



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos magistro studijų programos II kurso studentė

Toma JANUŠONYTĖ

Magistro baigiamasis darbas

***Listeria monocytogenes* genetinių profilių nustatymas pulsuojančio lauko
gelio elektroforezės metodu**

Darbo vadovas: dr. Vaclovas Jurgelevičius

Konsultantė: vyr. bioinžinierė Gertrūda Šeškutė

Vilnius, 2020

TURINYS

SANTRUMPOS	3
ĮVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. <i>L. monocytogenes</i> savybės	6
1.1.1. <i>Listeria</i> sensu stricto	7
1.1.2. <i>Listeria</i> sensu lato	7
1.2. <i>Listeria monocytogenes</i> patogenezė	9
1.3. <i>Listeria monocytogenes</i> paplitimas.....	11
1.3.1. Natūralioje aplinkoje.....	11
1.3.2. Maisto pramonėje	12
1.4. <i>Listeria monocytogenes</i> prisitaikymas išgyventi aplinkoje.....	12
1.5. <i>Listeria monocytogenes</i> prevencinės priemonės maisto pramonėje	14
1.6. Listeriozė.....	15
1.6.1. Diagnostika ir gydymas.....	17
1.6.2. Sergamumas ir epidemiologija	18
1.6.3. Sergamumas listerioze Lietuvoje	18
1.6.4. Sergamumas listerioze Europoje	21
1.7. Maisto produktų užterštumas listerijomis Europoje	22
1.7.1. <i>L. monocytogenes</i> mikrobiologinių rodiklių reglamentavimas.....	23
1.8. <i>Listeria</i> spp. nustatymas.....	23
1.8.1. Pulsuojančio lauko gelio elektroforezė	26
1.9. „BioNumerics” programinė įranga	28
2. TIRIAMOSIOS MEDŽIAGOS IR METODAI	30
2.1. Bendrasis <i>Listeria monocytogenes</i> bei <i>Listeria</i> spp. aptikimas (ISO 11290-1:2017).....	30
2.2. <i>L. monocytogenes</i> genetinių profilių nustatymas PFGE metodu.....	37
3. TYRIMŲ REZULTATAI	42
3.1. <i>Listeria monocytogenes</i> aptikimas pagal ISO 11290-1:2017 standartą	42
3.2. PFGE sąlygų optimizavimas	43
3.3. <i>L. monocytogenes</i> profilių analizė „BioNumerics“ programine įranga	47
4. REZULTATŲ APTARIMAS	52
IŠVADOS	55
PADĖKA	56
SANTRAUKA	57
SUMMARY	58
LITERATŪROS SĄRAŠAS	59
1 PRIEDAS	65
2 PRIEDAS	69

SANTRUMPOS

ISO (angl. International Organization for Standardization) – tarptautinė standartizacijos organizacija.

CDC (angl. Centers for Disease Control and Prevention) – ligų kontrolės ir prevencijos centras.

ULAC – užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras.

WHO (angl. World Health Organization) – pasaulinė sveikatos organizacija.

RTE (angl. ready to eat) – valgis, paruoštas valgyti.

PFGE (angl. pulse-field gel electrophoresis) – pulsuojančio lauko gelio elektroforezė.

FIGE (angl. field-inversion gel electrophoresis) – lauko inversijos gelio elektroforezė.

OFAGE (angl. orthogonal-field alternation gel electrophoresis) – stačiakampio kintančio lauko gelio elektroforezė.

TAFE (transverse-alternating field gel electrophoresis) – skersai kintančio lauko gelio elektroforezė.

PHOGE (angl. pulsed-homogeneous orthogonal field gel electrophoresis) – pulsuojančio homogeninio keturkampio lauko gelio elektroforezė.

PACE (angl. programmable autonomously-controlled electrodes) – užprogramuojami automatiškai kontroliuojami elektrodai.

CAMP – kraujo agaras, angl. Christie-Atkins-Munch-Peterson, testui.

KFV – kolonijas formuojantys vienetai.

Bp – bazių poros.

Kbp – kilobazių poros.

Mbp – megabazių poros.

kDa – kilodaltonai.

TSMEA – triptono sojos mielių ekstrakto agaras.

ALOA – atrankioji sėjimo terpė pagal Ottaviani ir Agosti.

TBE – buferinis tirpalas, sudarytas iš Tris bazės, boro rūgšties ir EDTA.

TE – buferinis tirpalas, sudarytas iš Tris (pH 8,0) ir 1 mM EDTA (pH 8,0).

GAD – glutamato dekarboksilazė.

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis.

SDS – natrio laurilsulfatas, detergentas.

BSA – galvijų serumo albumino baltymas.

UPGMA (angl. unweighted pair group method with arithmetic mean) – „nepasvertas grupių porų metodas su aritmetiniu vidurkiu“.

ĮVADAS

Per maistą plintančios zoonozės, ūminės žarnyno virusinės infekcijos Lietuvoje iki šiol yra svarbi visuomenės sveikatos problema. Tikslūs sergančiųjų šiomis ligomis skaičiai nėra žinomi, kadangi į oficialią statistiką dažniausiai patenka tik susirgę sunkiomis ligos formomis. Zoonozės gali plisti tiesiogiai nuo sergančių gyvūnų per maistą arba geriamąjį vandenį, užkrėtus ligas sukeliančiais mikroorganizmais. Kampilobakteriozė ir salmoneliozė yra dažniausiai registruojamos per maistą plintančios zoonozės Europoje. Kitos zoonozės, tokios kaip bruceliozė, listeriozė, Q karštligė yra mažiau paplitusios ir registruojamos atskiruose Europos regionuose (Čaplinskas S. et al., 2019).

Listeriozė yra viena iš rimčiausių ir sunkiausių maistu plintančių ligų. Ją sukelia bakterijos *Listeria monocytogenes*. Šis viduląstelinis patogenas gali užkrėsti tiek sveikus, tiek silpną imuninę sistemą turinčius žmones. Sveikiems asmenims liga gali būti besimptomė arba gali pasireikšti gastroenteritas, peršalimo simptomai. Tuo tarpu asmenims, kurių imunitetas silpnas, liga pasireiškia invazine forma (Bhunia, 2018). Listeriozė santykinai reta liga, pasireiškianti nuo 0,1 iki 10 atvejų 1 mln. žmonių per metus. Nors atvejų skaičius yra nedidelis, tačiau su šia infekcija susijusių mirčių skaičius yra augantis ir sukelia didelį visuomenės susirūpinimą. Skirtingai nuo daugelio kitų zoonozės sukeliančių patogenų, *L. monocytogenes* gali išgyventi ir daugintis žemoje temperatūroje, todėl net maistas laikomas šaldytuve nėra apsaugotas nuo patogeno plitimo. Didžiausią pavojų žmonėms kelia maisto produktai, kurių galiojimo laikas šaldytuve yra ilgas, ir produktai, kurie gali būti vartojami be papildomo terminio apdorojimo. Dažni listeriozės protrūkiai įvyksta dėl paruoštų pusgaminių, tokių kaip: rūkytos ar žalios mėsos, pieno produktai, paruoštos salotos (įskaitant kopūstų salotas, pupelių daigus), taip pat šviežios daržovės ir vaisiai (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>, žiūrėta 2020-03-20).

Pulsuojančio lauko gelio elektroforezės metodas (PFGE) yra unikalus genotipavimo metodas, naudojamas didelėms DNR molekulėms atskirti po to, kai jos yra sukarpomos specialiais restrikcijos endonukleazės fermentais (Sharma-Kuinkel et al., 2014). PFGE metodas sėkmingai naudojamas siekiant nustatyti patogeninių mikroorganizmų, tokių kaip *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, kamienus (Neoh et al., 2019). PFGE pasižymi puikiu pakartojamumu, didele skiriamąja geba, gali būti standartizuotas, todėl dar yra vadinamas „auksiniu standartu“ (Mendonça et al., 2012).

Darbo tikslas:

Nustatyti, maisto produktuose aptiktų, *Listeria monocytogenes* genetinius profilius, taikant pulsuojančio lauko gelio elektroforezės metodą.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti *L. monocytogenes* kamienus vadovaujantis PulseNet standartine darbo procedūra.
2. Atlikti *L. monocytogenes* profilių analizę naudojant „BioNumerics” programinę įrangą.
3. Palyginti gautus *L. monocytogenes* kamienus tarpusavyje.
4. Įvertinti kamienų giminingumą, išanalizuoti maisto produkto ir *L. monocytogenes* kamienų priklausomybes.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *L. monocytogenes* savybės

Pirmą kartą 1911 metais, Stokholmo veterinarijos institute, veterinaras, profesorius Gustav Hülphers aprašė bakteriją, sukėlusią triušiams kepenų nekrozę ir dėl sukėlėjo būdingumo paveikti kepenis, pavadino ją *Bacillus hepatitis*. 1940 metais Škotijos medicinos daktaras Harvey Pirie pakeitė bakterijos pavadinimą į *Listeria monocytogenes*. Nors 1920 metais buvo aprašyti ir paskelbti mikroorganizmo sukeliama klinikiniai požymiai tiek žmonėms, tiek gyvūnams, tačiau tai nebuvo pripažinta reikšminga naujagimių infekcijos, sepsio ar meningito priežastimi iki 1952 metų. Suaugusiųjų listeriozė buvo susijusi su pacientais, vartojančiais imuninę sistemą slopinančius vaistus, ŽIV infekuotais asmenimis ar patyrusius organų transplantaciją. *L. monocytogenes* nebuvo pripažinta kaip per maistą plintančia patogenine bakterija iki 1981 metų, kuomet ligos protrūkis įvyko Kanadoje, Nova Scotia provincijos sostinėje Halifakse. Protrūkis apėmė 41 atvejį, iš kurių 18 buvo mirtini. Jų tarpe daugiausia sudarė nėščiosios moterys ir naujagimiai. Nustatyta, kad bakterijos paplito per avių mėšlu tręšiamas kopūstų salotas. Nuo to laiko, užfiksuota daugiau listeriozės atvejų, susijusių su maistu, o bakterija pripažinta kaip svarbus ir didelę žalą maisto pramonėje atnešantis patogenas (Hof, 2003).

L. monocytogenes priklauso *Firmicutes* tipui, *Bacilli* klasei, *Bacillales* eilei, *Listeriaceae* šeimai ir *Listeria* genčiai. Tai Gramteigiamos bakterijos, turinčios mažą (36–42 %) guanino, citozino (GC) nukleobazių procentinę dalį DNR. Šiam tipui taip pat priskiriamos *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* ir *Staphylococcus* gentys (Scharadt et al., 2017). *Listeria monocytogenes* yra mažos (0,5 μm–4 μm skersmens ir 0,5 μm–2 μm ilgio), apvaliais galais lazdelės (Jamshidi and Zeinali, 2019). Tai fakultatyvinis viduląstelinis sporų ir kapsulių nesudarantis anaerobas, atsparus aplinkos sąlygoms: aukštai temperatūrai, karščiui ar sausrui (Scharadt et al., 2017). *Listeria* genčiai priklauso 21 rūšis: *Listeria aquatica*, *Listeria booriae*, *Listeria cornellensis*, *Listeria costaricensis*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria goaensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria kieliensis*, *Listeria marthii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria riparia*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria seeligeri*, *Listeria thailandensis*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria welshimeri* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1637>, žiūrėta 2020-03-10).

1.1.1. *Listeria sensu stricto*

Ilgus metus buvo manoma, kad *L. monocytogenes* yra vienintelė *Listeria* genties bakterija, kol 1966 metais buvo atrasta *L. grayi*. 1970–1980 m. mokslininkai aprašė dar keturias rūšis *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* ir *Listeria ivanovii*, kurios yra artimai susijusios su *Listeria monocytogenes*. Prireikė dar 25 metų, kol buvo atrasta kita rūšis – *Listeria marthii*. Kartu jos sudaro vadinamąją *Listeria sensu stricto* grupę, lotyniškai reiškiančią „*Listeria* siaurąją prasme”, priešingai nei *Listeria sensu lato*, t.y. „*Listeria* plačiąją prasme”, kurią sudaro gana gausus *Listeria* spp. bakterijų rūšių kiekis, kuris buvo atrastas per pastarąjį dešimtmetį (Schardt et al., 2017).

Listeria sensu stricto spp. gali būti randami natūralioje gamtoje. Jie buvo išskirti iš daugybės skirtingų ekologinių nišų, tokių kaip dirvožemis, paviršiniai vandenys, nuotekos, maisto perdirbimo aplinka ir augmenija. Vieninteliai *Listeria sensu stricto* spp. nariai, kurie reguliariai siejami su patogeniškumu gyvūnams ir žmonėms – *L. monocytogenes* ir *L. ivanovii*. Buvo nustatyti trys genomo lokusai, koduojantys šių rūšių pagrindinius virulentiškumo genus: 1) *Listeria* patogeniškumo salelė 1 (LIPI – 1). Ją sudaro šeši genai – *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* ir *plcB* atsakingi už vidinį ir tarpląstelinį judrumą ir išgyvenimą; 2) internaliniai – *InlA* ir *InlB*, kurie padeda patekti į ląstelę. Internalinas A jungiasi prie kadherinų ir skatina fagocitozę; 3) trečiasis internalinas *inlC* yra reikalingas plitimui iš ląstelės į ląstelę (Schardt et al., 2017)

1.1.2. *Listeria sensu lato*

Pastarąjį dešimtmetį aptiktas gana platus naujų *Listeria* spp. rūšių skaičius, kuris kartu buvo priskirtas atskirai „plačiąjai” grupei – *Listeria sensu lato*. Šios grupės kamienai buvo išskirti iš sūrio, tekančio vandens, jūros gėrybių, supjaustytų salotų ir pieno perdirbimo įmonių. Visi *Listeria sensu lato* spp. yra laikomi nepatogeniškais, nes jiems trūksta hemolizinio ir fosfolipazės C (PLC) aktyvumo. Tačiau gali būti ir taip, kad kai kurių nepatogeninių rūšių kamienai, gali kelti pavojų. Pavyzdžiui, *L. innocua* paprastai laikomas nepatogenišku, nors yra daug šios rūšies kamienų, kurie turi patogenišką LIPI-1 saleles, tačiau jiems trūksta *inlA*, *inlB* ir *inlC*. Yra nustatytas vienas mirties atvejis, kurį sukėlė *L. innocua* 6a serotipas (Schardt et al., 2017).

L. monocytogenes yra vienintelė žmonėms patogeniška rūšis, kelianti didžiausią susirūpinimą visuomenės sveikata. *L. ivanovii* bakterija dažnai sukelia atrajotojų listeriozę ir tik labai retai sukelia ligą žmonėms (Ryser et al., 2019).

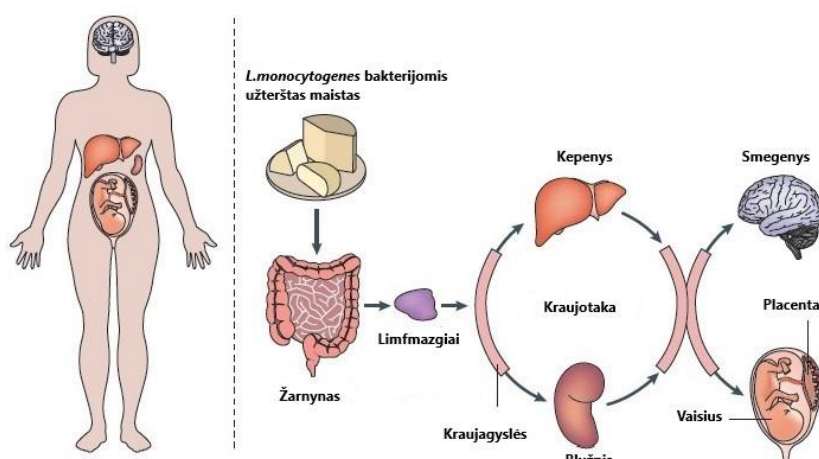
1 lentelė. Fenotipiniai *Listeria* sensu stricto ir *Listeria* sensu lato skirtumai (<https://www.thermofisher.com/blog/food/keeping-up-with-the-listerias-implications-of-taxonomic-changes-for-food-testing/>, žiūrėta 2020-03-20).

	Sensu stricto	Sensu lato			
Rūšis ir atradimo metai	<i>L. monocytogenes</i> (1924) <i>L. innocua</i> (1983) <i>L. welshimeri</i> (1983) <i>L. seeligeri</i> (1983) <i>L. ivanovii</i> (1984) <i>L. marthii</i> (2010)	<i>L. grayi</i> (1966)	<i>L. floridensis</i> (2014) <i>L. fleischmannii</i> (2013) <i>L. aquatica</i> (2014) <i>L. goaensis</i> (2018) <i>L. kieliensis</i> (2018)	<i>L. newyorkensis</i> (2015) <i>L. corneliensis</i> (2014) <i>L. rocourtiae</i> (2010) <i>L. weihenstephanensis</i> (2013) <i>L. grandensis</i> (2014) <i>L. riparia</i> (2014) <i>L. booriae</i> (2015)	<i>L. costaricensis</i> (2018) <i>L. thailandensis</i> (2018)
Judrumas prie 30 ° C	+	+	-	-	-
Augimas žemiau 7 ° C	+	+	-	+	-

Listerijų serotipavimas – tipavimo metodas, padedantis atskirti šios bakterijos porūšius. Tai yra svarbi priemonė infekcijos sukėlėjų nustatymui protrūkio metu, leidžia atskirti svarbius, su maistu plintančius kamienus, ištirtus skirtingose laboratorijose ir tarpusavyje juos palyginti (Borucki and Call, 2003). Serotipų nustatymas yra pagrįstas skirtingų, termiškai stabilių somatinių (O) ir šilumai neatsparių, žiuželinių (H) antigenų buvimu. O antigenas yra lipopolisacharidas, esantis ląstelės sienelėje. Šis antigenas atsparus temperatūrai, etanolui ir rūgštims, gali būti suaktyvinamas formalinu. H antigenai, esantys žiuželiuose, yra neatsparūs veikimui karščiu ir etanolu (Borucki and Call, 2003). Iš viso žinoma apie 15 *Listeria* O antigenų potipių, kurie žymimi I-XV ir 4 H antigenų potipiai, kurie žymimi A-D (Chen et al., 2017). *L. monocytogenes* galime suskirstyti į 13 serotipų: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ir 7, tačiau tik keturi iš jų – 1/2a, 1/2b, 1/2c ir 4b yra atsakingi už didžiąją dalį (maždaug 95 %) žmonių listeriozės atvejų visame pasaulyje (Jamshidi and Zeinali, 2019). 4b yra Europoje, Kanadoje bei JAV dominuojantis serotipas, sukeliantis didžiąją dalį susirgimų (Borucki and Call, 2003; Capita et al., 2019). Dėl skirtingos jų ekologijos, genomo ir rekombinacijos greičio *L. monocytogenes* serotipai yra suskirstyti į keturias filogenetines linijas (I-IV) (Alonso-Calleja et al., 2019). Listerijų kamienai, priklausantys I ir II filogenetinei linijai, buvo izoliuoti iš pavienių atvejų (serotipai: 1/2a, 1/2b ir 4b) ir žmonių listeriozės protrūkių (dažniausi serotipai: 1/2a ir 4b). II linijos (serotipai 1/2a, 1/2c, 3a ir 3c) ir keletas I linijos kamienų (serotipai 1/2b ir 4b), dažniausiai randami maiste, plačiau paplitę natūralioje aplinkoje ir ūkiuose. III ir IV filogenetinių linijų kamienai aptinkami retai, bet labiausiai siejami su gyvūnų infekcijomis (Lomonaco et al., 2015; Orsi et al., 2011). Nepaisant lengvo taikymo, serotipų nustatymo metodai yra mažai jautrūs, todėl turėtų būti naudojami kiti molekuliniai metodai (Moghadam and Larsen, 2019).

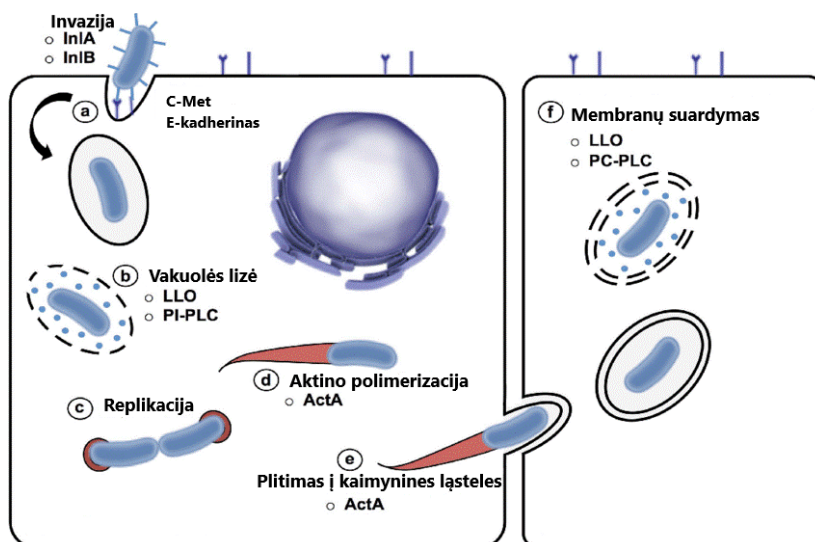
1.2. *Listeria monocytogenes* patogenezė

L. monocytogenes patogenezė yra daugiapakopis procesas, kuris apima dvi fazes: žarnyno ir sisteminę. Pirmoji fazė prasideda bakterijų kolonizacija žarnyne, toliau seka jų translokacija per gleivinę. Jei imuninė sistema nekontroliuoja infekcijos, bakterijos įveikia žarnyno barjerą, patogenas pasklinda į kraują arba mezenterinius limfmazgius, tolimesniam sisteminiam infekcijos plitimui. Sisteminio plitimo metu, dendritinės ląstelės arba makrofagai transportuoja mikroorganizmą į tikslinius organus – kepenis, blužnį, limfinius mazgus, smegenis ir nėščiosioms į placentą (Bhunia, 2018). Bakterijos praėjusios hematoencefalinį barjerą, asmenims, su nusilpusiu imunitetu gali sukelti sepsį, meningitą, o nėščiosioms – nėštumo komplikacijas, priešlaikinį gimdymą ar abortą (1 pav.) (Bhunia, 2018; Radoshevich and Cossart, 2018).



1 pav. *L. monocytogenes* infekcijos plitimo schema žmogaus organizme. Tiksliniai organai – kepenys ir blužnis (Radoshevich and Cossart, 2018).

Listeriozė dažniausiai plinta maistu, taigi bakterijų patekimas per skrandį ir plonąją žarną yra būtina infekcijos sąlyga. Glutamato dekarboksilazė (GAD) apsaugo *L. monocytogenes* nuo skrandžio rūgšties, o maisto dalelės padeda neutralizuoti pH, kad būtų užtikrintas bakterijos saugus patekimas į plonąją žarną. Listerijų viduląstelinis infekcinis ciklas susideda iš skirtingų etapų: i) invazijos į eukariotinę šeimininko ląstelę, ii) išsilaisvinimas iš vakuolės, iii) tarpląstelinė proliferacija, iv) tarpląstelinis išplitimas dėl kryptingos aktino polimerizacijos, v) plitimas į gretimas ląsteles (Bhunia, 2018).



2 pav. *L. monocytogenes* gyvenimo ciklas (Luque-Sastre et al., 2018).

Patekimas į ląstelę yra bene plačiausiai apibūdinamas *L. monocytogenes* infekcijos etapas. Pirminė infekcijos vieta yra žarnyno epitelis, kur bakterijos patenka į ląsteles „užtrauktuko“ mechanizmo principu, kuomet InlA ir InlB – du pagrindiniai baltymai, susijungia su eukariotinių ląstelių membranų receptoriais E-kadherinu arba c-Met. Šeiminko ląstelė apgaubia bakteriją ir aplink ją suformuoja vakuolę. Po 30 min. listeriolizinas O (LLO) kartu su fosfatidilinozitolio fosfolipaze C (PI-PLC) dirba sinergiškai ir sunaikina dvisluoksni lipidų membraną, dėl ko *L. monocytogenes* gali išsivaduoti iš vakuolės. PI-PLC yra 33–36 kDa dydžio fermentas, kurį koduoja *plcA* genas, o jį reguliuoja *prfA* ir yra randamas tik *L. monocytogenes* ir *L. ivanovii*. Išsilaisvinus iš vakuolės, bakterija dauginasi ir kaupia F-aktiną – baltymą, kuris yra svarbus ląstelių funkcijai ir judrumui palaikyti. Citoplazmoje, listerija viename polyje ekspresuoja aktino polimerizacijos baltymą ActA, kuris sukuria į kometą panašią uodegą, padedančią bakterijai judėti. ActA sudaro 639 amino rūgštys ir yra apie 90 kDa dydžio paviršiaus baltymas. Jį koduoja *actA* genas, kurį tiesiogiai kontroliuoja *prfA*. Aktino uodega sukuria jėgą, kuri pastumia bakteriją į priekį. Nuolatinės aktino polimerizacijos pakanka judrumui citoplazmoje ir net gretimų ląstelių užkėtimui. Judanti ląstelė suformuoja į pseudopodiją panašią išsikišančią struktūrą, kuri tęsiasi į kaimyninę ląstelę ir patenka į jos vidų. Kaimyninėje ląstelėje bakteriją gaubia dvi membranos: išorinė membrana yra iš naujai užkrėtos ląstelės, o vidinė membrana – iš anksčiau užkrėtos ląstelės. Šios membranos yra pašalinamos kartu veikiant 29 kDa dydžio, plataus spektro fosfolipazei (PC-PLC) kartu su LLO (Bhunia, 2018).

1.3. *Listeria monocytogenes* paplitimas

1.3.1. Natūralioje aplinkoje

Listeria rūšys buvo išskirtos iš daugiau nei 50 naminių ir laukinių gyvūnų rūšių, o ligos pobūdis skiriasi priklausomai nuo šeimininko (2 lentelė) (Luque-Sastre et al., 2018). Įvairūs stuburiniai gyvūnai, žinduoliai, paukščiai, ropliai, varliagyviai ir žuvis gali tapti besimptomiais nešiotojais, kurie taip pat išskiria listerijas su išmatomis. Klinikiniai atvejai dažniausiai pastebimi galvijams, avims, ožkoms, tačiau taip pat nustatyta ir kitiems atrajotojams: vandens buivolams, elniams, šiaurės elniams, antilopėms, briedžiams, Pietų Afrikos kupranugariams, laukiniams triušiams (lot. *Oryctolagus cuniculus*), graužikams (jūrų kiaulytėms, šinšiloms, žiurkėms), arkliais, kiaulėms, šunims, katėms ir ūkyje auginamoms audinėms (lot. *Neovison vison*). Retkarčiais pranešama apie nelaisvėje gyvenančius arba laisvai gyvenančius laukinius žinduolius ir sterblinius gyvūnus. Paukščiai taip pat gali būti bakterijos nešiotojais. Liga serga naminiai paukščiai: viščiukai, kalakutai, žąsys, antys, taip pat ir medžiojami laukiniai paukščiai: raudonuodegės kurapkos, fazanai, kanarėlės, papūgos ir kt. Listerioze gali sirgti ropliai (lot. *Pogona vitticeps*), tačiau iki šiol nežinoma kaip liga paveikia varliagyvius ir žuvis (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/listeriosis.pdf>, žiūrėta 2020-04-20)

2 lentelė. *Listeria* rūšys, šeimininkai ir ligos formos (Luque-Sastre et al., 2018).

