

VYUŽITÍ METODY PCR-RFLP K DETEKCI POTENCIÁLNĚ INVAZIVNÍCH KMENŮ *L. monocytogenes*

TEREZA GELBÍČOVÁ^a
a RENÁTA KARPÍŠKOVÁ^{a,b}

^a Státní zdravotní ústav Praha, Odbor laboratoří hygieny výživy a bezpečnosti potravin Brno, Palackého 3a, 612 42 Brno, ^b Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Palackého 1-3, 612 42 Brno
gelbicova.t@seznam.cz

Došlo 2.2.11, přijato 3.3.11.

Klíčová slova: patogenita, internalin A, polymerasová řetězová reakce, restriční štěpení

Úvod

Listeria monocytogenes je ubikvitárně se vyskytující oportunní intracelulární bakterie schopná vyvolat onemocnění lidí i zvířat^{1,2}. *L. monocytogenes* je adaptovaná nejen na intracelulární životní cyklus, ale také na saprofytický způsob života v půdě a rozkládající se vegetaci^{3,4}. Bakterie *L. monocytogenes* je možné izolovat jak z vnějšího prostředí, tak z prostředí potravinářských podniků a širokého spektra potravin⁵⁻⁷.

Patogenita bakterií *L. monocytogenes* je dána jejich schopností infikovat a množit se v různých typech hostitelských buněk, včetně makrofágů a nefagocytujících buněk. Pro intracelulární cyklus *L. monocytogenes* jsou základními a v současnosti nejvíce prostudovanými faktory virulence pozitivně regulační faktor A (*prfA*), internaliny A a B (*inlA*, *inlB*), listeriolysin O (*hlyA*), fosfatidylinositol fosfolipasa C (*plcA*), fosfatidylcholin fosfolipasa C (*plcB*) a aktin polymerizující protein (*actA*). Tyto povrchové proteiny odpovídají za adhezi a penetraci do hostitelských buněk, únik z fagolysosomů umožňující následnou replikaci v cytosolu, a dále intracelulární motilitu a šíření z buňky do buňky⁸. Soubor základních genů virulence je obvykle detegován u všech kmenů *L. monocytogenes*^{9,10}. Delece jednoho či více genů kódujících klíčové faktory virulence může vést k rozdílům v patogenitě. Mutanty *L. monocytogenes* s delecí genů *prfA*, *hlyA* či *actA* se v modelových pokusech na myších vyznačují avirulencí⁸.

Změny v patogenním potenciálu *L. monocytogenes* lze vysvětlit i bodovými mutacemi genů virulence. Pro vstup *L. monocytogenes* intestinální bariérou během počáteční fáze infekce je klíčový povrchový protein internalin A, který zprostředkovává interakci s E-kadherinem

epiteliálních buněk¹¹. Celosvětově bylo, např. v USA¹² nebo ve Francii^{13,14}, popsáno několik bodových mutací vedoucích ke vzniku předčasného terminačního kodonu v genu *inlA*, PMSC (premature stop codon), vedoucího k neúplné syntéze internalinu A. V současnosti bylo identifikováno 18 přirozeně se vyskytujících mutací majících za následek vznik PMSC v genu *inlA* (cit.¹⁵). Kmeny *L. monocytogenes* s produkcí zkrácené formy internalinu A, v důsledku bodových mutací, mají sníženou schopnost napadat epitelální buňky tkáňových kultur a vykazují nižší virulenci u savčích hostitelů^{12-14,16}. Pro rychlý screening těchto potenciálně neinvazivních kmenů *L. monocytogenes* je možné využít metodu RFLP (restriction fragment length polymorphism), umožňující rychlou detekci polymorfismu genu *inlA* (cit.^{12,17}).

Experimentální část

Vyšetřované kmeny *L. monocytogenes*

Kmeny pocházely ze sbírky Národní referenční laboratoře pro listérie (Státního zdravotního ústavu – Odboru laboratoří hygieny výživy a bezpečnosti potravin, Brno). Byly uchovávány v glycerinovém médiu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Celkem bylo vyšetřeno 151 kmenů *L. monocytogenes*. Testováno bylo 38 humánních, 101 potravinových a 12 kmenů pocházejících z vnějšího prostředí. Před provedením typizace byly kmeny oživeny vyočkováním na krevní agar (Bio-Rad, Francie) a inkubovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin za aerobních podmínek.

