

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



UDK 57.08:616-036.22:579.86:57.088.7:575.111:579(043.3)

Bojan Papić, mag. mikrobiol.

**UGOTAVLJANJE ZNAČILNOSTI IN
EPIDEMIOLOŠKIH POVEZAV MED IZOLATI
BAKTERIJE *Listeria monocytogenes* S
SEKVENCIRANJEM NASLEDNJE GENERACIJE**

Doktorska disertacija

**CHARACTERIZATION AND EPIDEMIOLOGICAL
INVESTIGATION OF *Listeria monocytogenes* ISOLATES
USING NEXT-GENERATION SEQUENCING**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2020

Bojan Papić

Ugotavljanje značilnosti in epidemioloških povezav med izolati bakterije *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentorica: viš. zn. sod. dr. Mateja Pate

Somentorica: zn. sod. dr. Darja Kušar

Izjava o delu: Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršil avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

izr. prof. dr. Irena Zdovc (Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta)

prof. dr. Darja Barlič Maganja (Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju)

prof. dr. Gregor Anderluh (Kemijski inštitut, Ljubljana)

IZVLEČEK

Ključne besede: Molekularna epidemiologija; listerioza – mikrobiologija; *Listeria monocytogenes* – izolacija in čiščenje – genetika; tipizacija na osnovi zaporedij več lokusov – metode, sekvenciranje celotnega genoma – metode

Listerioza je resno obolenje ljudi in živali, ki ga povzroča bakterija *Listeria monocytogenes*. Sekvenciranje celotnih genomov (angl. *whole-genome sequencing*, WGS) postaja metoda izbora za epidemiološki nadzor listerioze, vključno s preiskavami izbruhanov. Tipizacija izolatov ni sestavni del rutinskih preiskav izbruhan listerioze pri živalih, zato genotipi bakterije *L. monocytogenes*, ki so udeleženi pri tovrstnih izbruhih, niso dobro raziskani. V prvem sklopu naloge smo metodo WGS uporabili za podrobno genetsko opredelitev domnevno epidemiološko in mikrobiološko povezanih izolatov. Retrospektivno smo analizirali sedem izbruhan listerioze pri drobnici, ki so jih povzročili kloni ST1 (CC1), ST18 (CC18), ST21 (CC21) in ST184. Z več analitičnimi pristopi, ki temeljijo na metodi WGS, smo potrdili monoklonalno naravo izbruhanov; mikrobiološko povezani izolati so se razlikovali v največ 13 polimorfizmih posameznih nukleotidov v celotnem genomu (angl. *whole-genome single nucleotide polymorphism*, wgSNP), sedmih alelih osrednjega genoma (angl. *core-genome multilocus sequence typing*, cgMLST) in 12 alelih celotnega genoma (angl. *whole-genome multilocus sequence typing*, wgMLST). V primeru izbruha, povzročenega s sevom ST184, smo mikrobiološko povezan sev ugotovili tudi v vodi iz napajalnika in silaži, ki sta bila najverjetnejši vir okužbe za obolele živali. Metoda WGS je imela večjo moč razlikovanja od elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (angl. *pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE), ki dveh izbruhanov, povzročenih s sevoma CC1, ni uspela razlikovati. Retrospektivno smo preiskali tudi izbruh listerioze pri ljudeh, ki ga je povzročil sev ST8 (CC8). Potrdili smo, da je bil izbruh monoklonalne narave, in ovrgli domnevo, da je bil vir okužbe preiskovano živilo oz. z živilom povezano okolje. Nadalje smo metodo WGS uporabili za podrobno preučitev genetske raznolikosti in poti širjenja izolatov bakterije *L. monocytogenes* v kmetijskem okolju. Na kmetiji s primerom živčne oblike listerioze smo hipervirulentni klon CC4 ugotovili tudi pri kravah s subkliničnim mastitisom. Z metodo WGS smo potrdili mikrobiološko povezavo med dvema izolatoma CC5 iz kmetijskega okolja z različnim profilom PFGE. Naši rezultati kažejo, da bi metoda WGS morala nadomestiti metodo PFGE za epidemiološki nadzor bakterije *L. monocytogenes*. V drugem sklopu naloge smo analizirali populacijsko strukturo izolatov živalskega kliničnega izvora in iz naravnega okolja, ki je slabo poznana. Za opis populacijske strukture izolatov živalskega kliničnega izvora in iz naravnega okolja smo uporabili tipizacijo na osnovi zaporedij več lokusov (angl. *multilocus sequence typing*, MLST). Klon CC1 je bil značilno povezan s kliničnim izvorom in z živčno obliko listerioze. Na novo smo opisali značilno povezavo klonov CC6 in CC37 z abortivno obliko bolezni. Kloni CC9, CC14 in CC29 so bili značilno povezani z naravnim okoljem. Zbrani rezultati predstavljajo pomemben doprinos k razumevanju genetske raznolikosti bakterije *L. monocytogenes* v kmetijskem okolju na nacionalni in mednarodni ravni.

ABSTRACT

Keywords: Molecular epidemiology; listeriosis – microbiology; *Listeria monocytogenes* – isolation and purification – genetics; multilocus sequence typing – methods; whole genome sequencing – methods

Listeriosis is a serious disease of humans and animals caused by *Listeria monocytogenes*. Whole-genome sequencing (WGS) is becoming the method of choice for the epidemiological surveillance of listeriosis, including outbreak investigations. Bacterial typing is not an integral part of routine investigations of animal listeriosis outbreaks; therefore, *L. monocytogenes* genotypes involved in these outbreaks remain poorly known. In the first part of the dissertation, WGS was used for detailed genetic characterization of presumably epidemiologically and microbiologically related isolates. Seven listeriosis outbreaks in small ruminants caused by the ST1 (CC1), ST18 (CC18), ST21 (CC21) and ST184 clones were retrospectively analyzed. Several WGS-based analytical approaches confirmed the monoclonal nature of the investigated outbreaks; microbiologically related isolates differed in up to 13 polymorphisms by whole-genome single nucleotide polymorphism (wgSNP) typing, seven alleles in core-genome multilocus sequence typing (cgMLST) and 12 alleles in whole-genome multilocus sequence typing (wgMLST). In the case of an outbreak caused by the ST184 strain, a microbiologically related strain was also found in the drinking water and silage, which were the most likely source(s) of infection of the diseased animals. WGS showed a greater discriminatory power compared with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), which failed to distinguish between two outbreaks caused by the CC1 strains. We retrospectively investigated the human listeriosis outbreak caused by the ST8 (CC8) strain. We confirmed the monoclonal nature of the outbreak and rejected the hypothesis that the analyzed food or food-associated isolates caused the outbreak. Furthermore, WGS was used for a comprehensive genetic characterization and elucidation of *L. monocytogenes* transmission pathways in the farm environment. On a farm with a neurolisteriosis case, the hypervirulent CC4 clone was also found in cows with subclinical mastitis. The microbiological link between two CC5 isolates from the farm environment with different PFGE profiles was confirmed by WGS. The results of this study suggest that WGS should replace PFGE in epidemiological surveillance of *L. monocytogenes*. In the second part of the dissertation, we analyzed the population structure of *L. monocytogenes* isolates of animal clinical origin and from the natural environment, which are poorly understood. Multilocus sequence typing (MLST) was used to describe the population structure of isolates of animal clinical origin and from the natural environment. The CC1 clone was significantly associated with a clinical origin and with neurolisteriosis. We described a novel and significant association of CC6 and CC37 with abortion. CC9, CC14 and CC29 were significantly associated with the natural environment. The results presented herein represent an important contribution to the understanding of the genetic diversity of *L. monocytogenes* in the farm environment at regional and international levels.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	4
ABSTRACT	5
KAZALO VSEBINE.....	6
KAZALO SLIK.....	10
1 UVOD	14
1.1 NAMEN DELA.....	14
1.2 HIPOTEZE	14
2 PREGLED LITERATURE	16
2.1 SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE	16
2.1.1 Sekvenciranje kratkih odčitkov	16
2.1.1.1 Priprava knjižnic NGS.....	16
2.1.1.2 Tehnologija Illumina	17
2.1.1.3 Tehnologija Ion Torrent.....	17
2.1.2 Sekvenciranje dolgih odčitkov	18
2.2 BAKTERIJA <i>L. monocytogenes</i> IN LISTERIOZA	18
2.2.1 Bakterija <i>L. monocytogenes</i> kot saprotrof	18
2.2.2 Bakterija <i>L. monocytogenes</i> kot znotrajcelični patogen	19
2.2.3 Listerioza pri ljudeh.....	20
2.2.4 Listerioza pri živalih	21
2.3 EPIDEMIOLOŠKI NADZOR BAKTERIJE <i>L. monocytogenes</i>	22
2.3.1 Metoda MLST	22
2.3.2 Metoda PFGE	23
2.3.3 Metoda WGS	23
2.3.3.1 Preiskave izbruhov listerioze z metodo WGS	24
2.4 POPULACIJSKA STRUKTURA BAKTERIJE <i>L. monocytogenes</i>	25
2.4.1 Populacijska struktura izolatov bakterije <i>L. monocytogenes</i> kliničnega izvora	26
2.4.2 Populacijska struktura izolatov bakterije <i>L. monocytogenes</i> iz živil.....	27
2.4.3 Populacijska struktura izolatov bakterije <i>L. monocytogenes</i> iz naravnega okolja	27
3 MATERIALI IN METODE.....	29
3.1 VZDRŽEVANJE IZOLATOV BAKTERIJE <i>L. monocytogenes</i>	29

3.2	IZOLACIJA GENOMSKE DNA IN NADZOR KAKOVOSTI.....	29
3.3	Metoda PFGE	29
3.4	Metoda WGS	30
3.4.1	Tehnologija Ion Torrent	30
3.4.2	Tehnologija Illumina.....	30
3.5	RETROSPEKTIVNE PREISKAVE IZBRUHOV LISTERIOZE	31
3.6	UGOTAVLJANJE POTI ŠIRJENJA BAKTERIJE <i>L. monocytogenes</i> V KMETIJSKEM OKOLJU	31
3.7	BIOINFORMACIJSKA OBDELAVA PODATKOV	32
3.7.1	Nadzor kakovosti odčitkov	32
3.7.2	Sestavljanje odčitkov v soseanke	33
3.7.3	Nadzor kakovosti sosešk	33
3.7.4	Izdelava bakterijskih psevdokromosomov.....	33
3.7.5	Anotacija bakterijskih genomov	33
3.7.6	Analiza prisotnosti/odsotnosti determinant virulence	34
3.7.7	Analiza profagnih zaporedij.....	35
3.7.8	Analiza plazmidnih zaporedij	35
3.7.9	WGS-tipizacija	35
3.8	ANALIZA POPULACIJSKE STRUKTURE IZOLATOV BAKTERIJE <i>L. monocytogenes</i>	36
3.8.1	MLST-tipizacija	36
3.8.1.1	MLST-tipizacija na osnovi profila PFGE <i>Ascl-ApaI</i>	36
3.8.1.2	In silico MLST-tipizacija na osnovi WGS	37
3.8.2	Izdelava minimalnega vpetega drevesa	37
3.8.3	Analiza taksonomske raznolikosti izolatov bakterije <i>L. monocytogenes</i>	37
3.8.4	Podatkovna zbirka Naravno okolje	37
3.8.5	Podatkovna zbirka Živalski klinični izvor	38
3.8.6	Statistična obdelava podatkov.....	39
3.9	GENTAMICINSKI TEST	39
4	REZULTATI.....	41
4.1	UGOTAVLJANJE EPIDEMIOLOŠKIH POVEZAV MED IZOLATI BAKTERIJE <i>L. monocytogenes</i>	41
4.1.1	Izbruhi listerioze pri živalih	41
4.1.1.1	Analiza profagnih in plazmidnih zaporedij	47

4.1.2 Izbruh listerioze pri ljudeh	47
4.1.2.1 Analiza profagnih in plazmidnih elementov	51
4.1.2.2 Primerjava tehnologij Illumina in Ion Torrent	51
4.1.3 Ugotavljanje poti širjenja bakterije <i>L. monocytogenes</i> na kmetiji s primerom nevrolisterioze pri govedu	51
4.1.3.1 Analiza prisotnosti/odsotnosti determinant virulence	54
4.1.3.2 Testiranje invazivnosti in replikativnosti izolatov.....	55
4.1.4 Ugotavljanje poti širjenja bakterije <i>L. monocytogenes</i> na kmetiji s kontaminiranim surovim mlekom.....	57
4.2 POPULACIJSKA STRUKTURA IZOLATOV <i>L. monocytogenes</i> IZ NARAVNEGA OKOLJA IN ŽIVALSKEGA KLINIČNEGA IZVORA	59
4.2.1 Analiza taksonomske raznolikosti izolatov bakterije <i>L. monocytogenes</i>	59
4.2.2 Populacijska struktura izolatov <i>L. monocytogenes</i> izolatov živalskega kliničnega izvora	62
4.2.3 Populacijska struktura izolatov <i>L. monocytogenes</i> izolatov iz naravnega okolja	64
4.2.4 Analiza prisotnosti/odsotnosti determinant virulence	65
5 RAZPRAVA	67
5.1 UGOTAVLJANJE EPIDEMIOLOŠKIH POVEZAV MED IZOLATI BAKTERIJE <i>L. monocytogenes</i>	67
5.2 POPULACIJSKA STRUKTURA IZOLATOV BAKTERIJE <i>L. monocytogenes</i>	73
6 ZAKLJUČKI.....	80
7 POVZETEK	81
8 SUMMARY	83
9 ZAHVALE.....	85
10 LITERATURA.....	86
11 PRILOGE	100

KAZALO TABEL

Tabela 1: Glavni fizikalno-kemijski parametri okolja/medija, ki določajo zmožnost rasti bakterije <i>L. monocytogenes</i>	19
Table 1: Main physico-chemical parameters of the environment/medium that determine the growth ability of <i>L. monocytogenes</i>	19
Tabela 2: Podatkovna zbirka izolatov Živalski klinični izvor ($n = 350$), stratificana po klinični obliki listerioze.....	38
Table 2: Animal clinical dataset ($n = 350$), stratified according to the clinical form of listeriosis	38
Tabela 3: Izbruhi listerioze pri drobnici v obdobju 2008–2018	41
Table 3: Listeriosis outbreaks in small ruminants in the period 2008–2018	41
Tabela 4: Minimalna in maksimalna genetska razdalja med epidemiološko povezanimi izolati bakterije <i>L. monocytogenes</i> (genetska raznolikost znotraj izbruha)	42
Table 4: Minimum and maximum pairwise allelic/SNP differences among the outbreak-associated <i>L. monocytogenes</i> isolates (intra-outbreak diversity)	42
Tabela 5: Minimalna in maksimalna genetska razdalja med izolati bakterije <i>L. monocytogenes</i> iz različnih izbruhov enakega sekvenčnega tipa (ST)	42
Table 5: Minimum and maximum pairwise allelic/SNP differences among <i>L. monocytogenes</i> isolates from different outbreaks of the same sequence type (inter-outbreak diversity).....	42
Tabela 6: Izbruh listerioze pri ljudeh, ki ga je povzročil sev bakterije <i>L. monocytogenes</i> ST8	48
Table 6: Human listeriosis outbreak caused by <i>L. monocytogenes</i> ST8 strain.....	48
Tabela 7: Koeficient znotrajcelične rasti (IGC) za devet izolatov <i>L. monocytogenes</i> iz kmetije G, izračunan na osnovi rezultatov gentamicinskega testa na celični liniji BoMac	64
Table 7: Intracellular growth coefficient (IGC) for nine <i>L. monocytogenes</i> isolates from farm G, calculation based on the results of the gentamicin protection assay in the BoMac cell line.	64
Tabela 8: Absolutna in relativna frekvanca hipervirulentnih klonov bakterije <i>L. monocytogenes</i> v podatkovni zbirki Živalski klinični izvor, stratificirani po klinični obliki listerioze	64
Table 8: Absolute and relative frequency of hypervirulent <i>L. monocytogenes</i> clones in the Animal clinical dataset, stratified according to the clinical form of listeriosis	64

KAZALO SLIK

Slika 1: Znotrajcelični infekcijski cikel bakterije <i>L. monocytogenes</i>	20
Figure 1: Intracellular cycle of <i>L. monocytogenes</i>	20
Slika 2: Izbruhi listerioze pri živalih, ki so jih povzročili sevi bakterije <i>L. monocytogenes</i> ST1	43
Figure 2: Animal listeriosis outbreaks caused by the <i>L. monocytogenes</i> ST1 strains	43
Slika 3: Izbruh listerioze pri živalih, ki ga je povzročil sev bakterije <i>L. monocytogenes</i> ST18	44
Figure 3: Animal listeriosis outbreak caused by the <i>L. monocytogenes</i> ST18 strain	44
Slika 4: Izbruha listerioze pri živalih, ki sta ga povzročila seva bakterije <i>L. monocytogenes</i> ST21	45
Figure 4: Animal listeriosis outbreaks caused by the two <i>L. monocytogenes</i> ST21 strains....	45
Slika 5: Izbruh listerioze pri živalih, ki ga je povzročil sev bakterije <i>L. monocytogenes</i> ST184	46
Figure 5: Animal listeriosis outbreak caused by the <i>L. monocytogenes</i> ST184 strain	46
Slika 6: Najverjetnejše poti širjenja seva bakterije <i>L. monocytogenes</i> ST184 na kmetiji F....	47
Figure 6: Most likely on-farm transmission cycle of the <i>L. monocytogenes</i> ST184 outbreak strain (farm F).....	47
Slika 7: Izbruh listerioze pri ljudeh, ki ga je povzročil sev bakterije <i>L. monocytogenes</i> ST8 – analiza WGS s tehnologijo Illumina.	49
Figure 7: Human listeriosis outbreak caused by the <i>L. monocytogenes</i> ST8 strain – analysis by Illumina technology.....	49
Slika 8: Izbruh listerioze pri ljudeh, ki ga je povzročil sev bakterije <i>L. monocytogenes</i> ST8 – analiza WGS s tehnologijo Ion Torrent.....	50
Figure 8: Human listeriosis outbreak caused by the <i>L. monocytogenes</i> ST8 strain – analysis by Ion Torrent technology.....	50
Slika 9: Dendrogram podobnosti kombiniranih profilov PFGE <i>Ascl-ApaI</i> za 36 izolatov bakterije <i>L. monocytogenes</i> s kmetije G.....	53
Figure 9: Dendrogram showing similarity of PFGE <i>Ascl-ApaI</i> profiles for 36 <i>L. monocytogenes</i> isolates from farm G	53
Slika 10: Dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije cgMLST za 16 izolatov bakterije <i>L. monocytogenes</i> iz kmetije G	54
Figure 10: Dendrogram based on the cgMLST typing for 16 <i>L. monocytogenes</i> isolates from farm G	54

Slika 11: Profil prisotnosti/odsotnosti 31 determinant virulence pri 16 izolatih bakterije <i>L. monocytogenes</i> s kmetije G.....	55
Figure 11: Virulence gene presence/absence pattern for in 16 <i>L. monocytogenes</i> isolates from farm G	55
Slika 12: Gentamicinski test na celični liniji BoMac za devet izolatov <i>L. monocytogenes</i> iz kmetije G	55
Figure 12: Gentamicin protection assay in the BoMac cell line for nine <i>L. monocytogenes</i> from farm G	55
Slika 13: Gentamicinski test na celični liniji Vero za devet izolatov <i>L. monocytogenes</i> iz kmetije G	57
Figure 13: Gentamicin protection assay in the Vero cell line for nine <i>L. monocytogenes</i> from farm G	57
Slika 14: Dendrogram podobnosti kombiniranih profilov PFGE <i>Ascl-ApaI</i> za osem izolatov <i>L. monocytogenes</i> s kmetije H.....	58
Figure 14: Dendrogram showing similarity of the combined PFGE <i>Ascl-ApaI</i> profiles for eight <i>L. monocytogenes</i> isolates from farm H	58
Slika 15: Profag $\phi rpsI$ pri izolatu L1419 (ST5, CC5), ki je povzročil zamik velikosti 37 kb v pasu profila PFGE <i>AsclI</i>	58
Figure 15: $\phi rpsI$ profage in the L1419 isolate (ST5, CC5), which caused a 37-kb shift in <i>AsclI</i> band	58
Slika 16: Populacijska struktura 624 izolatov bakterije <i>L. monocytogenes</i>	60
Figure 16: Population structure of 624 <i>L. monocytogenes</i> isolates	60
Slika 17: Relativna frekvenca klonalnih kompleksov (CC) bakterije <i>L. monocytogenes</i> v podatkovnih zbirkah Živalski klinični izvor in Naravno okolje	61
Figure 17: Relative frequency of <i>L. monocytogenes</i> clonal complexes (CCs) in the Animal clinical and the Natural environment dataset	61
Slika 18: Rarefakcijska krivulja klonalnih kompleksov (CC) bakterije <i>L. monocytogenes</i>	61
Figure 18: Rarefaction curve of <i>L. monocytogenes</i> clonal complexes (CCs)	61
Slika 19: Prevalenca klonalnih kompleksov (CC) bakterije <i>L. monocytogenes</i> v podatkovni zbirki Živalski klinični izvor, stratificiranih po klinični obliku listerioze (nevrolisterioza, abortus in druge oblike listerioze)	62
Figure 19: Prevalence of <i>L. monocytogenes</i> clonal complexes (CCs) in the Animal clinical dataset, stratified according to the clinical form of listeriosis (neurolisteriosis, abortion and other clinical forms)	62
Slika 20: Prevalenca klonalnih kompleksov (CC) bakterije <i>L. monocytogenes</i> v podatkovni zbirki Naravno okolje (levo) in njeni podmnožici Krma (desno)	64
Figure 20: Prevalence of <i>L. monocytogenes</i> clonal complexes (CCs) in the Natural environment dataset (left) and Feed subset (right)	64

Slika 21: Toplotni diagram prisotnosti/odsotnosti 151 determinant virulence pri klonalnih kompleksih (CC) bakterije *L. monocytogenes*, ki so bili značilno povezani z virom izolacije ali klinično obliko listerioze 61

Figure 21: Heatmap of the gene presence/absence for 151 virulence genes in *L. monocytogenes* clonal complexes (CCs) that were significantly associated with the origin of isolation or clinical form of listeriosis 66

SEZNAM OKRAJŠAV

BoMac	goveja makrofagna celična linija (angl. <i>bovine macrophage cell line</i>)
bp	bazni par
CC	klonalni kompleks (angl. <i>clonal complex</i>)
CDC	Ameriški center za nadzor bolezni (angl. <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CFU	kolonijkska enota (angl. <i>colony forming unit</i>)
cgMLST	tipizacija na osnovi zaporedij lokusov osrednjega genoma (angl. <i>core-genome multilocus sequence typing</i>)
CI	interval zaupanja (angl. <i>confidence interval</i>)
ddNTP	dideoksinukleotid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksinukleotid
IGC	koeficient znotrajcelične rasti (angl. <i>intracellular growth coefficient</i>)
MLST	tipizacija na osnovi zaporedij več lokusov (angl. <i>multilocus sequence typing</i>)
MOI	multipliciteta okužbe (angl. <i>multiplicity of infection</i>)
NGS	sekvenciranje naslednje generacije (angl. <i>next-generation sequencing</i>)
p.i.	po okužbi (angl. <i>post infection</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. <i>pulsed-field gel electrophoresis</i>)
SI NRL <i>Lm</i>	Slovenski referenčni laboratorij za bakterijo <i>Listeria monocytogenes</i>
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
ST	sekvenčni tip (angl. <i>sequence type</i>)
UVHVVR	Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin
wgMLST	tipizacija na osnovi zaporedij lokusov celotnega genoma (angl. <i>whole-genome multilocus sequence typing</i>)
WGS	sekvenciranje celotnih genomov (angl. <i>whole-genome sequencing</i>)
wgSNP	tipizacija na osnovi polimorfizmov posameznih nukleotidov v celotnem genomu (angl. <i>whole-genome single nucleotide polymorphism typing</i>)

1 UVOD

Listeria monocytogenes je patogena grampozitivna bakterija, ki povzroča listeriozo – resno obolenje ljudi in živali z visoko (20–30 %) smrtnostjo. Incidencu listerioze je pri ljudeh sicer nizka, a v zadnjih letih narašča tako v Sloveniji kot v Evropi. Ker bakterija *L. monocytogenes* med vsemi bakterijami, ki se prenašajo s hrano, povzroča največjo smrtnost med obolelimi, predstavlja resen problem na področju javnega zdravja in veterinarske medicine.

Za nadzor okužb z bakterijo *L. monocytogenes* je pomembno njeno redno in zanesljivo epidemiološko spremljanje. Sestavni del epidemiološkega nadzora je genotipizacija bakterije, ki nam omogoča ugotavljanje njenih značilnosti in poti širjenja. Elektroforezo v pulzirajočem električnem polju (angl. *pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE), ki velja za »zlati standard« za tipizacijo bakterije *L. monocytogenes*, v zadnjih letih vse bolj nadomešča sekvenciranje celotnih genomov (angl. *whole-genome sequencing*, WGS). To sodi med metode sekvenciranja naslednje generacije (angl. *next-generation sequencing*, NGS) in ima v primerjavi z metodo PFGE in ostalimi tipizacijskimi metodami največjo moč razlikovanja. Temelji na filogeniji in omogoča vpogled v sestavo celotnega bakterijskega genoma.

Posamezni klonalni kompleksi (kloni) bakterije *L. monocytogenes* se razlikujejo glede na svojo ekofiziologijo in druge značilnosti, kot sta npr. virulenza in tropizem. Metoda WGS omogoča opredelitev genetske raznolikosti (populacijske strukture) listerij v izbranem okolju in ugotavljanje prisotnosti genetskih determinant, ki so povezane s preučevanim fenotipom. Zato nam omenjena metoda omogoča veliko bolj informativen vpogled v značilnosti bakterij v primerjavi s klasičnimi tipizacijskimi metodami, kot sta PFGE in tipizacija na osnovi zaporedij več lokusov (angl. *multilocus sequence typing*, MLST).

1.1 NAMEN DELA

Namen doktorske disertacije je bil ugotoviti uporabnost metode NGS za epidemiološko spremljanje in podrobno genetsko opredelitev izolatov *L. monocytogenes* (na ravni zaporedij celotnih genomov, WGS) s poudarkom na izolatih iz kmetijskega okolja.

1.2 HIPOTEZE

Z raziskavo smo želeli preveriti naslednje hipoteze:

1. Pri domnevno epidemiološko povezanih izolatih *L. monocytogenes*, ki imajo enak ali zelo podoben profil PFGE, bomo to povezavo ugotovili tudi z metodo WGS.
2. Med izolati *L. monocytogenes* iz mlečne žleze živali bodo prevladovali hipervirulentni klonalni kompleksi, tako kot pri izolatih, ki so povezani z resnimi oblikami listerioze (septikemična, abortivna in živčna oblika).

3. Pri kliničnih izolatih iz kmetijskega okolja bo nabor znanih genetskih determinant virulence drugačen kot pri nekliničnih izolatih *L. monocytogenes*. Klinični izolati bodo hiperinvazivni in hiperreplikativni v primerjavi z nekliničnimi izolati drugih (z listeriozo nepovezanih) klonalnih kompleksov.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE

Sekvenciranje naslednje generacije (angl. *next-generation sequencing*, NGS), tudi masovno vzporedno sekvenciranje ali sekvenciranje visokih zmogljivosti, je tehnologija določanja nukleotidnega zaporedja (sekvenciranja) velikega števila zaporedij DNA. Tehnologije NGS lahko razdelimo v dve glavni skupini: (i) sekvenciranje kratkih, klonalno namnoženih fragmentov DNA (sekvenciranje druge generacije), in (ii) sekvenciranje posameznih, dolgih fragmentov DNA (sekvenciranje tretje generacije). Sestavni del metode NGS je tudi obdelava pridobljenih podatkov (zaporedij). To izvajamo s specializiranimi bioinformacijskimi programi, ki jih v grobem razdelimo na komercialne in prosto dostopne programe. Medtem ko imajo komercialni programi grafične vmesnike in so uporabniku prijazni, so manj fleksibilni in ne omogočajo vpogleda v algoritme, na katerih temeljijo. Poleg tega nakup licence za njihovo uporabo predstavlja znaten strošek. Prosto dostopni bioinformacijski programi so običajno (i) spletna orodja z omejeno kapaciteto za obdelavo podatkov ali (ii) odprtokodna, samostojna orodja, ki običajno delujejo v operacijskem sistemu Linux in zahtevajo specifična računalniška znanja (Carrico in sod., 2018). Izbor primernega bioinformacijskega programa je v veliki meri odvisen od aplikacije ter računalniškega znanja (usposobljenosti) in računalniške infrastrukture, s katerima uporabnik razpolaga.

