

Streszczenie

Listeria monocytogenes wywołuje u ludzi chorobę listeriozę. Bakterie te dostają się do organizmu człowieka zazwyczaj za pośrednictwem zanieczyszczonej nimi żywności. Listerioza charakteryzuje się najwyższym odsetkiem hospitalizacji oraz śmiertelności spośród wszystkich odzwierzęcych chorób przenoszonych drogą pokarmową. Od 2009 roku obserwuje się istotny statystycznie trend wzrostowy potwierdzonych przypadków listeriozy u ludzi w Unii Europejskiej. Ze względu na zdolność *L. monocytogenes* do przeżycia a także namnażania się w szerokim zakresie różnorodnych warunków, bakterie te mogą przetrwać przez długi czas w środowisku produkcji żywności i w związku z tym zanieczyszczać produkty żywnościowe na różnych etapach ich wytwarzania.

Celem pracy była charakterystyka molekularna *L. monocytogenes* należących do serogrup IIa i IVb, pochodzących z żywności i środowiska jej produkcji w Polsce. Został on zrealizowany poprzez analizę sekwencji genomowych, w tym określenie profili molekularnych oraz ocenę występowania u badanych izolatów markerów chorobotwórczości, genów odpowiedzialnych za adaptację bakterii do niekorzystnych warunków środowiska czy oporność na czynniki przeciwbakteryjne. Ponadto określono wzajemne podobieństwo genomowe między badanymi *L. monocytogenes* a innymi szczepami pochodzącymi z żywności lub od ludzi w Polsce i na świecie. Dodatkowo określono wrażliwość badanych *L. monocytogenes* na wybrane środki przeciwbakteryjne.

W badaniach analizie poddano 283 izolaty *L. monocytogenes*, z których 146 należało do serogrupy IIa, a pozostałe 137 do serogrupy IVb. Izolaty te pochodziły z surowego mięsa, wędlin oraz środowiska produkcji żywności w Polsce. Badane *L. monocytogenes* poddano typowaniu molekularnemu przy zastosowaniu techniki MLST. Wśród izolatów należących do serogrupy IIa wyodrębniono 18 kompleksów klonalnych (CC), a większość z nich należała do jednego z trzech CC: CC155, CC121 oraz CC8. Natomiast *L. monocytogenes* reprezentujące serogrupę IVb zaklasyfikowano jedynie do trzech CC, z czego ponad połowa (65,7%) należała do CC2.

W kolejnym etapie badań, 100 *L. monocytogenes* serogrupy IIa i 91 zaklasyfikowanych do IVb poddano sekwencjonowaniu (WGS). Wyboru dokonano pod kątem źródła, miejsca i czasu izolacji, a także wyników ich klasyfikacji do CC, w celu zapewnienia jak największej reprezentatywności grupy. Analiza WGS pozwoliła na dalsze różnicowanie badanych *L. monocytogenes*. W wyniku zastosowania schematu cgMLST izolaty należące do serogrupy IIa zaklasyfikowano do 6 podlinii klonalnych (SL), a następnie wyodrębniono wśród nich 60

różnych typów cgMLST (CT). Najliczniej reprezentowane były CT1170 oraz CT750 a *L. monocytogenes* należące do tych CT pochodziły najczęściej z wędlin i środowiska produkcji żywności. Wśród izolatów reprezentujących serogrupę IVb wyodrębniono trzy SL oraz 32 profile CT, z których najbardziej rozpowszechnionym był CT375, izolowany zwykle z mięsa surowego.

