MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2009, 61: 79 - 85

Grzegorz Madajczak[1], *Danuta Majczyna*[2]

SEROLOGICZNE TYPOWANIE I GENOSEROTYPOWANIE PAŁECZEK *LISTERIA MONOCYTOGENES* IZOLOWANYCH Z PRÓBEK MATERIAŁU KLINICZNEGO, PRÓBEK ŻYWNOŚCI I PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH

[1] Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego -
- Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. *M. Jagielski*
[2] Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
Oddział Chłodnictwa i Jakości Żywności w Łodzi
Kierownik: dr inż. *E. Polak*

Opisano wyniki typowania szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes* izolowanych z próbek materiału klinicznego, próbek żywności i próbek środowiskowych metodą multiplex PCR umożliwiającą ustalenie przynależności badanego szczepu do określonej genoserogrupy. Stwierdzono, że większość badanych szczepów można było zaliczyć do genoserogrupy I.1 oraz II.2, reprezentujących odpowiednio typy serologiczne 1/2a oraz 1/2b. Szczepy izolowane z próbek żywności najczęściej należały do typu serologicznego 1/2a, natomiast izolowane z próbek materiału klinicznego do 1/2b.

Zakażenia pałeczkami *Listeria mononocytogenes* dotyczą ludzi na całym świecie, powodując przede wszystkim zaburzenia żołądkowo jelitowe, rzadziej odpowiedzialne są za zakażenia centralnego układu nerwowego, powodując zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie mózgu, czy ropnie mózgu. Zakażenia tymi drobnoustrojami u kobiet ciężarnych mogą natomiast prowadzić do przedwczesnych porodów, czy nawet poronień (3, 11). Listerioza jest poważnym problemem nie ze względu na liczbę zachorowań (zapadalność), lecz ze względu na wysoką śmiertelność, która sięga 20 % w przypadku uogólnionych zakażeń (6).

Najczęściej pałeczki *Listeria* są izolowane z krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego lub ropy, a rzadziej z próbek innego materiału klinicznego –jak na przykład próbki kału. Identyfikacja bakterii pozyskanych z powyższych materiałów, a także z próbek materiału nieklinicznego, np. z żywności, opiera się wykryciu cech biochemicznych – charakterystycznych dla rodzaju oraz gatunków pałeczek *Listeria* (9). Szczepy rozpoznane biochemicznie mogą podlegać dalszej identyfikacji serologicznej metodą opisaną przez *Seeliger i Höhne* (14). Ta klasyczna metoda serotypowania opiera się wykorzystaniu metody aglutynacji szkiełkowej

do identyfikacji antygenów somatycznych pałeczek *Listeria* oraz aglutynacji probówkowej do identyfikacji antygenów rzęskowych.

Opracowano również różne procedury ustalania typu serologicznego badanego szczepu pałeczek *Listeria* na podstawie badania genetycznego profilu szczepu. (1, 2, 5). Zastosowana w niniejszej pracy metoda *Doumitha* wykorzystuje reakcję multiplex PCR w celu wykrycia fragmentów genów: *lmo0737* i *lmo1118*, kodujących białka o dotychczas nie znanej funkcji, fragmentu sekwencji ORF2819 kodującej białko o funkcji regulatora transkrypcji i fragmentu sekwencji ORF2110, kodującej białko sekrecyjne a także fragmentu genu *prs,* kodującego białko regulujące ekspresję listeriolizyny O. Wyniki amplifikacji wymienionych sekwencji genowych pozwalają na podzielenie pałeczek *Listeria monocytogenes* na pięć genoserogrup: I.1 zawierającej typy serologiczne 1/2a i 3a, I.2 z serotypami 1/2c i 3c, II.1 z serotypami 4b, 4d i 4e, II.2 z serotypami 1/2b, 3b i 7 oraz III z serotypami 4a i 4c (4).

Istotne jest rozpoznanie typu serologicznego pałeczek *Listeria mononocytogenes*, ze względu na zróżnicowaną chorobotwórczość poszczególnych typów serologicznych. Doświadczalne zakażenia ciężarnych myszy wykazały, iż szczepy należące do typu serologicznego 1/2a, 1/2b i 4b wykazują zdolność kolonizacji przewodu pokarmowego i przenikania do wątroby i śledziony, gdzie przeżywają. W przeciwieństwie do wyżej wymienionych szczepy o serotypie 3a nie wykazywały takich właściwości (10). Prawidłowość tą potwierdzają również badania przeprowadzone na linii komórkowej Caco-2 (15). Typy serologiczne 1/2a, 1/2b i 4b są równocześnie najczęściej izolowanymi typami serologicznymi z przypadków listeriozy od ludzi (13).