Sérotypizace

Sérotyp byl určen metodou skličkové aglutinace za použití komerčně dostupných antisér (Denka Seiken, Japonsko) a následně potvrzen metodou PCR (polymerasové řetězové reakce)^{18,19} s použitím PPP polymerasy (Top-Bio, ČR) a primerů syntetizovaných firmou Generi Biotech (ČR).

Detekce genů virulence

K detekci genů virulence byla použita kombinace čtyř PCR: **1.** detekce *prfA* a *plcA*, **2.** *hlyA* a *actA*, **3.** *plcB* a **4.** *inlA*, *inlC*, *inlJ* a *inlB* (tabulka I). Pro všechny reakce byly použity primery syntetizované firmou Generi Biotech (ČR), PPP polymerasa (Top-Bio, ČR) nebo Qiagen Multiplex PCR Kit (Bio-Consult, ČR).

PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)

Polymorfismus genu *inlA* u kmenů *L. monocytogenes* byl sledován metodou PCR-RFLP s využitím primerů seq01 a seq02 (Generi Biotech, ČR)¹⁷. Amplifikovaný produkt *inlA* (733 bp) byl štěpen restriční endonukleasou *AfuI* (BioLabs, UK). Detekce produktů a fragmentů restričního štěpení byla provedena elektroforeticky v 1,5 až

Tabulka I

Přehled primerů použitých při stanovení sérotypu, detekci genů virulence a určení RFLP profilu (polymorfismus délky restričních fragmentů)

Gen	Velikost produktu	Zdroj	PCR ^a
<i>lmo0737</i>	691 bp	Doumith a spol. ¹⁹	sérotypizace
<i>lmo1118</i>	906 bp	Doumith a spol. ¹⁹	
ORF2819	471 bp	Doumith a spol. ¹⁹	
ORF2110	597 bp	Doumith a spol. ¹⁹	
<i>prs</i>	370 bp	Doumith a spol. ¹⁹	
<i>flaA</i>	538 bp	Borucki a Call ¹⁸	
<i>prfA</i>	274 bp	D'Agostino a spol. ³⁰	virulence-1. PCR
<i>plcA</i>	129 bp	Jaradat a spol. ⁹	
<i>hlyA</i>	456 bp	Aurora a spol. ²⁸	virulence-2. PCR
<i>actA</i>	385/268 bp	Jaradat a spol. ⁹	
<i>plcB</i>	261 bp	Jaradat a spol. ⁹	virulence-3. PCR
<i>inlA</i>	800 bp	Liu a spol. ³¹	virulence-4. PCR
<i>inlC</i>	517 bp	Liu a spol. ³¹	
<i>inlJ</i>	238 bp	Liu a spol. ³¹	
<i>inlB</i>	146 bp	Jaradat a spol. ⁹	
<i>inlA</i>	733 bp	Rousseaux a spol. ¹⁷	RFLP

^a PCR – polymerasová řetězová reakce

3,5% gelu (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo) s následným obarvením v roztoku ethidiumbromidu a vizualizací pod UV světlem.

Výsledky a diskuse

Na základě fylogenetických studií lze *L. monocytogenes* rozdělit do tří genetických linií. Linie I zahrnuje sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, 4ab a 7, linie II zahrnuje sérotypy 1/2a, 3a, 1/2c a 3c a do linie III patří sérotypy 4a a 4c (cit.^{20,21}). S humánními případy listerióz podle řady autorů souvisí zejména kmeny zařazené do linií I a II, jedná se především o sérotypy 1/2a, 1/2b a 4b (cit.^{10,22}). Naproti tomu kmeny zařazené do linie III jsou označovány za patogenní zejména pro zvířata a na vzniku onemocnění lidí se podílejí jen ojediněle^{10,23}. V České republice patří mezi nejrozšířenější sérotyp 1/2a, a to nejen v potravinách²⁴, ale také v humánní populaci²⁵. Doposud u nás nebyl zaznamenán jediný případ listeriózy vyvolaný sérotypem 1/2c, přestože v potravinách se kmeny tohoto sérotypu vyskytují. Vzhledem k těmto rozdílům bývá často diskutována otázka různého patogenního potenciálu jednotlivých genetických linií a sérotypů *L. monocytogenes*.

