

Charakteristika a prevalence klonů *Listeria monocytogenes* izolovaných od pacientů v letech 2001-2008 v České republice

Karpíšková R.^{1,2}, Gelbíčová T.^{1,2}

¹Státní zdravotní ústav Praha, Centrum hygieny potravinových řetězců, Palackého 3a, Brno

²Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Palackého 1-3, Brno

Souhrn

Cíl: Cílem práce bylo charakterizovat humánní izoláty *Listeria monocytogenes* pomocí vybraných typizačních metod a ověřit možnosti jejich využití při epidemiologických šetřeních.

Metodika: Typizováno bylo 78 humánních izolátů získaných v letech 2001-2008. Sérotypizace byla prováděna skličkovou aglutinací a multiplex PCR a dále byla provedena makrorestrikční analýza bakteriálního genomu analyzovaných kmenů.

Výsledky: Sérotyp 1/2a patřil k dominantním, dále byly detekovány sérotypy 1/2b a 4b, které byly zastoupeny jen ojediněle. Metoda makrorestrikční analýzy umožnila odlišit 20 odlišných pulzotypů. Porovnáním těchto výsledků s pulzotypy detekovanými u potravinových izolátů byly naznačeny možné souvislosti mezi sporadickými výskyty onemocnění a suspektní vehikula některých listerióz.

Závěr: Z dosažených výsledků vyplývá, že by na národní úrovni měly být všechny humánní izoláty typizovány a analyzovány. Tím by se mohlo předejít pozdnímu odhalení hromadného výskytu listerióz, rychleji odhalit možné zdroje infekce a snížit počet postižených osob.

Klíčová slova: Sérotypizace – makrorestrikční analýza – *Listeria monocytogenes* – humánní a potravinové izoláty.

Summary

Karpíšková R., Gelbíčová T.: Characterization and Prevalence of Clones of *Listeria monocytogenes* Isolated from Patients in 2001-2008 in the Czech Republic

Objectives: To characterize human isolates of *Listeria monocytogenes* by typing methods and to test them for use in epidemiological investigations.

Methods: Typing was carried out in 78 human isolates obtained in 2001-2008. Slide agglutination and multiplex PCR were used for serotyping. Genome macrorestriction analysis of the analyzed strains was performed.

Results: Serotype 1/2a was predominant, serotypes 1/2b and 4b were detected sporadically. DNA macrorestriction analysis yielded 20 pulsotypes. The comparison of these results with the data obtained for food isolates suggested possible linkage between sporadic cases of listeriosis and suspected vehicles of infection.

Conclusion: Based on the obtained results, all human isolates should be typed and analyzed at the national level. It would be helpful in preventing late detection of listeriosis outbreaks, rapidly detecting sources of infection and reducing the number of cases.

Key words: serotyping – macrorestriction analysis – *Listeria monocytogenes* – human and food isolates.

Listeria monocytogenes je fakultativně intracelulární bakterie, schopná vyvolat onemocnění u lidí i zvířat. V humánní populaci je prevalence listerióz relativně nízká, ale závažnost onemocnění je vysoká, smrtelnost se obvykle pohybuje od 20 do 30 %. Listerióza

postihuje zejména rizikové skupiny populace, kam řadíme osoby se sníženou imunitou, starší 65 let nebo těhotné ženy a novorozence [13]. Listeriózy jsou většinou hlášeny jako sporadické případy, vzácněji pak jako případy s epidemiologickou souvislostí. Zatímco

u hromadných onemocnění se obvykle daří vyhledat společný zdroj infekce, u sporadických případů tomu tak není a jejich zdroj zůstává neobjasněn. Šetření těchto případů je v porovnání s ostatními alimentárními onemocněními složitější, a to především z důvodů dlouhé inkubační doby (od několika dnů až po několik měsíců), nízké incidence onemocnění a výskytu geograficky oddělených případů.

Z výroční zprávy o zoonózách Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) za rok 2006 [1] vyplývá, že počet hlášených onemocnění listeriózou se v zemích EU zvýšil o 8,6 %, z 1427 případů v roce 2005 na 1 583 v roce 2006. Roční incidence činila v roce 2006 0,3 případů na 100 000 obyvatel, 56 % listeriových infekcí bylo hlášeno u osob starších 65 let. Nejvyšší nemocnost byla hlášena v Dánsku, Finsku a Lucembursku, zvýšený výskyt byl zaznamenán i ve Francii a České republice, kde byl způsoben hromadným onemocněním probíhajícím na přelomu let 2006 a 2007.

