

MULTILOCUS SEQUENCE TYPING ZUR GENOTYPISIERUNG VON *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

Sara Urmersbach¹, Madura Sanjeevani Gonsal Koralage², Thomas Alter¹, Ute Messelhäusser³, Duangporn Pichpol⁴, Stephan Huehn¹

¹Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin, Deutschland

²Government Veterinary Office, Walikanda, Polonnaruwa, Sri Lanka

³Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

⁴Veterinärmedizinische Fakultät, Chiang Mai Universität, Thailand

Hintergrund

Vibrio (V.) parahaemolyticus ist ein in der marinen Umwelt vorkommendes potentiell pathogenes Bakterium, das regelmäßig aus Meerwasser, Sediment und rohen oder unzureichend gegarten marinen Lebensmitteln (z.B. Krustentieren und Muscheln) isoliert wird. Durch die Filtration des umgebenden Meerwassers können Muscheln vorhandene Mikroorganismen um das 200-fache anreichern (DePaola *et al.* 2000). Der Verzehr von rohen bzw. unzureichend erhitzten Meeresfrüchten, die *Vibrio* enthalten, sowie der Kontakt mit kontaminiertem Meerwasser können zu Infektionen führen (Gastroenteritis, Wundinfektion und Sepsis).

Ziel dieser Untersuchung war es, Isolate mit (A) unterschiedlicher geographischer Herkunft mittels MLST hinsichtlich ihrer Verwandtschaft und möglicher Verteilungsmuster zu untersuchen. Ein Schwerpunkt war dabei die Analyse von (B) Garnelenisolaten aus drei Regionen Sri Lankas.

Material und Methoden

Bakterien-Stämme

Insgesamt wurden 78 *V. parahaemolyticus*-Isolate untersucht. Davon stammten 30 Stämme aus Wasserproben, Muscheln und Garnelen unterschiedlicher geographischer Herkunft.

Weitere 46 Stämme wurden in Garnelenfarmen aus drei Regionen Sri Lankas (Abb.1) isoliert. Pro Farm bzw. pro Garnelen-Becken wurde ein Isolat analysiert.

Als Referenzstämme dienten die beiden sequenzierten klinischen Humanisolate ATCC 17802 und RIMD 2210633 CM29.

Multilocus Sequence Typing (MLST)

Beim MLST werden Teilsequenzen mehrerer Referenzgene, die für Stoffwechsellzyme codieren, verglichen. Dazu wurden interne Fragmente der Gene *dnaE*, *gyrB*, *recA*, *dtbS*, *pntA*, *pyrC* und *tnaA* mittels PCR amplifiziert und sequenziert (Abb. 2A; González-Escalona *et al.* 2008).

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Bionumerics (Applied Maths, Version 6.01) analysiert und über PubMLST (<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus>) mit bereits beschriebenen Sequenztypen (STs) verglichen (Jolley *et al.* 2004). Mittels der verknüpften Fragmentsequenzen wurde über eine „unweighted pair group method with arithmetic mean“-Analyse (UPGMA) ein Stammbaum erstellt. Auf Grundlage der resultierenden Ähnlichkeitsmatrix wurden Minimum Spanning Trees erzeugt.