2.1.1 Sekvenciranje kratkih odčitkov

Najbolj razširjena različica metode NGS je masovno vzporedno sekvenciranje kratkih (100–500 bp), klonalno namnoženih fragmentov DNA (sekvenciranje druge generacije). Za klonalno namnoževanje fragmentov uporabljam verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR). Na voljo so številne tehnologije sekvenciranja kratkih fragmentov DNA, od katerih sta trenutno vodilni tehnologiji na trgu Illumina (Illumina, ZDA) in Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, ZDA) (Besser in sod., 2018; Levy and Myers, 2016). Ker obe temeljita na sekvenciranju DNA z DNA-polimerazo, tehnologiji označujemo tudi kot sekvenciranje s sintezo (Besser in sod., 2018). Vsaka od omenjenih tehnologij ima na voljo več platform (sistemov za sekvenciranje oz. sekvenatorjev), kar uporabniku omogoča izbor platforme s primerno zmogljivostjo glede na njegove potrebe, vendar že najmanj zmogljivi sekvenatorji omogočajo hkratno sekvenciranje več sto tisoč fragmentov DNA. Obe tehnologiji omogočata visoko zanesljivo (natančno in ponovljivo) sekvenciranje celotnih bakterijskih genomov (Mellmann in sod., 2017; Phelan in sod., 2016).

2.1.1.1 Priprava knjižnic NGS

Ključni korak pri sekvenciranju druge generacije je priprava knjižnic. Knjižnice so nabor kratkih, klonalno namnoženih fragmentov DNA (insertov), ki imajo na vsakem koncu DNA vezan oligonukleotid z znanim zaporedjem (adapter). Adapterja (i) omogočata vezavo matrične DNA na trdno površino, ki je prevlečena s komplementarnimi oligonukleotidi, in (ii) vezavo

DNA-polimeraze na matrično DNA. Adapterjem je navadno priključen še en oligonukleotid z znanim zaporedjem, ki ga imenujemo črtna koda DNA (angl. *barcode*); ta je specifičen za vsak vzorec in omogoča hkratno sekvenciranje več vzorcev (angl. *multiplexing*).

Prvi korak pri pripravi knjižnic je fragmentacija DNA, ki je lahko encimska ali mehanska. Priljubljeni metodi za fragmentacijo sta (*i*) encimska fragmentacija s kompleksom Transposome (tehnologija Nextera, Illumina), znana tudi kot tagmentacija, in (*ii*) mehanska fragmentacija z ultrasonikacijo. Pri encimski metodi fazi fragmentacije sledi vezava adapterjev in črtih kod DNA (pri tagmentaciji ta poteka sočasno s fragmentacijo). Pri mehanski fragmentaciji je pred vezavo adapterjev in črtih kod potrebno encimsko popravilo koncev DNA in zapolnitev vrzeli v DNA. Po vezavi adapterjev in črtih kod sledi izbor fragmentov primerne dolžine (angl. *size selection*) in njihovo klonalno namnoževanje z metodo PCR.

2.1.1.2 Tehnologija Illumina

Tehnologija Illumina/Solexa (ZDA), danes znana kot Illumina, je trenutno vodilna tehnologija na trgu sekvenciranja kratkih (75–300 bp) fragmentov DNA, ki proizvede več kot 90 % vseh podatkov NGS. Tehnologija temelji na klonalnem namnoževanju fragmentov DNA s premostitvenim PCR (angl. *bridge PCR*), ki poteka na površini pretočne celice (angl. *flow cell*). Nastale klonalne gruče sekvenciramo vzporedno in postopno (nukleotid za nukleotidom). Ob vsakem ciklu sekvenciranja k matrični DNA dodajamo vse štiri fluorescenčno označene dideoksinukleotide (angl. *dideoxynucleotide*, ddNTP). Ti imajo dodano kemično skupino, ki služi kot reverzibilni terminator sinteze (preprečuje vgradnjo naslednjega komplementarnega ddNTP). Ob vgraditvi laser odčita identiteto vgrajenega nukleotida. Sledijo spiranje nevgrajenih ddNTP, odstranitev reverzibilnega terminatorja ter dodatek novih ddNTP (začetek novega cikla) (Bentley in sod., 2008). Tehnologija Illumina poleg sekvenciranja fragmentov DNA z enega konca (angl. *single-read sequencing*) omogoča sekvenciranje fragmentov z obema konci (angl. *paired-end sequencing*), kar olajša ugotavljanje strukturnih genomskeh variacij (insercij, delecij in inverzij), repetitivnih elementov, fuzij genov in novih transkriptov (Ambardar in sod., 2016).

2.1.1.3 Tehnologija Ion Torrent

Tehnologija Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, ZDA) je še ena priljubljena tehnologija masovnega vzporednega sekvenciranja kratkih (100–600 bp) fragmentov DNA. Temelji na klonalnem namnoževanju fragmentov DNA z emulzijskim PCR (angl. *emulsion PCR*), ki poteka na površini nanokroglic, imenovanih Ion Sphere Particles. Kroglice s klonalno namnoženimi fragmenti DNA nato nanesemo na površino polprevodnega čipa z jamicami tako, da ima vsaka jama po eno kroglico. Sledi postopno sekvenciranje vzorcev, ki temelji na zaznavanju spremembe pH, do katere pride ob vgradnji nukleotida zaradi sprostitev vodikovega protiona. Polprevodni čip spremembu pH pretvori v spremembu električne napetosti. Ob vsakem ciklu sekvenciranja k matrični DNA dodajamo le posamične, nativne deoksinukleotide (dNTP) iste identitete; sledita spiranje nevgrajenih dNTP ter dodatek novih dNTP (začetek novega

cikla). Če je v matrični verigi DNA niz enakih nukleotidov (homopolimer), se vgradijo vsi komplementarni dNTP, kar pomeni sorazmerno večjo spremembo električne napetosti (Bentley in sod., 2008).

2.1.2 Sekvenciranje dolgih odčitkov

V zadnjih letih je vse bolj priljubljeno tudi sekvenciranje dolgih fragmentov DNA (sekvenciranje tretje generacije). Pri tem gre za vzporedno sekvenciranje dolgih molekul DNA brez njihove predhodne fragmentacije in klonalnega namnoževanja. Priljubljeni komercialni tehnologiji sekvenciranja dolgih fragmentov DNA sta sekvenciranje z nanoporami (Oxford Nanopore Technology, ONT; Združeno kraljestvo) in sekvenciranje posameznih molekul v realnem času (angl. *single molecule real-time sequencing*, SMRT; Pacific Biosciences, ZDA) (Eid in sod., 2009). Običajna dolžina odčitkov pri obeh tehnologijah presega 50 kb. Čeprav imata omenjeni tehnologiji trenutno v primerjavi s tehnologijama Illumina in Ion Torrent večjo začetno stopnjo napake in sta cenovno manj ugodni, sta v mikrobnih genomske epidemiologiji zelo uporabni pri zapolnitvi vrzeli v bakterijskem genomu (izdelavi zaključenih bakterijskih genomov) ali sekvenciranju velikih plazmidov (Li in sod., 2018; Wick in sod., 2017). Trenutno priljubljena aplikacija pri zaključevanju bakterijskih genomov je t. i. hibridni pristop, ki združuje odčitke iz različnih tehnologij sekvenciranja, npr. tehnologij dolgih in kratkih odčitkov. Pomembni dodatni aplikaciji sekvenciranja dolgih fragmentov DNA v primerjavi s sekvenciranjem kratkih fragmentov sta hkratno ugotavljanje epigenetskih sprememb (obe tehnologiji) ter neposredno sekvenciranje RNA brez sinteze komplementarne verige DNA (tehnologija ONT) (Keller in sod., 2018).

2.2 BAKTERIJA *L. monocytogenes* IN LISTERIOZA

2.2.1 Bakterija *L. monocytogenes* kot saprotrof

L. monocytogenes je grampozitivna, saprotrofna bakterija, ki jo taksonomsko uvrščamo v deblo *Firmicutes*, razred *Bacilli*. Gre za paličasto, nesporogeno, fakultativno anaerobno bakterijo. Peritrihni bički omogočajo listerijam gibeljivost, vendar le pri temperaturah, nižjih od 30 °C (Lungu in sod., 2009). Listerije so splošno razširjene (ubikvitarno) v naravnem okolju; pogosto jih najdemo v odpadnem rastlinskem materialu, prsti, vodi in celo v fecusu ljudi in živali brez kliničnih znakov (Linke in sod., 2014; Nightingale in sod., 2004). Odlikuje jih izjemna sposobnost preživetja v številnih skrajnih razmerah, kot so nizka vrednost pH, nizka temperatura in visoka koncentracija soli (**Tabela 1**) (Norton in Braden, 2007). Ker so listerije pogosti kontaminanti različnih tipov živil, njihova sposobnost razmnoževanja pri temperaturi hlajenja (4 °C) in drugih skrajnih razmerah predstavlja velik izziv za nadzor bakterije v živilski industriji (Norton in Braden, 2007).

Tabela 1: Glavni fizikalno-kemijski parametri okolja/medija, ki določajo zmožnost rasti bakterije *L. monocytogenes*. Vir: Norton in Braden, 2007

Table 1: Main physico-chemical parameters of the environment/medium that determine the growth ability of *L. monocytogenes*. Source: Norton in Braden, 2007

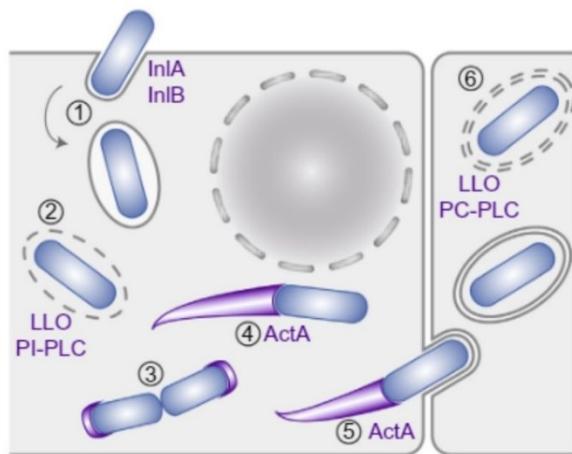
Fizikalno-kemijski parameter	Minimum*	Optimum*	Maksimum*
Temperaturno območje T [°C]	-1,5	30–37	45
Vodna aktivnost (a_w)	0,90	0,97	/
Vrednost pH	4,0	6,0–8,0	9,6

*Vrednosti veljajo, ko so ostali fizikalno-kemijski parametri blizu njihovega optimuma.

2.2.2 Bakterija *L. monocytogenes* kot znotrajcelični patogen

Bakterija *L. monocytogenes* je tudi oportunistični patogen, ki povzroča listeriozo – resno obolenje ljudi in živali z visoko (20–30 %) smrtnostjo (Low in Donachie, 1997). Listerije okužujejo makrofage in dendritične celice, poleg tega pa tudi številne druge celice, ki običajno nimajo fagocitne aktivnosti – med drugim nevroni, hepatociti, celice endotelija in fibroblasti. V vseh omenjenih tipih celic listerije razvijejo značilni znotrajcelični infektivni cikel, ki služi njihovemu namnoževanju in širjenju. Po vstopu (internalizaciji) v gostiteljsko celico bakterija pobegne iz fagosoma (vakuole) in se namnoži v citoplazmi. Sledi aktivacija polimerizacije gostiteljevih aktinskih filamentov na polu bakterije, s katerimi se bakterija širi med celicami, ne da bi bila pri tem izpostavljena dejavnikom imunskega odziva v krvnem obtoku (Camejo in sod., 2011; Vázquez-Boland in sod., 2001) (**Slika 1**).

Najpomembnejše in najbolje preučene determinante virulence bakterije *L. monocytogenes* so listeriolizin O (LLO; znan tudi kot hemolizin Hly), za fosfatidilholin specifična fosfolipaza C (PC-PLC), za fosfatidilinozitol specifična fosfolipaza C (PI-PLC), beljakovina ActA, internalin A (InlA) in internalin B (InlB). Osrednji transkripcijski regulator omenjenih determinant virulence je beljakovina **PrfA**. Ko se listerije nahajajo v okolju (izven gostitelja), je regulator PrfA v neaktivni obliki in listerije izražajo omenjene determinante virulence v nizki koncentraciji. Pri temperaturi ≥ 37 °C (v gostitelju) regulator preide iz svoje neaktivne v aktivno obliko (PrfA*) in sproži izražanje determinant virulence (Freitag in sod., 2009; Vázquez-Boland in sod., 2001). Vloga ključnih determinant virulence pri različnih fazah znotrajceličnega cikla je povzeta na **Sliki 1**.



Slika 1: Znotrajcelični infekcijski cikel bakterije *L. monocytogenes*. **1**, internalizacija bakterije v gostiteljsko celico. **2**, pobeg bakterije iz primarne vakuole. **3**, namnoževanje bakterije v citosolu. **4**, znotrajcelično premikanje bakterije s polymerizacijo aktinskih filamentov. **5**, medcelično širjenje. **6**, pobeg iz sekundarne vakuole. Vir: Cossart in Lebreton, 2014

Figure 1: Intracellular cycle of *L. monocytogenes*. **1**, internalization of the bacterium into the host cell. **2**, rupture of the primary vacuole. **3**, replication of the bacterium in the cytosol. **4**, actin-based intracellular motility. **5**, cell-to-cell spread. **6**, rupture of the secondary vacuole. Source: Cossart and Lebreton, 2014

2.2.3 Listerioza pri ljudeh

Listerioza je redko, vendar resno obolenje ljudi, ki ga povzroča bakterija *L. monocytogenes*. Najpogostejši vir okužbe je kontaminirana hrana. S pojavom obolenja povezujemo številne tipe živil; za najbolj tvegana veljajo živila za neposredno uživanje, kot so delikatesni izdelki, dimljene ribe in mehki siri (Lopez-Valladares in sod., 2018). Ogrožene skupine za razvoj bolezni so starejše osebe, nosečnice in ljudje z oslabljenim imunskim sistemom oz. pridruženimi boleznimi (Vázquez-Boland in sod., 2001).

Listerioza se pri ljudeh kaže v različnih kliničnih oblikah. Bakterija sprva preide črevesno pregrado ter vstopi v krvni in limfatični sistem. Primarna tarčna organa, kjer se bakterija namnožuje, so jetra in vranica (Vázquez-Boland in sod., 2001). Nadalje lahko bakterija preide krvno-možgansko pregrado (živčna oblika bolezni, imenovana tudi nevrrolisterioza) ali fetoplacentalno pregrado (maternalno-neonatalna oblika bolezni). Če bakterija ostane omejena na krvni obtok in viscerale organe, povzroči sistemsko obliko bolezni (septikemija, sepsa). Živčna oblika listerioze se običajno kaže kot diseminirani meningitis ali meningoencefalitis, redkeje kot možganski abscesi (Doganay, 2003). Pri nosečnicah se maternalno-neonatalna listerioza kaže v neonatalni, fetalni ali maternalni oblikih in lahko vodi v abortus (Madjunkov in sod., 2017). Listerioza se lahko kaže tudi kot gastroenteritis, endokarditis ali lokalizirana (fokalna) okužba (npr. pljučnica, celulitis, miokarditis, perikarditis) (Doganay, 2003). Zelo redko so opisani primeri kožne listerioze (Zelenik in sod., 2014).

Povprečna incidenčna stopnja listerioze v Evropi v letu 2016 je bila 0,47/100.000 oseb. V Sloveniji je bila incidenčna stopnja v istem letu 0,73/100.000 oseb. Zaskrbljujoč podatek je, da

je incidenca listerioze pri ljudeh v Evropi in Sloveniji v zadnjih letih (obdobje 2012–2016) naraščala (ECDC, 2018).

Bolezen se običajno pojavlja sporadično, vendar občasno prihaja tudi do izbruhov. Opisani so tudi številni primeri dolgotrajnih in/ali mednarodnih izbruhov (ECDC-EFSA, 2018; ECDC, 2018; Fretz in sod., 2010). Največji do danes opisan izbruh se je zgodil v obdobju 2017–2018 v Južnoafriški republiki; izbruh s 1060 potrjenimi primeri listerioze in 216 smrtnimi žrtvami je povzročil, da so v omenjeni državi bolezen uvrstili na seznam prijavljivih nalezljivih bolezni (Smith in sod., 2019).

2.2.4 Listerioza pri živalih

Listerioza je bila opisana pri številnih živalskih vrstah, vendar se najpogosteje pojavlja pri prežvekovalcih (drobnici in govedu), pri katerih ima bolezen zaradi visoke smrtnosti tudi ekonomski pomen (Rocha in sod., 2013). Smrtnost pri rejnih živalih naj bi bila podobna smrtnosti pri ljudeh (do 30 %), vendar natančne ocene smrtnosti pri živalih niso na voljo (Kumar et al., 2012; Nash in sod., 1995). Listerioza pri živalih običajno poteka v eni od dveh glavnih oblik: živčna in abortivna oblika. Živčna oblika se pri prežvekovalcih običajno kaže kot rombencefalitis, pri katerem so patohistološke spremembe omejene predvsem na možganski most in podaljšano hrbtenjačo. Zaradi teh nevropatoloških razlik med živalmi in ljudmi (pri ljudeh se bolezen običajno kaže kot disseminirani meningitis/meningoencefalitis) so raziskovalci predlagali, da je pri živalski nevrolisteriozi poleg hematogene poti okužbe znana tudi nevralna retrogradna pot, pri kateri bakterije vstopijo v organizem skozi ustno ali nosno sluznico in se širijo po obraznih živcih do možganov (možganski most, podaljšana hrbtenjača) s centripetalno aksonsko migracijo (Oevermann in sod., 2010a; Oevermann in sod., 2010b). Druge, redkejše oblike listerioze pri živalih so septikemija, mastitis (pogosto poteka v subklinični obliki), gastroenteritis in očesna listerioza (iritis, keratokonjunktivitis) (Evans in sod., 2004; Low in Donachie, 1997; Starič et al., 2008). Znani so tudi primeri listerioze pri konjih, vendar so bolj dovtetne zelo mlade živali (Pirš in sod., 2005). Prežvekovalci, zlasti govedo, lahko listerije izločajo s fecesom v okolje brez kliničnih znakov (asimptomatsko klicenoštvo) (Esteban in sod., 2009; Ho in sod., 2007).

Izbruhi listerioze so bili do danes opisani predvsem pri drobnici in govedu, redkeje tudi pri perutnini, činčilah, damjakih in prašičih (Akpvie in Ikheloa, 1992; Dreyer in sod., 2015; Eriksen in sod., 1988; Garcia in sod., 2016; Stein in sod., 2018; Wilkerson in sod., 1997). Pri izbruhu se znotraj črede oz. jate običajno pojavlja le ena klinična oblika listerioze. Prav tako pri posamezni živali običajno ne beležimo sočasnega pojava različnih kliničnih oblik listerioze (npr. sočasnna nevrolisterioza in listerijski abortus) (Garcia in sod., 2016; Oevermann in sod., 2010a; Wagner in sod., 2005). Rutinske preiskave izbruhov listerioze pri živalih ne vključujejo tipizacije povzročitelja, zato so opisi izbruhov, kjer so mikrobiološko povezanost med izolati potrdili tudi z genotipizacijo, redki (Dreyer in sod., 2015; Stein in sod., 2018).

V Sloveniji trenutno ne izvajamo aktivnega monitoringa listerioze pri živalih. Pri prežvekovalcih poteka pasivni monitoring nevrolisterioze; spremjanje bolezni se izvaja na podlagi zbiranja podatkov o potrjenih primerih listerioze pri živalih, ki kažejo klinične znake listerioze ali v sklopu diferencialno-diagnostičnih preiskav pri sumih na bolezni centralnega živčnega sistema (UVHVVR, 2018). Če je listerioza potrjena z diagnostičnim izvidom, mora veterinarska organizacija o tem obvestiti pristojni območni urad Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR). Glede na naravo bolezni in če je potrebno, pristojne veterinarske in zdravstvene organizacije opravijo epidemiološko oz. epizootiološko poizvedovanje (UVHVVR, 2018). Povprečna incidenčna stopnja nevrolisterioze v Sloveniji v obdobju 2006–2016 je bila pri drobnici 5,3/100.000 živali in pri govedu 1,0/100.000 živali (KIS, 2018; UVHVVR, 2017). Incidenca nevrolisterioze pri živalih je najverjetnejše podcenjena, saj je odvisna od pripravljenosti rejca, da ob pojavu živčnih znakov pri živalih pokliče pristojnega veterinarja, in njegove ozaveščenosti o bolezni. V Sloveniji je bil najboljši pregled nad incidenco listerioze v času intenzivnega ugotavljanja vzroka pogina pri vseh prežvekovalcih z živčnimi znaki z namenom diferencialne diagnostike s steklino in boleznijo norih krav. Aktivni monitoring možganskih sprememb pri drobnici v Švici je pokazal, da je bila nevrolisterioza najpogostejsa okužba centralnega živčnega sistema. Incidenčna stopnja nevrolisterioze pri drobnici je bila 26,3/100.000 živali in je bila precej večja od incidence, ki so jo ocenili s pasivnim monitoringom (Oevermann in sod., 2008).

2.3 EPIDEMIOLOŠKI NADZOR BAKTERIJE *L. monocytogenes*

Ameriški center za nadzor bolezni (angl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) je epidemiološki nadzor definiral kot »sistematicno zbiranje, analizo in interpretacijo z javnim zdravjem povezanih podatkov, ki so pomembni pri načrtovanju, vpeljavi in ovrednotenju praks v javnem zdravstvu« (CDC, 2018). Z vidika iniciative »Eno zdravje« lahko uporabo epidemiološkega nadzora razširimo še na zdravje živali in okolja. Epidemiološki nadzor bakterije *L. monocytogenes* zajema spremjanje (monitoring) trendov in lastnosti mikroorganizma, ki so povezani z zdravjem ljudi ali živali, ter preiskave izbruhotov listerioze. Nadzor listerioze temelji na monitoringu, vendar ima dodaten aplikativni pomen oz. cilj, saj stremi k načrtovanju, implementaciji in ovrednotenju ukrepov (praks) za zmanjševanje pojavnosti bolezni pri ljudeh in živalih (OIE, 2018).

2.3.1 Metoda MLST

Ena od priljubljenih metod za tipizacijo bakterij je tipizacija na osnovi zaporedij več lokusov (angl. *multilocus sequence typing*, MLST). Shema MLST za bakterijo *L. monocytogenes*, ki jo vzdržuje Institut Pasteur (Pariz, Francija) (<https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>), temelji na zaporedjih sedmih ohranjenih lokusov (genov) ter izolate bakterije *L. monocytogenes* razvršča v (i) sekvenčne tipe (angl. *sequence type*, ST), ki so enaki v vseh sedmih lokusih, in v (ii) klonalne komplekse (angl. *clonal complex*, CC), ki se med seboj razlikujejo v največ enim lokusu (Ragon in sod., 2008). Nekateri ST nimajo pripadajočega CC (angl. *singleton*). Zaradi velike genetske raznolikosti in klonalne narave bakterije *L. monocytogenes* (dedni material se

prenaša predvsem vertikalno, horizontalni prenosи genov ali rekombinacije niso pogosti) je metoda MLST zelo priljubljena in informativna za preučevanje značilnosti in genetske raznolikosti listerij (Haase in sod., 2014).

2.3.2 Metoda PFGE

Pri preiskavah izbruuhov listerioze je ključna uporaba tipizacijske metode z dovolj veliko močjo razlikovanja. Elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. *pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) je metoda, ki temelji na uporabi restrikcijske endonukleaze, ki bakterijskega genoma ne cepi prepogosto. Sledi ločitev pridobljenih fragmentov DNA v agaroznem gelu v pulzirajočem električnem polju. Za tipizacijo bakterije *L. monocytogenes* v referenčnih laboratorijih v Evropi je v uporabi standardiziran protokol, ki temelji na cepitvi DNA z restrikcijskima endonukleazama *AscI* in *Apal*. Metoda PFGE ima večjo moč razlikovanja od metode MLST, zato se je uveljavila kot »zlati standard« za tipizacijo bakterije *L. monocytogenes*, zlasti v primeru preiskav izbruuhov (Roussel in sod., 2014).

2.3.3 Metoda WGS

Metoda WGS je trenutno najsodobnejša metoda za tipizacijo bakterij *L. monocytogenes* in drugih bakterij z največjo močjo razlikovanja. Metoda omogoča zanesljivo razlikovanje tudi tistih bakterijskih izolatov, ki se razlikujejo le v nekaj nukleotidih. V zadnjih letih WGS vse bolj nadomešča druge genotipizacijske metode, vključno s PFGE. Metoda WGS poleg večje moči razlikovanja omogoča tudi vpogled v celoten genom organizma, je zelo robustna (ponovljiva in zanesljiva) in temelji na filogeniji (odraža prave sorodstvene odnose med organizmi) (Moura in sod., 2016).

Metoda WGS je že v nekaj letih znatno izboljšala epidemiološki nadzor listerioze. Z njeno uporabo so zanesljivo opredelili oz. potrdili številne izbruhe listerioze, ki jih metoda PFGE ni uspela potrditi (ozko sorodni izolati z različnim profilom PFGE), in ovrgli številne domnevne izbruhe, pri katerih je imela metoda PFGE nezadostno moč razlikovanja (Chen in sod., 2017b; Jackson in sod., 2016; Kwong in sod., 2016; Reimer in sod., 2019). Z metodo WGS so retrogradno podrobno opredelili in ponovno definirali izbruhe (Moura in sod., 2017; Reimer in sod., 2019). Metoda WGS je olajšala tudi ugotavljanje vira okužbe in prisotnosti perzistentnih sevov v živilskopredelovalnih obratih (Moura in sod., 2016). V ZDA so prospektivno tipizacijo izolatov *L. monocytogenes* uvedli leta 2013; vpeljava metode WGS je že v treh letih pripeljala do ugotavljanja več primerov izbruuhov v primerjavi s prejšnjimi leti in identifikacije vira okužbe pri sporadičnem primeru bolezni (Jackson in sod., 2016).

Dva glavna tipizacijska pristopa, ki temeljita na podatkih WGS, sta tipizacija na osnovi alelov in tipizacija na osnovi polimorfizmov posameznih nukleotidov (angl. *single nucleotide polymorphism*, SNP). Prvi pristop ugotavlja število alelov, drugi število nukleotidov, v katerih se izolati razlikujejo. Nadalje lahko pristop, ki temelji na aleilih, razdelimo na (Moura in sod., 2016; Nadon in sod., 2017):

- tipizacijo na osnovi alelov osrednjega genoma (angl. *core-genome MLST*, cgMLST), ki zajema visoko ohranjene alele, prisotne pri skoraj vseh (običajno 95–99 %) izolatih *L. monocytogenes*;
- tipizacijo na osnovi alelov celotnega genoma (angl. *whole-genome MLST*, wgMLST), ki poleg ohranjenih alelov osrednjega genoma zajema tudi manj ohranjene alele dodatnega genoma (tj. gene, ki so prisotni le pri določeni skupini izolatov; angl. *accessory genome*). Ker pri tipizaciji wgMLST primerjamo vse alele, ki so skupni preučevanim izolatom, ima ta večjo moč razlikovanja od tipizacije cgMLST.

Vsek od omenjenih pristopov ima svoje prednosti in pomanjkljivosti. Glavne prednosti tipizacije na osnovi alelov so možnost vzpostavitve enotne nomenklature, enostavna izmenjava rezultatov v obliki alelnih podpisov in računalniško manj zahtevna obdelava podatkov, vendar tipizacija zahteva predhodno izdelavo robustne sheme alelov. Glavni prednosti tipizacije na osnovi SNP sta velika moč razlikovanja in možnost rekonstrukcije pravega filogenetskega drevesa, vendar je tipizacija računalniško zahtevna, bolj občutljiva za rekombinacijske dogodke, zajema samo eno vrsto mutacij (tj. SNP) in je odvisna od uporabljenih parametrov in izbora referenčnega genoma (Henri in sod., 2017; Schürch in sod., 2018). Številne raziskave so pokazale, da uporaba različnih WGS-tehnologij in WGS-pristopov za tipizacijo bakterije *L. monocytogenes* po večini daje primerljive rezultate in vodi v enake zaključke pri preiskavah izbruhov (Henri in sod., 2017; Reimer in sod., 2019).