V souboru 151 testovaných kmenů *L. monocytogenes* získaných z klinických případů listerióz i kmenů pocházejících z potravin a vnějšího prostředí byly detegovány

všechny geny významné v patogenezi *L. monocytogenes* (*prfA*, *hlyA*, *plcA*, *plcB*, *actA*, *inlA*, *inlB*). Rozdíly ve výskytu testovaných genů virulence nebyly zaznamenány ani mezi zastoupenými sérotypy. Geny patřící do ostrůvku patogenity LIPI-1 (*Listeria pathogenicity island 1*) a geny *inlA* a *inlB* jsou podle výsledků řady studií^{9,10} stabilní součástí genomu *L. monocytogenes*. Kromě výše uvedených genů byl sledován také výskyt genů *inlC* a *inlJ*, kódujících internaliny C a J, jejichž funkce ve virulenci zatím není zcela známa¹¹, ačkoli jsou obvykle detegovány u všech kmenů *L. monocytogenes*^{26,27}. Absence genů *inlC* a *inlJ* by mohla být jednou z příčin nízké patogenity kmenů *L. monocytogenes* sérotypu 4a. Bylo zjištěno, že kmeny tohoto sérotypu vykazují vyšší genetickou příbuznost s nepatogenním druhem *L. innocua*, který také neprodukuje internaliny C a J (cit.^{23,26}). V této studii byly geny *inlC* a *inlJ* prokázány u všech námi testovaných kmenů *L. monocytogenes*.

Ke sledování virulence *L. monocytogenes* je možné využít např. zkoušky *in vivo* na myších, či techniky *in vitro* na tkáňových kulturách nebo molekulárně biologické metody: PCR, Western blot analýzu či sekvenaci^{13,27,28}. Za rychlou a finančně dostupnou variantu monitorování patogenního potenciálu *L. monocytogenes* lze považovat i techniku RFLP (polymorfismus délky restričních fragmentů). V této studii byla využita metoda PCR-RFLP umožňující detekci polymorfismu genu *inlA* pro screening kmenů

Tabulka II

Původ testovaných kmenů s uvedením jejich sérotypu a RFLP profilu (polymorfismus délky restričních fragmentů)

Typ kmene	RFLP profil	Genetická linie	Sérotyp	Původ	Počet kmenů
Invazivní	2	I	1/2b	humánní	8
				potravin	28
				prostředí	0
	2	I	4b	humánní	8
				potravin	17
				prostředí	2
	2	I	4d	humánní	0
				potravin	3
				prostředí	0
	3	II	1/2a	humánní	5
potravin				6	
prostředí				2	
5	II	1/2a	humánní	1	
			potravin	3	
			prostředí	0	
Potenciálně neinvazivní	1	II	1/2a	humánní	11
				potravin	11
				prostředí	6
	4	II	1/2a	humánní	5
				potravin	11
				prostředí	2
	4	II	1/2c	humánní	0
potravin				22	
				prostředí	0

L. monocytogenes s různou schopností vnikat do epiteliálních buněk. Ve shodě s výsledky publikovanými ve studii Lyautey a spol.²⁹ jsme prokázali souvislost mezi jednotlivými RFLP profily a sérovými skupinami. U kmenů linie I (sérotyp 1/2b, 4b a 4d) byl detegován pouze RFLP profil 2. Kmeny *L. monocytogenes* linie II (sérotyp 1/2a a 1/2c) patřily k RFLP profilům 1, 3, 4 a 5.

Z celého souboru testovaných kmenů představovalo 52,3 % invazivní kmeny profilu 2 a 3, u kterých byl podle studie, kterou zveřejnil Rousseaux a spol.¹³, vždy prokázán funkční internalin A o molekulové hmotnosti 80 kDa. RFLP profil 5, který je rovněž spojován s produkcí funkčního internalinu A, jsme detegovali pouze ojediněle (6,3 %) podobně jako v jiných studiích^{17,29}. Potenciálně patogenní byly i izoláty *L. monocytogenes* pocházející z environmentálních zdrojů, shodné výsledky potvrzuje i studie z Kanady²⁹.