Rūšis	Šeimininkas	Ligos formos
<i>L. monocytogenes</i>	Galvijai, avys, ožkos	Encefalitas, abortas, septicemija, akių ligos
	Galvijai	Mastitas (retai)
	Katės, šunys, arkliai	Abortas, encefalitas (retai)
	Kiaulės	Encefalitas, abortas
	Paukščiai	Septicemija
<i>L. ivanovii</i>	Galvijai, avys	Abortas
<i>L. innocua</i>	Avys	Encefalitas (retai)

Su gyvūnų ekskrementais patekusios listerijos gali būti randamos dirvožemyje, vandenyje, pūvančioje žolėje, mėšle, silose (<http://www.ulac.lt/ligos/L/listerioze>, žiūrėta 2020-04-15). Dirvožemis yra pagrindinė niša perduodant šią bakteriją augalams ir gyvūnams. Jo sudėtis, mikrobų bendrijos ir makrofauna yra išoriniai veiksniai, lemiantys *L. monocytogenes* gyvavimą. Didesnis paplitimas nustatytas dirvožemiuose, esančiuose arčiau vandens, drėgnesniuose, neseniai drėkintuose arba esančiuose šalia ganyklų. Prie *Listeria* spp. gyvavimo ciklo provincijoje prisideda naminių atrajotojų šėrimas užterštu silosu arba nuotekų pasklidimas žemės ūkio paskirties laukuose ar vandenyse (Chen et al., 2017). Bakterijų išgyvenimas taip pat skiriasi atsižvelgiant į dirvožemio tipą ir sąlygas: drėgname ir organinėmis medžiagomis

praturtintame dirvožemyje bakterijos išgyvena ilgiau nei sausame ir skurdžiame (Buchanan et al., 2017).

1.3.2. Maisto pramonėje

L. monocytogenes bakterijomis produktai gali būti užteršti bet kuriame maisto grandinės „nuo ūkio iki šakutės“ etape (Lakicevic et al., 2015). Tarp tokių produktų galima paminėti sūrius, ypač minkštus ir pelėsinius, dešrainius, paštetus, saliami, nepasterizuotą pieną, ledus, sviestą, rūkytus žuvies produktus, daržoves ir mišraines. Nors perdirbimo metodai, tokie kaip terminis arba cheminis apdorojimas gali sunaikinti bakteriją, tačiau perdirbti produktai dažnai gali būti užteršti dėl netinkamo terminio proceso arba kryžminės taršos. Tokiam maistui patekus į prekybą, padidėja rizika užkrėsti kitus maisto produktus (Lakicevic et al., 2015).

Kai maisto perdirbimo aplinka yra sausa, listerijų skaičius yra ribotas, tačiau didelė drėgmė sudaro palankesnes sąlygas joms daugintis. Patekusi į maisto perdirbimo gamyklą, listerija neišvengiamai randa tinkamas nišas, ypač drėgnas vietas, kuriose tinkamos sąlygos gyventi. *L. monocytogenes* gali būti randama talpose, naudojamose maistui gabenti, laikyti ar ruošti. Ligos sukėlėjų gali būti sunkiai išvalomoje įrangoje, įskaitant: pjaustykles, įtrūkimus esančius ant stalų paviršių, kondicionavimo sistemas. Bet koks sąlyčio su maistu paviršius (peiliai, pjaustymo lentelės, pirštinės), taip pat gali būti potencialus *L. monocytogenes* šaltinis. Pagal Maisto ir vaistų administracijos nurodytas maisto ruošimo normas, įranga, naudojama kartu su potencialiai pavojingais maisto produktais, turi būti dezinfekuojama ne rečiau kaip kas 4 valandas (Chen et al., 2017).

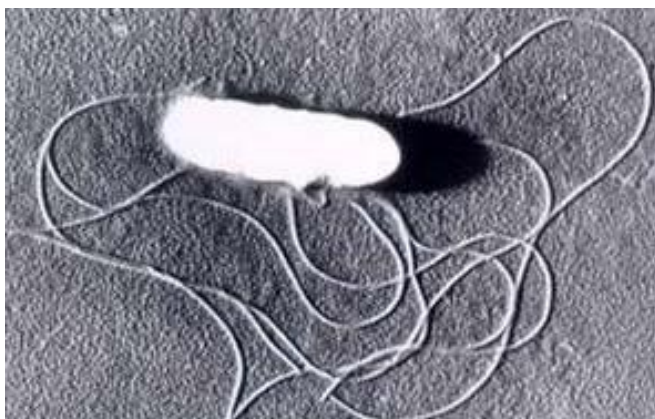
1.4. *Listeria monocytogenes* prisitaikymas išgyventi aplinkoje

L. monocytogenes toleruoja atšiaurias aplinkos sąlygas, todėl gali išgyventi ir net daugintis rūgštiniame ar šarminiame pH intervale nuo 4,0–9,6, oksidaciniame ar osmosiniame streso ir anglies medžiagų trūkume (Chen et al., 2017). Šie mikroorganizmai taip pat toleruoja didelį druskingumą – gali išgyventi 6–10 % druskos tirpale, piene, vandenyje. Yra užfiksuota, kad *L. monocytogenes* metus laiko išgyveno 16 % koncentracijos NaCl tirpale. Kaitinamos 62 °C temperatūroje žūva per 35 minutes. Veikiamos tiesioginių saulės spindulių žūva per 2–15 parų (<http://www.ulac.lt/ligos/L/listerioze>, žiūrėta 2020-04-15).

Ypatinga savybė, leidžianti bakterijai plisti per maistą, yra gebėjimas augti ir daugintis įvairiose temperatūrose nuo 1 °C iki 45 °C. Taigi nenuostabu, kad listeriozė dažniausiai būna susijusi su pieno, mėsos ar daržovių produktais, kurie ilgą laiką buvo laikomi žemoje temperatūroje (<http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>, žiūrėta 2020-03-25). Įdomu tai, kad listerijos kambario temperatūroje (20–25 °C) juda peritrichinių žiuželių pagalba, tačiau

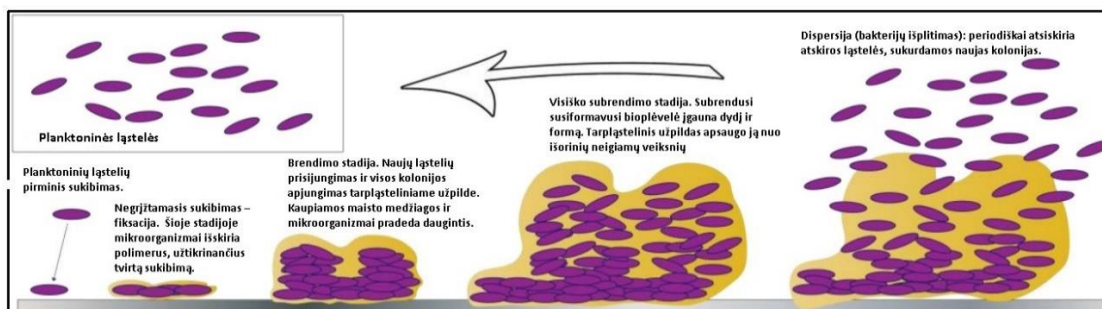
esant 37 °C temperatūrai – žiuželiai nesintetinami.
(<http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>, žiūrėta 2020-03-25).

Mikroskopuojant matomos bakterijos išsidėsto atskirai, raide V arba Y, arba formuoja trumpas grandinėles (Saha et al., 2015). Tepinėliuose *L. monocytogenes* gali būti painiojami su *Streptococcus* spp. šeimos bakterijomis, nes atrodo kaip kokai (<http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>, žiūrėta 2020-03-25).



3 pav. *Listeria monocytogenes* bakterija. Vaizdas užfiksuotas naudojant skenuojamą elektroninį mikroskopą (<https://www.creative-diagnostics.com/tag-listeria-monocytogenes-antigens-48.htm>, žiūrėta 2020-03-21).

Gebėjimas formuoti bioplėveles yra vienas iš *L. monocytogenes* virulentiškumo faktorių (4 pav.). Jose esančios ląstelės yra atsparesnės biocidams ir nepalankioms sąlygoms (valymui, dezinfekavimui). Bioplėvelė yra vienos ar kelių rūšių mikroorganizmų bendruomenė, kuri gali augti ant skirtingų paviršių. Bioplėvelėse bakterijos dalinasi maistinėmis medžiagomis ir yra kaip priedanga nuo žalingų aplinkos sąlygų, pavyzdžiui, išdžiūvimo, antibiotikų, organizmo imuninės sistemos (Colagiorgi et al., 2017). Formuojant bioplėveles pirmiausia judri planktoninė ląstelė prisitvirtina prie paviršiaus ir tampa nejudria. Ląstelės jungiasi į grandinėles ir išskiria polimerus, užtikrinančius tvirtą sukibimą. Didžiausią dalį, nuo 40 % iki 95 %, sudaro egzopolisacharidai (EPS). Tai reikšmingi polimerai, sudaryti iš cukrų. Juos gamina ir į aplinką išskiria tam tikri mikroorganizmai (šitaip susikurdami sau maistinę ir apsauginę terpę). Kiekvienas mikroorganizmas gamina tik jam būdingą egzopolisacharidą. Baltymai bioplėvelėse sudaro iki 60 %, lipidai iki 40 %, nukleino rūgštys iki 10 %. Šios organinės polimerinės medžiagos veikia kaip stabilizatoriai (Saiful and Khan, 2017).



4 pav. Bioplėvelių susidarymo schema (Colagiorgi et al., 2017).

Giovani Di Bonaventura et al. atliko tyrimą, kurio tikslas buvo įvertinti 44 *L. monocytogenes* kamienų, gaunamų iš maisto produktų ir jų perdirbimo aplinkos, galimybę formuoti bioplėvelę ant trijų skirtingų paviršių – polistireno, stiklo ir nerūdijančio plieno. Šios medžiagos pasirinktos, nes jos turi skirtingas fizikines ir chemines savybes: nerūdijančio plieno ir stiklo – hidrofilinės, o polistireno – hidrofobinės. Tyrimui atlikti parinktos skirtingos temperatūros – 4 °C, 12 °C, 22 °C ir 37 °C (Di Bonaventura et al., 2008; Kvaraciejūtė, 2019).

Gauti tyrimai parodė, kad *L. monocytogenes* bioplėvelės formavimasis smarkiai skyrėsi priklausomai nuo augimo temperatūros ir paviršiaus. Bioplėvelės lygis, gautas esant 4 °C, 12 °C, 22 °C temperatūrai, buvo žymiai didesnis ant stiklo, nei ant polistireno ar nerūdijančio plieno. Be to, 37 °C temperatūroje tiek ant nerūdijančio plieno, tiek ant stiklo susidarė žymiai didesnis kiekis nei ant polistireno. *L. monocytogenes* gebėjimas kolonizuoti įvairius paviršius bioplėvele žemoje temperatūroje, naudojamoje maisto pramonėje, padidina kryžminio užterštumo tikimybę. Dėl šiuo priežasčių, šis atliktas tyrimas ir jo rezultatai, galėtų būti praktiškai pritaikyti sprendžiant higienos problemas, iškeltas dėl *L. monocytogenes* bioplėvelių susidarymo maisto pramonėje (Di Bonaventura et al., 2008; Kvaraciejūtė, 2019).

Maisto perdirbimo aplinkoje, *L. monocytogenes* bioplėvelės dažniausiai formuoja ant negyvų paviršių kartu su *Pseudomonas* spp., gali užteršti maisto produktus ir kelti pavojų visuomenės sveikatai (Warke et al., 2017). Be to, nuolatiniai bakterijų kamieniai gali išgyventi maisto perdirbimo aplinkoje ilgesnį laiką (net metus), nes formuoja storesnes bioplėveles nei sporadiškai randami izoliatai. Tai rodo, kad bioplėvelių formavimasis yra svarbus *L. monocytogenes* išlikimui maisto pramonėje (Colagiorgi et al., 2017).

1.5. *Listeria monocytogenes* prevencinės priemonės maisto pramonėje

Paprastai tinkamai pritaikytos dezinfekavimo priemonės, gali slopinti planktoninių ląstelių kolonizaciją. Tačiau netinkamos dezinfekuojamų priemonių koncentracijos ar jų naudojamas ant drėgnų paviršių gali tapti neveiksmingomis priemonėmis prieš bakterijų plitimą (Gray et al., 2018). Chloro junginiai yra pigūs ir naudojami prieš bakterijas, grybelius, dumblius. Įrodyta, kad įvairūs chloro junginiai, tokie kaip natrio hipochloritas, chloro dioksido

dujos arba vandeninis chloro dioksidas veikia *L. monocytogenes* (Gray et al., 2018). Tarp biocidų, ketvirtiniai amonio junginiai yra viena iš maisto pramonėje dažniausiai naudojamų dezinfekavimo priemonių. Ši priemonė mažomis koncentracijomis, efektyviai naikina bakterijas, dumblius, grybelius, sporas, virusus ir mikobakterijas. Dezinfekantas bakterijose pažeidžia fosfolipidų dvisluoksnį, kas sukelia ląstelės turinio ištekėjimą ir bakterijos mirtį. Ketvirtiniai amonio junginiai yra stabilūs, pasižymi mažu toksiškumu, todėl yra tinkami naudoti maisto pramonėje (Gray et al., 2018).

L. monocytogenes augimą ir dauginimąsi stabdančios dezinfekcinės medžiagos: peroksidai, ketvirtiniai amonio junginiai. Mažiausią poveikį turėjo tie dezinfekantai, kurių sudėtyje buvo alkoholiai (Kvaraciejūtė, 2019). Mikroorganizmas yra atsparus ultravioletiniams, gama ir rentgeno spinduliams. *L. monocytogenes* atsparumas dažniausiai naudojamoms dezinfekcinėms priemonėms, skatina atsiradimą ir išlikimą maisto perdirbimo aplinkoje (Skowron et al., 2019).

Neseniai ozonas tapo alternatyvia dezinfekavimo priemone. Dėl savo antibakterinių savybių, ozonas yra plačiai naudojamas geriamojo vandens ir nuotekų dezinfekavimui, taip pat maisto pramonėje. Atsižvelgiant į nukenksminamą paviršių, ozonas naudojamas dujinėje arba skystoje formoje. Mikroorganizmams pašalinti pakanka nedidelės ozono koncentracijos ir trumpo veikimo. Jis nukenksmina bakterijas (*Listeria* spp., *Escherichia* spp., *Salmonella* spp.), virusus, grybelius ir jų sporas bei pirmuonis. Naudojant vandenį su maža ozono koncentracija (0,5 mg/L), sumažina mezofilinių ir koliforminių bakterijų skaičių ant daržovių paviršių. Ozonas sutrikdo bakterijų ląstelių membranos vientisumą, oksiduodamas fosfolipidus ir lipoproteinus. Grybuose, tam tikru etapu, ozonas slopina mikrobu augimą. Virusuose – pažeidžia viruso kapsidę ir sutrikdo replikaciją (Skowron et al., 2019).

1.6. Listeriozė

Listeriozė yra gyvūnų ir žmonių užkrečiama liga, kurią sukelia *Listeria monocytogenes* bakterijos. Šis viduląstelinis patogenas gali užkrėsti tiek sveikus, tiek silpną imuninę sistemą turinčius žmones. Sveikiems asmenims liga gali būti besimptomė arba gali pasireikšti gastroenteritas, peršalimo simptomai. Tuo tarpu asmenims, kurių imunitetas silpnas, liga pasireiškia invazine forma. Infekciją sukelti dozė nežinoma, tačiau atsižvelgiant į šeimininko būklę, manoma, kad ji yra nuo 100 KFV iki 10⁶ KFV. Inkubacinis periodas varijuoja nuo 3 dienų iki 3 mėnesių ir priklauso nuo žmogaus imuninės būklės bei į organizmą patekusių bakterijų kiekio (Bhunja, 2018).

Žmonėms, *Listeria* gali pasireikšti kaip 1) virškinamojo trakto listeriozė; 2) sisteminė listeriozė; 3) abortas ir naujagimių listeriozė. Neinvazinė listeriozė (gastroenteritas) yra

lengvesnė ligos forma, kuria dažniausiai serga sveiki žmonės. Bakterijai patekus į organizmą, liga pasireiškia per 24 valandas. Šia ligos forma dažniausiai užsikrečiama per maistą, kuriame buvo didelė *L. monocytogenes* koncentracija (Bourdichon et al, 2019). Pasauliniu mastu, nuo 1993 metų, dėl maiste rastų *L. monocytogenes* kilo septyni protrūkiai, susiję su gastroenteritu. Šiuos protrūkius sukėlė 1/2a, 1/2b ir 4b serotipai. Bakterija nustatyta ryžių, tuno salotose, sūryje, upėtakyje ir šokoladiniame piene. Suaugusieji ir tie, kurie vartojo vaistus skrandžio sulčių rūgštingumui mažinti, buvo imlesni infekcijai nei vaikai. Inkubacinis periodas varijavo nuo 6 val. iki 10 dienų. Manoma, kad bakterija daro žalą, paveikdama maistinių medžiagų įsisavinimą ir skatindama skysčių sekreciją. Tipiniai gastroenterito simptomai yra galvos skausmas, pykinimas, vėmimas, pilvo skausmas ir diarėja (Bhunias, 2018).

L. monocytogenes sukelia invazinę listeriozę, retą, bet mirtiną ligos formą, kuri pirmiausia paveikia žmones su nusilpusiu imunitetu. Tai gali būti jauni, vyresnio amžiaus asmenys (virš 60 metų) ir nėščiosios. Padidintos rizikos grupėje yra asmenys sergantys AIDS, kardiovaskuliaremis ligomis, cukriniu diabetu, vėžiu ir gydomi chemoterapija, žmonės, kuriems atlikta organų transplantacija ir tie, kurie turi priklausomybę alkoholiui. Bakterija trumpam laikui kolonizuojasi žarnyne, pereina žarnyno barjerą ir patenka į kraujotaką arba limfinę sistemą. Didžioji dalis per 24 valandas pasiekia tikslinius organus ir pasiskirsto kepenyse (90 %), blužnyje (10 %) ir mezenteriniuose limfmazgiuose (MLN). Vėliau listerija kerta hematoencefalinį barjerą ir infekuoja smegenis, sukeldama meningitą ir encefalitą. Nėščiosioms, listerija kerta placentos barjerą ir infekuoja vaisių. Sisteminei listeriozei būdingas galvos skausmas, peršalimo simptomai, bendras negalavimas, septicemija, meningitas, encefalitas, ataksija, bakteremija ir kepenų abscesai. *L. monocytogenes* siejama su Krono liga – lėtinė žarnyno liga, kuriai būdingas uždegimas, pažeidžiantis ne tik paviršinius, bet ir giliuosius žarnos sienelės sluoksnius (Bhunias, 2018).

Nėščiosioms, *L. monocytogenes* vėlyvą trečiąjį nėštumo trimestrą gali sukelti tokias komplikacijas, dėl kurių vaisius gali gimti per anksti arba negyvas. Nėštumo laikotarpiu, sisteminė listeriozė sukelia vaisių dengiančių membranų uždegimą, kuris dar vadinamas intrauterine infekcija. *L. monocytogenes* juda iš motinos organų į placentą ir vėliau grįžta atgal į motinos organus. Placenta yra pakankamai apsaugota nuo bakterijos kolonizacijos, tačiau jei viena bakterija pateks į placentą ir ras tinkamą nišą, ji ten kolonizuosis ir taps infekcijos šaltiniu motinai. Gali būti, kad priešlaikinis gimdymas arba abortas yra motinos apsauginis mechanizmas, kurio metu pašalinamas infekcijos šaltinis ir suteikiamos didesnės galimybės išgyventi motinai. Infekcija prasideda paprastais, peršalimo simptomais, kurie palaipsniui progresuoja iki stipraus galvos skausmo. Sumažėję vaisiaus judesiai, priešlaikinis gimdymas, abortas, negyvagimiai yra dažnos infekcijos atvejų pasekmės (Bhunias, 2018).

Naujagimių listeriozė skirstoma į ankstyvąją ir vėlyvąją formas. Ankstyvoji listeriozės forma (1,5 dienos) yra įgyjama dar gimdoje, infekcija plačiai paplitusi po organizmą ir mirtingumas labai aukštas. Vėlyvoji listeriozės forma (14 dienų) gali būti įgyjama iš makšties arba aplinkos. Sergant vėlyvąja listerioze būdingas meningitas. Naujagimių listeriozės simptomai yra kvėpavimo sutrikimai, pneumonija, dusulys, padidėjęs jautrumas, konjunktyvitas, bėrimas, vėmimas, hipo- arba hipertermija. Naujagimių listeriozės mirštamumas yra apie 36 % (Bhunja, 2018).

1.6.1. Diagnostika ir gydymas

Listeriozė diagnozuojama laboratorijose atliekant bendrą kraujo tyrimą, citologinį smegenų skysčio tyrimą, bakteriologinį kraujo, nosiaryklės, odos abscesų, išmatų tyrimą. Mėginiai patekę į laboratoriją yra auginami ant specialaus Mueller – Hinton agarų, kuriame atsiskiria hemolizę sukeliančios Gramteigiamos lazdelės. Yra ir kitokių, greitų listeriozės aptikimo metodų, įskaitant polimerazės grandininę reakciją (PGR). Nėštumo metu patikimiausi būdai išsiaiškinti ar simptomai atsirado dėl listeriozės yra kraujo ir placentos ėminiai. Nėščiosios moterys maždaug 20 kartų dažniau susergera listerioze nei kiti sveiki suaugusieji. Žmonės, sergantys ŽIV/AIDS 300 kartų dažniau sergera nei asmenys su normaliai funkcionuojančia imunine sistema. Dėl ilgo inkubacijos laikotarpio sudėtinga atsekti maisto produktus, kurie galėjo būti tikraisiais infekcijos šaltiniais (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>, žiūrėta 2020-03-20). Dėl listerinio meningito, mirštamumas gali siekti 70 %, dėl sepsio 50 %, o dėl perinatalinių/naujagimių infekcijų – daugiau kaip 80 % (Temple ME, Nahata MC, 2000). Kadangi listeriozės simptomai labai primena gripo ar kitų su maistu plintančių infekcijų sukeltus simptomus, daugelis žmonių nežino, kad sergera (<https://medbroadcast.com/condition/getcondition/listeriosis>, žiūrėta 2020-04-02).

Vakcinų nuo listeriozės nėra, todėl ankstyva diagnozė yra labai svarbi norint pradėti sėkmingą paciento gydymą antibiotikais. Dėl ilgo bakterijos inkubacinio laikotarpio (iki 70 dienų) yra sunku nustatyti patogeno šaltinį ir kilmę (Olaimat et al., 2018). Bakterija yra jautri daugumai antibiotikų, bet atspari cefalosporinams, kurie dažniausiai naudojami gydant bakterines infekcijas (Buyck et al., 2018). Listeriozė gydoma antibiotikų grupės preparatais, beta-laktamais (penicilinu arba ampicilinu), kurie gali būti naudojami vieni arba kombinuojami su aminoglikozidų grupės antibiotikais (gentamicinu). Pacientams, kuriems pasireiškia alerginė reakcija į peniciliną, rekomenduojama naudoti sulfametoksazolo ir trimetoprino derinį, taip pat sulfametoksazolą kartu su ko-trimoksazoliu. Vankomicinas yra naudojamas bakteremijai gydyti, o eritromicinas yra skiriamas nėščiosioms. Listeriozei gydyti taip pat naudojama rifampicinas, tetraciklinas, chloramfenikolis ir fluorochinolonai (Olaimat et al., 2018).

1.6.2. Sergamumas ir epidemiologija

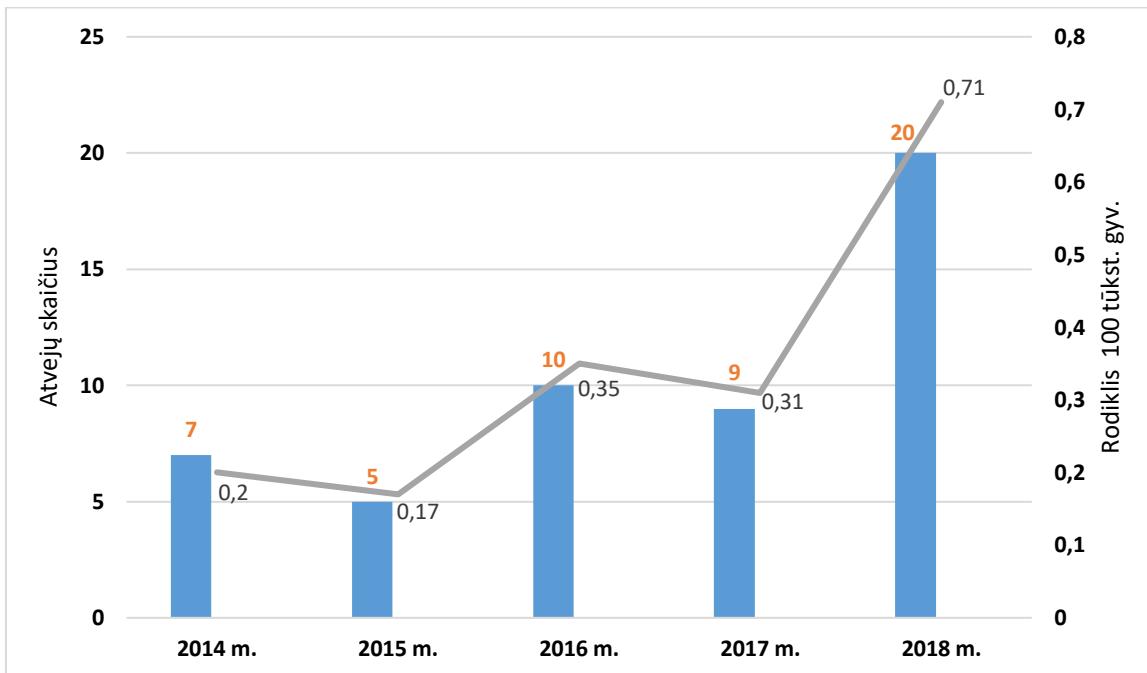
Listeriozės dažnumas pasauliniu mastu svyruoja nuo 0,1–11,3 mln. atvejų per metus. Dauguma infekcijų atvejų yra atsitiktiniai ir manoma, kad tik 5 % atvejų yra susiję su protrūkiiais. Užsikrėtusių mirtingumas pakankamai aukštas ir siekia 20–40 %. Jungtinėse Amerikos Valstijose maždaug 1600 asmenų kasmet susergera sunkiausia listeriozės forma (sergamumo dažnumas yra apie 0,26 atvejų 100 000 gyventojų), iš kurių 260 miršta. (Rodríguez-Campos et al., 2019). 2018 metais Europos Sąjungoje patvirtinti 2549 infekcijos atvejai (sergamumo dažnumas 0,48 atvejų 100 000 gyventojų). Mirštamumas siekė 15,6 % – didžiausias tarp visų per maistą plintančių ligų (EFSA, ECDC, 2020).