V souvislosti se vznikem listeriózy bývá uváděna konzumace širokého spektra potravin zahrnujícího masné, mléčné, rybí, lahůdkářské a cukrářské výrobky, mořské plody a zeleninu [4, 6]. Mezi potenciálně nebezpečné patří zejména potraviny určené k přímé spotřebě, skladované při chladírenských teplotách.

Při epidemiologických šetřeních se v poslední době stále více uplatňují různé molekulární metody, které umožňují zjistit klonální identitu nebo příbuznost jednotlivých izolátů. To se týká nejen došetřování epidemiologických souvislostí v humánní populaci, ale také sledování zdrojů a cest šíření listerií v prostředí farem potravinových zvířat, potravinářských podniků a tržní sítě.

Základní typizační metodou je u *L. monocytogenes* obvykle sérotypizace [7, 11]. V současnosti se u *L. monocytogenes* rozlišuje třináct sérotypů. Na vzniku humánních listerióz se však podílejí především sérotypy 1/2a, 1/2b a 4b [4]. Vzhledem k dominantnímu výskytu těchto tří sérotypů je využití této metody v praxi omezené [11]. Z mezinárodně standardizovaných molekulárních metod je k typizaci využívána metoda makrorestrikční analýzy, založená na štěpení bakteriálního genomu restrikčními endonukleázami a následné separaci fragmentů v pulzním poli [7, 11].

Cílem naší studie bylo charakterizovat humánní izoláty *L. monocytogenes* pomocí vybraných typizačních metod (sérotypizace a makrorestrikční analýza) a ověřit možnosti jejich využití při epidemiologických šetřeních.

Materiál a metodika

Vyšetřované izoláty

Izoláty *L. monocytogenes* pocházely ze sbírky Národní referenční laboratoře pro listerie (Státního zdravotního ústavu – Centra hygieny potravinových řetězců), byly skladovány v glycerinovém médiu při -80 °C. Celkem bylo v období let 2001 až 2008 shromážděno 78 humánních izolátů *L. monocytogenes* (do studie byl od každého pacienta zařazen jen jeden izolát). Před provedením typizace byly kmeny oživeny vyočkováním na krevní agar (Bio-Rad, USA) a inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin za aerobních podmínek.

Sérotypizace

U všech izolátů byl určen sérotyp metodou sklíčkové aglutinace za použití antisér firmy Denka Seiken (Japonsko) a následně potvrzen pomocí multiplex PCR [3] s použitím PPP polymerázy (Top-Bio, ČR) a primerů syntetizovaných firmou Generi Biotech (ČR).

Makrorestrikční analýza (PFGE)

Makrorestrikční analýza s použitím endonukleázy *AscI* (BioLabs, UK) byla provedena podle protokolu PulseNet Europe [9].

Výsledky a diskuse

Na základě fylogenetických studií jsou *L. monocytogenes* děleny do 3 linií. Linie I zahrnuje kmeny sérotypů 4b, 1/2b, a 3b [2], linie II sérotypů 1/2a, 1/2c, a 3c [5, 14]. Linie III byla charakterizována později a zahrnuje sérotypy 4a a 4c, které se však na onemocnění lidí podílejí minimálně [14]. Na vzniku humánních listerióz se z více než 90 % podílí sérotypy 1/2a, 1/2b a 4b, ačkoli klastř genů virulence je obvykle detekován u všech sérotypů *L. monocytogenes* [4, 10].

Humánní kmeny analyzované v naší studii pocházely od pacientů se sporadickým onemocněním (28 případů) i z případů s epidemiologickou souvislostí (50 případů, jedna epidemie). Sérotyp 1/2a patří v České republice k dominantním. Byl potvrzen u 66 případů (84,6 %), pokud by nebyly započítány epidemické případy, jednalo by se o 16 případů (57,1 %). Podobně jako v ostatních vyspělých státech světa se na vzniku humánních listerióz podílely i sérotypy 1/2b a 4b, které však byly detekovány jen ojediněle. Detailní výsledky sérotypizace uvádí tabulka 1.

