

Agnieszka Kołakowska, Grzegorz Madajczak

GENETYCZNE METODY TYPOWANIA PAŁECZEK *LISTERIA MONOCYTOGENES*

GENOTYPING METHODS OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Pracownia Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Przewodu Pokarmowego
Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego –
Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

STRESZCZENIE

Listerioza może występować zarówno pod postacią sporadycznego zachorowania, jak i ogniska epidemicznego. Dlatego potrzebne jest szybkie i skuteczne subtypowanie pałeczek *Listeria monocytogenes*. Najefektywniejszymi metodami różnicowania przedstawicieli tego gatunku są techniki genetyczne. Na podstawie dostępnych danych scharakteryzowano 8 wybranych metod genetycznego subtypowania szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes*: REA-PFGE, rybotypowanie, AFLP, PCR-RFLP, multiplex PCR, jak również metody z grupy RAPD, takie jak: AP-PCR, rep-PCR i ERIC-PCR. Analiza dostępnych informacji pozwoliła ocenić, iż najefektywniejszymi metodami w typowaniu wewnątrzgatunkowym szczepów pałeczek *L. monocytogenes* są REA-PFGE oraz rybotypowanie. Metody rep-PCR i ERIC-PCR mają natomiast istotne znaczenie w rutynowej diagnostyce omawianego czynnika etiologicznego.

Słowa kluczowe: *Listeria monocytogenes*, metody genetyczne, subtypowanie

Artykuł ten zawiera fragmenty pracy magisterskiej pod tytułem „Genotypowanie metodą REA – PFGE szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes* izolowanych z próbek materiału klinicznego, próbek środowiskowych i próbek żywności” autorstwa mgr Agnieszki Kołakowskiej.

WSTĘP

Pałeczki *Listeria monocytogenes* to Gram-dodatnie, względnie beztlenowe drobnoustroje, niewytwarzające przetrwalników, będące etiologicznym czynnikiem listeriozy. Choroba ta może przebiegać pod postacią zakażenia centralnego układu nerwowego (CUN),

ABSTRACT

Listeriosis could occur as sporadic case as well as epidemic outbreak. For that reason it is important to subtype the *Listeria monocytogenes* strains using the fastest and most effective method. Genetic techniques are the most effective methods for differentiation of this species. Basing on latest available data eight selected subtyping genetic methods of *Listeria monocytogenes* strains were characterized: REA-PFGE, rybotyping, AFLP, PCR-RFLP, multiplex PCR, and methods from RAPD groups, such as AP-PCR, rep-PCR and ERIC-PCR. Analysis of available information allowed to assess that the most effective methods for *L. monocytogenes* typing are REA-PFGE and rybotyping. However, the rep-PCR and ERIC-PCR methods could be used in the routine *Listeria monocytogenes* diagnosis.

Key words: *Listeria monocytogenes*, genetic methods, subtyping

bakteriemii lub ropni narządów wewnętrznych. Sporadycznie rozpoznaje się przypadki listeriozy jelitowej.

Jak wynika z danych European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), wskaźnik zachorowalności na listeriozę w krajach Unii Europejskiej i krajach stowarzyszonych (EEA/EFTA) w ostatnich latach systematycznie wzrasta. W latach 2006-2007 wynosił on 0,35 na 100 000 (1). Podobne zjawisko obserwuje się także w Polsce (2).

W związku ze zwiększającą się liczbą zgłaszanych przypadków zachorowań na listeriozę, poszukuje się skutecznych metod wykrywania, identyfikacji i różnicowania pałeczek *Listeria monocytogenes*, jako czynnika etiologicznego tych zakażeń.

METODY TYPOWANIA PAŁECZEK *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Izolaty pałeczek *Listeria monocytogenes*, pozyskane w toku dochodzenia epidemiologicznego powinny zostać poddane typowaniu z użyciem metod fenotypowych lub genotypowych. Podstawową techniką bazującą na cechach fenotypowych jest serologiczne typowanie, które dzieli pałeczki *L. monocytogenes* na 13 serotypów (3). Zdecydowanie mniejsze znaczenie ma metoda fagotypowania, opracowana przez *Loessnera* i *Busse* (4).