2.3.3.1 Preiskave izbruhov listerioze z metodo WGS

Pri preiskavah izbruhov z metodo WGS želimo opredeliti sev (ozko sorodno gručo izolatov) *L. monocytogenes*, ki je povzročil izbruh. Pričakujemo, da so epidemiološko povezani izolati tudi ozko genetsko sorodni, saj izvirajo iz istega vira oz. imajo v evolucijskem smislu zelo nedavnega skupnega prednika. Pri opredelitvi epidemiološko povezane gruče izolatov nam pomagajo tudi ozko sorodni, a epidemiološko nepovezani izolati *L. monocytogenes*. Ti se na filogenetskem drevesu uvrščajo poleg epidemiološko povezanih izolatov, vendar ne skupaj z njimi, ter na ta način pomagajo pri zanesljivi opredelitvi gruče mikrobiološko povezanih izolatov (Pightling in sod., 2018; Schürch in sod., 2018).

V zadnjih letih so raziskovalci na podlagi prehodnih izbruhov listerioze predlagali različne meje za zamejitev epidemiološko povezanih gruč izolatov *L. monocytogenes*, npr. 5 SNP in 7–10 alelov cgMLST (EFSA-ECDC, 2018; Moura in sod., 2016; Ruppitsch in sod., 2015). Po drugi strani so opisani primeri izbruhov, ki presegajo omenjene meje. Največja do danes opisana raznolikost epidemiološko povezanih izolatov, pridobljenih v okviru preiskave izbruha, je bila 67 SNP (izbruh s sladoledom, ZDA, 2015) in 43 alelov wgMLST (izbruh s koščičastim sadjem, ZDA, 2014) (Jackson in sod., 2016). Večjo genetsko raznolikost izolatov pričakujemo predvsem pri dolgo trajajočih izbruhih ter primerih, pri katerih prihaja do večkratne kontaminacije iz več virov in/ali virov z genetsko raznoliko populacijo *L. monocytogenes* (npr. naravno okolje) (Pightling in sod., 2018; Reimer in sod., 2019). Zato številni raziskovalci svetujejo, da se predlagana meja uporablja zgolj kot vodilo in ne pravilo pri zamejitvi

epidemiološko povezane gruče izolatov. V rekonstrukcijo filogenetskega drevesa je treba vključiti čim več ozko sorodnih, a epidemiološko nepovezanih izolatov, ter izbruh interpretirati v kontekstu filogenije. Za dokončno potrditev izbruga ostajajo ključni tudi epidemiološki podatki (Chen in sod., 2017a; Chen in sod., 2017b; Pightling in sod., 2018; Reimer in sod., 2019).

Z vidika interpretacije mikrobioloških povezav med izolati v evolucijskem kontekstu ločimo tri oblike razvrščanja epidemiološko povezanih izolatov v skupine oz. topologij filogenetskega drevesa (Pightling in sod., 2018):

- monofiletsko razvrščanje, pri katerem se preiskovani izolati razvrščajo skupaj in oblikujejo jasno ločeno skupino glede na ozko sorodne, a epidemiološko nepovezane izolate;
- parafiletsko razvrščanje, pri katerem se preiskovani izolati razvrščajo skupaj, vendar se v to skupino uvrščajo tudi ozko sorodni, a epidemiološko nepovezani izolati;
- polifiletsko razvrščanje, pri katerem se preiskovani, epidemiološko povezani izolati ne razvrščajo skupaj na filogenetskem drevesu.

Pightling in sod. (2018) so na osnovi izkušenj s predhodnimi preiskavami izbruhov ugotovili, da monofiletsko in parafiletsko razvrščanje v kombinaciji s statistično dobro podprtим razvezjanjem, majhnimi genetskimi razlikami (< 20 SNP) ter epidemiološkimi podatki podpirata mikrobiološko povezavo med izolati, medtem ko jo polifiletsko razvrščanje zavrača.

2.4 POPULACIJSKA STRUKTURA BAKTERIJE *L. monocytogenes*

Bakterija *L. monocytogenes* je genetsko precej raznolika bakterija, ki jo razvrščamo v 13 serotipov in štiri filogenetske linije (I–IV). Pri izolatih iz naravnega okolja in kliničnega izvora najdemo predvsem filogenetski liniji I in II, medtem ko se liniji III in IV pojavljata le redko. Filogenetska linija I je značilno povezana s kliničnim izvorom, medtem ko je filogenetska linija II značilno povezana z živili in je tudi splošno razširjena v naravnem okolju (Maury in sod., 2016; Orsi in sod., 2011). Serotipi 1/2a, 1/2b in 4b so odgovorni za več kot 95 % vseh primerov listerioze pri ljudeh, zato ima serotipizacija le omejeno uporabnost za epidemiološki nadzor bolezni (Orsi in sod., 2011).

Raziskave populacijske strukture izolatov *L. monocytogenes* so nepogrešljivi del njihovega epidemiološkega nadzora, vendar je pri interpretaciji rezultatov potrebna previdnost. Zaradi velike genetske raznolikosti bakterije *L. monocytogenes* sta za zanesljiv opis njene populacijske strukture potrebni metoda z zadostno močjo razlikovanja in tipizacija velikega števila izolatov iz danega okolja. Epidemiološki duplikati (tj. časovno in geografsko povezani izolati z enakim genotipom, ki najverjetneje pripadajo istemu sevu) lahko zabrišejo pravo genetsko raznolikost v danem okolju, zato jih je iz analize populacijske strukture treba izločiti (Dreyer in sod., 2016b; Félix in sod., 2018). Nadalje se populacijska struktura med različnimi geografskimi regijami (npr. kontinenti) lahko razlikuje in s časom spreminja, zato je pri raziskavah populacijske strukture potrebna jasna opredelitev njihovega časovnega in geografskega okvira (Haase in sod., 2014; Jennison in sod., 2017).

Priljubljena in informativna metoda za opis genetske raznolikosti (populacijske strukture) bakterije *L. monocytogenes* je metoda MLST. Številne raziskave so pokazale, da se klonalni kompleksi (imenovani tudi kloni) *L. monocytogenes* razlikujejo v svoji ekofiziologiji in drugih značilnostih (npr. tropizem, virulensa) (Dreyer in sod., 2016; Félix in sod., 2018; Maury in sod., 2016; Painset in sod., 2019). Nedavna raziskava je pokazala, da so kloni CC1, CC2, CC4 in CC6 hipervirulentni in značilno povezani s kliničnim izvorom, medtem ko sta klena CC9 in CC121 hipovirulentna in povezana z živili (Maury in sod., 2016).

2.4.1 Populacijska struktura izolatov bakterije *L. monocytogenes* kliničnega izvora

Med kliničnimi izolati iz ljudi prevladujejo hipervirulentni kloni CC1, CC2, CC4, CC6 in CC8 (Kuch in sod., 2018; Maury in sod., 2016). Nedavna raziskava je pokazala tudi razliko v tropizmu klonov, saj se je prevalenca klonov pri različnih oblikah listerioze značilno razlikovala (Maury in sod., 2016):

- klon CC1 je značilno povezan z nevrolisteriozo in se pogosto pojavlja tudi pri osebah brez pridruženih obolenj;
- kloni CC1, CC2 in CC4 so značilno povezani z maternalno-neonatalno obliko bolezni;
- kloni CC8-CC16, CC9 in CC121 so povezani s septikemijo in se pogosteje pojavljajo pri bolnikih s pridruženimi obolenji.

Dosedanje raziskave kliničnih izolatov iz živali so manj obsežne. V Švici in Veliki Britaniji so med takimi izolati prevladovali kloni CC1, CC4 in CC412 (Dreyer in sod., 2016). V ZDA sta bila prevladujoča klona CC7 in CC14 (Steckler in sod., 2018). Nedavni raziskavi sta pokazali tudi močno povezavo klona CC1 z nevrolisteriozo pri govedu, kar, podobno kot pri ljudeh, nakazuje na njegovo nevrotropno naravo (Aguilar-Bultet in sod., 2018; Dreyer in sod., 2016).

Pri bakteriji *L. monocytogenes* je opisanih že več kot 100 determinant virulence, ki so po večini dobro ohranjene in se nahajajo v bakterijskem kromosomu (Camejo in sod., 2011; Painset in sod., 2019). Nekatere znane izjeme so (Maury in sod., 2016; Painset in sod., 2019):

- otoka patogenosti LIPI-3 in LIPI-4 ter gen *vip*, ki so značilno povezani s filogenetsko linijo I;
- geni *aut*, *gtcA*, *lmo0478*, *lmo1081*, *lmo1082*, *lmo2026*, *inlF* in SSI-1, ki so značilno povezani s filogenetsko linijo II.

Genetske in druge mikrofne determinante, ki pogojujejo različen tropizem klonov, so slabo poznane. Maury in sod. (2016) so z bioinformacijskim pristopom identificirali številne nove (domnevne) determinante virulence, med katerimi je bil tudi novo opisani otok patogenosti LIPI-4. Z *in vivo* poskusi na mišjem modelu so pokazali, da je otok LIPI-4 udeležen pri tropizmu klona CC4 do posteljice in možganskega tkiva. Nedavno so opisali vlogo internalina F (InlF) pri tropizmu do možganskega tkiva (Ghosh in sod., 2018) in vlogo internalina P (InlP) pri tropizmu do posteljice (Faralla in sod., 2016; Faralla in sod., 2018).

2.4.2 Populacijska struktura izolatov bakterije *L. monocytogenes* iz živil

Obsežne raziskave izolatov *L. monocytogenes* iz živil so pokazale, da so v živilih bolj zastopani kloni filogenetske linije II v primerjavi z izolati kliničnega izvora, med katerimi prevladujejo kloni filogenetske linije I. Živila sicer lahko vsebujejo genetsko zelo raznolike seve *L. monocytogenes*, vključno s kloni, ki so odgovorni za večino okužb pri ljudeh; prevalentni kloni so CC1, CC2, CC6, CC8-CC16, CC9 in CC121. Med temi sta z živili močno povezana klona CC9 in CC121, ki jih pogosto najdemo tudi v živilskopredelovalnih obratih (Ebner in sod., 2015; Félix in sod., 2018; Maury in sod., 2016).

Bakterija *L. monocytogenes* je sposobna perzistence – dolgotrajnega ohranjanja (običajno vsaj šest mesecev ali več) v istem živilskopredelovalnem obratu. Perzistenco pogosto povezujejo z ekofiziološko prilagoditvijo sevov na različne skrajne razmere (stresorje) v okolju, kot so odpornost proti težkim kovinam, protimikrobnim sredstvom in razkužilom (npr. kvartarne amonijeve spojine), sposobnost preživetja pri temperaturi hlajenja, povišani koncentraciji soli in kislem pH, odpornost proti oksidativnem stresu in izsuševanju ter sposobnost tvorbe biofilma (filmotvornost) (Pasquali in sod., 2018). Sevi, ki perzistirajo v živilskopredelovalnih obratih, običajno sodijo v filogenetsko linijo II. Nekateri kloni, pri katerih so opisali sposobnost perzistence, so CC5, CC8, CC9, CC14, CC121 in CC204 (Cherifi in sod., 2018; Muhterem-Uyar in sod., 2018; Pasquali in sod., 2018; Schmitz-Esser in sod., 2015; Stoller in sod., 2019).

Populacijska struktura listerij se razlikuje tudi med različnimi vrstami živil. Nedavna raziskava je pokazala, da so hipervirulentni kloni, zlasti CC1, značilno povezani z mlečnimi izdelki (Maury in sod., 2019). Poleg tega imajo večjo sposobnost kolonizacije črevesja in invazije notranjih organov. Po drugi strani sta hipovirulentna klona CC9 in CC121, ki sta značilno povezana z mesnimi izdelki, bolj prilagojena na preživetje v skrajnih razmerah in sposobna perzistence v živilskopredelovalnih obratih (Maury in sod., 2019).

Do danes je opisanih že vsaj 94 genetskih determinant, ki so povezane z ekofiziologijo sevov *L. monocytogenes* (Muhterem-Uyar in sod., 2018). Pri perzistenci naj bi bili udeleženi tudi ohranjeni mobilni genetski elementi, kot so profagi in plazmidi (Schmitz-Esser in sod., 2015; Verghese in sod., 2011).

2.4.3 Populacijska struktura izolatov bakterije *L. monocytogenes* iz naravnega okolja

Dosedanje raziskave izolatov *L. monocytogenes* iz naravnega in kmetijskega okolja so manj obsežne. V naravnem okolju najdemo genetsko zelo raznolike izolate *L. monocytogenes*, med katerimi prevladujejo izolati filogenetske linije II (Dreyer in sod., 2016). V naravnem in urbanem okolju so v več primerih ugotovili prisotnost klonov CC14, CC37, CC101 in CC517 (Linke in sod., 2014). Ugotovili so, da na kmetijah s prežvekovalci prevladujejo kloni CC1, CC4, CC14, CC37 in CC412 (Dreyer in sod., 2016). Na farmah prašičev prevladujejo kloni CC1, CC8, CC37, CC77 in CC224 (Félix in sod., 2018). Ameriška raziskava je pokazala, da sta klona ST382 in ST639 značilno povezana z naravnim okoljem (Lee in sod., 2018).

Zaključimo lahko, da večino klonov, ki prevladujejo med živalskimi in človeškimi kliničnimi izolati, najdemo tudi v naravnem okolju, in da so nekateri kloni najverjetneje značilno povezani z naravnim okoljem ter posledično prilagojeni na preživetje in ohranjanje v tovrstnem okolju.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZDRŽEVANJE IZOLATOV BAKTERIJE *L. monocytogenes*

Vsi izolati *L. monocytogenes*, ki so bili uporabljeni v tem delu, so bili izolirani in determinirani na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete po standardnem postopku, opisanem v ISO 11290-2:1998 (pred letom 2017) oz. ISO 11290-2:2017 (po letu 2017). Izolate smo vzdrževali na vbodnikih (kratkotrajno shranjevanje pri sobni temperaturi) oz. kot trajne kulture na poroznih steklenih kroglicah Microbank (Pro-Lab Diagnostics, Kanada; dolgotrajno shranjevanje pri -70°C).

3.2 IZOLACIJA GENOMSKE DNA IN NADZOR KAKOVOSTI

Bakterijske kulture, zrasle na krvnem agarju preko noči pri 37°C , smo suspendirali v $120 \mu\text{l}$ pufra *Enzymatic lysis buffer* (ELB; pH 8,0), ki je vseboval 20 mM Tris-Cl, 2 mM Na-EDTA in 1,2 % Triton X-100. Pufru ELB smo predhodno dodali lizocim (Sigma-Aldrich, ZDA) v končni koncentraciji $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Genomsko DNA smo izolirali s komercialnim kompletem »DNeasy & Tissue Kit« (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca (protokol za grampozitivne bakterije z dodatkom $400 \mu\text{g}$ RNaze A, Qiagen). Genomsko DNA smo eluirali v $120 \mu\text{l}$ pufra Tris (10 mM, pH 8,5; Roche, Švica). Koncentracijo genomske DNA smo izmerili s kompletem »Qubit dsDNA HS assay kit« in fluorometrom Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Integriteto genomske DNA smo opredelili z elektroforezo v 0,8 % agaroznem gelu, ki je potekala 90 min v 1-kratnem pufru TBE pri 100 V/cm . V jamice na gelu smo nanesli $\sim 100 \text{ ng}$ genomske DNA. Kot označevalec velikosti smo uporabili lestvico »DNA Lambda DNA/HindIII Marker« (Thermo Fisher Scientific). Gel smo obarvali z etidijevim bromidom in DNA vizualizirali z ultravijoličnim presvetljevalnikom, združenim s kamero za zajemanje slike GeneGenius (Syngene, Indija). Genomsko DNA smo do uporabe shranili pri -70°C .

Za pripravo knjižnic WGS smo uporabili le DNA, ki je izpolnjevala naslednje parametre kakovosti:

- koncentracija $> 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (koncentracijo smo izmerili s fluorometrom Qubit);
- večina genomske DNA potuje kot fragmenti DNA z velikostjo $> 10 \text{ kb}$ (integriteto DNA smo opredelili z agarozno gelsko elektroforezo);
- RNA ni prisotna (odsotnost RNA smo potrdili z agarozno gelsko elektroforezo).

3.3 Metoda PFGE

V okviru tega dela smo z metodo PFGE tipizirali 109 izolatov *L. monocytogenes*. Metodo smo izvedli po standardiziranem postopku PulseNet, opisanem v EURL *Lm* (Roussel in sod., 2014). Za cepitev genomske DNA smo uporabili encima *Apal* (Roche) in *AscI* (New England Biolabs). Elektroforezno ločitev v pulzirajočem električnem polju smo izvedli z instrumentom CHEF-DR II System (Bio-Rad, ZDA) v 1 % agaroznem gelu in 0,5-kratnem pufru TBE. Gel smo obarvali z etidijem bromidom in DNA vizualizirali z ultravijoličnim presvetljevalnikom, združenim s kamero za zajemanje slike GeneGenius. Profile PFGE smo analizirali s

programskim orodjem BioNumerics v7.6.3 (Applied Maths). Za izdelavo dendrograma podobnosti na osnovi kombiniranega profila PFGE *Ascl-ApaI* smo uporabili naslednje parametre: algoritem netehtane aritmetične sredine parnih vrednosti (UPGMA), koeficient Dice s toleranco 1 % in optimizacijo 1 %.

3.4 Metoda WGS

Sekvenciranje celotnih bakterijskih genomov (WGS), uporabljenih v tem delu, smo izvedli z dvema uveljavljenima tehnologijama sekvenciranja kratkih fragmentov DNA – Ion Torrent in Illumina. V obeh primerih smo s sekvenciranjem dosegli vsaj 30-kratno povprečno pokritost genoma, pri čemer smo pokritost izračunali po naslednji formuli:

$$\text{povprečna pokritost genoma} = \frac{\text{število odčitkov} \times \text{povprečna dolžina odčitkov}}{\text{velikost genoma}}$$

3.4.1 Tehnologija Ion Torrent

S tehnologijo Ion Torrent smo sekvencirali 25 izolatov *L. monocytogenes*; od tega smo 11 izolatov sekvencirali tudi s tehnologijo Illumina. Sekvenciranje smo izvedli na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete. Fragmentacijo genomske DNA na tarčno dolžino fragmentov ~400 bp smo izvedli encimsko ali mehansko. Za encimsko fragmentacijo DNA, ligacijo adapterjev in označevanje vzorcev s črtnimi kodami DNA smo uporabili komplet »GeneRead library prep kit« (Qiagen). Za mehansko fragmentacijo DNA smo uporabili inštrument M220 Focused-ultrasonicator (Covaris, ZDA). Za popravilo koncev DNA, ligacijo adapterjev in vezavo črtnih kod DNA smo uporabili komplet »GeneRead library prep kit« (Qiagen). Pripravljene knjižnice smo kvantificirali s kompletom »GeneRead library quant kit« (Qiagen) na pomnoževalniku ABI Prism (Thermo Fisher Scientific). Knjižnice smo redčili do koncentracije 100 pM in vezali na kroglice Ion Sphere Particles (Thermo Fisher Scientific). Obogatitev polnih kroglic (kroglic z matrično DNA) smo izvedli s kompletom »Ion PGM Template OT2 400 kit« na inštrumentu Ion OneTouch ES (Thermo Fisher Scientific). Klonalno namnožitev knjižnic na površini kroglic smo izvedli s kompletom »Ion PGM Template OT2 400 kit« na inštrumentu Ion OneTouch 2 (Thermo Fisher Scientific). Knjižnice smo nanesli na čip ustrezne zmogljivosti (Ion 316 Chip v2 ali Ion 318 Chip v2; Thermo Fisher Scientific). Sekvenciranje knjižnic z vključki dolžine ~400 bp smo izvedli s kompletom »Ion PGM Hi-Q View sequencing kit« na platformi Ion PGM (Thermo Fisher Scientific), pri čemer smo knjižnice sekvencirali z enega konca.

3.4.2 Tehnologija Illumina

S tehnologijo Ilumina so sekvencirali 149 izolatov *L. monocytogenes*; od tega smo 11 izolatov sekvencirali tudi s tehnologijo Ion Torrent. Sekvenciranje s tehnologijo Illumina so izvedli v sekvencijskem centru Source BioScience (Nottingham, Združeno kraljestvo) in v partnerski ustanovi »Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail« (ANSES; Maisons-Alfort, Francija). Genomsko DNA so mehansko fragmentirali z

ultrasonikatorjem Bioruptor (Diagenode) ali S2 Focused-ultrasonicator (Covaris). Knjižnice WGS so pripravili s kompletom »TruSeq Nano DNA library prep kit« (Illumina) ali »NEBNext Ultra II DNA library prep kit« (New England Biolabs). Nadzor kakovosti knjižnic so izvedli z elektroforezno ločitvijo na inštrumentu Bioanalyzer 2100 (Agilent, ZDA). Koncentracijo knjižnic so izmerili s fluorimetrom Qubit 3.0. Sekvenciranje knjižnic z vključki dolžine ~500 bp z obeh koncov (2×150 bp) so izvedli na sistemu NextSeq 500 (Illumina).

3.5 RETROSPEKTIVNE PREISKAVE IZBRUHOV LISTERIOZE

Slovenski referenčni laboratorij za bakterijo *L. monocytogenes* (SI NRL *Lm*), ki deluje pod okriljem Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete od leta 2008, hrani zbirko izolatov *L. monocytogenes*. Zbirka je dne 11. maja 2019 obsegala 1597 izolatov, med katerimi so prevladovali izolati iz živil, kmetijskega okolja in živalskih kliničnih primerov. Laboratorij SI NRL *Lm* v programski opremi BioNumerics hrani tudi molekularno-tipizacijske podatke. Do dne 13. maja 2019 je bilo 454 izolatov tipiziranih z metodo PFGE (kombiniran profil *Ascl-ApaI*). Za opredelitev uporabnosti metode WGS za retrospektivno analizo izbruhoval listerioze smo podatkovno zbirko pregledali z namenom ugotavljanja domnevnih izbruhoval listerioze pri živalih. Izbruh smo definirali kot vsaj dva živalska primera z laboratorijsko potrjeno listeriozo, ki sta bila epidemiološko in mikrobiološko povezana:

- epidemiološko povezanost smo definirali kot časovno in geografsko povezane izolate (isto leto izolacije, ista kmetija);
- mikrobiološko povezanost smo definirali kot izolate z enakim ali zelo podobnim ($> 90\%$ podobnost) kombiniranim profilom PFGE *Ascl-ApaI*.

Ugotovljene domnevne izbruhe listerioze pri živalih smo v nadaljevanju tipizirali z metodo WGS.

Metodo WGS smo uporabili tudi za podrobno opredelitev predhodno opisanega izbruha listerioze pri treh ljudeh v letu 2013, pri katerem je bila izvedena obsežna epidemiološka preiskava, vendar vira okužbe niso uspeli identificirati (NIJZ, 2014; UVHVVR, 2014; Zdovc, 2015). Z namenom primerjave uporabnosti tehnologij Ion Torrent in Illumina za opredelitev epidemiološko povezanih izolatov *L. monocytogenes* smo izolate, udeležene pri preiskavi omenjenega izbruha ($n = 7$), sekvincirali z obema tehnologijama.

Vsem epidemiološko povezanim izolatom smo določili MLST CC in jih tipizirali z različnimi analitičnimi pristopi, ki temeljijo na WGS (wgSNP, cgMLST in wgMLST) (poglavlje 3.7.9).

3.6 UGOTAVLJANJE POTI ŠIRJENJA BAKTERIJE *L. monocytogenes* V KMETIJSKEM OKOLJU

V okviru tega dela smo retrospektivno analizirali poti širjenja bakterije *L. monocytogenes* na dveh kmetijah (kmetiji G in H) ob pomoči tipizacije izolatov z metodama PFGE in WGS.

Kmetija G je bila srednje velika ekološka kmetija, na kateri je leta 2013 za nevrolisteriozo zbolela krava. V okviru epidemiološke preiskave, usmerjene v ugotavljanje vira okužbe krave z nevrolisteriozo, je bilo pridobljenih 36 izolatov, in sicer:

- izolat iz možganov krave z nevrolisteriozo ($n = 1$);
- izolati iz surovega mleka krav s subkliničnim mastitisom ($n = 9$);
- izolati iz blata košut brez kliničnih znakov bolezni ($n = 5$);
- izolat iz silaže ($n = 1$);
- izolati iz vode iz pipe v hlevu ($n = 5$);
- izolati iz vode iz napajalnika v hlevu ($n = 5$);
- izolati iz pitne vode iz gospodinjstva ($n = 5$);
- izolati iz vode iz mlakuže na dvorišču ($n = 5$).

Na kmetiji smo ugotovili velik delež krav s subkliničnim mastitisom (9/47; 19,1 %). Vse izolate smo tipizirali z metodo PFGE. Na osnovi kombiniranih profilov PFGE *Ascl-ApaI* smo 16 izolatov izbrali za sekvenciranje z metodo WGS in devet izolatov za *in vitro* testiranje invazivnosti in replikativnosti z gentamicinskim testom.

Kmetija H je bila velika kmetija, ki je proizvajala in prodajala surovo mleko. V mlekomatu, ki ga je oskrbovala kmetija H, smo leta 2018 ugotovili kontaminacijo surovega mleka z bakterijo *L. monocytogenes*. V okviru epidemiološke preiskave, usmerjene v ugotavljanje vira kontaminacije surovega mleka iz mlekomata, je bilo pridobljenih osem izolatov, in sicer:

- dva izolata iz mlekomata ($n = 2$);
- dva izolata iz starega robota za molžo ($n = 2$);
- dva izolata iz cisterne ($n = 2$);
- izolat iz vode iz zajetja ($n = 1$);
- izolat iz umazane vode iz okolja ($n = 1$).

Vse izolate smo tipizirali z metodo PFGE. Na osnovi kombiniranega profila *Ascl-ApaI* smo dva izolata izbrali za sekvenciranje z metodo WGS.

3.7 BIOINFORMACIJSKA OBDELAVA PODATKOV

Vso obdelavo podatkov z odprtokodnimi, samostojnimi bioinformacijskimi programi, ki temeljijo na operacijskem sistemu Linux, smo izvedli na strežniku PowerEdge R730 Server (Dell), ki se nahaja na Veterinarski fakulteti. Strežnik ima 56 virtualnih jader in temelji na operacijskem sistemu Debian, ki je priljubljena in vplivna distribucija GNU/Linux.

3.7.1 Nadzor kakovosti odčitkov

Odčitke (angl. *reads*) smo analizirali v formatu FASTQ. Z orodjem cutadapt v1.18 (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/guide.html>) smo odstranili odčitke ali dele odčitkov slabe kakovosti (vrednost Q < 20) in ostanke adapterjev. Vrednost Q, tudi vrednost Phred, meri verjetnost napake za napačno odčitan nukleotid v odčitku; vrednost Q = 20 ustreza 1 %

verjetnosti za napako. Odčitki slabe kakovosti in ostanki adapterjev lahko motijo nadaljnjo bioinformacijsko obdelavo podatkov, npr. sestavljanje odčitkov (angl. *genome assembly*) v soseske (angl. *contigs*). Za nadzor kakovosti odčitkov, ki smo jih dobili z orodjem cutadapt (angl. *trimmed reads*), smo uporabili orodje FastQC v0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). V nadaljnjo analizo smo zajeli le odčitke, ki so ustrezali naslednjim parametrom kakovosti (status 'PASS'): splošni statistični parametri (angl. *basic statistics*), kakovost nukleotidov (angl. *per base sequence quality*) in kakovost odčitkov (angl. *per sequence quality scores*).

3.7.2 Sestavljanje odčitkov v soseske

Odčitke, ki smo jih pridobili z orodjem cutadapt v1.18, smo sestavili v soseske z orodjem SPAdes v3.13.0 (Bankevich in sod., 2012). Za sestavljanje odčitkov Illumina dolžine <175 bp smo uporabili parametra --careful -k 21,33,55,67,77. Za sestavljanje odčitkov Ion Torrent dolžine 400 bp smo uporabili naslednje parametre: --careful --iontorrent -k 21,33,55,77,99,127.

3.7.3 Nadzor kakovosti sosek

Soseskam, ki smo jih pridobili z orodjem SPAdes, smo opredelili parametre kakovosti z orodjem QUAST v5.0.2 (Gurevich in sod., 2013). V nadaljnjo bioinformacijsko analizo smo vključili le genome, ki so zadostili naslednjim kriterijem kakovosti:

- vrednost $N_{50} > 20$ kb;
- število sosek dolžine > 1000 bp manjše od 500;
- skupna dolžina sosek približno enake velikosti kot genom bakterije *L. monocytogenes* (3,0 Mb).

Na ta način smo v nadaljnjo analizo vključili le genome, ki so bili dobro pokriti (ni bilo obširnih manjkajočih regij v genomu), niso bili znatno kontaminirani s sevi iste ali druge vrste in kjer je bilo sestavljanje v soseske uspešno (genom ni bil prekomerno fragmentiran).