1.6.3. Sergamumas listerioze Lietuvoje

Lietuvoje kasmet vidutiniškai užregistruojama apie 20 tūkst. per maistą ir vandenį plintančių žarnyno infekcinių ligų atvejų. Šios infekcinės ligos tarp visų užkrečiamųjų ligų vidutiniškai sudaro apie 2 %. Tačiau pateikta statistika neparodo realios situacijos, nes lengvesnėmis zoonozių formomis sergantys asmenys nesikreipia medicinos pagalbos (ULAC, 2019).

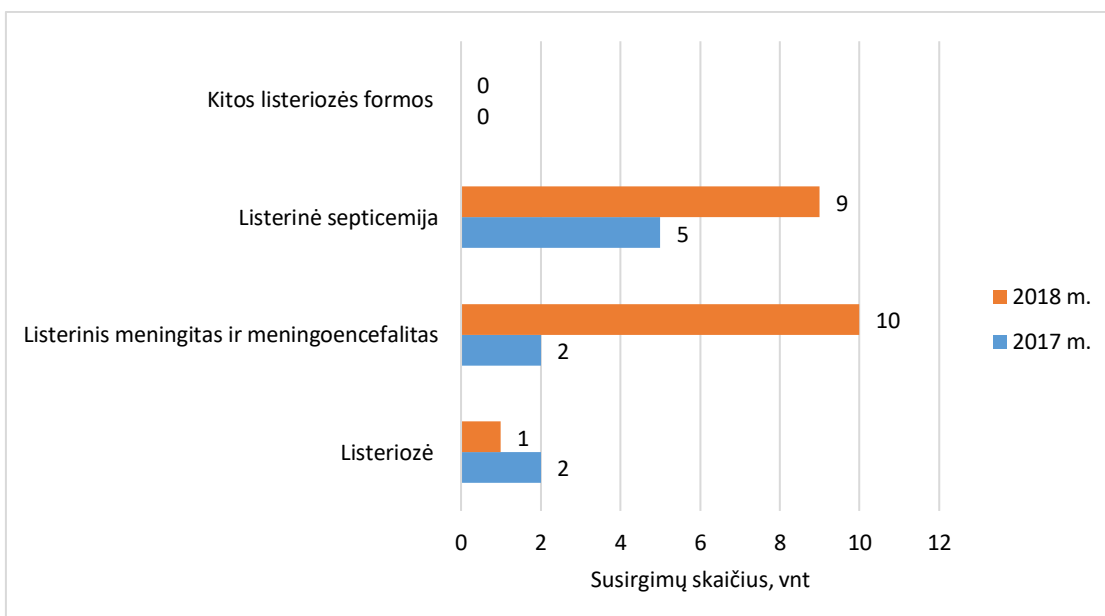
Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centro specialistai, 2019 metais parengė „Sergamumo užkrečiamosiomis ligomis Lietuvoje 2018 m. apžvalgą“, kurioje analizuojami sergamumo užkrečiamosiomis ligomis duomenys, registruoti 2018 metais. Remiantis šia apžvalga, salmoneliozė ir kampilobakteriozė yra dažniausiai registruojamos per maistą plintančios zoonozės visame Europos regione. Kitos zoonozės, bruceliozė, listeriozė, Q karštligė yra svarbios visuomenės sveikatos problemos atskiruose Europos regionuose. 2014–2018 m. ES šalyse buvo stebimas padidėjęs sergamumas kampilobakterioze (nuo 61,7 iki 64,8 atv./100 tūkst. gyv.) ir listerioze (nuo 0,36 iki 0,48 atv./100 tūkst. gyv.).

Šiuo laikotarpiu Lietuvoje buvo užregistruotas 51 listeriozės atvejis. Sergamumo rodiklis 2014–2018 m. svyravo nuo 0,2 atv./100 tūkst. gyv. iki 0,71 atv./100 tūkst. gyventojų. 2018 metais Lietuvoje buvo diagnozuota 20 listeriozės atvejų (0,71 atv./100 tūkst. gyv.), t.y. 11 atvejų daugiau nei 2017 m.



5 pav. Sergamumo listerioze dinamika Lietuvoje 2014–2018 m. (pagal ULAC, 2019).

2018 m. 10 atvejų buvo diagnozuotas listerinis meningitas ir meningoencefalitas (6 pav.), 2017 m. ši diagnozė nustatyta tik 2 asmenims. Taip pat ženkliai padidėjo ir listerinės septicemijos susirgimų, lyginant 2017 m. jų buvo 5, o 2018 m. – 9. Iš dviejų metų galutinių diagnozių matoma, kad yra tendencingas sisteminės listeriozės susirgimų atvejų didėjimas. Tai nurodo, kad daugėja sisteminės listeriozės atvejų.



6 pav. Listeriozės atvejų skaičius pagal galutinę diagnozę 2018 m. (pagal ULAC, 2019).

2014–2018 m. iš viso užregistruota 13 mirties nuo listeriozės atvejų, 4 iš jų 2018 m.: 3 atvejai nuo listerinio meningito ir meningoencefalito, 1 atvejis nuo listerinės septicemijos. Tų pačių metų laikotarpyje nustatyti nežymūs, bet reikšmingi sergamumo skirtumai tarp lyčių. 5

metų laikotarpyje, nustatyti 23 susirgimo atvejai tarp vyrų ir 28 atvejai tarp moterų. Tarp susirgusiųjų 2018 m. buvo 13 vyrų ir 7 moterys. Tuo tarpu 2017 m. infekcija dažniau pasireiškė moterims. Listerioze užsikrėtė 2 vyrai ir 7 moterys (3 lentelė). Tarp provincijos gyventojų 2018 m. užregistruoti 6 susirgimai listerioze, tarp miesto gyventojų 14.

3 lentelė. Susirgusių asmenų struktūra pagal lytį 2014–2018 m. (pagal ULAC, 2019).

Metai	Vyrai		Moterys		Iš viso	
	Atvejų sk.	Sergamumo rodiklis 100 tūkst. gyv.	Atvejų sk.	Sergamumo rodiklis 100 tūkst. gyv.	Atvejų sk.	Sergamumo rodiklis 100 tūkst. gyv.
2018	13	1	7	0,46	20	0,71
2017	2	0,15	7	0,45	9	0,31
2016	5	0,37	5	0,32	10	0,35
2015	0	0	5	0,32	5	0,17
2014	3	0,22	4	0,25	7	0,2
Iš viso	23	-	28	-	51	-

Susirgimai listerioze buvo registruoti 4 Lietuvos regionuose: Kauno, Panevėžio, Šiaulių ir Vilniaus. Daugiausia susirgimų nustatyta Kaune (10 atvejų), mažiausia - Šiauliuose (1 atvejis). Amžiaus grupė turi didelę reikšmę sergamumui listerioze, kadangi vaikai ir vyresni žmonės yra įtraukiami į padidintos rizikos grupę. Listeriozė buvo nustatyta 7 amžiaus grupėse: 75 % visų atvejų nustatyti vyresnių nei 45 m. asmenų tarpe. Didžiausias sergamumas užregistruotas 65–74 m. amžiaus grupėje (4 lentelė). 2018 m. registruotas 1 naujagimių listeriozės atvejis.

4 lentelė. Susirgimų atvejai pagal amžiaus grupes 2018 m. (pagal ULAC, 2019).

Amžiaus grupė	Susirgimų sk.	Rodiklis 100 tūkst. gyv.
0–17 m.	1	0,19
18–24 m.	1	0,45
25–34 m.	3	0,8
35–44 m.	0	0
45–54 m.	1	0,24
55–64 m.	2	0,49
65–74 m.	9	3,27
75–84 m.	3	1,45
85 m.+	0	0
Iš viso	20	0,71

2018 m. 19 asmenų iš klinikinės medžiagos buvo išauginta patogeninė *L. monocytogenes*. Žarnyno infekcinių ligų sukėlėjų grupėje listerijos sudarė 0,9 %. Fiksuotas tik vienas atvejis, kuomet patogenas buvo išaugintas iš klinikinio mėginio berniukui iki 1 metų. Vyresniems nei 65 metų asmenims, *L. monocytogenes* mikroorganizmai, buvo išauginti iš kraujo ir likvoro, žaizdos ir patanatominės medžiagos. 2018 m. listerijų, išaugintų iš klinikinių

mėginių, užregistruota 3 atvejais mažiau nei 2017 m. 8 listerijos buvo tipuotos ir nustatyta, kad serotipas 1/2a ir serotipas 4b dominavo tirtuose mėginiuose.

Iš aplinkos mėginių listerijų išauginta 50,7 % mažiau nei 2017 m. Jos daugiausia augo iš kulinarijos gaminių, plovinių, žalios mėsos, žuvies ir kt.

1.6.4. Sergamumas listerioze Europoje

2018 metais, 28 Europos šalių narės iš viso patvirtino 2549 žmonių invazinės listeriozės atvejus. Tai sudarė 0,47 atvejus 100 000 gyventojų, tai buvo apytiksliai tiek pat, kiek ir 2017 metais – 0,48 atvejais 100 000 gyventojų. Daugiausia pranešimų buvo Estijoje, Suomijoje, Švedijoje ir Danijoje – atitinkamai 2,05, 1,45, 0,88 ir 0,85 atvejo 100 000 gyventojų. Mažiausiai pranešimų užfiksuota Bulgarijoje, Kroatijoje, Kipre ir Rumunijoje ($\leq 0,15 / 100,000$) (5 lentelė). Didžioji dauguma iš užfiksuotų listeriozės atvejų (99,5 %) yra su žinoma infekcijos kilme Europos Sąjungoje (ES). Šešios valstybės narės nustatė apie 15 infekcijų atvejų, kuomet liga buvo užsikrėsta kelionės metu: 8 atvejai už ES ribų ir 7 ES viduje. 2018 metais iš visų nustatytų ir patvirtintų atvejų, 35,5 % sudarė atvejai, kurių kilmė nėra žinoma (EFSA, ECDC, 2019).

5 lentelė. Žmonių invazinės listeriozės patvirtinti atvejai, dažnis 100 tūkst. gyv. ES šalyse, 2017 – 2018 m. Žalia spalva – mažiausiai užfiksuotų atvejų skaičius, mėlyna spalva – didžiausias atvejų skaičius (pagal EFSA, ECDC, 2019).

Šalis	2018 m.			2017 m.	
	Iš viso atvejų sk.	Patvirtinti atvejai		Patvirtinti atvejai	
		Atvejų sk.	Dažnis (100 tūkst. gyv.)	Atvejų sk.	Dažnis (100 tūkst. gyv.)
Austrija	27	27	0,31	32	0,36
Belgija	74	74	0,81	73	0,80
Bulgarija	9	9	0,13	13	0,18
Kroatija	4	4	0,10	8	0,19
Kipras	1	1	0,12	0	0,00
Čekijos Respublika	35	31	0,29	30	0,28
Danija	49	49	0,85	58	1,01
Estija	27	27	2,05	4	0,30
Suomija	80	80	1,45	89	1,62
Prancūzija	338	338	0,51	370	0,55
Vokietija	684	583	0,82	725	0,88
Graikija	19	19	0,18	20	0,19
Vengrija	24	24	0,25	36	0,37
Airija	21	21	0,43	14	0,29
Italija	180	178	0,29	164	0,27
Latvija	15	15	0,71	9	0,32
Lietuva	20	20	0,71	9	0,32
Liuksemburgas	5	5	0,83	5	0,85
Malta	1	1	0,21	0	0,00
Olandija	69	69	0,40	108	0,63
Lenkija	128	128	0,34	116	0,31
Portugalija	64	64	0,62	42	0,41
Rumunija	28	28	0,14	10	0,05
Slovakija	18	17	0,31	12	0,22

Slovėnija	10	10	0,48	13	0,63
Ispanija	372	370	0,89	284	-
Švedija	89	89	0,88	81	0,81
Jungtinė Karalystė	170	168	0,25	160	0,24
Viso ES	2561	2549	0,47	2479	0,48

2009–2018 m. laikotarpyje stebima, kad ES užregistruoti infekcijos atvejai buvo sezoniskai pasiskirstę – vasaros laikotarpiu sergamumas didesnis nei žiemos metu. Taip pat pastebėtas statistiškai reikšmingas listeriozės padidėjimas ($p < 0,01$), o didžiausias atvejų skaičiaus didėjimas fiksuojamas 2014–2018 m. ($p < 0,05$) (EFSA, ECDC, 2019).

14 valstybių, tarp jų Estijoje, Suomijoje, Vokietijoje, Italijoje, Lenkijoje, Rumunijoje, nuo 2009 metų pastebimai padaugėjo patvirtintų listeriozės atvejų. Nei vienoje iš 28 ES šalių 2009–2018 m. nebuvo pastebėtas infekcijos sumažėjimas. 9 šalyse (Vokietijoje, Estijoje, Suomijoje, Italijoje, Latvijoje, Lietuvoje, Lenkijoje, Rumunijoje ir Ispanijoje) 2014–2018 m. buvo matomas žymus infekcijos atvejų daugėjimas. Manoma, kad didėjantį atvejų skaičių Ispanijoje iš dalies lėmė tai, kad pagerėjo šios infekcijos atsekamumas (EFSA, ECDC, 2019).

2018 metais 18 šalių buvo patvirtinti sunkūs infekcijos atvejai, kuriems buvo reikalinga hospitalizacija, jie sudarė 42,4 % visų tirtų ir patvirtintų listeriozės atvejų. Lyginant su kitomis zoonozėmis, listeriozė turi daugiausia patvirtintų hospitalizuotų atvejų (EFSA, ECDC, 2019). Iš viso 2018 m. Europoje patvirtinos 229 mirtys nuo šios infekcijos, mirčių skaičius nuo 13,6 % 2017 m. pakilo iki 15,6 % 2018 m. Didžiausias mirštamumas užfiksuotas Lenkijoje (56 atvejai), šiek tiek mažiau užfiksuota Prancūzijoje (42 atvejai) (EFSA, ECDC, 2019).

Listeria infekcija dažniausiai nustatyta vyresnio amžiaus grupėms, t.y. asmenims virš 64 metų. ES šalyse listeriozės atvejai šioje amžiaus grupėje augo nuo 56,0 % 2008 metais, iki 69,1 % 2018 metais, o amžiaus grupėje virš 84 metų, atvejų skaičius tuo pačiu laikotarpiu padidėjo nuo 7,3 % iki 14,5 %. Mirčių skaičius vyresnių nei 64 metų amžiaus grupėje išaugo nuo 64,9 % 2008 m. iki 74,2 % 2018 m. (EFSA, ECDC, 2019).

Nors žmonių listeriozė vis dar yra gana reta, bet dėl didelės hospitalizacijos ir mirčių skaičiaus, ji yra viena iš rimčiausių su maistu plintančių ligų, kurias seka ir prižiūri ES. ES vykdomų listeriozės stebėsenos programų tikslas yra stebėti šios infekcijos plitimą ir atsekti patogeno šaltinį apsaugant visuomenę nuo šios ligos (EFSA, ECDC, 2019).

1.7. Maisto produktų užterštumas listerijomis Europoje

Europoje 2018 metais, didžiausias listerijų kiekis buvo nustatytas iš anksto paruoštuose maisto produktuose (angl. RTE – ready to eat), kurių didžiausią dalį sudarė mėsa ir mėsos gaminiai – 37,5 %, o antroje vietoje buvo pienas ir pieno pusgaminiai, kurie sudarė 36,6 %. 2018 metais šios dvi kategorijos sudarė apie 75 % visų paimtų maisto mėginių, mėsos ir jos

produktų mėginių skaičius padidėjo 28 %. Iš visų tyrimams paimtų mėginių žuvis ir jos produktai sudarė 9 %, apie 16 % sudarė mėginiai priskirti „kitiems RTE maisto produktams“. Iš RTE maisto produktų grupės, pienas ir pieno produktai daugiausiai buvo tiriami Bulgarijoje, Italijoje, Lenkijoje ir Rumunijoje, mėsa ir mėsos produktai – Čekijoje, Lenkijoje ir Rumunijoje, o žuvis ir jos produktai – Prancūzijoje, Vokietijoje, Italijoje ir Lenkijoje. Tik 1,1 % visų RTE mėginių sudarė kūdikiams ir medicinos įstaigoms skirtas maistas. Nustačius, kad vaisiai ir daržovės taip pat gali būti listeriozės šaltiniu, EFSA rekomenduoja ES narėms imti mėginius ir iš šių maisto produktų (EFSA, 2018). 2018 m. iš visų atrinktų mėginių, vaisiai ir daržovės sudarė tik 0,8 %. Nuo 2016 m. ES šalių narės padidino mėginių ėmimą iš daugumos RTE maisto kategorijų (EFSA, ECDC, 2019).

1.7.1. *L. monocytogenes* mikrobiologinių rodiklių reglamentavimas

Žmonių sveikatos apsauga yra pagrindinis su maistu skirtų teisės aktų tikslas. Maistas privalo atitikti visus nurodytus mikrobiologinius rodiklius ir turi būti tokios kokybės, kad būtų tinkamas žmonėms vartoti ir nekeltų pavojaus jų sveikatai. Lietuvos Respublikos higienos norma HN 26:2006 „Maisto produktų mikrobiologiniai kriterijai“ reglamentuoja patogeninių mikroorganizmų nustatymą. Maisto produktai negali būti užteršti cheminiais, fizininiais, mikrobiologiniais ar kitokiais teršalais daugiau nei nurodo Komisijos reglamentas (EB) Nr. 1441/2007. Jis teigia, kad paruoštoje produkcijoje *L. monocytogenes* bakterijų kiekis turi būti mažesnis nei 100 KSV/g, o kūdikiams skirtuose paruoštuose maisto produktuose ir specialios medicininės paskirties produktuose *L. monocytogenes* negali būti aptikta. Taip pat maisto produktai turi atitikti privalomuosius saugos ir kokybės reikalavimus pateiktus Lietuvos Respublikos Maisto įstatyme, Nr. VIII-1608, (2019) (<http://www.nvspl.lt/index.php?59936412>, žiūrėta 2020-03-04).

JAV šalyse, visuose iš anksto pagamintuose maisto produktuose, *L. monocytogenes* taikoma „nulinė tolerancija“. Tuo tarpu Kanadoje, kitose Europos šalyse leidžiamas bakterijų kiekis yra 100 KFV 25 g maisto, su sąlyga, jei aplinkos sąlygos nepalaiko bakterijų dauginimosi, produkto galiojimo laikotarpiu (Bhunja, A. K., 2018).

1.8. *Listeria* spp. nustatymas

Dauguma maisto produktų gali būti patikrinti dėl *Listeria* spp. ir *L. monocytogenes*, tačiau perdirbti atšaldyti produktai, tokie kaip pieno gaminiai, virta mėsa ir rūkyta žuvis, sudaro didžiąją tikrinamų mėginių dalį. Mėginiai nuo maisto ruošimo paviršių, šaltų ir drėgnų vietų, pavyzdžiui, drenažų ar kondicionierių, yra paimami vatos tamponais (angl. swabs). Iš maisto ir

aplinkos paimti mėginiai, turėtų būti patikrinti kuo greičiau po jų surinkimo. Jei to padaryti neįmanoma, mėginiai turėtų būti laikomi 4 °C temperatūroje (Liu et al., 2018).

Tarptautinės standartizacijos organizacija (angl. ISO – International Organization for Standardization) yra parengusi metodus, skirtus aptikti ir skaičiuoti *L. monocytogenes* ir *Listeria* spp. maiste ir gyvūnų pašaruose, ISO 11290-1:2017 standarto dalis skirta listerijoms aptikti, o ISO 11290-2:2017 listerijoms skaičiuoti. Kartu su listerijomis esančių mikroorganizmų skaičius gali būti gerokai didesnis, dėl to būtinas atrankusis gausinimas. Taip pat būtina aptikti streso paveiktas ir pažeistas listerijas, šią funkciją iš dalies atlieka pirminė atrankioji gausinimo terpė su sumažinta inhibitoriaus koncentracija (ISO 11290-1:2017) (Gasnov et al., 2005).

Tradicinis bakterijų kultivavimo metodas pradėtas naudoti dar devintojo dešimtmečio pradžioje ir yra iki šiol plačiai naudojamas visame pasaulyje. Tai daugiapakopis procesas, kuris apima gausinimą, išsėjimą į terpes ir auginimą, bei nustatymą biocheminiais testais. Visas šis procesas trunka apie savaitę laiko, dėl to tradicinius metodus stengiamasi pakeisti greitesniais, alternatyviais metodais (Välmaa et al., 2015). Fenotipiniai ir genotipiniai metodai dažniausiai naudojami po *Listeria* pagausinimo etapo. Imunofermentinės analizės testai paremti antigeno – antikūno komplekso susidarymu ir vertinamas pagal fermento, prijungto prie vieno iš komponentų, aktyvumą. Dažniausiai naudojami įvairūs ELISA tipai (tiesioginė, netiesioginė, dviepitopinė, konkurentinė), listerijų struktūriniais vienetais, tokiems kaip LLO toksinui, žiuželiams ir kt., nustatyti. Visi šie metodai yra pakankamai brangūs, nes reikalinga speciali įranga. Naudojant nukleorūgščių nustatymu paremtus metodus galima nustatyti inlB geną, kuris yra 100 % specifiškas *L. monocytogenes* ir kurį galima identifikuoti praleidžiant gausinimo etapus. Dažniausi virulentiškumo faktoriai, tokie kaip hlyA genas (LLO), iap genas (su invazija susijęs baltymas), inl genas (internalinai) ir kt., yra amplifikuojami naudojant polimerazės grandininę reakciją (PGR). Listerijos aptikimui ir greitam atskyrimui iki kamieno, galėtų būti naudojamas kelių lokusų viengrandės konformacijos polimorfizmas (angl. Multi-locus single strand conformation polymorphism). Amplifikavimo metodai turi ir keletą apribojimų: jie negali atskirti gyvybingos ir neaktyvios listerijos, taip pat kai kurių foninių komponentų. Fenolio, aldehydų buvimas rūkytoje žuvyje, hemoglobino kiekis kraujyje ar proteazės pieno produktuose gali trukdyti PGR procesui. DNR hibridizacija – tai dar vienas molekulinis metodas, naudojamas listerijų charakterizavimui. *Listeria* spp. detekcija atliekama naudojant zoną, pažymėtą radioizotopu. Ši technika naudojama greitam listerijos aptikimui maisto produktuose (Välmaa et al., 2015).

MLST (angl. multilocus sequence typing) yra molekulinės biologijos metodas, turi pranašumų prieš kitus metodus, nes gali pertvarkyti evoliucinius ryšius tarp *L. monocytogenes*

izoliatų. Eksperimento metu yra pagausinami apie 450 – 500 bp dydžio „namų ruošos“ genų fragmentai, jie sekvenuojami ir gautos sekos lyginamos tarpusavyje bei su duomenų baze. Listerijų aptikimui naudojamas BAX kokybinis metodas, naudojantis PGR ir fluorescencijos technologiją, kuri per trumpą laiką amplifikuoja milijonus ieškomos bakterijos DNR fragmentų. Amplifikuota DNR siunčia fluorescencinį signalą, kurį realaus laiko termocikleris Q7 atpažįsta ir pateikia rezultatus (Moghadam and Larsen, 2019).

Daugelį metų ir iki šių dienų, pulsuojančio lauko gelio elektroforezės (angl. PFGE – pulse field gel electrophoresis) metodas naudojamas didelės masės DNR molekulių išskyrimui. Jis pasižymi puikiu pakartojamumu ir didele skiriamąja geba, dėl to yra vadinamas „auksiniu standartu“. Vis dėlto viso genomo sekos nustatymas (angl. WGS – whole genome sequence) pirmą kartą buvo pristatytas JAV 2008 m. ir padėjo nustatyti, išspręsti ir suvaldyti „Blue Bell“ valgomųjų ledų, užkrėstų listerijomis protrūkį. Nuo tada WGS tapo tinkamiausiu metodu, nustatant ir stebint patogenus maisto mėginiuose ir maisto gamybos vietose. Daugybė maisto saugos tarnybų plačiai naudoja šią techniką įvairiose pasaulio šalyse ir ypač Europoje. WGS yra tikslesnis nei serotipavimas ir turintis didesnę skiriamąją gebą nei ribotipavimas ar RFLP (angl. restriction fragment length polymorphism) (<https://store.fil-idf.org/product/bulletin-of-the-idf-n-502-2019-ecology-of-listeria-spp-and-listeria-monocytogenes-significance-in-dairy-production/>, žiūrėta 2020-04-03).

WGS suteikia galimybę: diferencijuoti užteršimo šaltinius, nustatyti, kuris maisto produktas ar ingredientas buvo pirminis užkrato šaltinis, sukėlęs protrūkį; nustatyti maisto užteršimo vektorius, fenotipines izoliatų savybes, tokias kaip atsparumas ar jautrumas valymo priemonėms ar prisitvirtinimas prie paviršių. Identifikuotais profiliais gali būti dalijamasi ir lyginami tarp viso pasaulio laboratorijų, naudojant atviros prieigos tarptautines duomenų bazes, tokias kaip „GenomeTrakr“. Maisto mikrobiologai ir klinikiniai mikrobiologai dabar gali tiksliai nustatyti užteršimo kilmę ir palyginti su klinikiniais izoliatais (<https://store.fil-idf.org/product/bulletin-of-the-idf-n-502-2019-ecology-of-listeria-spp-and-listeria-monocytogenes-significance-in-dairy-production/>, žiūrėta 2020-04-03).

