].

Генотипування патогенів набуває все більшого значення для практики охорони здоров'я в боротьбі з інфекційними захворюваннями. Типування таких харчових патогенів як *Listeria spp.* за допомогою ПЛР має значно більшу ефективність, специфічність і чутливість і може дати істотно більше інформації порівняно з традиційними фенотипічними методами епідемічного типування цих мікроорганізмів.

Метод ПЛР-генотипування базується на різниці між штамми по кількості і розподілу відомих послідовностей ДНК чи послідовностей, які повторюються з використанням специфічних праймерів, праймерів для випадкових послідовностей і характеристичних патернів ампліфікації, отриманих в результаті виконання ПЛР. Після поділу ампліконів в агарозному гелі ідентичні штами мають подібні характеристичні патерни. Такі молекулярні відбитки є ефективним епідеміологічним інструментом ідентифікації і контролю у мікроорганізмі.

Найбільш близьким до даної роботи є метод детекції і диференціальної діагностики лістерій на основі мультиплексної ПЛР. Тест-систему складають 5 праймерів. Один з них є загальним і специфічним для всіх видів *Listeria*. Інші 4 праймера специфічні для *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. grayi* і згрупованих разом трьох видів: *L. ivanovii*, *L. seeligeri* і *L. welshimeri*. Недоліком цієї тест-системи є неможливість здійснювати міжвидову диференціальну діагностику для *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*.

Спеціалістами Інституту мікробіології і імунології АМН України розроблено дві тест-системи для міжвидового типування лістерій. В основу першої покладені набори праймерів, комплементарних гену лістеріолізіну (цитолізіну), друга базується на праймерах, які комплементарні гену *iap*.

Перша тест-система дозволяє детектувати патогенні для людини лістерії *L. monocytogenes*, а також інші види лістерій, які містять фактори патогенності – *L. ivanovii* та *L. seeligeri*.

Схема міжвидового генотипування *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* та *L. seeligeri* приведена в таблиці 4.

Тест-система для міжвидового генотипування патогенних лістерій містить один спільний праймер і праймери, специфічні тільки для певного виду лістерій. Тест-система для ПЛР-детекції

**Таблиця 4** – Схема міжвидового генотипування патогенних лістерій за допомогою ПЛР з праймерами до гену лістеріолізіну

Вид лістерій	Набори праймерів					
	List 3 – List 5		List 3 – List 6		List 3 – List 7	
	Результат аналізу	Розмір ПЛР продукту	Результат аналізу	Розмір ПЛР продукту	Результат аналізу	Розмір ПЛР продукту
<i>L. monocytogenes</i>	-		-		+	378
<i>L. ivanovii</i>	-		+	210	-	
<i>L. seeligeri</i>	+	570	-		-	

**Примітка:** розмір ПЛР-продукту наведений в парах основ; «+» – позитивний результат ПЛР аналізу – наявність бактерій *Listeria spp.*; «-» – негативний результат ПЛР аналізу – відсутність бактерій *Listeria spp.*

фрагмента гена лістеріолізіна/цитолізіна складається з чотирьох праймерів – одного спільного консервативного 5'-кінця праймера (List 3) і трьох видоспецифічних праймерів (List 5, List 6, List 7). Праймери сконструйовані таким чином, що генотипування всіх патогенних лістерій можна провести в одній реакції з використанням мультиплексної ПЛР. Ампліфіковані фрагменти для *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* та *L. seeligeri* відрізняються довжиною утворюваного ПЛР-продукту.

Схема міжвидового генотипування лістерій за допомогою праймерів до іар гену представлена в таблиці 5.

**Таблиця 5** – Схема міжвидового генотипування лістерій за допомогою праймерів до іар гену

Вид лістерій	Набор праймерів							
	List 1 – List 11		List 1 – List 12		List 1 – List 13		List 1 – List 14	
	Результат аналізу	Розмір амплікону	Результат аналізу	Розмір амплікону	Результат аналізу	Розмір амплікону	Результат аналізу	Розмір амплікону
<i>L. grayi</i>	+	297	-	-	-	-	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	+	843	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	-	-	-	-	-	-	+	561

**Примітка:** Розмір ПЛР-продукту наведений в парах основ; «+» – позитивний результат ПЛР аналізу – наявність бактерій *Listeria spp.*; «-» – негативний результат ПЛР аналізу – відсутність бактерій *Listeria spp.*

Вона складається з спільного праймера List 1 та видоспецифічних праймерів List 11, List 12, List 13, List 14, які дозволяють проводити генотипування *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* відповідно [15].