Najskuteczniejszymi metodami różnicowania szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes* są techniki genetyczne. Opisanym jest przynajmniej kilka metod genotypowania bakterii z rodzaju *Listeria*, wśród których najczęściej wymienia się: analizę makrorestrykcyjną genomowego DNA z zastosowaniem elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (REA-PFGE), rybotypowanie, metody bazujące na technice łańcuchowej reakcji polimerazy, jak również metody MLVA, MLST wraz z ich odmianami.

REA-PFGE

Metodą najczęściej wykorzystywaną w toku dochodzenia epidemiologicznego w przypadku zakażeń pałeczkami *Listeria monocytogenes* jest analiza polimorfizmu długości restrykcyjnych fragmentów chromosomalnego DNA w zmiennym polu elektrycznym (REA-PFGE). Przydatność tej techniki oceniono wysoko zarówno w odniesieniu do szczepów pochodzących z ognisk epidemicznych wywołanych przez pałeczki *Listeria monocytogenes*, jak i sporadycznych przypadków listeriozy (5). Metoda ta uznawana jest za „złoty standard” w dochodzeniach epidemiologicznych. W przypadku pałeczek *Listeria* charakteryzuje się dużą siłą dyskryminującą, powtarzalnością wyników, a jednocześnie, dzięki wystandaryzowanej procedurze (REA-PFGE wg PulseNet) stwarza możliwość międzylaboratoryjnego porównywania uzyskiwanych wyników.

W opisanym przez *Fretz* i wsp. epidemicznym ognisku listeriozy zastosowanie metody REA-PFGE pozwoliło na potwierdzenie, iż szczepy *Listeria monocytogenes* izolowane z próbek żywności należą do tej samej grupy klonalnej, co szczepy wyizolowane od ludzi (6).

W doświadczeniu przeprowadzonym przez *Nuceira* i wsp. badaniu poddano 300 szczepów pałeczek *L. monocytogenes* różnego pochodzenia, wśród których znajdowało się 11 izolatów nietypujących się serologicznymi metodami. Dzięki zastosowaniu techniki

REA-PFGE 8 z nich, na podstawie odrębności profili genetycznych, zaliczono do różnych typów serologicznych (7).

W przypadku pałeczek *Listeria monocytogenes* REA-PFGE wydaje się być niezawodną techniką, niemniej jednak niepozbawioną wad, do których zaliczane są przede wszystkim praco- i czasochłonność metody. Ponadto metoda ta wymaga posiadania specjalistycznego sprzętu, przez co jej zastosowanie ograniczone jest do laboratoriów referencyjnych (8).

RYBOTYPOWANIE

Rybotypowanie, podobnie jak REA-PFGE jest metodą, której podstawę stanowi restrykcyjna analiza genomowego DNA. W technice tej stosuje się często tnące szóstkowe restryktazy, wśród których wymienia się *EcoRI*, *PvuI* oraz *HhoI* (9). W pierwszym etapie rybotypowania, bakteryjne DNA zostaje pocięte na wiele fragmentów (>300) o wielkości, w zależności od użytego enzymu restrykcyjnego, od 1 kb do 30 kb (10). Uzyskane w ten sposób produkty poddane zostają elektroforetycznemu rozdziałowi w żelu agarozowym, a następnie transferowi na nylonową lub nitrocelulozową membranę.

Kolejnym etapem jest hybrydyzacja DNA z wyznakowanymi sondami molekularnymi. W przypadku rybotypowania pałeczek *Listeria monocytogenes* jako sondy zazwyczaj używa się wyznakowanych fragmentów DNA *Escherichia coli*, kodujących rRNA (rDNA), m.in. operon *rrnB*. W typowaniu szczepów pałeczek *L. monocytogenes* najczęściej stosowana jest restryktaza *EcoRI*. Analiza wykonana z jej użyciem umożliwia określenie korelacji pomiędzy fenotypem badanego szczepu a jego zdolnością do wywoływania zakażenia w organizmie gospodarza. W doświadczeniu z zastosowaniem wyżej wspomnianego enzymu restrykcyjnego przeprowadzonym przez *Bruce* i wsp. przebadano 1346 izolatów pałeczek *L. monocytogenes*, które zaklasyfikowano do 50 rybotypów, na podstawie uzyskanych profili restrykcyjnych (11). Zastosowanie w odniesieniu do badanych szczepów dodatkowych restryktaz (*PvuI*, *HhoI*) wspomaga precyzję wewnątrzgatunkowej identyfikacji pałeczek *L. monocytogenes*. Badania przeprowadzone przez *De Cesare* i wsp. dowodzą, iż spośród 16 przebadanych enzymów wspomniane restryktazy charakteryzują się największą zdolnością różnicującą (12).