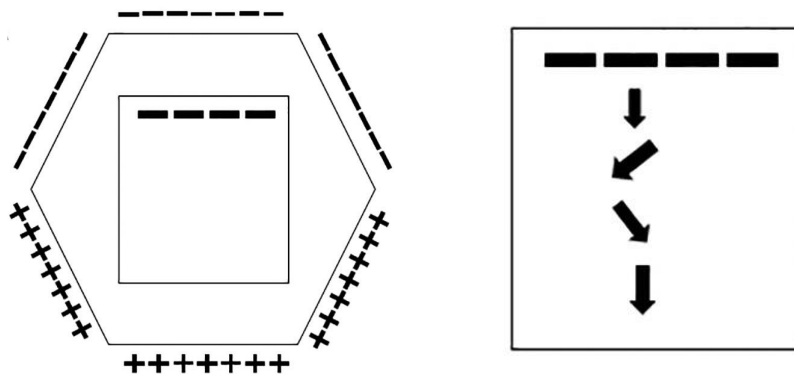
Prognozuojama, kad laikui bėgant WGS taps naujų izoliatų identifikavimo standartu ir pakeis kitus metodus šiam tikslui pasiekti. Šiuo metu pagrindiniai kriterijai, kodėl WGS nepakeičia standartais laikomų metodų yra didelė kaina, standartinių darbo procedūrų trūkumas ir tarptautiniu mastu sutartų „ribinių“ verčių nebuvimas. Su maistu kilę infekcinių ligų protrūkiai neturėtų būti sprendžiami remiantis vien WGS duomenimis, patvirtinimui juos visada reiktų susieti su epidemiologiniais duomenimis. Daugiau nei 30 metų PFGE buvo naudojamas kaip auksinis genotipavimo standartas. Dėl tyrimo atlikimo tobulinimo (įrangos, mokymų, patalpų, duomenų apdorojimo ir t.t.) šios technologijos neįmanoma pakeisti per

trumpą laiką. Tai metodas, kuris turi patvirtintą darbo standartą. Be to, kai kuriose situacijose, kur WGS įsigyti būtų per brangu, PFGE ir toliau bus naudojama kaip patikima ir vertinga analizės priemonė (<https://store.fil-idf.org/product/bulletin-of-the-idf-n-502-2019-ecology-of-listeria-spp-and-listeria-monocytogenes-significance-in-dairy-production/>, 2019 žiūrėta 2020-04-03).

1.8.1. Pulsuojančio lauko gelio elektroforezė

Pulsuojančio lauko gelio elektroforezės metodas (PFGE) yra unikalus genotipavimo metodas, naudojamas didelėms DNR molekulėms atskirti po to, kai jos yra sukarpomos specialiais restrikcijos endonukleazės fermentais (Sharma-Kuinkel et al., 2014). Šie fermentai sukarto bakterijų genominę DNR į smulkesnius fragmentus. Galutiniame rezultate matoma 10 – 20 fragmentų, kurių dydis svyruoja nuo 20 kbp iki 10,000 kbp. (Felix et al., 2012). PFGE metu periodiškai keičiama elektrinio lauko kryptis, jai pakitus, skirtingo dydžio fragmentai juda gelyje skirtingu greičiu. Šiuo atveju, mažesnieji fragmentai, pakitus elektrinio lauko krypties, pajuda greičiau nei didesni (Goering, 2010).

PFGE metodą, dar 1984 m. pasiūlė naudoti David C.Schwartz ir Charles Cantor, nes jo metu ypač gerai išskirstomi nuo kelių kilobazių porų iki 10 Mbp fragmentai. Kuomet įprastos elektroforezės metu, fragmentai, didesni nei 40–50 kb negali efektyviai migruoti gelyje ir galutiniame rezultate matoma plati juosta. PFGE metodas sėkmingai naudojamas siekiant nustatyti patogeninių mikroorganizmų, tokių kaip *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* ir *Listeria monocytogenes*, kamienus. PFGE buvo naudojamas analizuojant mielių ir kai kurių žinduolių dideles chromosomas. Jis buvo naudojamas mielių dirbtinių chromosomų (angl. YAC - Yeast artificial chromosome) bibliotekoms kurti. Ši metodika taip pat naudinga kuriant žmogaus genų žemėlapi. Metodas pasižymi puikiu pakartojamumu ir didele skiriamąja geba, todėl dar yra vadinamas „auksiniu standartu“ (Goering, 2010) (Neoh et al., 2019).



7 pav. Elektroforetinis laukas agarozės gelyje (kairėje); elektrinio lauko reorientacija (dešinėje) (Neoh et al., 2019).

Svarbu paminėti, kad PFGE toli gražu nėra naujausias molekulinis metodas, tačiau turi didžiulę išliekamąją galią kaip vertingas genomo analizės ir palyginimo metodas. Laikoma, kad kiekvieno kamieno PFGE profilyje matomi fragmentai sumoje sudaro daugiau nei 90 % viso genomo (Goering, 2010). PFGE plačiai naudojamas kaip kokybės kontrolės metodas maisto pramonėje. Pavyzdžiui, alaus ir vyno pramonėje, jį naudoja norėdami stebėti genetinių organizmų stabilumą fermentacijos procesuose (Parizad, 2016).

Elektros srovės panaudojimas kartu su srovės greičiu ir elektrinio lauko reorientacija lėmė įvairių tipų PFGE atsiradimą. Laboratorijose dažniausiai naudojamas kontūru suvaržytas homogeninis elektrinis laukas (CHEF), kur kas rečiau lauko inversijos gelio elektroforezė (FIGE), skersai kintančio lauko gelio elektroforezė (TAFE), stačiakampio kintančio lauko gelio elektroforezė (OFAG), pulsuojančio homogeninio keturkampio lauko gelio elektroforezė (PHOGE) ir užprogramuojami automatiškai kontroliuojami elektrodai (PACE) remiasi skirtingais DNR molekulių atskyrimais ir tipavimais. Šių tipų pasirinkimas priklauso nuo finansinių galimybių ir tyrimo tikslo (Parizad, 2016).

CHEF sistemoje, elektroforezės celėje elektrinis laukas yra sukuriamas šešiakampio forma išsidėsčiusių 24 elektrodų pagalba, kurie vienas nuo kito nutolę vienodais tarpais. Reorientavimo kampas dažniausiai būna 120° . PFGE metu elektros laukas periodiškai kinta keliomis kryptimis, kas skatina DNR fragmentus nuolat keisti judėjimo kryptį gelyje. Rezultate gauname tiesias vertikalias DNR fragmentų atskyrimo juostas. Kaip ir dauguma elektroforetinių metodų, CHEF rezultatai priklauso nuo agarozės gelio koncentracijos ir storio, buferio sudėties ir elektrinio lauko (V/cm). Bėgant laikui šie parametrai buvo standartizuoti, t.y. 1,0 % koncentracijos PFGE agarozės (SeaKem Gold, Lonza, Rockland, ME), $0.5 \times$ Tris-borato EDTA buferio (TBE) ir 6 V/cm elektrinio lauko (Richard V. Goering, 2010). Šioje sistemoje galima atskirti didesnes kaip 7000 kb molekules (Parizad, 2016).

Kaip alternatyva CHEF sistemai, gali būti naudojamas FIGE. Šią sistemą 1986 m. atrado ir aprašė Carle, Frank ir Olson. Tai yra greitesnis, bet mažesnę skiriamąją gebą turintis variantas. DNR ir agarozės gelio paruošimas yra toks pats kaip ir CHEF, tik FIGE nereikia specialios elektroforezės kameros, nes elektros srovės laukas reorientuojamas 180° , o ne 120° . Lyginant su CHEF, FIGE elektroforezė užtrunka 3–4 val. (kuomet CHEF 20–30 val.) ir naudojama 2–3 kartus stipresnis elektrinis laukas nei CHEF. FIGE rezultate matomi kompaktiškesni, storesni fragmentai. Nepaisant to, metodas gali būti naudingas greitai atrankai ir siekiant atskirti ne didesnius nei 800 kb fragmentus (Goering, 2010; Parizad, 2016). Bet kurio metodo atkuriamumas laboratorijoje ir tarp laboratorijų priklauso nuo optimizuotų sąlygų ir jų valdymo. Dauguma tyrimu parodė, kad elektroforeze paremti metodai, tokie kaip PFGE, gali tapti tikru iššūkiu daugeliui laboratorijų. Nepaisant to, standartizuoti PFGE tipavimo būdai,

sukurti ir naudojami JAV ligų kontrolės centruose „PulseNet” ir tarptautiniame laboratorijų konsorciume parodo, kad PFGE vienodumą ir atkuriamumą tikrai galima pasiekti. Tai įvyko dėl to, kad labiau akcentuojama standartizuota kokybės kontrolė, ypač pagrindiniuose PFGE etapuose, tokiuose kaip intaktinės genominės DNR paruošimas, restrikcijos fermento parinkimas ir elektroforezės sąlygos (Goering, 2010). Genominės DNR paruošimo metu turi būti nepažeistos bakterijos, kurių kokybė ir koncentracija leistų pakartotinai atlikti restrikciją. Eksperimento eiga Gramteigiamoms ir Gramneigiamoms bakterijoms išlieka ta pati, tik konkreitiems mikroorganizmams paruošimo protokolai gali skirtis. Pavyzdžiui, tam, kad įvykų Gramteigiamų bakterijų sienelių lizė, būtina naudoti tam tikrus fermentus (lizocimą), o Gramneigiamoms nereikia (Goering, 2010). Bet kuris fermentas, kuris tankiai sukarmo DNR (į mažesnius nei 10 kb dydžio) fragmentus, yra netinkamas PFGE analizei. Dėl tos priežasties patartina naudoti fermentus, turinčius nedaug restrikcijos taikinių karpamoje DNR. Fermentai, atpažįstantys didesnes nei 6 bp sekas yra potencialiai naudingi, nes sukarmo į didelius fragmentus. Renkantis restriktazes, būtina atkreipti dėmesį į karpomos DNR G+C kiekį. Jei jis yra 35–55 %, tuomet rekomenduojama rinktis retai kerpančias restriktazes – NotI, SfiI, SrfI, AseI, PacI ir Swa (jos atpažįsta 8 bp igio sekas). Jei G+C kiekis yra mažiau nei 35 %, tada gauname mažai fragmentų, o jei daugiau nei 55 % – fragmentų gauname labai daug, PFGE skiriamoji geba prastėja (Basim & Basim, 2001). Kitas labai svarbus veiksnys – elektroforezės sąlygos. PFGE sistemoje vykdomas DNR atskyrimas yra labai jautrus įvairiems molekuliniais ir aplinkos kintamiesiems veiksniams. Svarbiausi iš jų yra elektrinio impulso trukmė, elektrinio lauko stiprumas, temperatūra, buferio sudėtis.

1.9. „BioNumerics” programinė įranga

„BioNumerics“ yra bioinformatikos programinės įrangos programų rinkinys, kurį sukūrė bendrovė „Applied Maths NV“. Programa išleista 1996 m. ir vis dar yra visų tipų biologinių duomenų valdymo, saugojimo ir (statistinės) analizės platforma. „BioNumerics“ naudojami keliuose tinkluose visame pasaulyje, kad būtų galima keisti informacija apie bakterijų kamienus ir juos identifikuoti. PulseNet yra ligų kontrolės ir prevencijos centro valdomas tinklas, jungiantis visuomenės sveikatos ir maisto laboratorijas visoje JAV ar Europoje. Tokiu būdu laboratorijos, priklausančios šiam tinklui gali dalintis pulsuojančio lauko gelio elektroforezės (PFGE) rezultatais, kad atskirtų bakterijų, tokių kaip *E.coli* (O157:H7), *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus* ir *Yersinia pestis*, kamienus. Pasidalinus rezultatais, lengviau nustatyti didelio masto protrūkius. Pavyzdžiui, jei *E.coli* protrūkis įvyko dviejose nutolusiose šalies dalyse, PulseNet gali padėti

įrodyti ir patvirtinti bakterijų tarpusavio tapatumo ryšį. Tokiu atveju, patogenas turėtų tą patį genetinį profilį, skirtingose šalies vietose (Hunter et al., 2005).

„BioNumerics” programinė įranga PFGE profilius įvertina pagal fragmentų skaičių ir dydį. Dažniausiai naudojamas Dice koeficientas, PFGE profilių panašumą skaičiuoja kaip funkciją, kuri priklauso nuo abiejuose profiliuose esančių panašių fragmentų skaičiaus. Svarbu paminėti, kad sukonstruotų dendrogramų analizė nėra pilnai automatizuota, dėl to tyrėjas atlieka reikšmingą funkciją analizėje. Teisingai profilių analizei ir palyginimui tarp skirtingų laboratorijų, būtinas vienodos molekulinės masės žymens naudojimas. Šiuo atveju priimtina naudoti gelio šoniniuose takeliuose ir viduryje *Salmonella enterica* Braenderup H9812. Kuo tankiau leidžiamas molekulinis žymuo gelyje, tuo tikslesnė gelio normalizacija (Goering, 2010). Naudojamas UPGMA hierarchinis klasteriavimo metodas. Tai metodas, naudojamas medžių konstravimui, kurio metu klasteriai formuojami laipsniškai. Kiekviename grupavimo žingsnyje, artimiausios dvi grupės yra sujungiamos į aukštesnio lygio grupes (Hunter et al., 2005).

2. TIRIAMOSIOS MEDŽIAGOS IR METODAI

Tyrimas atliktas 2019–2020 m. Nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute, molekulinės biologijos ir genetiškai modifikuotų organizmų tyrimų skyriuje. Maisto ėminiai tyrimui iš įvairių užsakovų buvo pristatomi į maisto produktų mikrobiologinių tyrimų skyrių, kuriame bendradarbiaujant su skyriaus darbuotojais, buvo atliktas *Listeria monocytogenes* bei *Listeria spp.* aptikimas pagal ISO 11290-1:2017 standartą. Tyrimo dalyje nėra aprašyto mėginių ėmimo. Jei nėra specialaus tarptautinio standarto, skirto tiriamojo produkto mėginių ėmimui, rekomenduojama, kad suinteresuotos šalys tarpusavyje susitartų. Svarbu, kad laboratorija gautų reprezentatyvų mėginį, kuris būtų nesugadintas ar nepakitęs gabenant ir laikant.

Kokybės užtikrinimui, dirbant su bakterijų kultūromis svarbu laikytis specialių saugumo priemonių: bakterijų suspencijas ruošti laminariniame bokse, dėvėti vienkartinės pirštines. Panaudotas priemones nukenksminti ir sudėti į tolimesniam apdorojimui skirtus indus. Atlikus numatytus darbus, naudojant paviršius dezinfekuojančias medžiagas (70 % etanolį, rūgštines priemones) išvalyti darbinis paviršius.

2.1. Bendrasis *Listeria monocytogenes* bei *Listeria spp.* aptikimas (ISO 11290-1:2017)

Įranga ir naudojamos priemonės

1. Drėgnojo sterilizavimo įrenginys (autoklavas).
2. Termostatas, kuriame galima palaikyti nuo 25 °C iki 50 °C temperatūrą.
3. Vandens vonia, kurioje galima palaikyti nuo 47 °C iki 50 °C temperatūrą.
4. Sterilios kilpelės, maždaug 3 mm skersmens arba 10 µl tūrio.
5. pH metras
6. Mechaninės pipetės su filtru, 1 ml ir 10 ml talpos.
7. Petri lėkštelės, 90 mm skersmens.
8. Laminarinis boksas
9. Spiritinė lempelė
10. Svarstyklės, kurių tikslumas 0,0001 g.
11. Sterilūs buteliai (0,5–1 l).
12. Mikroskopas su objektiniais ir dengiamaisiais stikleliais.

13. Šaldytuvas, kuriame galima palaikyti $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrą.

Tiriamoji mėginio dalis ir pradinė suspensija

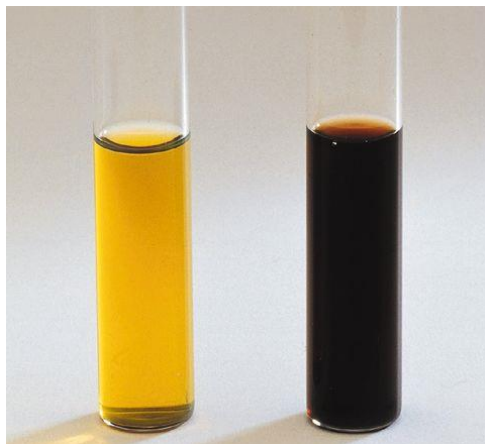
Paprastai, ruošiant pradinę suspensiją, 25 g arba 25 ml tiriamoji mėginio dalis įpilama į 225 g arba 225 ml atrankiosios pirminio gausinimo terpės su puse koncentracijos akriflavino ir nalidikso rūgšties (pusės stiprumo Fraserio sultinys) (1 priedas, 1 lentelė), kad būtų gautas dešimtkartinis skiedinys ir homogenizuojama 30–60 s.

Pirminis gausinimas

Pagal 2.2 paruošta pirminio gausinimo terpė (pusės stiprumo Fraserio sultinys) 25 val. ± 1 val. inkubuojama $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Inkubavimo metu galimas pajuodavimas.

Antrinis gausinimas

Po pirminio gausinimo, 0,1 ml gautos kultūros (neatsižvelgiant į spalvą) sėjama į mėgintuvėlį su 10 ml antrinio gausinimo terpės (viso stiprumo Fraserio sultinį) (1 priedas, 2 lentelė). Užsėta terpė 24 val. ± 2 val. inkubuojama $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Fraser sultinyje yra selektyviųjų medžiagų – nalidikso rūgšties, eskulino, leidžiančio nustatyti *Listeria* β -d-gliukozidazės aktyvumą, dėl kurio terpė patamsėja (8 pav.). Pusės stiprumo ir viso stiprumo Fraser terpėse esantis mielių bei mėsos ekstraktas suteikia maistinių medžiagų, reikalingų *Listeria* augimui.



8 pav. Viso stiprumo Fraserio sultinys. Kairėje kontrolinė terpė, dešinėje – *L. monocytogenes* (pagal Bioser, 2020, žiūrėta 2020-03-02).

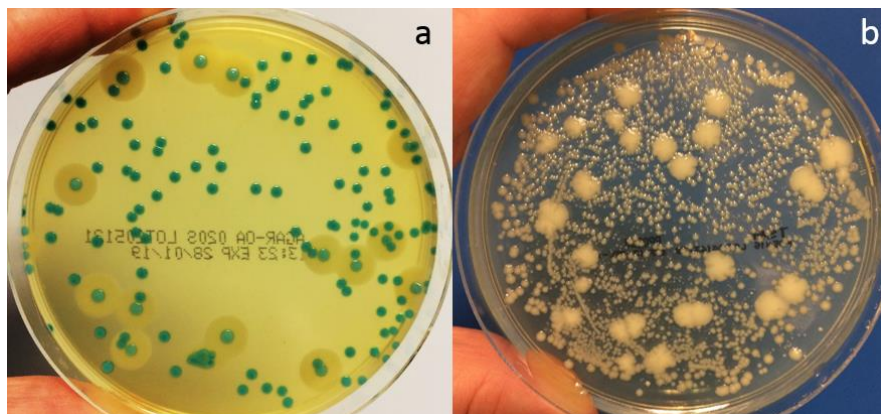
Sėjimas ir identifikavimas

Iš pirminio gausinimo kultūros, kilpele sėjama ant pirmosios atrankiosios ALOA sėjimo terpės, kad būtų gautos atskiros kolonijos (1 priedas, 3 lentelė). Tokiu pat būdu sėjama ant antrosios atrankiosios Oxford sėjimo terpės (1 priedas, 4 lentelė). Su antrinio gausinimo terpe, kartojama aprašyta procedūra su dviem atrankiomis sėjimo terpėmis. Iš pirminio ir antrinio gausinimo gautos Petri lėkštelės apverčiamos ir sudedamos į $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros termostatą, 48

val. \pm 2 val. Jei po 24 val. \pm 2 val. inkubavimo yra numanomų *L. monocytogenes* arba *Listeria* spp. kolonijų, inkubavimą šiame etape galima stabdyti.

***Listeria monocytogenes* ant atrankiosios ALOA sėjimo terpės**

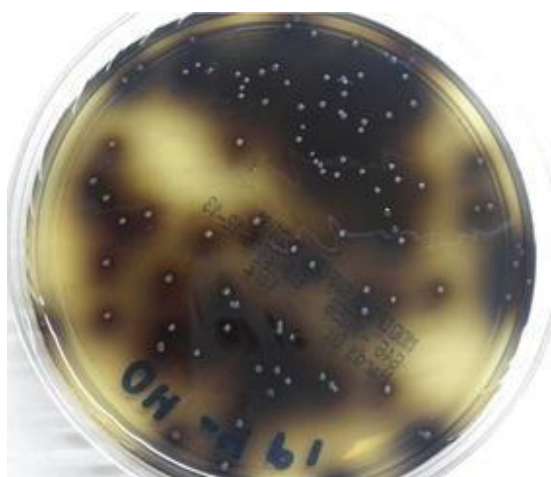
Numanomomis *L. monocytogenes* kolonijomis laikomos mėlynai žalios kolonijos su neskaidriomis zonomis (būdingos kolonijos).



9 pav. Ant abiejų lėkštelių buvo užsėta po 100 μ l *L. monocytogenes*, *L. innocua* ir įvairios mikrofloros (*Streptococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* ir *Staphylococcus*) (a) *L. monocytogenes* būdingos mėlynai žalios kolonijos su neskaidriomis zonomis ant ALOA agaro. (b) bakterijos ant bendros paskirties mitybinės TSA terpės (pagal Solusscientific, 2020, žiūrėta 2020-03-11).

***Listeria monocytogenes* ant atrankiosios Oxford sėjimo terpės**

Praėjus 24–48 val., lėkštelės apžiūrimos, ar nėra numanomomis laikomų *Listeria* spp. arba *L. monocytogenes* kolonijų. Būdingomis laikomos 2 mm skersmens, juodos, įdubusiais centrais kolonijos su zonomis.



10 pav. *L. monocytogenes* būdingos juodos kolonijos su zonomis (Shen and Zhang, 2017).

Kolonijų atrinkimas patvirtinimui

Numanomoms *L. monocytogenes* patvirtinti imama mažiausiai viena kolonija nuo ALOA ir Oxford terpių. Pakanka vieno patvirtinto izoliato mėginiui. Jei pirmoji kolonija yra neigiama, iš atrankiosios terpės imamos kitos numanomos *L. monocytogenes* kolonijos. *Listeria* spp. patvirtinimui naudojamas TSMEA agaras (1 priedas, 5 lentelė). Pasirinktos kolonijos sėjamos brūkšniais ant TSMEA agaro lėkštelių paviršiaus atskiroms kolonijoms augti. Lėkštelės sudedamos į 37 °C nustatytos temperatūros termostatą nuo 18 val. iki 24 val. *Listeria* spp. būdingos kolonijos būna nuo 1 mm iki 2 mm skersmens, išgaubtos, bespalvės ir neskaidrios su vientisiais kraštais. Apšvietus dirbtina ar natūralia šviesa, kolonijos matomos melsvai pilkos spalvos ir grūdėtu paviršiumi.

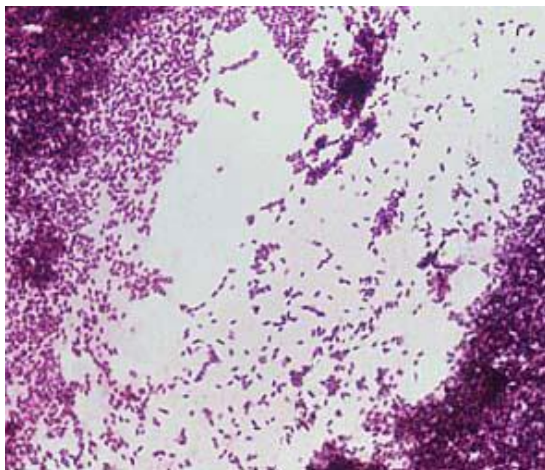


11 pav. *L. monocytogenes* ant TSMEA agaro. Būdingos bespalvės, išgaubtos ir neskaidrios kolonijos (Biswas et al.)

***L. monocytogenes* patvirtinimas**

L. monocytogenes patvirtinimui naudojami privalomieji testai: katalazės testas, dažymas Gramo metodu ir mikroskopavimas, β -hemolizės nustatymas, angliavandenių skaidymas (L-ramnozės, D-ksilozės), CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) testas. Katalazės reakcijai imama atskira kolonija ir suspenduojama 3 % vandenilio peroksido tirpalo laše ant objektyvio stiklelio. Iš karto susidarę dujų burbuliukai rodo teigiamą reakciją. Tai fermentas, skaidantis vandenilio peroksidą į vandenį ir deguonį.

Iš gerai atskirtos kolonijos gaunamas mikroskopinis preparatas. Bakterijos dažomos Gramo metodu: pradžioje mėginėlis nudažomas kristaliniu violetu, vėliau plaunamas vandeniu ir pridedama Gramo jodo reagento, kuris sutvirtina dažus bakterijų ląstelių sienelėse. Vėliau vėl plaunama vandeniu ir blukinama organiniu tirpikliu etanoliu. Po blukinimo preparatas pakartotinai dažomas safraninu. Gramteigiamos listerijos išlaiko pradinę tamsiai violetinę spalvą. Mikroskopuojant matomos chaotiškai judančios, plonos, trumpos lazdelės.

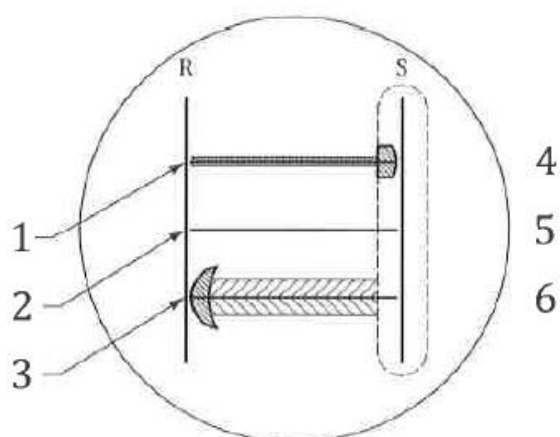


12 pav. *L. monocytogenes* mikroskopinis vaizdas, nudažius Gramo metodu (<http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>, žiūrėta 2020-03-25).

Jei morfologinės ir fiziologinės charakteristikos būdingos *Listeria* spp., sėjama į lėkšteles su kraujo agaru, hemolizei nustatyti (1 priedas, 6 lentelė). Agaro paviršius gerai išdžiovinamas. Paimama atskira kultūra ir duriama į agaro sektorių. Į tą pačią lėkštelę, duriamos teigiama (*L. monocytogenes*) ir neigiama (*L. innocua*) kontrolinės kultūros. Inkubuojama 24 val. ± 2 val. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos *L. monocytogenes* hemolizės zonos yra siauros, aiškios ir šviesios, *L. innocua* dūrio vietoje nėra aiškios zonos, *L. seeligeri* hemolizės zona paprastai yra silpnai matoma, o *L. ivanovii* paprastai yra plati ir su ryškiais kontūrais hemolizė. Lėkštelės apžiūrimos ryškioje šviesoje, kad būtų galima tiriamąsias kultūras palyginti su kontrolinėmis.