Температури відпалювання цих праймерів також підібрані таким чином, що міжвидове типування лістерій за допомогою обох наборів праймерів

можна проводити одночасно в одній реакційній суміші, за допомогою мультиплексної ПЛР.

Сконструйовані нами набори праймерів дозволяють детектувати 6 типів лістерій (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*), проводити диференційовану діагностику тільки патогенних лістерій виду *L. monocytogenes* і тих видів лістерій, які містять ген цитолізіну – *L. seeligeri* та *L. ivanovii*; виконувати генотипування *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*.

Праймери для генотипування лістерій сконструйовані таким чином, що міжвидове типування може бути проведено одночасно в одній реакції за допомогою мультиплексної ПЛР: ампліфіковані фрагменти штамів лістерій відрізняються довжиною ампліфікону.

Ступінь гомології праймерів є ключовим параметром, який визначає специфічність ПЛР. Створені набори праймерів для виявлення та міжвидового генотипування лістерій мають 95–100% ступінь гомології, для усіх відомих ізолятів (для тих, які присутні в базах даних EMBL, GenBank, DDBJ) на момент проведення комп'ютерного аналізу. Використання праймерів з невисоким ступенем гомології (90% і менше) може істотно знижувати чутливість і специфічність ПЛР-аналізу і приводити до появи як помилково позитивних, так і помилково негативних результатів [13, 14, 15].

Існує декілька причин того, чому точність ПЛР-аналізу не досягає 100%. Точність залежить від технології (різновидності) ПЛР-методу, який використовується (звичайна чи флюоресцента), детекції ампліконів, ПЛР однораундна чи гніздова, гніздова в одній пробірці чи в двох пробірках, а також рівня якості обладнання (в першу чергу, від технічних параметрів ампліфікатора). Наприклад, при лізисі біоптата нагріванням нуклеази, які в ньому присутні, можуть привести до часткової деградації ДНК. Оскільки частково фрагментована ДНК може не бути ампліфікована, то фрагмент гена не буде синтезований, і як наслідок, результат аналізу буде помилково негативним. Інша причина – раніше ампліфіковані фрагменти можуть потрапляти в

реакційну суміш. Така контамінація приведе до помилкового позитивного результату аналізу.

Таким чином, мультиплексна ПЛР може бути використана для детекції 6 видів лістерій і їх міжвидового генотипування при дослідженні проб матеріалів біологічного і не біологічного походження.

Використані тест-системи можуть застосовуватись для ПЛР-детекції і рекомендовані як стандартні набори праймерів для визначення і міжвидового типування лістерій, що має велике значення для своєчасного проведення відповідних проти епідеміологічних заходів при лістеріозі [14, 15, 16].

**Обговорення отриманих результатів.** Для успішного генотипування лістерій за допомогою ПЛР очевидна необхідність коректного вибору температури відпалювання, проведення мультиплексної ПЛР з одночасним виявленням 6-ти видів лістерій та диференційовану детекцію патогенних лістерій. Праймери для генотипування лістерій повинні бути сконструйовані таким чином, що міжвидове типування може бути проведено одночасно в одній реакції за допомогою мультиплексної ПЛР. Ступінь гомології праймерів є ключовим параметром, який визначає специфічність ПЛР. Використання праймерів з невисоким ступенем гомології (90% і менше) може істотно знижувати чутливість і специфічність ПЛР-аналізу і приводити до появи як помилково позитивних, так і помилково негативних результатів.

Точність ПЛР залежить від технології (різновидності) ПЛР-методу, який використовується та детекції амплікона. Частково фрагментована ДНК може не бути ампліфікована, то фрагмент гена не буде синтезований, і як наслідок, результат аналізу буде помилково негативним. Раніше ампліфіковані фрагменти можуть потрапити в реакційну суміш. Також контамінація приведе до помилково позитивного результату аналізу.

#### Висновки

1. На підставі наведених про генотипування лістерій за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), мультиплексна ПЛР може бути використана для детекції 6 видів лістерій і їх міжвидового генотипування при дослідженні проб матеріалів біологічного і не біологічного походження.
2. Використані тест-системи можуть застосовуватись для ПЛР-детекції і рекомендовані як стандартні набори праймерів для визначення і міжвидового типування лістерій.