Obecnie proces tradycyjnego rybotypowania zastępowany jest komercyjnymi, całkowicie zautomatyzowanymi testami, charakteryzującymi się wysokim stopniem powtarzalności wyników, jak również szybkością i prostotą wykonania badania. Przykład takiego

testu stanowi RiboPrinter Microbial Characterization system (Qualicon, Inc.) (10).

We wspomnianym wcześniej doświadczeniu *De Cesare* i wsp. poddali typowaniu szczepy pałeczek *L. monocytogenes* serotypu 4b, zaliczonych do dwóch grup klonalnych. Dzięki zastosowaniu zautomatyzowanej metody w pierwszej grupie wyróżniono 44 na 51, a w grupie drugiej 12 na 20 izolatów o identycznym profilu genetycznym, co może świadczyć o czułości i niezawodności opisywanej metody (12).

W odniesieniu do szczepów pałeczek *L. monocytogenes* metoda rybotypowania jest zdecydowanie mniej czasochłonna i pracochłonna w porównaniu do techniki PFGE, ponadto nie wymaga ona posiadania specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego. Typowanie 36 izolatów pałeczek *L. monocytogenes* pochodzących z żywności (18 izolatów) oraz z materiału klinicznego (18 izolatów) wykonane przez *Allerberger 'a* i *Fritsche-l'a* zajęło autorom zaledwie 2 dni (13).

Rybotypowanie to metoda nie pozbawiona wad, bowiem analiza otrzymanych wyników jest stosunkowo trudna, ze względu na dużą liczbę uzyskiwanych prążków w pojedynczym profilu genetycznym (8). Niemniej, przewaga zalet tej techniki sprawia, że ma ona szansę stać się dominującą metodą w dochodzeniach epidemiologicznych w kierunku zakażeń pałeczkami *L. monocytogenes*.

METODY BAZUJĄCE NA TECHNICIE ŁAŃCUCHOWEJ REAKCJI POLIMERAZY

W celu szybkiego porównania pokrewieństwa szczepów wykorzystuje się inne metody genotypowania, oparte na technice łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Pośród najważniejszych w odniesieniu do szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes* wymienia się metody Multiplex PCR, AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism* - polimorfizm długości fragmentów amplifikowanych), PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction* - łańcuchowa reakcja polimerazy- polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych), jak również metody z grupy RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA* - losowa amplifikacja polimorficznych fragmentów DNA), wśród których do najpowszechniej stosowanych zaliczane są: RAPD-PCR, AP-PCR, rep-PCR oraz ERIC-PCR.

PCR-RFLP (POLYMERASE CHAIN REACTION- RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

W odniesieniu do szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes* metoda PCR-RFLP polega na amplifikacji

fragmentu jednego lub kilku genów typu „housekeeping”, genów patogenności, a następnie poddaniu ich analizie restrykcyjnej z zastosowaniem specyficznej endonukleazy lub kombinacji nukleaz (*HhoI*, *SacI* czy *HinfI*). Otrzymane w ten sposób produkty poddane zostają elektroforetycznemu rozdzielaniu w agarozowym żelu, a uzyskane w ten sposób profile stanowią podstawę różnicowania pałeczek *L. monocytogenes* (10).

Metoda PCR- RFLP jest techniką umożliwiającą uzyskanie wyników o dość dużej powtarzalności, a w połączeniu z innymi metodami typowania może stanowić podstawę interpretacji wyników w dochodzeniu epidemiologicznym. W doświadczeniu opisanym przez *Paillard* i wsp. typowaniu poddano 180 środowiskowych szczepów pałeczek *Listeria sp.* Dzięki zastosowaniu techniki PCR-RFLP spośród wszystkich izolatów, 160 zaliczono do gatunku *L. monocytogenes*. Dodatkowo stwierdzono, iż 22 izolaty były mieszaniną dwóch gatunków *Listeria*: *L. monocytogenes* i *L. innocua*. Badania te wykazały, iż metoda PCR- RFLP jest przydatna w identyfikacji drobnoustrojów z rodzaju *Listeria sp.* izolowanych zarówno z żywności oraz środowiska naturalnego, jak i z materiału pochodzenia klinicznego (14).