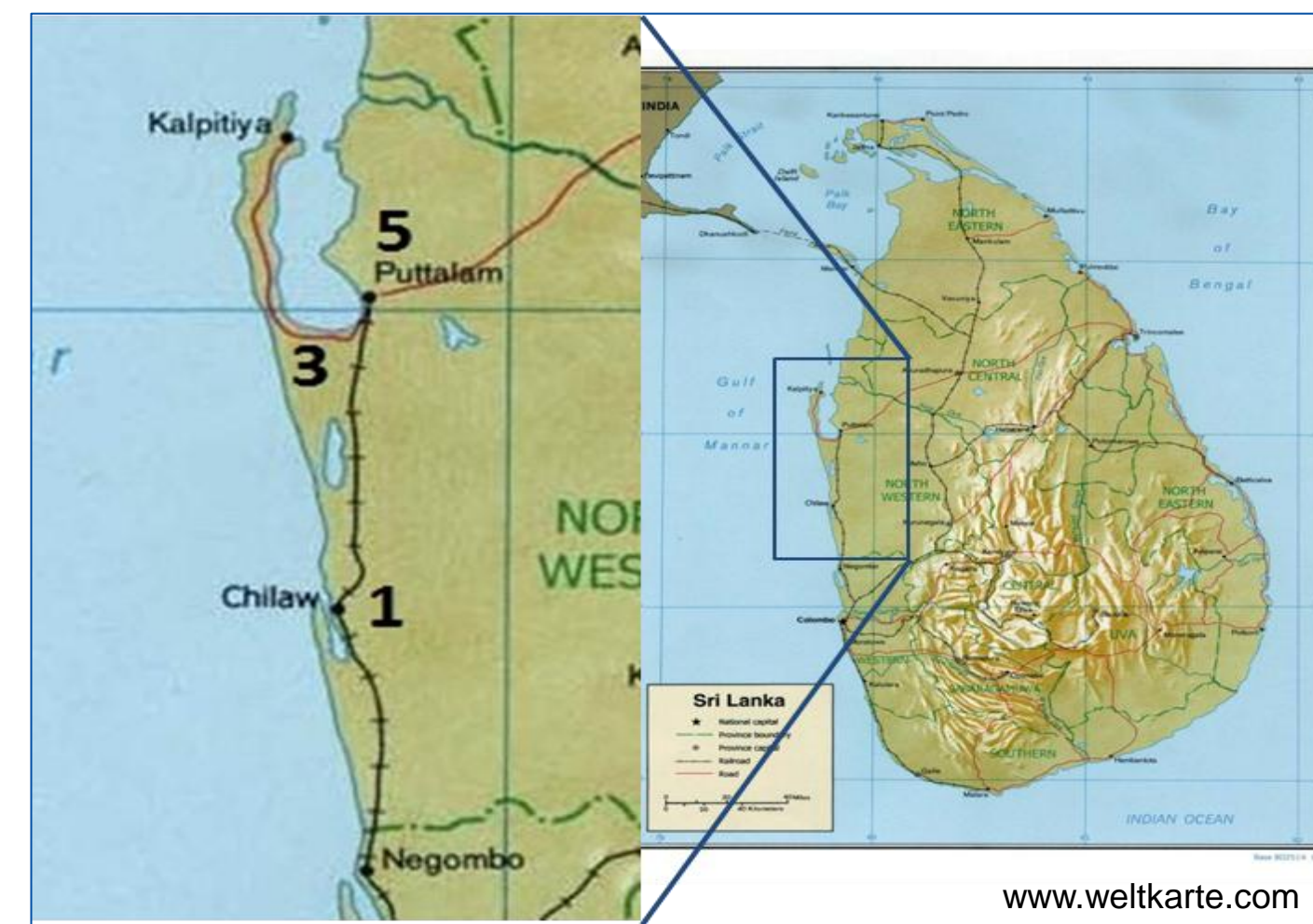


Abb. 1: Karte von Sri Lanka mit Probensammelgebieten (1 Chillaw, 3 Madurankuliya, 5 Puttalam)

recA und *gyrB*

Die Unterteilung der ursprünglichen Fragmente von *gyrB* und *recA* in zwei Teilfragmente führte zur erfolgreichen Amplifikation und somit zum Erhalt vollständiger Allelprofile (Abb. 2C). Dazu wurden zwei innere Primer designt (Abb. 2B), die eine PCR-Amplifikation und Sequenzierung mit den von González-Escalona (2008) eingeführten Bedingungen erlaubten.

eBURST-Analyse

Der eBURST-Algorithmus identifiziert Gruppen von verwandten Genotypen auf Basis ihres Sequenztyp (d.h. ihres Allelprofils). Der mögliche Gründer der Gruppe wird vorhergesagt und die mögliche Beziehung zu den anderen Genotypen der Gruppe wird aufgezeigt (<http://eburst.mlst.net/>).

