

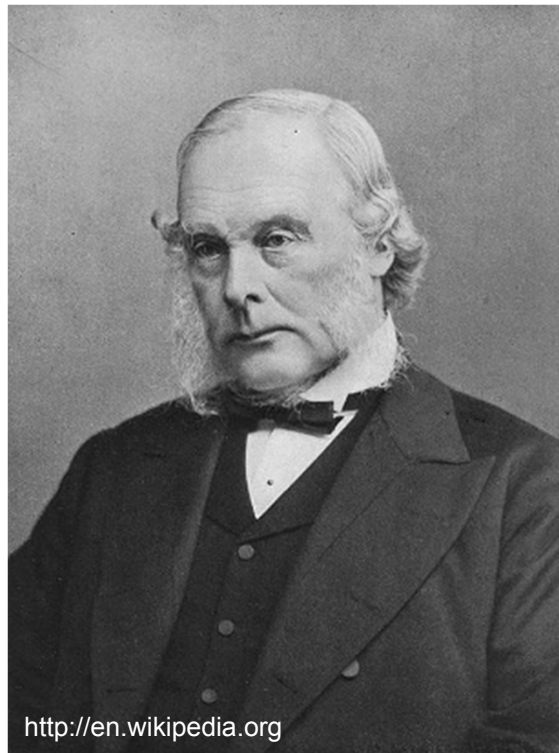
Schwerpunkt Listerien

Dr. Sven Halbedel
FG11 Bakterielle darmpathogene Erreger und *Legionella*
Robert Koch-Institut

Berlin, 31.05.2016

Sir Joseph Lister (1827-1912)

- „father of modern antiseptics“
- schottischer Chirurg
- Carbol-Lösung (=Phenol) zur Desinfektion



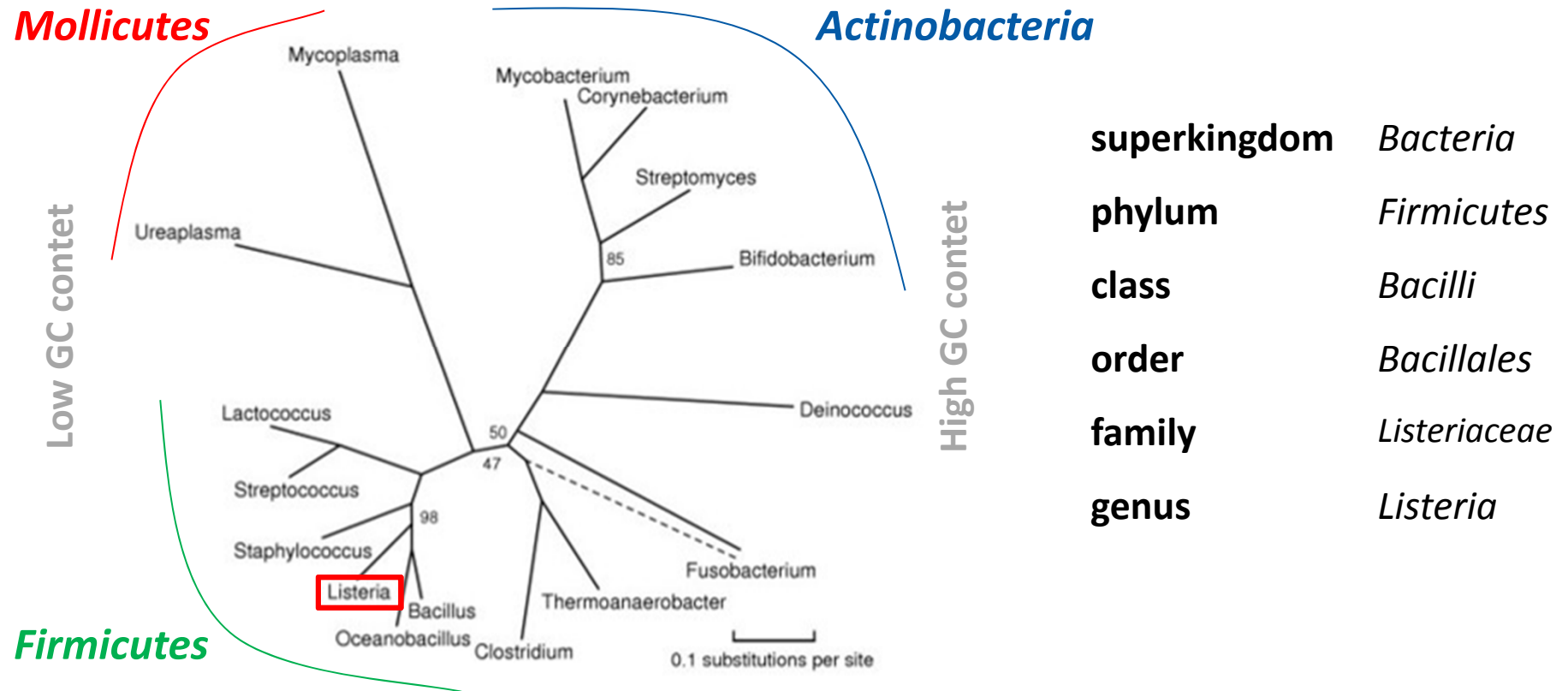
- seit 1879 (Joseph Lawrence, USA)



Von der Entdeckung zur Genomsequenz

- **1926** Murray: „*Bacterium monocytogenes*“ aus Kaninchen mit Monozytose
- **1927** Pirie: „*Listerella hepatolytica*“ aus Wüstenrennmäusen
- **1929** erste Fallbeschreibung im Menschen
- **1940** Umbenennung in „*Listeria monocytogenes*“
- **1953** erste Fallbeschreibung mit Übertragung durch Lebensmittel (Rohmilch)
- **1980er** Beschreibung erster lebensmittelassoziierte Ausbrüche
- **1991** Entdeckung von Internalin A (Gaillard *et al.*, Cell. 65:1127-41)
- **2001** Genomsequenz EGD-e (Glaser *et al.*, Science 294:849-52)
- **2016** Genomsequenzen von 715 Isolaten (NCBI), davon 70 geschlossene

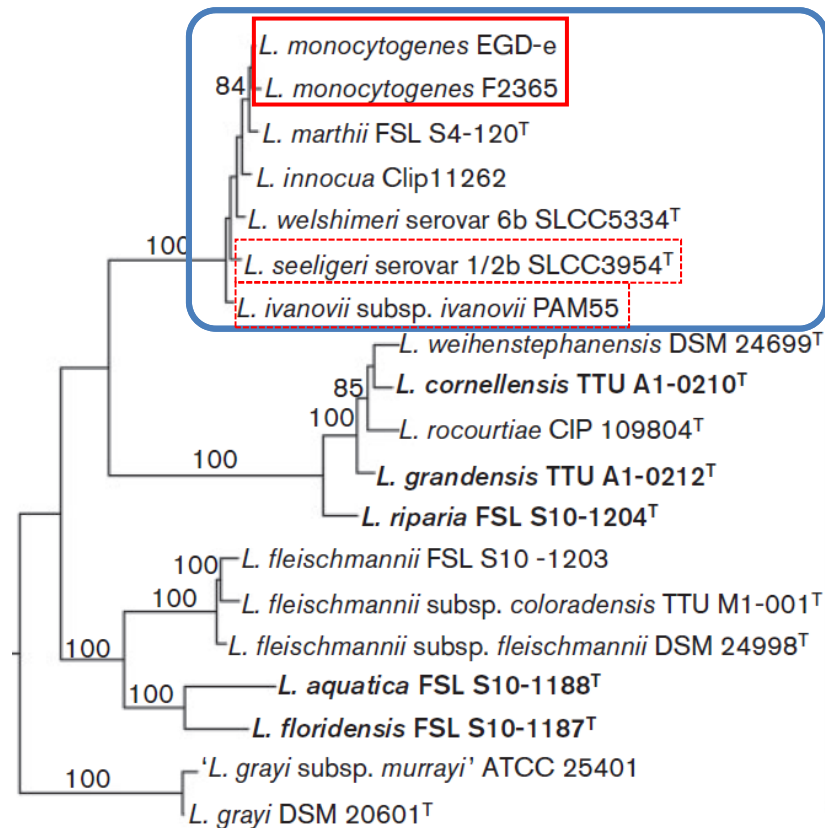
Phylogenetische Einordnung



BMC Evolutionary Biology 2005, 5:34

Genus *Listeria*

Listeria sensu stricto



Inl J Syst Evol Microbiol (2014), 64, 1882–1889

Listeria-Arten

- 2011 8 Spezies
- 2014 15 Spezies
- 2016 17 Spezies

Humanpathogen

- *L. monocytogenes*
- *L. ivanovii* (vereinzelt)
- *L. seeligeri* (vereinzelt)

Lmo Sub-Differenzierung in 13 Serovare:

- Lineage I: 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, 7
- Lineage II: 1/2a (EGD-e), 1/2c, 3a, 3c
- Lineage III: 4a und 4c