AFLP (AMPLIFIED FRAGMENTS LENGTH POLYMORPHISM)

Metoda AFLP podobnie jak RFLP-PCR łączy w sobie łańcuchową reakcję polimerazy z analizą restrykcyjną. W przeciwieństwie jednak do PCR-RFLP, w technice AFLP badane DNA w pierwszej kolejności poddane zostaje analizie restrykcyjnej z zastosowaniem dwóch enzymów. Pierwszy jest często tnącą restryktazą, natomiast drugi rozpoznaje nieliczne miejsca restrykcyjne w badanym genomie. Współdziałanie obu enzymów doprowadza do powstania fragmentów DNA z tzw. „lepkimi końcami”, do których przyłączają się wprowadzone oligonukleotydowe adaptory (9). Uzyskane w ten sposób produkty poddawane są amplifikacji ze starterami o sekwencjach komplementarnych do adaptorów, a następnie elektroforetycznemu rozdzielaniu w żelu poliakrylamidowym.

Zastosowanie opisywanej metody w przypadku szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes* powoduje wygenerowanie układów prążków, odpowiadających od 40 do 200 fragmentom DNA. Obecność tak dużej liczby otrzymanych produktów rozdziału spowodowana jest szerokim polimorfizmem markerów AFLP (15).

AFLP jest techniką wysoce dyskryminującą, która uwydatnia różnice zarówno pomiędzy gatunkami szczepów z rodzaju *Listeria*, jak również w obrębie gatunku *L. monocytogenes*. Metoda ta charakteryzuje się także szybkością wykonania analiz (16). Zalety opisywanej

metody jednoznacznie potwierdziły wyniki wykonanego w roku 2010 przez *Parisi* i wsp. doświadczenia, którego celem było porównanie przydatności metod AFLP oraz MLST w badaniach epidemiologicznych. Typowaniu poddane zostały 103 izolaty pałeczek *L. monocytogenes* pochodzące z żywności oraz ze środowiska naturalnego. Dzięki zastosowaniu techniki AFLP spośród przebadanych szczepów wyróżniono 62 różne profile genetyczne pałeczek *L. monocytogenes*, charakteryzujące się unikatowym układem prążków, natomiast technika MLST pozwoliła zidentyfikować zaledwie o 4 profile genetyczne więcej, co świadczy o porównywalnej sile dyskryminacyjnej obu analizowanych metod (17). Ponadto według wyników otrzymanych przez *Parisi*'ego i wsp. wartość siły dyskryminującej w technice AFLP w odniesieniu do typowania szczepów pałeczek *L. monocytogenes* o ponad 20% przekracza zdolność różnicującą metody typowania serologicznego (17). Jedynym mankamentem metody AFLP jest konieczność stosowania oligonukleotydowych ligandów, co nieznacznie obniża poziom wiarygodności wyników wykonywanych analiz (8).

RAPD (RANDOM AMPLIFICATION OF POLYMORPHIC DNA) I AP-PCR (ARBITRARILY PRIMED PCR)

RAPD jest metodą stosowaną w analizie podobieństw między szczepami badanych drobnoustrojów. Polega ona na losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA z zastosowaniem jednego oligonukleotydowego (10-20 pz) startera, zawierającego dużą liczbę zasad azotowych: guaniny (G) oraz cytozyny (C) (18). W technice tej przeprowadza się amplifikację, której dwa pierwsze cykle, w związku z obniżoną temperaturą ($T=35^{\circ}\text{C}-45^{\circ}\text{C}$) pozwalają na wiązanie startera do sekwencji matrycowych, niebędących całkowicie homologicznymi. Kolejne cykle odbywają się we właściwej temperaturze przyłączania startera, co podnosi specyficzność prowadzonej reakcji. Produkty amplifikacji rozdzielane są w żelu agarozowym za pomocą elektroforezy.