L-ramnozės, D-ksilozės skaidymui nustatyti į kiekvieną angliavandenių skaidymo sultinį (1 priedas, 7 lentelė) kilpele sėjamos kultūros, išaugusios neatrankiame TSMEA agare. Inkubuojama 37 °C temperatūroje. Teigiamą reakciją (rūgšties susidarymą) rodo geltona spalva, kuri paprastai atsiranda praėjus 24–48 val. *L. monocytogenes* patvirtinimui naudojama L-ramnozė ir D-ksilozė, nes jos rodo teigiamą L-ramnozės ir neigiamą D-ksilozės reakciją.

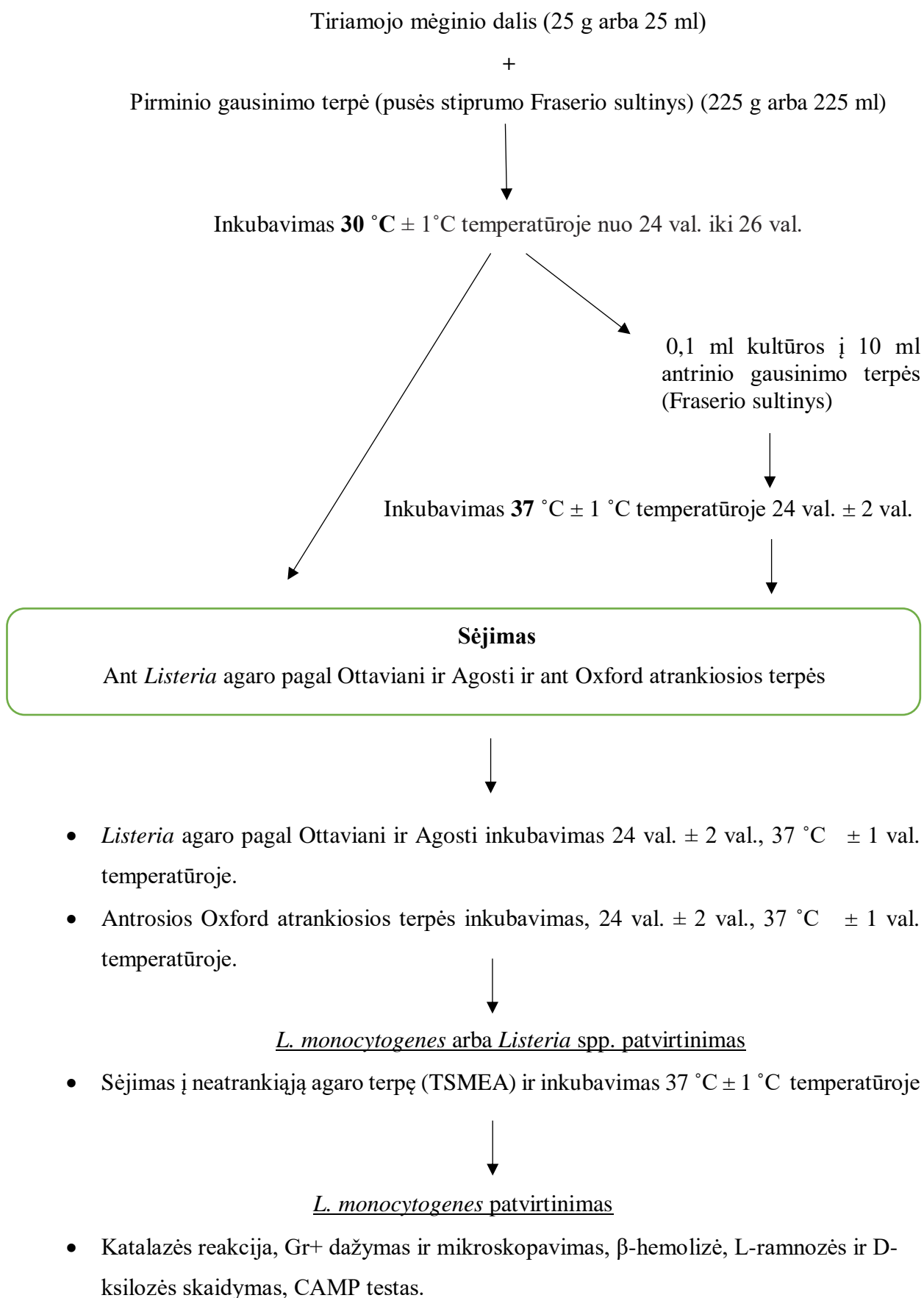
CAMP testas (1 priedas, 8 lentelė) atliekamas, siekiant aiškiai įrodyti, kad hemolizė vyksta dėl listeriolizino aktyvumo. Sėjimai atliekami ant kraujo agaro. Testui reikalinga β-hemolizę rodanti *Staphylococcus aureus* ir neigiama kontrolė *Rhodococcus equi*. Kiekviena *S. aureus* ir *R. equi* kultūra sėjama brūkšniais atskiromis linijomis skersai kraujo agaro lėkštelės taip, kad dvi kultūros būtų lygiagrečios ir viena priešais kitą. Pasėlis turi būti siauras ir lygus. *L. monocytogenes* panašiu būdu sėjama brūkšniais šioms kultūroms stačiu kampu taip, kad nesiliestų su *S. aureus* ir *R. equi*. Atstumas tarp tiriamų kultūrų ir kontrolių turi būti apie 1–2 mm. Toje pačioje lėkštelėje brūkšniais galima pasėti kelias tiriamąsias bakterijų kolonijas (13 pav.).



13 pav. CAMP testas. 1 – siaura β -hemolizės juosta, 2 – hemolizė nevyksta, 3 – plati β -hemolizės juosta, 4 – *L. monocytogenes*, 5 – *L. innocua*, 6 – *L. ivanovii*. R – *Rhodococcus equi*, S – *Staphylococcus aureus*. Brūkšniuotos zonos rodo padidėjusios hemolizės vietas (pagal ISO 11290-1:2017)

Lėkštelės inkubuojamos 12–18 val. 37 °C temperatūroje. Teigiama *L. monocytogenes* reakcija su *S. aureus* atrodo kaip maža padidėjusios hemolizės zona, besitęsianti apie 2 mm nuo tiriamosios bakterijų kultūros.

Procedūros schema



Tolimesnis tyrimas atliekamas naudojantis PulseNet standartinėmis darbo procedūromis *L. monocytogenes* (Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes*) ir *Salmonella enterica* Braenderup H9812 (*Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non – O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*).

2.2. *L. monocytogenes* genetinių profilių nustatymas PFGE metodu

Kontrolinės medžiagos

1. *Salmonella enterica* serotipas Braenderup H9812

Kiti reagentai

1. Agarozė SeaKem Gold;
2. 1 M Tris-HCl, pH 8,0 (Invitrogen);
3. TE buferinis tirpalas (10 ml 1 M Tris, pH 8,0; 2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; 1000 ml dist. H₂O);
4. TBE buferinis tirpalas (0,5 ×)
5. SDS 10 % (10 g SDS; 100 ml dist. H₂O)
6. Koncentruotas etidžio bromidas (10 mg/ml)
7. Lizocimas 20 mg/ml
8. BSA (20 mg/ml)
9. Ląstelių suspendavimo buferinis tirpalas (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8,0);
10. Ląstelių lizavimo buferinis tirpalas (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8,0 + 1 % Sarcosyl);
11. Proteinazė K, 20 mg/ml (Thermo Scientific);
12. Restrikcijos rinkinys „FastDigest XbaI“ (Thermo Scientific);
13. Restrikcijos rinkinys „FastDigest AscI“ (Thermo Scientific);
14. Restrikcijos rinkinys „FastDigest ApaI“ (Thermo Scientific);

Įranga

1. Centrifuga (apsisukimų greitis ne mažesnis nei 10,000 rpm);
2. Termostatas (~37–99 °C);
3. Mikrobangų krosnelė;
4. Lizės gelių formelės;
5. PFGE gelio forma;
6. Pulsuojančio lauko gelio elektroforezės sistema BIORAD CHEF MapperXA;
7. Laminarinis boksas;

8. Svarstyklės (tikslumas ne mažesnis nei $\pm 0,001$ g);
9. Spektrofotometras (Jenway Genova);
10. Vienkartinės kiuvetės;
11. Buteliukai, kolbos, stikliniai matavimo cilindrai;
12. Vienkartinės mikrobiologinės kilpelės 1 μ l; 10 μ l;
13. Gelių analizavimo sistema (AutoChemi System);
14. Purtyklė (VELP Scientifica);
15. Pipetės (0,5–10 μ l; 2–20 μ l, 5–50 μ l, 10–100 μ l, 20–200 μ l; 100–1000 μ l; 500–5000 μ l);
16. Antgaliai su filtrais (įvairių tūrių);
17. Mėgintuvėliai (1,5–2 ml; 50 ml);
18. Šaldytuvas ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$);
19. Šaldiklis ($-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Darbo eiga

Bakterijų kultūros pasėjamos ant triptono, sojos ir mielių ekstrakto agarų (TSMEA), inkubuojamos $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje nuo 18 val. iki 24 val. Po auginimo nuo lėkštelių kilpele paaimama bakterijų kolonijų ir suspenduojama 2 ml TE buferiniame tirpale iki optinio tankio, $A_{610} = 1,000$ (0,800 – 1,000) *Listeria monocytogenes*.

Toliau paruošiamas 1 % agarozės tirpalas su 0,5 % SDS (0,25 g agarozės, 25 ml TE buferinio tirpalo ir 1,25 ml 10 % SDS), naudojant SeaKem Gold agarozę ir TE buferinį tirpalą, išlydomas mikrobangų krosnelėje ir paliekamas saugoti $55\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Į 1,5–2 ml talpos švarius mėgintuvėlius perkelti 400 μ l ląstelių suspencijos ir lengvai sumaišyti. Į kiekvieną iš mėgintuvėlių įpilti po 20 μ l lizocimo (20 mg/ml) ir švelniai sumaišyti. Mėgintuvėliai inkubuojami $55\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, apie 10–20 min. Praėjus laikui, į kiekvieną mėgintuvėlį įdedama po 20 μ l Proteinazės K (20 mg/ml) ir atsargiai pipetuojama ir įdedama 400 μ l paruošto ir išlydyto agarozės tirpalo. Pasiruošiamos vienkartinės geliukų formelės, užklijuojamas jų dugnas, kad mėginys neištekėtų. Mišinys nedelsiant įpilamas į švrias lizės gelių formules. Kiekvienam mėginiui tirti užpildoma po 2 daugartinio naudojimo arba 3–4 vienkartinio naudojimo lizės gelių formelių šulinėlius. Mišinio pilama tiek, kad susidarytų išgaubimas šulinėlio viršuje, nes stingdamas gelis šiek tiek susitraukia. Užpildytos formelės paliekamos stingti 10–15 min. kambario temperatūroje arba 5 min. šaldytuve ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Kol gelis stingsta formelėse, pasiruošiamas lizės mišinys iš 5 ml ląstelių lizės buferinio tirpalo ir 25 μ l Proteinazės K (20 mg/ml). Paruoštas lizės mišinys supilstomas į sunumeruotus 50 ml talpos mėgintuvėlius. Į kiekvieną 50 ml talpos mėgintuvėlį perkeliama 3–4 sustingę

geliukai (ne gali būti daugiau nei 4). Prieš tai juos gražiai apipjaustant iki taisyklingos formos. Jei buvo naudojamos vienkartinės formelės, nuo jų dugno nuimama juostelė ir geliukai išstumiami į mėgintuvėlį su lizės buferiniu tirpalu. Mėgintuvėliai su geliukais dedami lizuotis į 54–55 °C temperatūrą juos švelniai maišant, 1,5–2 val.

Atliekamas plovimas su iš anksto 54–55 °C temperatūroje pašildytu steriliu dejonizuotu vandeniu ir TE buferiniu tirpalu. Naudojant perforuotą kamštelį, iš 50 ml mėgintuvėlių pašalinamas ląstelių lizės buferis ir įpilama 10–15 ml pašildyto sterilaus dejonizuoto vandens. Inkubuojama 15 min. 54–55 °C temperatūroje švelniai maišant. Šis žingsnis kartojamas dar kartą. Vėliau, iš mėgintuvėlių atsargiai pašalinus vandenį, įpilama pašildyto TE buferinio tirpalo ir inkubuojama 15 min. 54–55 °C temperatūroje švelniai maišant. Šis žingsnis kartojamas 4–5 kartus. Iš mėgintuvėlių pašalinus TE buferį, geliukai atsargiai perkeliama į 2 ml talpos mėgintuvėlius. Įpilama TE buferinio tirpalo tiek, kad apsemtų geliukus ir padedama į šaldytuvą (+4 °C). Taip paruošti geliukai gali būti saugomi iki 2 metų. Ties šiuo žingsniu tyrimas gali būti perkeliama į kitą dieną arba toliau tęsiama restrikcija.

Su steriliu skalpeliu atpjaunamas 2–2,5 mm pločio gelio gabaliukas ir dedamas į 2 ml mėgintuvėlį. Pasiruošiamas pre-restrikcijos mišinys iš 180 µl dejonizuoto vandens ir 20 µl 10× restrikcijos buferinio tirpalo vienam mėginiui, sumaišoma ir gautas tūris užpilamas ant atpjauto lydinuko. Svarbu, kad geliukas būtų apsemtas. Palaikoma 5–10 min. 37 °C temperatūroje. Tuo metu pasiruošiamas restrikcijos buferinis tirpalas su atitinkamomis restriktazėmis. Tiriamoji *L. monocytogenes* karpoma dvejomis restriktazėmis, retai kerpančia AscI ir tankiai kerpančia ApaI. Jų kiekiai, reikalingi vienam geliukui, nurodyti lentelėse. Kontrolinei *Salmonella enterica* Braenderup H9812 naudojama viena restriktazė XbaI. Inkubuojama 2 val. 37 °C temperatūroje.

2 lentelė. Restrikcijos mišiniui reikalingi reagentai, karpant *L. monocytogenes* AscI restriktaze

Reagentai	µl/vienam lydinukui
Distiliuotas vanduo	176,5 µl
10x restrikcijos buferinis tirpalas	20 µl
*BSA (20 mg/ml) (rekomenduojama)	1 µl
AscI	2,5 µl
Iš viso	200 µl

3 lentelė. Restrikcijos mišiniui reikalingi reagentai, karpant *L. monocytogenes* ApaI restriktaze

Reagentai	µl/vienam lydinukui
Distiliuotas vanduo	178,5 µl
10x restrikcijos buferinis tirpalas	20 µl
*BSA (20 mg/ml) (rekomenduojama)	1 µl
Apal	0,5 µl
Iš viso	200 µl

4 lentelė. Restrikcijos mišiniui reikalingi reagentai, karpant *Salmonella* Braenderup H9812 XbaI restriktaze

Reagentai	µl/vienam lydinukui
Dejonizuotas vanduo	174 µl
10x restrikcijos buferinis tirpalas	20 µl
*BSA (20 mg/ml) (rekomenduojama)	1 µl
XbaI	5 µl
Iš viso	200 µl

*PulseNet rekomenduoja į visus restrikcijos fermentų mišinius įdėti BSA (angl. Bovine Serum Albumin), kad sumažintų tikimybę ne pilnam DNR susikarpymui.

Surenkama gelio forma. Paruošiamas 1 % SeaKem Gold agarozės tirpalas (7,5 ml 0,5x TBE, 1,5 g agarozės ir 150 ml distiliuoto vandens), išlydomas mikrobangų krosnelėje ir padedamas šilti 55–56 °C temperatūroje inkubatoriuje.

Nuo lydinukų nusiurbiamas restrikcijos mišinys ir užpilama 200 µl 0,5x TBE buferinio tirpalo. Inkubuojame 5 min. kambario temperatūroje. Vėliau buferis nusiurbiamas ir geliukai atsargiai, vienas po kito dedami ant paruoštų šukučių. Ant geliukų užlašiname paruošto agarozės gelio, kad jie prisiklijuotų. Jiems sustingus, užpildome gelio formą paruoštu agarozės tirpalu ir paliekame apie 30 min. sustingti. Likusį agarozės gelį dedame atgal į inkubatorių šilti. Sustingus geliui, šukutės išimamos, o šulinėliai užpildomi su kaupu likusiu agarozės tirpalu. Palaukiame apie 10–15 min. kol sustings. PFGE sistemos gelio kamera užpildoma apie 2500 ml paruoštu 0,5 x TBE buferiniu tirpalu. Maždaug prieš 30 min. įjungiamas elektroforezės aparatas, pompa ir šaldymo blokas. Prieš paleidžiant elektroforezę nustatomas 550 mL/min srovės greitis, o šaldymo blokelyje nustatoma 14 °C temperatūra. Atvėsus buferiui į PFGE kamerą dedamas gelis ir pasirenkama *Auto algorithm* programa, tolimesnės funkcijos:

Pradinis pasisukimo laikas = 4,0 s

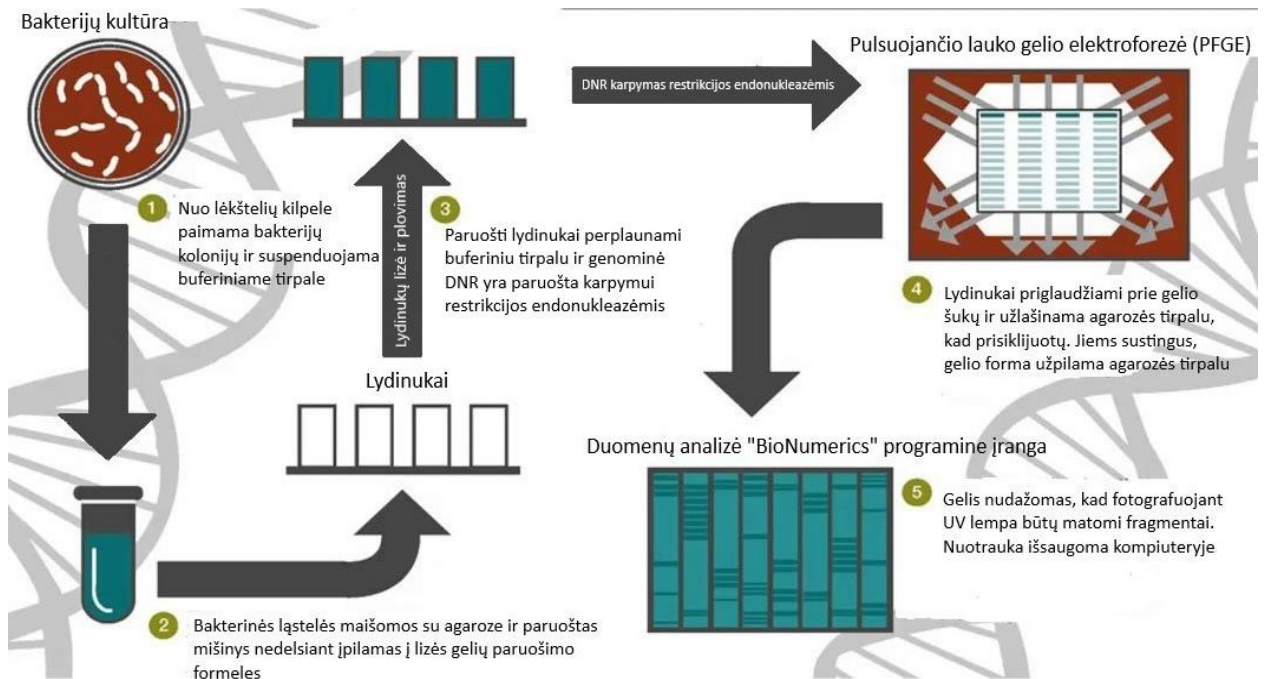
Galutinis pasisukimo laikas = 40,0 s

Įtampos gradientas – 6 V/cm

Reorientacijos kampas – 120 °

Proceso trukmė: AscI 15 val. 40 min., ApaI 14 val. 50 min.

Pasibaigus tyrimui, gelį dedame į nepermatomą indą dažymui. Dažomas 400 ml vandeninio Etidžio bromido tirpale (40 µl EtBr (10 mg/ml) praskiedžiama 400 ml dejonizuoto vandens) 20–30 min., švelniai purtant. Po dažymo gelis 4 kartus po 20 min. plaunamas distiliuotu vandeniu, švelniai purtant. Po plovimo, gelis fotografuojamas UV šviesos kameroje. Gauta nuotrauka išsaugoma TIFF formatu ir apdorojama naudojant „Bionumerics“ programą.



14 pav. Pulsuojančio lauko gelio elektroforezės metodika (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html>, žiūrėta 2020-03-12)

Kontrolinis *Salmonella enterica* Braenderup H9812 kamienas paruoštas naudojantis PulseNet *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotipų, *Shigella sonnei* ir *Shigella flexneri* standartine darbo procedūra. Nuo *L. monocytogenes* SDP skiriasi tuom, kad pradiniame žingsnyje bakterijų kultūra suspenduojama Ląstelių lizės buferyje (*L. monocytogenes* TE buferyje), prie 610 nm bangos ilgio nurodoma bakterijų koncentracija yra 0,8–1,0. Gramneigiamoms bakterijoms nereikia naudoti ląstelių sienelę ardančio fermento lizocimo ir DNR karpymui naudojama XbaI restrikcijos endonukleazė (4 lentelė).

3. TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. *Listeria monocytogenes* aptikimas pagal ISO 11290-1:2017 standartą

Tyrimų rezultatai išskaidyti į kelias dalis, kurios buvo aptartos antroje dalyje. Atlikus *Listeria monocytogenes* bei *Listeria spp.* aptikimą pagal ISO 11290-1:2017 standartą ir visus būtinus *L. monocytogenes* patvirtinamuosius testus, gauti tokie rezultatai (6 lentelė):

1. Katalazės testui – teigiama. Paėmus atskirą koloniją ir suspendavus vandenilio peroksido tirpalo laše, iš karto susidarė dujų burbuliukai.
2. Gr+ lazdelės. Bakterijas dažant Gramo būdu, jos nusidažė violetine spalva ir mikroskopuojant buvo matomas chaotiškas lazdelių judėjimas.
3. β-hemolizinės bakterijos. Augdamos ant kraujo agarų, bakterijos išskiria β-hemoliziną, o šis fermentas visiškai suskaido raudonuosius kraujo kūnelius, dėl to matomos siauros, aiškios, šviesios zonos.
4. Angliavandenių skaidymas. *L. monocytogenes* kilpele sėjamos į anglivandenių skaidymo sultinį (1 priedas, 7 lentelė) ir inkubuojama parą. Teigiamą reakciją (rūgšties susidarymą) rodo geltona spalva.
5. CAMP testas. Teigiamą *L. monocytogenes* reakciją su *S. aureus* rodo maža padidėjusios hemolizės zona, besitęsianti apie 2 mm nuo tiriamosios bakterijų kultūros.

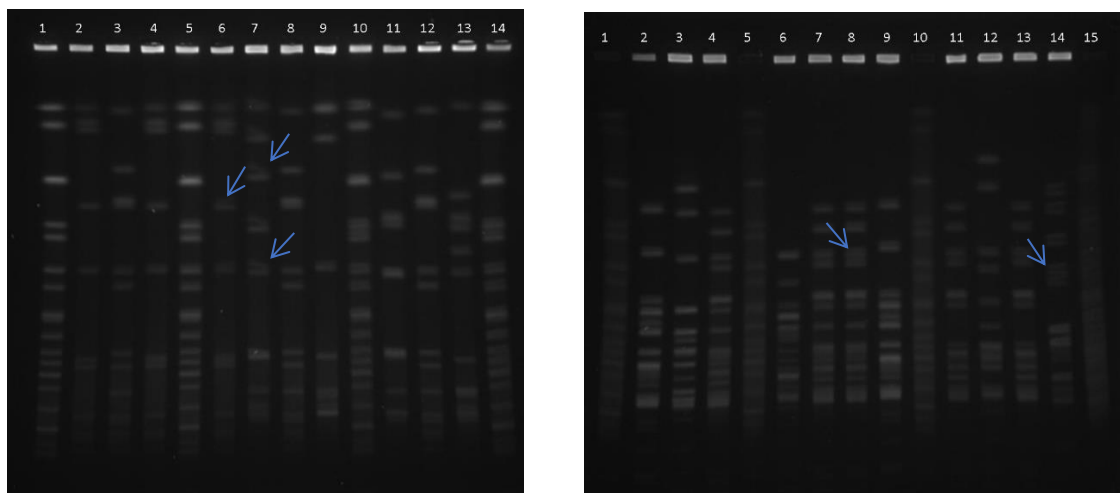
6 lentelė. *L. monocytogenes* biocheminių testų rezultatai.

Mėginio registracijos kodas	Katalazė	Gr+ lazdelės	B-hemolizė	L-ramnozė	D-ksilozė	CAMP	
						<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
Tyrimo įvertinimo data	06.25	06.25	06.26	06.27	06.27	06.26	06.26
1–44	+	+	+	+	-	+	-

Kadangi visų gautų 44 kultūrų biocheminiai testų rezultatai sutapo, lentelėje jie nurodyti 1–44 mėginio registracijos kodu. Iš maisto produktų mikrobiologijos skyriaus gavus patvirtinimą, kad gautos kultūros yra *L. monocytogenes*, buvo atlikta tolimesnė profilių analizė PFGE metodu. Dirbant su skirtingomis bakterijomis ir siekiant nustatyti jų kamienus PFGE metodu, būtina prieš tai optimizuoti sąlygas, nes ne visada griežtai laikantis PulseNet procedūrų gaunamas norimas rezultatas. Metodui atlikti reikalinga aukšta personalo kvalifikacija ir geri įgūdžiai, pasižymi didelėmis darbo sąnaudomis, rezultatų interpretavimas nėra automatizuotas ir viską atlieka specialistas. Taip pat skirtingų bakterijų DNR dažniausiai karpomi skirtingais fermentais.