**Перспективи подальших досліджень.** Перспективним на наш погляд, виступають подальші дослідження з метою підвищення чутливості та специфічності полімеразної ланцюгової реакції для діагностики лістеріозної інфекції. В першу чергу, це стосується технології ПЛР-методу, який використовується методами детекції ампліконів, рівня якості обладнання (технічних параметрів ампліфікатора).

#### References

1. Zyuzin VO, Frenkel YuD, Muntyan LYa, Tuzova OB. Diahnostyka ta profilaktyka listerioznoyi infektsiyi v suchasnykh umovakh [Diagnosis and prevention of listeriosis infection in modern conditions]. Olbia Forum – 2020: Strategies of the Black Sea Region in the Geopolitical Space, XIV International Scientific Conference. 2020 Jun 4-7, Mykolaiv. 2020; 2020: 5-7. [Ukrainian]
2. Zyuzin VO, Polovenko LS, Belikova OI, Romanyuk AS, Zyuzin DV. Epidemiolohichna ta mikrobiolohichna kharakterystyka listerioznoyi infektsiyi [Epidemiological and microbiological characteristics of listeriosis infection]. Scientific Bulletin of the Nikolaev National University named after VO Sukhomlinsky. Biological sciences. 2017; 2(9): 12-17. [Ukrainian]
3. Khramov MV, Kostenko YuG. Listerioz: laboratornaya diahnostika v sovremennykh usloviyakh [Listeriosis: laboratory diagnostics in modern conditions]. Materials of the II National Congress of Bacteriologists. Bataevo, 2016. 2016; 6(3): 106-110. [Russian]
4. Zyuzin VO, Frenkel YuD, Muntyan LYa, Tuzova OB, Frolov YuA. Henotypuvannya listeriy za dopomohoyu polimeraznoyi lantsyuhovoyi reaktsiyi (PLR) ta yoho epidemiolohichne znachennya [Genotyping of listeria by polymerase chain reaction (PCR) and its epidemiological significance]. Mohyla Readings – 2020. Experience and trends in society in Ukraine: global, national and regional aspects. XXIII All-Ukrainian scientific-practical conference. Actual problems of medicine. Mykolaiv; 2020. 2020: 13-15. [Ukrainian]
5. Samson A, Marchuk T, Filipenya E. Listerioz: etiologiya, diagnostika i lechenie [Listeriosis: etiology, diagnosis and treatment]. Liky Ukrainy. 2005; 2: 27-30. [Russian]
6. Zyuzin VO, Frenkel YuD, Muntyan LYa, Tuzova OV. Epidemiolohichni osoblyvosti listeriozu yak zooantropoznoho zakhvoryuvannya [Epidemiological features of listeriosis as a zoonanthropoctic disease]. Olbia Forum – 2020: Strategies of the Black Sea Region in the Geopolitical Space, XIV International Scientific Conference. 2020 Jun 4-7, Mykolaiv. 2020; 2020: 3-5. [Ukrainian]
7. Spanu C, Scarano Ch, Ibba M, Spanu V, Pietro E, De Santis L. Occurrence and traceability of *Listeria monocytogenes* stains isolated from sheep's milk cheese-making plants environment. Department of Veterinari Medicine, University of Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italy. Food control. 2015; 47: 318-325.