Pathogenität

95% aller Isolate



Listeria monocytogenes

■ Morphologie

stäbchenförmig (ca. 0,4 x 1,5 µm)
 fakultativ anaerob (TCA unvollständig)
 peritrich begeißelt
 keine Sporen, Biofilmbildner

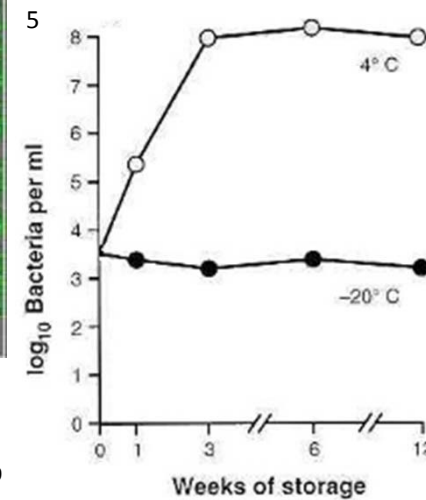
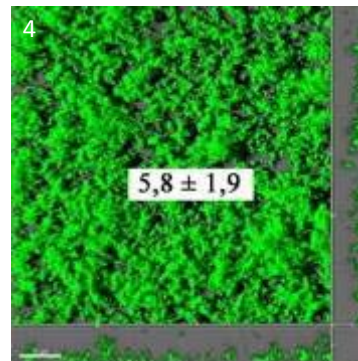
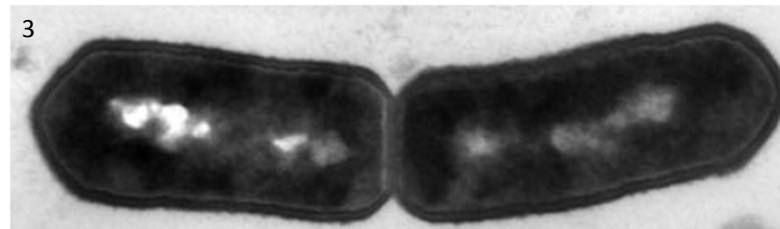
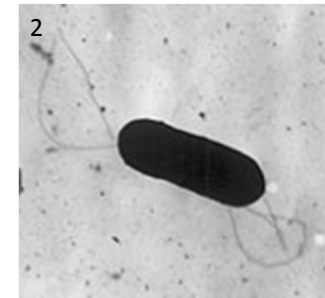
■ Ubiquitäre Verbreitung

Boden, Detritus, Pflanzen
 in vielen Säugetierarten,
 in Abwässern, Silagen
 5-10% asymptomatische Träger

■ Widerstandsfähigkeit

pH: 4.4-9.4
 T: -0,4-45°C
 NaCl: bis 10%

■ Genom: ~2,9 Mbp, ~ 2900 Gene



1 – HZI/M. Rohde

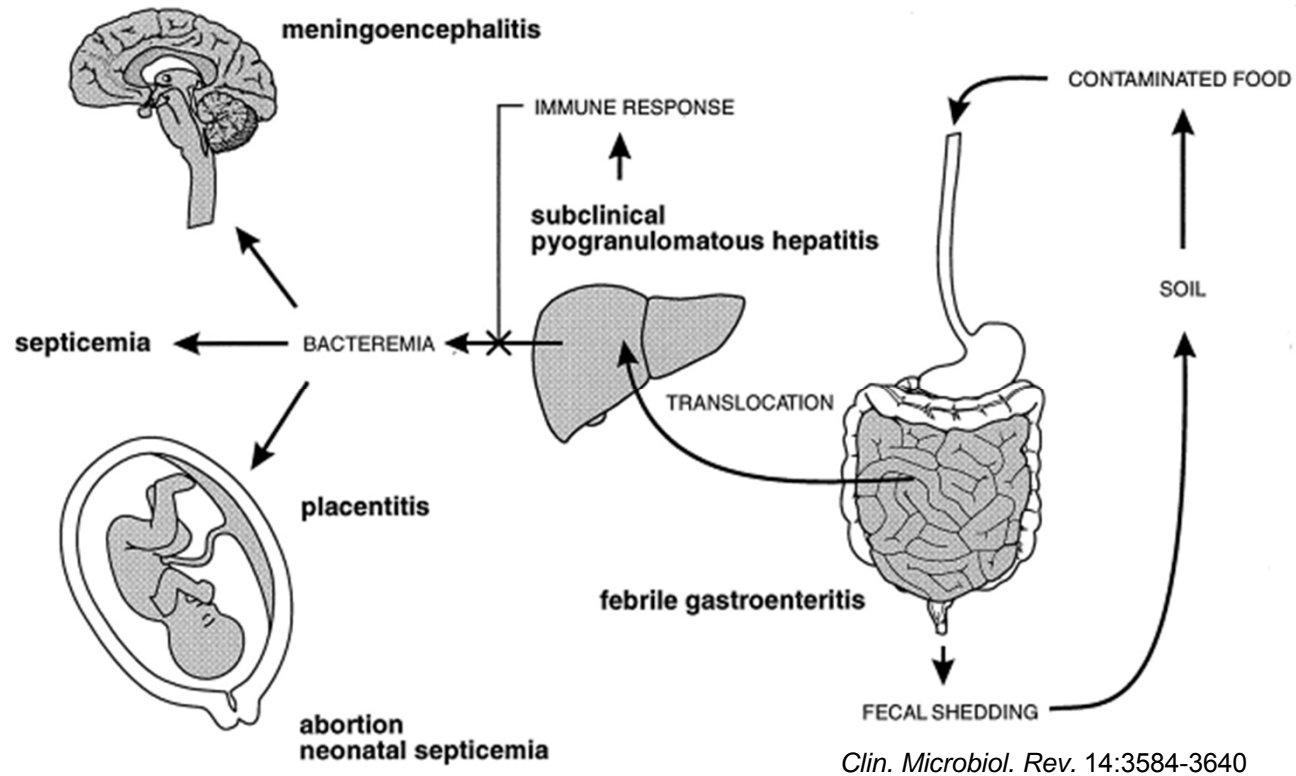
2 – www.wikipedia.de

3 – Mol Micro 83:821-839

4 – Appl Environ Microbiol 76:2271-2279

5 – <http://textbookofbacteriology.net>

Listeriose ist eine lebensmittelbedingte Erkrankung



Risikolebensmittel

- Rohwurstprodukte (Rohschinken, Salami, Teewurst)
- Rohmilchprodukte (Camembert, Brie)
- roher oder Räucherfisch (Inhibition ab 15 µg/ml Phenol)
- Salate, Rohkost, *Ready to eat*-Produkte

Listeriose Manifestationen und Symptome

▪ Schwangerschaftsassozierte Listeriose

Infektionsweg transplazentar, peri- oder postpartal

Mutter grippeähnlich oder symptomfrei

Kind Frühgeburt, Totgeburt

▪ neonatale Listeriose

Symptome

- Sepsis
- Granulomatosis infantiseptica
- multiple granulomatöse Organmanifestation mit Multiorganversagen
- Atemnotsyndrom
- Hautläsionen
- Meningitis

