

К.А.Собянин., Е.В.Сысолятина, Я.М.Чаленко, А.Я.Лаврикова, Е.В.Калинин, В.И.Пушкарева, С.А.Ермолаева

## РОЛЬ ПРИРОДНЫХ ВАРИАНТОВ ФАКТОРОВ ИНВАЗИИ *LISTERIA MONOCYTOGENES* В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ЛИСТЕРИОЗЕ

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

*Цель.* Определить вклад природных вариантов фактора инвазии *Listeria monocytogenes* InlB в вероятность развития перинатальной инфекции на модели интрагастрального заражения беременных мышей. *Материалы и методы.* Мышам на 12-16 день беременности интрагастрально вводили  $10^8$  КОЕ изогенных рекомбинантных штаммов *L. monocytogenes* EGDe $\Delta$ inlB::InlB9 и EGDe $\Delta$ inlB::InlB14, экспрессирующих отличающиеся природные варианты InlB9 и InlB14. Через 72 час мышей подвергали эвтаназии, вскрывали и оценивали микробную нагрузку во внутренних органах. *Результаты.* Перинатальная инфекция наблюдалась только при инфекции штаммом, экспрессирующим InlB14. Также микробная нагрузка этого штамма превышала нагрузку штамма EGDe $\Delta$ inlB::InlB9 в 715, 315 и 70 раз для печени, селезенки и Пейеровых бляшек соответственно ( $p < 0,01$ ). Микробные нагрузки в эпителии тонкого кишечника были сравнимы для двух штаммов. Раздельные высевы плацент и плодов одной мыши, инфицированной EGDe $\Delta$ inlB::InlB14, выявили возбудитель в 5 плацентах и 2 плодах из 9. *Заключение.* Природные варианты InlB отличаются по своей способности способствовать развитию перинатальной инфекции при интрагастральном пути введения *L. monocytogenes*.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 114—118

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, природные факторы инвазии, листериоз

К.А.Собянин, Е.В.Сысолятина, Я.М.Чаленко, А.Я.Лаврикова, Е.В.Калинин, В.И.Пушкарева, С.А.Ермолаева

## THE ROLE FOR NATURALLY OCCURRING VARIANTS OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* INVASION FACTORS IN PERINATAL LISTERIOSIS

Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow Russia

*Aim.* Using the model of intragastric *Listeria monocytogenes* infection in pregnant mice to compare an input of found in nature variants of the invasion factor InlB in perinatal listeriosis. *Materials and methods.* Mice on 12-16 days of pregnancy were injected intragastrically with  $10^8$  CFU of isogenic recombinant *L. monocytogenes* strains EGDe $\Delta$ inlB::InlB9 and EGDe $\Delta$ inlB::InlB14. The strains expressed naturally occurring InlB variants, InlB9 and InlB14. In 72 h, mice were subjected to euthanasia to evaluate bacterial loads in the internal organs. *Results.* Only the strain, which expressed InlB14, caused perinatal infection. Microbial loads in the liver, spleen and Peyer's patches was 715, 315 and 70 times higher for this strain than for the strain EGDe $\Delta$ inlB::InlB9 ( $p < 0,01$ ). Microbial loads in the villous epithelium were comparable for both strains. Separate plating of placentas and fetuses infected with EGDe $\Delta$ inlB::InlB14 demonstrated that 5 and 2 placentas and fetuses, respectively, were infected from totally 9 embryonic structures. *Conclusion.* Naturally occurring InlB variants differed in their ability to provide perinatal listeriosis in intragastrically infected mice.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No.4, P. 114—118

Key words: *Listeria monocytogenes*, naturally variants invasion factors, listeriosis

## ВВЕДЕНИЕ

Грамположительная бактерия *Listeria monocytogenes* относится к числу хотя и не самых распространенных, однако опасных возбудителей пищевых инфекций. В целом по миру общее число случаев листериозной инфекции в последнее десятилетие не превышало 0,2-0,8 на 100 000 населения [8]. Вместе с тем, подавляющее число зарегистрированных больных с диагнозом «листериоз» госпитализируют, а летальность достигает 25-35 % от числа заболевших [6, 9]. Особенно тяжелые последствия имеет перинатальный листериоз. Частота развития перинатального листериоза составляет от 2 до 25 случаев на 100 000 новорожденных, при этом летальность достигает 30-35 % [11, 12]. В Российской Федерации в ходе только одной вспышки инфекции было зафиксировано 13 случаев перинатального листериоза с летальным исходом [3].

Проведенные в 2005-2015 гг. эпидемиологические исследования позволили нам выдвинуть гипотезу о том, что штаммы, ассоциированные с перинатальным листериозом, характеризуются определенным вариантом фактора инвазии InlA, одного из двух основных факторов инвазии *L. monocytogenes* [1, 4]. Эпидемиологические данные однако недостаточны для того, чтобы сделать вывод, имеет ли выявленный признак только диагностический характер или отражает вклад природных вариантов факторов инвазии в увеличении вероятности развития перинатального листериоза.

Для установления роли природных вариантов факторов инвазии в перинатальном листериозе мы решили разработать экспериментальную модель перинатальной инфекции на лабораторных мышах. Из двух основных факторов инвазии, относящихся к семейству интерналинов, InlA и InlB, роль в инвазивной инфекции мышевидных грызунов играет только InlB [13]. Эпизотологические данные свидетельствуют о существовании корреляции между инвазивной листериозной инфекцией и вариантом InlB, выявляемого у возбудителя, циркулирующего среди мелких мышевидных грызунов в природных очагах [1, 2, 7, 15]. Моделируя перинатальный листериоз у лабораторных мышей, мы сравнили два природных варианта InlB, один из которых был характерен для штаммов, изолированных от грызунов в природных очагах, а второй не встречался среди изолятов от грызунов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ранее сконструированные изогенные рекомбинантные штаммы *L. monocytogenes*: EGDe $\Delta$ inlB::InlB9 и EGDe $\Delta$ inlB::InlB14 [14]. Штаммы сконструированы на основе штамма EGDe $\Delta$ inlB с делецией хромосомной копии гена *inlB* и несут многокопийную плазмиду, экспрессирующую один из вариантов InlB: вариант InlB9 характерен для штаммов высоковирулентного эпидемического клона ЕС1 и не встречался среди изолятов от грызунов [7], вариант InlB14 характерен для изолятов, выделенных от грызунов, и также был найден у изолятов при вспышках листериоза среди людей [2, 7]. Варианты отличали 9 аминокислотных замен [14].

Использовали беспородных мышей весом 30-35 г. Для воспроизводимой модели перинатального листериоза самкам подкожно был введен 17-эстрдиол-бета (0,3 мкг/г). Через 2 суток к самкам был подсажен самец. Опыт начинали через 15 дней после подсадки самца. Самки с детектируемой беременностью были произвольно разделены на группы по 3 головы. Перед инфекцией животных выдерживали 12 часов без еды. Инфекция осуществлялась интрагастрально в объеме 100 мкл с использованием изогнутой

иглы диаметром 0.6 mm и длиной 25 mm с затупленным краем. Культуры *L. monocytogenes* для инфекции готовили заранее: экспоненциальную культуру отмывали и замораживали в 10 % глицерине при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Непосредственно перед опытом культуру размораживали и разводили до необходимой концентрации в PBS. В указанные сроки животных усыпляли эфиром, вскрывали, органы стерильно изымали и гомогенизировали в PBS с использованием гомогенизатора ИКА-Т10. Обсемененность органов определяли высевами десятикратных разведений гомогенатов на агар Brain Heart Infusion (BHI, BD), содержащий эритромицин (10 мкг/мл). Все высевы проводили в дубликate. Вычисление средних значений, среднеквадратичного отклонения и статистической значимости (критерий Стьюдента) проводили в программе Excel.

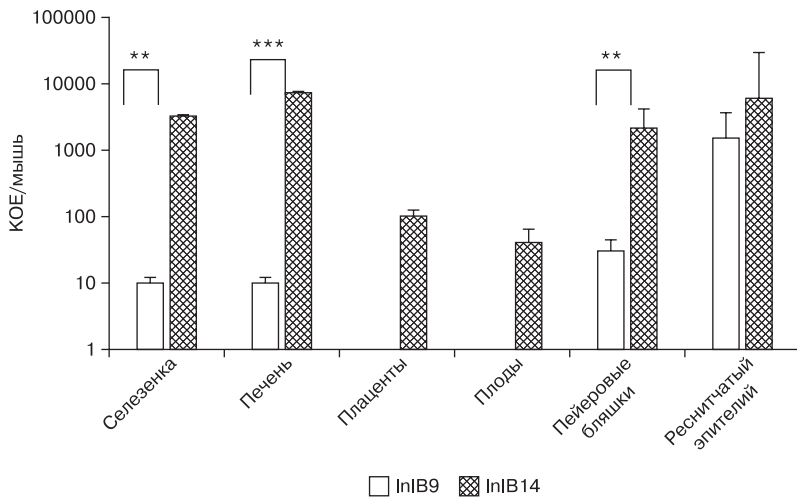
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предварительных экспериментах определили оптимальную дозу заражения. Доза LD50 при интрагастральном пути введения штамма дикого типа EGDe превышала  $10^9$  КОЕ/мышь [5]. Для определения дозы, позволяющей достоверно выявлять инвазивную инфекцию, небеременным самкам вводили интрагастрально бактерии штамма дикого типа EGDe и его производного EGDe $\Delta$ inlB в количестве  $10^6$  или  $10^8$  КОЕ/мышь и исследовали присутствие возбудителя в печени и селезенке через 24 часа. При низкой дозе возбудителя бактерии, лишенные гена inlB, во внутренних органах не выявлялись, а бактерии дикого типа выявлялись в единичных колониях. При более высокой дозе возбудитель уверенно выделялся в печени и селезенке животных. В дальнейших экспериментах использовали дозу  $10^8$  КОЕ/мышь.

В эксперименте использовали изогенные штаммы EGDe $\Delta$ inlB::InlB9 и EGDe $\Delta$ inlB::InlB14, несущие рекомбинантные плазмиды, которые экспрессировали белки InlB: InlB9 и InlB14 соответственно [14]. Определили накопление бактерий штаммов EGDe $\Delta$ inlB::InlB9 и EGDe $\Delta$ inlB::InlB14 во внутренних органах беременных мышей через 72 часа после инфекции. Штамм дикого типа в сравнение не включили, так как уровень продукции InlB в рекомбинантных штаммах был значительно выше за счет копийности плазмид [14].

Оба штамма выявлялись как в тканях кишечника, так и в печени и селезенке (рис.). Количество бактерий, инфицирующих эпителий кишечника, было приблизительно одинаковым для исследуемых штаммов ( $p > 0,05$ ). Однако в других тканях нагрузки существенно различались. Особенно большие различия наблюдались в печени — количество бактерий штамма EGDe $\Delta$ inlB::InlB14 превышало количество бактерий штамма EGDe $\Delta$ inlB::InlB9 в 715 раз ( $p < 0,001$ ). Различия в селезенке и Пейеровых бляшках составляли 315 и 70 раз соответственно ( $p < 0,01$ ). Только бактерии штамма EGDe $\Delta$ inlB::InlB14 выявлялись в плаценте и плодах.

Интересно, что распределение бактерий штамма EGDe $\Delta$ inlB::InlB14 среди отдельных плодов одной и той же самки значительно различалось. Из 9 плодов и плацент, исследованных по отдельности, возбудитель был обнаружен в 5 плацентах, и только 2 плода, ассоциированные с инфицированными плацентами, были инфицированы. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что природные варианты InlB отличаются по своей способности к развитию перинатальной инфекции при интрагастральном пути введения возбудителя; вероятность развития перинатальной инфекции коррелирует с бактериальными нагрузками в печени, селезенке и Пейеровых бляшках, но не эпителии кишечника, а также, что инфицирование отдельных плацент происходит независимо друг от друга.



**Микробные нагрузки во внутренних органах беременных мышей через 72 часа после интрагастрального введения  $10^8$  КОЕ штаммов EGDe $\Delta$ InlB::InlB9 (InlB9) и EGDe $\Delta$ InlB::InlB14 (InlB14).**

Показаны средние значения  $\pm$  стандартное отклонение. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ . В эмбриональных органах (плоды и плаценты) бактерий штамма EGDe $\Delta$ InlB::InlB9 выявлено не было.

Целью работы было выяснение потенциала влияния природных вариантов фактора инвазии InlB на развитие перинатального листериоза. Для того, чтобы устранить эффект вариабельности других бактериальных факторов патогенности, в работу были включены изогенные штаммы *L. monocytogenes*, различающиеся только по последовательности InlB. Использованные штаммы были сконструированы ранее и экспрессировали широко распространенные варианты InlB, обозначенные InlB9 и InlB14 [14]. Оба варианта, InlB9 и InlB14, выявляются среди клинических изолятов *L. monocytogenes* и широкого круга штаммов, выделенных от других источников [2, 3, 7, 15]. Важным эпидемиологическим отличием вариантов, непосредственно касающихся мышинной модели листериоза, было то, что InlB14 характерен для изолятов, выделенных от диких мышевидных грызунов в природных очагах листериоза, в то время как InlB9 не был выявлен у изолятов, полученных от грызунов [2, 7, 15].