Sekwencje genomowe *L. monocytogenes* poddano także analizie w kierunku obecności genów wirulencji, oporności na czynniki przeciwbakteryjne i markery odpowiedzi na warunki stresowe. Wszystkie badane izolaty, zarówno należące do serogrupy IIa jak i IVb, posiadały wyspy patogenności LIPI-1. Natomiast *L. monocytogenes* zaklasyfikowane do serogrupy IIa, nie wykazywały obecności LIPI-2, LIPI-3 i LIPI-4. Dodatkowo 31,0% z nich charakteryzowała się obecnością mutacji PMSC w genie *inlA*, która powoduje skrócenie długości białka InlA i w konsekwencji ma wpływ na wzmożoną zdolność tworzenia biofilmu, powodując jednocześnie osłabienie potencjału wirulencji. Z kolei, wszystkie izolaty reprezentujące serogrupę IVb posiadały pełną sekwencję genu *inlA*, a u niektórych z nich stwierdzono obecność wyspy patogenności LIPI-3, co może sugerować zwiększony potencjał wirulencji takich *L. monocytogenes*. Ponadto u niektórych izolatów należących do serogrupy IIa zidentyfikowano geny warunkujące oporność na środki dezynfekcyjne, w tym kasetę genów *bcrABC* oraz *Tn6188_qac(ermC)*, czy adaptację do niekorzystnych warunków środowiskowych takich jak wyspa stresu SSI-1. U badanych *L. monocytogenes* serogrupy IVb stwierdzono również występowanie genów związanych z adaptacją do warunków stresowych, takich jak *cadA1* czy LGI-2. Wszystkie badane izolaty, niezależnie od przynależności do serogrupy, charakteryzowały się obecnością takich genów jak *sigB* i *mdrM*. Natomiast sekwencję genu *comK*, zidentyfikowano we wszystkich izolatach należących do serogrupy IVb oraz 29 ze 100 badanych *L. monocytogenes* reprezentujących serogrupę IIa. Występowanie wymienionych wyżej markerów, zwłaszcza w połączeniu z wykryciem wielu elementów genetycznych takich jak plazmidy i profagi w badanych sekwencjach, sugeruje, że bakterie te miały wysoką zdolność do adaptacji do niekorzystnych warunków.

W trakcie prowadzonych badań określono także wzajemne podobieństwo *L. monocytogenes* należących do serogrup IIa i IVb i stwierdzono, że niektóre z nich, izolowane w różnym czasie, z różnych miejsc i rodzajów próbek, były bardzo blisko ze sobą spokrewnione. Może to wskazywać na długotrwałe bytowanie tych szczepów w środowisku przetwórstwa żywności. Podobne zależności wykazano pomiędzy niektórymi izolatami z obecnych badań, a innymi szczepami *L. monocytogenes* pochodzącymi z żywności, czy środowiska jej produkcji, a także od pacjentów z listeriozą w Polsce. Stanowi to przesłankę to

stwierdzenia, że izolaty takie nie tylko długotrwale bytują w środowisku i powodują zanieczyszczenie żywności, ale także mogą być przyczyną zachorowania u ludzi.

Jednym z elementów prowadzonych badań było także określenie wrażliwości na substancje przeciwbakteryjne *L. monocytogenes* należących do serogrup IIa i IVb. Wszystkie badane izolaty były wrażliwe na ampicylinę, gatifloksacynę, gentamycynę, penicylinę, chinuprystynę, streptomycynę, trimetoprim i wankomycynę. Natomiast najczęściej stwierdzono oporność na ceftriakson, oksacylinę i klindamycynę. Zaobserwowano także, że większość *L. monocytogenes* należących do serogrupy IVb była niewrażliwa na ceftriakson i oksacylinę w porównaniu do izolatów reprezentujących serogrupę IIa.

Przeprowadzone badania pozwoliły na ocenę różnorodności, określenie podobieństwa genetycznego oraz identyfikację markerów patogenności i adaptację do niekorzystnych warunków środowiskowych izolatów *L. monocytogenes* należących do serogrup IIa i IVb, pochodzących z żywności oraz środowiska jej produkcji w Polsce. Uzyskane wyniki wskazują, że żywność i środowisko jej produkcji mogą być potencjalnym źródłem patogennych dla ludzi szczepów *L. monocytogenes*, które poprzez swoje zdolności adaptacyjne mogą przetrwać niekorzystne warunki i długotrwale bytować w środowisku.

Summary

Listeria monocytogenes causes in humans a disease listeriosis. These bacteria usually enter the human body through contaminated food. Listeriosis is characterized by the highest percentage of hospitalization and mortality among other foodborne zoonotic diseases. Since 2009, it has been a statistically significant increasing trend in confirmed number of listeriosis cases in humans in the European Union. Due to the ability of *L. monocytogenes* to survive and also to multiply under a wide variety of conditions, these bacteria can survive for long periods in the food processing environments and therefore, contaminate food products at various stages of their production.

The aim of the study was the molecular characterization of *L. monocytogenes* belonging to serogroups IIa and IVb, isolated from food and food production environments in Poland. It was carried out through the analysis of genomic sequences, including the determination of molecular profiles and the assessment of the presence of pathogenicity markers in the isolates tested, genes responsible for the adaptation of bacteria to the adverse environmental conditions or resistance to antimicrobials. In addition, the genomic similarity between *L. monocytogenes* within studied serogroups with other strains from food and humans in Poland and in the world was determined. Additionally, the sensitivity of the studied *L. monocytogenes* to selected antibacterial agents was determined.