3.7.4 Izdelava bakterijskih psevdokromosomov

Pridobljene soseske smo uredili in sestavili v psevdokromosom z orodjem MeDuSa v1.6 (Bosi in sod., 2015), pri čemer smo za referenco uporabili ozko sorodni, zaključeni genom, ki je pripadal istemu MLST ST kot analizirani izolat.

3.7.5 Anotacija bakterijskih genomov

Bakterijske genome smo anotirali z orodjem PROKKA v1.13 (Seemann, 2014), pri čemer smo uporabili parametra --genus *Listeria* --species *monocytogenes*.

3.7.6 Analiza prisotnosti/odsotnosti determinant virulence

Izdelali smo obširen nabor 151 podrobno opredeljenih (potrjenih) in kandidatnih determinant virulence pri vrsti *L. monocytogenes*, ki je vključeval:

- 111 determinant virulence, predhodno opisanih v literaturi (Camejo in sod., 2011; Faralla in sod., 2016; Maury in sod., 2016) ali vključenih v javno dostopni podatkovni zbirkki Institut Pasteur BIGSdb-*Lm* Database (<https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>) in CGE VirulenceFinder Database (https://bitbucket.org/genomicepidemiology/virulence_finder);
- 40 nedavno opisanih kandidatnih determinant virulence, ki so značilno povezane s hipervirulentnimi kloni (Aguilar-Bultet in sod., 2018; Maury in sod., 2016).

Determinante virulence ($n = 151$) smo za večjo preglednost razdelili v tri skupine (**Priloga 1**):

- dobro opredeljene determinante virulence ($n = 31$), ki so obsegale gene LIPI-1, LIPI-3, LIPI-4 in gene za internaline (*inl*);
- preostale predhodno opisane (podrobno opredeljene in kandidatne) determinante virulence ($n = 80$);
- nedavno opisane kandidatne determinante virulence, ki so značilno povezane s kliničnim izvorom ($n = 40$).

Prisotnost determinant virulence smo ugotavljali z algoritmom BLASTn (Altschul in sod., 1990) z naslednjimi parametri: -perc_identity 70 -qcovs 70 -word_size 11. Na ta način smo kot kriterija za prisotnost gena uporabili 70 % pokritost in 70 % identičnost v nukleotidnem zaporedju. Za ugotavljanje mutacij, ki vodijo v pojav prezgodnjega stop kodona v genu *inlA* (ta vodi v nastanek okrnjene beljakovine InlA) in so povezane s hipovirulenco (Van Stelten in sod., 2016), smo pridobljena zaporedja poravnali z algoritmom CLUSTAL W v2.1 (Thompson in sod., 1994) in izvedli *in silico* translacijo v orodju Geneious v11.0.4.

V primeru izolatov iz kmetije G, ki smo jih sekvencirali v tem delu, smo pridobljen vzorec prisotnosti/odsotnosti determinant virulence prikazali ob filogenetskem drevesu. Za ta namen smo z orodjem EDGAR v2.3 (Blom in sod., 2016) izdelali poravnavo domnevnih aminokislinskih zaporedij genov osrednjega genoma. Filogenetsko drevo največjega verjetja (angl. *maximum likelihood*) na osnovi zaporedij osrednjega genoma smo rekonstruirali z orodjem RAxML v8.1.22 (Stamatakis, 2014) z naslednjimi parametri: -f a -p 12345 -m BLOSUM62 -x 1000. Filogenetsko drevo smo anotirali z orodjem iTOL v4.3 (Letunic in Bork, 2019).

Za analizo prisotnosti/odsotnosti determinant virulence pri klonih, ki so značilno povezani z virom izolacije ali klinično obliko listerioze, smo sestavili nabor 60 javno dostopnih, naključno izbranih genomov (po 10 genomov na posamezen klon) (**Priloga 2**). Relativne frekvence prisotnosti genov znotraj posameznega klena smo prikazali kot topotni diagram (angl. *heatmap*), ki smo ga izdelali z orodjem Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). Hierarhično razvrščanje klonov v skupine na

osnovi prisotnosti/odsotnosti determinant virulence smo izvedli s povprečno metodo (angl. *average linkage method*) in rezultate grafično prikazali kot dendrogram podobnosti.

3.7.7 Analiza profagnih zaporedij

Profagna zaporedja v bakterijskih psevdokromosomih smo ugotavljali z orodjem PHASTER (Arndt in sod., 2016). V analizo smo vključili le intaktna profagna zaporedja. Mesto insercije profaga smo določili na osnovi anotiranega genoma (psevdokromosoma), ki smo ga vizualizirali z orodjem Artemis v18.0.2 (<https://github.com/sanger-pathogens/Artemis>).

3.7.8 Analiza plazmidnih zaporedij

Prisotnost plazmidnih zaporedij smo ugotavljali z orodjem plasmidSPAdes v3.13.0 (Antipov in sod., 2016) in PLSDB v2019_03_05 (Galata in sod., 2019) s privzetimi nastavtvami. Za ugotavljanje plazmidnih zaporedij z orodjem plasmidSPAdes smo kot vhodno datoteko uporabili odčitke v formatu FASTQ in parameter --careful, v primeru odčitkov Ion Torrent smo dodali še parameter --iontorrent. Za ugotavljanje plazmidnih zaporedij z orodjem PLSDB smo kot vhodno datoteko uporabili soseske in parameter mash screen. Ugotovljena plazmidna zaporedja smo razvrstili v eno od treh skupin na osnovi njihove mobilnosti (mobilni, nemobilni ali konjugativni) z modulom mob_typer, integriranem v orodju MOB-suite v1.4.9.2 (Robertson in Nash, 2018).

Ker so determinante odpornosti proti stresorjem pogosto zapisane v plazmidih, smo njihovo prisotnost ugotavljali v rekonstruiranih plazmidnih zaporedjih. Za ta namen smo uporabili orodje Sequence query, ki je integrirano v podatkovni zbirki Institut Pasteur BIGSdb-*Lm* (<https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>). Rezultate smo dodatno preverili tudi z avtomatsko anotacijo plazmidnih zaporedij v podatkovni zbirki NCBI.

3.7.9 WGS-tipizacija

Za ugotavljanje epidemiološke povezave med izolati *L. monocytogenes* smo izolate tipizirali na osnovi podatkov WGS (WGS-tipizacija) s tremi analitičnimi pristopi, integriranimi v programsko opremo BioNumerics:

- tipizacija **cgMLST**, ki temelji na shemi Pasteur Institute PubMLST (<https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/>) in vključuje 1748 lokusov osrednjega genoma;
- tipizacija **wgMLST**, ki temelji na shemi BioNumerics in vključuje 4797 lokusov celotnega genoma (<http://www.applied-maths.com/news/listeria-monocytogenes-whole-genome-sequence-typing>);
- tipizacija **wgSNP**.

Za tipizacijo cgMLST in wgMLST smo izrisali dendrograme podobnosti z netehano aritmetično sredino parnih vrednosti (UPGMA). Za tipizacijo wgSNP smo uporabili ozko sorodno referenco, ki je pripadala enakemu ST kot preiskovani izolati. Za filtracijo SNP visoke

kakovosti smo uporabili predlogo »Strict SNP Filter (closed SNP set)«. Pridobljeno poravnava iz konkateniranih SNP smo uporabili za rekonstrukcijo filogenetskega drevesa po metodi največjega verjetja z orodjem RAxML s parametrom -X 1000 -m GTRGAMMA. Filogenetska drevesa smo anotirali s programom iTol v4 (Letunic in Bork, 2019).

3.8 ANALIZA POPULACIJSKE STRUKTURE IZOLATOV BAKTERIJE *L. monocytogenes*

Zaradi klonalne narave bakterije *L. monocytogenes* je metoda MLST primerna za opredelitev njene populacijske strukture. Za opredelitev populacijske strukture izolatov *L. monocytogenes* iz naravnega okolja in živalskega kliničnega okolja smo sestavili dve obširni podatkovni zbirki (Naravno okolje in Živalski klinični izvor). Osnovo za izdelavo podatkovnih zbirk je predstavljalo 205 izolatov, ki smo jih tipizirali v okviru tega doktorskega dela. Ti so vključevali izolate iz naravnega okolja ($n = 40$) in živalskega kliničnega izvora ($n = 55$) iz Slovenije (SI) ter 110 izolatov živalskega kliničnega izvora iz Francije (FR). Iz analize smo izključili vse epidemiološke duplike, ki smo jih definirali kot časovno in geografsko povezane izolate z enakim profilom PFGE ali ≤ 7 aleli razlike v shemi cgMLST.

K 205 izolatom, ki smo jih tipizirali v okviru tega doktorskega dela, smo dodali 398 predhodno tipiziranih izolatov iz literature. Za zagotovitev konsistentnosti rezultatov pri analizi populacijske strukture z meta-analitičnim pristopom smo v analizo vključili le izolate iz različnih evropskih držav, ki so bili izolirani v obdobju 2008–2018. Iz analize smo izločili vse izolate iz možganov živali brez patohistološko potrjene nevrrolisterioze. Izolate, ki so izvirali iz Slovenije in so bili tipizirani v okviru tega dela, smo analizirali tudi ločeno od celotne podatkovne zbirke. V vsaki analizirani skupini smo frekvenco klonov definirali kot število izolatov izbranega CC, medtem ko smo relativno frekvenco klonov definirali kot odstotek izolatov izbranega CC v celotni preiskovani (pod)množici izolatov. Seznam vseh 603 izolatov in njihovih metapodatkov je dostopen v elektronski različici članka Papić in sod. (2019).

3.8.1 MLST-tipizacija

Klonalne komplekse (CC) izolatov smo določili z dvema metodama: (i) MLST-tipizacijo, ki temelji na metodi PFGE (poglavlje 3.8.1.1), in/ali (ii) *in silico* MLST-tipizacijo, ki temelji na podatkih metode WGS (poglavlje 3.8.1.2).

3.8.1.1 MLST-tipizacija na osnovi profila PFGE *Ascl-ApaI*

Izolatom, ki so bili v tem delu tipizirani le z metodo PFGE *Ascl-ApaI* in ne z metodo WGS ($n = 148$), smo pripisali ujemajoč MLST CC po predhodno opisani metodi (Félix in sod., 2018) s programom BioNumerics v7.6.3 (Applied Maths). Metoda temelji na dobrem (92 %) ujemaju med kombiniranim profilom PFGE *Ascl-ApaI* in MLST CC, kar omogoča zanesljiv pripis ujemajočega MLST CC na osnovi ≥ 85 % podobnosti v kombiniranem profilu *Ascl-ApaI*.

(Félix in sod., 2018). MLST CC, ki jih na osnovi omenjenih kriterijev podobnosti nismo mogli medsebojno razlikovati, smo združili v kombiniran CC (npr. CC4-CC217).

3.8.1.2 *In silico* MLST-tipizacija na osnovi WGS

Izolatom, ki smo jih v tem delu sekvencirali z metodo WGS ($n = 78$), smo *in silico* določili MLST-tip z orodjem Sequence query, integriranem v orodja Institut Pasteur BIGSdb-*Lm* (<https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>). Če je bil izolat tipiziran z obema pristopoma, smo v primeru neskladij upoštevali rezultate *in silico* MLST-tipizacije.

3.8.2 Izdelava minimalnega vpetega drevesa

Populacijsko strukturo izolatov *L. monocytogenes* v obeh podatkovnih zbirkah smo grafično predstavili kot minimalno vpeto drevo (angl. *minimum spanning tree*), ki smo ga izdelali s programsko opremo BioNumerics. V programsko opremo smo uvozili alelne profile za vse sekvenčne tipe (ST) (dostopni na <https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>). Pri izolatih, ki so bili tipizirani le z metodo PFGE, smo uporabili alelni profil ustanoviteljskega ST (angl. *founder ST*), tj. ST, ki ima veliko zastopanost v podatkovni zbirki in oblikuje osrednje vozlišče na minimalnem vpetem drevesu (npr. ST1 za CC1).

3.8.3 Analiza taksonomske raznolikosti izolatov bakterije *L. monocytogenes*

Taksonomsko raznolikost smo ocenili na osnovi Simpsonove cenilke raznolikosti (1–D). Ta je odvisna od števila taksonov in njihove relativne zastopanosti ter meri verjetnost, da dva naključno izbrana izolata pripadata različnima taksonoma (klonom). Cenilko smo izračunali s spletnim računalom Comparing Partitions (<http://www.comparingpartitions.info>).

Taksonomsko raznolikost izolatov bakterije *L. monocytogenes* v obeh podatkovnih zbirkah smo ocenili tudi na osnovi **rarefakcijske krivulje**, ki prikazuje genetsko raznolikost izolatov v podvzorcu vseh preiskovanih izolatov v odvisnosti od njegove velikosti. Krivulji smo izrisali s paketoma iNEXT v2.0.17 (<https://cran.r-project.org/web/packages/iNEXT/>) in ggplot2 v3.0.0 (<https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/>) v orodju R v3.4.3 (<https://cran.r-project.org/>).

3.8.4 Podatkovna zbirka Naravno okolje

Podatkovna zbirka Naravno okolje je vključeval izolate *L. monocytogenes* iz različnih tipov vzorcev iz naravnega okolja ($n = 253$), vključno s kmetijskim okoljem in izolati iz fecesa živali brez kliničnih znakov bolezni. Zbirka ni vključevala izolatov iz živil ali živilskopredelovalnih obratov. Sestavili smo jo iz naslednjih dveh podmnožic podatkov:

- podmnožica **SI**: 40 izolatov iz Slovenije, ki so bili tipizirani v okviru tega dela;

- podmnožica **Druge evropske države**: 213 predhodno tipiziranih izolatov iz Avstrije, Češke, Finske, Nemčije, Velike Britanije, Grčije, Italije, Portugalske in Švice (Dreyer in sod., 2016; Haase in sod., 2014; Linke in sod., 2014; Lomonaco in sod., 2018).

Skupno smo za 34/253 (13,4 %) izolatov imeli podatek, da izvirajo iz krme. Te izolate smo združili v podatkovno podmnožico **Krma**.

3.8.5 Podatkovna zbirka Živalski klinični izvor

Podatkovna zbirka Živalski klinični izvor je vključevala izolate, ki so izvirali iz živali s potrjeno listeriozo in znano obliko bolezni ($n = 350$). Zbirko smo sestavili iz naslednjih treh podatkovnih podmnožic (**Tabela 2**):

- podmnožica **SI**: 55 izolatov iz Slovenije, ki so bili tipizirani v okviru tega dela;
- podmnožica **FR**: 110 izolatov iz Francije, ki so bili tipizirani v okviru tega dela;
- podmnožica **Druge evropske države**: 185 predhodno tipiziranih izolatov iz Švice in Velike Britanije (Aguilar-Bultet in sod., 2018; Dreyer in sod., 2016).

Podmnožica SI je zajemala vse klinične izolate iz živali s potrjeno listeriozo, izolirane v obdobju 2008–2018 ($n = 55$).

Tabela 2: Podatkovna zbirka izolatov Živalski klinični izvor ($n = 350$), stratificirana po klinični obliky listerioze. Zbirka je obsegala klinične izolate *L. monocytogenes* iz podmnožic izolatov iz Slovenije (SI), Francije (FR) in predhodno tipizirane isolate iz drugih evropskih držav (Druge evropske države).

Table 2: Animal clinical dataset ($n = 350$), stratified according to the clinical form of listeriosis. The dataset consisted of clinical *L. monocytogenes* isolates from Slovenia (SI), France (FR) and previously typed isolates from other European countries.

Klinična oblika listerioze	SI	FR	Druge evropske države	Vsota
Nevrolisterioza	45	10	139	194
Abortus	2	93	33	128
Druge klinične oblike*	8	7	13	28
Vsota	55	110	185	350

*Podmnožica ‘Druge klinične oblike’ je obsegala izolate iz živali z gastroenteritisom ($n = 7$), mastitisom ($n = 13$), očesno listeriozo ($n = 2$) in septikemijo ($n = 6$).

**Other clinical forms’ group included isolates from gastroenteritis ($n = 7$), mastitis ($n = 13$), ocular listeriosis ($n = 2$) and septicaemia ($n = 6$) cases.

Definicije oblik bolezni smo uskladili s predhodno opisanimi definicijami (Dreyer in sod., 2016):

- listerijski **abortus** smo definirali kot izolacijo bakterije *L. monocytogenes* iz abortiranega ploda ali posteljice;
- listerijski **gastroenteritis** smo definirali kot izolacijo bakterije *L. monocytogenes* iz fecesa živali z drisko in nevtrofildnim gastroenteritisom;
- listerijski **mastitis** smo definirali kot izolacijo bakterije *L. monocytogenes* iz vimenske četrte;
- **nevrolisteriozo** smo definirali kot izolacijo bakterije *L. monocytogenes* iz živčnega tkiva (možgani in podaljšana hrbtenjača) ob prisotnosti značilnih (patognomoničnih) patohistoloških sprememb;

- listerijsko **septikemijo** smo definirali kot izolacijo bakterije *L. monocytogenes* iz viscerálnih organov;
- **očesno** listeriozo smo definirali kot izolacijo bakterije *L. monocytogenes* iz očesa in prisotnost kliničnih znakov vnetja očesa.

3.8.6 Statistična obdelava podatkov

Statistično analizo smo izvedli s programom GraphPad v6.01 (GraphPad Software, ZDA). Vse povezave med MLST CC ali filogenetsko skupino in ostalimi značilnostmi izolatov (filogenetska linija, živalska vrsta, klinična oblika listerioza in vir izolacije) smo preverjali s Fisherjevim testom (angl. *Fisher's exact test*). S tem smo zagotovili, da povezava med preiskovano značilnostjo in prevalenco MLST CC ni bila odvisna le od absolutne frekvence MLST CC. Mejna *p*-vrednost za ugotavljanje značilnih razlik med pari izolatov je bila $\leq 0,05$.

Definicijo hiper- in hipovirulentnih klonov smo povzeli po predhodni objavi avtorjev Maury in sod. (2016). Da bi ugotovili statistično značilne povezave med relativno frekvenco hipovirulentnih klonov in klinično obliko listerioze, smo vse hipovirulentne klone (CC1, CC2, CC4 in CC6) združili v enotno skupino in izračunali njihovo relativno frekvenco znotraj vsake klinične oblike listerioze. Značilne povezave med hipovirulentnimi kloni in klinično obliko listerioze smo ugotavljali s Fisherjevim testom. Zaradi majhne frekvence izolatov iz živali z redkimi oblikami listerioze smo vse redke oblike listerioze (gastroenteritis, septikemija, očesna listerioza in mastitis) združili v eno skupino.

3.9 GENTAMICINSKI TEST

Za opredelitev sposobnosti invazije v gostiteljske celice (invazivnost) in znotrajceličnega namnoževanja (replikativnost) izolatov *L. monocytogenes* ($n = 9$) v celični liniji smo uporabili *in vitro* gentamicinski test. Izolati so izvirali iz preiskave poti širjenja bakterije *L. monocytogenes* na kmetiji G. Gentamicinski test temelji na principu zaščite znotrajceličnih bakterij pred gentamicinom, saj gentamicin ne prehaja celične membrane gostiteljskih (evkariontskih) celic, medtem ko so zunajcelične bakterije občutljive za gentamicin. Test smo izvedli v dveh različnih gostiteljskih celičnih linijah:

- goveja makrofagna celična linija (angl. *bovine macrophage cell line, BoMac*), ki so jo razvili na fakulteti VetSuisse (Bern, Švica; donator celične linije prof. dr. Matthias Schweizer);
- nepolarizirana epitelijska celična linija, ki izvira iz ledvic zelene zamorske mačke (**Vero** ATCC CCL-81).

Za vzdrževanje celične linije BoMac smo uporabili gojišče »Dulbecco's modified eagle medium« z dodanim 10 % fetalnim govejim serumom (Thermo Fisher Scientific) in brez dodanih antibiotikov. Za vzdrževanje celične linije Vero smo uporabili gojišče »Eagle's Minimum Essential Medium« (American Type Culture Collection, ZDA) z dodanim 10 % fetalnim govejim serumom (Thermo Fisher Scientific) in brez dodanih antibiotikov.

Gentamicinski test smo izvedli v 24-jamičnih ploščicah »TPP tissue culture plates 24 well plate« (Sigma-Aldrich) in s 500 µL delovnim volumnom po predhodno opisanem postopku (Dreyer in sod., 2016), ki smo ga nekoliko modificirali: (i) koncentracija gentamicina je bila 30 µg/mL in (ii) preučevani časi, pri katerih smo v celičnem lizatu določili kolonijske enote (angl. *colony forming unit*, CFU), so bili 2, 8 in 24 h po okužbi (angl. *post infection*, p.i.). CFU v bakterijskem inokulumu in celičnih lizatih smo določili z metodo polzeče kapljice (Kühbacher in sod., 2013). V sterilnih mikrotitrskih ploščicah smo pripravili 10-kratne redčitve bakterijskih suspenzij v fiziološki raztopini. Nato smo na vrh trdnega gojišča Brain heart infusion (BHI) v petrijevki premera 90 mm nanesli po šest bakterijskih suspenzij izbrane redčitve volumna 10 µL. Gojišče smo nato nagnili, da so kapljice spolzele v ravnih črtah do dna gojišča, s čimer smo olajšali štetje CFU. Gojišča smo inkubirali preko noči pri 37 °C in prešteli CFU v števnih redčitvah (redčitve z 1–100 CFU na vzorec). Rezultate smo normalizirali glede na število CFU v inokulumu, ki je znašal $\sim 3 \times 10^6$ CFU/mL. Multipliciteta okužbe (angl. *multiplicity of infection*, MOI) je znašala 10, kar ustreza 10 bakterijskim celicam na gostiteljsko celico. Invazivnost bakterij smo opredelili glede na število CFU pri času 2 h p.i. Replikativnost bakterij smo opredelili na osnovi njihovega koeficiente znotrajcelične rasti (angl. *intracellular growth coefficient*, IGC), ki smo ga izračunali po spodnji formuli:

$$\text{IGC} = \frac{\text{CFU (24 h p.i.)} - \text{CFU (2 h p.i.)}}{\text{CFU (2 h p.i.)}}$$

Vse poskuse smo izvedli v vsaj treh neodvisnih (bioloških) ponovitvah s tremi tehničnimi ponovitvami. Statistično obdelavo podatkov smo izvedli s programom GraphPad v6.01 (GraphPad Software, ZDA). Normalnost porazdelitve smo ugotavljali z D'Agostino-Pearsonovim testom. Nenormalne porazdelitve smo analizirali s Kruskal-Wallisovim testom in *post-hoc* Dunnovim testom multiplih parnih primerjav. Mejna *p*-vrednost za ugotavljanje značilnih razlik med pari izolatov je bila $\leq 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 UGOTAVLJANJE EPIDEMIOLOŠKIH POVEZAV MED IZOLATI BAKTERIJE *L. monocytogenes*

4.1.1 Izbruhi listerioze pri živalih

Pri preiskavi podatkovne zbirke SI NRL *Lm* smo retrospektivno ugotovili sedem kandidatnih (verjetnih) izbruhov listerioze pri drobnici (**Tabela 3**). Vsi epidemiološko povezani izolati so izkazovali enak profil PFGE *Ascl-ApaI* (podatki niso prikazani).

Tabela 3: Izbruhi listerioze pri drobnici v obdobju 2008–2018. CC, klonalni kompleks; ND, ni podatkov; ST, sekvenčni tip.

Table 3: Listeriosis outbreaks in small ruminants in the period 2008–2018. CC, clonal complex, ND, not defined ST; sequence type.

Oznaka izbruha	Obdobje izbruha	Klinična oblika	Oznaka kmetije	Živalska vrsta	Št. obolelih živali	Št. analiziranih izolatov	ST	CC
Izbruh 1	Januar 2018	Nevrolisterioza	Kmetija A	Koze	ND	2	ST1	CC1
Izbruh 2	Marec 2008	Nevrolisterioza	Kmetija B	Ovce	3	2	ST1	CC1
Izbruh 3	April 2018	Nevrolisterioza	Kmetija A	Koze	5	2	ST1	CC1
Izbruh 4	Februar 2013	Abortus	Kmetija C	Koze	ND	3	ST18	CC18
Izbruh 5	Maj 2014	Nevrolisterioza	Kmetija D	Koze	3	2	ST21	CC21
Izbruh 6	Januar–februar 2015	Nevrolisterioza	Kmetija E	Koze	ND	2	ST21	CC21
Izbruh 7	Maj–junij 2013	Nevrolisterioza, septikemija	Kmetija F	Koze, ovce	6	11	ST184	ST184

Vse domnevno epidemiološko povezane izolate smo tipizirali z metodo WGS in ugotovili naslednje klone: ST1 (CC1; $n = 3$), ST18 (CC18; $n = 1$), ST21 (CC21; $n = 2$) in ST184 ($n = 1$). Na osnovi WGS-tipizacije smo potrdili monoklonalno naravo vseh sedmih izbruhov (**Slike 2–5**). Epidemiološko povezani izolati so se razlikovali v največ 13 polimorfizmih wgSNP, sedmih alelih cgMLST in 12 alelih wgMLST. Ker so bili vsi izbruhovi podprtvi tudi z epidemiološkimi podatki in ker so bili časovno in geografsko omejeni, je najverjetnejše šlo za točkovne izbruhe, pri katerih so se živali znova posameznega izbruha okužile iz istega vira.

Minimalna genetska razdalja med različnimi izbruhi enakega MLST ST je bila majhna in se je približala maksimalni genetski razdalji znova izbruha (razdalji med epidemiološko povezanimi izolati) (**Tabeli 4 in 5**). Poleg tega smo v zbirki ugotovili sporadične, epidemiološko nepovezane izolate, ki so bili genetsko zelo ozko sorodni epidemiološko povezanim izolatom in so se v primeru izbruha 6 celo uvrščali v isto gručo (**Slika 4**).

Epidemiološko povezani izolati so na filogenetskem drevesu na osnovi wgSNP oblikovali monofletsko skupino. Monofletsko grupiranje epidemiološko povezanih izolatov je bilo zelo dobro statistično podprtvo (vrednost samovzorčenja s ponovitvami [angl. *bootstrap*] $\geq 99\%$) z izjemo izbruha ST21 (vrednost samovzorčenja s ponovitvami 69 %), ki bi lahko zaradi slabše statistične podpore skupaj z epidemiološko nepovezanimi, a ozko sorodnimi izolati, izkazoval parafiletsko grupiranje (**Slike 2–5**).

Izbruha 1 in 3, ki sta pripadala ST1 (CC1), sta bila epidemiološko povezana (izvirala sta iz iste kmetije, a s štirimesečno razliko v pojavu bolezni) in izkazovala enak profil PFGE, zato bi ju na podlagi rezultatov PFGE lahko označili kot enoten izbruh (podatki niso prikazani). Nasprotno je metoda WGS pokazala, da so se izolati med omenjenima izbruhoma razlikovali v najmanj 78 polimorfizmih wgSNP, zato smo ju opredelili kot dva ločena izbruha (**Slika 2**).

Izbruha 5 in 6 (ST21), katerih izolati so bili ozko sorodni (mikrobiološko povezani), smo kljub majhni medsebojni genetski razdalji izolatov interpretirali kot dva ločena, nepovezana izbruha. Izbruha sta se zgodila z osemmesečnim razmikom v isti občini, vendar njune epidemiološke povezave nismo mogli dokončno potrditi. Poleg tega so se sporadični, epidemiološko nepovezani izolati grupirali z epidemiološko povezanimi izolati (**Tabela 3, Slika 4**).

Izbruh 7 (ST184) je bil edini izbruh pri živalih, pri katerem smo v analizo vključili tudi izolate *L. monocytogenes* iz okolja, kar nam je omogočilo ugotavljanje potencialnega vira okužbe. Sev ST184, ki je bil odgovoren za izbruh, smo ugotovili tudi v vodi iz napajalnika in v silaži, ki sta bila najverjetnejši vir okužbe. Živali brez kliničnih znakov, ki so sev ST184 izločale v okolje z iztrebki, so najverjetneje doprinesle k ohranjanju in sklenitvi poti širjenja seva v kmetijskem okolju (**Sliki 5 in 6**).

Tabela 4: Minimalna in maksimalna genetska razdalja med epidemiološko povezanimi izolati bakterije *L. monocytogenes* (genetska raznolikost znotraj izbruha).