Technika AP-PCR jest modyfikacją standardowej metody RAPD, w której zmiana dotyczy długości sekwencji zastosowanego startera, wahającej się między 10 a 50 pz.

Zarówno RAPD, jak i AP-PCR to metody umożliwiające skuteczną analizę molekularnego podobieństwa badanych szczepów, na podstawie porównania uzyskanych wzorów prążków charakterystycznych dla każdego z nich. Obie metody są bardziej ekonomiczne, a także zdecydowanie szybsze od innych technik subtypowania szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes*. Jednakże, jak pokazują wyniki wykonanych

w latach 1994-1995 doświadczeń, stosowane są zwykle w przypadku typowania niewielkiej liczby szczepów (<50) (19). Badania przeprowadzone przez *Farbera* i *Addisona* obejmowały typowanie 52 szczepów pałeczek *L. monocytogenes* oraz innych drobnoustrojów z rodzaju *Listeria sp.*, wśród których wyróżniono 34 profile genetyczne charakteryzujące się heterogenicznym układem prążków. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła wnioskować, iż metoda RAPD (AP-PCR) cechuje się dość dużą powtarzalnością, jak również stosunkowo wysokim poziomem dyskryminacji (20). Nie jest to jednak twierdzenie w pełni uprawnione, czego w swoich badaniach dowodzą *Franciosa* i wsp. Wykonane przez nich doświadczenie dotyczyło 32 szczepów pałeczek *L. monocytogenes*, pochodzących z ognisk epidemicznych inwazyjnej (16 izolatów) i nieinwazyjnej (16 izolatów) listeriozy. Współczynnik zdolności dyskryminacyjnej, zastosowanej w powyższych badaniach metody AP-PCR wynosił zaledwie 0,67 i był nieco niższy od indeksu siły dyskryminującej rybotypowania. Świadczy to jednoznacznie o tym, iż w przypadku analizy szczepów pochodzących z ognisk epidemicznych wyniki różnicowania metodą RAPD (AP-PCR) wymagają potwierdzenia z zastosowaniem dodatkowej techniki typowania (21).

REP-PCR I ERIC-PCR

Rep-PCR (*repetitive extragenic palindromic PCR*) oraz ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*), należą do metod, bazujących na zastosowaniu starterów komplementarnych do sekwencji powtórzonych o wielkościach 124-127 pz (sekwencja ERIC) oraz 35-40 pz (sekwencje rep), które występują w genomie bakteryjnym (22). Podstawowa różnica pomiędzy obydwoma technikami polega na zastosowaniu inozyny w sekwencji starterów rep-PCR, która jest zasadą purynową komplementarną do adeniny oraz cytozyny, co zwiększa liczbę rozpoznawanych kombinacji sekwencji DNA (22). W porównaniu do elektroforezy pulsacyjnej metody te wydają się mniej czaso- i pracochłonne, a przy tym wykazują znaczną przydatność w rutynowej diagnostyce (5). Zarówno rep-PCR jak i ERIC-PCR to metody pozwalające na różnicowanie szczepów w obrębie serotypów 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3b i 4b. Jednoznacznie potwierdzają to badania *Jaršek* i wsp. (22).

We wspomnianym doświadczeniu, analizie poddano 52 epidemiologicznie niespokrewnione szczepy pałeczek *L. monocytogenes* izolowane od ludzi, zwierząt, a także pochodzące z żywności. Wskaźnik siły dyskryminującej dla obu opisywanych technik okazał się być zbliżony do siły różnicującej metod PFGE czy rybotypowania i wynosił 0,98. Otrzymane wyniki

jednoznacznie sugerują, że metody te mogą stanowić alternatywne techniki szybkiego subtypowania szczepów pałeczek *L. monocytogenes* (22).