K RFLP profilu 1 a 4, které jsou spojovány s produkcí zkrácené formy internalinu A a sníženou schopností invadovat do epiteliálních buněk tkáňových kultur¹⁷, patřilo 43,6 % potravinových kmenů *L. monocytogenes* a 66,7 %

kmenů z vnějšího prostředí. Toto procentuální rozložení pravděpodobně nesouvisí s nižší virulencí vyšetřovaných environmentálních kmenů, ale spíše s dominantním zastoupením sérotypu 1/2a v této skupině (83,3 %). Kmeny s profilem 1 a 4 mohou také produkovat funkční formu internalinu A (cit.¹³). Tomu odpovídá skutečnost, že u 42,1 % humánních kmenů, získaných z klinických případů listeriózy, byly rovněž detegovaly RFLP profily 1 a 4. Zajímavé bylo zjištění, že všechny kmeny sérotypu 1/2c patřily výhradně k restričnímu profilu 4, ale žádný kmen se shodným sérotypem se nepodílel na invazivní formě listeriózy u lidí.

Pouze na základě výsledků RFLP nelze uzavřít, zda mají kmeny *L. monocytogenes* patřící k profilům 1 a 4 sníženou invazivní schopnost. Rousseaux a spol.¹⁷ sekvenční analýzou fragmentu *inlA* (733 bp) prokázal, že amplifikovaný produkt není nositelem všech bodových mutací odpovědných za produkci zkráceného internalinu A. U kmenů sérotypu 1/2a a 1/2c, u kterých bývají detegovaly profily spojované s nižší invazivitou *L. monocytogenes*, je k prokázání virulence nutná kombi-

nace metody RFLP s dalšími technikami, případně její optimalizace. Optimalizace je možná amplifikací delšího fragmentu *inlA* s vyšším obsahem bodových mutací či použitím dalších restričních endonukleas¹⁷. Ke zvýšení rozlišovací schopnosti použité metody by mohla vést u kmenů *L. monocytogenes* linie II také její kombinace s RFLP technikou umožňující detekci PMSC mutace typu 3 v genu *inlA*. Tento typ mutace je u kmenů linie II nejčastější^{12,15}. Podle výsledků řady studií jsou nositeli mutací vedoucích ke vzniku zkráceného internalinu A častěji kmeny *L. monocytogenes* pocházející z potravin než od lidí^{12,14,15}. Na vzniku humánních listerióz se však mohou podílet i kmeny *L. monocytogenes* sérotypu 1/2a a 1/2c s bodovými mutacemi genu *inlA* (cit.¹⁴). Při hodnocení virulence *L. monocytogenes* je nutné brát v úvahu, že na patogenitě těchto bakterií se podílí celá řada dalších faktorů.

Závěr

Dosažené výsledky potvrdily, že technika RFLP genu *inlA* je dostupná a časově nenáročná typizační metoda, která umožňuje orientační screening potenciálně invazivních kmenů *L. monocytogenes*.

Práce vznikla za finanční podpory projektu MŠMT NPV 2B08050 a VZ MSM 6215712402.