Celem przeprowadzonych badań było określenie przynależności do genoserogrupy szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes* izolowanych z próbek materiału klinicznego, żywności oraz z próbek środowiskowych. Jednocześnie w celu weryfikacji uzyskanych wyników badań szczepy poddawano klasycznemu typowaniu serologicznemu z użyciem surowic dla antygenów somatycznych i rzęskowych.

MATERIAŁ I METODY

S z c z e p y Do pracy użyto 90 szczepów pałeczek z rodzaju *Listeria*: 75 szczepów *Listeria monocytogenes* izolowanych z próbek materiału klinicznego, żywności oraz z próbek środowiskowych, 10 wzorcowych szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes* oraz 5 szczepów wzorcowych należących do innych gatunków: *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* and *L. grayi*. Szczepy wzorcowe pałeczek *Listeria* użyte do badań pochodziły z kolekcji Instytutu Pasteura oraz z kolekcji NIZP-PZH (Tabela I). Szczepy pochodzące z próbek klinicznych, żywności i środowiskowych zostały nadesłane do reidentyfikacji do NIZP-PZH w okresie ostatnich 10 lat.

R e i d e n t y f i k a c j a s z c z e p ó w Szczepy przechowywano w postaci zamrożonej w temp. -70 °C. Po rozmrożeniu i namnożeniu na podłożu BHI Agar, szczepy przesiewano na podłoże Columbia Agar z 5 % dodatkiem krwi baraniej (BioMeriéux, Francja), a następnie określano ich właściwości biochemiczne przy użyciu klasycznych testów probówkowych dla następujących cech: produkcja kwasu z L-ramnozy, D-ksylozy, D-rybozy, oraz hydroliza eskuliny i hipuranu. Dla wszystkich szczepów wykonano również test CAMP (*Christie, Atkins, Munch-Petersen*) z β-hemolitycznym *Staphylococcus aureus* i *Rhodococcus equi*.

Genoserotypowanie. Określenie typu serologicznego pałeczek *Listeria monocytogenes* przeprowadzano metodą multiplex PCR zgodnie z procedurą opisaną przez *Doumith* i wsp. (4). Do mieszaniny reakcyjnej, zamiast DNA matrycowego izolowanego z badanych szczepów, dodawano masę bakteryjną w ilości 1-2 kolonie pobrane z podłoża BHI Agar, bezpośrednio przed reakcją. PCR przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler (Eppendorf, Germany), zgodnie z następującym programem: wstępna denaturacja DNA w temp. 94°C przez 3 min, a następnie 35 cykli złożonych z denaturacji DNA w 94°C przez 40 sek., wiązanie starterów w temp. 51°C przez 1 min 15 sek oraz wydłużanie produktu w temp. 72°C przez 1 min15 sek. Końcowe wydłużanie produktów przeprowadzano w temp. 72°C przez 7 min. Produkty amplifikacji rozdzielano w 1,5 % żelu agarozowym Basica LE (Prona, Hiszpania), a następnie uwidaczniano poprzez barwienie żelu bromkiem etydyny.

Serologiczne typowanie metodą klasyczną. Wszystkie szczepy pałeczek *Listeria mononocytogenes* typowano serologicznie z użyciem klasycznej metody aglutynacji szkiełkowej dla antygenów somatycznych i aglutynacji probówkowej dla antygenów rzęskowych. Do badań użyto mono- lub poliwalentnych surowic firmy Mast Diagnostic, zgodnie z zaleceniami producenta.

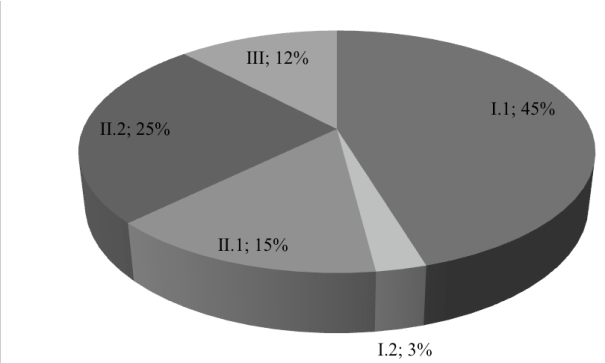
WYNIKI

Wyniki serologicznego typowania i genoserotypowania szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes* przedstawiono w tabelach I i II oraz ryciny 1 i 2. Wśród użytych do badań 15 szczepów wzorcowych dla 10 szczepów należących do gatunku *L. monocytogenes* metodą multiplex PCR potwierdzono przynależność do określonej genoserogrupy a metodą klasycznego typowania serologicznego ustalono serotyp potwierdzając pełną zgodność obu metod typowania (Tabela I). Szczepy wzorcowe pałeczek *Listeria* innych gatunków, niż

Tabela I. Wynik typowania serologicznego i genoserotypowania wzorcowych szczepów należących do gatunku *Listeria*

Oznakowanie	Gatunek	Serotyp	Genoserogrupa	Kolekcja
CLIP 74902	*Listeria monocytogenes*	1/2a	I.1	Kolekcja Instytutu Pasteura
CIP 78.34	*Listeria monocytogenes*	3a	I.1	Kolekcja Instytutu Pasteura
CLIP 74904	*Listeria monocytogenes*	1/2c	I.2	Kolekcja Instytutu Pasteura
CIP 78.36	*Listeria monocytogenes*	3c	I.2	Kolekcja Instytutu Pasteura
CLIP 74910	*Listeria monocytogenes*	4b	II.1	Kolekcja Instytutu Pasteura
PZH 10/07	*Listeria monocytogenes*	4d	II.1	NIZP-PZH†
PZH 11/07	*Listeria monocytogenes*	4e	II.1	NIZP-PZH†
CLIP 74903	*Listeria monocytogenes*	1/2b	II.2	Kolekcja Instytutu Pasteura
CIP 78.35	*Listeria monocytogenes*	3b	II.2	Kolekcja Instytutu Pasteura
PZH 9/07	*Listeria monocytogenes*	4a	III	NIZP-PZH†
CLIP 74914	*Listeria ivanovii*	5	-----	Kolekcja Instytutu Pasteura
CLIP 74915	*Listeria innocua*	6a	-----	Kolekcja Instytutu Pasteura
CLIP 73019	*Listeria grayi*	-----	-----	Kolekcja Instytutu Pasteura
CLIP 73020	*Listeria welshimeri*	6b	-----	Kolekcja Instytutu Pasteura
CLIP 73021	*Listeria seeligeri*	1/2b	-----	Kolekcja Instytutu Pasteura

† Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

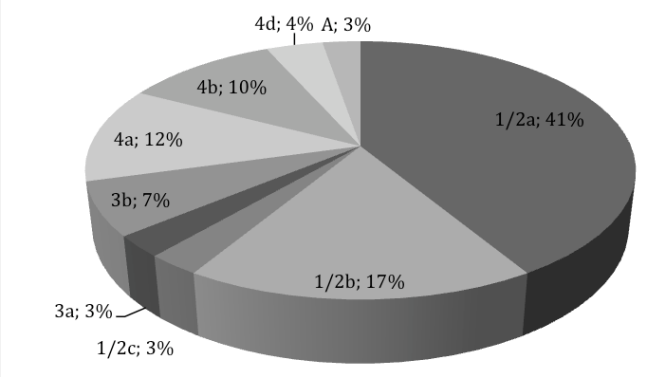


Ryc.1. Przynależność badanych szczepów *Listeria monocytogenes* do określonej genoserogrupy

Tabela II. Wynik typowania serologicznego i genoserotypowania badanych szczepów należących do gatunku Listeria monocytogenes

Źródło	Genoserogrupa	I.1			I.2		II.1			II.2			III	
	Serotyp	1/2a	3a	A†	1/2c	3c	4b	4d	4e	1/2b	3b	A†	4a	4c
Próbki mat. klinicznego		9	1	1	1	0	7	1	0	5	1	0	3	0
Próbki żywności		22	1	0	1	0	1	2	0	5	4	1	6	0
Próbki środowiskowe		0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
Ogółem / Odsetek		34 (45%)			2 (3%)		11 (15%)			19 (21%)			9 (12%)	

† Forma autoaglutynująca



Ryc. 2. Przynależność badanych szczepów *Listeria monocytogenes* do określonego typu serologicznego. A- szczepy autoaglutynujące

L. monocytogenes, stosując metodę multiplex PCR, rozpoznano co do rodzaju oraz jako nie należące do gatunku *L. monocytogenes*. W przypadku 73 szczepów na 75 badanych szczepów *L. monocytogenes* pochodzących z próbek materiału klinicznego i nieklinicznego stwierdzono, że w oznaczonych metodą multiplex PCR genoserogrupach znalazły się

zgodnie z danymi piśmiennictwa szczepy należące do określonego typu serologicznego ustalonego metodą klasyczną. I tak do genoserogrupy I.1 zaklasyfikowano 34 szczepy (45% wszystkich badanych szczepów *L. monocytogenes*), do genoserogrupy I.2 zaklasyfikowano 2 (3%) szczepy, do genoserogrupy II.1 zaklasyfikowano 11 (15%) szczepów, do genoserogrupy II.2 zaklasyfikowano 19 (25%) szczepów, a do genoserogupy III – 9 (12%) szczepów. Najliczniej reprezentowanym typem serologicznym był serotyp 1/2a z 31 przedstawicielami (41% wszystkich badanych *L. monocytogenes)*. Drugim co do częstości typem serologicznym był 1/2b (11 szczepów – 15%), a trzecim 4b (8 szczepów – 11%). W badanej grupie nie stwierdzono obecności szczepów należących do typów sertologicznych 3c, 4c i 4e. W przypadku 2 szczepów należących do genoserogrupy I.1 i II.2 nie udało się ustalić ich typu serologicznego ze względu na autoaglutynujące właściwości tych szczepów. Wyniki genoserotypowania, jak i typowania serologicznego metodą klasyczną badanych szczepów *Listeria monocytogenes* przedstawiono w tabeli II i na rycinie 1 i 2.

DYSKUSJA

Prezentowana praca przedstawia wyniki określania przynależności szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes* do grup serologicznych, na podstawie wyników genetycznego typowania metodą multiplex PCR a także przy użyciu klasycznego typowania serologicznego wg. *Seeliger i Höhne* (14).

Badane szczepy pałeczek *Listeria monocytogenes* najczęściej reprezentowały genoserogrupę I.1, a w szczególności typ serologiczny 1/2a. Drugą co do częstości występowania była genoserogrupa II.2, złożona w głównej mierze z przedstawicieli typu serologicznego 1/2b. Obie genoserogrupy, jak i wspomniane typy serologiczne należą do najczęściej występujących na świecie, co zostało wykazane przez wielu autorów (1, 8, 11, 13). Ponadto, analizując wyniki w obrębie grup szczepów o tym samym pochodzeniu (izolaty z próbek materiału klinicznego lub żywności), częstotliwość występowania poszczególnych genoserotypów i typów serologicznych zgodna jest z ogólnoświatową tendencją – najczęściej w grupie szczepów izolowanych z żywności identyfikowano przedstawicieli serotypu 1/2a (genoserogrupa I.1) (8). Natomiast w grupie szczepów pochodzących z próbek materiału klinicznego nie stwierdzono przewagi typu serologicznego 4b, uznanego na świecie, jako najczęściej wywołujący zakażenia inwazyjne u ludzi (8, 13). Pomimo, iż wszystkie szczepy użyte do badań wyizolowano od ludzi z przypadków inwazyjnej listeriozy, to jednak niewielka liczebność badanej grupy (29 szczepów) nie pozwala na wyciąganie takich wniosków.

W pracy porównywano również obie zastosowane metody ustalania przynależności do typu serologicznego pałeczek *Listeria monocytogenes.* Klasyczna metoda typowania serologicznego charakteryzuje się w porównaniu do genoserotypowania znaczną pracochłonnością i czasochłonnością. W przypadku, gdy wymagane jest szybkie rozpoznanie – może to stanowić problem. Uzyskane wyniki badań wykazały, iż genoserotypowanie wykazuje zgodność z metodą klasyczną, a ponadto znajduje zastosowanie również wobec szczepów o właściwościach autoaglutynujących, których identyfikacja co do typu serologicznego, jest niemożliwa w przypadku metody klasycznej. Wobec powyższych faktów należy uznać, iż metoda genoserotypowania szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes* może być rekomendowana jako metoda do rutynowego stosowania w laboratoriach diagnostyki bakteriologicznej.

G. Madajczak, D. Majczyna

GENOSEROTYPING OF LISTERIA MONOCYTOGENES IN MULTIPLEX PCR

SUMMARY

Listeria monocytogenes infection affects people throughout the all world, most often causing gastrointestinal disturbances, less inflammation of the central nervous system (meningitis, meningoencephalitis, absceses), sepsis, endocarditis and dispersed focal inflammation. Listeria monocytogenes infection in pregnant woman can lead also to premature birth or abortion. Listeriosis is a serious problem because of the high mortality in case of generalized infection, which can reach up to 20%. Listeria strains could be identified by determination of biochemical features – characteristic for each Listeria species. Biochemically identified strains could be serotyped using Seeliger method. Many authors developed a molecular biology-based methods of Listeria serotype determination The Doumith's method divide all Listeria monocytogenes serotypes for five genoserogroups. The purpose of this study was to determine the genoserogroups of Listeria monocytogenes strains and compare those results with results obtained by classical serotyping by Seeliger method. To this work 90 Listeria strains were used: 75 Listeria monocytogenes strains from clinical, food and environmental samples and 15 reference strains from Pasteur Institute collection and National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene collection. All strains were serotyped using liquid stable antisera for determination of O and H Listeria monocytogenes antigens (Mast Diagnostic, UK). Multiplex PCR for Listeria monocytogenes serovars differentiation were performed according to Doumith et all procedure. The genoserogroup obtained from multiplex PCR of 10 Listeria monocytogenes reference strains were compatible with real serotype. In case of non-Listeria monocytogenes reference strains in multiplex-PCR, they were identified as non-monocytogenes. In group of 75 non-reference strains isolated from human, food and environmental sources, 34 belonged to genoserogroup I.1, two strains to genoserogroup I.2, 11 strains to genoserogroup II.1, 21 strains belonged to genoserogroup II.2 and 9 strains to genoserogroup III.

PIŚMIENNICTWO

1. *Chen Y, Knabel, S J.* Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Bacteria of the Genus Listeria, Listeria monocytogenes, and Major Serotypes and Epidemic Clones of L. monocytogenes. App Env Microbiol. 2007; 73, 6299-304.
2. *De Santis E P L, Pilo A L, Cosseddu A M, Canu N A* i inni. Multiplex PCR for the identification and serotyping of L. monocytogenes isolated from sheep cheese-processing plants. Vet Res Commun. 2001; 31: 359-63.
3. *Doganay M.* Listeriosis: clinical presentation. FEMS Immun Medical Microbiol. 2003; 35: 173-5.
4. *Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C* i inni. Differentiation of the Major Listeria monocytogenes Serovars by Multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2004; 42, 3819-22.
5. *Doumith M, Cazalet C, Simoes N, Frangeul L* i inni. New aspects regarding evolution and virulence of Listeria monocytogenes revealed by comparative genomics and DNA arrays. Infect Immun. 2004; 72: 1072-83.
6. *Gerner-Smidt P, Ethelberg S, Schiellerup P, Christensen J J* i inni. Invasive listeriosis in Denmark 1994-2003: a review of 299 cases with special emphasis on risk factors for mortality. Clin Microbiol Infect. 2005; 11: 618-24.

7. *Gilot P, Genicot A, Andre P.* Serotyping and esterase typing for analysis of Listeria monocytogenes populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium. J Clin Microbiol. 1996; 34:1007–10.
8. *Hong E, Doumith M, Duperrier S, Giovannacci I* i inni. Genetic diversity of Listeria monocytogenes recovered from infected persons and pork, seafood and dairy products on retail sale in France during 2000 and 2001. J Food Microbiol. 2007; 114:187-94.
9. *Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, Staley J T* i inni. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. 1994; 566-567 Baltimore: Williams & Wilkins.
10. *Lammerding A M, Glass K A, Gendron-Fitzpatrick A* i inni. Determination of virulence of different strains of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by oral inoculation of pregnant mice. App Env Microbiol. 1992; 58: 3991-4000.
11. *Latorre L, Parisi A, Fraccalvieri R, Normanno G* i inni. Low prevalence of Listeria monocytogenes in foods from Italy. J Food Prot. 2007; 70: 1507-12.
12. *Ooi S T, Lorber B*. Gastroenteritis Due to Listeria monocytogenes. Clin Infect Dis. 2005; 40, 1327–32.
13. *Schuchat A, Swaminathan B, Broome C V.* Epidemiology of human listeriosis. Clin Microbiol Rev. 1991; 4:169-183.
14. *Seeliger H P R*, Höhne *K.* Serotyping of Listeria monocytogenes and related species. Methods Microbiol. 1979; 13: 31-49.
15. *Ziad W J, Bhunia A K.* Adhesion, Invasion, and Translocation Characteristics of Listeria monocytogenes Serotypes in Caco-2 Cell and Mouse Models. App Env Microbiol. 2003; 69: 3640–5.

Otrzymano: 4 II 2009 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii NIZP-PZH