

Streszczenie

Listeria monocytogenes występuje powszechnie w środowisku, może być również obecna w żywności i środowisku jej produkcji. Z tego względu, szczególnie zagrożenie dla zdrowia konsumentów stanowią produkty gotowe do spożycia zanieczyszczone tymi drobnoustrojami. Konieczność hospitalizacji niemal wszystkich pacjentów, u których zdiagnozowano listeriozę oraz wysoki odsetek przypadków śmiertelnych sprawia, że choroba wywoływana przez *L. monocytogenes* jest poważnym problemem zdrowia publicznego. Drobnoustroje te powodują także wymierne straty ekonomiczne związane z wycofywaniem z obrotu zanieczyszczonej żywności lub zamykaniem zakładów produkcyjnych. Chorobotwórczość *L. monocytogenes*, a także ich zdolność do przetrwania w niekorzystnych warunkach środowiskowych oraz oporność na środki przeciwbakteryjne, podlegają ciągłym zmianom. Dlatego konieczne jest stałe monitorowanie tych cech oraz ustalenie, w jaki sposób patogeny rozprzestrzeniają się w łańcuchu wytwarzania żywności. Przyczyni się to do opracowania skuteczniejszych metod zabezpieczania produktów spożywczych przed zanieczyszczeniem bakteryjnym a w konsekwencji poprawi bezpieczeństwo konsumentów.

Celem przedstawionych badań była charakterystyka izolatów *L. monocytogenes* wyosobnionych z żywności pochodzenia zwierzęcego gotowej do spożycia oraz ze środowiska produkcji żywności. Analiza ta będzie mieć znaczenie w ocenie zagrożenia dla zdrowia konsumentów związanego z występowaniem tych bakterii w żywności.

W badaniach wykorzystano 150 izolatów *L. monocytogenes*, zaklasyfikowanych, ze względu na źródło ich izolacji, do trzech grup: z produktów poddanych obróbce termicznej (wędliny), z żywności niepoddanej obróbce termicznej (produkty surowe) oraz ze środowiska produkcji żywności (środowisko produkcji). Pierwszym etapem badań było wstępne różnicowanie genotypowe izolatów i zaklasyfikowanie ich do odpowiednich serogrup molekularnych oraz charakterystyka szczepów, uwzględniająca ich oporność na substancje przeciwbakteryjne i obecność genów kodujących czynniki wirulencji. Wykazano, że badane *L. monocytogenes* należały najczęściej do serogrupy IIa (48,0%), następnie IIc (25,3%), IVb (16,0%) oraz IIb (10,7%). Ponadto stwierdzono różnice statystycznie istotnie w występowaniu serogrup molekularnych badanych izolatów w zależności od źródła ich pochodzenia.

Izolaty serogrupy IIa występowały częściej w produktach surowych, natomiast szczepy serogrupy IIb w środowisku produkcji żywności, a izolaty serogrupy IVb były najczęściej obecne w wędlinach. Ocena wrażliwości *L. monocytogenes* na substancje przeciwbakteryjne wykazała ich oporność na daptomycynę (93,3% izolatów), oksacylinę (53,0% izolatów) oraz ceftriakson (35,3% izolatów). Badania dotyczące wykrywania obecności genów chorobotwórczości techniką PCR, w tym genów kodujących wytwarzanie internalin oraz markerów genetycznych wchodzących w skład wyspy patogenności LIPI-1, nie wskazały znaczących różnic w występowaniu tych czynników w poszczególnych grupach izolatów *L. monocytogenes*. Stwierdzono, że geny internalin były obecne we wszystkich badanych izolatach natomiast markery genetyczne LIPI-1 wykazano niemal we wszystkich szczepach (od 96 do 100% izolatów w zależności od badanego genu).

Różnicowanie molekularne *L. monocytogenes* przy pomocy metod PFGE, MLST oraz MVLST wykazało znaczne zróżnicowanie genotypowe badanej grupy *L. monocytogenes*. Obserwowano, że niektóre izolaty wyisobnione z żywności i ze środowiska wytwarzania żywności należały do tych samych typów pulsacyjnych (PFGE), sekwencyjnych (MLST) i wirulencji (MVLST). Odnotowano także przypadki identyfikacji tych samych typów na przestrzeni kilku lat w różnych województwach. Wyniki te mogą wskazywać na rozpowszechnienie i trwałość niektórych klonów *L. monocytogenes*, zasiedlających zakłady produkujące żywność. Ponadto stwierdzono, że metoda MVLST charakteryzowała się statystycznie istotnie niższym potencjałem różnicującym niż techniki PFGE i MLST.

W ostatnim etapie badań wykonano sekwencjonowanie całych genomów *L. monocytogenes*, należących do serogrup IIb i IVb. Używając metody cgMLST analizowane 40 izolatów przyporządkowano do 21 typów cgMLST (CT). Wykazano, że szczepy pochodzące z żywności, należące do pięciu typów cgMLST: CT1385, CT322, CT4382, CT461 oraz CT443, zostały wcześniej stwierdzone wśród *L. monocytogenes* odpowiedzialnych za przypadki listeriozy ludzi w Polsce, a także w Danii, Francji, Holandii i Belgii. Analiza sekwencji genomowych, wykonana w czasie obecnych badań wykazała także, że u 10 izolatów należących do serogrupy IIb zidentyfikowano mutację PMSC w genie *inlA*, powodującą powstanie wcześniejszego kodonu STOP. Dodatkowo u dwóch z tych izolatów zidentyfikowano nowy typ mutacji, wynikający z delecji adeniny w pozycji 2209. Zaobserwowano ponadto obecność u 8 badanych szczepów delecji w genie *inlB*. Tego typu mutacje mogą

wpływać na zmniejszenie zjadliwości *L. monocytogenes* dla ludzi. Z drugiej strony, wśród *L. monocytogenes* należących do serogrupy IIb, zaobserwowano występowanie izolatów posiadających gen oporności na aminoglikozydy oraz geny kodujące niewrażliwość bakterii na chlorki benzalkoniowe.