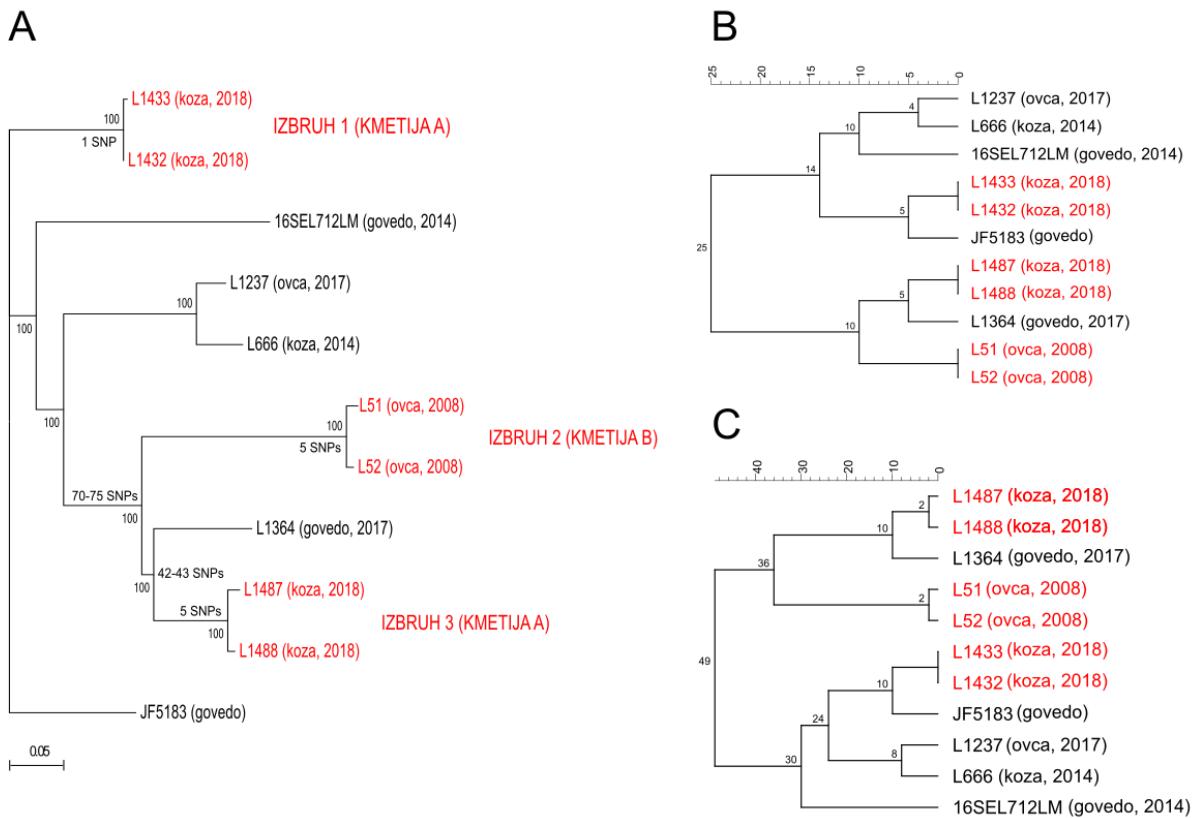
Table 4: Minimum and maximum pairwise allelic/SNP differences among the outbreak-associated *L. monocytogenes* isolates (intra-outbreak diversity).

Oznaka izbruha	ST	cgMLST (min–max)	wgMLST (min–max)	wgSNP (min–max)
Izbruh 1	ST1	0	0	1
Izbruh 2	ST1	0	2	5
Izbruh 3	ST1	0	2	5
Izbruh 4	ST18	1–3	3–4	3–4
Izbruh 5	ST21	2	5	6
Izbruh 6	ST21	7	8	13
Izbruh 7	ST184	0–4	0–12	3–6

Tabela 5: Minimalna in maksimalna genetska razdalja med izolati bakterije *L. monocytogenes* iz različnih izbruhov enakega sekvenčnega tipa (ST).

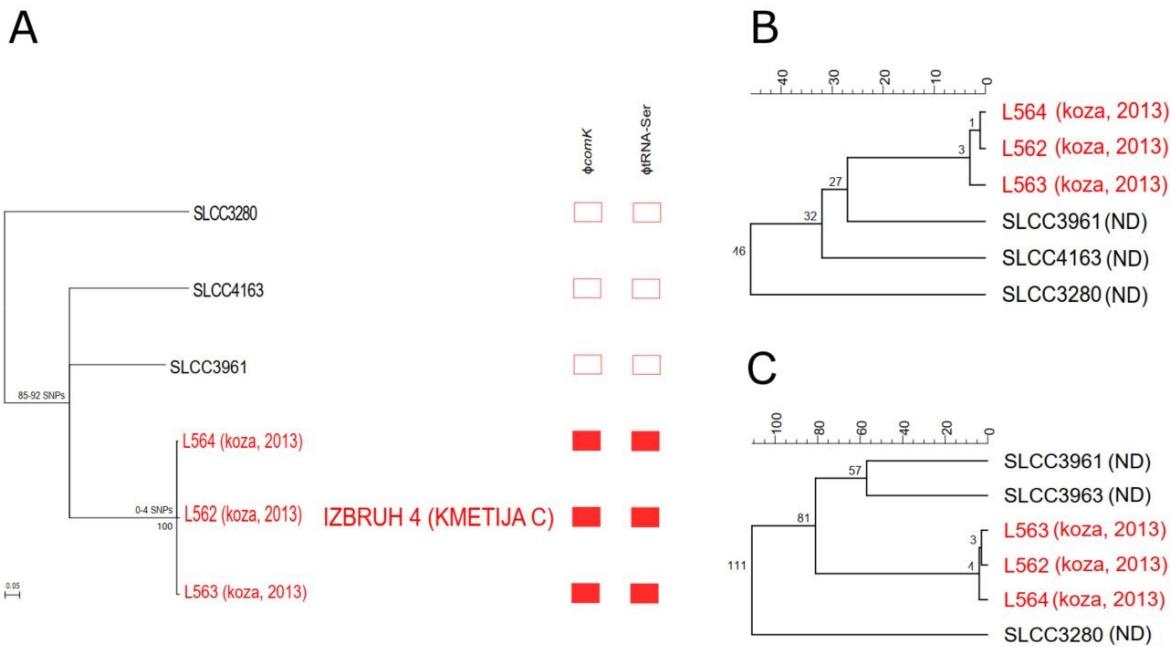
Table 5: Minimum and maximum pairwise allelic/SNP differences among *L. monocytogenes* isolates from different outbreaks of the same sequence type (inter-outbreak diversity).

Outbreak	MLST ST	cgMLST (min–max)	wgMLST (min–max)	wgSNP (min–max)
Outbreaks 1–3	ST1	10–25	21–42	70–103
Outbreaks 5–6	ST21	8–9	9–14	12–19



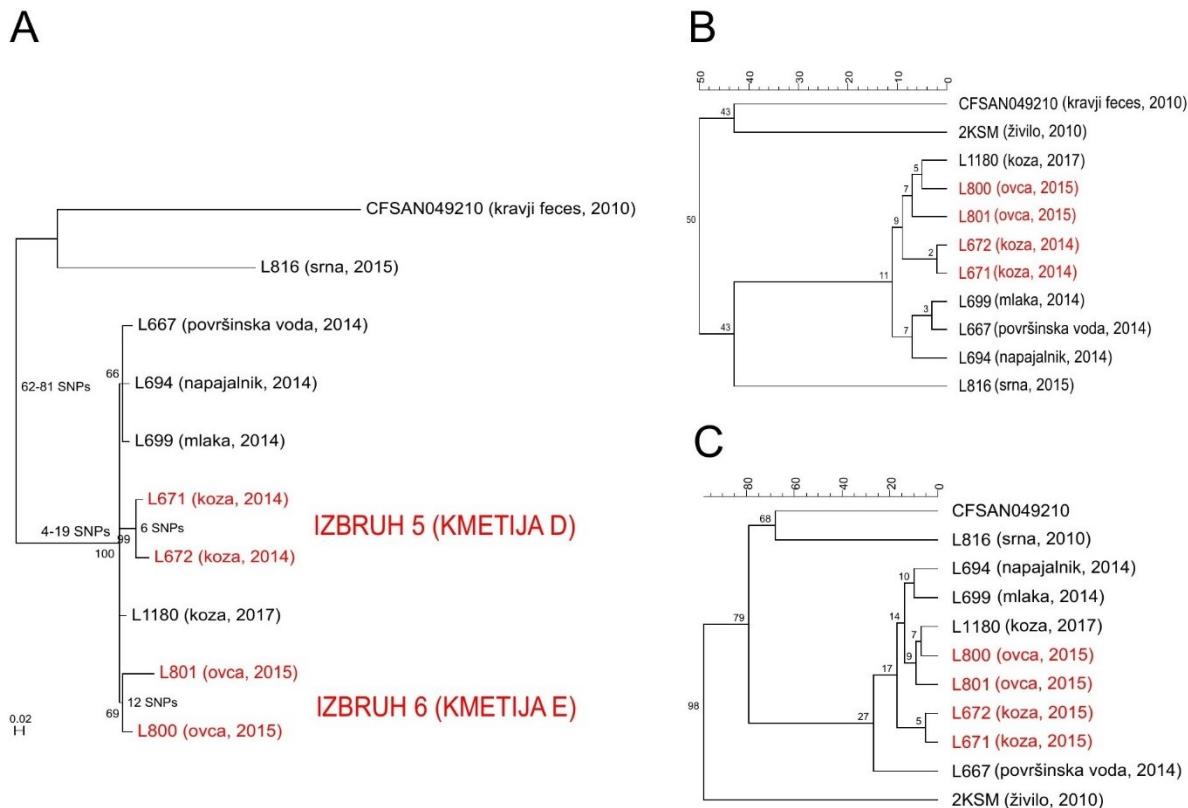
Slika 2: Izbruhi listerioze pri živalih, ki so jih povzročili sevi bakterije *L. monocytogenes* ST1. Epidemiološko povezani izolati so prikazani v rdeči barvi. **A**, filogenetsko drevo največjega verjetja na osnovi tipizacije wgSNP. Merilo prikazuje število nukleotidnih zamenjav na pozicijo. Na drevesu so prikazana števila polimorfizmov wgSNP in statistična podpora razvjejitev, pridobljena z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. **B**, dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije cgMLST. Merilo prikazuje število alelnih razlik. **C**, dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije wgMLST. Merilo prikazuje število alelnih razlik.

Figure 2: Animal listeriosis outbreaks caused by the *L. monocytogenes* ST1 strains. Outbreak isolates are denoted in red. **A**, maximum-likelihood phylogenetic tree constructed from wgSNP alignment. Pairwise wgSNP distance and bootstrap support (calculated from 1000 repetitions) are denoted on a tree. Scale, number of nucleotide substitutions per site. **B**, cgMLST dendrogram. Scale, number of allelic differences. **C**, wgMLST dendrogram. Scale, number of allelic differences.



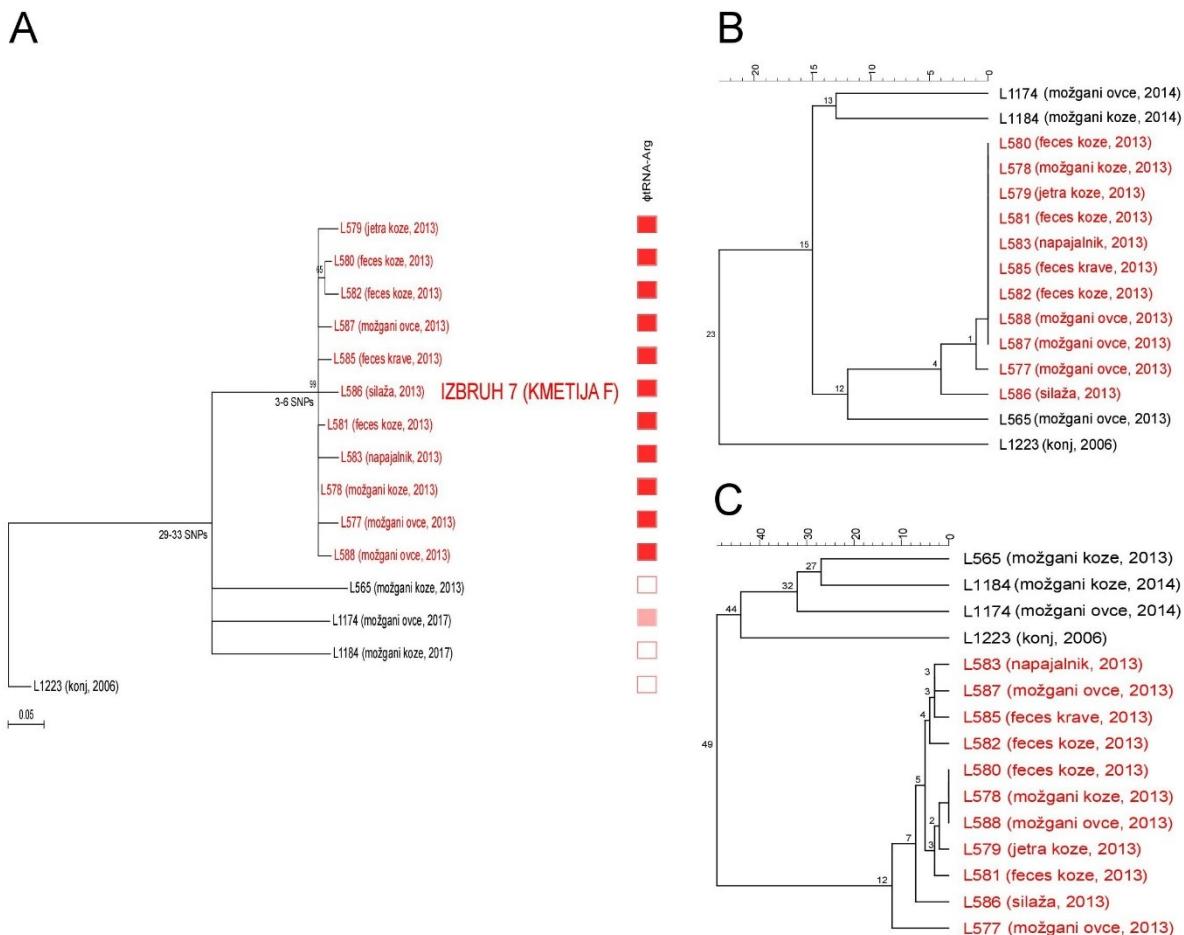
Slika 3: Izbruh listerioze pri živalih, ki ga je povzročil sev bakterije *L. monocytogenes* ST18. Epidemiološko povezani izolati so prikazani v rdeči barvi. **A**, filogenetsko drevo največjega verjetja na osnovi tipizacije wgSNP. Merilo prikazuje število nukleotidnih zamenjav na pozicijo. Ob drevesu je s polnimi kvadratki prikazana prisotnost mobilnih genetskih elementov, njihova odsotnost je prikazana s praznimi kvadratki. Na drevesu so prikazana števila polimorfizmov wgSNP in statistična podpora razvjejitev, pridobljena z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. **B**, dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije cgMLST. Merilo prikazuje število alelnih razlik. **C**, dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije wgMLST. Merilo prikazuje število alelnih razlik.

Figure 3: Animal listeriosis outbreak caused by the *L. monocytogenes* ST18 strain. Outbreak isolates are denoted in red. **A**, maximum-likelihood phylogenetic tree constructed from wgSNP alignment. Full squares besides the tree denote the presence and empty squares denote the absence of mobile genetic elements. Pairwise wgSNP distance and bootstrap support (calculated from 1000 repetitions) are denoted on a tree. Scale, number of nucleotide substitutions per site. **B**, cgMLST dendrogram. Scale, number of allelic differences. **C**, wgMLST dendrogram. Scale, number of allelic differences.



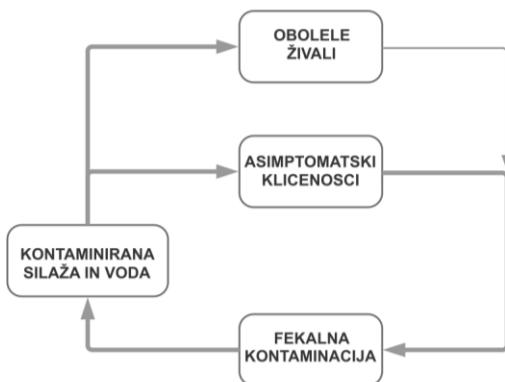
Slika 4: Izbruha listerioze pri živalih, ki sta ga povzročila seva bakterije *L. monocytogenes* ST21. Epidemiološko povezani izolati so prikazani v rdeči barvi. **A**, filogenetsko drevo največjega verjetja na osnovi tipizacije wgSNP. Merilo prikazuje število nukleotidnih zamenjav na pozicijo. Ob drevesu je s polnimi kvadratki prikazana prisotnost mobilnih genetskih elementov, njihova odsotnost je prikazana s praznimi kvadratki. Intenziteta barve sovпадa z odstotkom identičnosti v nukleotidnem zaporedju v primerjavi z epidemiološko povezanimi izolati. Na drevesu so prikazana števila polimorfizmov wgSNP in statistična podpora razvjejitev, pridobljena z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. **B**, dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije cgMLST. Merilo prikazuje število alelnih razlik. **C**, dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije wgMLST. Merilo prikazuje število alelnih razlik.

Figure 4: Animal listeriosis outbreaks caused by the two *L. monocytogenes* ST21 strains. Outbreak isolates are denoted in red. **A**, maximum-likelihood phylogenetic tree constructed from wgSNP alignment. Full squares next to the tree denote the presence and empty squares denote the absence of mobile genetic elements. Colour intensity indicates the percentage identity at the nucleotide level in comparison with the outbreak strain. Pairwise wgSNP distance and bootstrap support (calculated from 1000 repetitions) are denoted on a tree. Scale, number of nucleotide substitutions per site. **B**, cgMLST dendrogram. Scale, number of allelic differences. **C**, wgMLST dendrogram. Scale, number of allelic differences.



Slika 5: Izbruh listerioze pri živalih, ki ga je povzročil sev bakterije *L. monocytogenes* ST184. Epidemiološko povezani izolati so prikazani v rdeči barvi. **A**, filogenetsko drevo največjega verjetja na osnovi tipizacije wgSNP. Merilo prikazuje število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto. Ob drevesu je s polnimi kvadratki prikazana prisotnost mobilnih genetskih elementov, njihova odsotnost je prikazana s praznimi kvadratki. Intenziteta barve kvadratkov Sovpada z odstotkom identičnosti v nukleotidnem zaporedju v primerjavi z zaporedjem pri epidemiološko povezanih izolatih. Na drevesu so prikazana števila polimorfizmov wgSNP in statistična podpora razvejitev, pridobljena z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. **B**, dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije cgMLST. Merilo prikazuje število alelnih razlik. **C**, dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije wgMLST. Merilo prikazuje število alelnih razlik.

Figure 5: Animal listeriosis outbreak caused by the *L. monocytogenes* ST184 strain. Outbreak isolates are denoted in red. **A**, maximum-likelihood phylogenetic tree constructed from wgSNP alignment. Full squares next to the tree denote the presence and empty squares denote the absence of mobile genetic elements. Colour intensity indicates the percentage identity at the nucleotide level in comparison with the outbreak strain. Pairwise wgSNP distance and bootstrap support (calculated from 1000 repetitions) are denoted on a tree. Scale, number of nucleotide substitutions per site. **B**, cgMLST dendrogram. Scale, number of allelic differences. **C**, wgMLST dendrogram. Scale, number of allelic differences.



Slika 6: Najverjetnejše poti širjenja seva bakterije *L. monocytogenes* ST184 na kmetiji F.

Figure 6: Most likely on-farm transmission cycle of the *L. monocytogenes* ST184 outbreak strain (farm F).

4.1.1.1 Analiza profagnih in plazmidnih zaporedij

Da bi preučili uporabnost analize zaporedij mobilnih elementov za dodatno razlikovanje epidemiološko povezanih in nepovezanih izolatov *L. monocytogenes*, smo pri vseh izolatih, ki so bili povezani z izbruhi, analizirali plazmidna in profagna zaporedja. Plazmidna ali intaktna profagna zaporedja smo ugotovili pri treh od sedmih analiziranih izbruhov; pri štirih izbruhih plazmidnih ali profagnih zaporedij nismo ugotovili. Pri epidemiološko povezanih izolatih z intaktnimi profagi so bila profagna zaporedja ohranjena pri vseh epidemiološko povezanih izolatih in so se razlikovala od profagnih zaporedij pri epidemiološko nepovezanih izolatih.

Pri izolatih ST8 smo ugotovili prisotnost nemobilnega plazmida pLmA144 (KU513859.1). Plazmid pLmA144 je bil dobro ohranjen tudi pri epidemiološko nepovezanih, a ozko sorodnih izolatih, kot tudi pri izolatih iz različnih klonalnih kompleksov (**Slike 3–5**). Omenjeni plazmid ni kodiral determinant virulence ali odpornosti proti stresorjem.

Domnevni plazmid NCTC7974: plasmid2 (NZ_LR134399.1), ki je bil prisoten pri vseh izolatih sekvenčnih tipov ST18, ST21 in ST184, smo iz analize izločili zaradi slabe kakovosti referenčnega genoma (velika dolžina plazmidnih zaporedij in majhna dolžina kromosomskega zaporedja; LR134398.1–LR134403.1). Gre namreč za plazmid velikosti 394 kb, ki ima številne determinante virulence (*cheAY*, *dltA*, *hpt*, *lplA1* in *srtA*), ki so sicer zapisane v kromosому, zato gre najverjetneje za del kromosomskega zaporedja. Medtem ko smo prisotnost plazmida pLmA144 ugotovili z obema uporabljenima orodjem (plasmidSPAdes in PLSDB), smo prisotnost plazmida NCTC7974: plasmid2 ugotovili le z orodjem PLSDB, kar dodatno potrjuje, da vnos NZ_LR134399.1 predstavlja kromosomsko (in ne plazmidno) zaporedje.

4.1.2 Izbruh listerioze pri ljudeh

Predhodno opisan izbruh listerioze pri štirih ljudeh je potekal v letu 2013 (NIJZ, 2014; **Tabela 6**). Metoda PFGE je predhodno pokazala, da so imeli izolati treh kliničnih primerov enak kombiniran profil PFGE *Ascl-ApaI*, zato je bila sprožena epidemiološka preiskava. V okviru

epidemiološke preiskave sta bila pridobljena tudi dva izolata iz živila ($n = 1$) in salamoreznice ($n = 1$), ki sta bila genetsko zelo sorodna kliničnim izolatom in sta se od njih razlikovala le v enem pasu profila na osnovi *AscI* in enem pasu profila na osnovi *Apal*. Na osnovi ugotovljenih genetskih razlik istovetnosti seva niso mogli potrditi, zato vir okužbe ni bil ugotovljen (NIJZ, 2014; Zdovc, 2015).

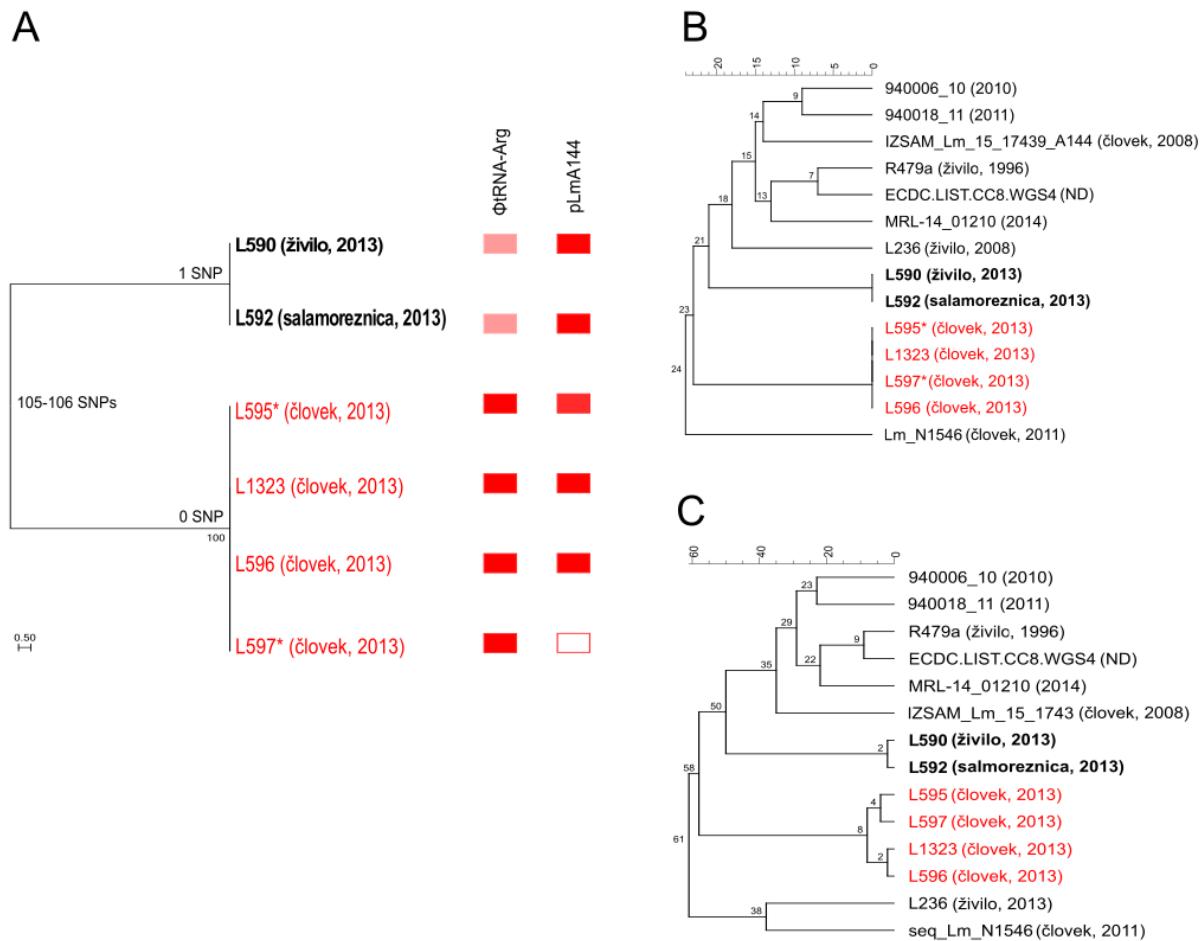
Tabela 6: Izbruh listerioze pri ljudeh, ki ga je povzročil sev bakterije *L. monocytogenes* ST8.

Table 6: Human listeriosis outbreak caused by the *L. monocytogenes* ST8 strain.