8. Ministry of Health of the USSR. Woof. Sanitary-epidemiological management. Metodicheskie ukazaniya po sanitarno-bakteriologicheskomu kontrolyu na predpriyatiyakh obshchestvennogo pitaniya i torgovli pishchevymi produktami [Methodical instructions for sanitary and bacteriological control at public catering and food trade enterprises]. M; 1986. 61 p. [Russian]
9. Ministry of Health of the USSR, Order No. 535, 1985 Apr 22. Ob unifikatsii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniya, primenyaemykh v kliniko-diagnosticheskikh laboratoriyakh lechebno-profilakticheskikh uchrezhdeniy [On the unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical diagnostic laboratories of medical institutions]. M; 1985. 123 p. [Russian]
10. USSR, Ministry of Health from 04.09.1986. Gosagroprom of the USSR from 02.13.1987. Metodicheskie rekomendatsii po laboratornoy diagnostike listerioza u zhivotnykh i lyudey [Guidelines for laboratory diagnosis of listeriosis in animals and humans]. M; 1987. 67 s. [Russian]
11. Ministry of Health of Ukraine. Metodicheskie rekomendatsii. O poryadke provedeniya laboratornykh issledovaniy na listerioz v uchrezhdeniyakh sanitarno-epidemiologicheskoy sluzhby pri pishchevykh toksikoinfektsiyakh [Guidelines. On the procedure for conducting laboratory tests for listeriosis in the institutions of the sanitary and epidemiological service for food toxicoinfections]. Kharkov; 1995. 75 s. [Russian]
12. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes*. Ed by GL Jones. US Department of health and human services, CDC. Atlanta-Georgia; 1989. 53 p.
13. Shapoval VF. Cultural, morphological and enzymatic properties of listeria isolated from environmental objects and clinical material. Problems of ecological and medical genetics and clinical immunology. 2001; 4(36): 261-268.
14. Shapoval VF. Characteristics of factors of pathogenicity of listeria isolated from objects of the external environment and clinical material. Ukrainian Medical Almanakh. 2001; 4(3): 123-129.
15. Shapoval VF. Epidemiologichni kharakterystyky infektsiyi listeriozu ta polipshennya metodiv yoho diahnozyky ta profilaktyky [Epidemiological characteristics of listeriosis infection and improvement of methods of its diagnosis and prevention]. Abstr. PhD. (Med.). K; 2002. 145 p. [Ukrainian]
16. Shapoval VF. Clinical-epidemiological and immunological features of listeriosis infection in modern conditions. J Clin Exp Med Research. 2001; 32(11): 155-159.

УДК 616.981.136-036.2-07-08

### **ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ЛИСТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) И ЕГО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ** **Зюзин В. А., Тузова О. В., Френкель Ю. Д., Мунтян Л. Я., Зюзин Д. В.**

**Резюме.** В статье освещены вопросы генотипирования листерий с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и его эпидемиологического значения. Известно, что молекулярно-генетические методы позволяют выявить специфические микробные патогены, маркеры вирулентности, гены антимикробной устойчивости быстрее и с большей чувствительностью, чем традиционные культуральные методы.

В связи с этим актуальной является разработка методов детекции и методов генотипирования с помощью полимеразной цепной реакции.

Для детекции и генотипирования листерий все большее значение приобретает технология ДНК-чипов, которая позволяет значительно расширить возможности молекулярной детекции. Технология чипов может быть использована как для одновременной идентификации целого спектра патогенных микроорганизмов, так и для определения генетических маркеров вирулентности, отношение к антибиотикам, субтипирование, а также для определения качества микроорганизмов в образцах. Упрощенным вариантом технологии ДНК-чипов является мультиплексная (числовая) полимеразная цепная реакция, которая применяется для детекции и генотипирования листерий. Как показали проведенные исследования, для выявления *Listeria spp.* с помощью полимеразной цепной реакции целесообразно использовать ген *iap* (Invasive associated protein), известный для 6 видов листерий, которые кодирует белок *p 60*, что является общим для всех видов листерий, включая *L. murrayi*. Проведенный компьютерный анализ позволил выделить участки со 100% уровнем гомологии, из которых были отобраны праймеры для ПЦР-детекции всех видов листерий. Участки геномов, характеризующихся 100% гомологии, были выбраны для дальнейшего анализа и обозначения наборов праймеров. Последовательности сконструированных праймеров List 1 и List 2 позволили определить 6 видов листерий (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*). Увеличение длины праймера ведет к повышению специфичности ПЦР-анализа. Чем больше длина праймера, тем меньше удельный вес одной ошибки неспаренного нуклеотида. Степень гомологии праймеров является ключевым параметром, обозначающим «качество» набора праймеров.



Установлено, что существенным недостатком подавляющего большинства диагностик с использованием ПЦР-тест-систем является отсутствие внутреннего контроля амплификации. Отрицательный результат ПЦР-анализа может быть следствием отсутствия в клиническом материале фрагмента генома листерий, а также тем, что ПЦР-продукт не был синтезирован по другим причинам таким как: ошибки оператора, ошибочно определены концентрации реакционной смеси и параметров температурных режимов полимеразной цепной реакции.