LITERATURA

- Vázquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J.: *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 584 (2001).
- K. Demnerova, J. Pazlarova: *Chem. Listy* 103, 641 (2009).
- Freitag N. E., Port G. C., Miner M. D.: *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 623 (2009).
- Blažková M., Karamonová L., Fukal L., Rauch P.: *Chem. Listy* 99, 467 (2005).
- Fugett E. B., Schoonmaker-Bopp D., Dumas N. B., Corby J., Wiedmann M.: *J. Clin. Microbiol.* 45, 865 (2007).
- Blažková M., Koets M., Rauch P., van Amerongen A.: *Eur. Food Res. Technol.* 229, 867 (2009).
- Blažková M., Karamonová L., Greifová M., Fukal L., Hoza I., Rauch P., Wyatt G.: *Eur. Food Res. Technol.* 223, 821 (2006).
- Roberts A. J., Wiedmann M.: *Cell Molecul Life Sci.* 60, 904 (2003).
- Jaradat Z. W., Schutze G. E., Bhunia A. K.: *Int. J. Food Microbiol.* 76, 1 (2002).
- Doumith M., Cazalet Ch., Simoes N., Frangeul L., Jacquet Ch., Kunst F., Martin P., Cossart P., Glaser P., Buchrieser C.: *Inf. Immun.* 72, 1072 (2004).
- Bierne H., Sabet C., Personnic N., Cossart P.: *Microb. Infect* 9, 1156 (2007).
- Nightingale K. K., Windham K., Martin K. E., Yeung M., Wiedmann M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8764 (2005).
- Olier M., Piere F., Rousseaux S., Lemaître J. P., Rousset A., Piveteau P., Guzzo J.: *Inf. Immun.* 71, 1217 (2003).
- Jacquet Ch., Doumith M., Gordon J. I., Martin P. M. V., Cossart P., Lecuit M.: *J. Inf. Dis.* 189, 2095 (2004).
- Van Stelten A., Nightingale K. K.: *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7365 (2010).
- Nightingale K. K., Ivy R. A., Ho A. J., Fortes E. D., Njaa B. L., Peters R. M., Wiedmann M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6570 (2008).
- Rousseaux S., Olier M., Lemaître J. P., Piveteau P., Guzzo J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2180 (2004).
- Borucki M. K., Call D. R.: *J. Clin. Microbiol.* 41, 5537 (2003).
- Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P.: *J. Clin. Microbiol.* 42, 3819 (2004).
- Wiedmann M., Bruce J. L., Keating C., Johnson A. E., McDonough P. L., Batt C. A.: *Inf. Immun.* 65, 2707 (1997).
- Nadon C. A., Woodward D. L., Young C., Rodgers F. G., Wiedmann M.: *J. Clin. Microbiol.* 39, 2704 (2001).
- Farber J. M., Peterkin P. I.: *Microbiol. Rev.* 55, 476 (1991).
- Chen J., Jiang L., Chen X., Luo X., Chen Y., Yu Y., Tian G., Liu D., Fang W.: *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 238 (2009).
- Gelbičová T., Karpíšková R.: *CJSF sp.* 2, S2-3 (2009).
- Karpíšková R., Gelbičová T.: *EMI* 57, 137 (2008).
- Chen J., Jiang L., Chen X., Lou X., Chen Y., Yu Y., Tian G., Liu D., Fang W.: *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 238 (2009).
- Chen J., Luo X., Jiang L., Jin P., Wei W., Liu D., Fang W.: *Food Microbiol.* 26, 103 (2009).
- Aurora R., Prakash A., Prakash S., Rawool D. B., Barbudde S. B.: *Food Control* 19, 641 (2008).
- Lyautey E., Lapen D. R., Wilkes G., McCleary K., Pagotto F., Tyler K., Hartmann A., Piveteau P., Rieu A., Robertson W. J., Medeiros D. T., Edge T. A., Gannon V., Topp E.: *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5401 (2007).
- D'Agostino M., Wagner M., Vázquez-Boland J. A., Kuchta T., Karpiskova R., Hoorfar J., Novella S., Scortti M., Ellison J., Murray A., Fernandes I., Kuhn M., Pazlarova J., Heuvelink A., Cook N.: *J. Food Prot.* 67, 1646 (2004).
- Liu D., Lawrence M. L., Austin F. W., Ainsworth A. J.: *J. Microbiol. Methods* 71, 133 (2007).

T. Gelbíčová^a and R. Karpíšková^{a,b} (^a National Institute of Public Health Prague, ^b University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno): **Use of PCR-RFLP for the Detection of Potentially Invasive Strains of *L. monocytogenes***

Internalin A, encoded by the gene *inlA*, is the key virulence factor, which allows crossing the intestinal barrier during the initial stages of an infection. The aim of this study was to evaluate the potential of RFLP (restriction fragment length polymorphism) technique of *inlA* for monitoring the occurrence of potentially invasive strains of *L. monocytogenes* from different sources. The ability to invade the epithelial host cells of the intestinal barrier was detected in 52.3 % of the investigated strains. RFLP profiles (1 and 4) associated with the production of truncated form of the internalin A and with the decreased invasiveness was detected only in serotype 1/2a and 1/2c. These RFLP profiles were found in strains isolated from food (43.6 %) and the external environment (66.7 %), but also in some human strains (42.1 %). Following the *inlA* polymorphism by PCR-RFLP is a fast screening technique for evaluation of alteration in pathogenic potential of *L. monocytogenes*.