MULTIPLEX PCR

Kolejną metodą pozwalającą na szybkie typowanie pałeczek *Listeria monocytogenes* jest technika multiplex PCR opisana przez *Doumitha* i wsp. (23). Jest to metoda wykorzystująca łańcuchową reakcję polimerazy z jednoczesnym zastosowaniem aż sześciu par starterów. Metoda ta w założeniu autorów stwarza możliwość zaklasyfikowania izolatów pozyskanych z ogniska epidemicznego do jednej z pięciu grup filogenetycznych, rozumianych jako zespół serotypów, charakteryzujących się występowaniem sekwencji określonych fragmentów genów opisanych w tabeli I (23). W publikacjach innych autorów, pojęcie grupy filogenetycznej zostało zastąpione określeniem „grupa PCR” lub „geno-serotyp”. Zdaniem *Almieda* i wsp. zastosowanie określenia „geno-serotyp” jest nieuprawnione ze względu na brak związku metody, a także uzyskiwanego wyniku, z jakimkolwiek serologicznym odczynem (24).

Tabela I. Interpretacja wyników multiplex PCR wg *Doumitha* i wsp., na podstawie obecności poszukiwanych fragmentów sekwencji DNA

Table I. Interpreting the results of multiplex PCR by *Doumith* and all, sought the presence of fragments of DNA sequences

Nazwa sekwencji	Grupa PCR oraz reprezentowana przez nią serotypy:				
	1/2A	1/2B	1/2C	4B	4A
	1/2a; 3a	1/2b; 3b; 7	1/2c; 3c	4b; 4d; 4e	4a; 4c
Imo 1118	-	-	+	-	-
Imo 0737	+	-	+	-	-
Orf 2110	-	-	-	+	-
Orf 2819	-	+	-	+	-
Prs	+	+	+	+	+
PrfA	+	+	+	+	+

Metoda ta, zgodnie z zaleceniami ECDC, ma zastąpić do celów epidemiologicznych serotypowanie z użyciem surowic dla antygenów somatycznych i rzęskowych. Jej zaletą jest pominięcie długotrwałego procesu przygotowywania szczepu do odczynu próbki aglutynacji antygenów rzęskowych, a także możliwość typowania szczepów autoaglutynujących. Wadą jest natomiast niemożność rozróżnienia serotypów w obrębie grup PCR. Wada ta może być jednak wyeliminowana poprzez połączenie opisywanej reakcji multiplex-PCR ze szkiełkową aglutynacją wybranych antygenów somatycznych. W tym wypadku wydaje się

uzasadnione zastosowanie określenia „geno-serotyp” w odniesieniu do uzyskiwanego wyniku.

MLST (MULTILOCUS SEQUENCE TYPING)

Do badania pokrewieństwa między szczepami w dochodzeniach epidemiologicznych wykorzystuje się również inną metodę genotypowania, jaką jest MLST (*Multilocus Sequence Typing*), która polega na porównaniu wysoce stabilnych sekwencji alleli wybranych genów typu „housekeeping” – kodujących białka biorące udział w podstawowym metabolizmie, warunkującym przeżycie komórki. Alternatywę dla tradycyjnej metody MLST stanowi technika MLVST (*Multi-Virulence Sequence Typing*). Subtypowanie z zastosowaniem tej metody opiera się o porównanie i analizę sekwencji genów kodujących zdolność badanych drobnoustrojów do wywoływania zakażenia komórek organizmu gospodarza. Ponieważ pałeczki *Listeria monocytogenes* stanowią wewnątrzkomórkowe patogeny, a czynniki chorobotwórczości tych drobnoustrojów są dobrze poznane, metoda MLVST jest jedną z najczęściej stosowanych metod ich identyfikacji (25).

Większość genów warunkujących patogenność pałeczek *L. monocytogenes*, zlokalizowana jest na chromosomie bakteryjnym i zgrupowana pod wspólną nazwą zależnego od *prfA* zespołu genów zjadliwości, pośród których wymienia się *plcA*, *plcB*, *hlyA*, *mpl*, *actA*, *prfA*. Dodatkowym czynnikiem identyfikowanym w metodzie MLVST jest allel *ilnA*, zlokalizowany poza wyspą patogenności (26).