3.2. PFGE sąlygų optimizavimas

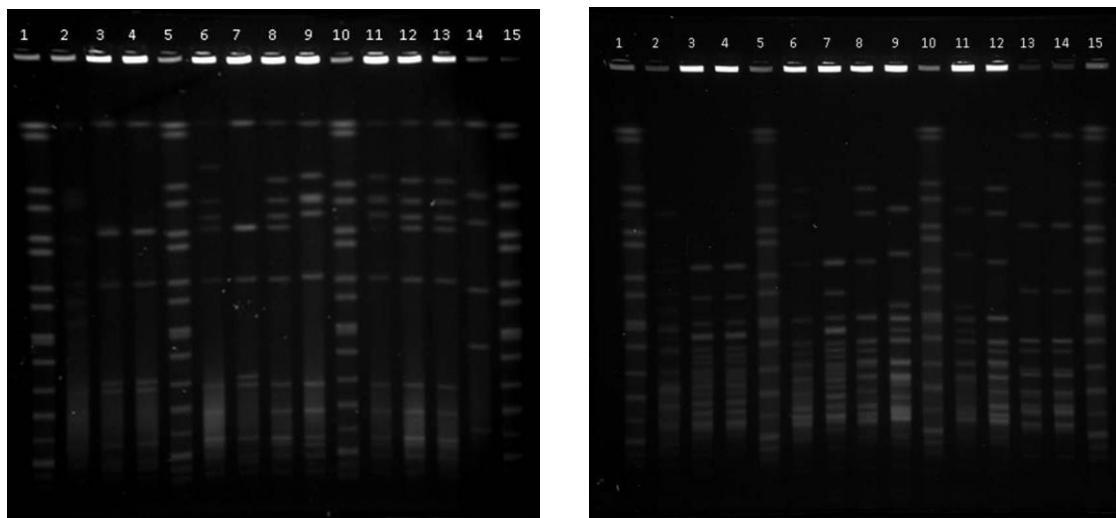
Sąlygų optimizavimui buvo naudojami *S.Braenderup* H9812 ir *L. monocytogenes* bakterijų kamienai, paruošiant jas laikantis PulseNet *Listeria monocytogenes* ir *Salmonella enterica* Braenderup H9812 standartinių darbo procedūrų. Paruoštos bakterijų kultūrų suspencijos, kurių koncentracija prie 610 nm bangos ilgio 0,8–1. *L. monocytogenes* DNR karpymui naudota retai kerpanti AscI ir tankiai kerpanti ApaI, o *S. enterica* Braenderup H9812 – XbaI restrikcijos endonukleazės. Karpymas endonukleazėmis truko 2 val. 37 °C temperatūroje. Pulsuojančio lauko elektroforezė buvo vykdoma pasirenkant Auto algorithm programą, nustatant tokius parametrus: įtampos gradientas 6 V/cm, buferio tėkmės greitis 650 mL/min., šaldymo bloke nustatyta 14 °C temperatūra, tyrimo trukmė karpant AscI restriktaze – 15 val. 30 min., o karpant ApaI – 14 val. 10 min., 1 % SeaKem agarozės gelis, pradinio ir galutinio pasisukimo laikas 4,0–40,0 s., reorientavimo kampas 120 °. Gauti rezultatai pavaizduoti 16 pav. Iš jų matoma, kad pasirinktos sąlygos nebuvo tinkamos, nes dėl per didelio buferio tėkmės greičio PFGE sistemoje, DNR fragmentų takeliai gavosi šiek tiek išlinkę. O dėl ne tiesiai stovinčios PFGE kameros ir joje netolygiai pasiskirsčiusio buferinio tirpalo, kairėje esančios nuotraukos 6, 7 gelio tankeliuose bei dešinėje esančios nuotraukos 8 ir 14 tankeliuose fragmentai susidubliavo.



16 pav. *L. monocytogenes* PFGE. Sistemoje parinkti parametrai: įtampa 6 V/cm, buferio tėkmės greitis 650 mL/min., temperatūra 14 °C. Kairėje – DNR karpyta su AscI, tyrimo trukmė 15 val. 30 min. Dešinėje – DNR karpyta su ApaI, tyrimo trukmė 14 val. 10 min.

Stengiantis gauti gražesnę DNR fragmentų vaizdą, pirmiausiai buvo sureguliuota PFGE kamera taip, kad ji stovėtų tiesiai ir buferinis tirpalas pasiskirstytų tolygiai. Taip pat buvo sumažintas buferio tėkmės greitis iki 550 mL/min., siekiant sumažinti fragmentų takelių

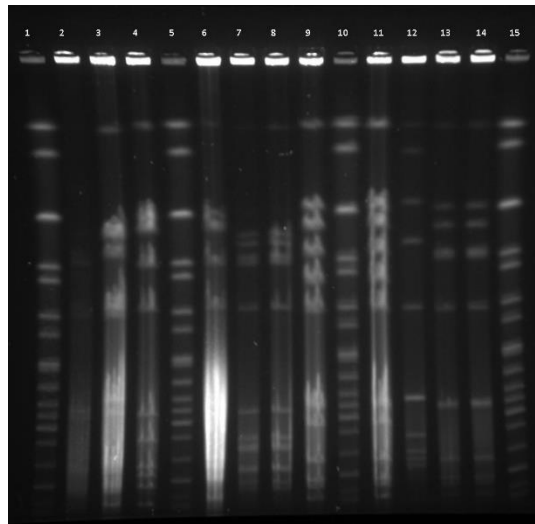
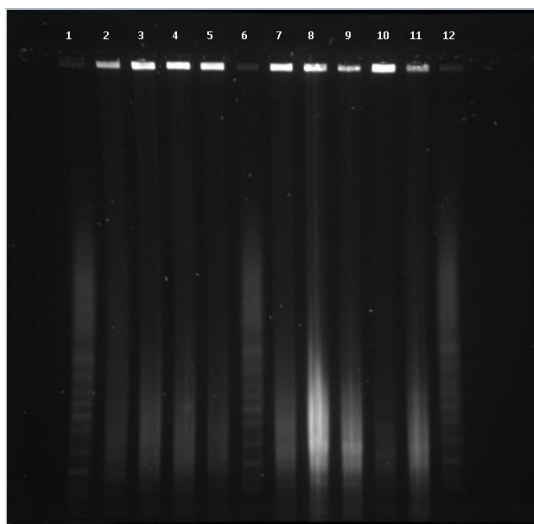
išlinkimą ir pasiekti geresnį fragmentų atskyrimą. Gauti rezultatai matomi 17 pav. – minimalus gelio išlinkimas, geras DNR fragmentų atsiskyrimas, profiliai tinkami tolimesnei analizei.



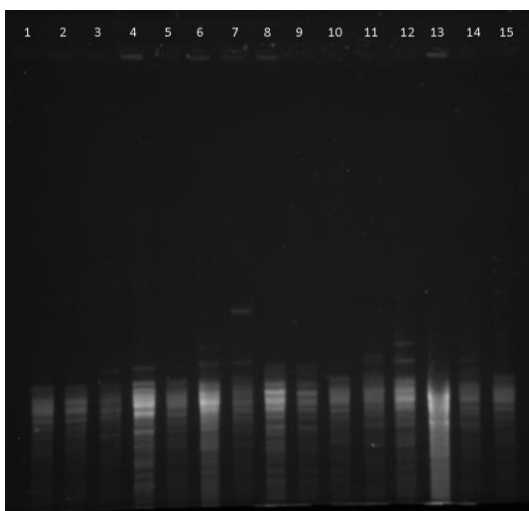
17 pav. *L. monocytogenes* PFGE. Sistemoje parinkti parametrai: įtampa 6 V/cm, buferio tėkmės greitis 550 mL/min., temperatūra 14 °C. Kairėje – DNR karpyta su AscI, tyrimo trukmė 15 val. 10 min. Dešinėje – DNR karpyta su ApaI, tyrimo trukmė 14 val. 50 min.

PFGE sistemoje vykdomas DNR atskyrimas yra labai jautrus įvairiems molekuliniais ir aplinkos kintamiesiems veiksniams. Ir dažnai susiduriama su sunkumais dėl patirties trūkumo, laboratorinės įrangos, reagentų ar kitų veiksnių. Pavyzdžiui, lydinukų ruošimo metu susidurta su tokiomis problemomis: DNR degradavimu (18 pav. kairėje), mechaniniu lydinukų pažeidimu (18 pav. dešinėje) arba temperatūros pakilimu šaldymo bloke (+ 42 °C) (19 pav.). Todėl labai svarbu ruošiant DNR, grubiai nepipetuoti bakterijų ilgą laiką arba nesinaudoti purtykle joms sumaišyti. Visa tai gali sukelti bakterijų pažeidimus. Taip pat stengtis kuo tiksliau atlikti visus tyrimo žingsnius ir kuo trumpiau laikyti bakterijų kultūras kambario temperatūroje. Rekomenduojama pasinaudoti šaldymo stoveliais.

Temperatūra – viena iš pagrindinių sąlygų, nuo kurios priklauso DNR judėjimas gelyje. Nors PFGE sistemoje yra šaldymo blokas, kuris palaiko nustatytą 14 °C temperatūrą ir vėsina buferinį tirpalą, tačiau proceso metu ji pakildavo iki 42 °C temperatūros. Tokia aukšta temperatūra sistemoje lėmė greitą DNR judėjimą gelyje, ko pasekoje mažesnieji fragmentai išėjo iš gelio ir sumažėjo skiriamoji geba. Priežastis – elektroforezės sistemoje susidarę oro burbulai neleisdavo palaikyti pastovios, nustatytos temperatūros buferinio tirpalo tėkmės.



18 pav. Kairėje – *L. monocytogenes* PFGE, DNR degradavimas, dešinėje – *L. monocytogenes* PFGE. DNR karpyta AscI, 3, 4, 6, 8, 9, 11 takeliuose – mechaninis lydinukų pažeidimas.



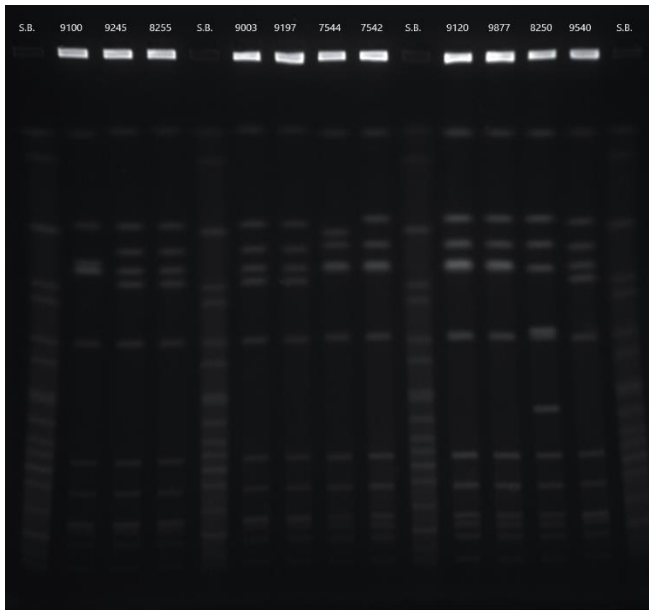
19 pav. *L. monocytogenes* PFGE. DNR karpyta ApaI. PFGE tyrimo metu, buferio tėkmės greitis 450 mL/min., temperatūra 42 °C.

Siekiant išvengti sistemos perkaitimo ir burbulų susidarymo joje, nuspręsta buferio tėkmės greitį padidinti iki 550 mL/min., taip pat patrumpinti žarnų, kuriomis teka buferinis tirpalas, ilgį. Padidinus tėkmės greitį, rezultate gaunamas nežymus gelio išlinkimas, tačiau temperatūra palaikyta viso tyrimo metu 14 °C. O pakeitus žarnų, jungiančių PFGE sistemą, ilgį, išvengta buferio užsilaikymo josoje ir burbulų susidarymo bei sistemos perkaitimo.

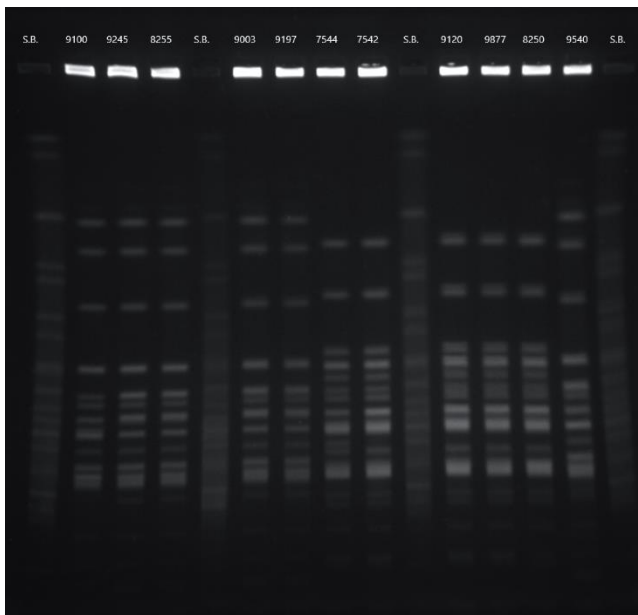
Tinkamai optimizavus metodo sąlygas, gauti 44 kultūrų karpytų dviejomis restriktažėmis (AscI, ApaI) profiliai. Pateiktose nuotraukose (20 pav. ir 21 pav.) matomi 11 kultūrų rezultatai. Likusių kultūrų nuotraukos pateiktos 2 priede.

Naudojant restrikcijos endonukleazes, pirmiausiai viena maža lydinuko dalis karpyta pirminiu restrikcijos fermentu AscI. ApaI yra rekomenduojamas kaip antrinis fermentas *L. monocytogenes* izoliatų analizei. Antrinis fermento naudojimas yra naudingas tais atvejais, kai PFGE modeliai, gauti naudojant pirminį fermentą, taip pat yra neatskiriami arba abejotini.

Laikantis rekomendacijų nuotraukoje matomi 11 tų pačių izoliatų profiliai karpyti skirtingomis restriktazėmis, vienodomis sąlygomis: įtampa 6 V/cm, buferio tėkmės greitis 550 mL/min., temperatūra 14 °C, ApaI trukmė – 14 val. 50 min., AscI – 15 val. 10 min.



20 pav. *L. monocytogenes* DNR karpyta AscI restriktaze. 1, 5, 10, 15 takeliai S.B. – *Salmonella enterica* Braenderup H9812.



21 pav. *L. monocytogenes* DNR karpyta ApaI restriktaze. 1, 5, 10, 15 takeliai – *Salmonella enterica* Braenderup H9812.

Kadangi *L. monocytogenes* pasižymi mažu G+C kiekiu (36–42 %), naudinga pasirinkti restrikcijos fermentus, kurie atpažįsta G ir C nukleotidus DNR sekoje, tokiu būdu rezultate gaunant retą DNR sukarpymą. Skirtingos retai kerpančios restriktazės gali būti naudojamos *L. monocytogenes*: ApaI 5' GGGCC↓C 3', AscI 5' GG↓CGCGCC 3', NotI 5' GC↓GGCCGC 3' ir SmaI 5' CCC↓GGG 3' (SJÖMAN MARIA, 2010). Tačiau tyrime pasirinktos restriktazės

pagal PulseNet rekomendaciją. Tankiai kerpanti ApaI ir retai kerpanti AscI, geriausiai karmo DNR esant 37 ° C temperatūrai.

3.3. *L. monocytogenes* profilių analizė „BioNumerics“ programine įranga

Gauti profiliai toliau buvo analizuojami „BioNumerics“ 7.6 versijos programa. Ši programa leidžia pašalinti elektroforezės nuotraukose atsiradusius nedidelius išlinkimus ir nespecifiškumus, kad būtų galima sudaryti kokybiškesnę dendrogramą. Tai programa, nurodanti ryšius tarp tiriamų kamienų, bet ne filogenetinius ryšius. Atlikus *L. monocytogenes* kamienų pulsuojančio lauko gelio elektroforezę, išanalizavus jų genetinius profilius ir sudarius dendrogramas galima spręsti apie kamienų paplitimą maisto produktuose, jų giminiškumą ir tapatumą.

Šiame tyrime analizuojami mėginiai gauti 2019 m. I pusmetį, iš dviejų skirtingų gamintojų, užsiimančių mėsos supirkimu, skerdenos perdirbimu, mėsos pusgaminių, šviežios ir šaldytos mėsos pardavimu, virtų, vytintų ar rūkytų gaminių prekyba. Taip pat gauti pavieniai mėginiai iš skirtingų gamintojų. Gautus mėsos produktus galima suskirti į kelias grupes: 1) mėsos žaliaviniai produktai; 2) rūkyti mėsos gaminiai; 3) pusgaminiai su mėso įdaru. Skirtingų gamintojų mėginiai su matricomis nurodyti 7, 8 ir 9 lentelėse.

7 lentelė. Pirmojo gamintojo mėginiai su nurodytomis matricomis.

Eil. Nr.	Mėginio kodas	Matrica	Gamintojas
1.	9120	Lietiniai blyneliai su mėsa, užšaldyti	1
2.	9877	Lietiniai blyneliai su mėsa, užšaldyti	
3.	7542	Lietiniai blyneliai su mėsa, užšaldyti	
4.	7544	Lietiniai blyneliai su mėsa, užšaldyti	
5.	8250	Lietiniai blyneliai su mėsa, užšaldyti	
6.	9779	Koldūnai su kiaulienos ir jautienos įdaru, šaldyti	
7.	9887	Koldūnai su kiaulienos ir jautienos įdaru, šaldyti	
8.	8997	Koldūnai su kiaulienos įdaru, šaldyti	
9.	7778	Koldūnai su kiaulienos įdaru, šaldyti	
10.	13722	Česnakinė dešra rinkutė šaltai rūkyta, aukšč.rūšis	
11.	13544	Česnakinė dešra rinkutė šaltai rūkyta, aukšč.rūšis	
12.	8998	Mėsos įdaras Pigutis keptiems mini čeburėkams	
13.	8977	Mėsos įdaras Pigutis keptiems mini čeburėkams	
14.	11045	Mėsos įdaras Pigutis keptiems mini čeburėkams	
15.	9870	Koldūnai su mėsos įdaru, giliai užšaldyti Žalioji linija	
16.	8700	Koldūnai su mėsos įdaru, giliai užšaldyti Žalioji linija	
17.	7920	Koldūnai su mėsos įdaru, šaldyti	
18.	9780	Koldūnai su mėsos įdaru, giliai užšaldyti Žalioji linija	
19.	10050	Koldūnai Užsienietiški su mėsos įdaru, užšaldyti	
20.	7250	Koldūnai su blauzdelių mėsa, šaldyti	
21.	8744	Koldūnai su mėsos įdaru, giliai užšaldyti Žalioji linija	
22.	9855	Koldūnai su mėsos įdaru, giliai užšaldyti Žalioji linija	

8 lentelė. Antrojo gamintojo mėginiai su nurodytomis matricomis.

Eil. Nr.	Mėginio kodas	Matrica	Gamintojas
1.	11547	Mažai rūkytos kiaulienos dešrelės	2
2.	11487	Mažai rūkytos kiaulienos dešrelės	
3.	9954	Rinktinė dešra, šaltai rūkyta, aukšč. rūšis	
4.	9941	Kumpinė šaltai rūkyta dešra, aukšč. rūšis	
5.	9540	Koldūnai Savas su mėsos įdaru, šaldyti	
6.	8780	Mėsos įdaras koldūnams	
7.	9197	Mėsos įdaras lietišiams blyneliams, šaldytas	
8.	8255	Mėsos įdaras lietišiams blyneliams, šaldytas	
9.	9245	Mėsos įdaras lietišiams blyneliams, šaldytas	
10.	9003	Mėsos įdaras lietišiams blyneliams, šaldytas	
11.	9100	Smulkinta kiaulienos mėsa	
12.	7892	Jautienos smulkinta mėsa	
13.	7894	Jautienos smulkinta mėsa	
14.	7886	Jautienos smulkinta mėsa	
15.	7887	Jautienos smulkinta mėsa	
16.	7889	Jautienos smulkinta mėsa	
17.	11072	Šviežios kaimiškos kiaulienos dešrelės	
18.	11754	Šviežios kaimiškos kiaulienos dešrelės	
19.	11080	Šviežios kaimiškos kiaulienos dešrelės	

9 lentelė. Skirtingų gamintojų mėginiai su nurodytomis matricomis.

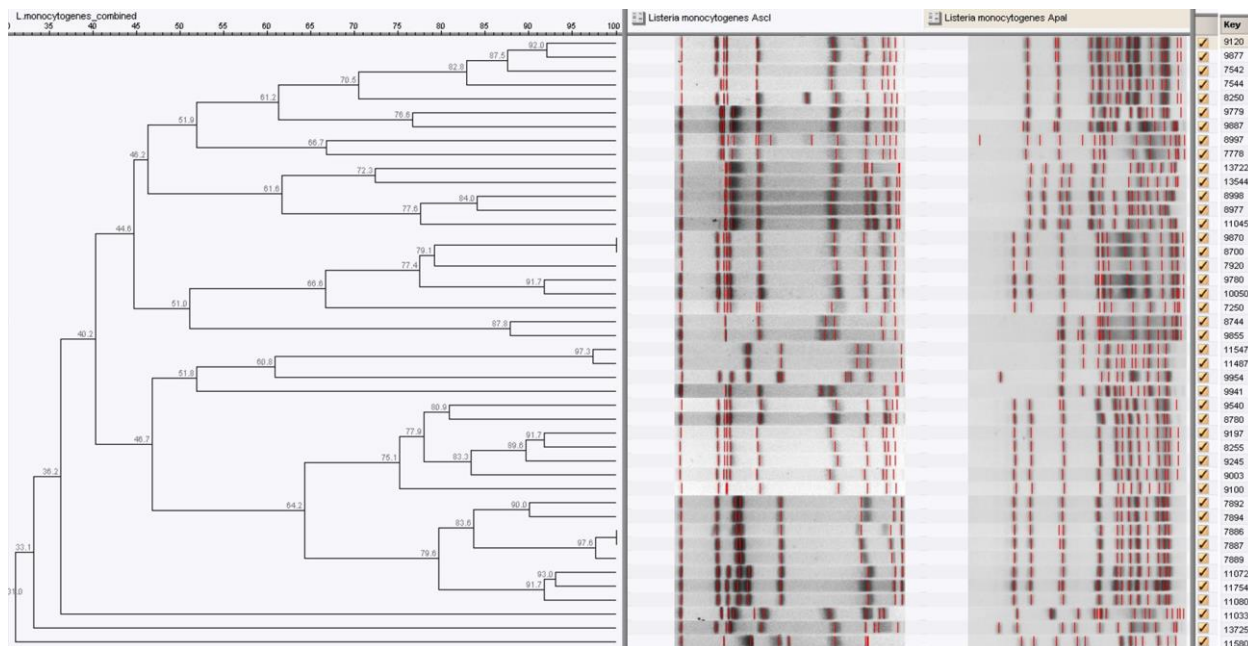
Eil. Nr.	Mėginio kodas	Matrica	Gamintojas
1.	11033	Įvairių daržovių mišinys, šaldytas	3
2.	13725	Aštrus daržovių mišinys, šaldytas	4
3.	11580	Greitai užšaldytos morkytės	5

22 pav. pavaizduoti *L. monocytogenes* 44 kamienų, karpytų AscI ir ApaI restriktazėmis kombinuoti PFGE profiliai ir jų pagrindu sukurta dendrograma. Naudotas kophenetinis (angl. cophenetic) koreliacijos koeficientas, nurodantis kaip tiksliai dendrograma išlaiko atstumą tarp klasterių. Jis dažniausiai svyruoja tarp 0,60 ir 0,95. Vertės didesnės nei 0,80 laikomos pagrįstomis (Neves et al., 2008). Iš 44 tiriamų profilių, 11580 (greitai užšaldytos morkytės), 13725 (šaldytų aštrių daržovių mišinys), 11033 (šaldytas įvairių daržovių mišinys) kamienai buvo unikalūs ir atitinkamai tik 31,0 %, 33,1 % ir 36,2 % panašūs su mėsos supirkimu, perdirbimu ir pardavimu susijusių įmonių gautų maisto produktų kamienais. Tai pavieniai ir iš skirtingų įmonių gauti mėginiai. Iš dendrogramos matoma, kad kamienai nėra paimti iš vieno šaltinio, jie išsiskyrė į dvi dideles šakas, kurių tarpusavio panašumas – 40,2 %. Kamienai yra laikomi neatskiriama, jei jų panašumas yra 100 %, ir giminingais kloniškai, jei jų panašumas yra daugiau kaip 80 % (Andrei and Zervos, 2006). Abi šakos susiskirsto į sudėtingas sistemas. Pirmojoje atšakoje išsidėsto pirmojo gamintojo 22 mėginiai, kurie sudaro vis smulkesnius ir tarpusavyje vis panašesnius klasterius. I gamintojo atšakos išsiskyrė 44,6 % panašumu, medžio

viršutinėje dalyje vyravo įvairesni maisto produktai – pusgaminiai, mėsos žaliava ar rūkyti produktai, apatinėje dalyje – pusgaminiai (koldūnai). 12 kamienų panašumas svyravo nuo 82,8 % iki 100 % – nuo artimai giminingų iki neatskiriamų. Didžiausias tų pačių kamienų atsikartojimas pastebėtas tuose pačiuose mėginiuose, kaip pavyzdžiui, 9120, 9877, 7542 ir 7544 – užšaldyti lietiniai blyneliai su mėsa. Didžiausias tarpusavio panašumas aptiktas tarp 9120 ir 9877 – 92,0 %, jų panašumas su su 7542 – 87,5 %, o su 7544 – 82,8 %. Dėl atsitiktinių genetinių įvykių, atsiranda fragmentų skaičiaus ir dydžio pakitimai, kurie įtakoja didesnę ar mažesnę kamienų tarpusavio panašumą. Jei kamienai nesiskiria daugiau nei 4 fragmentais, galima manyti, kad jie yra susiję epidemiologiniu požiūriu (Goering, 2010). Tos pačios matricos mėginys – 8250, su ankščiau aptartaisiais tapatus tik 70,5 %, kas rodo, kad kamienai skirtingi. Kadangi nežinoma daugiau informacijos apie mėginius, galime daryti prielaidą, kad mėginiai 9120, 9877, 7542, 7544 nuo 8250 skiriasi gaminio partija, kas gali lemti skirtingų kamienų atsiradimą tame pačiame produkte. Šiek tiek kitaip yra su vienai atšakai priskiriamais mėginiais 9870, 8700 ir kitai atšakai priskiriamais mėginiais 8744, 9855 – giliai užšaldytais Žalioji linija koldūnais su mėsos įdaru. Tarpusavio atšakų panašumas 51,0 %. Žalioji linija koldūnuose vyrauja trys skirtingi kamienai: 9870 ir 8700 – tarpusavyje neatskiriami, 8744 ir 9855 tarpusavio panašumas siekia 87,8 %, o trečiasis kamienas 9780 yra 91,7 % giminingas su šaldytais Užsienietiškais koldūnais (mėginio kodas 10050). Manoma, kad pirmieji du skirtingi kamienai galėjo atsirasti dėl skirtingų produktų partijų, o to paties kamieno atsikartojimas skirtinguose gaminiuose galėjo atsirasti dėl įmonėje nesilaikomų higienos normų (nepakankamo stalų ar įrangos dezinfekavimo) ir kryžminio produktų užteršimo. Pirmojo gamintojo šakoje iš viso išsiskyrė 10 atsitiktinių pavienių kamienų, kurie artimo giminingumo su kitais kamienais nesudarė, o artimiausias panašumas svyravo nuo 66,6 % iki 79,1 % ir gali būti vertinami kaip individualūs ligas sukėlę patogenai.

Antroje kamienų atšakoje išsidėsto antrojo gamintojo 19 mėsos produktų. Šakos išsiskyrė į mažesnius klasterius, kurių tarpusavio panašumas – 46,7 %, o matricos pasiskirstė pagal mėginio tipą: pirmoje šakoje – rūkyti mėsos gaminiai, antroje šakoje pasiskirstė mėsos pusgaminiai, mėsos žaliaviniai produktai. 11547 ir 11487 – mažai rūkytos kiaulienos dešrelės, kuriuose rastų *L. monocytogenes* kamienų panašumas tarpusavyje siekė 97,3 %, tačiau jos skyrėsi nuo 9954 (rinktinės dešros) 60,8 % ir nuo 9941 (kumpinės šaltai rūkytos dešros) 51,8 %. Įdomu tai, kad 9540 – koldūnai su mėsa, o 8780 – mėsos įdaras koldūnams. Šių *L. monocytogenes* kamienų tarpusavio panašumas 80,9 %. Kadangi nėra pateikta detali informacija apie gautus mėginius ir jų sudėtis, galime daryti tik prielaidą, kad galimai iš mėsos įdaro buvo pagaminti koldūnai su mėsa ir *L. monocytogenes* užkratas tęsėsi nuo žaliavos apdorojimo iki pusgaminių, kas ir yra būdinga *L. monocytogenes* plitimui “nuo ūkio iki

šakutės“. Antroje medžio atšakoje taip pat išsiskyrė kamienai, kurie yra būdingi tik tam tikriems maisto produktams. Pavyzdžiui, jautienos žaliavoje aptikti *L. monocytogenes* kamienai 7886 ir 7887 yra neatskiriami, su 7889 matomas 97,6 % panašumas, o su 7892 ir 7894 – 83,6 % panašumas. Taip pat kaimiškose kiaulienos dešrelėse vyrauja tapatus kamienas, 11072 ir 11754 kamienai panašus 93,0 %, o su 11080 panašumas 91,7 %. Antroje šakoje išsiskyrė trys bakterijų kamienai: 9954 – rinktinė šaltai rūkyta dešra, 9941 – kumpinė šaltai rūkyta dešra ir 9100 – kiaulienos žaliava, kurie buvo pavieniai ir neturėjo kloniško giminingumo su kitais izoliatais.



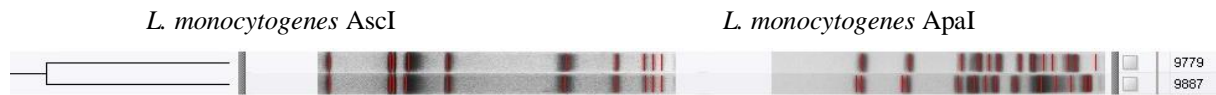
22 pav. *L. monocytogenes* kamienų PFGE profiliai, karpyti Ascl ir ApaI restriktazėmis ir jų pagrindu sukurta kombinuota dendrograma. Profilių tarpusavio panašumui įvertinti pasirinktas Dice koeficientas (profilų panašumo tolerancija ir optimizacija 1 %). Procentinis kamienų panašumas nurodytas prie kiekvienos medžio atšakos.

Dendrogramos analizės metu įsitikinta ir patvirtinta rekomenduojamų dviejų restriktazių Ascl ir ApaI nauda nustatant kamienų tapatumą. Galima išskirti kelis profilius 9780 ir 10050 ir juos palyginti taikant Tenoverio kriterijus, kurie teigia, kad jei fragmentai tarpusavyje nesiskiria – jie laikomi neatskiriamais, jei skiriasi 2 – 3 fragmentais – laikomi artimai giminingais, jei 4 – 6 fragmentais – kamienai gali būti giminingi, o jei skiriasi >7 fragmentais – kamienai skirtingi. Nors Ascl yra laikoma pirminiu restrikcijos fermentu, tačiau pažvelgus į 9780 ir 10050 Ascl restriktazę karpytus profilius matoma, kad pagal Ascl kamienai yra neatskiriami, o pagal ApaI yra 2 fragmentų skirtumas, kas nurodo artimą kamienų giminybę.



23 pav. *L. monocytogenes* 9780 ir 10050 Ascl ir ApaI profilių palyginimas.

Panašiai yra ir su 9779 ir 9887 kamienų profiliais (24 pav.). Pirmasis mėginys yra užšaldyti koldūnai su kiaulienos ir jautienos įdaru, o antrasis mėginys – šaldyti lietiniai blyneliai su mėsa. DNR sukarpius AscI fermentu, kamienus galėtume priskirti identiškiems, o su ApaI profiliai skiriasi >7 fragmentais, kas nurodo, kad kamienai yra skirtingi. Bendras kamienų panašumas 77 %.



24 pav. *L. monocytogenes* 9779 ir 9887 AscI ir ApaI profilių palyginimas.

Dviejų restrikcijos endonukleazių naudojimas tipuojant *L. monocytogenes* pagerina metodo skiriamąją gebą. Dėl tos priežasties PFGE yra daug tikslesnis metodas nei MLST, MLVA ar ribotipavimas.

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Siekiant nustatyti *Listeria monocytogenes* genetinius profilius PFGE metodu, buvo atrinkti 44 maisto produktų mėginiai, kurie atlikus biocheminius testus buvo teigiami *L. monocytogenes*. Pagal Nathalie Gnanou Besse ir kt., referentinis *L. monocytogenes* aptikimas maisto produktuose pagal ISO 11290-1:2017 bendrąjį standartą, buvo patvirtintas tarplaboratoriniais tyrimais pagal Europos Komisijos suteiktą įgaliojimą. Autorių atliktas tyrimas, kurių metu pasirinktos skirtingos matricos (šalta rūkyta lašisa, pieno milteliai kūdikių mišinėliams, daržovės, aplinkos mėginiai, pienos produktai ir kt.) patvirtino standarto ISO 11290-1 tinkamumą aptikti *L. monocytogenes* maisto produktuose, perdirbimo įmonėse. Pagal naudotas matricas, metodo jautrumas svyravo nuo 91,1 % iki 100 %, o specifiškumas nuo 97,6 % iki 100 %. Tai yra standartinis metodas, kuris dažniausiai naudojamas listerijų aptikimui. Aptikimas skirstomas į keturias nuoseklias pakopas: 1) pirminis gausinimas skystojoje atrankiojoje gausinimo terpėje, esant sumažintai atrankųjų medžiagų koncentracijai (pusės stiprumo Fraserio sultinys); 2) antrinis gausinimas skystojoje atrankiojoje gausinimo terpėje esant visai atrankųjų medžiagų koncentracijai (Fraserio sultinys); 3) sėjimas ir identifikavimas (ALOA, Oxford); 4) Patvirtinimas taikant morfologinius arba biocheminius testus: katalazės reakcija, Gramteigiamų bakterijų dažymas ir mikroskopavimas, β -hemolizė, L-ramnozės ir D-ksilozės skaidymas, CAMP testas. Listerijų aptikimas maisto produktuose užtrunka apie 4 dienas.

Atliekant PFGE buvo įsitikinta, kad dirbant su atskiromis bakterijų kultūromis arba dirbant skirtingose laboratorijose būtina parinkti optimalias PFGE sąlygas. Pagal Laura Luque-Sastre ir kt., DNR degradavimas dažniausiai tikėtinas, kuomet reikia nusistatyti bakterijų koncentraciją, o neturint įgūdžių, tai tiksliai ir greitai padaryti gali būti sudėtinga, todėl jei tiriama daugiau nei 6 bakterijų kultūros, rekomenduojama naudoti šaldymo stovėlį. Taip pat nerekomenduojama vienu metu atlikti daugiau nei 10 bakterijų kultūrų. Turint daug mėginių patariama juos padalinti į kelias grupes. Nors listerijoms PulseNet rekomenduoja naudoti dvi restrikcijos endonukleazes, tačiau kiti mokslininkai teigia, kad antrasis ApaI fermentas būtinas tik tuomet, jei pirmuoju fermentu restrikcija nepavyksta. Atliktame tyrime, dviejų restrikcijos endonukleazių naudojimas pasitvirtinio ir leido teisingai suskirstyti gautus bakterijų profilius. Taip pat prieš atliekant restrikciją, rekomenduojama patikrinti sąlygas, kuriomis DNR karpymas vyksta efektyviausiai, kadangi skirtingi tiekėjai gali nurodyti skirtingas inkubavimo temperatūras (pvz. 56 °C). Vienas iš dažniausiai kintančių faktorių skirtingose laboratorijose – tyrimo laikas. Standartizuotas tyrimo laikas būna tuomet, kai kontrolinės *S. enterica* Braendrup

H9812 paskutinis fragmentas numigravęs ne toliau kaip 1,0 – 1,5 cm nuo gelio apačios. Mūsų atliktame metodo optimizavime papildomai teko nustatyti tinkamą buferio tėkmės greitį (550 mL/min), taip pat dėl PFGE sistemos šaldymo bloke kylančios temperatūros (42 °C), reikėjo sutrumpinti žarnų, jungiančių sistemą, ilgį, tam, kad neišlinktų gelio šonai. Temperatūros pakilimas sistemoje lėmė burbulų susidarymą žarnelėse, kuriomis teka buferis. Tyrimo metu susidurta ir su kitokiomis problemomis: fragmentų susidubliavimu dėl šiek tiek ne tiesiai stovičios gelio celės, taip pat DNR degradavimu ar mechaniniu lydinukų pažeidimu.

„BioNumerics“ analizei pasirinktas dviejų restrikcijos profilių kombinavimas ir jų sulyginimas, naudojant Dice koeficientą, kuris konvertuotas į procentinę vertę. Profilių panašumo tolerancija ir optimizacija – 1%. Dendrogramos sudarymui buvo naudojamas hierarchinis grupavimo metodas UPGMA – „nepasvertas grupių porų metodas su aritmetiniu vidurkiu“ arba žinomas, kaip vidurkinė jungčių klasterizacija (angl. unweighted pair group method with arithmetic mean). Šis algoritmas paremtas idėja, kad artimi objektai yra panašesni tarpusavyje, nei tolimesni ir sujungia į klasterius, remiantis atstumu. Taip pat naudotas kopenetinis (angl. cophenetic) koreliacijos koeficientas, nurodantis kaip tiksliai dendrograma išlaiko atstumą tarp klasterių. Jis dažniausiai svyruoja tarp 0,60 ir 0,95. Vertės didesnės nei 0,80 laikomos pagrįstomis. Mokslininkai (Karla Sequeira Mendonca ir kt.), siekdami nustatyti užterštumą įmonėse, ima mėginius ne tik iš skirtingų maisto produktų, bet taip pat ir iš pirminės grandies – gyvūnų ūkių, skerdyklų, įmonių apdorojančių gautą žaliavą. Taip pat mėginiai imami nuo įmonės skirtingų darbo paviršių ir įrangos. Tai tiksliausias būdas stebėti ir atsekti listeriozės paplitimą įvairiose maisto grandyse. Taip pat rekomenduojama nustatyti bakterijų serotipus, nes tai leidžia atskirti svarbius, su maistu dažniausiai paplitusius bakterijų kamienus (1/2a, 1/2b, 4b). Šiame atliktame tyrime nebuvo taikytas serotipų nustatymas, nes tyrimo tikslas buvo nustatyti genetinius *L. monocytogenes* profilius PFGE metodu. Atlikta analizė parodė, kad iš 44 ištirtų maisto produktų, 28 kamienų tapatumas tarpusavyje buvo didesnis nei 80 %, kas nurodo, kad kamienai tarpusavyje yra giminingi. Taip pat nustatyti 16 atsitiktinių pavienių kamienų, kurie gali būti vertinami kaip individualūs ligas sukėlę patogenai (panašumas <80 %). Iš jų 3 kamienai nustatyti šaldytose daržovėse, aštriose šaldytose daržovėse ir greitai užšaldytose morkytėse (11033, 13725, 11580 – jų panašumas su likusiais svyravo tarp 31,0 % ir 36,2 %). Atliekant dendrogramos analizę pastebėta, kad medžio šakos išsiskiria į dvi atšakas, kurių panašumas tarpusavyje – 40,2 %. Gauti mėginiai – įvairūs mėsos produktai, dėl ko galima daryti prielaidą, kad tai dažniausiai pristatomi mėginiai arba juose dažniausiai nustatomos listerijos. Muhterem-Uyar ir kt. atlikto tyrimo metu nustatė, kad *L. monocytogenes* dažniau aptikama (32 %) mėsos perdirbimo įmonėse ir rečiau (8,8 %) pieno perdirbimo įmonėse. Manoma, kad toks procentinis pasiskirstymas mėsos perdirbimo įmonėse yra dėl didesnio

kryžminio užterštumo apdorojant mėsą: dėl kraujo atliekų, skerdenos „purvinajame“ sektoriuje, vėliau tos pačios mėsos patekimo ir pakavimo „švariajame“ sektoriuje (Muhterem-Uyar et al., 2015). Atliktame tyrime, neatskiriami kamienai nustatyti Žalioji linija šaldytuose koldūnuose ir jautienos smulkintoje mėsoje. Taip pat gali būti keliami hipotezė, kad dėl įrangos ar darbinių stalų nepakankamo dezinfekavimo, sanitarinių sąlygų nesilaikymo, tas pats bakterijų kamienas su 91,7 % tapatumu, nustatytas skirtinguose koldūnų rūšyse (Užsienietiški ir Žalioji linija). Dauguma nustatytų kamienų buvo aptikti tik tame pačiame produkte, reikšminga kamienų variacija tarp gamintojų nepastebėta, kas nurodo, kad dviejų įmonių produkcija gali būti užsakoma iš skirtingų tiekėjų.

Apibendrinant galima teigti, kad PFGE metodas yra labai jautrus aplinkos veiksniams, nėra trumpas ir nuo mėginio gavimo iki PFGE profilio gavimo užtrunka apie 8 dienas. Taip pat nors metodas neatrodo sudėtingas, tačiau yra daug techninių aspektų, kurių neatlikus teisingai, gautas rezultatas gali netenkinti ir būti netinkamas tolimesnei analizei. Duomenų analizė „BioNumerics“ programa yra dalinai automatizuota, nes dauguma sprendimų apdorojant duomenis turi priimti ir tyrėjas. Sudaryta dendrograma leido lengviau išanalizuoti ir naudojant dvi restriktazes, teisingiau įvertinti tai, kad tiriamuosiuose produktuose vyravo kamieno priklausomybė nuo produkto rūšies (rūkyta, žaliavinė mėsa ar pusgaminiš). Ir aptikti keli atvejai, kuomet nustatytas tas pats kamienas skirtinguose maisto produktuose.

Apžvelgus kitų autorių atliktus bandymus ir tobulinant atliktą tyrimą, būtų naudinga epidemiologiniu požiūriu nustatyti *L. monocytogenes* serotipus, taip pat siekiant nustatyti užterštumo šaltinį, rekomenduotina mėginius rinkti iš visų maisto grandinių: nuo ūkio iki perdirbimo įmonės, o norint juose iširti užterštumą listerijomis, taip pat rinkti ėminius nuo darbinių paviršių, įrangos ir žmogaus, kuriam nustatyta listeriozė. Siekiant palyginti gautus duomenis su Europos mastu paplitusiais ir listeriozės protrūkius sukėlusiais kamienais, naudingas gautų profilių palyginimas su PulseNet duomenų baze.

IŠVADOS

1. Nustatyti 44 *Listeria monocytogenes* kamienai optimizuotomis PFGE sąlygomis: buferio tėkmės greitis 550 mL/min., temperatūra 14 °C, proceso trukmė AscI 15 val. 40 min., ApaI 14 val. 50 min.
2. Analizei „BioNumerics” programine įranga, pasirinkti tokie parametrai: profilių tarpusavio panašumo nustatymui pasirinktas Dice koeficientas, konvertuotas į procentinę vertę, profilių panašumo tolerancija ir optimizacija – 1%, dendrogramos sudarymui naudotas hierarchinis grupavimo metodas UPGMA (angl. unweighted pair group method with arithmetic mean), rezultatų patikimumui naudotas kophenetinis (angl. cophenetic) koreliacijos koeficientas, nurodantis kaip tiksliai dendrograma išlaiko atstumą tarp klasterių. Jis dažniausiai svyruoja tarp 0,60 ir 0,95. Vertės didesnės nei 0,80 laikomos pagrįstomis.
3. Iš gautų 44 kamienų, tarpusavyje neatskiriami buvo 9870 ir 8700 (šaldyti mėsos koldūnai Žalioji linija), 7886 ir 7887 (jautienos smulkinta mėsa), 10 kamienų grupės tarpusavyje >80 % panašūs, 13 kamienų tapatumas mažesnis nei 80 % ir 3 pavieniai, skirtingų gamintojų, mažiausiai tapatūs kamienai (31–36,2 %).
4. Iš tirtų 44 mėginių nustatyta, kad tiriamuosiuose produktuose vyravo kamieno priklausomybė nuo produkto rūšies (žaliavinė mėsa, rūkyta ar mėsos pusgaminis) ir pasitaikė tik du atvejai, kurių metu dėl galimos aplinkos taršos įmonėje, nustatyti vienodi kamienai skirtinguose produktuose.

PADĖKA

Dėkoju Nacionaliniam maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutui bei dr. Vaclovui Jurgelevičiui už suteiktą galimybę atlikti tyrimus, pagalbą rengiant baigiamąjį darbą. Taip pat dėkoju konsultantei, molekulinės biologijos ir genetiškai modifikuotų organizmų tyrimų skyriaus vyriausiajai bioinžinierei Gertrūdai Šeškutei už išsamias konsultacijas bei pagalbą viso mokslinio projekto darbo metu.

Taip pat dėkoju visam molekulinės biologijos ir genetiškai modifikuotų organizmų tyrimų skyriaus kolektyvui už puikią darbo atmosferą, motyvaciją ir palaikymą.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Toma Janušonytė
Magistro baigiamasis darbas

Listeria monocytogenes genetinių profilių nustatymas pulsuojančio lauko
gelio elektroforezės metodu

SANTRAUKA

Darbo tikslas - nustatyti, maisto produktuose aptiktų, *Listeria monocytogenes* genetinius profilius, taikant pulsuojančio lauko gelio elektroforezės metodą.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti *L. monocytogenes* kamienus vadovaujantis PulseNet standartine darbo procedūra.
2. Atlikti *L. monocytogenes* profilių analizę naudojant „BioNumerics” programinę įrangą.
3. Palyginti gautus *L. monocytogenes* kamienus tarpusavyje.
4. Įvertinti kamienų giminingumą, išanalizuoti maisto produkto ir *L. monocytogenes* kamienų priklausomybes.

Listeriozė – gyvūnų ir žmonių užkrečiamoji liga, kurią sukelia *Listeria monocytogenes* bakterijos. Listeriozė dažniausiai plinta maistu, taigi maisto produktai gali būti užteršti bet kuriame maisto grandinės „nuo ūkio iki šakutės” etape. Siekiant sumažinti listerijų paplitimą ir visuomenės sveikatai keliamą pavojų būtina imtis tinkamų ir veiksmingų priemonių, skirtų aptikti ir kontroliuoti šiuos patogenus. Šiame tyrime, taikant ISO 11290-1:2017 standartą, 44 maisto produktuose nustatytos *L. monocytogenes* bakterijos. Šiame darbe buvo parenkamos optimalios sąlygos *L. monocytogenes* tyrimui pulsuojančio lauko gelio elektroforezės metodu: buferio tėkmės greitis 550 mL/min., temperatūra 14 °C, proceso trukmė AscI 15 val. 40 min., ApaI 14 val. 50 min. Bakterijų tarpusavio kamienų giminingumas įvertintas naudojantis „BioNumerics” programine įranga, sukurta dendrograma. Iš gautų 44 kamienų, tarpusavyje neatskiriami buvo 4 kamienai, 10 kamienų grupių tarpusavyje >80 % panašūs, 13 kamienų tapatumas mažesnis nei 80 % ir 3 pavieniai, mažiausiai tapatūs kamienai (31–36,2 %). Nustatyta, kad tiriamuosiuose produktuose vyravo kamieno priklausomybė nuo produkto rūšies ir pasitaikė tik du atvejai, kurių metu dėl galimos aplinkos taršos, nustatyti vienodi kamienai skirtinguose produktuose.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Toma Janušonytė

Master thesis

DNA fingerprinting of *Listeria monocytogenes* using pulse-field gel electrophoresis

SUMMARY

The aim of the study was to determine the genetic profiles of *Listeria monocytogenes* detected in food by the method of pulse-field gel electrophoresis.

Objectives:

1. Identify *L. monocytogenes* strains using PulseNet standard operating procedure.
2. Perform *L. monocytogenes* profile analysis using “BioNumerics” software.
3. Compare the obtained *L. monocytogenes* strains with each other.
4. Evaluate the relatedness between strains, to determine the dependences of the food and *L. monocytogenes* strains.

Listeriosis is a contagious disease of animals and humans caused by *Listeria monocytogenes*. Listeriosis is most commonly spread through food, which can be contaminated at any stage of the food chain “from farm to fork”. Appropriate and effective measures to detect and control these pathogens are necessary to reduce the prevalence of *Listeria* and the risk to public health. In this study, *L. monocytogenes* was detected in 44 products using ISO 11290-1: 2017 procedure. Through the analysis of *L. monocytogenes* conducted in this thesis, optimal conditions were selected using PFGE method: buffer flow rate 550 mL / min, temperature 14 °C, process duration AscI 15 h. 40 min, ApaI 14 h. 50 min. “BioNumerics” software generated dendrogram was used to assess the relatedness of bacterial strains. Of the 44 strains obtained, 4 strains were inseparable, 10 groups of strains were > 80% similar to each other, 13 strains had an identity of less than 80% and 3 single, least identical strains (31–36,2%).

It was found that different product types (e.g. smoked meat, raw meat, etc.) will provide different strain results. Due to probable environmental contamination, only two cases of different types of products had shown the same strain results.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Alonso-Calleja, C., Gómez-Fernández, S., Carballo, J., and Capita, R. (2019). Prevalence, Molecular Typing, and Determination of the Biofilm-Forming Ability of *Listeria monocytogenes* Serotypes from Poultry Meat and Poultry Preparations in Spain. *Microorganisms* 7, 529. [https://doi: 10.3390/microorganisms7110529](https://doi.org/10.3390/microorganisms7110529)
2. Andino Romano and Carmine F.Giordano, 2012. *Listeria* infections. Epidemiology, pathogenesis and treatment. Nova Science Publishers, Inc. New York. 35 – 163 p.
3. Andrei, A., and Zervos, M.J. (2006). The Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Arch Pathol Lab Med* 130, 7. [https://doi. 10.1128/CMR.00025-05](https://doi.org/10.1128/CMR.00025-05)
4. Basim, E.H., Basim, H. (2001). Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology, 405 – 418 p.
5. Bhunia, A.K. (2018). *Listeria monocytogenes*. In *Foodborne Microbial Pathogens*, (New York, NY: Springer New York), pp. 229–248. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1_13
6. bioser.com [internetinė svetainė]. Fraser Selective Supplement; [atnaujinta 2020; cituota 2020-03-02]. Adresas <https://www.bioser.com/productos/fraser-selective-supplement-173p/>
7. Biswas, P., Deka, D., Motina, E., Dutta, T., and Singh, N. Studies on detection and antibiotic sensitivity and resistance pattern of *Listeria monocytogenes* isolated from cattle, raw cow milk and milk products from Tripura, India. *International Journal of Chemical Studies* 7.
8. Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., and Whiting, R.C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* 75, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
9. Buyck, G., Devriendt, V., Van den Abeele, A.-M., and Bachmann, C. (2018). *Listeria monocytogenes* sepsis in the nursing home community: a case report and short review of the literature. *Acta Clinica Belgica* 73, 418–422. <https://doi.org/10.1080/17843286.2017.1421846>
10. Capita, R., Felices-Mercado, A., García-Fernández, C., and Alonso-Calleja, C. (2019). Characterization of *Listeria monocytogenes* Originating from the Spanish Meat-Processing Chain. *Foods* 8, 542. [https://doi:10.3390/foods8110542](https://doi.org/10.3390/foods8110542)
11. Chen, J.-Q., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S., and Hu, Z. (2017). Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness* 6, 97–120. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.06.002>
12. cfsph.iastate.edu [internetinė svetainė]. The center for food security and public health, sukurta 2004 [atnaujinta 2019; cituota 2020-04-20]. Adresas <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/listeriosis.pdf>

13. cdc.gov [internetinė svetainė]. Standard operating procedure for PulseNet PFGE, sukurta 1946 [atnaujinta 2017; cituota 2020-02-27]. Adresas <https://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf>
14. Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P.A., Zanardi, E., Ghidini, S., and Ianieri, A. (2017). *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens* 6, 41. <https://doi:10.3390/pathogens6030041>
15. creative-diagnostics.com [internetinė svetainė]. Creative diagnostics, sukurta 2005 [atnaujinta 2020]. Adresas <https://www.creative-diagnostics.com/tag-listeria-monocytogenes-antigens-48.htm>
16. Čaplinskas S. et al., 2019. Sergamumo užkrečiamosiomis ligomis Lietuvoje 2018 m. apžvalga. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centas, ISSN 2345 – 0606. 93 – 94 p.
17. Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D’Orio, V., Vergara, A., Conter, M., and Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J Appl Microbiol* 104, 1552–1561. <https://doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x>
18. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 276. 73 – 89 p.
19. Felix, B., Tam, T., Lombard, B., Anne Brisabois, A.A., and Roussel, S. (2012). The Use of Pulsed Field Gel Electrophoresis in *Listeria monocytogenes* Sub-Typing - Harmonization at the European Union Level. In *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, S. Magdeldin, ed. (InTech), p. <https://doi.10.5772/38578> .
20. François Bourdichon, Denise Lindsay, Aurélie Dubois, Kieran Jordan, 2019. Bulletin of the IDF N° 502/ 2019: Ecology of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*, Significance in Dairy Production, 1 – 44 psl.
21. Gasanov, U., Hughes, D., and Hansbro, P.M. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* : a review. *FEMS Microbiol Rev* 29, 851–875. <https://doi:10.1016/j.femsre.2004.12.002>
22. Gnanou Besse, N., Lombard, B., Guillier, L., François, D., Romero, K., Pierru, S., Bouhier, L., and Rollier, P. (2019). Validation of standard method EN ISO 11290 - Part 1 - Detection of *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology* 288, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.024>
23. Goering, R.V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 866–875. <https://doi:10.1016/j.meegid.2010.07.023>
24. Gray, J.A., Chandry, P.S., Kaur, M., Kocharunchitt, C., Bowman, J.P., and Fox, E.M. (2018). Novel Biocontrol Methods for *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Production Facilities. *Front. Microbiol.* 9, 605. <https://doi:10.3389/fmicb.2018.00605>