Oznaka izbruha	Obdobje	Regija	Št. obolenih ljudi	Št. analiziranih izolatov	MLST ST	MLST CC
Izbruh 8	Maj–avgust 2013	Dolenjska	3	6	ST8	CC8

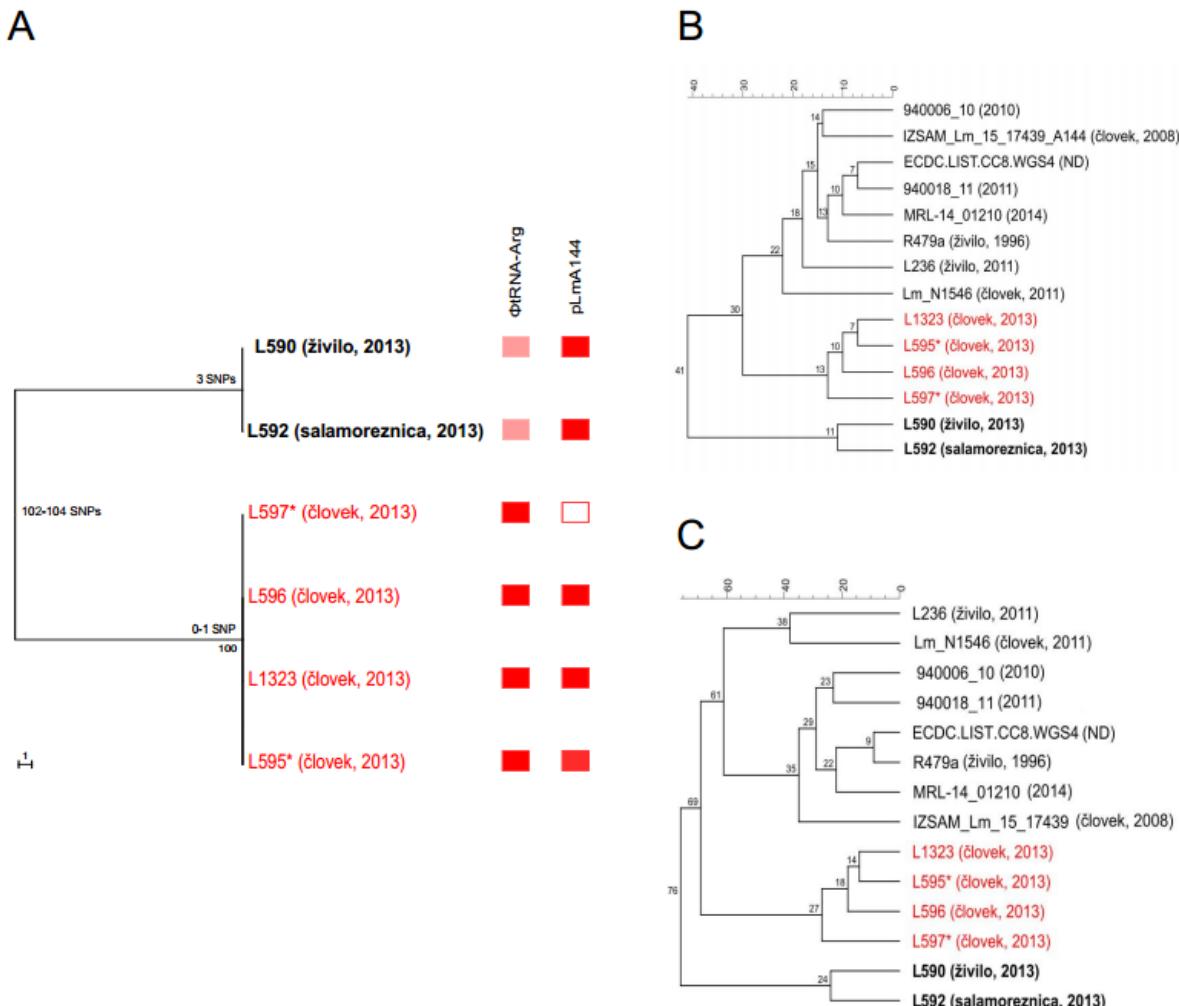
Vseh šest izolatov smo za podrobno opredelitev izbruha sekvencirali s tehnologijama Illumina in Ion Torrent. Podatke WGS iz obeh tehnologij smo analizirali ločeno (**Sliki 7 in 8**). Vsi trije analitični pristopi WGS (wgSNP, cgMLST in wgMLST) so v primeru tehnologije Illumina potrdili, da gre za izbruh monoklonalne narave in da z živili povezana izolata nista bila vir okužbe, saj sta se od kliničnih izolatov pri obeh tehnologijah sekvenciranja razlikovala v več kot 101 polimorfizmu wgSNP. Presenetljivo smo pri tehnologiji Ion Torrent opazili veliko razliko v alelih med epidemiološko povezanimi kliničnimi izolati – do 13 alelov cgMLST in 27 alelov wgMLST (**Slika 9**). Po drugi strani je wgSNP-tipizacija pokazala, da se ti izolati z obema tehnologijama sekvenciranja razlikujejo v največ treh polimorfizmih wgSNP, zato smo tudi s tehnologijo Ion Torrent in tipizacijo wgSNP potrdili izbruh in izključili, da sta z živili povezana izolata odgovorna za izbruh.

Epidemiološko povezani izolati ST8 so na filogenetskem drevesu na osnovi wgSNP oblikovali monofiletsko skupino, ki je bila dobro statistično podprta (vrednost samovzorčenja 100 %). Izolata iz živila in iz salamoreznice, ki sta bila pridobljena v okviru epidemiološke preiskave, sta se razvrščala polifiletsko glede na epidemiološko povezano gručo kliničnih izolatov (**Sliki 7 in 8**).



Slika 7: Izbruh listerioze pri ljudeh, ki ga je povzročil sev bakterije *L. monocytogenes* ST8 – analiza WGS s tehnologijo Illumina. Epidemiološko povezani izolati so prikazani v rdeči barvi. Izolata, ki sta povezana z živili in sta bila pridobljena v okviru iste epidemiološke preiskave, sta prikazana v odebelenem tisku. **A**, filogenetsko drevo največjega verjetja na osnovi tipizacije wgSNP. Merilo prikazuje število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto. Ob drevesu je s polnimi kvadratki prikazana prisotnost mobilnih genetskih elementov, medtem ko je njihova odsotnost prikazana s praznimi kvadratki. Intenziteta barve kvadratkov svopada z odstotkom identičnosti v nukleotidnem zaporedju v primerjavi z zaporedjem pri epidemiološko povezanih izolatih. Na drevesu so prikazana števila polimorfizmov wgSNP in statistična podpora razvjejitev, pridobljena z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. **B**, dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije cgMLST. Merilo prikazuje število alelnih razlik. **C**, dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije wgMLST. Merilo prikazuje število alelnih razlik. Izolata L595* in L597* sta izvirala iz istega bolnika.

Figure 7: Human listeriosis outbreak caused by the *L. monocytogenes* ST8 strain – analysis by Illumina technology. Outbreak isolates are denoted in red. Food-associated isolates that were obtained within the same epidemiological investigation are denoted in bold. **A**, maximum-likelihood phylogenetic tree constructed from wgSNP alignment. Full squares besides the tree denote the presence and empty squares the absence of mobile genetic elements. Colour intensity indicates the percentage identity at the nucleotide level in comparison with the outbreak strain. Pairwise wgSNP distance and bootstrap support (calculated from 1000 repetitions) are denoted on a tree. Scale, number of nucleotide substitutions per site. **B**, cgMLST dendrogram. Scale, number of allelic differences. **C**, wgMLST dendrogram. Scale, number of allelic differences. Isolates L595* and L597* originate from the same patient.



Slika 8: Izbruh listerioze pri ljudeh, ki ga je povzročil sev bakterije *L. monocytogenes* ST8 – analiza WGS s tehnologijo Ion Torrent. Epidemiološko povezani izolati so prikazani v rdeči barvi. Izolata, ki sta povezana z živili in sta bila pridobljena v okviru iste epidemiološke preiskave, sta prikazana v odebelenjem tisku. **A**, filogenetsko drevo največjega verjetja na osnovi tipizacije wgSNP. Merilo prikazuje število nukleotidnih zamenjav na nukleotidno mesto. Ob drevesu je s polnimi kvadratki prikazana prisotnost mobilnih genetskih elementov, medtem ko je njihova odsotnost prikazana s praznimi kvadratki. Intenziteta barve kvadratkov sovпадa z odstotkom identičnosti v nukleotidnem zaporedju v primerjavi z zaporedjem pri epidemiološko povezanih izolatih. Na drevesu so prikazana števila polimorfizmov wgSNP in statistična podpora razvjejitev, pridobljena z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami. **B**, dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije cgMLST. Merilo prikazuje število alelnih razlik. **C**, dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije wgMLST. Merilo prikazuje število alelnih razlik. Izolata L595* in L597* sta izvirala iz istega bolnika.

Figure 8: Human listeriosis outbreak caused by the *L. monocytogenes* ST8 strain – analysis by Ion Torrent technology. Outbreak isolates are denoted in red. Food-associated isolates that were obtained within the same epidemiological investigation are denoted in bold. **A**, maximum-likelihood phylogenetic tree constructed from wgSNP alignment. Full squares next to the tree denote the presence and empty squares the absence of mobile genetic elements. Colour intensity indicates the percentage identity at the nucleotide level in comparison with the outbreak strain. Pairwise wgSNP distance and bootstrap support (calculated from 1000 repetitions) are denoted on a tree. Scale, number of nucleotide substitutions per site. **B**, cgMLST dendrogram. Scale, number of allelic differences. **C**, wgMLST dendrogram. Scale, number of allelic differences. Isolates L595* and L597* originate from the same patient.

4.1.2.1 Analiza profagnih in plazmidnih elementov

Pri epidemiološko povezanih izolatih ST8 je bil profag ϕ tRNA-Arg ohranjen pri vseh epidemiološko povezanih izolatih in se je razlikoval od profaga pri dveh epidemiološko nepovezanih izolatih. Pri izolatu L597, ki je izviral iz istega bolnika kot izolat L595, nismo ugotovili prisotnosti nemobilnega plazmida pLmA144, medtem ko je bil plazmid pri izolatu L595 prisoten neodvisno od uporabljene tehnologije sekvenciranja (**Sliki 7–8**). Obe metodi sekvenciranja sta dali skladne rezultate glede prisotnosti mobilnih elementov (**Sliki 7–8**).

4.1.2.2 Primerjava tehnologij Illumina in Ion Torrent

Za primerjavo tehnologij sekvenciranja (Illumina in Ion Torrent) za epidemiološki nadzor bakterije *L. monocytogenes* smo 11 izolatov tipizirali s tremi analitičnimi pristopi na osnovi metode WGS: cgMLST, wgMLST in wSNP. Šest izolatov (ST8) je izvralo iz izbruha listerioze pri ljudeh. Ostali izolati ($n = 5$) so bili naključno izbrani in epidemiološko nepovezani. Po analizi podatkov, pridobljenih s sekvenciranjem izolatov z obema tehnologijama, smo ugotovili, da se je zaradi tehnologije rezultat za posamezen izolat v povprečju razlikoval za sedem alelov cgMLST, 11 alelov wgMLST in en polimorfizem wgSNP (**Priloga 3**).

Ker smo zlasti pri izolatih iz izbuha listerioze pri ljudeh ugotovili veliko število alelnih razlik pri tehnologiji Ion Torrent v primerjavi s tehnologijo Illumina, smo žeeli ugotoviti poglavitni razlog za odstopanje med tehnologijama in različnimi analitičnimi pristopi WGS. Zato smo izvedli obsežen nadzor kakovosti podatkov WGS na ravni odčitkov, sosesk in alelov wgMLST. Ugotovili smo, da imajo podatki Ion Torrent v povprečju več odstopanj od priporočenih vrednosti za nadzor kakovosti (**Priloga 4**). Glavna odstopanja so bila prevelika zastopanost odčitkov z vrednostjo $Q < 30$, prenizka povprečna pokritost odčitkov in povečano število nejasnih (nepopolnih, multiplih, nepotrjenih ali neznanih) alelov. Večina alelov wgMLST, v katerih so se razlikovali izolati, sekvencirani s tehnologijo Ion Torrent, je bila prisotna tudi pri izolatih, sekvenciranih s tehnologijo Illumina; pri teh nismo ugotovili variabilnosti v aleilih wgMLST. Pri poravnavi odčitkov na variabilne alele smo ugotovili, da so imeli ti aleli v primeru tehnologije Ion Torrent nižjo pokritost v primerjavi s tehnologijo Illumina in so se večinoma nahajali v homopolimernih regijah. Primer variabilnega alela je predstavljen v **Prilogi 5**.

4.1.3 Ugotavljanje poti širjenja bakterije *L. monocytogenes* na kmetiji s primerom nevrolisterioze pri govedu

Pri izolatih ($n = 36$), ki so bili pridobljeni v okviru epidemiološke preiskave na **kmetiji G** s primerom nevrolisterioze pri govedu, smo ugotovili veliko genetsko raznolikost. Izolati so se razvrščali v sedem kombiniranih profilov PFGE *Ascl-ApaI* (**Slika 9**). Domnevno epidemiološko povezani izolati z enakim kombiniranim profilom PFGE so se razvrščali v pet gruč (na **Sliki 9** poimenovane kot ‘gruča 1–5’). Ugotovili smo naslednje epidemiološke povezave med izolati:

- povezava med izolati iz vode iz napajalnika, zajetja, mlakuže in pipe v hlevu (gruča 1);

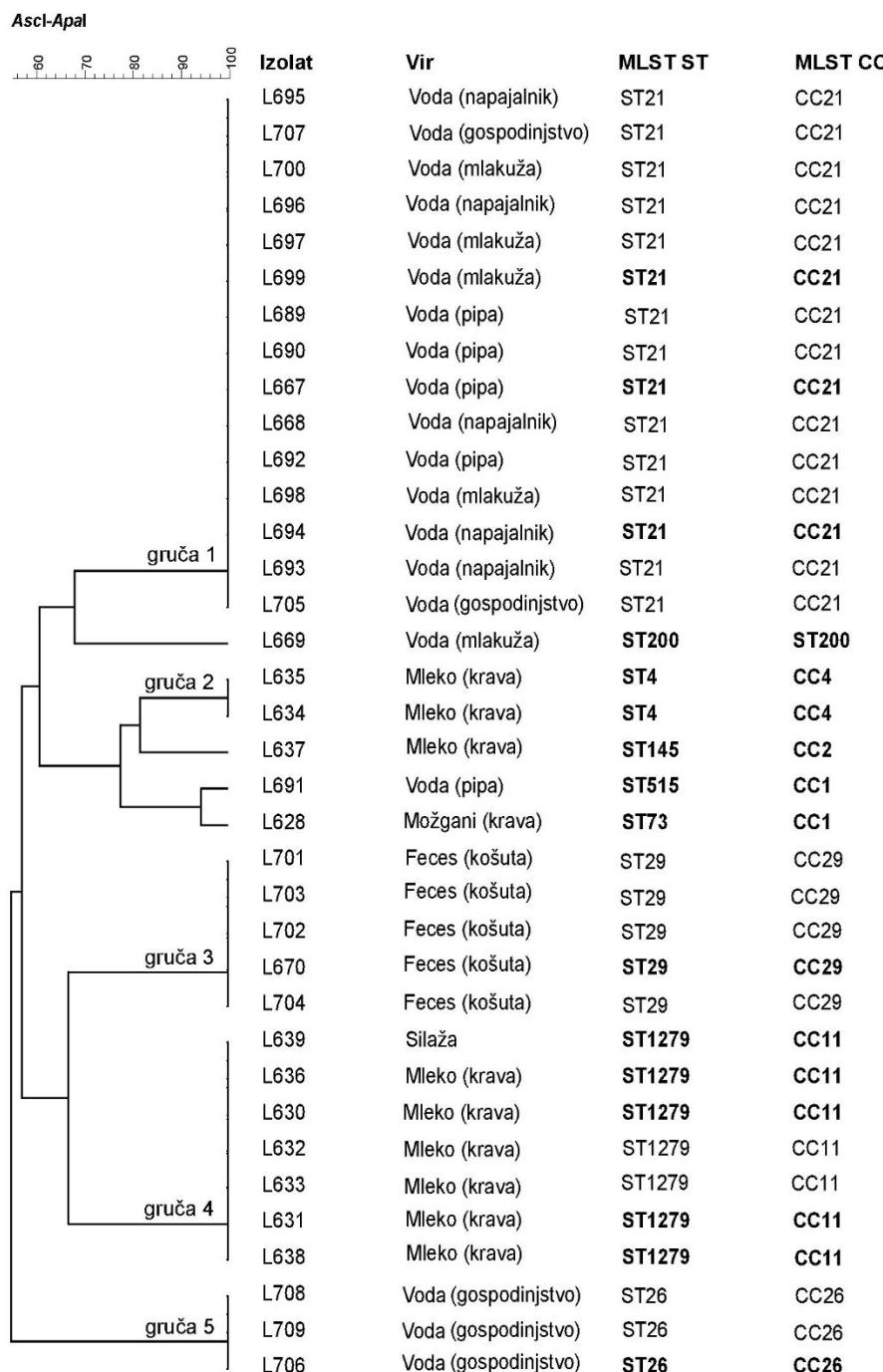
- povezava med dvema primeroma subkliničnega mastitisa (gruča 2);
- povezava med izolatom iz silaže in šestimi primeri subkliničnega mastitisa (gruča 4).

V primeru izolatov iz iztrebkov košut (gruča 3) in vodnega zajetja (gruča 5) je vseh pet izolatov izviralo iz istega vzorca in imelo enak kombiniran profil PFGE, zato smo jih obravnavali kot epidemiološke duplike.

Za dokončno potrditev epidemioloških povezav, ki jih je nakazala metoda PFGE, smo 16 izolatom določili zaporedja celotnih genomov in jih tipizirali s pristopom cgMLST (**Slika 10**). Izolati z enakim kombiniranim profilom PFGE *Ascl-ApaI* so se razlikovali v največ sedmih alelih cgMLST, zato smo vse tri zgoraj naštete epidemiološke povezave potrdili tudi z metodo WGS. Izolatom, ki so se razlikovali v največ sedmih alelih cgMLST, smo dodelili enake oznake kot pri PFGE-tipizaciji (gruče 1, 2 in 4).

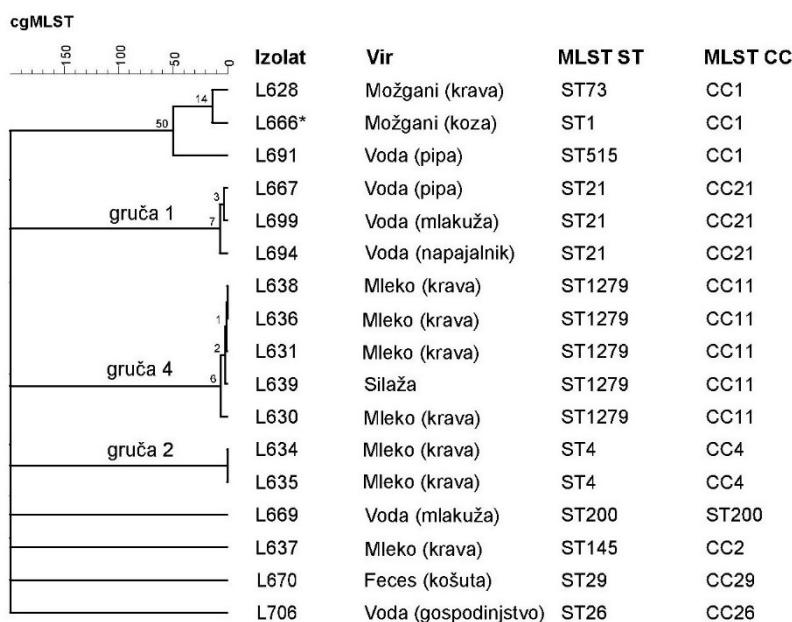
Izolat L691, ki je izviral iz vode iz pipe v hlevu, se je od izolata razlikoval v 50 alelih cgMLST. Poleg tega se je izolat L666, ki je izviral iz sočasnega, a epidemiološko nepovezanega (sporadičnega) primera listerioze pri kozi, od kliničnega izolata L628 razlikoval le v 14 alelih cgMLST. S tem smo ovrgli mikrobiološko povezavo med izolatoma L628 in L691 in dokončno ovrgli hipotezo, da je izolat L691 povzročil nevrolisteriozo pri poginuli kravi. Vira okužbe krave z nevrolisteriozo tako nismo uspeli identificirati. Devet izolatov, ki so izvirali iz krav s subkliničnim mastitisom, je pripadalo trem različnim klonom: ST4 (CC11), ST145 (CC2) in ST1279 (CC4). Sev ST145 smo ugotovili tudi v silaži.

Sev ST21 (CC21; gruča 1 na **Sliko 10**) smo ugotovili v vodi iz zajetja, mlakuže, pipe v hlevu in napajalniku. Ker je zajetje predstavljalo vir vode tako za hlev kot za hišo, je zelo verjetno, da je bila voda iz zajetja vir kontaminacije vodovodnega sistema in s tem vode v hlevu. Ker smo sev ST21 ugotovili tudi v kmetijskem okolju (mlakuža), je možen vir kontaminacije vode v hlevu ali v vodnem zajetju tudi kmetijsko okolje.



Slika 9: Dendrogram podobnosti kombiniranih profilov PFGE *Ascl-ApaI* za 36 izolatov bakterije *L. monocytogenes* s kmetije G. Merilo predstavlja odstotek podobnosti kombiniranih profilov PFGE. V odebelenjem tisku so predstavljeni MLST-tipi, ki smo jih določili na osnovi podatkov WGS; v navadnem tisku so predstavljeni MLST-tipi, ki smo jih določili na osnovi kombiniranega profila PFGE.

Figure 9: Dendrogram showing similarity of PFGE *Ascl-ApaI* profiles for 36 *L. monocytogenes* isolates from farm G. Scale, percent similarity of the combined PFGE profiles. MLST types that were assigned based on WGS data are denoted in normal, those that were mapped from the combined PFGE profile are denoted in bold text.



Slika 10: Dendrogram podobnosti na osnovi tipizacije cgMLST za 16 izolatov bakterije *L. monocytogenes* iz kmetije G. Merilo predstavlja število alelnih razlik cgMLST. K analizi smo dodali tudi izolat L666*, ki je izviral iz sočasnega, a epidemiološko nepovezanega primera nevrolisterioze pri kozi. Merilo predstavlja število alelnih razlik cgMLST.

Figure 10: Dendrogram based on the cgMLST typing for 16 *L. monocytogenes* isolates from farm G. L666* isolate, which originated from a concurrent, but epidemiologically unlinked caprine neurolisteriosis case, was added to the analysis. Scale, number of allelic differences.

4.1.3.1 Analiza prisotnosti/odsotnosti determinant virulence

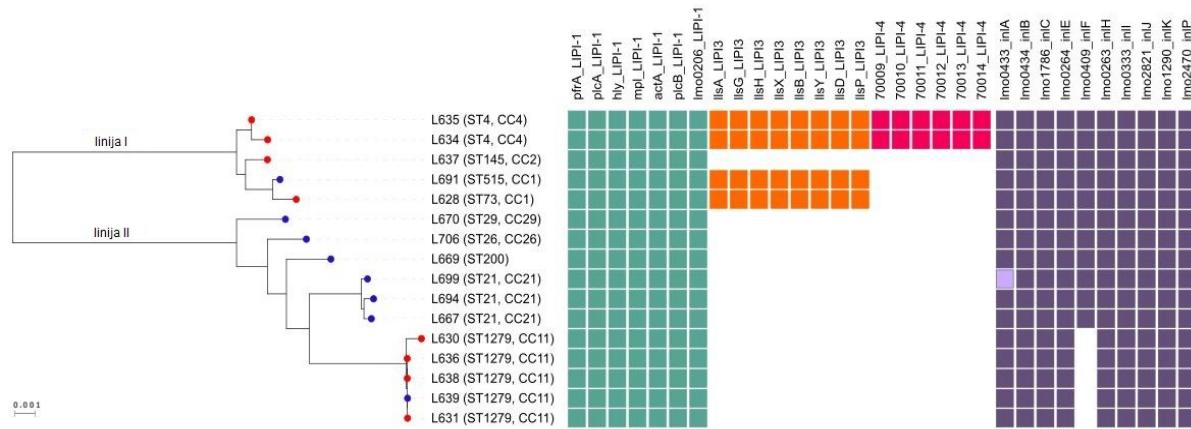
Izolatom *L. monocytogenes* s **kmetije G**, ki smo jih tipizirali z metodo WGS ($n = 16$), smo določili profil prisotnosti/odsotnosti 151 determinant virulence. Determinante smo zaradi večje preglednosti razdelili v tri skupine (**Slika 11, Priloga 1**).

Analiza 31 podrobno opredeljenih determinant virulence, med katerimi so bile tudi determinante, ki so povezane s povečanim infekcijskim potencialom na ravni populacije (InlA polne dolžine, LIPI-3 in LIPI-4), je pokazala, da je bila večina med njimi pri preiskovanih izolatih dobro ohranjena (**Slika 11**). Otok patogenosti LIPI-1, ki kodira ključne determinante virulence pri bakteriji *L. monocytogenes* (geni *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* in *plcB*), smo ugotovili pri vseh izolatih. Geni za internaline (*inl*), ki sodelujejo pri adheziji in invaziji v gostiteljske celice, so bili prisotni pri vseh izolatih z izjemo gena *inlF*. Mutacijo, ki vodi v pojav prezgodnjega stop kodona in nastanek okrnjene beljakovine InlA ter s tem povezano nižjo virulenco, smo ugotovili pri izolatu L699 (ST21). Ostali izolati (15/16) so imeli zapis za beljakovino InlA polne dolžine. Otok patogenosti LIPI-3, ki kodira listeriolizin S, je bil prisoten pri štirih izolatih iz filogenetske linije I. Otok patogenosti LIPI-4, ki je povezan s tropizmom do živčnega tkiva in posteljice, je bil prisoten pri dveh izolatih ST4 (**Slika 11**). Gen *inlF*, ki je udeležen pri tropizmu do možganskega tkiva, je bil prisoten pri 8/8 izolatih kliničnega izvora

(ne glede na klinično obliko listerioze in filogenetsko linijo), medtem ko je bil prisoten le pri 4/8 izolatih iz naravnega okolja.

Analiza prisotnosti 80 predhodno opisanih determinant virulence je pokazala, da so ti pri preiskovanih izolatih po večini dobro ohranjeni. Pri determinantah, ki niso bile prisotne pri vseh izolatih, je bila njihova prisotnost po večini vezana na filogenetsko linijo (**Priloga 6A**).

Nedavno opisane kandidatne determinante virulence, ki so značilno povezane s hipervirulentnimi kloni ($n = 40$), so bile v primerjavi s preostalimi determinantami manj ohranjene. Vsaka od 40 determinant je bila prisotna pri vsaj enem izolatu (**Priloga 6B**).



Slika 11: Profil prisotnosti/odsotnosti 31 determinant virulence pri 16 izolatih bakterije *L. monocytogenes* s kmetije G. Prisotnost gena je označena s polnim kvadratkom. Z rdečo barvo na listih filogenetskega drevesa so označeni izolati kliničnega izvora, z modro izolati iz naravnega okolja. Gen *inlA* z zapisom za beljakovino InlA polne dolžine je predstavljen s temno vijoličnim, gen *inlA* z zapisom za okrnjeno beljakovino InlA s svetlo vijoličnim kvadratkom. Merilo predstavlja število aminokislinskih zamenjav na pozicijo.

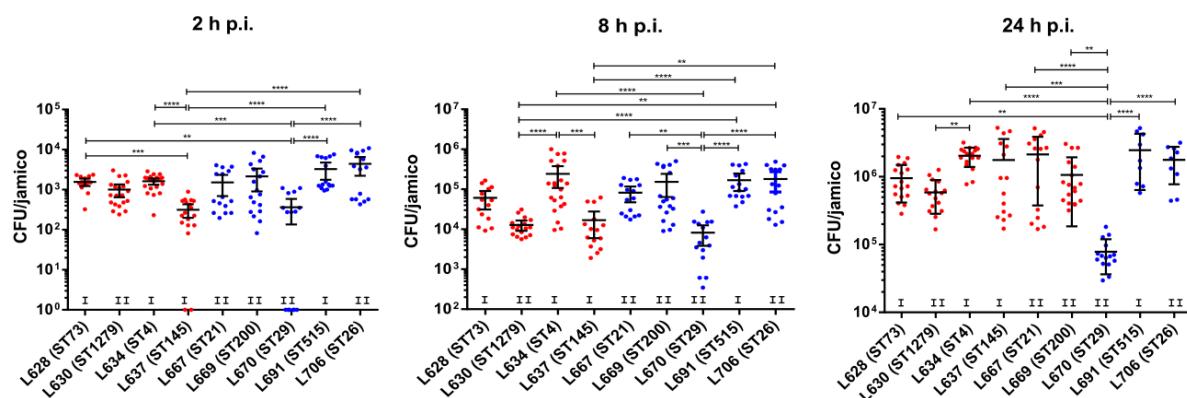
Figure 11: Virulence gene presence/absence pattern for 16 *L. monocytogenes* isolates from farm G. Isolates of clinical origin are denoted by red, isolates from the natural environment by blue dots at nodes of the tree. Gene presence is denoted by a filled square. Full-length InlA is denoted by dark violet and truncated InlA by light violet square. Scale, number of amino acid substitutions per site.

4.1.3.2 Testiranje invazivnosti in replikativnosti izolatov

Devet izolatov z različnim MLST-tipom in različnim virom izolacije s kmetije G smo izbrali za *in vitro* testiranje invazivnosti in replikativnosti na dveh celičnih linijah (BoMac in Vero).

Na celični liniji **BoMac** smo ugotovili številne razlike v invazivnosti in replikativnosti izolatov. Izolata L628 (ST145, CC2) in L670 (ST29, CC29) sta imela najmanjo sposobnost invazije, zato smo ju označili kot hipoinvazivna. Njuna invazivnost je bila značilno manjša od invazivnosti izolatov L691 (ST515, CC1) in L706 (ST26, CC26), ki sta imela največjo invazivnost (**Slika 12**). Posebnih trendov v invazivnosti in replikativnosti izolatov v povezavi z njihovo filogenetsko linijo ali virom izolacije nismo ugotovili, prav tako hipoinvazivnost ni bila vedno povezana s hiporeplikativnostjo oz. hiperinvazivnost ni bila vedno povezana s hiperreplikativnostjo (**Slika 12, Tabela 7**). Izjema je bil izolat L670 (ST29, CC29), ki je imel

značilno nižjo invazivnost in replikativnost glede na ostale izolate, zato smo ga označili kot hipoinvazivnega in hiporeplikativnega. Izolat L637 (ST145, CC2) je imel prav tako zmanjšano sposobnost invazije, vendar je izkazoval največjo sposobnost znotrajcelične replikacije.