Někteří zahraniční autoři uvádějí, že sérotyp 4b je nejvíce virulentní a podílí se zejména na epidemických výskytech listerióz a to přesto, že je z potravin izolován v porovnání s ostatními sérotypy vzácně [4, 5, 8]. Z výsledků naší studie ale vyplývá, že prevalence *L. monocytogenes* sérotypu 4b je v ČR nízká, a to jak u humánních případů, tak v potravinách.

Detailní výsledky makrorestrikční analýzy izo-

látů *L. monocytogenes* všech tří sérotypů uvádí tabulka 2. U sérotypu 1/2a bylo zjištěno 11 pulzních profilů, u sérotypu 1/2b bylo potvrzeno 5 profilů, u sérotypu 4b byly zjištěny jen 4 profily. To ukazuje na velkou heterogenitu kmenů dominantního sérotypu 1/2a. Kmeny náležející k sérotypu 4b jsou naopak více homogenní, než jiné sérotypy [12].

Výskyt shodných klonů *L. monocytogenes* izolovaných od pacientů v průběhu několika měsíců naznačuje možné epidemiologické souvislosti mezi jednotlivými případy. Například v srpnu roku 2007 byly do NRL pro listerie odeslány dva humánní izoláty sérotypu 1/2b, shodného pulzoty-

Tab. 1. Rok izolace, počet a sérotyp vyšetřovaných kmenů *L. monocytogenes*

Table 1. Years of isolation, numbers and serotypes of tested strains of *L. monocytogenes*

Rok	Počet izolátů		Sérotyp	
		1/2a	1/2b	4b
2001	1	1	0	0
2004	1	1	0	0
2005	2	1	0	1
2006	27	25 (*23)	2	0
2007	39	32 (*27)	4	3
2008	8	6	0	2
celkem	78	66 (*50)	6	6

* kmeny v epidemiologické souvislosti

* epidemiologically linked strains

Tab. 2. Označení a počet pulzotypů *L. monocytogenes* podle sérotypu

Table 2. *L. monocytogenes* pulsotypes and numbers of isolates by serotype

Sérotyp					
1/2a		1/2b		4b	
Označení pulzotypu	Počet izolátů	Označení pulzotypu	Počet izolátů	Označení pulzotypu	Počet izolátů
L700	*50	L506	1	L200	2
L702	1	L508	1	L203	2
L711	1	L511	1	L204	1
L712	1	L514	2	L205	1
L713	1	L515	1		
L716	3				
L717	5				
L719	1				
L721	1				
L731	2				
L733	1				

* kmeny v epidemiologické souvislosti

* epidemiologically linked strains

pu L514. Jednalo se o ženu narozenou v roce 1934 a muže narozeného v roce 1946. Zpětným šetřením bylo dohledáno, že muž pocházel z okresu Žďár nad Sázavou a případ byl označen jako sporadický, bez epidemiologické souvislosti. Onemocnění ženy z jihomoravského kraje nebylo v Epidatu vykázáno, souvislosti nebyly zjišťovány.

Další možná epidemiologická souvislost byla zjištěna mezi případy onemocnění dvou mužů vyvolanými klonem L731 sérotypu 1/2a. První muž narozený v roce 1983, onemocněl v prosinci roku 2007 na Plzeňsku, druhý narozený v roce 1936, onemocněl v lednu 2008 na Chrudimsku. Oba případy byly hlášeny jako sporadické.

Klon L717 (sérotyp 1/2a) byl v roce 2007 a 2008 potvrzen u 5 pacientů. Jednalo se o muže narozeného v roce 1942, který onemocněl na Frýdecko-Místecku v březnu 2007, těhotnou ženu z Prahy, narozenou v roce 1976 a jejího novorozeného syna, oba případy byly hlášeny v srpnu 2007, dal-

ší ženu z Prahy narozenou v roce 1949, která onemocněla v září roku 2007 a dále muže z Plzeňska narozeného v roce 1945, který onemocněl v červnu roku 2008.