Wykorzystanie siedmiu wymienionych alleli genów pałeczek *L. monocytogenes* pozwala na wykrycie stosunkowo dużej liczby profili ST (*Sequences Type*), które mogą być porównywane dzięki międzynarodowej bazie danych MLST. Metoda ta charakteryzuje się znaczną siłą dyskryminującą i w porównaniu z innymi genetycznymi technikami subtypowania analiza wykonana z jej zastosowaniem jest zdecydowanie bardziej jednoznaczna. Badania z użyciem izolatów pochodzących z ognisk listeriozy, jak również ze środowiska naturalnego, przeprowadzone przez *Parisi* i wsp. wykazały, iż współczynnik mocy dyskryminującej dla tej metody sięga rzędu 0,972. (17). Jak opisują w swojej publikacji *Ward* i wsp., wyniki uzyskane dzięki zastosowaniu techniki MLST są ponadto relatywnie łatwiejsze w interpretacji, w porównaniu do innych metod genetycznego subtypowania szczepów pałeczek *L. monocytogenes* (27).

MLVA (MULTI- LOCUS VARIABLE- NUMBER TANDEM- REPEATS ANALYSIS)

Kolejną metodą genotypowania mającą zastosowanie w odniesieniu do *Listeria monocytogenes* jest MLVA (*Multiple-Locus Variable-number tandem-repeats Analysis*), opierająca się na analizie tandemowych powtórzeń, znajdujących się w DNA. Technika ta wykorzystywana jest głównie w celu ustalenia filogenetycznego pochodzenia badanych szczepów. W doświadczeniu wykonanym przez Lindstedt i wsp. porównano skuteczność metod MLVA i PFGE, poddając analizie dwie grupy szczepów pałeczek *L. monocytogenes*: 61 izolatów pochodzących ze Szwecji oraz 79 izolatów pochodzących z Norwegii. Z zastosowaniem metody MLVA wśród izolatów norweskich wyróżniono 28 profili genetycznych, natomiast z użyciem metody PFGE - 24 profile. Wśród szczepów pochodzących ze Szwecji oznaczono odpowiednio 42 profile dla MLVA i 43 profile dla PFGE (28). Otrzymane wyniki wykazały, iż metoda MLVA pod względem skuteczności i czytelności wyników dorównuje elektroforezie w zmiennym polu elektrycznym. Niemniej jednak w odróżnieniu od niej wymaga wyższych nakładów finansowych, a przede wszystkim jest zdecydowanie bardziej czasochłonna (28).

PODSUMOWANIE

Metody biologii molekularnej są skutecznym narzędziem wykrywania, identyfikacji i różnicowania pałeczek *Listeria monocytogenes*. Spośród opisanych technik molekularnego typowania pałeczek *L. monocytogenes*, do najefektywniejszych można zaliczyć metody REA-PFGE oraz rybotypowanie. Jednak wydaje się, że techniki oparte na sekwencjonowaniu DNA, a w szczególności MLST, w najbliższym czasie mogą stać się ich skutecznym zastępstwem. Przyczyną tego jest większa siła dyskryminacji oferowana przez tego typu metody, możliwość automatyzacji, a co z tym idzie zmniejszenie czasu pracy i nakładów finansowych. W rutynowej diagnostyce szczepów pałeczek *L. monocytogenes* najistotniejszą rolę odgrywają techniki rep-PCR i ERIC-PCR, ze względu na szybkość i łatwość wykonania badania, a także stosunkowo wysoki współczynnik siły dyskryminującej.

Dostępne genetyczne metody subtypowania pozwalają na poznanie elementów genomiki, epidemiologii oraz ekologii pałeczek *L. monocytogenes*. Stosowanie technik molekularnych pozwala na szybsze i skuteczniejsze wykrywanie i opracowywanie epidemicznych ognisk wywoływanych przez zakażenie pałeczkami tego gatunku.