Slika 12: Gentamicinski test na celični liniji BoMac za devet izolatov *L. monocytogenes* iz kmetije G. Število CFU v celičnem lizatu smo določili v času 2, 8 in 24 h po okužbi (p.i.). Horizontalna črta predstavlja povprečno vrednost, intervali napake predstavljajo 95 % interval zaupanja. Barva točk sovpada z virom izolacije: rdeča, klinični izvor; modra, neklinični izvor. Filogenetska linija je predstavljena nad x-oso. Značilne razlike med pari izolatov so prikazane z zvezdicami: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Figure 12: Gentamicin protection assay in the BoMac cell line for nine *L. monocytogenes* from farm G. CFUs were enumerated in cell lysates at 2, 8 and 24 h post infection (p.i.). Horizontal line represents the average, error bars represent the 95% confidence interval. Colour of the dots corresponds to the origin of isolation: red, clinical origin; blue, non-clinical origin. The phylogenetic lineage is indicated above the x axis. Significant pairwise differences bare denoted with asterisks: ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

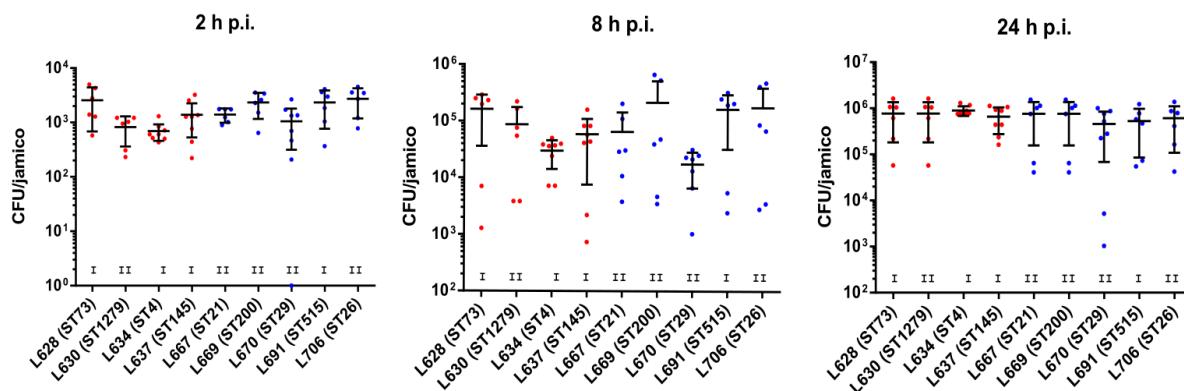
Tabela 7: Koeficient znotrajcelične rasti (IGC) za devet izolatov *L. monocytogenes* iz kmetije G, izračunan na osnovi rezultatov gentamicinskega testa na celični liniji BoMac.

Table 7: Intracellular growth coefficient (IGC) for nine *L. monocytogenes* isolates from farm G, calculation based on the results of the gentamicin protection assay in BoMac cell line.

Izolat	Vir	MLST ST	MLST CC	Filogenetska linija	IGC
L628	Možgani (krava)	ST73	CC1	I	608
L630	Mleko (krava)	ST1279	CC11	II	585
L634	Mleko (krava)	ST4	CC4	I	1256
L637	Mleko (krava)	ST145	CC2	I	5598
L667	Voda (pipa)	ST21	CC21	II	1401
L669	Voda (pipa)	ST200	ST200	II	459
L670	Feces (košuta)	ST29	CC29	II	216
L691	Voda (pipa)	ST515	CC1	I	759
L706	Voda (zajetje)	ST26	CC26	II	402

Na celični liniji **Vero** pri nobenem od preiskovanih časov nismo ugotovili značilnih razlik v številu CFU/jamico (**Slika 13**). Vsi izolati so imeli sposobnost invazije in replikacije na obeh celičnih linijah (**Sliki 12–13**). Celična linija Vero se zaradi manjšega števila ugotovljenih razlik

v primerjavi s celično linijo BoMac zdi manj primerna za opredelitev invazivnosti in replikativnosti izolatov bakterije *L. monocytogenes*.



Slika 13: Gentamicinski test na celični liniji Vero za devet izolatov *L. monocytogenes* iz kmetije G. Število CFU v celičnem lizatu smo določili v času 2, 8 in 24 h po okužbi (p.i.). Horizontalna črta predstavlja povprečno vrednost, intervali napake predstavljajo 95 % interval zaupanja. Barva točk sovpada z virom izolacije: rdeča, klinični izvor; modra, neklinični izvor. Filogenetska linija je predstavljena nad x-osojo. Pri nobenem od preiskovanih časov nismo ugotovili značilnih razlik v CFU/jamico.

Figure 13: Gentamicin protection assay in the Vero cell line for nine *L. monocytogenes* from farm G. CFUs were enumerated in cell lysates at 2, 8 and 24 h post infection (p.i.). Horizontal line represents the average, error bars represent the 95% confidence interval. Colour of the dots corresponds to the origin of isolation: red, clinical origin; blue, non-clinical origin. The phylogenetic lineage is indicated above the x axis. No significant differences in CFU/well were observed at the examined time points.

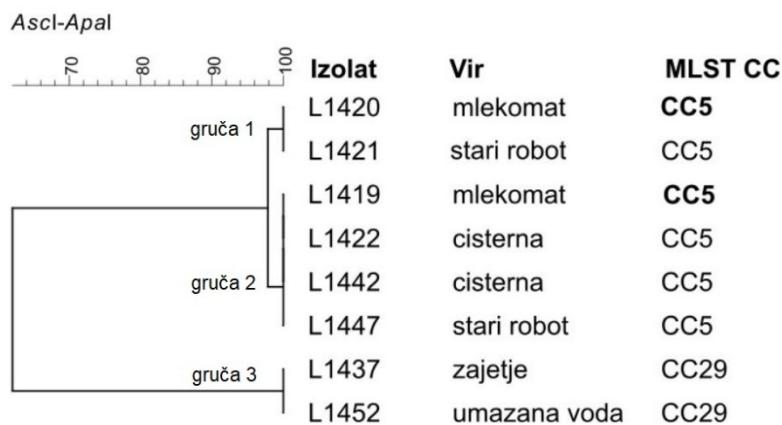
4.1.4 Ugotavljanje poti širjenja bakterije *L. monocytogenes* na kmetiji s kontaminiranim surovim mlekom

V okviru epidemiološke preiskave na **kmetiji H** smo iskali vir kontaminacije mleka iz mlekomata. Pridobili smo osem izolatov, ki smo jih tipizirali z metodo PFGE. Izolati so izkazovali tri kombinirane profile PFGE *Ascl-ApaI* ('gruče 1–3' na **Sliki 14**). Gruča 1 in gruča 2 sta izkazovali 97,8 % podobnost v kombiniranem profilu PFGE, v profilu PFGE *Ascl* pa sta se razlikovali le v enem pasu (**Slika 15A**). Izolati iz gruč 1 in 2 so pripadali CC5, medtem ko so izolati iz gruče 3 pripadali CC29.

Da bi dokončno opredelili mikrobiološko povezavo med izolati iz gruče 1 in gruče 2, smo izolata L1420 (gruča 1 na **Sliki 14**) in L1419 (gruča 2 na **Sliki 14**) tipizirali z metodo WGS. Izolata sta se razlikovala v nič alelih cgMLST, dveh alelih wgMLST in nič polimorfizmih wgSNP, zato smo potrdili njuno mikrobiološko povezanost.

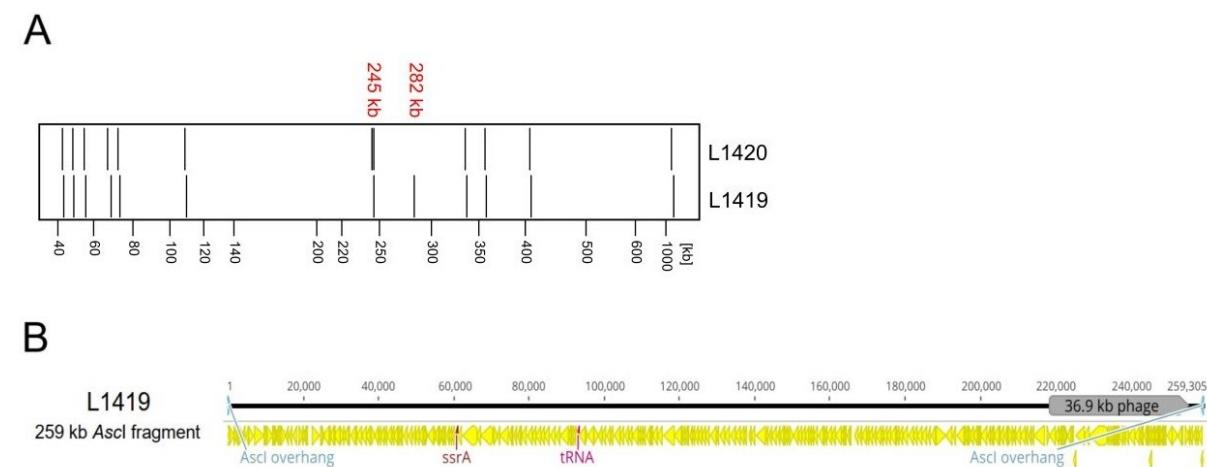
Da bi ugotovili genetsko ozadje zamika velikosti 37 kb (282 kb – 245 kb) v enem pasu (profil *Ascl*) (**Slika 15A**), smo izvedli *in silico* cepitev genomske DNA z restriktijsko endonukleazo *Ascl* in identifikacijo intaktnih profagnih zaporedij. Ugotovili smo, da je pri izolatu L1419 prisoten intaktni profag *φrpsI* (36,9 kb), ki se nahaja v fragmentu *Ascl* velikosti 259 kb. Prisotnost profaga je torej povzročila zamik v fragmentu *Ascl* (**Slika 15A**). Izolat L1420 ni imel profaga *φrpsI*.

Mleko iz mlekomata je bilo torej kontaminirano z ozko sorodno populacijo sevov *L. monocytogenes* ST5 (CC5), ki je izkazovala dva profila PFGE *Ascl*. To populacijo sevov ST5 smo ugotovili tudi v starem molznem robotu in cisterni. Kontaminacija surovega mleka je tako najverjetneje izvirala iz starega molznega robota in/ali cisterne, saj krave molznice v času epidemiološke preiskave niso izločale listerij v mleku (podatki niso prikazani).



Slika 14: Dendrogram podobnosti kombiniranih profilov PFGE *Ascl-ApaI* za osem izolatov *L. monocytogenes* s kmetije H. Merilo predstavlja odstotek podobnosti v kombiniranem profilu PFGE. V odebelenjem tisku so predstavljeni MLST-tipi, ki smo jih določili na osnovi podatkov WGS; v navadnem tisku so predstavljeni MLST-tipi, ki smo jih določili na osnovi kombiniranega profila PFGE. Merilo predstavlja odstotek podobnosti v kombiniranem profilu PFGE.

Figure 14: Dendrogram showing similarity of the combined PFGE *Ascl-ApaI* profiles for eight *L. monocytogenes* isolates from farm H. Scale, percent similarity in combined PFGE profile. MLST types that were assigned based on WGS data are denoted in normal, those that were mapped from the combined PFGE profile are denoted in bold text. Scale, percent similarity in combined PFGE profile.



Slika 15: Profag *φrpsI* pri izolatu L1419 (ST5, CC5), ki je povzročil zamik velikosti 37 kb v pasu profila PFGE *Ascl*. A, profil *Ascl*; z rdeča sta označena variabilna pasova. B, profag *φrpsI* (36,9 kb), ki se je nahajal na fragmentu *Ascl* velikosti 259 kb, je bil prisoten pri izolatu L1419 in odsoten pri izolatu L1420.

Figure 15: *φrpsI* profage in the L1419 isolate (ST5, CC5), which caused a 37-kb shift in *Ascl* band. A, *Ascl* profile; variable bands are denoted in red. B, *φrpsI* profage (36.9 kb), which was located on a 259-kb *Ascl* fragment, was present in L1419 isolate, but absent in L1420 isolate.

4.2 POPULACIJSKA STRUKTURA IZOLATOV *L. monocytogenes* IZ NARAVNEGA OKOLJA IN ŽIVALSKEGA KLINIČNEGA IZVORA

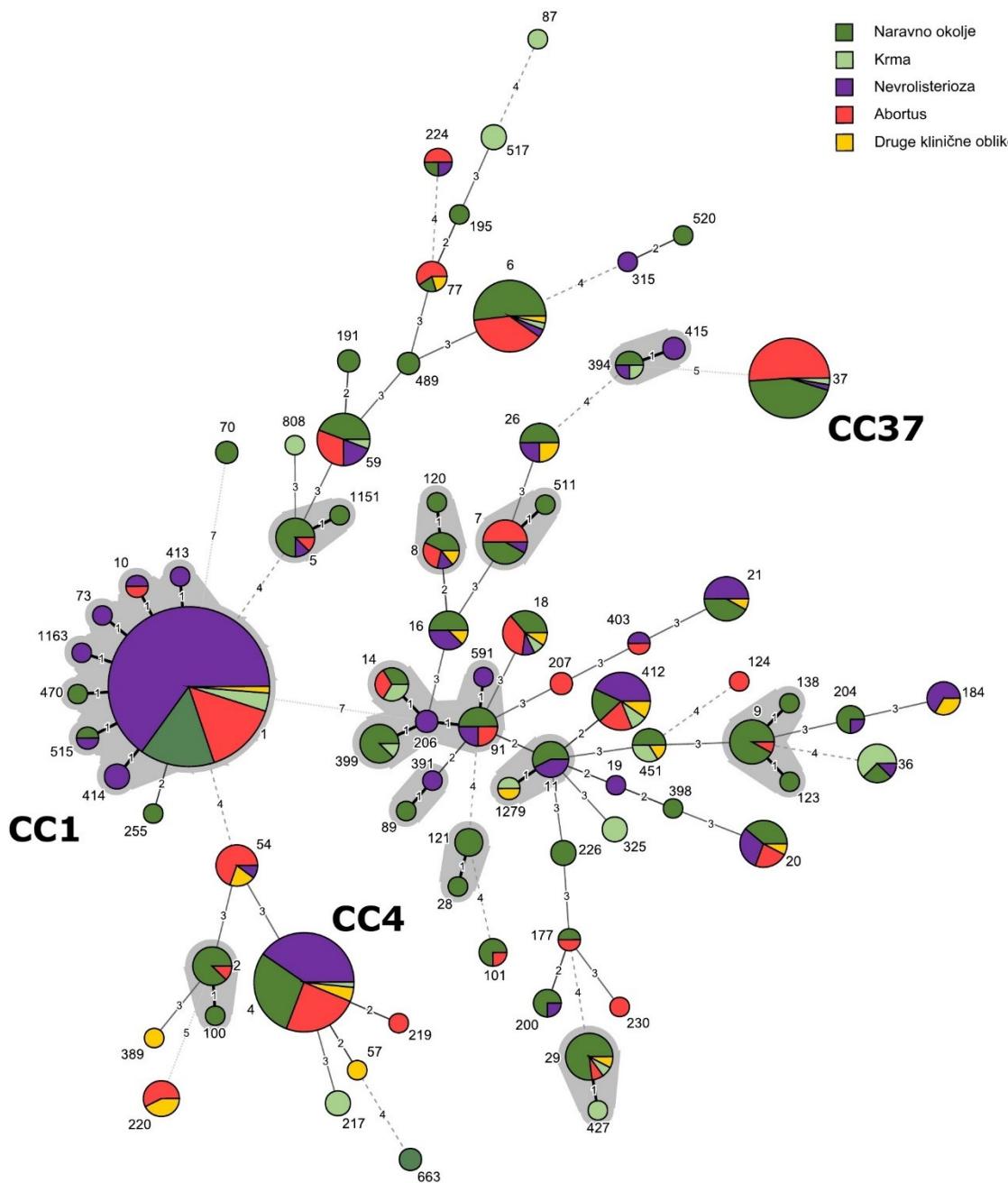
Z namenom analize populacijske strukture izolatov bakterije *L. mnocytogenes* iz živalskega kliničnega izvora in iz naravnega okolja smo izdelali dve podatkovni zbirki (Živalski klinični izvor in Naravno okolje), ki sta obsegali 603 izolatov. Ti so se uvrščali v 45 različnih CC in sedem ST brez pripadajočega CC. Zastopanost različnih CC je bila nehomogena glede na njihov vir izolacije (**Sliki 16 in 17**). Tриje kloni z največjo zastopanostjo so bili CC1 (171/603; 27,4 %), CC4-CC217 (69/603; 11,1 %) in CC37 (44/603; 7,1 %); ti so predstavljali 47,3 % vseh analiziranih izolatov (**Slika 16**). Klon CC1 je imel največje razmerje relativnih frekvenc 'Živalski klinični izvor / Naravno okolje' (razmerje = 3,0). Klon CC9 je imel največje razmerje relativnih frekvenc 'Naravno okolje / Živalski klinični izvor' (razmerje = 18,0) (**Slika 17**).

V celotni podatkovni zbirki so prevladovali izolati iz filogenetske linije I (341/602; 56,6 %), ki sta ji sledili liniji II (259/602; 43,0 %) in III (2/602; 0,3 %). Izolatov iz linije IV nismo ugotovili v nobeni zbirki. En izolat ni sodil v nobeno linijo v shemi MLST. Linija I je bila značilno povezana s kliničnim izvorom, medtem ko je bila linija II značilno povezana z naravnim okoljem (oba testa $p < 0,0001$).

4.2.1 Analiza taksonomske raznolikosti izolatov bakterije *L. monocytogenes*

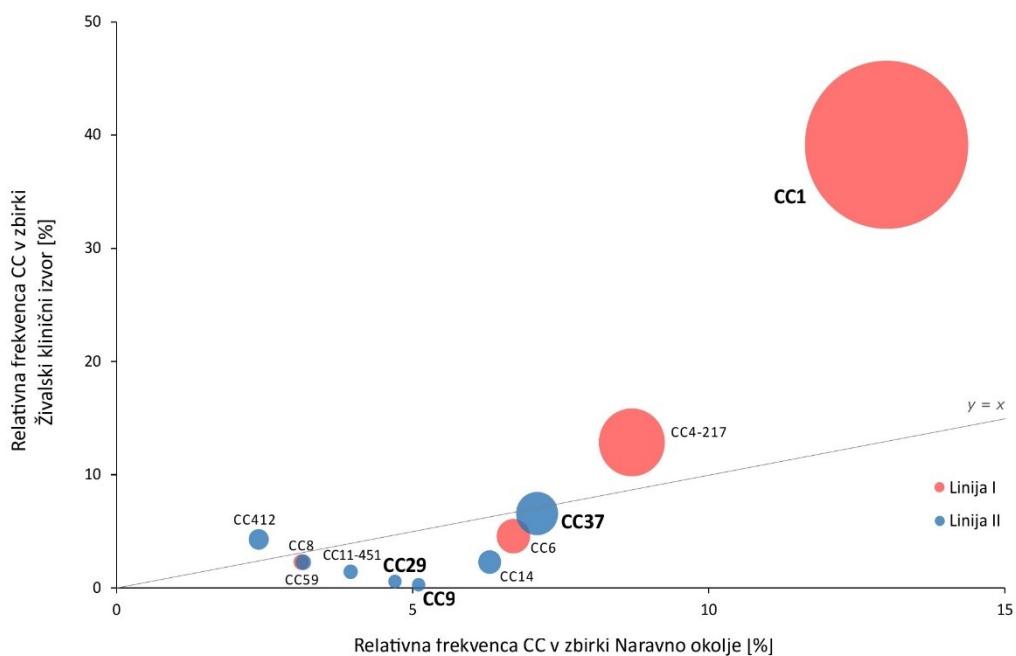
V podatkovni zbirki Živalski klinični izvor ($n = 350$) smo ugotovili 35 različnih CC (trije CC so bili kombinirani) in tri ST brez pripadajočega CC. Vrednost Simpsonove cenilke raznolikosti je bila 0,820; 95 % interval zaupanja (CI): 0,783–0,856. V podatkovni zbirki Naravno okolje ($n = 253$) smo ugotovili 36 različnih CC (trije CC so bili kombinirani) in šest ST brez pripadajočega CC. Vrednost Simpsonove cenilke raznolikosti je bila 0,950; 95 % CI: 0,941–0,960. Genetska raznolikost taksonov pri izolatih živalskega kliničnega izvora je bila torej značilno večja kot raznolikost pri izolatih iz naravnega okolja.

Rarefakcijska krivulja je pokazala, da je pri velikosti populacije $n = 253$ bogatost (angl. *richness*) taksonov večja v zbirki Naravno okolje (**Slika 17**). Izpostaviti velja, da sta se 95 % CI pri tej velikosti populacije prekrivala, zato razlike niso bile značilne. Ekstrapolacija podatkov je pokazala, da bi lahko pri vzorčenju večje populacije ($n > 350$) v zbirki Živalski klinični izvor ugotovili večjo bogatost taksonov kot v zbirki Naravno okolje. Poleg tega se nobena od krivulj ni približala asymptoti (**Slika 17**), kar prav tako govori v prid vzorčenju večje populacije v obeh podatkovnih zbirkah za celovitejši opis genetske raznolikosti bakterije *L. monocytogenes* v preiskovanih okoljih.



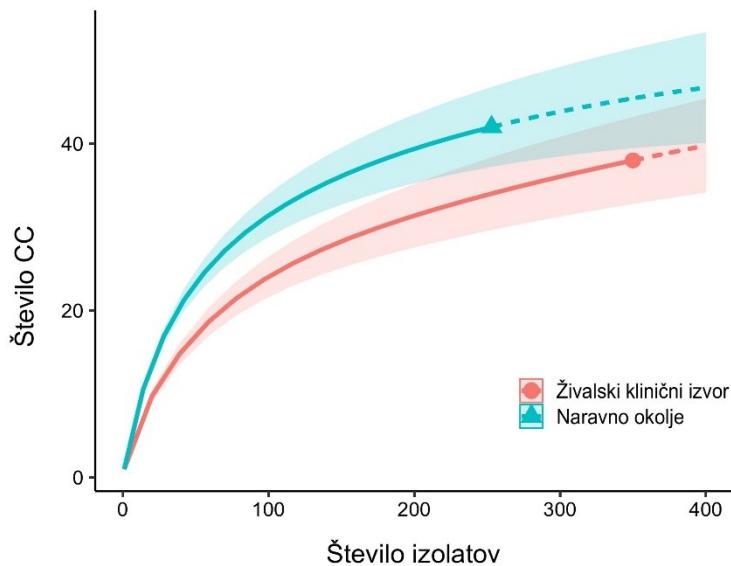
Slika 16: Populacijska struktura 603 izolatov bakterije *L. monocytogenes*. Izolate smo glede na njihov vir izolacije razdelili v podatkovni zbirki Živalski klinični izvor ($n = 350$) in Naravno okolje ($n = 253$). Minimalno vpeto drevo prikazuje frekvenco sekvenčnih tipov (ST), ki so na sliki označeni s številkami ob krogih. ST, ki pripadajo enakemu klonalnemu kompleksu (CC), so obrobljeni s sivo barvo. Številke na povezavah predstavljajo število alelnih razlik.

Figure 16: Population structure of 603 *L. monocytogenes* isolates. Isolates were divided according to the source of isolation into the Animal clinical ($n = 350$) and the Natural environment dataset ($n = 253$). Minimum spanning tree shows the frequency of sequence types (STs), which are indicated by numbers adjacent to the circles. STs belonging to the same clonal complex (CC) are shaded in gray. Numbers next to the branches indicate the number of allelic differences.



Slika 17: Relativna frekvenca klonalnih kompleksov (CC) bakterije *L. monocytogenes* v podatkovnih zbirkah Živilski klinični izvor in Naravno okolje. Velikost kroga odraža število izolatov znotraj posameznega CC. Predstavljenih je 11 CC z največjo frekvenco v združeni okoljski in klinični podatkovni zbirki. Z odenbenjem tiskom so predstavljeni kloni, ki so značilno povezani z virom izolacije.

Figure 17: Relative frequency of *L. monocytogenes* clonal complexes (CCs) in the Animal clinical and the Natural environment dataset. The size of the circle is proportional to the number of isolates of a given CC in a combined dataset. The 11 most frequent CCs in a combined environmental and clinical dataset are shown. CCs that are significantly associated with the origin of isolation are denoted in bold.



Slika 18: Rarefakcijska krivulja klonalnih kompleksov (CC) bakterije *L. monocytogenes*. Izolate smo glede na njihov vir izolacije razdelili v podatkovni zbirki Živilski klinični izvor ali Naravno okolje. Senčeno območje predstavlja 95 % interval zaupanja.

Figure 18: Rarefaction curve of *L. monocytogenes* clonal complexes (CCs). The isolates were divided according to the origin of isolation into the Animal clinical and Natural environment dataset. Shaded area represents the 95 % confidence interval.

4.2.2 Populacijska struktura izolatov *L. monocytogenes* izolatov živalskega kliničnega izvora

V podatkovni zbirkki Živalski klinični izvor ($n = 350$) so prevladovali naslednji kloni: CC1 (137/350; 39,1 %), CC4-CC217 (45/350; 12,9 %), CC37 (21/350; 6,0 %), CC6 (16/350; 4,6 %) in CC412 (15/350; 4,3 %) (Slika 17). Omenjeni kloni so imeli frekvenco $n > 10$ in so predstavljali 66,3 % vseh kliničnih izolatov. Zanesljivo razlikovanje kombiniranega klonu CC4-CC217 na osnovi profila PFGE ni bilo možno, vendar je glede na rezultate *in silico* MLST klon CC4-CC217 ($n = 51$) pretežno vključeval izolate CC4 (48/51; 94,1 %) in le malo izolatov CC217 (3/51; 5,9 %). Zato predvidevamo, da so v kombiniranem klonu CC4-CC217 prevladovali izolati CC4.

Izolate smo najprej stratificirali po živalski vrsti. V primeru nevrolisterioze in abortusa med drobnico in govedom nismo ugotovili značilnih razlik v prevalenci treh prevladajočih CC ($p \geq 0,0738$ za abortus in $p \geq 0,0546$ za nevrolisteriozo). Nadalje smo izolate stratificirali po klinični obliki listerioze in primerjali prevalence klonov glede na klinično obliko. Ugotovili smo naslednje značilne povezave (Slika 17):

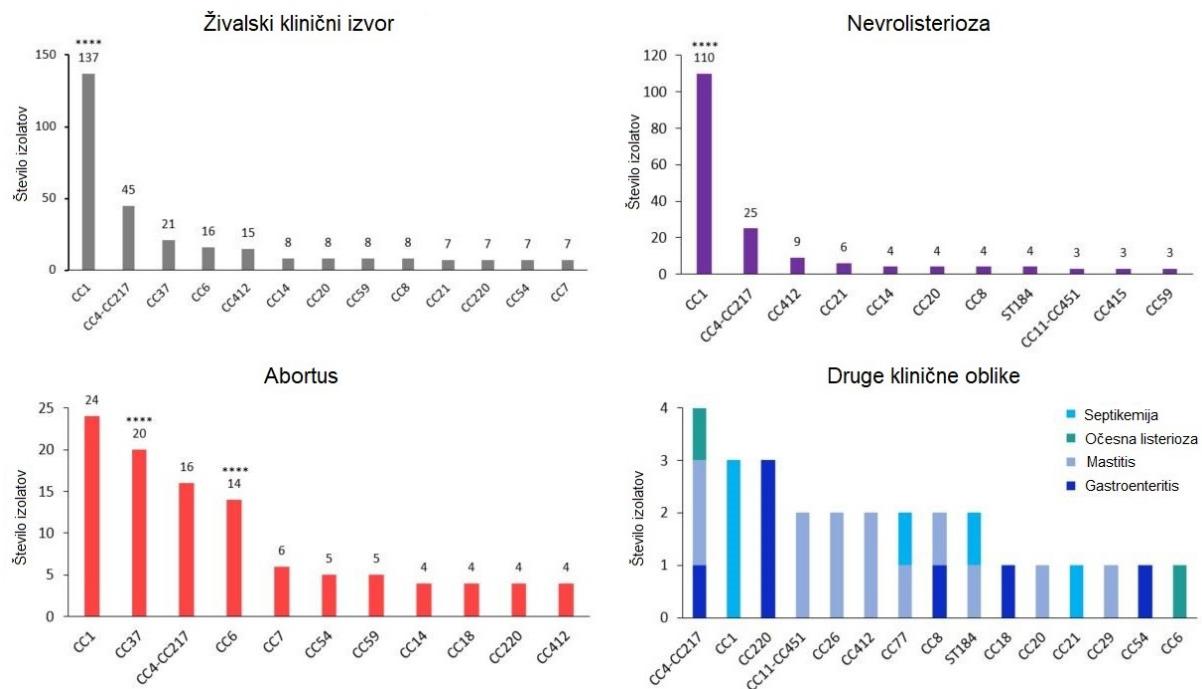
- klon CC1 je bil značilno povezan z nevrolisteriozo ($p < 0,0001$);
- klona CC37 in CC6 sta bila značilno povezana z abortusom (oba testa $p < 0,0001$).