Listeriose Manifestationen und Symptome

▪ Nicht-Schwangerschaftsassozierte Listeriose

Infektionsweg Lebensmittel

▪ Immunkompetente Patienten

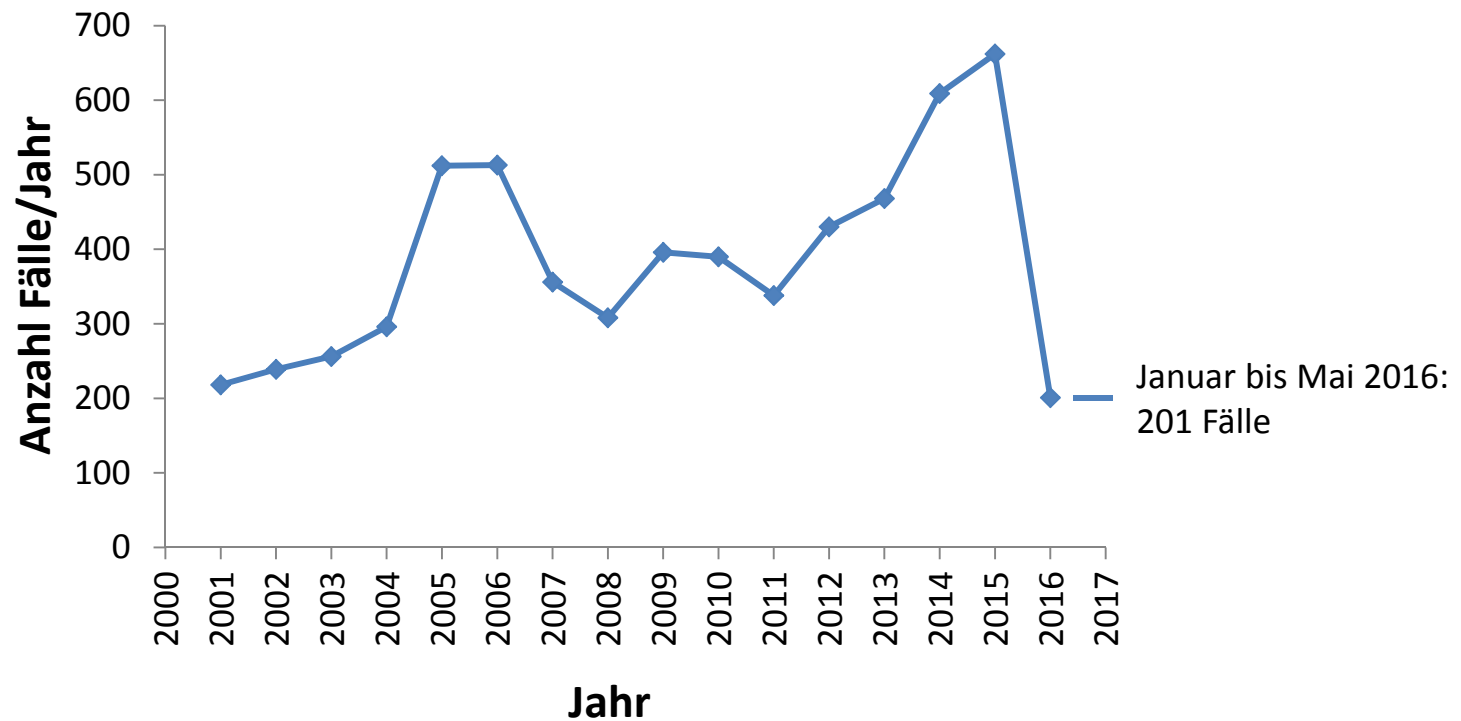
- uncharakteristische fieberhafte Reaktion
- oder
- selbstlimitierende Gastroenteritis

▪ Immundefiziente Patienten

- Lebensalter >60 Jahre
- chronische Grunderkrankungen
- Glukokortikoid-Therapie
- Transplantierte

- Grippeähnliche Symptome (Fieber/Muskelschmerzen)
- Gastroenteritis
- Sepsis
- Eitrige Meningitis
- Enzephalitis

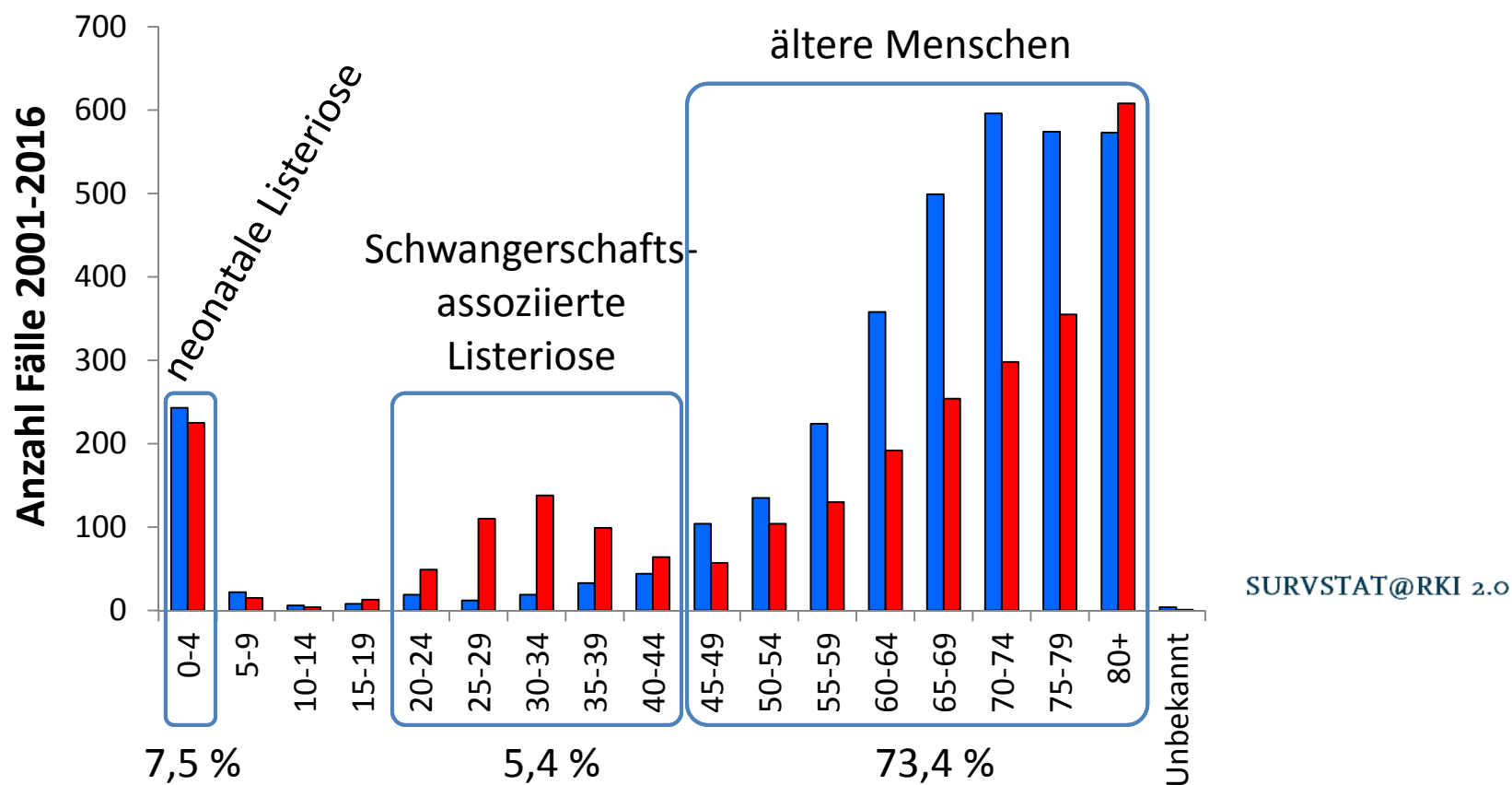
Listeriose Fallzahlen Deutschland



- 200-600 Fälle pro Jahr (D)
- jährliche Inzidenz ~0,4 Fälle/100.000
- sporadisch 1/3
- Ausbruch (n≥2) 2/3



Listeriose Fallzahlen Deutschland



- Listeriose ist überwiegend eine Erkrankung des älteren Menschen

Fallzahlen vs. Letalität

Land	Zeitraum	Todesfälle
USA	2009-2011	18%
China	1964-2010	26%
Dänemark	1994-2003	21%
Spanien	2011	20-30%
<i>BioMed Research International 2014 doi:10.1155/2014/358051</i>		
Deutschland	2001-2005	9%

Euro Surveill. 2006;11(6):85-8.

- **Die Letalität der Listeriose ist (auch in Deutschland) sehr hoch!**

Letalität gastrointestinaler Infektionen

Melddaten Deutschland 2004-2008

Spezies	Fälle	Todesfälle	Letalität
<i>L. monocytogenes</i>	1992	188	9,44%
<i>Salmonella</i> spp.	260207	225	0,09%
STEC*	5240	20	0,38%
<i>Campylobacter</i> spp.	300895	15	<0,01%
Norovirus	617437	192	0,03%

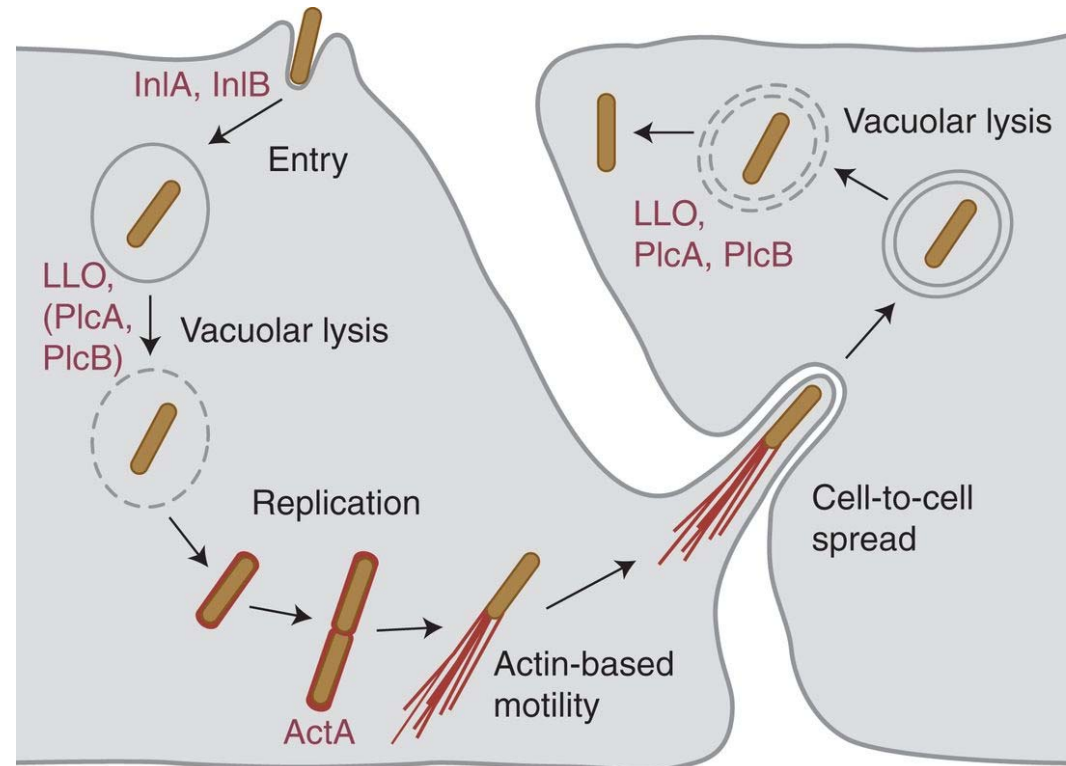
* Shiga-Toxin produzierende *E. coli*

Epidemiol. Infect. (2013), 141, 961–968.

- ***L. monocytogenes* ist einer der tödlichsten gastrointestinalen Infektionserreger!**

L. monocytogenes ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium

Invasion durch induzierte Phagozytose in nicht-phagozytische Zellen

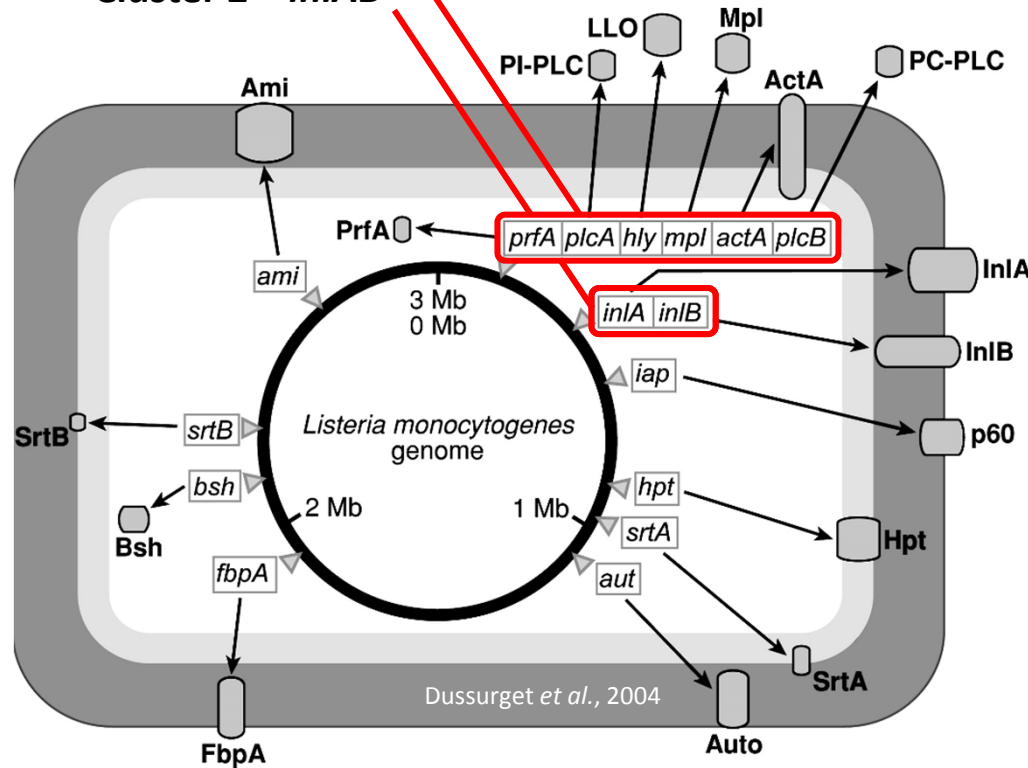


Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Nov 1;2(11). doi:pii: a010009

- Überwindet alle 3 Körperschranken**
- Intestinalschranke (Darm→Blut)
 - Blut-Hirn-Schranke
 - Blut-Plazenta-Schranke

Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes*

- Cluster 1 = LIPI-1
- Cluster 2 = *inIAB*



Adhäsion

Ami	Autolysin
DltA	LTA-Synthese
FpbA	Fibrinogen-Bdg.
Flagellum	Motilität

Invasion

<i>InIAB</i>	Internaline
Auto	Autolysin
lap (p60)	Autolysin
Vip	GP96 Attachment
SrtAB	Sortasen

Lyse der Vakuole

<i>PlcAB</i>	Phospholipasen
<i>Llo</i>	Listeriolysin
<i>Mpl</i>	Metalloprotease

Intrazelluläres Überleben

Hpt	Hexose-P-Transporter
-----	----------------------

Cell-to-cell spread

<i>ActA</i>	Actin-nukleierendes Protein
-------------	-----------------------------

Regulation u. a.

PrfA, *PgdA*, *InIC*, *InIGHEJ*, *PrsA*, *Bsh*...

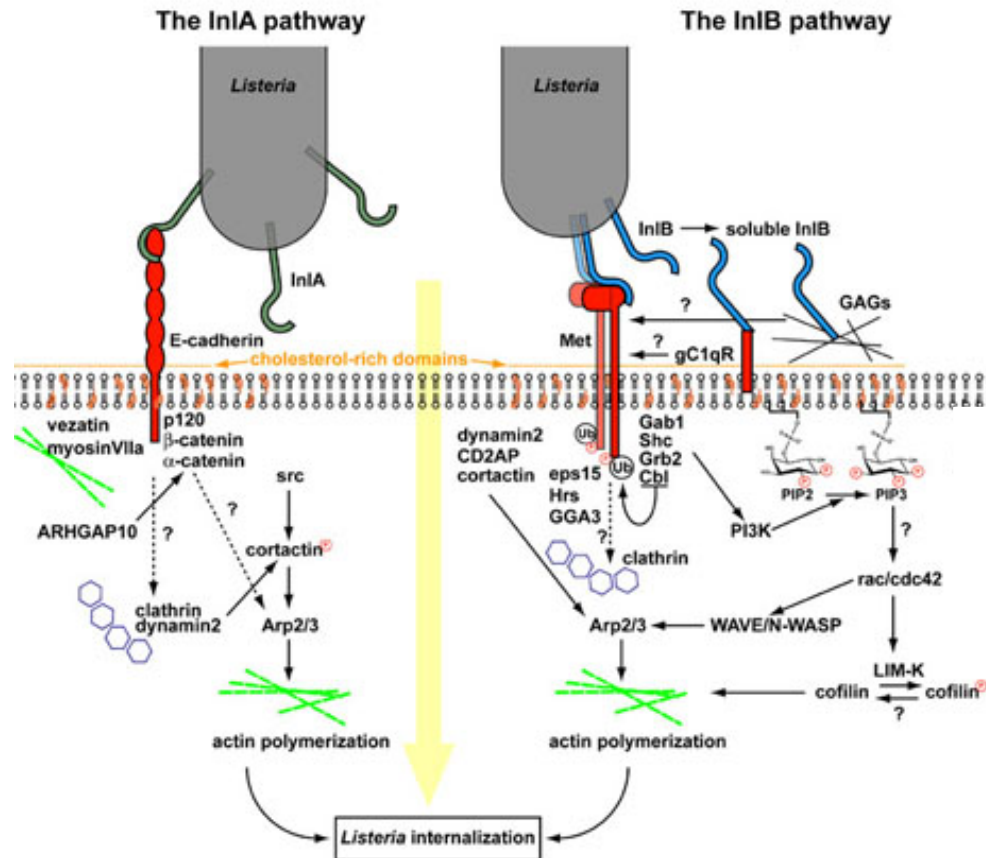
Invasion in humane Wirtszellen erfordert zwei Internaline

Internalin A

bindet

E-Cadherin

- Hepatozyten
- Dendriten
- Chorionzotten der Plazenta



<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-00002n-014>

Internalin B

bindet

Met

- alle humanen Zellen

- InIA-E-Cadherin Interaktion erklärt Gewebstropismus von *L. monocytogenes*

Lyse der Vakuole

▪ Listeriolysin

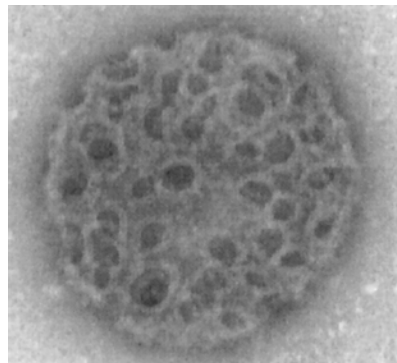
- sekretiertes Hämolyysin
- non-enzymatic, pore-forming toxin
- erleichtert Zutritt von PlcAB
- enger pH-Bereich (pH4.5...**5.5**...6.5)



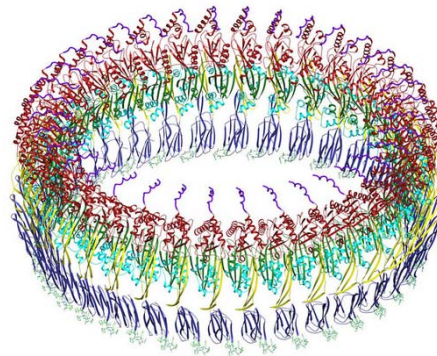
Aktivierung im Phagosom (pH5.9)



Inaktivierung im Wirtszellzytoplasma (pH 7.5)



Clin. Microbiol. Rev. 14:584



Nat Commun. 2014, 5:3690.