25. Heredia, N., and García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition* 4, 250–255. [https://doi: 10.1016/j.aninu.2018.04.006](https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006)
26. Hunter, S.B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M.A., Van Duyne, M.S., Kubota, K., Graves, L., Wrigley, D., Barrett, T., and Ribot, E. (2005). Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 1045–1050. doi:10.1128/JCM.43.3.1045–1050.2005
27. Jamshidi, A., and Zeinali, T. (2019). Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Poultry Products. *International Journal of Food Science* 2019, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/7835253>
28. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 1441/2007. Iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 2073/2005 dėl maisto produktų mikrobiologinių kriterijų (OL L 338, 2005 12 22, p.1)
29. Kvaraciejūtė Beata. Maisto saugos reikalavimų užtikrinimas Airijos „X“ šaldytų produktų gamybos įmonėje [magistrinis darbas]. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universitetas; 2019.
30. Lakicevic, B., Nastasijevic, I., and Raseta, M. (2015). Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in Retail Establishments. *Procedia Food Science* 5, 160–163. [https://doi: 10.1016/j.profoo.2015.09.046](https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.046)
31. Letchumanan, V., Wong, P.-C., Goh, B.-H., Ming, L.C., Pusparajah, P., Wong, S.H., Ab Mutalib, N.-S., and Lee, L.-H. (2018). A review on the characteristics, taxonomy and prevalence of *Listeria monocytogenes*. *Prog Microbes Mol Biol* 1.
32. Lietuvos Respublikos maisto įstatymas Nr. VIII-1608, (2019).
33. Liu, A., Shen, L., Zeng, Z., Sun, M., Liu, Y., Liu, S., Li, C., and Wang, X. (2018). A Minireview of the Methods for *Listeria monocytogenes* Detection. *Food Anal. Methods* 11, 215–223. [https://doi. 10.1007/s12161-017-0991-2](https://doi.org/10.1007/s12161-017-0991-2)
34. Lomonaco, S., Nucera, D., and Filipello, V. (2015). The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution* 35, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.008>
35. Lopez Valladares, G., Tham, W., Danielsson Tham, M.-L., Korkeala, H., Lindström, M., and Pålsson, C. (2019). Human listeriosis Grouping of human *Listeria monocytogenes* isolates with PFGE and AscI restriction enzyme.
36. Luque-Sastre, L., Fanning, S., and Fox, E.M. (2015). Pulsed-Field Gel Electrophoresis for *Listeria monocytogenes*. In *Pulse Field Gel Electrophoresis*, K. Jordan, and M. Dalmasso, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 43–53. [https://doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0031-2017](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0031-2017).
37. Luque-Sastre, L., Arroyo, C., Fox, E.M., McMahon, B.J., Bai, L., Li, F., and Fanning, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Listeria* Species. 23. [https://doi.10.1007/978-1-4939-2599-5_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2599-5_5)

38. medbroadcast.com [internetinė svetainė]. MediResource Inc sukurta 1996 [atnaujinta 2020; cituota 2020-04-02]. Adresas <https://medbroadcast.com/condition/getcondition/listeriosis>
39. McMullen, P.D., and Freitag, N.E. (2015). *Listeria monocytogenes*. In Molecular Medical Microbiology, (Elsevier), pp. 1345–1361. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00074-3>
40. Moghadam, A., and Larsen, H. (2019a). Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. Iranian Journal of Veterinary Research 20, 14.
41. Muhterem-Uyar, M., Dalmasso, M., Bolocan, A.S., Hernandez, M., Kapetanakou, A.E., Kuchta, T., Manios, S.G., Melero, B., Minarovičová, J., Nicolau, A.I., et al. (2015). Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. Food Control 51, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.042>
42. Nathalie Gnanou Besse, Bertrand Lombard, Laurent Guillier, Daniele François, Karol Romero, Sylvie Pierru, Laurence Bouhier, Patricia Rollier, 2018. International Journal of Food Microbiology. Validation of standard method EN ISO 11290 - Part 1 - Detection of *Listeria monocytogenes* in food.1 – 9 p. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.024>
43. ncbi.nlm.nih [internetinė svetainė]. National center for biotechnology, sukurta 1988 [atnaujinta 2020, cituota 2020-03-10]. Adresas <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1637>
44. Neoh, H., Tan, X.-E., Sapri, H.F., and Tan, T.L. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. Infection, Genetics and Evolution 74, 103935. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>
45. Neves, E., Lourenço, A., Silva, A.C., Coutinho, R., and Brito, L. (2008). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars. Systematic and Applied Microbiology 31, 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.08.005>
46. www.nvspl.lt [internetinė svetainė] Nacionalinė visuomenės sveikatos priežiūros laboratorija, sukurta 2003 [atnaujinta 2020, cituota 2020-03-04]. Adresas <http://www.nvspl.lt/index.php?59936412>
47. Olaimat, A.N., Al-Holy, M.A., Shahbaz, H.M., Al-Nabulsi, A.A., Abu Ghoush, M.H., Osaili, T.M., Ayyash, M.M., and Holley, R.A. (2018). Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review: Antibiotic resistance of *L. monocytogenes* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 17, 1277–1292. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12387>
48. Orsi, R.H., Bakker, H.C. den, and Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. International Journal of Medical Microbiology 301, 79–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.05.002>
49. Parizad, E.G. (2016). The Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Clinical Studies. JCDR. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15718.7043>

50. Priyanka B., Patil Rajashekhar K., and Dwarakanath Sulatha (2016). A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian Journal of Medical Research*. 144 (3): 327–338.
51. Pirone-Davies, C., Chen, Y., Pightling, A., Ryan, G., Wang, Y., Yao, K., Hoffmann, M., and Allard, M.W. (2018). Genes significantly associated with lineage II food isolates of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genomics* 19, 708. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5074-2>
52. P.David McMullen and Nancy E.Freitag, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, USA, 2015. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). Chapter 74 – *Listeria monocytogenes*, pp. 1345 – 1361. <https://doi.10.1016/B978-0-12-397169-2.00074-3>
53. Radoshevich, L., and Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 16, 32–46. <https://doi:10.1038/nrmicro.2017.126>
54. Rodrigues, C.S., Sá, C.V.G.C. de, and Melo, C.B. de (2017). An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. *Cienc. Rural* 47. <https://doi.10.1590/0103-8478cr20160721>
55. Rodríguez-Campos, D., Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., and Capita, R. (2019). Persistent *Listeria monocytogenes* Isolates from a Poultry-Processing Facility Form More Biofilm but Do Not Have a Greater Resistance to Disinfectants than Sporadic Strains. *Pathogens* 8, 250. <https://doi:10.3390/pathogens8040250>
56. Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J., Vázquez-Sánchez, D., and López Cabo, M. (2018). Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol. *Foods* 7, 85. <https://doi:10.3390/foods7060085>
57. Ryser, E.T., Buchanan, R.L., and Bakke, H.C. den (2019). *Listeria monocytogenes*. In *Food Microbiology*, M.P. Doyle, F. Diez-Gonzalez, and C. Hill, eds. (Washington, DC, USA: ASM Press), pp. 451–486. <https://doi:10.1128/9781555819972.ch17>
58. Saha, M., Debnath, C., and Pramanik, A.K. (2015). *Listeria monocytogenes*: An Emerging Food Borne Pathogen. 21. *ISSN: 2319-7706* Volume 4 Number 11 (2015) pp. 52-72
59. Saiful, M., and Khan, I. (2017). Applicability of non-thermal plasma as an emerging technology on pathogen inactivation in food industry. <https://doi:10.13140/RG.2.2.26783.41122>
60. Schardt, J., Jones, G., Müller-Herbst, S., Schauer, K., D’Orazio, S.E.F., and Fuchs, T.M. (2017). Comparison between *Listeria sensu stricto* and *Listeria sensu lato* strains identifies novel determinants involved in infection. *Sci Rep* 7, 17821. <https://doi:10.1038/s41598-017-17570-0>
61. Schumann, P., and Pukall, R. (2013). The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 36, 369–375. <https://doi.10.1016/j.syapm.2013.05.003>

62. Shabbir Simjee, 2007. Infectious Disease: Foodborne Diseases. Franz Allerberger. S. Simjee © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 27 – 39 p.
63. Shen, C., and Zhang, Y. (2017). Enumeration and Identification of *Listeria monocytogenes* on Ready-to-Eat (RTE) Frankfurters. In Food Microbiology Laboratory for the Food Science Student, (Cham: Springer International Publishing), pp. 37–42.
64. SJÖMAN MARIA. The use of serotyping and PFGE – typing of *Listeria monocytogenes* in food processing and human foodborne infections [ACADEMIC DISSERTATION]. Finland: University of Helsinki; 2010.
65. Skowron, K., Wałęcka-Zacharska, E., Grudlewska, K., Białucha, A., Wiktorczyk, N., Bartkowska, A., Kowalska, M., Kruszewski, S., and Gospodarek-Komkowska, E. (2019). Biocidal Effectiveness of Selected Disinfectants Solutions Based on Water and Ozonated Water against *Listeria monocytogenes* Strains. *Microorganisms* 7, 127. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050127>
66. solusscientific.com [internetinė svetainė]. Solus OA agar – Selectivity and differentiation in one plate; sukurta 2015 [atnaujinta 2020; cituota 2020-03-11]. Adresas <https://www.solusscientific.com/listeria-selectivity-confirmation-agars/>
67. Temple ME, Nahata MC (2000). „Treatment of listeriosis“. „The Annals of Pharmacotherapy. 34 (5): 656-61. doi:10.1345/aph.19315
68. textbookofbacteriology.net [internetinė svetainė]. Today's Online Textbook of Bacteriology; sukurta 2015 [atnaujinta 2020; žiūrėta 2020-03-25]. Adresas <http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>
69. thermofisher.com [internetinė svetainė]. ThermoFisher Scientific; sukurta 2006 [atnaujinta 2017; cituota 2020-03-20]. Adresas <https://www.thermofisher.com/blog/food/keeping-up-with-the-listerias-implications-of-taxonomic-changes-for-food-testing/>
70. ulac.lt [internetinė svetainė]. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras, sukurta [atnaujinta 2020; cituota 2020-04-15]. Adresas <http://www.ulac.lt/ligos/L/listerioze>
71. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. Listeriozės profilaktikos ir kontrolės metodinės rekomendacijos. 2014, 1-28.
72. Välimaa, A.-L., Tilsala-Timisjärvi, A., and Virtanen, E. (2015). Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain – A review. *Food Control* 55, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.037>
73. Warke, S.R., Ingle, V.C., Kurkure, N.V., Tembhrne, P.A., Prasad, M., Chaudhari, S.P., and Barbuddhe, S.B. (2017). Biofilm Formation and Associated Genes in *Listeria Monocytogenes*. *IJVSBT* 12. <https://doi.org/10.21887/ijvsbt.v12i3.7079>
74. who.int [internetinė svetainė]. World Health Organization; sukurta 1948 [atnaujinta 2020; cituota 2020-03-20]. Adresas <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
75. Wu, F., and Della-Latta, 2006. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. Springer Science+Business Media, LLC. USA. Pulsed-Field gel electrophoresis, 143 – 144 p

Mitybos terpių bei reagentų sudėtis ir ruošimas

1 lentelė. Atrankioji pirminio gausinimo terpė: pusės stiprumo Fraserio sultinys

Medžiagos	Kiekis (g; ml)
Fermentinis gyvūnų audinių hidrolizatas	5,0 g
Fermentinis kazeino hidrolizatas	5,0 g
Mėsos ekstraktas	5,0 g
Mielių ekstraktas	5,0 g
Natrio chloridas	20,0 g
Dinatrio vandenilio fosfato dihidratas	12,0 g
Kalio divandenilio fosfatas	1,35 g
Eskulinas	1,0 g
Vanduo	1000 ml

Pagrindiniai terpės komponentai ištirpinami vandenyje šildant, jei būtina. Jei reikia, pH koreguojamas taip, kad po sterilizavimo jis būtų $7,2 \pm 0,2$ esant $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai. Pagrindinė terpė išpilstoma į tinkamos talpos kolbas (po 225 ml arba 225 g). Sterilizuojama 15 min. autoklave $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

2 lentelė. Atrankioji antrinio gausinimo terpė: viso stiprumo Fraserio sultinys

Medžiagos	Kiekis (g; ml)
Fermentinis gyvūnų audinių hidrolizatas	5,0 g
Fermentinis kazeinas hidrolizatas	5,0 g
Mėsos ekstraktas	5,0 g
Mielių ekstraktas	5,0 g
Natrio chloridas	20,0 g
Dinatrio vandenilio fosfatas	12,0 g
Kalio divandenilio fosfatas	1,35 g
Eskulinas	1,0 g
Ličio chloridas	3,0 g
Nalidikso rūgšties natrio druska	0,02 g
Vanduo	1000 ml

Pagrindiniai terpės komponentai ištirpinami vandenyje šildant, jei būtina. Jei reikia, pH koreguojamas taip, kad po sterilizavimo jis būtų $7,2 \pm 0,2$ esant $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai. Pagrindinė terpė išpilstoma į tinkamos talpos kolbas ir sterilizuojama 15 min. autoklave $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

3 lentelė. *Listeria* agarų pagal Ottaviani ir Agosti (ALOA) sudėtis

Medžiagos	Kiekis (g; ml)
Fermentinis gyvūnų audinių hidrolizatas	18 g
Fermentinis kazeino hidrolizatas	6 g
Mielių ekstraktas	10 g
Natrio piruvatas	2 g
Gliukozė	2 g
Magnio glicerofosfatas	1 g
Magnio sulfatas (bevandenis)	0,5 g
Natrio chloridas	5 g
Ličio chloridas	10 g
Dinatrio vandenilio fosfatas (bevandenis)	2,5 g
5-brom-4-chlor-3-indolil-β-D-gliukopiranozidas	0,005 g
Agaras	Nuo 12 g iki 18 g*
Vanduo	930 ml

* Priklausomai nuo agarų gelio standumo

Bevandeniai komponentai ištirpinami vandenyje virinant. Jei būtina, pH koreguojamas taip, kad po sterilizavimo jis būtų $7,2 \pm 0,2$. Sterilizuojama 15 min. autoklave 121 °C temperatūroje.

4 lentelė. Oxford agarų sudėtis

Medžiagos	Kiekis (g; mg; ml)
Columbia pagrindinė terpė	39,0 g
Ličio chloridas	15,0 g
Eskulinas	1,0 g
Geležies amonio citratas	0,5 g
Cikloheksimidas	400,0 mg
Kolistinas	10,0 mg
Fosfomicinas	10,0 mg
Akriflavinas	4,5 mg
Cefotetanas	2,0 mg
Vanduo	1000,0 ml

„Columbia agarų pagrindas“ teikia peptonus ir kitas būtinas maistines medžiagas. *L. monocytogenes* hidrolizuoja eskuliną, kad susidarytų 6,7-dihidroksikumarinas, kuris susijungia su geležies amonio citratu ir sudaro juodas nuosėdas terpėse, supančiose kolonijas. Ličio chloridas, kolistinas, cikloheksimidas, akriflavinas ir fosfomicinas yra naudojami kaip selektyvūs agentai, siekiant slopinti daugumos Gramneigiamų ir Gramteigiamų organizmų augimą.

5 lentelė. Triptono, sojos ir mielių ekstrakto agarų (TSMEA) sudėtis

Medžiagos	Kiekis (g; ml)
Fermentinis kazeino hidrolizatas	17 g
Sojos pupelių miltų papaino hidrolizatas	3 g
Mielių ekstraktas	6 g
Gliukozė	2,5 g
Natrio chloridas	5 g
Dikilio vandenilio fosfatas	2,5 g
Agaras	Nuo 12 g iki 18 g
Vanduo	1000 ml

* Priklausomai nuo agarų gelio standumo

Bevandeniai komponentai ištirpinami vandenyje virinant. Jei būtina, pH koreguojamas taip, kad po sterilizavimo jis būtų $7,3 \pm 0,2$ esant $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai. Sterilizuojama 15 min. autoklave $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

6 lentelė. Kraujo agarų sudėtis

Medžiagos	Kiekis (g; ml)
Fermentinis gyvūnų audinių hidrolizatas	15 g
Kepenų hidrolizatas	2,5 g
Mielių ekstraktas	5 g
Natrio chloridas	5 g
Agaras	Nuo 9 g iki 18 g
Vanduo	1000 ml

Komponentai ištirpinami vandenyje virinant. Jei būtina, pH koreguojamas taip, kad po sterilizavimo jis būtų $7,3 \pm 0,2$ esant $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai. Sterilizuojama 15 min. autoklave $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

7 lentelė. Angliavandenių skaidymo sultinio (L-ramnozės ir D-ksilozės) sudėtis

Medžiagos	Kiekis (g; ml)
Fermentinis gyvūnų audinių hidrolizatas	10 g
Mėsos ekstraktas	1 g
Natrio chloridas	5 g
Bromkrezolio violetinis	0,02 g
Vanduo	1000 ml

Komponentai ištirpinami vandenyje šildant, jei būtina. Jei būtina, pH koreguojamas taip, kad po sterilizavimo jis būtų $6,8 \pm 0,2$ esant $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai. Sterilizuojama 15 min. autoklave $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. 5 g angliavandenių (L-ramnozės arba D-ksilozės) ištirpinami 100 ml vandenyje, sterilizuojama filtruojant per membraną.

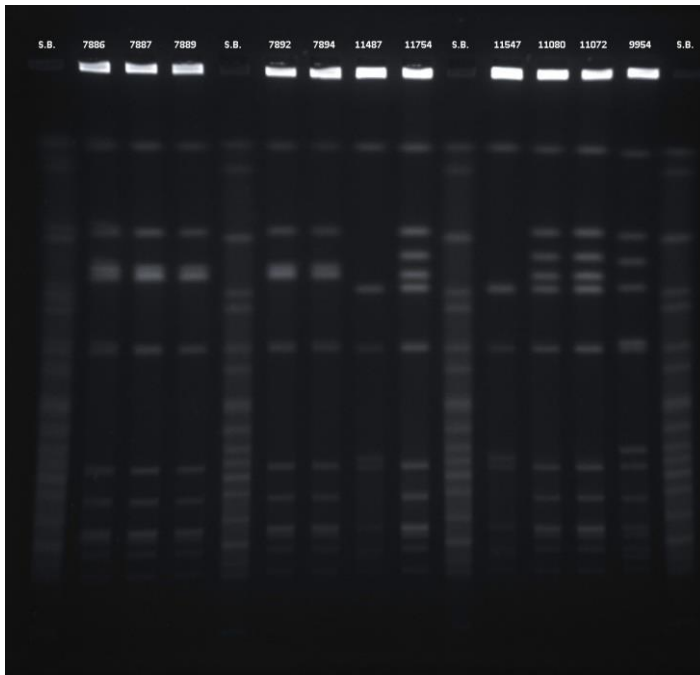
8 lentelė. CAMP terpės sudėtis

Medžiagos	Kiekis (ml)
Pagrindinė terpė (6 lentelė)	100 ml
Defibrinuotas kraujas	Nuo 5 ml iki 7 ml

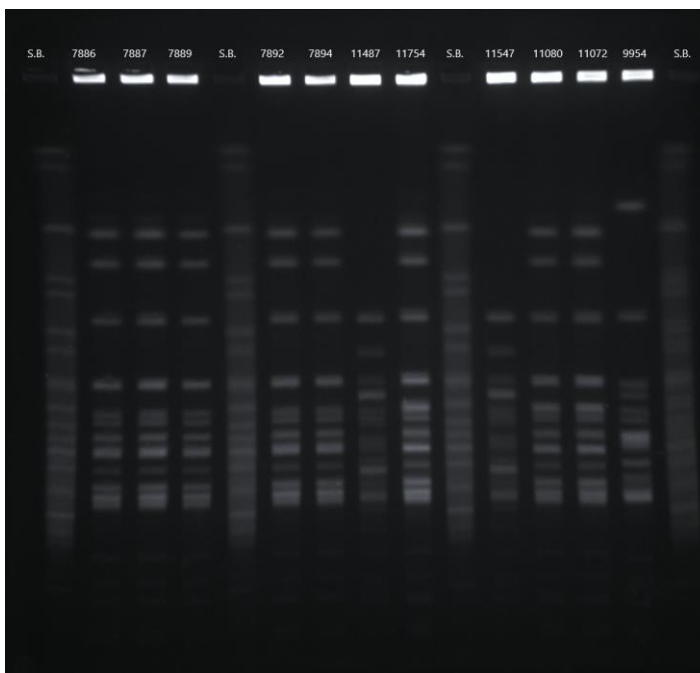
Kraujas įpilamas į pagrindinę terpę (6 lentelė), prieš tai atvėsintą iki 47– 50 °C temperatūros. Gerai išmaišoma. Terpė išmaišoma į sterilias Petri lėkšteles, leidžiama sustingti.

Listeria monocytogenes PFGE profiliai

Listeria monocytogenes kamienai karpyti AscI ir ApaI restrikcijos endonukleazėmis. 1, 5, 10, 15 takeliai *Salmonella enterica* Braenderup H9812.



1 pav. *L. monocytogenes* karpyta AscI restrikcijos endonukleaze.

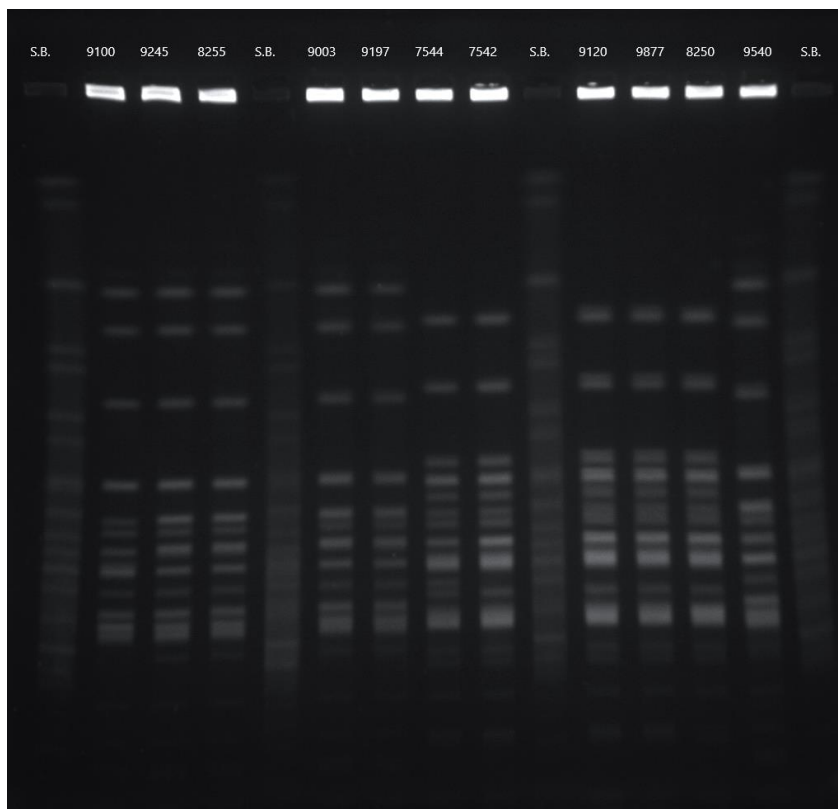


1 pav. *L. monocytogenes* karpyta ApaI restrikcijos endonukleaze.

Listeria monocytogenes kamienai karpyti AscI ir ApaI restrikcijos endonukleazėmis. 1, 5, 10, 15 takeliai *Salmonella enterica* Braenderup H9812.

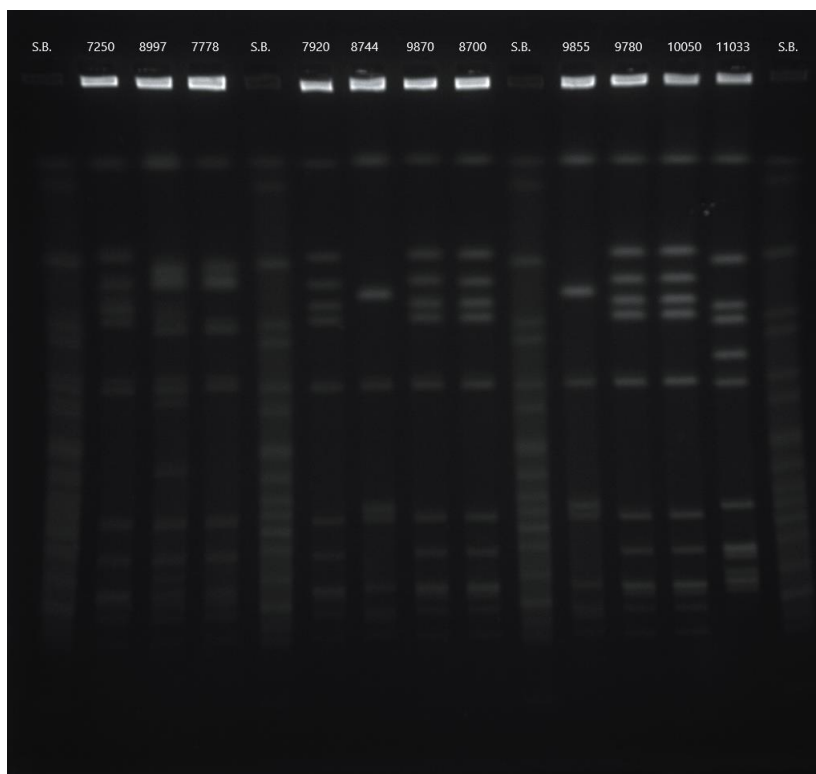


3 pav. *L. monocytogenes* karpyta AscI restrikcijos endonukleaze.



4 pav. *L. monocytogenes* karpyta ApaI restrikcijos endonukleaze.

Listeria monocytogenes kamienai karpyti AscI ir ApaI restrikcijos endonukleazėmis. 1, 5, 10, 15 takeliai *Salmonella enterica* Braenderup H9812.



5 pav. *L. monocytogenes* karpyta AscI restrikcijos endonukleaze.



6 pav. *L. monocytogenes* karpyta ApaI restrikcijos endonukleaze.

Listeria monocytogenes kamienai karpyti AscI ir ApaI restrikcijos endonukleazėmis. 1, 5, 10, 15 takeliai *Salmonella enterica* Braenderup H9812.



7 pav. *L. monocytogenes* karpyta AscI restrikcijos endonukleaze.



8 pav. *L. monocytogenes* karpyta ApaI restrikcijos endonukleaze.