In this study, 283 *L. monocytogenes* isolates were analyzed, of which 146 belonged to serogroup IIa and the remaining 137 were classified to serogroup IVb. The isolates were originated from meat, ready to eat meat products and food production environments in Poland. *L. monocytogenes* tested were subjected to molecular typing using the MLST technique. Among isolates belonging to serogroup IIa, 18 clonal complexes (CC) were identified, but most of them belonged to one of the three CC: CC155, CC121 and CC8. In contrast, *L. monocytogenes* representing serogroup IVb was classified into only 3 CC, the majority of which (65,7%) belonged to CC2.

In the next stage of the study, 100 *L. monocytogenes* isolates of serogroup IIa and 91 strains classified to IVb, were sequencing (WGS). The selection was made in terms of the source, place and time of isolation, as well as the results of their classification to CC, in order to ensure the greatest possible representativeness of the group. The WGS analysis allowed further differentiation of the studied *L. monocytogenes*. As the result of the using cgMLST scheme, isolates belonging to serogroup IIa were classified into 6 clonal sublines (SL), and then among them 60 different types of cgMLST (CT) were distinguished. The most numerous were

CT1170 and CT750. *L. monocytogenes* belonging to these CTs came mainly from ready to eat meat products and food production environments. Among the isolates belonging to serogroup IVb, three SL and 32 CT profiles were identified with the most common CT375, isolated usually from raw meat.

The genomic sequences of *L. monocytogenes* were also analyzed for the presence of virulence genes, resistance to antibacterial markers or markers responsible for responses to stress conditions. All tested isolates, belonging to serogroups IIa and IVb, had the pathogenicity island LIPI-1. On the other hand, *L. monocytogenes* classified to serogroup IIa have not shown the presence of LIPI-2, LIPI-3 and LIPI-4. In addition, 31.0% of them were characterized by the presence of the PMSC mutation in the *inlA* gene, which shortens the length of the InlA protein, and consequently, affects the increased ability to create biofilm, while reducing the virulence potential. On the other hand, all isolates representing serogroup IVb had the complete sequence of the *inlA* gene, and some of them had the LIPI-3 pathogenicity island, which may suggest an increased virulence potential of such *L. monocytogenes*. In addition, some isolates belonging to serogroup IIa possessed genes that determine resistance to disinfectants, including the *bcrABC* and *Tn6188_qac (ermC)* gene cassettes, or adaptation to adverse environmental conditions, such as the SSI-1 stress island. Furthermore, genes related to adaptation to stress conditions, such as *cadA1* or *LGI-2*, were also found in the studied *L. monocytogenes* of serogroup IVb. All tested isolates, regardless of their serogroup, were characterized by the presence of genes as *sigB*, *mdrM*. Additionally the *comK* gene sequence was identified in all isolates belonging to serogroup IVb and in 29 of the 100 tested strain representing serogroup IIa. The presence of the above mentioned markers, especially in connection with the detection of many genetic elements such as plasmids and prophages in the investigated sequences, suggests that these bacteria had a high adaptability to adverse conditions.

During the current study, the similarity of *L. monocytogenes* belonging to serogroups IIa and IVb was also determined and it was found that some of them isolated at different times, from different places and types of samples, were very closely related to each other. This may indicate a long-term existence of these strains in the food processing environments. A similar relationships have been demonstrated between some isolates from the current study and other strains of *L. monocytogenes* from food or food production environments, as well as from patients with listeriosis in Poland. This is a circumstance which allows for the statement that such isolates not only persist in the environments for a long time and cause food contamination, but also can cause disease in humans.

One of the elements of the current investigations was also determination of sensitivity *L. monocytogenes* belonging to serogroup IIa and IVb to antibacterial markers. All tested isolates were sensitive to ampicillin, gatifloxacin, gentamicin, penicillin, quinupristin, streptomycin, trimethoprim, and vancomycin. However, resistance to ceftriaxone, oxacillin, and clindamycin was the most common. It was also observed that the majority of *L. monocytogenes* belonging to serogroup IVb was not sensitive to ceftriaxone and oxacillin, compared to isolates replying to serogroup IIa.

The performed studies allowed for the assessment of diversity, determination of genetic similarity and identification of pathogenic markers and adaptation to adverse condition of *L. monocytogenes* isolates belonging to serogroups IIa and IVb from food and food production environments in Poland. The obtained results indicate that food and its production environment may be a potential source of pathogenic for humans *L. monocytogenes* strains which, due to their adaptive abilities, may survive adverse conditions and persist in the environment for a long time.