PIŚMIENNICTWO

1. European Food Safety Authority. The Community Summary Report On Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. Food-borne Outbreaks. The EFSA Journal 2010; 1496: 260.
2. http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2009/Ch_2009.pdf
3. Seeliger HPR, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes*. W: Bergan, T., Norris, JR (Eds.), Methods in Microbiology, Vol. 13, 1979; Academic press, New York, 31–49.
4. Loessner MJ, Busse M. Bacteriophage Typing of *Listeria* Species. App Env Microbiol 1990; 56: 1912 – 18.
5. Madajczak G. Ocena przydatności wybranych metod genotypowania pałeczek *Listeria monocytogenes*. Med Dosw Mikrobiol 2006; 58: 329 – 37.
6. Fretz R, Sagel U, Ruppitsch i in. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese Quargel, Austria and Germany 2009. Euro Surveill 2010;15: 33 – 7.
7. Nucera D, Lomonaco S, Bianchi D M i in. A five year surveillance report on PFGE types of *Listeria monocytogenes* isolates in Italy from food and food related environments. Int J Food Microbiol 2010; 140: 271-6.
8. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J Med Microbiol 2006; 55: 645–59.
9. Jeyaletchumi P, Tunung R, Margaret SP i in. Detection of *Listeria monocytogenes* in food. Int Food Re J 2010; 77: 1-11.
10. Wiedmann M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. J AOAC Int 2002; 85: 524-32.
11. Bruce JL, Hubner RJ, Cole EM, i in. Sets of EcoRI fragments containing ribosomal RNA sequences are conserved among different strains of *Listeria monocytogenes*. Procedures of Natural Academy of Sciences USA 1995; 92: 5229–33.
12. De Cesare A, Bruce JL, Dambaugh TR, i in. Automated Ribotyping Using Different Enzymes To Improve Discrimination of *Listeria monocytogenes* Isolates, with a Particular Focus on Serotype 4b Strains. J Clin Microbiol 2010; 39: 3002-5.
13. Allerberger F, Fritschel SJ. Use of automated ribotyping of Austrian *Listeria monocytogenes* isolates to support epidemiological typing. J Microbiol Meth 1999; 35: 237- 44.
14. Paillard D, Dubois V, Duran R, i in. Rapid Identification of *Listeria* Species by Using Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 23S rRNA Gene Fragments. Appl Environm Microbiol, 2003; 69: 6386–92 .
15. Guerra MM, Bernardo F, McLauchlin J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. Sys App Microbiol 2002; 25:456–61.
16. Keto-Timonen RO, Autio TJ, Korkeala HJ. An improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for discrimination of *Listeria* isolates. Sys App Microbiol 2003; 26: 236–44.
17. Parisi A, Latorre L, Normanno G, i in. Amplified Fragment Length Polymorphism and Multi-Locus Sequence Typing for high-resolution genotyping of *Listeria*

- monocytogenes* from foods and the environment. Food Microbiol 2010; 27:101.
18. Sztuba- Solińska J. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. Kosmos 2005; 54: 227-39.
 19. O'Donoghue K, Bowker K, McLauchlin J, i in. Typing of *Listeria monocytogenes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Int J Food Microbiol 1995; 27: 245-52.
 20. Farber JM, Addison CJ. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. J App Microbiol 1994; 77: 242-50.
 21. Franciosa G, Tartaro S, Wedell-Neergaard Ch, i in. Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Involved in Invasive and Noninvasive Listeriosis Outbreaks by PCR-Based Fingerprinting Techniques. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 1793-9.
 22. Jeršek B, Gilot P, Gubina M, i in. Typing of *Listeria monocytogenes* Strains by repetitive Element Sequence-Based PCR. J Clin Microbiol 1999; 37:103-9.
 23. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, i in. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2004; 42: 3819-22.
 24. Almeida G, Morvan A, Magalhães R, i in. Distribution and characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates in Portugal, 1994-2007. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010; 29: 1219-27.
 25. Zhang W, Jayarao BM, Knabel SJ. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. App Environment Microbiol 2004; 70: 913-20.
 26. Kreft J, Vázquez-Boland JA, Ng E, i in. Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements JB Kaper & J Hacker (Eds), Washington, ASM Press, 1999; pp 219-32
 27. Ward T J, Gorski L, Borucki M K, i in. Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. J Bacteriol 2004; 186: 4994-5002.
 28. Lindstedt BA, Tham W, Danielsson- Tham ML, i in. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolor capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. J Microbiol Methods 2008; 72: 141-8.
- Otrzymano: 18.05.2011r.
Zaakceptowano do druku: 08.06.2011r.
- Adres do korespondencji:**
Dr n. wet. Grzegorz Madajczak
Zakład Bakteriologii
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego –
Państwowy Zakład Higieny
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa
Tel. (022) 5421 263
e-mail: gmadajczak@pzh.gov.pl
- Mgr Agnieszka Kołakowska
Zakład Wirusologii
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego –
Państwowy Zakład Higieny
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa
Tel. (022) 5421 337
e-mail: akolakowska@pzh.gov.pl