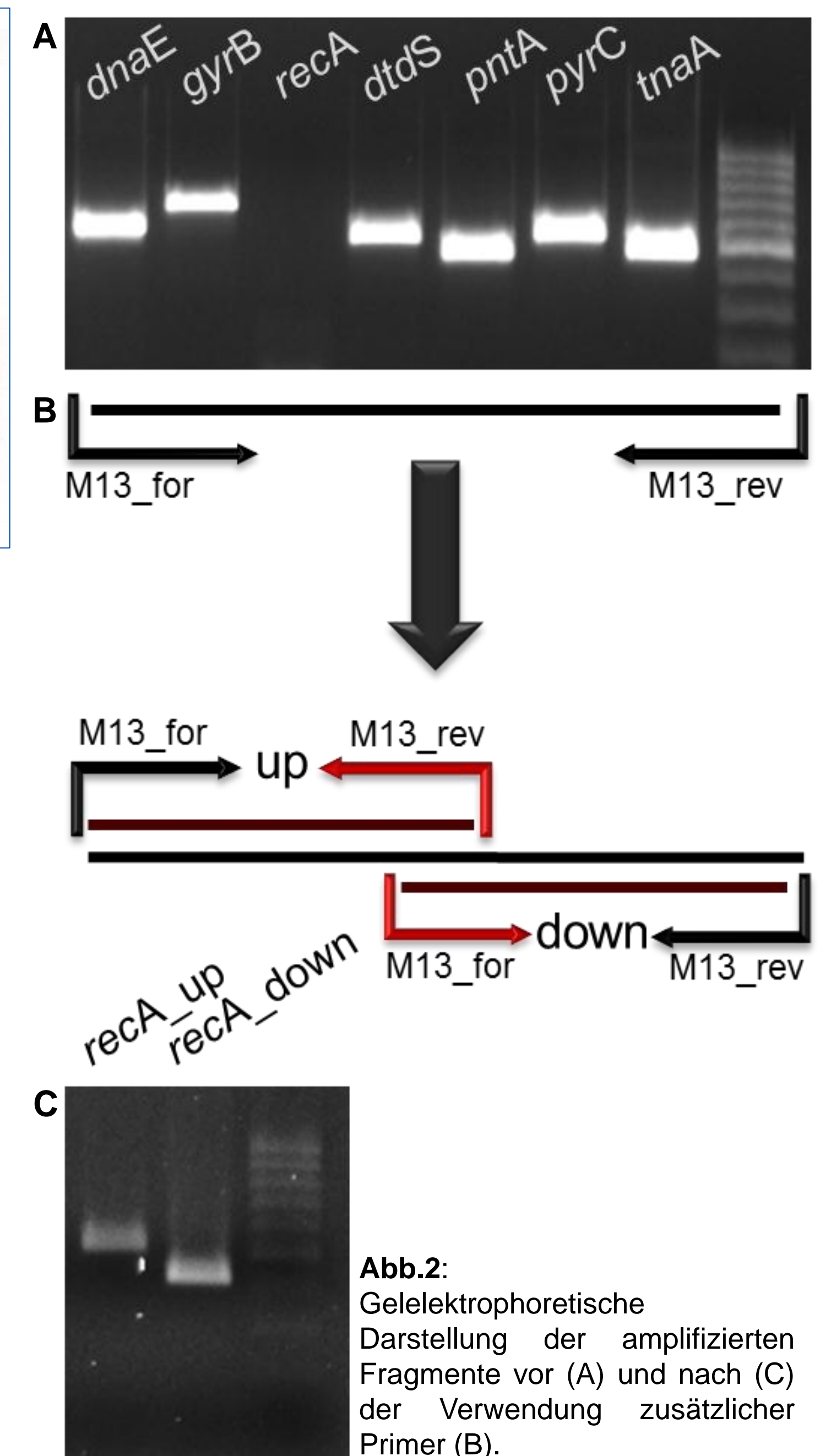


Abb.2: Gelelektrophoretische Darstellung der amplifizierten Fragmente vor (A) und nach (C) der Verwendung zusätzlicher Primer (B).

Ergebnisse

Der Großteil der analysierten Isolate stammte aus Asien (88%).

Nach der Sequenzierung der Genfragmente von 78 Isolaten konnten insgesamt 65 neue Allele identifiziert werden: 7 für *dnaE*, 15 für *gyrB*, 9 für *recA*, 9 für *dtbS*, 6 für *pntA*, 10 für *pyrC* und 9 für *tnaA*. Für 69 Isolate konnte ein vollständiges Allelprofil erstellt und ein ST zugewiesen werden. Unter den 28 neuen STs (52 Isolate) befanden sich sowohl Neukombinationen bereits beschriebener Allele als auch Kombinationen mit neuen Allelen.

