STRESZCZENIE

Potencjał infekcyjny oraz wrażliwość na substancje przeciwdrobnoustrojowe szczepów *Listeria* spp. wyizolowanych z ryb

Zanieczyszczenie żywności bakteriami z rodzaju *Listeria* stanowi istotny problem w zakresie bezpieczeństwa żywności oraz zdrowia publicznego, szczególnie w kontekście produktów spożywczych nie poddawanych obróbce termicznej. Wśród *Listeria* spp. szczególne znaczenie przypisuje się *Listerii monocytogenes*, będącej czynnikiem etiologicznym listeriozy – choroby odzwierzęcej charakteryzującej się wysokim wskaźnikiem hospitalizacji i śmiertelności w grupach podwyższonego ryzyka. Ryby i produkty rybne mogą stanowić istotne ogniwo transmisji *Listeria* spp. w łańcuchu żywnościowym, ponieważ środowisko wodne sprzyja ich utrzymywaniu się i rozprzestrzenianiu. Jednocześnie, coraz większe obawy budzi zjawisko oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe obserwowane wśród bakterii, również *Listeria* spp., które może prowadzić do ograniczenia skuteczności terapii zakażeń oraz sprzyjać szerzeniu się genów oporności pomiędzy drobnoustrojami.

Dane dotyczące występowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, potencjału wirulencji oraz właściwości cytotoksycznych bakterii *Listeria* spp. izolowanych z surowych ryb dostępnych na rynku polskim pozostają ograniczone. Celem przeprowadzonych badań była kompleksowa charakterystyka izolatów *Listeria* spp. pozyskanych z surowych ryb pochodzących z różnych środowisk wodnych na terenie północnej Polski, obejmujących ocenę prewalencji, profili oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe wraz z detekcją genów oporności, genów wirulencji, przynależności do serogrup, zdolności do tworzenia biofilmu oraz aktywności cytotoksycznej. Badania stanowiły próbę oceny zagrożeń związanych z obecnością bakterii *Listeria* w surowych rybach oraz określenia ich wrażliwości na substancje przeciwdrobnoustrojowe, cech mogących wpływać na ich przeżywalność oraz zdolność kolonizacji środowiska produkcji żywności.

Materiał badawczy stanowiło 750 próbek surowych ryb pochodzących z różnych środowisk wodnych północnej Polski, obejmujących zbiorniki słodkowodne z wodą zarówno przepływową jak i stojącą, oraz akwen Morza Bałtyckiego. Izolacje *Listeria* spp. przeprowadzono zgodnie z procedurą opisana w normie PN-EN ISO 11290-1:2017-07: Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* i innych *Listeria* spp. – Część 1: Metoda wykrywania. Uzyskane izolaty poddano identyfikacji gatunkowej, a następnie szczegółowej analizie fenotypowej i molekularnej. Wrażliwość na środki przeciwdrobnoustrojowe oceniono metodą dyfuzyjno –

krążkową z wykorzystaniem panelu substancji przeciwdrobnoustrojowych reprezentujących różne grupy terapeutyczne. Równocześnie przeprowadzono analizę występowania genów związanych z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe z zastosowaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). W celu określenia potencjału patogennego badanych szczepów wykonano analizę obecności genów wirulencji obejmujących kluczowe determinanty związane z inwazją, przeżywaniem wewnątrzkomórkowym oraz rozprzestrzenianiem się bakterii w organizmie gospodarza. W przypadku izolatów *L. monocytogenes* przeprowadzono również genoserotypowanie, umożliwiające określenie przynależności tych szczepów do serogrup mających znaczenie epidemiologiczne. Potencjał do kolonizacji środowiska produkcji żywności określono na podstawie zdolności do wytwarzania biofilmu wykorzystując metody jakościowe i ilościowe wraz z detekcją genu odpowiedzialnego za jego formowanie (*luxS*). Uzupełnieniem badań była ocena potencjału cytotoksycznego izolatów *Listeria* spp. *in vitro* z wykorzystaniem linii komórek eukariotycznych. Takie wielokierunkowe podejście badawcze pozwoliło na kompleksową charakterystykę badanej populacji *Listeria* spp.