Uzyskane w obecnych badaniach wyniki pozwoliły na wykazanie różnic pomiędzy *L. monocytogenes* występującymi w żywności surowej gotowej do spożycia, wędlinach poddanych obróbce termicznej i w środowisku produkcji żywności. Ponadto przedstawione badania wskazują, że *L. monocytogenes* obecne w żywności mogą być potencjalnym zagrożeniem dla zdrowia konsumentów.

Abstract

Listeria monocytogenes is commonly present in the environment and it may also be found in food and food production environment. Therefore, ready-to-eat products contaminated with these microorganisms pose a particular threat to consumer health. The need for the hospitalization of almost all patients who have been diagnosed with listeriosis and the high mortality rate make the disease caused by *L. monocytogenes* a serious public health problem. These microorganisms also causes measurable economic losses related to the withdrawal of contaminated food or closing down production plants. Pathogenicity of *L. monocytogenes* and its ability to survive in adverse conditions as well as resistance to antibacterial agents are changing. Therefore, it is necessary to constantly monitor these traits and determine how the pathogen spreads in the food production chain. This will contribute to the development of more effective methods of protecting food products against bacterial contamination and, consequently, improve consumer safety.

The aim of the presented study is to characterize *L. monocytogenes* isolates obtained from ready-to-eat meat products and food production environment. This analysis will allow the assessment of health risk associated with the presence of these bacteria in food.

In this study 150 isolates of *L. monocytogenes*, were classified into three groups according to their isolation source: from products of animal origin subjected to heat treatment (cold meat), from food not heat treated (raw products) and from the food production environment. In the first stage of the study, the preliminary differentiation of isolates, based on their assignment to appropriate serogroups, as well as strain characteristics taking into account their resistance to antibacterial agents and the presence of virulence genes, were performed. It was shown that the tested *L. monocytogenes* belonged most often to serogroup IIa (48.0%), then IIc (25.3%), IVb (16.0%), and IIb (10.7%). In addition, statistically significant differences in the occurrence of serogroups in groups of the isolates classified according to their source were found. Isolates belonging to serogroup IIa were statistically more common found in raw products, isolates of serogroup IIb - in the food production environment whereas isolates of serogroup IVb in cold meats. The study on the sensitivity of *L. monocytogenes* to antibacterial substances showed their resistance to daptomycin (93.3% isolates), oxacillin (53.0% isolates), and ceftriaxone (35.3% isolates). Studies on the detection of virulence genes with the PCR method, including genes encoding internalins and genotypic markers in the LIPI-1 pathogenicity island, did not indicate significant differences in the occurrence of these genes in particular groups of *L. monocytogenes* isolates according to strains' origin. It was found that the genes

encoding internalins were present in all isolates while the LIPI-1 genes were found in almost all strains (from 96% to 100% isolates depending on the gene tested).

Molecular differentiation of *L. monocytogenes* using PFGE, MLST and MVLST methods showed high genotypic differences of the examined group of *L. monocytogenes*. It was observed that some isolates obtained from food and from food production environment were classified into the same pulsotypes (PFGE), sequence types (MLST) or virulence types (MVLST). Moreover, the cases of identification of the same types over several years in different voivodeships were revealed. These results may indicate the prevalence and persistence of some *L. monocytogenes* clones colonizing food production plants. In addition, it was found that the MVLST method had statistically significantly lower differentiating potential than the PFGE or MLST techniques.

Finally, the whole genomes of *L. monocytogenes* belonging to serogroups IIb and IVb were sequenced. Using the cgMLST method, the 40 isolates tested were assigned to 21 cgMLST types (CT). It was shown that *L. monocytogenes* of food-origin, belonging to five cgMLST types: CT1385, CT322, CT4382, CT461, and CT443, were previously found among strains responsible for human listeriosis cases in Poland, but also in Denmark, France, the Netherlands, and Belgium. The sequence analysis performed in the current study also showed that 10 isolates belonging to serogroup IIb possessed the PMSC mutation in the *inlA* gene, resulting in the formation of the earlier STOP codon. Additionally, in two of these isolates a new type of mutation resulting from the deletion of adenine at the position 2209 was identified. Furthermore, the presence of deletion in the *inlB* gene was observed in 8 of the examined strains. These types of mutations may reduce the virulence of *L. monocytogenes* for humans. On the other hand, among the isolates belonging to serogroup IIb, the presence of isolates with the aminoglycoside resistance gene and genes responsible for resistance to benzalkonium chloride were observed.

The results obtained in the present study allowed to show differences between *L. monocytogenes* found in raw meat food, in heat treated meat products and in food production environment. In addition, the studies showed that *L. monocytogenes* present in food may be a potential risk for the consumers' health.