Ложноотрицательные результаты могут быть вызваны факторами, ингибирующими термостабильную ДНК-полимеразу. В свою очередь, к такому ингибированию фермента, отвечающему за амплификацию, приводит повышенное количество ДНК-матриц и предварительная обработка клинических образцов. Показано, что 80% клинических образцов содержат субстанцию, которая приводит к ингибированию ДНК-полимеразы. Поэтому необходимо использовать внутренний контроль, положительный результат реакции которого указывает на успешное проведение амплификации, то есть отсутствие ложного положительного результата.

Существует несколько причин того, почему точность ПЦР-анализа не достигает 100%. Точность зависит от технологии (разновидности) ПЦР-метода, который используется (обычная или флюоресцентная методика), детекции ампликонов, ПЦР однородная или гнездовая, гнездовая в одной пробирке или в двух пробирках, а также уровня качества обследования (в первую очередь, от технических параметров амплификатора). Используемые тест-системы могут применяться для ПЦР-детекций, и рекомендованы как стандартные наборы праймеров для определения и межвидового тестирования листерий, что имеет практическое значение для своевременного проведения соответствующих противоэпидемических мероприятий при листериозе.

**Ключевые слова:** генотипирование, листерии, полимеразная цепная реакция, эпидемиологическое значение.

UDC 616.981.136-036.2-07-08

### **Genotyping of *Listeria* by Polymerase Chain Reaction (PCR) and its Epidemiological Significance**

**Zyuzin V., Tuzova O., Frenkel U., Muntian L., Zyuzin D.**

**Abstract.** *The purpose of the study.* The article covers the issues of genotyping of listeria by polymerase chain reaction (PCR) and its epidemiological significance. It is known that molecular genetic methods allow to detect specific microbial pathogens, virulence markers, antimicrobial resistance genes faster and with greater sensitivity than traditional culture methods. Therefore, the development of detection methods and genotyping by polymerase chain reaction (PCR) is relevant.

*Materials and methods.* For the detection and genotyping of *Listeria*, the technology of DNA chips is becoming increasingly important, which can significantly expand the possibilities of molecular detection. Chip technology can be used to simultaneously identify a whole range of pathogenic microorganisms, to determine genetic virulence markers, the relationship to antibiotics, subtyping, as well as to determine the quality of microorganisms in samples. A simplified version of DNA chip technology is multiplex (numerical) PCR, which is used to detect and genotype listeria. Studies have shown that to detect *Listeria spp.* using a polymerase chain reaction, it is advisable to use the gene *iap* (invasive associated protein), known for 6 species of listeria, which encodes a protein P 60 that is common to all species of listeria, including *L. murrayi*. Computer analysis revealed areas with 100% homology, from which primers were selected for PCR detection of all types of listeria. Areas of genomes characterized by 100% homology were selected for further analysis and labeling of primer sets. The sequences of the constructed primers List 1 and List 2 allowed to identify 6 species of *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*). Increasing the length of the primer leads to the increasing of specificity of PCR analysis. The greater the length of the primer, the smaller the specific gravity of one error of the unpaired nucleotide. The degree of primer homology is a key parameter that indicates the «quality» of a set of primers.

*Results and discussion.* It is established that a significant disadvantage of the vast majority diagnosed using PCR test systems is the lack of internal control of amplification. The negative result of PCR analysis may be due to the absence in the clinical material of a fragment of the *Listeria* genome, and the fact that the PCR product was not synthesized for other reasons. They may be as the following ones: operator errors, erroneously determined reaction mixture concentrations and PCR temperature parameters.

False-negative results can also be caused by factors that inhibit thermostable DNA polymerase. In its turn, such inhibition of the enzyme responsible for amplification is caused by a very large amount of DNA – template, pre-treatment of clinical samples. It has been shown that 80% of clinical specimens contain a substance

that inhibits DNA polymerase. Therefore, it is necessary to use internal control, the positive result of the reaction of which indicates the successful amplification, that is the absence of false positive results.

*Conclusion.* There are several reasons why the accuracy of PCR analysis does not reach 100%. Accuracy depends on the technology (variety) of PCR – the method used (ordinary or fluorescent), detection of amplicons, PCR homogeneous or nested, nested in one test tube or in two test tubes, as well as the level of quality of the survey (primarily on the technical parameters of the amplifier). The test systems used can be used for PCR detection and are recommended as standard primer sets for the detection and cross-species testing of listeria, which is important for the timely implementation of appropriate anti-epidemic measures in listeriosis.

**Keywords:** genotyping, listeria, polymerase chain reaction, epidemiological significance.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

Стаття надійшла 16.02.2021 р.

*Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування*