

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-397>

Анализ уровня продукции факторов инвазии InlA и InlB у изолятов *Listeria monocytogenes*, выделенных на территории Российской Федерации

Калинин Е.В.[✉], Чаленко Я.М., Сафарова П.В., Федорова В.А., Ермолаева С.А.

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

Аннотация

Актуальность. *Listeria monocytogenes* характеризуется наличием эпидемически высоковирулентных клонов. Инвазия в непрофессиональные фагоциты — ключевой момент листериозной инфекции. Формирование высоковирулентных клонов обусловлено повышенной продукцией и/или наличием определённых изоформ факторов инвазии белков InlA и InlB.

Цель исследования — создать тест-систему для обнаружения InlA и InlB и на её основе оценить уровни продукции InlA и InlB у изолятов *L. monocytogenes*, относящихся к клональным группам с различным вирулентным потенциалом.

Материалы и методы. В работе использованы 32 штамма *L. monocytogenes*, относящихся к эпидемическим клонам ECII, ECIV, ECVII (клональные комплексы CC1, CC2, CC7) и гиповирулентному клональному комплексу CC9. Проведено секвенирование генов *inlA* и *inlB*. Для анализа уровня продукции белков InlA и InlB использован непрямой иммуноферментный анализ.

Результаты. Выявлена вариабельность InlA среди штаммов, относящихся к одному клональному комплексу: в том числе среди штаммов, принадлежащих к CC7, выявлены 3 изоформы InlA; из 8 штаммов, принадлежащих к CC9, у одного выявили стоп-кодон в гене *inlA*, приводящий к утрате функциональности белка InlA. Различия между аллелями *inlB* коррелировали с принадлежностью штаммов к конкретному клональному комплексу. Установлены различия в уровне продукции факторов инвазии. У штаммов, относящихся к CC9, уровень продукции InlA был в 2,5 раза ниже по сравнению со штаммами, относящимися к CC1, CC2 и CC7. Уровень продукции InlB был в среднем в 4 раза выше у штаммов, принадлежащих к филогенетически родственным CC1 и CC2, по сравнению со штаммами, относящимися к CC7 и CC9.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о вариабельности основных факторов инвазии как между клональными комплексами, так и между штаммами одного комплекса. Повышенная продукция факторов инвазии InlA и InlB коррелирует с потенциальной вирулентностью штаммов.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, InlA, InlB, иммуноферментный анализ

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 54 от 24.07.2023).

Источник финансирования. Работа поддержана грантом РФФ № 21–74–00105.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Калинин Е.В., Чаленко Я.М., Сафарова П.В., Федорова В.А., Ермолаева С.А. Анализ уровня продукции факторов инвазии InlA и InlB у изолятов *Listeria monocytogenes*, выделенных на территории Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):276–286.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-397>

EDN: <https://www.elibrary.ru/ucqwtu>

Analysis of production levels of InIA and InIB invasion factors in *Listeria monocytogenes* isolates collected in the Russian Federation

Egor V. Kalinin[✉], Yaroslava M. Chalenko, Polina V. Safarova, Victoria A. Fedorova, Svetlana A. Ermolaeva

Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

Background. *Listeria monocytogenes* is characterized by the presence of epidemic hypervirulent clones. A key feature of *L. monocytogenes* is its capacity to invade non-professional phagocytic cells. Hypervirulent clones are strongly associated with the increased production and/or the presence of certain isoforms of invasion factors InIA and InIB.

The **purpose** of the study is to create a test system for InIA and InIB detection and to measure the InIA and InIB production levels in *L. monocytogenes* isolates belonging to clonal groups with different virulence potential.

Materials and methods. The study was performed using 32 *L. monocytogenes* strains belonging to epidemic clones ECII, ECIV, ECVII (clonal complexes CC1, CC2, CC7) and hypovirulent clonal complex CC9. Sequencing of *inIA* and *inIB* genes was performed. The indirect enzyme-linked immunosorbent assay was used to analyze the production levels of InIA and InIB proteins.

Results. The variability of InIA was revealed among strains belonging to the same clonal complex: 3 InIA isoforms were identified among strains belonging to CC7; out of 8 strains belonging to CC9, one strain had a stop codon in the *inIA* gene, leading to the loss of function of the InIA protein. The differences between *inIB* alleles correlated with the specificity of strains belonging to a certain clonal complex. Differences in production levels of invasion factors were measured. In strains belonging to CC9, the InIA production level was 2.5 times as low compared to strains belonging to CC1, CC2, and CC7. In strains belonging to phylogenetically related CC1 and CC2, the InIB production level was on average 4 times as high compared to strains belonging to CC7 and CC9.

Conclusion. The obtained results confirm the variability of major invasion factors both among clonal complexes and strains of the same complex. The increased production of invasion factors InIA and InIB correlates with the potential virulence of strains.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, InIA, InIB, enzyme-linked immunosorbent assay

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Gamaleya Research Centre of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 54, July 24, 2023).

Funding source. This study was supported by the Russian Science Foundation (project number 21-74-00105).

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Kalinin E.V., Chalenko Ya.M., Safarova P.V., Fedorova V.A., Ermolaeva S.A. Analysis of production levels of InIA and InIB invasion factors in *Listeria monocytogenes* isolates collected in the Russian Federation. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(5):276–286.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-397>

EDN: <https://www.elibrary.ru/ucqwtu>

Введение

Listeria monocytogenes вызывает опасную пищевую инфекцию с высокой (около 30%) летальностью у людей, находящаяся в группе риска, а также у домашних и диких животных [1, 2]. Генетическую структуру вида *L. monocytogenes* подразделяют на 4 филогенетические линии [3].

I филогенетическая линия включает клональные комплексы (CC) CC1, CC2, CC4 и CC6, наиболее часто ассоциированные с листериозом у человека [4]. Штаммы CC1 и CC2 были разными методами отнесены к эпидемическим клонам ECII и ECIV соответственно, вызвавшим крупные вспышки ли-

стериоза в разных странах, в том числе в России. В Европе и США среди изолятов, выделенных из клинических случаев, преобладают штаммы CC1, на долю которых приходится 11,4% [5].

На территории России до 1980 г. доминировали штаммы II линии, выделяемые как из случаев листериоза у людей и животных, так и из природных источников, большая часть которых относилась к CC7 (также известному как эпидемический клон ECVII) [6]. Штаммы CC7 и до настоящего времени преобладают в природных очагах на территории европейской части России, а также их часто выделяют при спорадических случаях листериоза у людей и

животных [7]. Штаммы относящегося ко II линии СС9 часто выделяют из пищевых продуктов и объектов окружающей среды, в том числе на территории России [7]. В структуре инфекционной патологии стран Европы и Северной Америки штаммы СС7 относят к штаммам средней вирулентности, а клональный комплекс СС9 считают низковирулентным [8]. Разницу в частоте встречаемости среди клинических изолятов и, соответственно, в потенциальной вирулентности штаммов, относящихся к разным СС и/или филогенетическим линиям, разные авторы связывают с наличием дополнительных факторов вирулентности [9], аллельным разнообразием факторов вирулентности [10], а также уровнем их экспрессии [11].

Начальным этапом инфекции является взаимодействие листерий с непрофессиональными фагоцитами при помощи белков, относящихся к семейству интерналинов, — InlA и InlB, которые позволяют *L. monocytogenes* проникать в энтероциты кишечника и эпителиальные клетки через взаимодействие с целевыми рецепторами. Специфическим рецептором InlA является E-кадгерин. InlB специфически взаимодействует с двумя рецепторами: с-Met и gC1q-R [12]. Для инвазии в энтероциты достаточно наличия функционального InlA [13], в гепатоциты — только InlB [14], а совместное действие InlA и InlB опосредует пересечение плацентарного барьера [15].

Для установления аллельного разнообразия генов *inlA* и *inlB* проводят их секвенирование. Результаты этих исследований показывают, что клинические штаммы и, что наиболее важно, штаммы, вызывающие внутриутробные и неонатальные инфекции, экспрессируют полноразмерный InlA чаще, чем штаммы пищевого происхождения. Укороченный InlA был обнаружен в большинстве гиповирулентных изолятов СС9 и СС121 [16] и в других клональных комплексах филогенетической линии II (например, СС331, СС199 и СС321) [4].

Ранее было показано, что клинические и пищевые изоляты отличаются уровнем экспрессии генов *inlA* и *inlB* [11]. Экспрессия ключевых факторов патогенности активируется во время клеточной инфекции и зависит от регулятора транскрипции PrfA. *L. monocytogenes* имеет сложную систему перекрёстных взаимодействий между регуляторными цепями σ^B и PrfA, чтобы обеспечить оптимальную реализацию генов, необходимых во внешней среде, включая репрессию генов, связанных с вирулентностью. И наоборот, внутри организма эта регуляторная сеть обеспечивает повышенную экспрессию генов, связанных с вирулентностью, для успешной инвазии [17]. Активность PrfA снижается при культивировании *L. monocytogenes* на богатой питательной среде. Гидрофобные адсорбенты, включённые в состав среды культивирования, активируют PrfA

и индуцируют повышенную активность генов факторов вирулентности [18]. Однако механизмы, контролирующие уровень продукции соответствующих белков-факторов патогенности, остаются неисследованными.

Для оценки уровня экспрессии белков используют разнообразные методы, такие как ферментативная активность целевого образца и иммуноблоттинг. Оценку ферментативной активности невозможно использовать, если белки не являются биокатализаторами. Применение иммуноблоттинга является трудоёмким процессом, в котором анализ невозможно провести с большим числом образцов. В качестве альтернативного метода для качественной и количественной идентификации InlA и InlB была разработана тест-система на основе иммуноферментного анализа (ИФА). Используя данную ИФА-тест-систему, мы проанализировали изоляты *L. monocytogenes* из коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи на предмет уровня экспрессии InlA и InlB и его корреляции с филогенетическим положением штаммов.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования бактерий

В работе использованы штаммы *Listeria* spp. из коллекции НИЦЭМ им. Гамалеи (табл. 1). Культивирование микроорганизмов осуществляли в жидкой питательной среде ВНИ («Becton Dickinson») при 37°C в режиме постоянного встряхивания при 180 об/мин. Для активации PrfA в бульон ВНИ добавляли 1% (мас/об.) гидрофобного адсорбента Amberlite XAD 4 («Sigma-Aldrich»).

ПЦР-анализ

Коллекционные изоляты *L. monocytogenes* лизировали лизоцимом в концентрации 20 мкг/мл в течение 1 ч при 37°C, далее лизаты обрабатывали протеиназой К в концентрации 25 мкг/мл при 56°C в течение 1 ч. Полученные образцы кипятили на водяной бане в течение 10 мин. Амплификацию генов *inlA* и *inlB* осуществляли в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология») по следующей программе с использованием TransStartTaq-ДНК-полимеразы («TransGen»): 1-й этап (1 цикл): 94°C — 4 мин; 2-й этап (30 циклов): 94°C — 30 с, 52°C — 30 с, 72°C — 2 мин; 3-й этап (1 цикл): 72°C — 10 мин. Праймеры подбирали в программе «Ugene v. 40.1» и синтезировали в компании «Синтол». Для гена *inlA* использовали праймеры: InlA1 5'-ggttgaaaagtatactagtagc-3'; InlA2 5'-ggaagatattagcccaatttc-3', для гена *inlB*: InlBF 5'-gctatggatcctataattcaaaagaag, InlBR 5'-gaaaagctgcagaaaatccgccttc. Продукты амплификации выявляли методом гель-электрофореза. Целевые фрагменты ДНК очищали из геля с использованием набора «Dia-gene» («Диа-М»).

Таблица 1. Используемые штаммы *Listeria* spp.

Table 1. *Listeria* spp. strains used in the study

Штамм Strain	Характеристика Characteristics	Источник Source	Ссылка Reference
<i>L. monocytogenes</i>			
<i>EGDe</i>	CC9	Типовой штамм Type strain	BIGSdb ID = 1
<i>EGDeΔinB</i>	<i>inB</i> deletion	Предоставлен профессором J. Vazquez Boland Kindly provided by Prof. J. Vazquez-Boland	
<i>EGDeΔinA</i>	<i>inA</i> deletion		
<i>VIMHA004</i>	CC2	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3449
<i>VIMHA007</i>	CC2	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3450
<i>VIMHA006</i>	CC2	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3606
<i>VIMHA009</i>	CC1	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3452
<i>VIMHA011</i>	CC1	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3454
<i>VIMHA010</i>	CC1	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3453
<i>VIMHA012</i>	CC1	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3607
<i>VIMHA017</i>	CC1	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3609
<i>L.mo25</i>	CC1	Курица Chicken	BIGSdb ID = 79358
<i>L.mo70</i>	CC8	Курица Chicken	BIGSdb ID = 78808
<i>L.mo78</i>	CC37	Курица Chicken	BIGSdb ID = 79363
<i>VIMPH006</i>	CC7	Носитель Carrier	BIGSdb ID = 3464
<i>L.mo71</i>	CC59	Курица Chicken	BIGSdb ID = 78809
<i>GIMC2010:LmcUH8</i>	CC7	Носитель Carrier	BIGSdb ID = 42978
<i>GIMC2032:LmcINH-1</i>	CC7	Носитель Carrier	BIGSdb ID = 45728
<i>GIMC2007:LmcIH1_3</i>	CC7	Носитель Carrier	BIGSdb ID = 42975
<i>766</i>	CC7	Свинья Swine	BIGSdb ID = 5803
<i>VIMPR134</i>	CC7	Грызун Rodent	BIGSdb ID = 3459
<i>VIMPR422</i>	CC7	Грызун Rodent	BIGSdb ID = 3460
<i>VIMPA064</i>	CC7	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3455
<i>L.mo84</i>	CC37	Мясо Meat	BIGSdb ID = 79367
<i>L.mo49</i>	CC9	Курица Chicken	BIGSdb ID = 79359
<i>L.mo129/3</i>	CC9	Молочные продукты Dairy products	BIGSdb ID = 78797
<i>L.mo75</i>	CC9		BIGSdb ID = 79362
<i>GIMC2035:Lmc7218</i>	CC9	Рыба Fish	BIGSdb ID = 45731
<i>GIMC2017: Lmc921</i>	CC9	Мясо Meat	BIGSdb ID = 42987
<i>L.mo98-20</i>	CC9	Молочные продукты Dairy products	BIGSdb ID = 78795
<i>LO28</i>	CC9	Типовой штамм Type strain	BIGSdb ID = 3364
<i>L. ivanovii</i>			
<i>ATCC 19119</i>		Типовой штамм Type strain	Американская коллекция типовых культур American Type Culture Collection

Секвенирование

Подготовку проб к секвенированию проводили согласно рекомендациям Центра коллективного пользования «Геном». Секвенирование ДНК выполняли с помощью набора реактивов «ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1» с последующим анализом продуктов реакции на

автоматическом секвенаторе «Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer». Для определения последовательностей генов были использованы праймеры: InlA1 5'-gggtgaaaagtatactagtagc-3', InlA2 5'-ggaagatattagcccaatttc-3', InlA-R 5'-cttctttgaattataggatccataagc-3', InlA3 5'-ccaatatcccggaagaaagctat-3', 5'-gcttatggatcctataattcaaaaagaag-3', InlBR 5'-gaaaagct-

gcagaaaatccgccttc-3', InlB1 5'-gaagcaggatcccggataactgcac-3', InlB2 5'-atagcgggtaagtgtgactgc-3'. Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали программу «Ugene v. 40.1» и базу данных BigSdb-Pasteur¹.

Получение поликлональных моноспецифичных антител против InlA и InlB

Кроликов иммунизировали препаратами очищенных рекомбинантных белков InlA и InlB, как было описано ранее [19]. Работа с лабораторными животными проводилась с соблюдением этических принципов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 54 от 24.07.2023).

Глобулиновую фракцию гипериммунных сывороток осаждали, добавляя насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ («Русхим»). Выпавший осадок, содержащий IgG, растворяли в 0,01 М Na-фосфатном буфере pH 6,5 и диализовали против этого же буфера. Полученный раствор пропускали через колонку с ДЭАЭ-сефадексом А-50 и собирали фракцию IgG, выходящую в свободном объеме буфера. Аффинные антитела выделяли на колонке против соответствующих рекомбинантных белков InlA и InlB, иммобилизованных на активированной BrCN-сефарозе («GE Healthcare»). Фракцию, полученную после ДЭАЭ-хроматографии, промывали 0,3 М NaCl и элюировали 4,5 М MgCl_2 («Русхим»). Полученные образцы диализовали против фосфатно-солевого буфера («Sigma-Aldrich»), концентрировали, смешивали с глицерином до концентрации 50% и хранили при -20°C .

Вестерн-блот-анализ лизатов *L. monocytogenes*

Белки клеточной стенки получали из ночной культуры, выращенной в ВНИ-бульоне с добавлением 1% Amberlite XAD 4. Лизаты разделяли в 10% SDS-PAGE в денатурирующих условиях по Леммли и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad») с диаметром по 0,45 мкм. Нитроцеллюлозные мембраны инкубировали с полученными антителами против InlA или InlB соответственно

в разведении 1 : 10 000 в течение 1 ч. Далее мембрану отмывали 3 раза ТТБС буфером («Bio-Rad») и добавляли вторичные антитела против IgG кролика (в разведении 1 : 20 000). Визуализацию целевых белков InlA и InlB на мембране осуществляли добавлением ТМБ-субстрата («Thermo Fisher Scientific»). Для контроля нагрузки белков использовали антитела к GAPDH (в разведении 1 : 1000 («Thermo Fisher Scientific»)).

Непрямой иммуоферментный анализ

Бактериальные клетки культивировали в течение 24 ч на среде ВНИ, а затем центрифугировали и промывали трижды фосфатно-солевым буфером. Полученные образцы доводили до оптической плотности $\text{OD}_{600} = 0,2$. Чтобы проверить, что количество клеток совпадает, культуры высевали на агаризованную питательную среду. Лунки 96-луночного планшета покрывали аликвотами по 100 мкл соответствующих тестируемых штаммов *L. monocytogenes*. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 1 ч, далее трижды отмывали трис-буферным физиологическим раствором, содержащим 0,05% Твин-20 (ТТБС) («Русхим»), а затем блокировали незанятые участки добавлением в лунки 200 мкл 2% бычьего сывороточного альбумина («Диа-М»), разведенного в фосфатно-солевом буфере в течение 30 мин. По окончании времени инкубации буфер для блокировки удаляли и добавляли 100 мкл анти-InlB или анти-InlA антител в разведении 1 : 4000 в ТТБС и инкубировали 1 ч при комнатной температуре в режиме постоянного встряхивания при 140 об/мин. Далее лунки трижды промывали ТТБС и добавляли 100 мкл вторичных антител (козьи антитела против IgG кролика, меченные пероксидазой хрена, «Bio-Rad»), в ТТБС. После отмывали 6 раз ТТБС по 250 мкл и проявляли добавлением 100 мкл ТМБ-субстрата. Для остановки реакции использовали 100 мкл 2 М H_2SO_4 («Русхим»). Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм на планшетном фотометре «iMark» («Bio-Rad»). Концентрацию InlA и InlB определяли по калибровочной кривой (рис. 1).

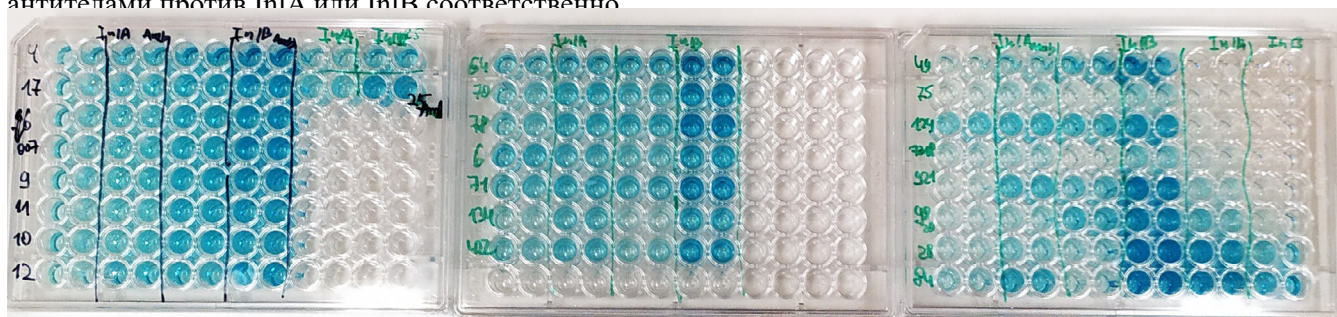


Рис. 1. 96-луночный планшет с результатами анализа.

Fig. 1. 96-well plate and test results.

¹ URL: <https://bigsdbs.pasteur.fr/listeria>

Статистический анализ

Все эксперименты повторяли не менее 3 раз. Статистический анализ включал однофакторный ANOVA с тестом Тьюки. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты

Анализ частоты встречаемости изолятов, депонированных в базе данных BigSdb-Pasteur, в зависимости от филогенетического положения и региона выделения

В совокупности в базе данных BigSdb-Pasteur депонировано 111 изолятов, выделенных на территории России от сельскохозяйственных животных и человека, инфицированных *L. monocytogenes*. Из них 83 изолята были выделены в 1958–2019 гг. сотрудниками НИИЭМ им. Г.П. Сомова, ФИЦВиМ, НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи и ГНЦ ПМБ из клинического материала, полученного от мертворождённых в результате перинатального листериоза детей, а также от беременных женщин без клинических признаков инфекции, и из образцов, забранных у пациентов с нейрوليستيرиозом и поражениями тканей лёгкого. Анализ базы данных показал, что в случаях листериоза человека преобладали изоляты, принадлежащие к СС7 (II филогенетическая линия), СС1 и СС2 (I филогенетическая линия) по 16, 11 и 8% соответственно. Изоляты, относящиеся к СС9 (II филогенетическая линия), составили 2% (рис. 2).

Далее мы проанализировали распределение в соответствии с СС для изолятов, выделенных на территории Европы (исключая страны, входившие в состав СССР) из клинического материала пациентов с листериозом. Всего в базе депонировано 747 изолятов. При этом 723 изолята представлены теми же клональными комплексами, что и на территории России. Однако процентное соотношение представленности отдельных СС среди клинических изолятов, выделенных на территории Европы, отличалось от российских. Среди европейских изолятов преобладали СС1, СС6 и СС2 (23, 15 и 14% соответственно).

Определение разнообразия *inlA* и *inlB* среди изолятов *L. monocytogenes*, выделенных на территории России, из коллекции НИЦЭМ им. Гамалеи

Анализ базы данных показал, что среди штаммов II филогенетической линии, преобладающих на территории России, штаммы, относящиеся к СС7, чаще встречаются среди клинических изолятов, по сравнению со штаммами, относящимися к СС9. Для понимания потенциальных механизмов, обеспечивающих эти различия, мы просеквенировали гены *inlA* и *inlB* 32 штаммов, принадлежащих к данным СС, которые были выделены на территории России.

Среди штаммов, принадлежащих к СС7, выявлены 3 аллельных варианта *inlA*, в том числе 15 штаммов обладали аллелем 2 гена *inlA*, пред-

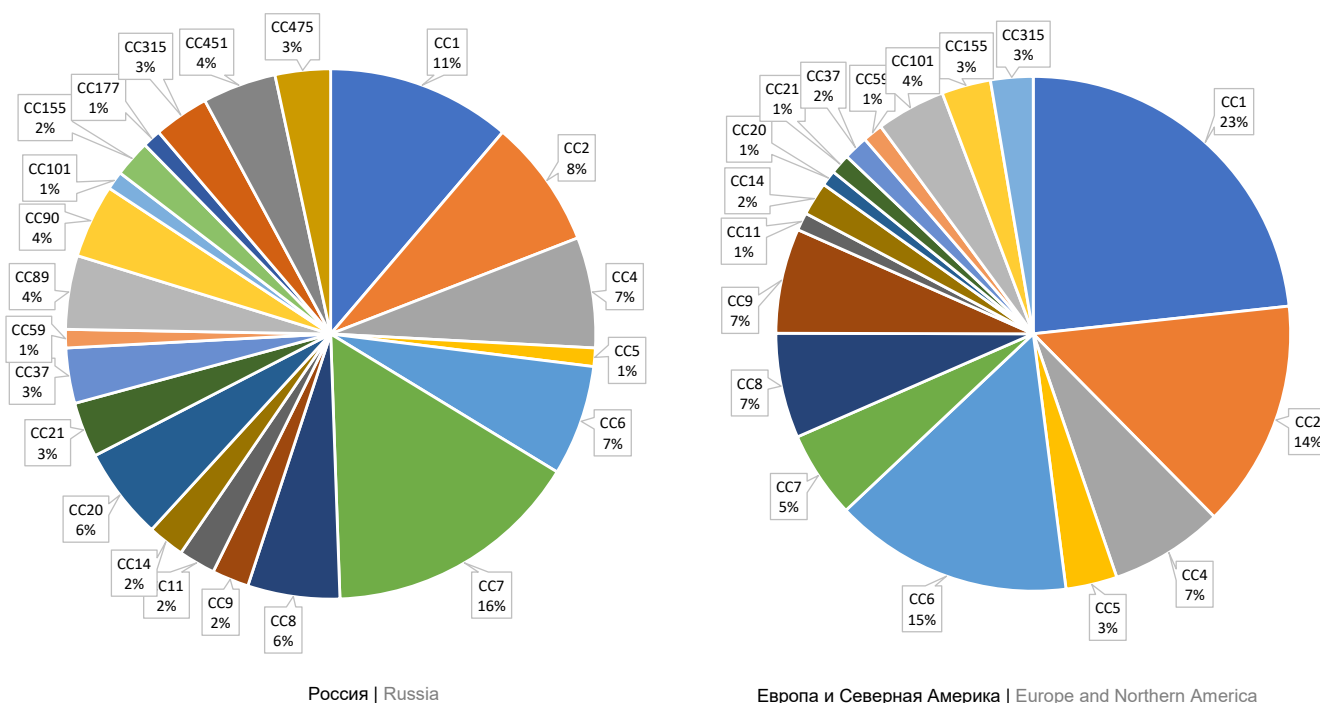


Рис. 2. Частота встречаемости СС среди штаммов *L. monocytogenes*, информация о которых хранится в базе данных ListiList (Institut Pasteur, Франция), для России и стран Европы и Северной Америки.

Fig. 2. CC occurrence frequency among *L. monocytogenes* strains from the ListiList database (Institut Pasteur, France), for Russia, countries of Europe and North America.

ставленным в базе данных BigSdb-Pasteur. Однако у 2 штаммов *inlA* отличался от аллелей, депонированных в этой базе данных. Выявленные мутации были несинонимическими, что указывало на потенциальное функциональное значение замен. Изолят VIMPA064 содержал 1 несинонимическую замену, приводящую к замене глутамина в 364-м положении на пролин в области интерналинового домена, вовлечённого в белок-белковое взаимодействие с эукариотическим рецептором E-кадгеринном. VIMPH006 содержал 3 несинонимические замены в положениях 618, 620 и 621 (пролин, лизин и глутамин вместо аланина, глутамина и серина) вне области интерналинового домена. Ни один из аллелей штаммов, относящихся к CC7, не содержал преждевременных стоп-кодонов.

Из 9 штаммов, принадлежащих к CC9, у 1 штамма выявили наличие стоп-кодона в гене *inlA*. Стоп-кодон находился вне области интерналинового домена, однако препятствовал формированию полноразмерного белка, в частности, связыванию белка с поверхностью бактерии, что необходимо для функциональной активности InlA как фактора инвазии. Остальные 8 штаммов CC9 кодировали полноразмерный вариант *inlA* относящийся к аллелю 1. Данные о последовательностях генов *inlA* доступны в базе данных GenBank под номерами OQ865090–OQ865119.

Секвенирование гена *inlB* у 32 штаммов не выявило особенностей в пределах клональных комплексов. Для штаммов, относящихся к CC7, был выявлен аллель 2, к CC9 — аллель 1.

Таким образом, анализируя последовательности *inlA* и *inlB*, у штаммов, относящихся к CC7 и

CC9, установлена внутриклональная варибельность *inlA*, в то время как *inlB* был консервативен для всех штаммов, относящихся к определённому клону. Аллели, выявленные среди штаммов высоковирулентного CC7, кодировали различные изоформы InlA, что может указывать на различия в их взаимодействии с таргетным рецептором на поверхности клеток человека. Вариант, кодируемый альтернативным аллелем *inlA*, выявленным среди штаммов, относящихся к редко встречающемуся среди клинических изолятов CC9, кодировал нефункциональный укороченный белок.

Уровень экспрессии фактора патогенности *L. monocytogenes* InlB в штаммах CC1, CC2, CC7 и CC9

Для оценки корреляции между уровнем продукции факторов инвазии InlA и InlB и частотой встречаемости штаммов данного CC среди клинических изолятов были сконструированы 2 тест-системы, основанные на ИФА. Концентрацию белков определяли по калибровочным кривым от 5 до 1000 нг/мл. В качестве стандартов использовали рекомбинантные InlA и InlB (рис. 3).

Транскрипция обоих генов, кодирующих белки InlA и InlB, находится под контролем регулятора PrfA [12]. При культивировании *L. monocytogenes* на питательных средах активность PrfA увеличивается в присутствии гидрофобных адсорбентов (активированный уголь или Amberlite XAD4), достигая уровней, характерных для бактерий в процессе инфекции [18]. С целью изучения изменений в концентрации инвазинов в зависимости от состо-

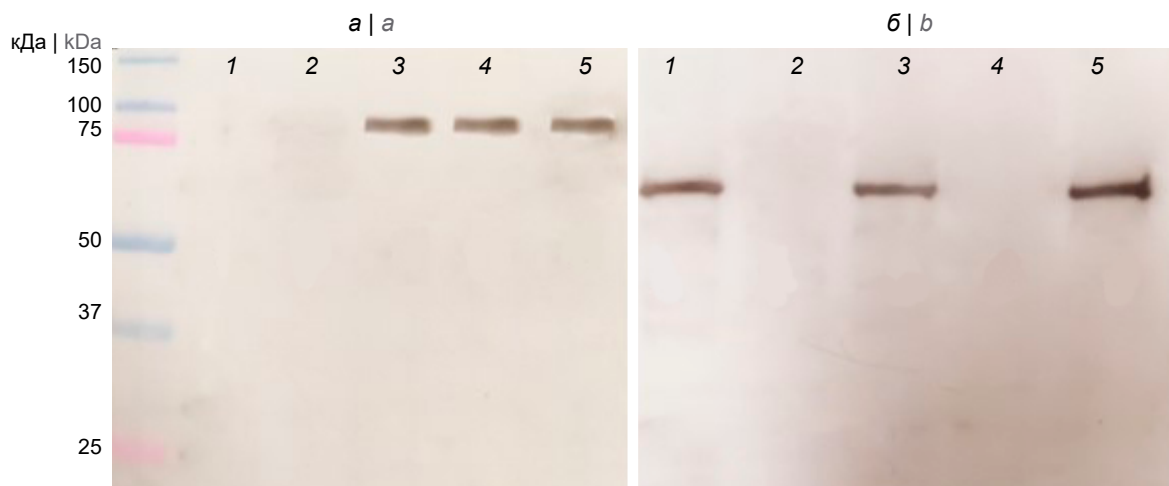


Рис. 3. Иммуноблот клеточных лизатов бактерий *Listeria* spp.

a — моноспецифические антитела против InlA; *b* — моноспецифические антитела против InlB. 1 — *L. monocytogenes* EGDe Δ *inlA*; 2 — *L. ivanovii* ATCC 19119; 3 — *L. monocytogenes* EGDe (CC9); 4 — *L. monocytogenes* EGDe Δ *inlB*; 5 — *L. monocytogenes* L.mo49 (CC9).

Fig. 3. Immunoblot of *Listeria* spp. cell lysates.

a — monospecific antibodies against InlA; *b* — monospecific antibodies against InlB. 1 — *L. monocytogenes* EGDe Δ *inlA*; 2 — *L. ivanovii* ATCC 19119; 3 — *L. monocytogenes* EGDe (CC9); 4 — *L. monocytogenes* EGDe Δ *inlB*; 5 — *L. monocytogenes* L.mo49 (CC9)

яния PrfA были измерены уровни InlA и InlB без активации и при активации PrfA регулона в зависимости от наличия в питательной среде адсорбента Amberlite XAD4. Без активации PrfA уровень InlA у штаммов *L. monocytogenes* варьировал от 5 до 65 нг/мл (рис. 4). При этом штаммы, относящиеся к CC1, CC2 и CC7, показывали в среднем более высокий уровень InlA в сравнении со штаммами, относящимися к CC9 (53,5 ± 5,3 нг/мл против 21,1 ± 3,2 нг/мл; $p < 0,05$). Исключение составил 1 штамм CC9 L.mo129-3, имеющий уровень, сравнимый со штаммами CC1, CC2, CC7 (59,1 ± 1,5 нг/мл).

Комплементация питательной среды адсорбентом Amberlite XAD4 и соответствующая активация PrfA приводила к увеличению концентрации InlA у всех штаммов в среднем на 31%. При этом у отдельных штаммов концентрация достигала максимума: VIMHA017 (CC1) — 99 нг/мл, VIMHA007 (CC2) — 93 нг/мл, L.mo71 — 107 нг/мл (CC7), L.mo129-3 (CC9) — 90 нг/мл.

Уровень InlB между штаммами варьировал от 15 до 958 нг/мл без активации PrfA регулона (рис. 5). При этом в среднем концентрация у штаммов CC1 и CC2 составляла 740,5 нг/мл, что было существенно

выше, чем у штаммов CC7 и CC9 (209,5 и 177,9 нг/мл соответственно). Но в сравнении с InlA уровень InlB у штамма L.mo129-3 не достигал значений, характерных для штаммов CC1 и CC2, и был меньше в 2 раза ($p < 0,05$).

При активации PrfA концентрация InlB достигала максимальных значений 1353 нг/мл для штаммов CC1 и CC2, 917 нг/мл — для CC7, 835 нг/мл — для CC9. При этом наибольшего увеличения уровня InlB достигала у штаммов CC7 (в 3,29 раза в сравнении с уровнем без активации). Для штаммов CC9 и I филогенетической линии (CC1, CC2) увеличение уровня InlB в присутствии адсорбента составило 2,93 и 1,54 раза соответственно.

Обсуждение

У *L. monocytogenes*, как и у большинства других патогенных бактерий, клональные группы и линии различаются по вирулентному потенциалу [20, 21]. Например, штаммы II филогенетической линии чаще связаны с пищевыми продуктами, в то время как штаммы I филогенетической линии чаще обнаруживают в клинических изолятах. Однако даже внутри филогенетических линий распределение

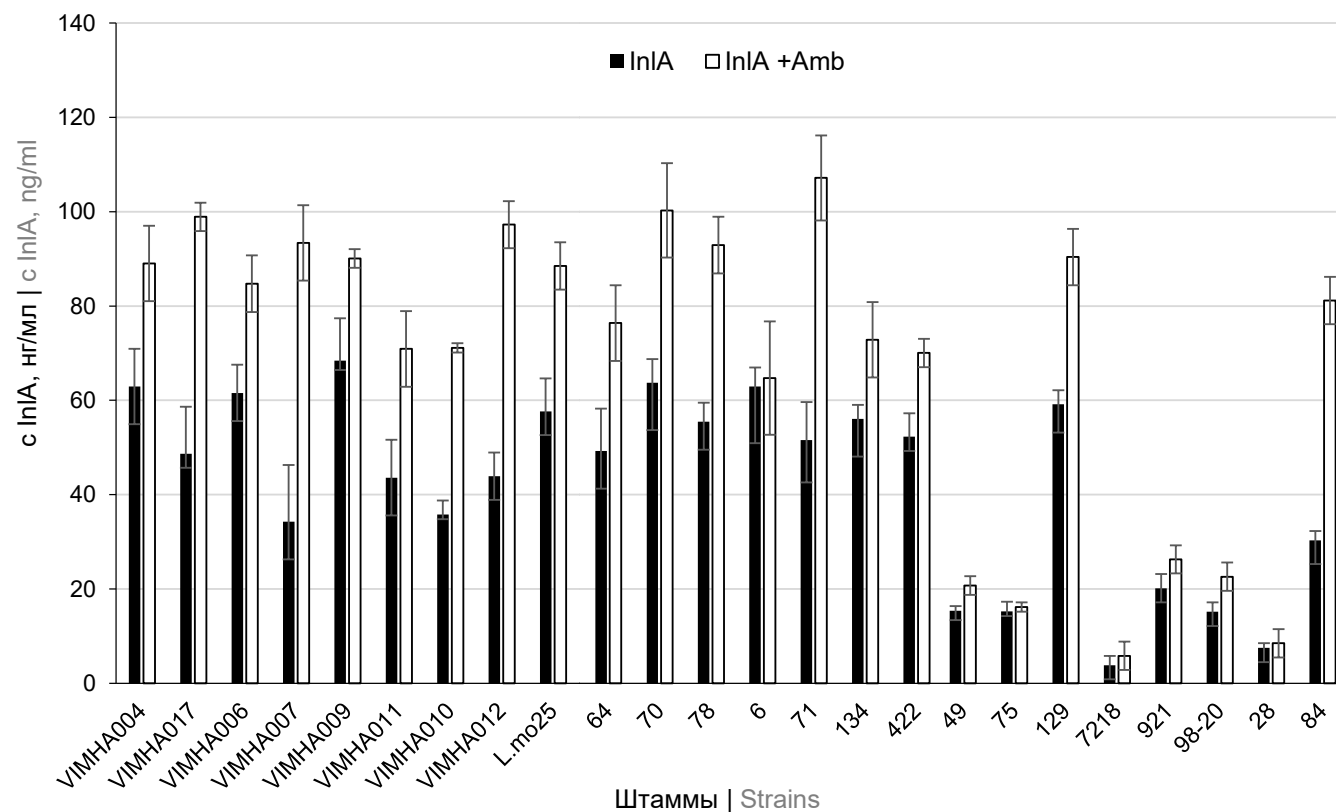


Рис. 4. Уровни InlA изолятов, относящихся к разным CC.

Концентрацию InlA измеряли при помощи разработанной ИФА-тест-системы. Бактерии выращивали в среде BHI без и с добавлением 1% Amberlite XAD4.

Fig. 4. Levels of InlA isolates belonging to different CCs.

The InlA concentration was measured using the new ELISA test system. Bacteria were grown in a BHI medium without and with the addition of 1% Amberlite XAD4.

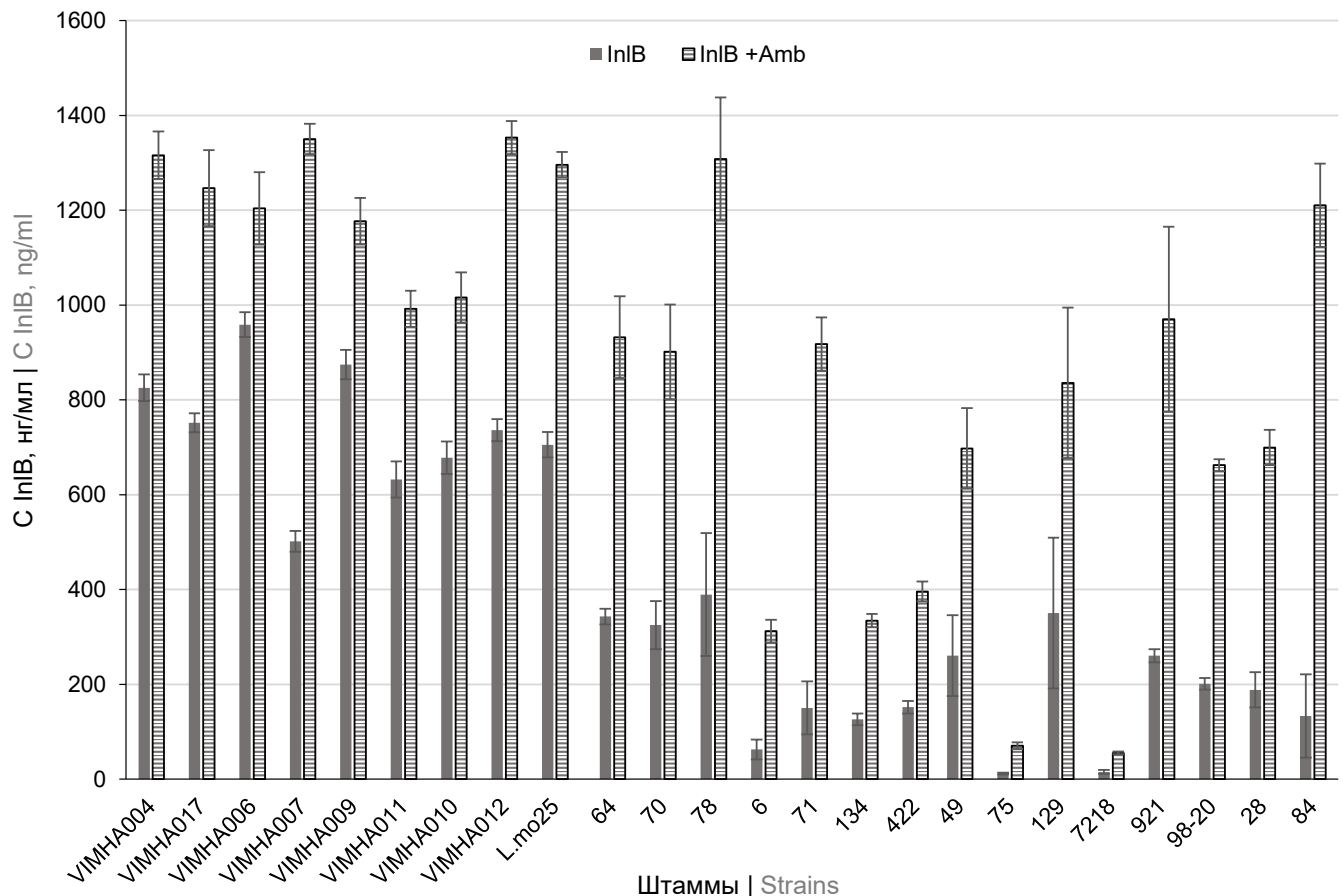


Рис. 5. Уровни InIB изолятов, относящихся к разным СС.

Концентрацию InIA измеряли при помощи разработанной ИФА-тест-системы. Бактерии выращивали в среде BHI без и с добавлением 1% Amberlite XAD4.

Fig. 5. Levels of InIB isolates belonging to different CCs.

The InIA concentration was measured using the new ELISA test system. Bacteria were grown in a BHI medium with and without 1% Amberlite XAD4.

среди источников различное. Например, штаммы II филогенетической линии, принадлежащие к СС7, чаще, чем штаммы, относящиеся к СС9, выделяют из клинических образцов [20]. Установление природы такой гетерогенности необходимо для понимания механизмов эволюции и формирования высоковирулентных штаммов.

Для ряда патогенных бактерий, например для энтеропатогенных иерсиний, различия в вирулентности связаны с наличием дополнительных факторов патогенности, которые могут присутствовать на плазидах и мобильных генетических элементах [22]. При поиске дополнительных факторов патогенности у штаммов *L. monocytogenes*, относящихся к клональному комплексу СС1, был обнаружен бактериоцин LLS, который, предположительно, позволяет листериям дольше выживать в присутствии нормальной микрофлоры, однако не является полноценным фактором патогенности и отсутствует у других высоковирулентных штаммов, относящихся к другим СС [23].

Нами была предложена альтернативная гипотеза о роли варибельности основных факторов патогенности как основного механизма формирования высоковирулентных штаммов *L. monocytogenes* и других возбудителей сапронозов [24]. Природные изоформы InIB отличаются между собой и по кинетике активации внутриклеточных сигнальных путей, и по константе связывания со своими целевыми рецепторами с-Met и gC1qR [25, 26]. Штаммы, отличающиеся только изоформой InIB, различались в способности поддерживать гастроинтестинальную инфекцию у мышевидных грызунов, а изоформы InIB обуславливали различную инвазию данных штаммов в эпителиальные клетки животных (клетки почки овцы, shKEC) [10]. В данной работе продемонстрирована варибельность другого фактора инвазии — белка InIA среди штаммов, относящихся к СС II филогенетической линии: СС7 и СС9. Среди проанализированных штаммов выявлен один нефункциональный белок InIA, что соответствует относительно низкой роли СС9 в клиническом рас-

пространении листериоза и совпадает с данными других авторов [27].

Ещё одним механизмом, определяющим вирулентный потенциал штамма, может быть уровень продукции основных факторов патогенности [11]. Ранее было установлено, что уровень продукции InlB влияет на взаимодействие *L. monocytogenes* с макрофагами [28]. У *L. monocytogenes* продукция факторов патогенности происходит под положительным контролем белка PrfA, который неактивен в условиях роста, свидетельствующих о пребывании вне организма хозяина (низкая температура, наличие растительных сахаров и гидрофобных пептидов) [22]. Данный механизм регуляции является оправданным, поскольку позволяет исключить избыточность синтеза факторов патогенности для возбудителей сапронозов, когда они обитают в абиотических условиях окружающей среды. Вместе с тем высокий уровень продукции факторов, необходимых для пересечения эпителиального барьера кишечника, должен положительно влиять на вирулентность бактерий. В соответствии с этой гипотезой в данном исследовании показано, что уровень продукции фактора инвазии InlB без активации PrfA был выше в 4 раза у штаммов I филогенетической линии (CC1 и CC2) в сравнении со штаммами II филогенетической линии (CC7, CC9). Уровень продукции InlA без активации PrfA и в условиях активации PrfA у изолятов, относящихся к CC1, CC2, CC7, был выше, чем у изолятов, относящихся к CC9. Это согласуется с тем, что наиболее часто на территории России в клинических образцах встречаются именно CC1, CC2, CC7. При этом у штаммов, относящихся к CC9, которые чаще выделяют из продуктов питания, уровень InlA был ниже в 2,5 раза, за исключением штамма L.mo129-3, который показал схожую с CC1 и CC2 концентрацию.

Таким образом, в нашем исследовании было показано, что высоковирулентные штаммы для человека характеризуются не только определёнными изоформами, но и повышенной продукцией InlA и InlB. Наши данные подтверждают результаты других исследователей, которые установили, что клинические изоляты отличаются от пищевых изолятов уровнем экспрессии *inlA* [11].

Заключение

В совокупности полученные нами данные согласуются с эпидемиологическими наблюдениями и раскрывают возможные механизмы формирования CC *L. monocytogenes* с различными вирулентными потенциалами. Полученные результаты имеют фундаментальное значение, но также могут послужить основой для классификации вновь выделенных изолятов на вирулентные и гиповирулентные клоны.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Pires S.M., Desta B.N., Mughini-Gras L., et al. Burden of food-borne diseases: think global, act local. *Curr. Opin. Food Sci.* 2021;39:152–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2021.01.006>
2. Halbedel S., Wilking H., Holzer A., et al. Large nationwide outbreak of invasive listeriosis associated with blood sausage, Germany, 2018-2019. *Emerg. Infect. Dis.* 2020;26(7):1456–64. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2607.200225>
3. Rasmussen O.F., Skouboe P., Dons L., et al. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology (Reading)*. 1995;141(Pt. 9):2053–61. DOI: <https://doi.org/10.1099/13500872-141-9-2053>
4. Moura A., Criscuolo A., Pouseele H., et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat. Microbiol.* 2016;2(2):1–10. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.185>
5. Maury M.M., Tsai Y.H., Charlier C., et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.* 2016;48(3):308–13. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.3501>
6. Psareva E.K., Egorova I.Y., Liskova E.A., et al. Retrospective study of *Listeria monocytogenes* isolated in the territory of inner Eurasia from 1947 to 1999. *Pathogens*. 2019;8(4):184. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens8040184>
7. Psareva E.K., Liskova E.A., Razheva I.V., et al. Diversity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food products in the central European part of Russia in 2000–2005 and 2019–2020. *Foods*. 2021;10(11):2790. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10112790>
8. Charlier C., Perrodeau É., Leclercq A., et al. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2017;17(5):510–9. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30521-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30521-7)
9. Cotter P.D., Draper L.A., Lawton E.M., et al. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.* 2008;4(9):e1000144. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000144>
10. Chalenko Y., Kolbasova O., Pivova E., et al. *Listeria monocytogenes* invasion into sheep kidney epithelial cells depends on InlB, and invasion efficiency is modulated by phylogenetically defined InlB isoforms. *Front. Microbiol.* 2022;13:825076. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.825076>
11. Severino P., Dussurget O., Vêncio R.Z.N., et al. Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals differences in virulence, cell wall, and stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(19):6078–88. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02730-06>
12. Kammoun H., Kim M., Hafner L., et al. Listeriosis, a model infection to study host-pathogen interactions *in vivo*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2022;66:11–20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.11.015>
13. Lecuit M., Ohayon H., Braun L., et al. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect. Immun.* 1997;65(12):5309–19. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.65.12.5309-5319.1997>
14. Dramsi S., Biswas I., Maguin E., et al. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.* 1995;16(2):251–61. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02297.x>
15. Disson O., Grayo S., Huillet E., et al. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature*. 2008;455(7216):1114–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature07303>

16. Gelbíčová T., Koláčková I., Pantůček R., Karpíšková R. A novel mutation leading to a premature stop codon in *inlA* of *Listeria monocytogenes* isolated from neonatal listeriosis. *New Microbiol.* 2015;38(2):293–6.
17. Gaballa A., Guariglia-Oropeza V., Wiedmann M., et al. Cross talk between SigB and PrfA in *Listeria monocytogenes* facilitates transitions between extra- and intracellular environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2019;83(4):e00034-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-19>
18. Ermolaeva S., Novella S., Vega Y., et al. Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. *Mol. Microbiol.* 2004;52(2):601–11. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04003.x>
19. Kalinin E.V., Chalenko Y.M., Kezimana P., et al. Combination of growth conditions and InlB-specific dot-immunoassay for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk. *J. Dairy Sci.* 2023;106(3):1638–49. DOI: <https://doi.org/10.3168/JDS.2022-21997>
20. Maury M.M., Bracq-Dieye H., Huang L., et al. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat. Commun.* 2019;10(1):1–13. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10380-0>
21. Quereda J.J., Morón-García A., Palacios-Gorba C., et al. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: a trip from environmental to medical microbiology. *Virulence.* 2021;12(1):2509–45. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1975526>
22. Timchenko N.F., Adgamov R.R., Popov A.F., et al. Far East scarlet-like fever caused by a few related genotypes of *Yersinia pseudotuberculosis*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2016;22(3):503–6. DOI: <https://doi.org/10.3201/EID2203.150552>
23. Quereda J.J., Andersson C., Cossart P., et al. Role in virulence of phospholipases, listeriolysin O and listeriolysin S from epidemic *Listeria monocytogenes* using the chicken embryo infection model. *Vet. Res.* 2018;49(1):1–9. DOI: <https://doi.org/10.1186/S13567-017-0496-4>
24. Ермолаева С.А., Зайцева Е.А., Тимченко Н.Ф., Адгамов Р.Р. Вариабельность функциональных доменов факторов инвазии как молекулярная основа полигостальности возбудителей сапронозов. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2010;(4):24–8. Ermolaeva S.A., Zaitseva E.A., Timchenko N.F., Adgamov R.R. Variability of functional domains of invasion factors as molecular basis for polyhostality of sapronosis-induced microorganisms. *Pacific Medical Journal.* 2010;(4):24–8. EDN: <https://elibrary.ru/ocqdnb>
25. Chalenko Y.M., Kalinin E.V., Marchenkov V.V., et al. Phylogenetically defined isoforms of *Listeria monocytogenes* invasion factor InlB differently activate intracellular signaling pathways and interact with the receptor gC1q-R. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(17):4138. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20174138>
26. Chalenko Y.M., Slonova D.A., Kechko O.I., et al. Natural isoforms of *Listeria monocytogenes* virulence factor InlB differ in c-Met binding efficiency and differently affect uptake and survival listeria in macrophage. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(8):7256. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24087256>
27. Phelps C.C., Vadia S., Arnett E., et al. Relative roles of listeriolysin O, InlA, and InlB in *Listeria monocytogenes* uptake by host cells. *Infect. Immun.* 2018;86(10):e00555-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00555-18>
28. Чаленко Я.М., Абдулкадиева М.М., Сафарова П.В. и др. Белок INLB, секретируемый *Listeria monocytogenes*, контролирует взаимодействие возбудителя с макрофагами. *Вестник Российской государственной медицинской академии* 2022;(3):5–10. DOI: <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2022.034>
Chalenko Y.M., Abdulkadiev M.M., Safarova P.V., et al. InlB protein secreted by *Listeria monocytogenes* controls the pathogen interaction with macrophages. *Bulletin of Russian State Medical University.* 2022;(3):5–10. DOI: <https://doi.org/10.24075/brsmu.2022.034>

Информация об авторах

Калинин Егор Валерьевич[✉] — н.с. лаб. экологии возбудителей инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, kalinin.egor@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4478-3225>

Чаленко Ярослава Михайловна — к.м.н., с.н.с., лаб. экологии возбудителей инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7901-5226>

Сафарова Полина Вагифовна — лаборант-исследователь, лаб. экологии возбудителей инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9051-2664>

Федорова Виктория Алексеевна — лаборант-исследователь, лаб. экологии возбудителей инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0000-9228-3818>

Ермолаева Светлана Александровна — д.б.н., зав. лаб. экологии возбудителей инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3396-6816>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 03.05.2023;
принята к публикации 25.06.2023;
опубликована 28.10.2023

Information about the authors

Egor V. Kalinin[✉] — researcher, Laboratory of ecology of infectious agents, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, kalinin.egor@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4478-3225>

Yaroslava M. Chalenko — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of ecology of infectious agents, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7901-5226>

Polina V. Safarova — laboratory researcher, Laboratory of ecology of infectious agents, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9051-2664>

Victoria A. Fedorova — laboratory researcher, Laboratory of ecology of infectious agents, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0000-9228-3818>

Svetlana A. Ermolaeva — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of ecology of infectious agents, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3396-6816>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 03.05.2023;
accepted for publication 25.06.2023;
published 28.10.2023