Typizační metody mohou také pomoci při hledání možného vehikula infekce. Potravinu, která vyvolala na přelomu let 2006 a 2007 epidemii listeriózy, byla odhalena právě za použití typizačních metod. Jednalo se o zrající sýr obsahující vysoké počty *L. monocytogenes* sérotypu 1/2a, pulzotypu L700. Souvislost mezi konzumací těchto sýrů a vznikem onemocnění byla u některých pacientů potvrzena i při epidemiologickém šetření.

Dlouhodobě prováděná typizace potravinových izolátů umožňuje vytvoření databáze obsahující detailní informace o charakteristice jednotlivých klonů *L. monocytogenes* a dále o čase, místě, typu potravinářského výrobku, ze kterého byl kmen izolován, a o jeho výrobcí. Tyto informace pak mohou významně napomoci při epidemiologickém

šetření. Tento fakt dokazují v současnosti dosažené výsledky typizace humánních a potravinových izolátů. U výrobce (A) vyrábějícího zrající sýr pod mazem je po dobu několika let detekován klon sérotypu 1/2a pulzotypu L713, který doposud nebyl izolován z žádné jiné potraviny. U výrobce (B) vyrábějícího plísňový zrající sýr je dlouhodobě detekován klon sérotypu 1/2a pulzotypu L719. V roce 2007 byl shodný klon, jenž se vyskytuje v sýrech výrobce A, zjištěn u pacienta narozeného v roce 1944, který onemocněl na Karvinsku. U pacienta narozeného v roce 1922 byl v roce 2008 potvrzen klon opakovaně detekovaný výhradně v sýrech výrobce B. Je vysoce pravděpodobné, že k onemocnění došlo u obou mužů po konzumaci specifického druhu sýra.

Závěr

Typizační metody přispívají k odhalování zdrojů *L. monocytogenes* a cest jejich šíření. Kontinuální analýza potravinových a humánních izolátů *L. monocytogenes* umožňuje sledovat aktuální situaci na národní úrovni, odhalovat možné epidemiologické souvislosti mezi případy a poskytovat epidemiologům informace o možných vehikulech infekce. Zavedení uvedených postupů by snížilo možnost opakování nepříznivé epidemiologické situace v ČR na přelomu let 2006 a 2007.

Práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin MSM6215712402, projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR NPV 2B08050.

Literatura

- Anonymus.** The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. The European Food Safety Authority Journal, 2007, 130.
- Brosch, R., Chen, J., Luchansky, J. B.** Pulsed-field fingerprinting of *Listeriae*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60, 2584-2592.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet et al.** Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. J Clin Microbiol., 2004, 42, 3819-3822.
- Farber, J.M. and Peterkin, P.I.** *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Reviews, 1991, 55, 476-511.
- Jeffers, G. T., Bruce, J.L., McDonough, P., Scarlett, J. et al.** Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. Microbiology, 2001, 147, 1095-1104.
- Karpíšková, R., Koláčková, I.** 2004. *Listeria monocytogenes* a nálezy tohoto patogena v potravinách v tržní síti. Maso, 2004, 6, 4-6.
- López, V., Villatoro, D., Ortiz, S., López, P. et al.** Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. Meat Sci., 2008, 78, 130-134.
- McLauchlin, J.** Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1990, 9, 210-213.
- PulseNet Europe. Standardized protocol for molecular subtyping of *Listeria monocytogenes* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). 2002,
- Schuchat, A., Swaminathan, B. and Broome, C.V.** Epidemiology of human listeriosis. Clin Microbiol Rev, 1991, 4, 169-183.
- Thévenot, D., Delignette-Muller, M.L., Christieans, S., Leroy, S. et al.** Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 French pork meat salting-curing plants and their products. Int J Food Microbiol, 2006, 112, 153-161.
- Tran, H. L. and Kathariou, S.** Restriction fragment length polymorphisms detected with novel DNA probes differentiate among diverse lineages of serogroup 4 *Listeria monocytogenes* and identify four lineages in serotype 4b. Appl Environ Microbiol, 2002, 68, 59-64.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T. et al.** *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Reviews, 2001, 14, 584-640.
- Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E. et al.** Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. Infect Immun, 1997, 65, 2707-2716.

Do redakce došlo 8.8.2008

MVDr. R. Karpíšková, PhDr.
Státní zdravotní ústav
Centrum hygieny potravinových řetězců
Palackého 3a
612 42 Brno
E-mail: karpiskova@chpr.szu.cz