A – Einfluss der geographischen Herkunft auf den MLST-Sequenztyp

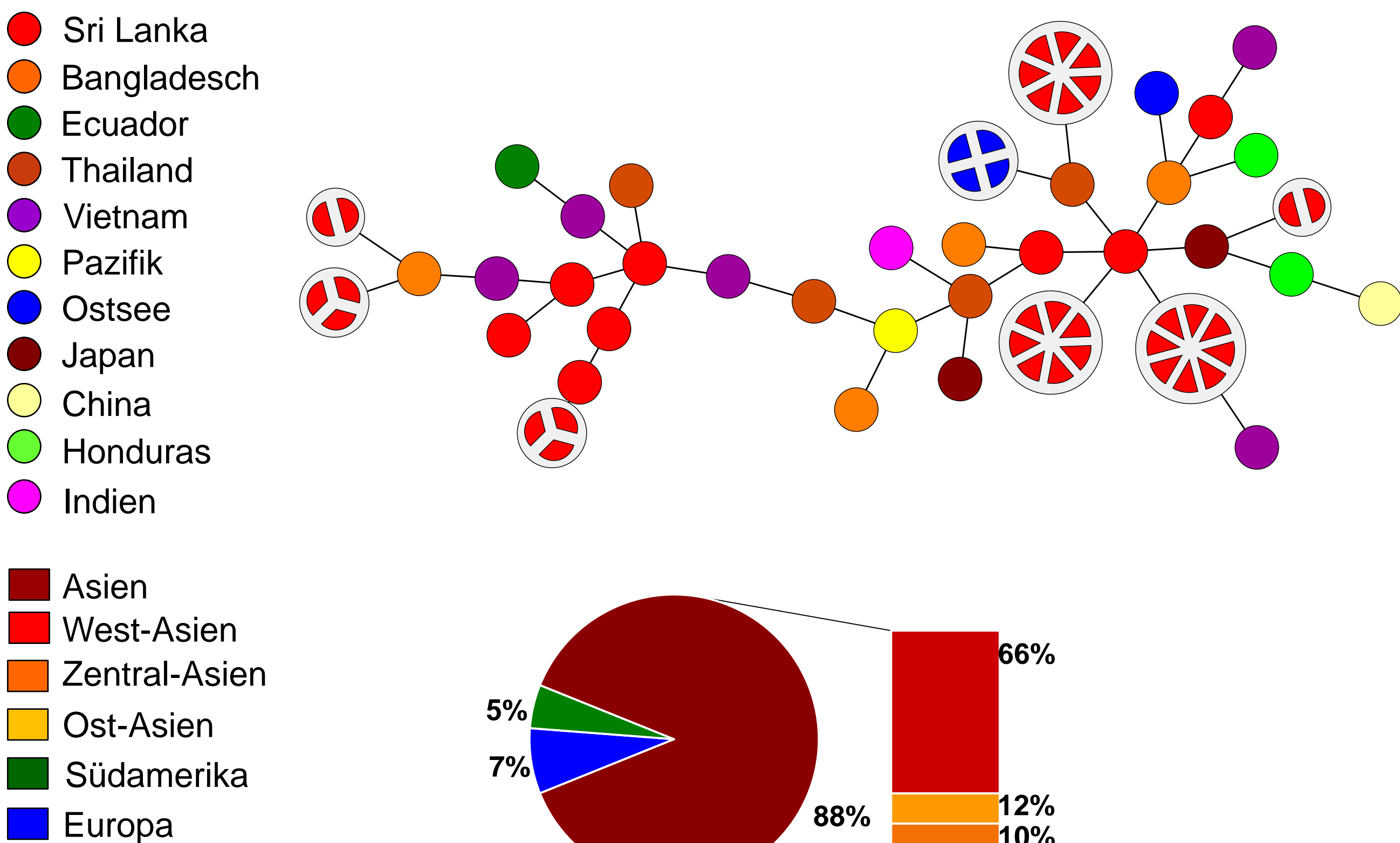


Abb. 3A: Minimum Spanning Tree basierend auf Sequenzunterschieden zwischen den verschiedenen STs. Tortendiagramm zur geographischen Herkunft. Einfärbung entsprechend des Ursprungslandes.

Im Minimum Spanning Tree zeigte sich keine klare Gruppierung der Stämme nach ihrer geographischen Herkunft. Die Sri Lanka-Stämme bildeten zwei Cluster, die über ST anderer geographischer Herkunft verbunden waren. Hierbei handelte es sich um die beiden japanischen Referenzstämme und die 24 Lebensmittelisolate.

Die Lebensmittelisolate konnten 21 unterschiedlichen STs zugeordnet werden (8 beschriebene und 13 neue), die sich über den ganzen Minimum Spanning Tree verteilen. Die drei STs aus Südamerika waren über beide Cluster verteilt, die beiden STs aus Europa lagen zwar in einem Cluster, waren aber nicht direkt benachbart.

B – Verteilung der MLST-Sequenztypen innerhalb Sri Lankas

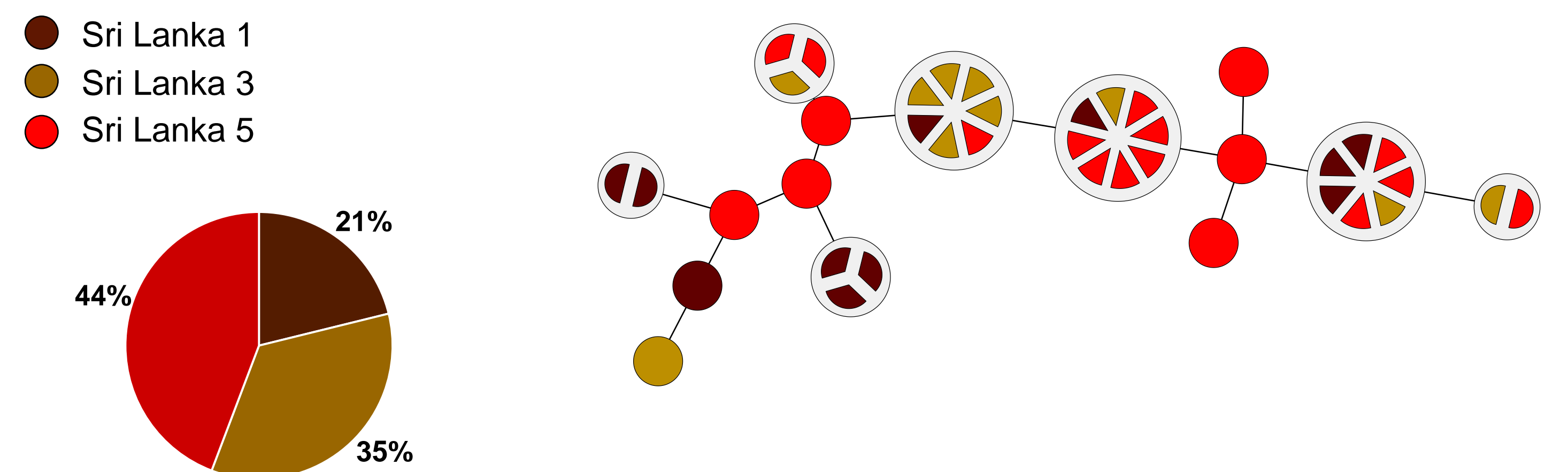


Abb. 3C: Minimum Spanning Tree und Tortendiagramm der Isolate aus Sri Lanka; Einfärbung entsprechend des Sammelgebietes.

Die Mehrheit der untersuchten *V. parahaemolyticus* Stämme (n= 43) waren Garnelenisolate aus drei Regionen Sri Lankas (Abb. 3C). Diese konnten 15 STs zugeordnet werden. Zehn dieser STs wurden aus einer Region isoliert, zwei STs aus zwei und drei aus allen Regionen. Isolate mit gleichem ST und gleicher Herkunftsregion stammten meist von verschiedenen Farmen, teils aber auch von einer Farm, aber stets aus unterschiedlichen Aufzuchtbecken.

C – eBURST-Analyse

Die eBURST-Analyse von allen publizierten STs führte zur Aufdeckung eines neuen clonalen Komplexes (CC; Abb. 4). Der Gründer, ST412 (trh+tdh⁺) wurde in dieser Studie aus einer Garnelenprobe aus Ecuador isoliert. Alle weiteren Stämme des CC wurden in den USA isoliert. Single-Locus-Varianten stammen aus Umweltproben: ST313 (trh+tdh⁺), ST314 (trh+tdh⁺) und ST315 (trh+tdh⁺). Die Double-Locus-Variante ST43 (trh+tdh⁺) wurde sowohl in klinischen Proben als auch in der Umwelt gefunden. Der Satellit ST44 (trh+tdh⁺) wurde nur in klinischen Proben nachgewiesen.

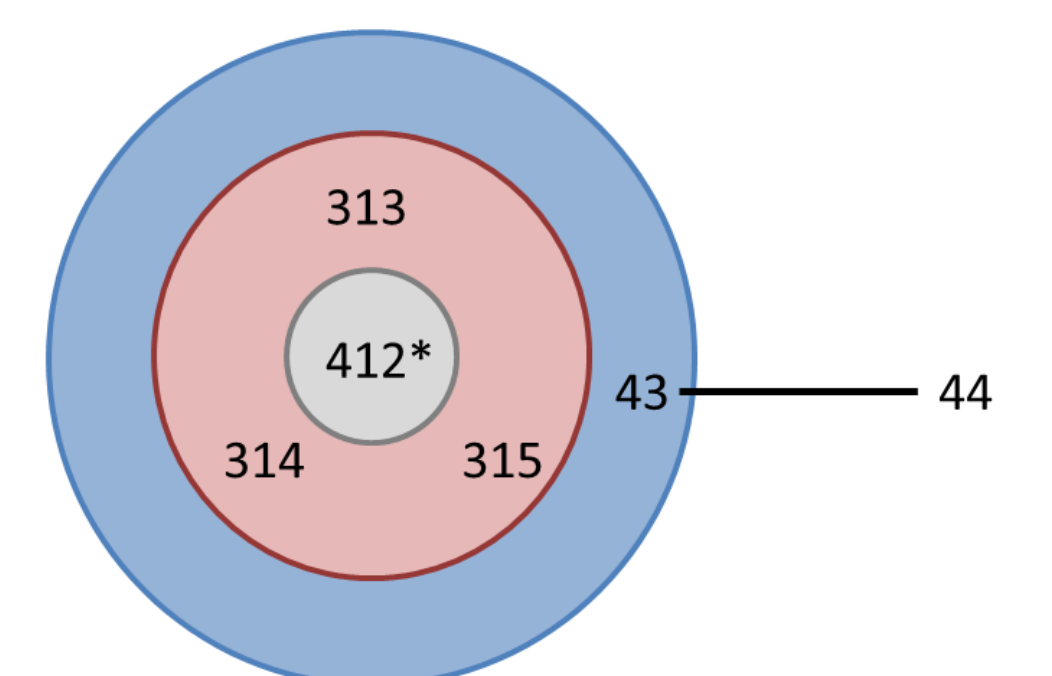


Abb. 4: Graphische Ausgabe der eBURST-Analyse (<http://pubmlst.org/>)

Diskussion

Wiederholt lassen sich Isolate keinem ST zuordnen, da die Fragmentsequenzen von *recA* und *gyrB* fehlen (Chao 2011). Mit der Verwendung der neu designten Primer konnten auch zuvor nicht typisierbare Isolate mittels MLST analysiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der STs unabhängig von der geographischen Herkunft ist. Sowohl die asiatischen als auch die untersuchten europäischen und südamerikanischen Stämme waren genetisch divers und es konnte kein regional dominierender ST identifiziert werden.

Aufgrund des hohen Anteils asiatischer Stämme (88%) wird die Verteilung der europäischen und südamerikanischen Isolate nach der Analyse weiterer nicht-asiatischer Stämme fortgeführt.

Die Stämme aus Sri Lanka zeigten eine hohe genetische Diversität und es wurde kein regional dominierender ST identifiziert. Dennoch konnten Stämme mit gleichem ST in verschiedenen

Farmen oder Regionen isoliert werden.

Da zum Zeitpunkt der Untersuchung noch keine Daten von anderen Isolaten aus Sri Lanka veröffentlicht waren und Umweltstämme eine hohe genetische Diversität aufweisen, wurden erwartungsgemäß größtenteils Stämme mit neuem ST isoliert (94%).

Die nahe Verwandtschaft von (potentiell) pathogenen Umweltisolaten und Stämmen, die aus klinischen Proben stammten, wurde gezeigt. Auch die eBURST-Analyse bestätigt diese verwandtschaftliche Nähe und betont so das hohe pathogene Potential von Isolat aus Umwelt- und Lebensmittelproben.