▪ Phospholipase PlcA

- **spezifisch** für Phosphatidylinositol

▪ Phospholipase PlcB

- **breites Substratspektrum:**
Phosphatidylcholin, -ethanolamin, -serin

- **Listeriolysin, PlcA und PlcB tragen synergistisch zum Austritt aus primärer und sekundärer Vakuole bei**

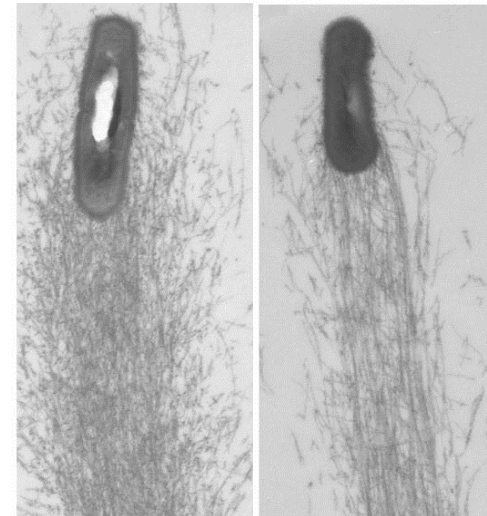
Intrazelluläre Motilität

L. monocytogenes/Xenopus-Zellextrakt/Alexa-Fluor 488-Aktin

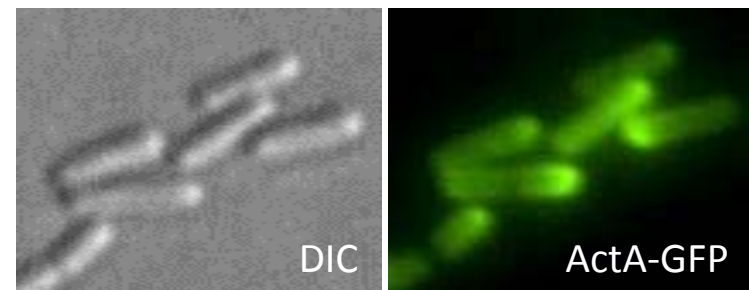


Biophys J. 2005. 89:2146–2158.

Aktin-Tails

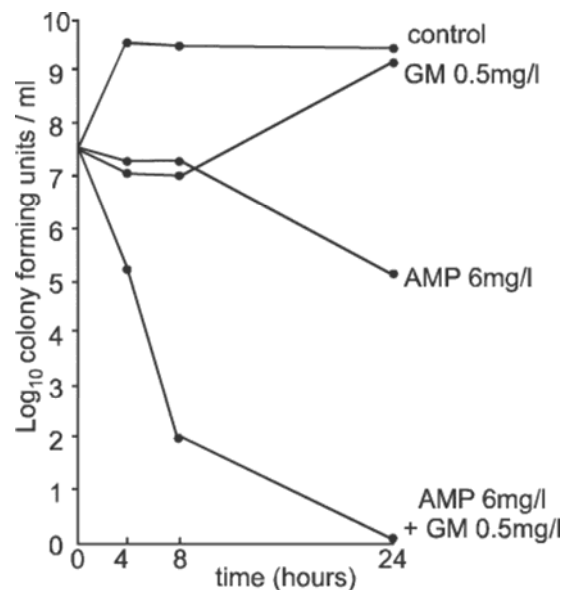


J Cell Biol 165:233-242



Antibiotische Therapie der Listeriose

- **β-Laktame**
 - Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin → Bakteriostase (*in vitro*)
 - in Kombination mit Gentamicin → Bakteriolyse (*in vitro!*)
 - Resistenzen gegen β-Laktame spielen praktisch keine Rolle (*Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2015. 13:395-403)



FEMS Immunol Med Microbiol 2003. 35, 203–205.

- ***Lmo* ist natürlich resistent gegen**
 - Cephalosporine (**Listerienlücke!**, Ursache unklar)
 - Nalidixinsäure (*gyrA* Mutation)
 - Fosfomycin (FosX fosfomycin resistance protein)

Antibiotische Therapie der Listeriose

- **Problematisch**
 - **Penicilline wirken nicht bakteriolytisch**
 - **Wirkung kombinierter Gentamicin-Gabe fraglich**
 - **intrazelluläre Stadien erschweren Antibiotikazugriff**



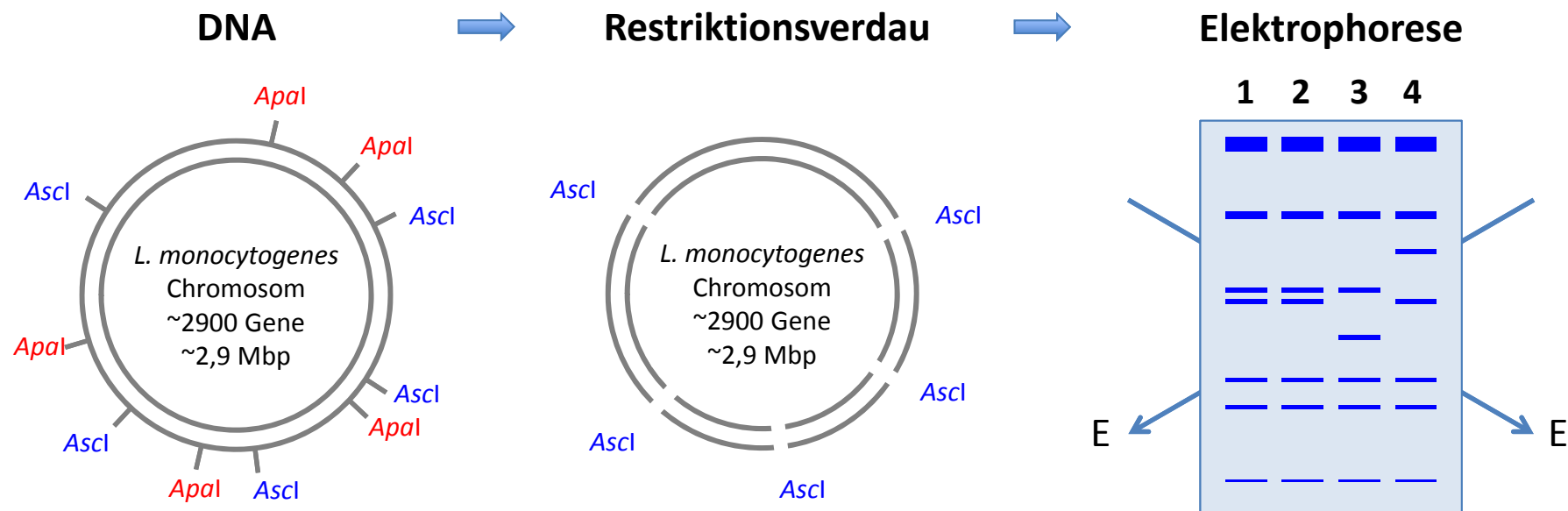
Aktuelle Ansatzpunkte für verbessertes Listeriose-Management

- **1. Molekulare Surveillance zur Ausbruchsaufklärung**
 - epidemiologische Überwachung von humanen *L. monocytogenes*-Isolaten
 - Feintypisierung durch next generation sequencing/core genome MLST
 - Aufklärung von Infektketten

- **2. Genetische Faktoren der β -Laktam-Toleranz von *L. monocytogenes***
 - Aufklärung von Mechanismen der Zellwandbiosynthese in *L. monocytogenes*
 - Identifikation von Genen, welche β -Laktam-Toleranz verursachen
 - Identifikation alternativer Drugtargets

Pulsfeld-Elektrophorese – bisheriger Standard für Feintypisierungen

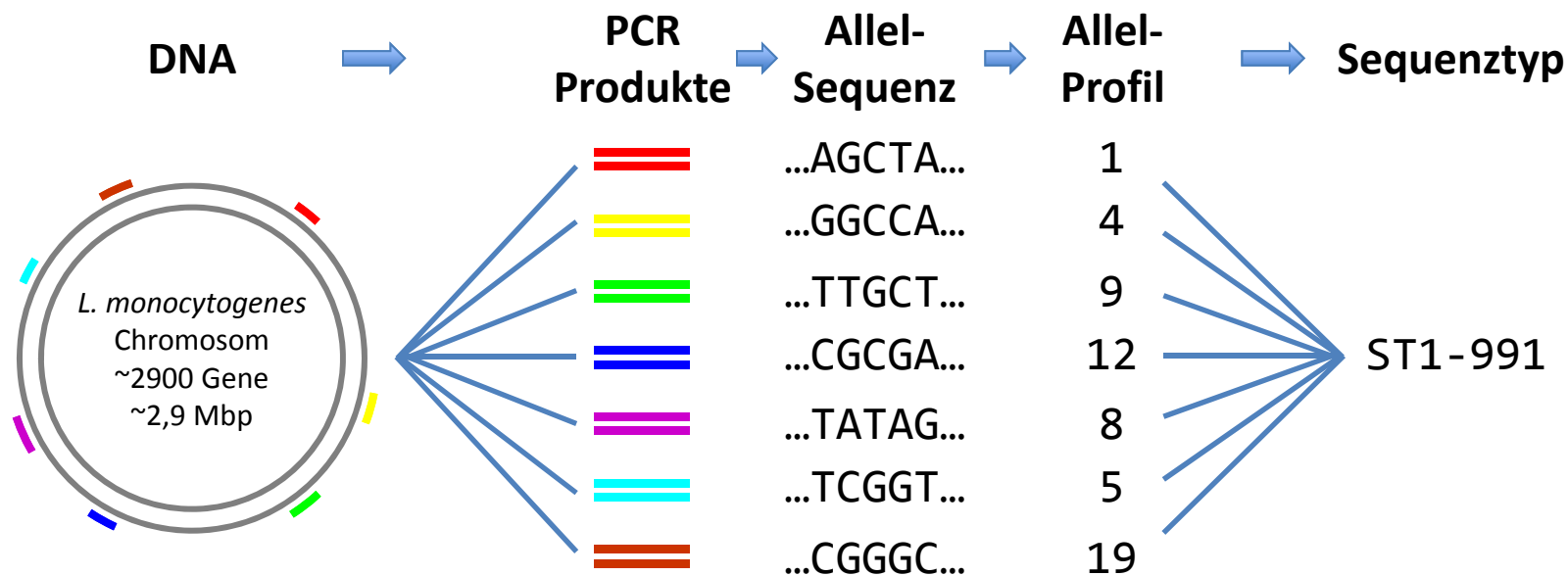
- Selten schneidende Enzyme liefern Fragmente mit hohem Molekulargewicht
- Auftrennung im alternierenden elektrischen Feld



- spezifische Fingerprints zur Unterscheidung von Isolaten unterhalb der Serotypenebene

cgMLST zur verbesserten Feintypisierung von *L. monocytogenes*

- **core genome (cg)** Σ aller Gene, welche in allen Isolaten einer Spezies vorkommen
- **MLST** multi locus sequence typing

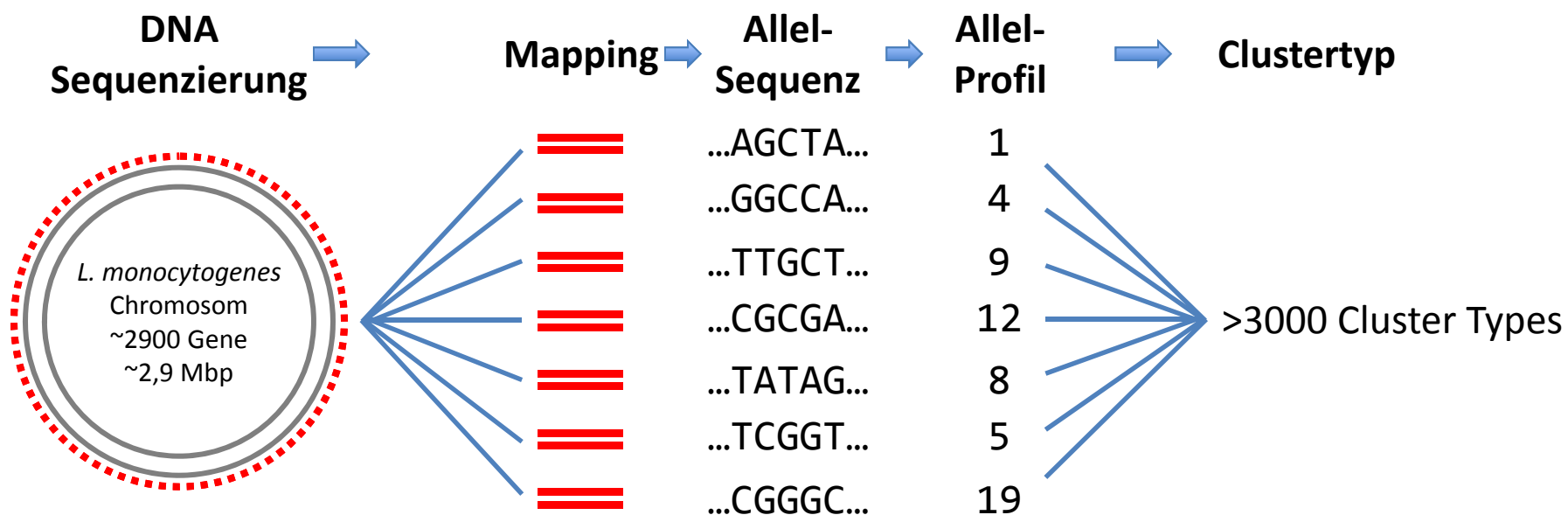


- **herkömmliche MLST:** 7 Gene (*abcZ, bglA, cat, dapE, dat, ldh, lhkA*) → Genomabdeckung 0,25%



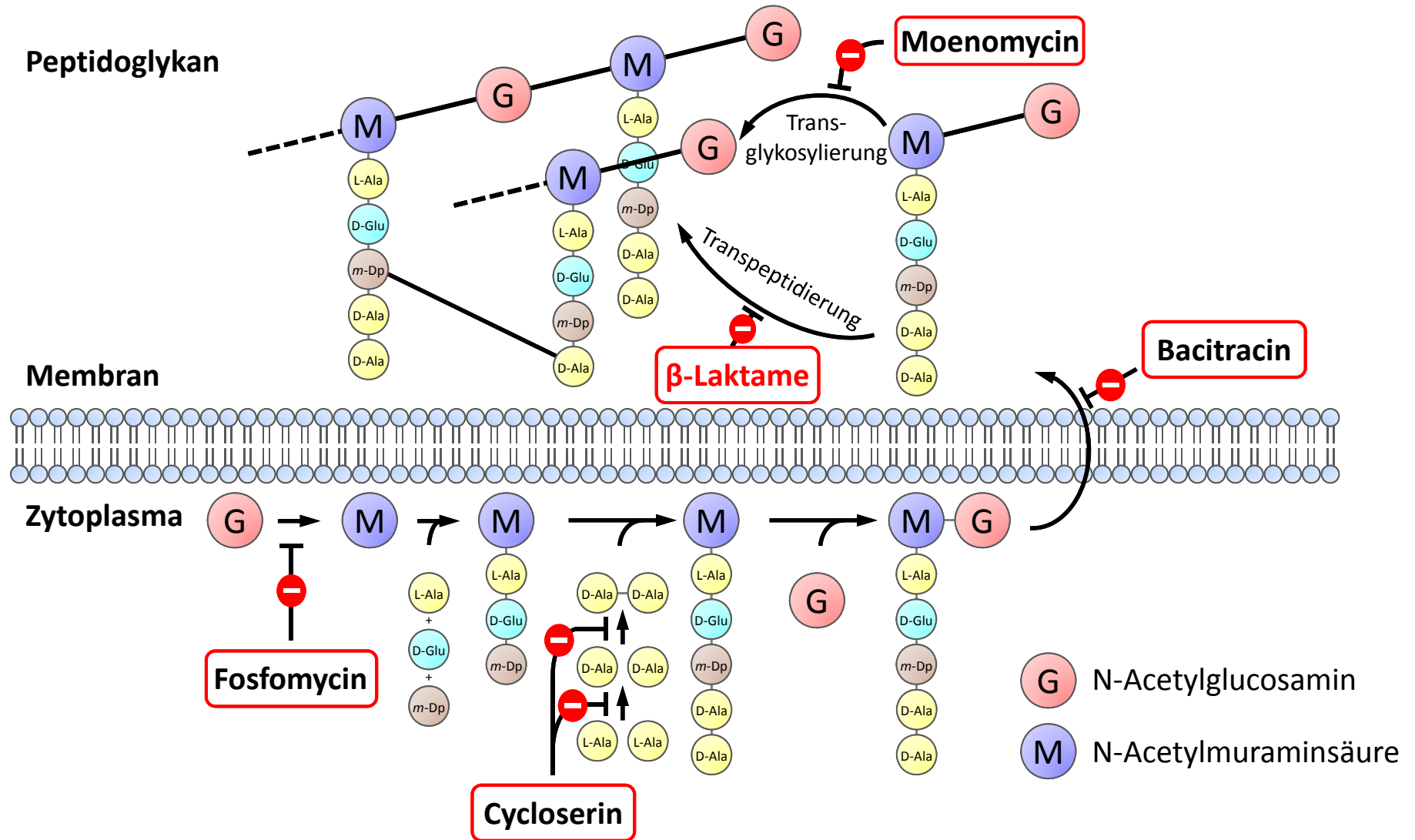
core genome MLST zur Feintypisierung von *L. monocytogenes*

- **core genome MLST**
 - 1701 von 2900 Genen → Genomabdeckung ~58% (*J Clin Microbiol.* 2015. 53:2869-2876)
 - 240-fach höhere Auflösung



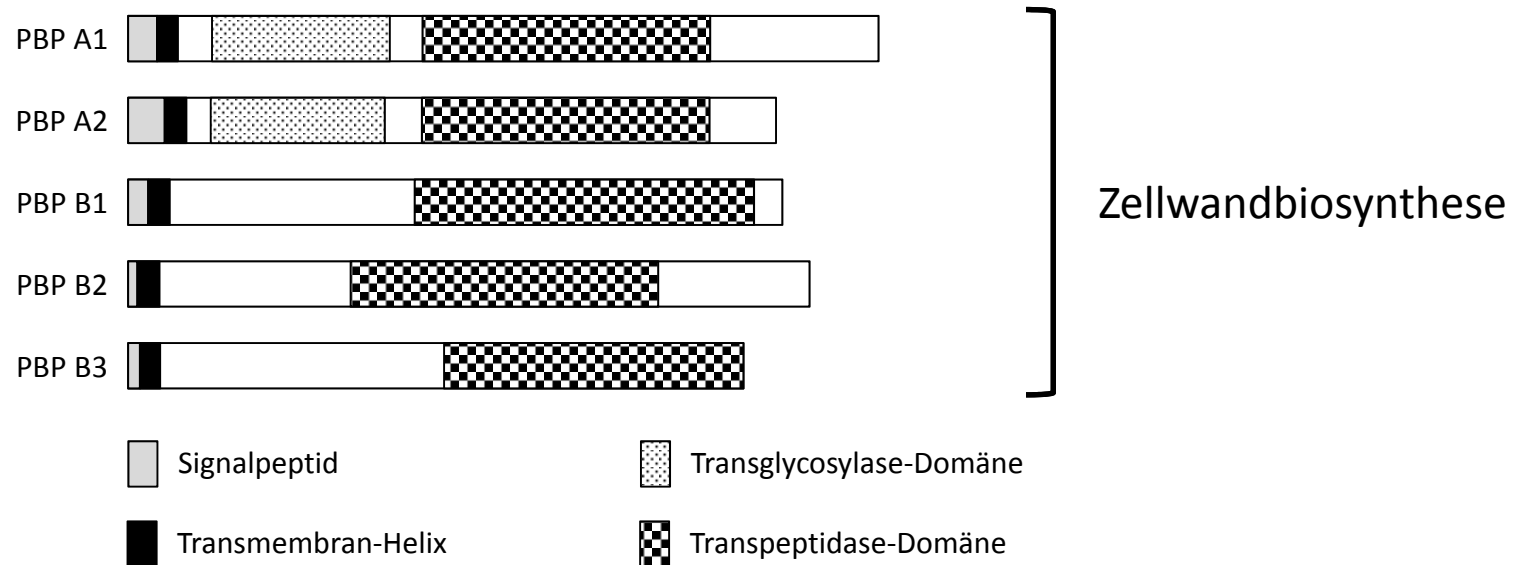
SeqSphere+ (Ridom, Münster)

Bakterielle Zellwandbiosynthese als Antibiotika-Target



Penicillin-bindende Proteine (PBPs) von *L. monocytogenes*

- **High molecular weight penicillin binding proteins (HMW PBPs)**

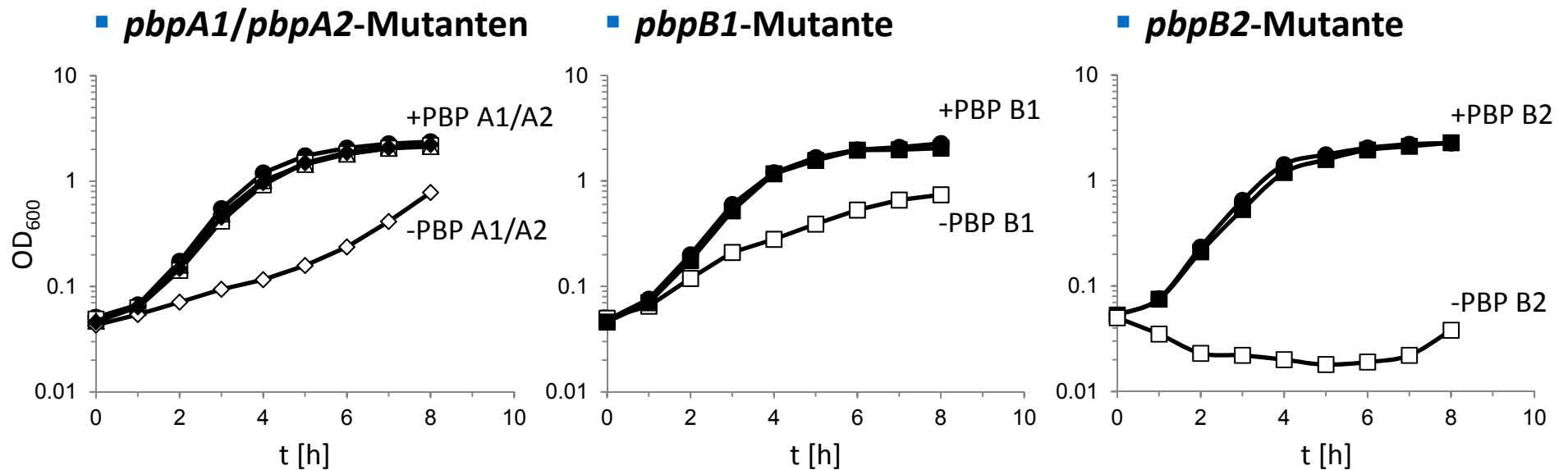


- **Low molecular weight penicillin binding proteins**

- Carboxypeptidasen Entfernung terminaler D-Alanine
- Endopeptidasen Spaltung der Peptid-Crosslinks

Zellwandabbau

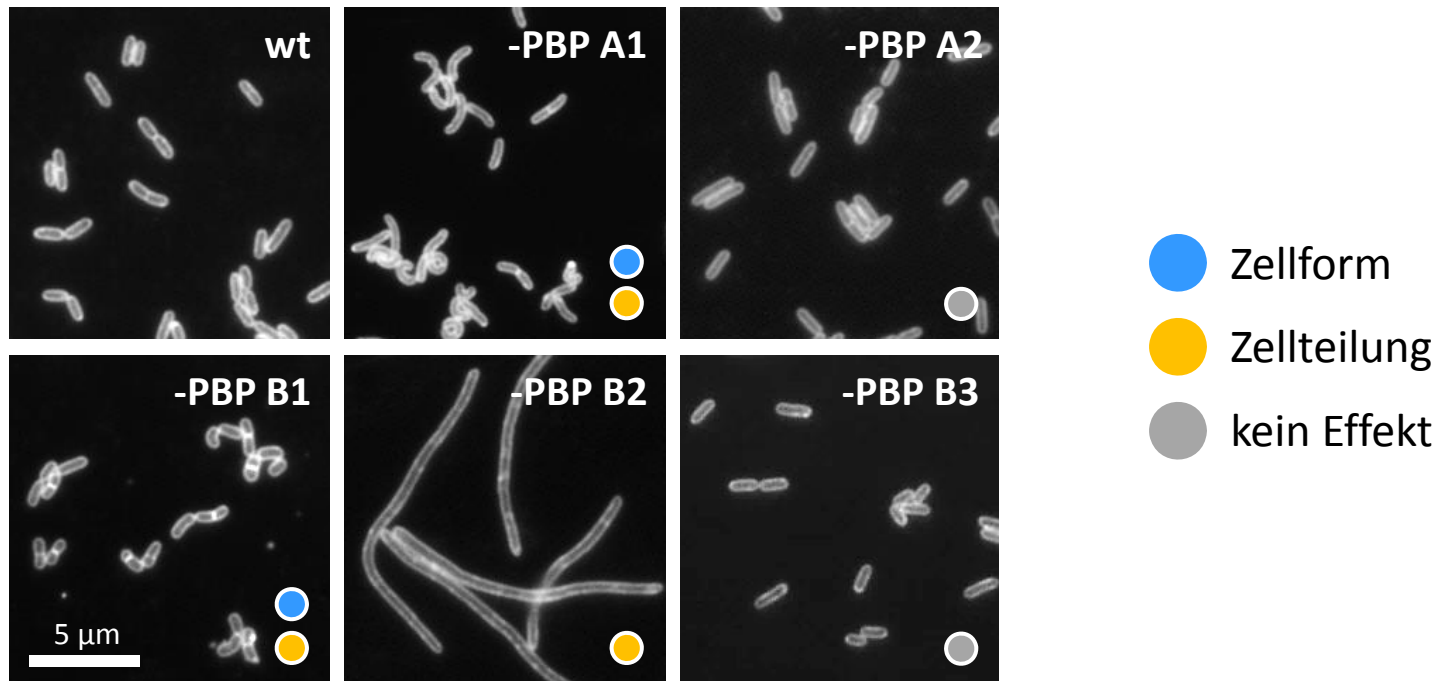
Wachstumsexperimente mit HMW PBP-Mutanten



Rismondo *et al.*, 2015. Mol. Microbiol.

■ → HMW PBPs sind notwendig für das Wachstum von *L. monocytogenes*

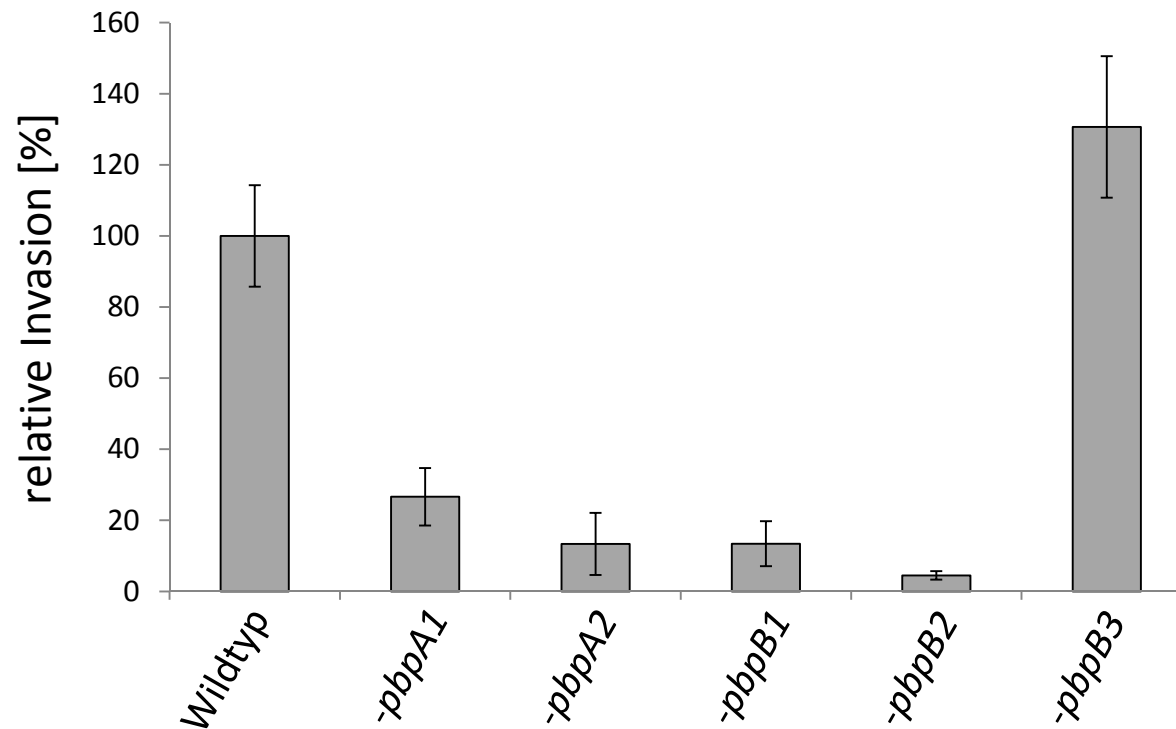
Morphologie von HMW PBP-Mutanten



Rismondo *et al.*, 2015. Mol. Microbiol.

- → **HMW PBPs sind notwendig für Form und Teilung von *L. monocytogenes*-Zellen**

Infektionsexperimente mit HMW PBP-Mutanten

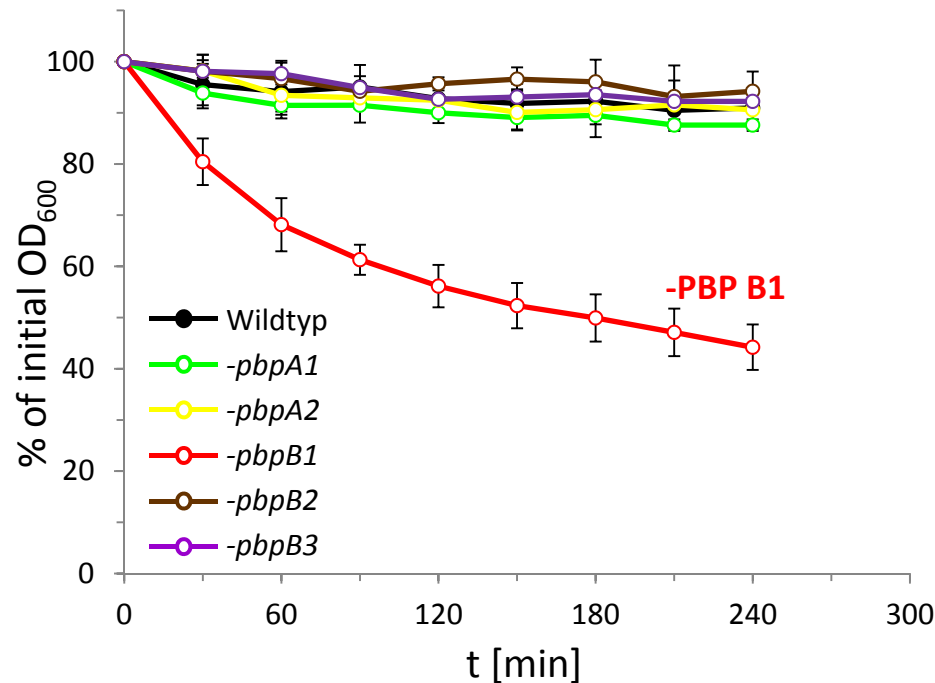


Rismondo *et al.*, 2015. Mol. Microbiol.

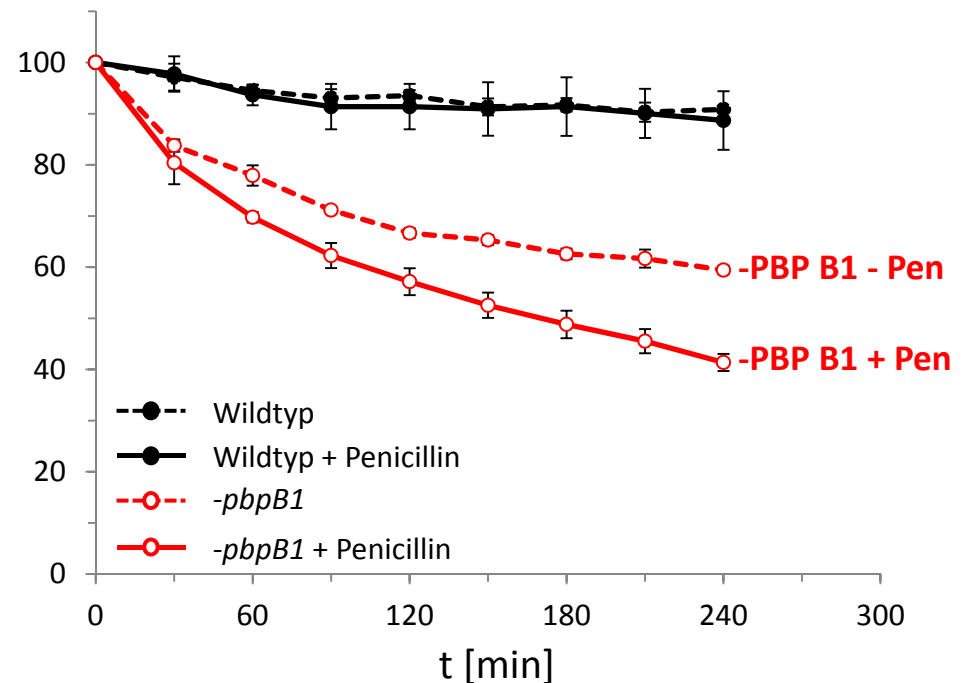
- → **HMW PBPs sind notwendig für die Invasion in humane Zellen**

Induziert Penicillin Bakteriolyse in HMW PBP-Mutanten?

■ Bakteriolyse durch Penicillin



■ Kontrolle: Bakteriolyse ± Penicillin



■ → PBP B1 als Angriffsort für bakteriolytisch wirkende Therapeutika

Listeria monocytogenes

- **ubiquitär verbreiteter Saprophyt + fakultativ pathogen**
- **resistent gegenüber Lebensmittelkonservierungsstrategien (Salz, Kälte, pH)**
- **geringe Fallzahlen aber hohe Letalität**
- **intrazelluläre Lebensweise in humanen Zellen**
- **optimierte Ausbruchsauflärung durch Genomsequenzierung**
- **Therapie optimierbar (durch bessere Targets + bessere Wirkstoffe)**