W wyniku przeprowadzonych analiz *Listeria* spp. wyizolowano łącznie 104 izolaty, co stanowiło prewalencję na poziomie 13,9%. Wśród badanych szczepów najliczniej reprezentowane były *L. seeligeri* (34,6%) oraz *L. welshimeri* (28,8%), natomiast *L. monocytogenes* i *L. innocua* stanowiły odpowiednio 23,1% i 13,5% wszystkich izolatów. Fenotypowa ocena wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe wykazała powszechną oporność na oksacylinę, obserwowaną we wszystkich badanych izolatach. Bardzo wysoki poziom oporności stwierdzono również wobec cefotaksymu, klindamycyny, cefoksytyny, ryfampicyny oraz trimetoprimu z sulfametoksazolem. Szczególnie niepokojącym wynikiem było wykazanie oporności wielolekowej u niemal wszystkich badanych izolatów, przy czym wszystkie izolaty *L. monocytogenes* spełniały kryteria szczepów wielolekoopornych. Izolaty tego gatunku charakteryzowały się całkowitą opornością na meropenem, cefoksytynę, cefotaksym, ryfampicynę oraz trimetoprim-sulfametoksazol, a ponadto wykazywały wysokie poziomy oporności wobec cyprofloksacyny, klindamycyny, tetracykliny, erytromycyny, benzylopenicyliny i nitrofurantoiny. Analiza molekularna potwierdziła obecność genów związanych z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe, spośród których najczęściej identyfikowano *blaTEM*, a także *ampC* i *ereB*. Uzyskane wyniki wskazują na szerokie rozpowszechnienie cech oporności wśród bakterii *Listeria* związanych ze środowiskiem wodnym oraz produktami rybnymi. Jednocześnie wysoka częstość występowania szczepów wielolekoopornych sugeruje możliwość utrzymywania się presji selekcyjnej w środowisku wodnym oraz potencjalnego udziału tych ekosystemów w rozprzestrzenianiu determinant

oporności. Przeprowadzone badania dostarczyły również danych dotyczących zróżnicowania gatunkowego populacji *Listeria* obecnych w surowych rybach, wskazując, że obok gatunku patogennego istotny udział mają również gatunki tradycyjnie uznawane za niepatogenne lub oportunistyczne.

Analiza potencjału wirulencji wykazała wyraźne różnice pomiędzy badanymi gatunkami. Izolaty *L. monocytogenes* charakteryzowały się obecnością licznych determinant wirulencji związanych z patogenezą zakażeń. Większość szczepów posiadała kompletną Wyspę Patogenności Listerii 1 (LIPI-1), a wszystkie izolaty zaklasyfikowano do serogrupy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c. Wśród szczepów *L. monocytogenes* powszechnie występowały geny *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *inlA*, *inlC* oraz *inlJ*, a geny *prfA* i *actA* identyfikowano u zdecydowanej większości izolatów. Również gen *iap* występował z wysoką częstością. Pozostałe gatunki *Listeria* wykazywały obecność jedynie wybranych genów wirulencji, głównie *plcA* i *mpl*, nie posiadając pełnego zestawu determinant charakterystycznych dla *L. monocytogenes*. Potencjał wirulencji izolatów *L. monocytogenes* został dodatkowo potwierdzony na poziomie fenotypowym, ponieważ aktywność cytotoksyczną wobec czterech eukariotycznych linii komórkowych obserwowano wyłącznie u tego gatunku. Szczepy *L. innocua*, *L. seeligeri* oraz *L. welshimeri* nie wykazywały aktywności cytotoksycznej pomimo obecności pojedynczych genów związanych z wirulencją.

Zdolność do tworzenia biofilmu stanowiła cechę większości badanych izolatów. W badaniach ilościowych ponad dwie trzecie izolatów wykazało zdolność do formowania biofilmu, co wskazuje na szerokie rozpowszechnienie tej właściwości wśród bakterii *Listeria* obecnych w surowych rybach. Analiza genu *luxS* wykazała jego obecność jedynie u części izolatów, jednak nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy obecnością tego genu a zdolnością do tworzenia biofilmu.

Uzyskane wyniki wskazują, że surowe ryby mogą stanowić źródło szczepów *L. monocytogenes* posiadających jednocześnie liczne determinanty wirulencji, wysoki poziom oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz zdolność do utrzymywania się w środowisku dzięki tworzeniu biofilmu. Jednocześnie obecność innych gatunków *Listeria* wyposażonych w wybrane geny związane z wirulencją i zdolnością adaptacji środowiskowej podkreśla potrzebę analizowania całego rodzaju *Listeria* w badaniach dotyczących bezpieczeństwa żywności. Wyniki badań własnych dostarczyły kompleksowej charakterystyki populacji *Listeria* spp. izolowanych z surowych ryb w północnej Polsce, obejmującej ocenę ich występowania, oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, potencjału wirulencji, aktywności cytotoksycznej oraz zdolności do tworzenia biofilmu.