Сравнение бактериальных нагрузок во внутренних органах животных, инфицированных разными штаммами, показало существование корреляции между развитием перинатальной инфекции и количеством бактерий в печени, селезенке и Пейеровых бляшках. Полученные результаты показывают, что вариант InlB14 обеспечивает более высокий уровень инфекции внутренних органов мыши, что, с одной стороны, может служить причиной более высокой вероятности развития перинатального листериоза, а с другой — объясняет, почему в природных очагах листериоза, включающих популяции диких мышевидных грызунов, преимущественно выделяются штаммы *L. monocytogenes*, несущие именно этот вариант InlB.

Интересно, что бактериальные нагрузки в эпителии тонкого кишечника были сопоставимы для обоих штаммов. Эти данные коррелируют с выводами Chiba S. et al. [8], что InlB играет важную роль в инвазии Пейеровых бляшек, откуда *L. monocytogenes* может распространяться в энтероциты путем межклеточного перемещения, используя другой фактор патогенности — белок ActA.

Ранее ключевая роль факторов инвазии InlA и InlB в развитии перинатальной инфекции была показана на ряде моделей *in vitro* и *in vivo* [10]. Наши результаты впервые показывают, что различные природные варианты факторов инвазии обеспечивают разный уровень обсемененности эмбриональных органов и, таким образом, могут определять вероятность развития перинатального листериоза. Сравнивая полученные экспериментальные данные с результатами ранее проведенных эпидемиологических исследований, установивших консерватизм фактора инвазии InlA у филогенетически удаленных штаммов *L. monocytogenes*, выделенных от мертворожденных [3, 12, 15], можно предположить, что выявленный в процитированных работах вариант InlA является не только маркером потенциально опасных штаммов, но и может играть прямую роль в развитии перинатального листериоза у человека.

*Работа была поддержана грантом РФФИ №17-04-00169.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Адгамов Р.Р., Тимченко Н.Ф., Зайцев Е.А., Пушкарева В.И., Колбасов Д.В., Егорова И.Ю., Пуховская Н.М., Мусатов Ю.С., Иванов Л.И., Ермолаева С.А. Эколого-генетические механизмы формирования эпидемически значимых вариантов возбудителей сапронозных инфекций. *Успехи современной биологии*. 2012, 132(6):551-567.
2. Зайцева Е.А., Ермолаева С.А., Сомов Г.П. Гены, кодирующие факторы инвазии у штаммов *Listeria monocytogenes*, изолированных в Европейской части и Дальневосточном регионе России. *Журн. микробиол.* 2006, (4):42-45.
3. Зайцева Е.А., Пуховская Н.М., Мусатов Ю.С., Иванов Л.И., Ермолаева С.А., Сомов Г.П. Молекулярно-генетические особенности и эпидемиологическая значимость штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных от беременных женщин и из абортного материала в Дальневосточном регионе России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2007, 9:81-89.
4. Ермолаева С.А., Зайцева Е.А., Тимченко Н.Ф., Адгамов Р.Р. Вариабельность функциональных доменов факторов патогенности как молекулярная основа полигостальности возбудителей сапронозов. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010, (4):24-28.
5. Собянин К.А. Влияние природных вариантов факторов инвазии на проникновение *Listeria monocytogenes* в эукариотические клетки. Дис. канд.биол. наук. М., 2016.
6. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. *Медицина для всех*. М., 2002.
7. Adgamon R., Zaytseva E., Thiberge J-M. et al. Genetically related *Listeria monocytogenes* strains isolated from lethal human cases and wild animals. *In: Genetic Diversity of Microorganisms*. Caliskan M. (Ed). 2012.
8. Chiba S., Nagai T., Hayashi T. et al. Listerial invasion protein internalin B promotes entry into ileal Peyer's patches *in vivo*. *Microbiol Immunol*. 2011, 55(2):123-129.
9. de Noordhout C., Devleeschauwer B., Angulo F.J. et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*. 2014, 14(11): 1073-1082.
10. Disson O., Grayo S., Huillet E. et al. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature*. 2008, 455(7216):1114-1118.
11. Elinav H., Hershko-Klement A., Valinsky L. et al. Pregnancy-associated listeriosis: clinical characteristics and geospatial analysis of a 10-year period in Israel. *Clin. Infect. Dis.* 2014, 59(7):953-961.
12. Girard D., Leclercq A., Laurent E. et al. Pregnancy-related listeriosis in France, 1984 to 2011, with a focus on 606 cases from 1999 to 2011. *Euro Surveill*. 2014, 19(38):20909.
13. Lecuit M., Dramsi S., Gottardi C. et al. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J*. 1999, 18(14):3956-3963.
14. Sobyanin K., Sysolyatina E., Krivozubov M. et al. Naturally occurring InlB variants that support intragastric *Listeria monocytogenes* infection in mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 2017, 364(3):fnx011.
15. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S. et al. Diversity and Pathogenic Potential of *Listeria monocytogenes* Isolated from Environmental Sources in the Russian Federation. *Int. J. Mod. Eng. Res.* 2015, 5:5-13.

*И.С.Тартаковский<sup>1</sup>, О.А.Груздева<sup>2</sup>, Т.И.Карпова<sup>1</sup>, Ю.Е.Дронина<sup>1</sup>, Т.А.Тарасова<sup>1</sup>,  
О.Г.Логинова<sup>1</sup>, М.Н.Дмитриева<sup>1</sup>*

## **АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ЭЛИМИНАЦИЮ ПЛАНКТОННЫХ КЛЕТОК И БИОПЛЕНОК ЛЕГИОНЕЛЛ В ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫХ ВОДНЫХ СИСТЕМАХ**

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва, <sup>2</sup>Первый московский государственный медицинский университет им.И.М.Сеченова

*Цель.* Сравнительное изучение различных методических подходов, направленных на элиминацию легионелл в потенциально опасных водных системах. *Материалы и методы.* Оценку эффективности краткосрочного повышения температуры воды до 70°C проводили в модуле водоснабжения с регулируемым температурным режимом объемом 290 литров. Оценку эффективности метода каталитической очистки воды проводили в бассейне для водоплавающей птицы объемом 10 000 литров. Исходный, промежуточный и конечный уровень колонизации водных систем *Legionella pneumophila* проводили в соответствии с методикой, описанной в МУК 4.2.2217-07. Наличие биопленок, содержащих легионеллы, на поверхности оборудования и границе водной среды или в шаровых краях системы водоснабжения определяли визуально с последующим бактериологическим подтверждением присутствия легионелл в биопленках. *Результаты* Показана высокая бактерицидная активность применявшихся методов в отношении планктонных форм и биопленок легионелл в водных системах различного типа. Полученные результаты свидетельствуют, что тепловой шок (70°C в течение 24 часов) в условиях работающего модуля системы горячего водоснабжения обладает краткосрочным эффектом, не превышающим 2 месяцев эксплуатации. Бактерицидный эффект каталитической очистки воды при достаточно высоком исходном уровне контаминации водного объекта проявлялся не ранее 3 недель экспозиции и сохранялся в течение 2 месяцев эксплуатации каталитического модуля. *Заключение.* Представленные в работе методические подходы могут быть использованы для разработки эффективной и рациональной стратегии обеспечения профилактики легионеллеза при эксплуатации различных водных систем и объектов в общественных зданиях.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 119—124

Ключевые слова: *L.pneumophila*, водные объекты, биопленки, профилактика

*I.S.Tartakovsky<sup>1</sup>, O.A.Gruzdeva<sup>2</sup>, T.I.Karpova<sup>1</sup>, Yu.E.Dronina<sup>1</sup>, T.A.Tarasova<sup>1</sup>, O.G.Loginova<sup>1</sup>,  
M.N.Dmitrieva<sup>1</sup>*

## **ANALYSIS OF THE DIFFERENT METHODOLOGICAL APPROACHES DIRECTED ON THE ELIMINATION OF PLANKTON FORMS AND *LEGIONELLA* BIOFILMS FROM POTENTIALLY DANGEROUS WATER SYSTEMS**

<sup>1</sup>Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow;

<sup>2</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

*Aim.* Comparative study of the different methodical approaches directed on the elimination of plankton forms and *Legionella* biofilms from potentially dangerous water systems. *Materials and methods.* Evaluation of short-term heating of water to 70°C implemented in water supply module by volume 290 L with regulated temperature profile. Evaluation of catalytic cleansing of water implemented in the pool for water birds by volume 10 000 L. The initial, intermediate and final level of water objects colonization by *L. pneumophila* determined accordance MUK 4.2.2217-07. Presence of biofilms associated with *L. pneumophila* on the surface of the equipment, water surface and ball valves of water supply system determined visual with subsequent bacteriological confirmation by