Med izolati iz živali z nevrolisteriozo ($n = 194$) so prevladovali kloni CC1 (110/194; 56,7 %), CC4-CC217 (25/194; 12,9 %) in CC412 (9/194; 4,6 %) (Slika 17). Klon CC1 je bil prevladajoč klon pri vseh invazivnih oblikah listerioze: nevrolisterioza (110/194; 56,7 %), abortus (25/128; 19,5 %) in septikemija (3/6). Prevalenca izolatov CC1 med izolati iz živali z nevrolisteriozo pri govedu (38/56) in pri drobnici (71/137; 51,8 %) se ni značilno razlikovala ($p = 0,0546$). Med izolati iz živali z abortusom ($n = 128$) so prevladovali kloni CC1 (25/128; 19,5 %), CC37 (20/128; 15,6 %) in CC4-CC217 (18/128; 14,1 %) (Slika 17). Vse ostale klinične oblike listerioze (gastroenteritis, mastitis, očesna oblika in septikemija) so bile redke, zato smo jih združili v skupno kategorijo 'Druge klinične oblike'.

V zbirkki en izolat ni sodil v nobeno filogenetsko linijo v shemi MLST (1/350); med ostalimi so prevladovali izolati iz linije I (233/349; 66,8%), ki ji je sledila linija II (116/349; 33,2 %). Izolatov iz linije III ali IV nismo ugotovili.

V podmnožici kliničnih izolatov iz Francije (podmnožica FR, $n = 110$), v kateri so prevladovali izolati iz živali z abortusom, so bili trije prevalentni kloni CC1 (34/110; 30,9 %), CC37 (19/110; 17,3 %) in CC4-CC217 (18/110; 16,4 %) (Priloga 7). Ker so v podmnožici FR prevladovali izolati iz živali z abortusom (93/110; 84,5 %), smo prevalenco klonov primerjali z njihovo prevalenco med vsemi izolati iz živali z abortusom. Prevalenca klonov s frekvenco $n > 10$ (CC1, CC37, CC4-CC217 in CC6) se ni značilno razlikovala med primerjanima skupinama za nobenega od klonov ($p \geq 0,8406$).

V podmnožici kliničnih izolatov iz Slovenije (podmnožica SI, $n = 55$), v kateri so prevladovali izolati iz živali z nevrolisteriozo (45/55; 81,8 %), so bili najpogosteje ugotovljeni kloni CC1 (24/55; 43,6 %), CC4-CC217 (7/55; 12,7 %) in ST184 (6/55; 10,9 %) (**Priloga 7**). Ker so v podmnožici SI prevladovali izolati iz živali z nevrolisteriozo, smo prevalenco klonov primerjali z njihovo prevalenco med vsemi izolati iz živali z nevrolisteriozo. Prevalenca obeh klonov s frekvenco $n > 10$ (CC1 in CC4-CC217) se ni značilno razlikovala med primerjanima skupinama ($p \geq 0,5099$).



Slika 19: Prevalenca klonalnih kompleksov (CC) bakterije *L. monocytogenes* v podatkovni zbirki Živalski klinični izvor, stratificiranih po klinični obliki listerioze (nevrolisterioza, abortus in druge oblike listerioze). Prikazani so le najbolj prevalentni kloni. Značilne povezave so označene z zvezdicami: **** $p \leq 0,0001$.

Figure 19: Prevalence of *L. monocytogenes* clonal complexes (CCs) in the Animal clinical dataset, stratified according to the clinical form of listeriosis (neurolisteriosis, abortion and other clinical forms). Only CCs with the highest prevalence are shown. Significant differences are denoted with asterisks: **** $p \leq 0.0001$.

Prisotnost predhodno opisanih hipervirulentnih klonov (CC1, CC2, CC4 in CC6) smo ugotovili pri vseh kliničnih oblikah listerioze. Hipervirulentni kloni so izrazito prevladovali pri nevrolisteriozi (136/194; 70,1 %), pri kateri je bila relativna frekvenca hipervirulentnih klonov značilno višja kot pri izolatih iz vseh ostalih oblik listerioze ($p < 0,0001$; **Tabela 8**). Relativna frekvenca hipervirulentnih klonov pri izolatih iz živali z abortusom in redkimi oblikami listerioze se ni značilno razlikovala ($p = 0,2034$).

Tabela 8: Absolutna in relativna frekvence hipervirulentnih klonov bakterije *L. monocytogenes* v podatkovni zbirki Živalski klinični izvor, stratificirani po klinični obliki listerioze. Hipervirulentni kloni so bili CC1, CC2, CC4 in CC6.

Table 8: Absolute and relative frequency of hypervirulent *L. monocytogenes* clones in the Animal clinical dataset, stratified according to the clinical form of listeriosis. Hypervirulent clones included CC1, CC2, CC4 and CC6.

Klinična oblika listerioze	Frekvenca hipervirulentnih klonov Število izolatov (%)
Abortus	55/128 (43,0 %)
Druge klinične oblike*	8/28
Nevrolisterioza	136/194 (70,1 %)

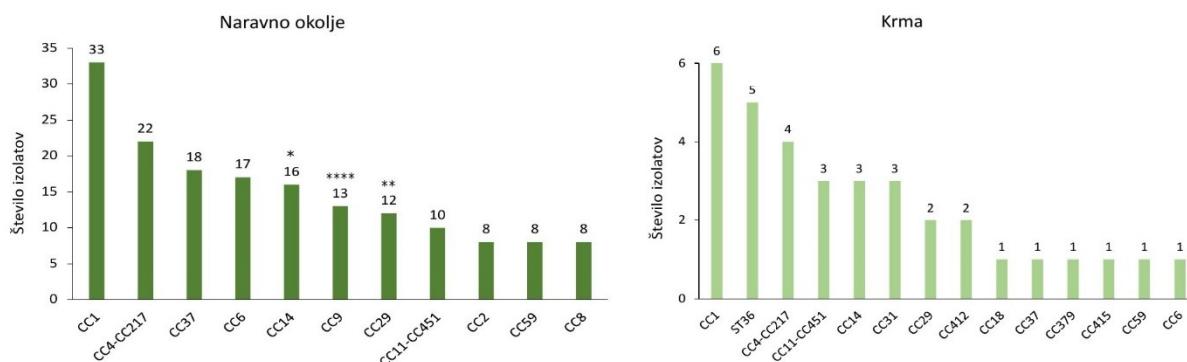
*Druge klinične oblike so vključevale gastroenteritis, mastitis, očesno listeriozo in septikemijo.

*Other clinical forms included gastroenteritis, mastitis, ocular listeriosis and septicaemia.

4.2.3 Populacijska struktura izolatov *L. monocytogenes* izolatov iz naravnega okolja

V podatkovni zbirki Naravno okolje ($n = 253$) so prevladovali naslednji kloni: CC1 (33/253; 13,0 %), CC4-CC217 (22/253; 8,7 %), CC37 (18/253; 7,1 %), CC6 (17/253; 6,7 %), CC14 (16/253; 6,3 %), CC9 (13/253; 5,1 %) in CC29 (12/253; 4,7 %) (Slika 18). Omenjeni kloni so imeli frekvenco $n > 10$ in so predstavljali 51,8 % celotne zbirke. Prevladovali so izolati iz filogenetske linije II (143/253; 56,5 %), ki sta ji sledili linija I (118/253; 43,1 %) in linija III (2/253; 0,7 %). Izolatov iz linije IV nismo ugotovili. Kloni CC9 ($p < 0,0001$), CC29 ($p = 0,0013$) in CC14 ($p = 0,0185$) so bili značilno povezani z naravnim okoljem.

Med izolati iz krme (podmnožica Krma, $n = 34$) so prevladovali izolati CC1 (6/34; 17,6 %), ST36 (5/34; 14,7 %) in CC4-CC217 (4/34; 11,8 %) (Slika 19). V podmnožici izolatov iz Slovenije (podmnožica SI; $n = 61$) so prevladovali kloni CC1 (8/61; 13,1 %), CC37 (7/61; 11,5 %) in CC4-CC217 (4/61; 6,6 %) (Priloga 8). Prevalenca šestih najbolj prevalentnih klonov v zbirki Naravno okolje (CC1, CC4-CC217, CC37, CC6, CC14 in CC9) se ni značilno razlikovala od njihove prevalence v podmnožici SI ($p \geq 0,1406$).



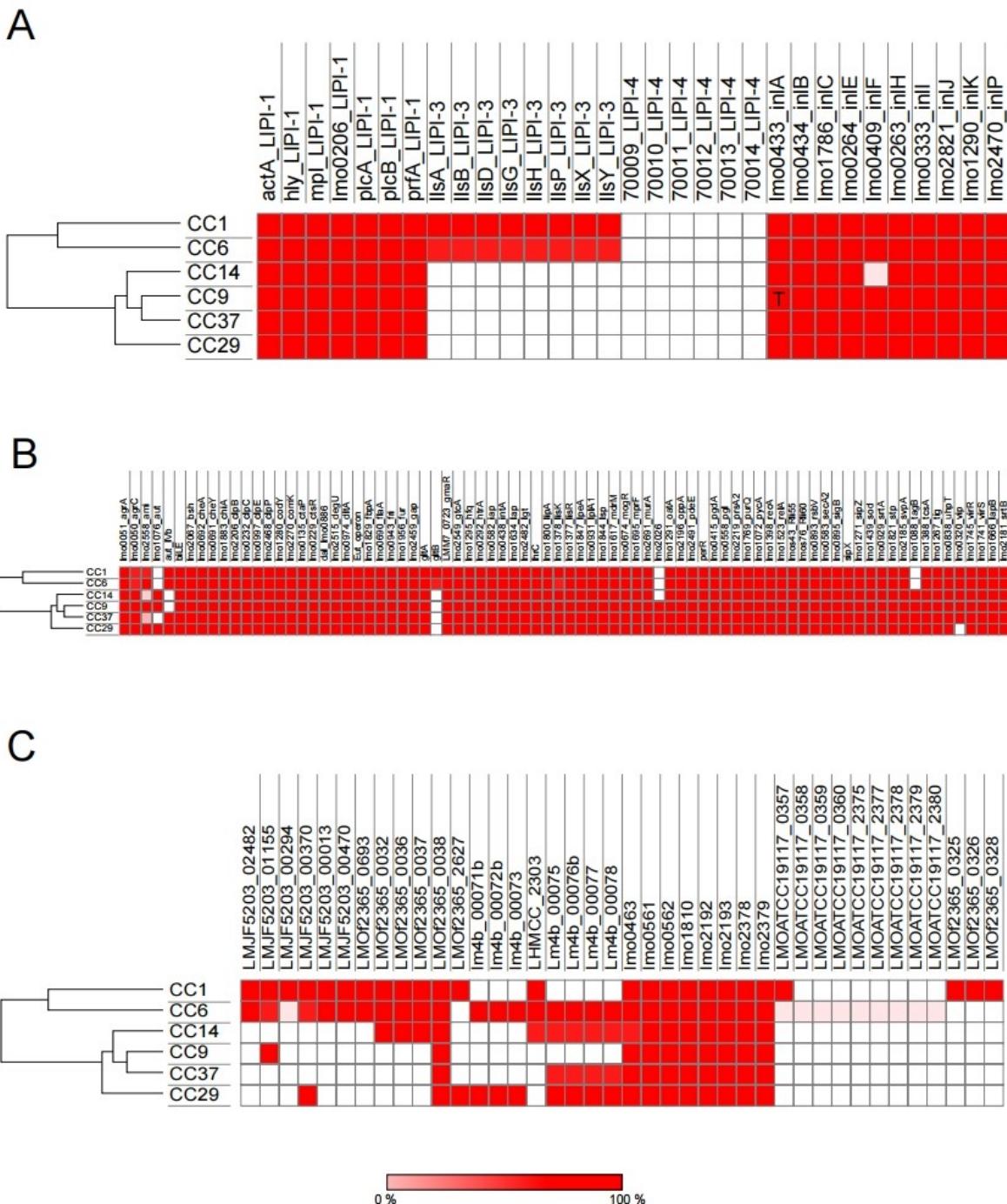
Slika 20: Prevalenca klonalnih kompleksov (CC) bakterije *L. monocytogenes* v podatkovni zbirki Naravno okolje (levo) in njeni podmnožici Krma (desno). Predstavljeni so le kloni z največjo prevalenco. Značilne povezave so označene z zvezdicami: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,0001$.

Figure 20: Prevalence of *L. monocytogenes* clonal complexes (CCs) in the Natural environment dataset (left) and Feed subset (right). Only the CCs with the highest prevalence are shown. Significant differences are denoted with asterisks: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,0001$.

4.2.4 Analiza prisotnosti/odsotnosti determinant virulence

Pri klonih, ki so povezani s kliničnim izvorom (CC1), naravnim okoljem (CC9, CC14 in CC29) ali klinično obliko listerioze (CC1, CC6 in CC37), smo analizirali prisotnost/odsotnost 151 determinant virulence. V analizo smo zajeli po 10 javno dostopnih, naključno izbranih genomov vsakega klena (**Priloga 2**). Ugotovili smo, da so determinante virulence po večini ohranjene tako znotraj posameznega klena kot med različnimi filogenetskimi linijami. Otok patogenosti LIPI-1 je bil ohranjen pri vseh analiziranih klonih (**Slika 21A**). Otok patogosti LIPI-3 je bil prisoten pri klonih CC1 in CC6, ki sodita v filogenetsko linijo I. Otoka patogosti LIPI-4 nismo ugotovili pri nobenem klenu (**Slika 21A**). Geni za internaline (*inl*) so bili po večini ohranjeni pri vseh izolatih z izjemo gena *inlF*, ki je bil odsoten pri klenu CC14. Zapis za okrnjeno beljakovino InlA smo ugotovili le pri 5/10 izolatih klena CC9 (**Slika 21A**). Med ostalimi 80 predhodno opisanimi determinantami virulence je bila večina determinant ohranjena pri vseh klonih; izjema so bili geni *ami*, *aut*, *aut_IVb*, *gltB*, *lmo2028*, *tagB* in *vip* (**Slika 21B**). Determinante virulence, ki so povezane s klinično relevantnimi (hipervirulentnimi) kloni, so bile v primerjavi z ostalimi determinantami manj ohranjene, vendar je bila njihova frekvenca precej visoka tako znotraj posameznega klena kot med različnimi kloni in filogenetskima linijama (**Slika 21C**).

Hierarhično razvrščanje klonov v skupine na osnovi prisotnosti/odsotnosti determinant virulence je pokazalo, da so izolati iste filogenetske linije po svojem naboru determinant virulence med seboj bolj podobni kot izolati iz različnih filogenetskih linij (**Slika 21**). Z drugimi besedami je bil nabor dejavnikov virulence bolj vezan na klen oz. filogenetsko linijo kot na vir izolacije.



Slika 21: Toplotni diagram prisotnosti/odsotnosti 151 determinant virulence pri klonalnih kompleksih (CC) bakterije *L. monocytogenes*, ki so bili značilno povezani z izvorom izolacije ali klinično obliko listerioze. Klone smo hierarhično razvrstili v skupine glede na prisotnost/odsotnost determinant virulence. Intenziteta barve sovpada z relativno frekvenco prisotnosti gena znotraj posameznega klena; v analizo smo zajeli po 10 izolatov na vsak klen. A, otoka patogenosti LIPI-1 in LIPI-3 ter geni za internaline (*inl*). Pri klonu CC9 smo pri 5/10 izolatih ugotovili zapis za okrnjeno beljakovino InlA (na sliki označena s črko T). B, 80 predhodno opisanih determinant virulence. C, 40 nedavno opisanih, kandidatnih determinant virulence.

Figure 21: Heatmap of the gene presence/absence for 151 virulence genes in *L. monocytogenes* clonal complexes (CCs) that were significantly associated with the origin of isolation or clinical form of listeriosis. Clones were hierarchically clustered according to the similarity in gene presence/absence. Colour intensity corresponds to the relative frequency of the gene presence per clone; 10 isolates were analyzed per each clone. A, LIPI-1 and LIPI-3 pathogenicity islands and internalin-coding (*inl*) genes. In CC9 clone, 5/10 isolates had a truncated InlA (marked as T). B, 80 previously described virulence genes. C, 40 recently described, candidate virulence genes.

5 RAZPRAVA

5.1 UGOTAVLJANJE EPIDEMIOLOŠKIH POVEZAV MED IZOLATI BAKTERIJE *L. monocytogenes*

V prvem sklopu naloge smo z metodama PFGE in WGS preučevali epidemiološke povezave med izolati bakterije *L. monocytogenes*. Metoda PFGE je do nedavnega veljala za zlati standard za tipizacijo bakterije *L. monocytogenes*, zdaj pa jo vse bolj nadomešča metoda WGS, ki ima večjo moč razlikovanja in omogoča vpogled v celoten genom mikroorganizma. Izbruhi listerioze pri živalih le redko vključujejo tipizacijo izolatov *L. monocytogenes*. V okviru doktorskega dela smo prvi v svetu izvedli obsežno analizo izbruhov listerioze pri živalih z metodo WGS.

Rezultate metod PFGE in WGS smo primerjali pri preiskavi sedmih izbruhov listerioze pri živalih, enem primeru izbruha listerioze pri ljudeh in dveh epidemioloških preiskavah poti širjenja listerij v kmetijskem okolju. Metodi sta v večini primerov (7/10) dali skladne zaključke glede mikrobioloških povezav med izolati. S tem smo delno potrdili prvo hipotezo, da bomo pri domnevno epidemiološko povezanih izolatih *L. monocytogenes*, ki imajo enak ali zelo podoben profil PFGE, to povezavo ugotovili tudi z metodo WGS. Po drugi strani je metoda PFGE v več primerih (3/10) dala napačne zaključke glede mikrobioloških povezav med izolati, ki smo jih ugotovili z metodo WGS.

Metoda PFGE ni uspela razlikovati dveh izbruhov listerioze pri živalih s kmetije A (izbruha 1 in 3), ki ju je povzročil klon *L. monocytogenes* ST1 (CC1). Izbruha sta si na isti kmetiji sledila s štirimesečnim zamikom (januar in april 2018). Analiza profilov PFGE je pokazala, da so imeli vsi širje klinični izolati enak kombiniran profil PFGE. Ker sta bila izbruha geografsko povezana (ista kmetija) in je bil časovni interval med njima sorazmerno kratek, bi ju na osnovi rezultatov metode PFGE lahko obravnavali kot en izbruh, ki ga je povzročil isti sev *L. monocytogenes* (monoklonalni izbruh). Vendar smo z metodo WGS pokazali, da je bila genetska razdalja med izolati, pridobljenimi v različnih mesecih, prevelika (≥ 78 polimorfizmov wgSNP), da bi lahko šlo za en izbruh. Ta ugotovitev je bila dodatno podprtta z ugotovitvijo, da se je sev *L. monocytogenes* ST1, ki je povzročil izbruh na kmetiji B v letu 2008 (izbruh 2), filogenetsko uvrščal med izolate iz obeh izbruhov na kmetiji A.

V primeru epidemiološke preiskave poti širjenja bakterije *L. monocytogenes* na kmetiji H je metoda PFGE pokazala, da sta se dva izolata bakterije *L. monocytogenes* ST5 razlikovala v enem pasu profila *Ascl*. Oba izolata sta izvirala iz mleka iz mlekomata. WGS-tipizacija je pokazala, da sta se izolata razlikovala le v dveh alelih wgMLST, zato smo lahko potrdili njuno mikrobiološko povezanost. Ugotovili smo, da je zamik v velikosti 37 kb v pasu profila *Ascl* posledica integracije profaga *frpsl* pri izolatu L1419 (oz. njegove ekskizije pri izolatu L1420). Integracija oz. ekskizija profaga, ki je enkratni genetski dogodek, je torej vodila v spremembo profila *Ascl* PFGE. Ker z analitičnimi pristopi cgMLST, wgMLST in wgSNP primerjamo le alele oz. nukleotidne pozicije, ki so prisotni pri vseh primerjanih izolatih, na ta način

zmanjšamo vpliv horizontalnih prenosov genov, ki lahko zabrišejo prave filogenetske odnose med izolati (Reimer in sod., 2019). Integracija oz. eksicizija profaga ali mutacija v restrikcijskem mestu *AscI* sta bili predhodno že opisani kot razloga za spremembo profila PFGE *AscI* pri genetsko ozko sorodnih izolatih bakterije *L. monocytogenes* (Chen in Knabel, 2008; Chen in sod., 2017b).

Naši rezultati so v skladu z ugotovitvami drugih raziskovalcev, ki so v primerih izbruhov listerioze poročali o lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatih PFGE oz. nezadostni moči razlikovanja, ki jo ima metoda PFGE (Chen in sod., 2017b; Moura in sod., 2017; Reimer in sod., 2019). Zato predlagajo, da bi morala metoda WGS za epidemiološki nadzor bakterije *L. monocytogenes* nadomestiti metodo PFGE (Moura in sod., 2017).

Avstralska raziskava je pokazala, da mobilni genetski elementi lahko olajšajo razlikovanje mikrobiološko povezanih in nepovezanih izolatov bakterije *L. monocytogenes* (Wang in sod., 2015), zato smo želeli to preveriti tudi v naši raziskavi. Ugotovili smo, da je analiza plazmidnih in profagnih zaporedij za opredelitev mikrobioloških povezav med izolati težavna iz več razlogov. Prvi je odsotnost mobilnih genetských elementov pri preiskovanih izolatih, saj pri treh od osmih analiziranih izbruhov nismo ugotovili prisotnosti plazmidne ali profagne DNA. Poleg tega plazmidna zaporedja niso izkazovala zadostne moči razlikovanja (so bila preveč ohranjena), saj je bil plazmid pLmA144 prisoten tudi pri sporadičnih, epidemiološko nepovezanih izolatih ST8. Tretji razlog je nestabilnost mobilnih genetských elementov, ki lahko z enkratnim dogodkom (eksicizijo ali integracijo profaga oz. izgubo ali privzemom plazmida) spremenijo genom izolata. Nestabilnost genetských elementov smo ugotovili pri izbruhi 8 (ST8), pri katerem izolat L597 ni imel plazmida pLmA144. Izolat L595 je izviral iz istega bolnika kot izolat L597; izolat L595 je bil pridobljen ob njegovi prvi hospitalizaciji, izolat L597 pa ob njegovi ponovni hospitalizaciji v drugi bolnišnici. Zato smo tudi pri izolatu L597 pričakovali prisotnost plazmida. Sev je lahko plazmid izgubil že v bolniku ali med vzdrževanjem (presajanjem) v laboratoriju. Tehnični razlogi za odsotnost plazmidne DNA (neuspešna ekstracija plazmidne DNA skupaj s kromosomsko DNA ali premajhna zastopanost plazmidne DNA v knjižnici WGS) so malo verjetni, saj smo odsotnost plazmidne DNA ugotovili z dvema tehnologijama sekvenciranja z zadostno pokritostjo. Poleg tega smo prisotnost oz. odsotnost plazmidne DNA dokazali z izolacijo plazmidne DNA in naknadno elektroforezno ločitvijo plazmidne DNA. O problematičnosti mobilnih elementov za razlikovanje epidemiološko povezanih in nepovezanih izolatov so poročali tudi drugi raziskovalci. Reimer in sod. (2019) so ugotovili, da nestabilnost profagnih zaporedij vodi v spremembe profila PFGE in otežuje interpretacijo mikrobiološke povezanosti med ozko sorodnimi izolati bakterije *L. monocytogenes* CC8. Chen in sod. (2017a) so ugotovili, da profagna zaporedja nimajo zadostne moči razlikovanja med mikrobiološko povezanimi in nepovezanimi izolati.

Analiza zaporedij mobilnih elementov je pri epidemiološkem spremljanju bakterije *L. monocytogenes* vendarle lahko tudi informativna. Plazmidi pogosto kodirajo determinante, ki so udeležene pri ekofiziologiji listerij, kot so odpornost proti težkim kovinam, razkužilom in visokim temperaturam (Elhanafi in sod., 2010; Pöntinen in sod., 2017). Znan je celo primer

domnevne determinante virulence *inlP3*, ki se nahaja v plazmidu pLMIV in naj bi kodirala internalin (den Bakker in sod., 2012). V tem delu smo med znanimi determinantami, ki so udeležene pri odpornosti proti stresorjem, v plazmidu pLmA144 ugotovili gena *cadA* in *cadC*, ki kodirata sistem za izčrpavanje kadmija (Lebrun in sod., 1994). Koncentracije težkih kovin v naravnem okolju so lahko precej visoke, poleg tega težke kovine v okolju perzistirajo dolgo časa in vstopajo v prehransko verigo (Ayangbenro in Babalola, 2017). Odpornost proti težkim kovinam, ki so jim listerije izpostavljene v naravnem okolju in v živilih, bi tako lahko vplivala na njihovo večjo sposobnost preživetja v tovrstnem okolju.

V tem delu smo 11 izolatov bakterije *L. monocytogenes* sekvencirali z obema uveljavljenima tehnologijama NGS druge generacije – Illumina in Ion Torrent. Ugotovili smo, da se izolati, sekvencirani z obema tehnologijama, v povprečju zaradi tehnologije razlikujejo v sedmih alelih cgMLST, 11 alelih wgMLST in enim polimorfizmu wgSNP. Od tega je šest izolatov pripadalo epidemiološki preiskavi izbruha listerioze pri ljudeh, ki ga je povzročil sev ST8. V tem primeru smo ugotovili nepričakovano veliko število alelnih razlik med epidemiološko povezanimi izolati: do 27 alelnih razlik cgMLST in 13 alelnih razlik wgMLST. Ob uporabi fiksne meje 7–10 alelov cgMLST za mikrobiološko povezanost bi te izolate lahko označili kot nepovezane (Moura in sod., 2016; Ruppitsch in sod., 2015). Ugotovili smo, da je večina genetskih razdalj (alelnih variacij) posledica napak, ki jih tehnologija Ion Torrent vnaša pri sekvenciranju homopolimernih regij. Gre za dobro znano omejitev tehnologije, ki zaradi svoje narave ne more zanesljivo sekvencirati teh regij; posebej težavne so daljše homopolimerne regije. Tehnologija pri sekvenciranju n nukleotidov dolgega homopolimera temelji na n -kratnem porastu v intenziteti signala (spremembi napetosti), vendar zaradi stohastične narave biokemijskih reakcij in delovanja sekvenatorja prihaja do napak pri sekvenciranju homopolimernih regij. Te se običajno kažejo kot precenitev ali podcenitev števila nukleotidov na koncu homopolimerne regije (Fujita in sod., 2017; Zeng in sod., 2013). Raziskave, ki bi primerjale uporabnost tehnologij Ion Torrent in Illumina za tipizacijo ozko sorodnih oz. epidemiološko povezanih bakterijskih izolatov, so redke. Kaas in sod. (2014) so na primeru 12 epidemiološko povezanih izolatov bakterije *Salmonella* Montevideo pokazali, da sta bili tehnologiji ponovljivi in da je bilo filogenetsko grupiranje izolatov na osnovi wgSNP skladno. Druge objave so omejene na manjše preizkuse, kot so medlaboratorijske kontrole, pri katerih se tehnologija Ion Torrent redkeje uporablja in epidemiološka povezava med izolati pogosto ni znana (ISS, 2018; ECDC, 2019a). Tovrstne kontrole so z javnozdravstvenega vidika zelo pomembne, saj zagotavljajo medlaboratorijsko primerljivost rezultatov in zanesljivost njihove interpretacije. Izpostaviti velja, da smo izolate iz vseh sedmih retrospektivnih preiskav izbruhovali pri živalih sekvencirali le s tehnologijo Illumina, s čimer smo izločili možnost vpliva tehnologije sekvenciranja na rezultate WGS-tipizacije.

Za razliko od analitičnih pristopov cgMSLT in wgMLST, ki temeljita na aleilih, smo s pristopom wgSNP dobili bolj skladne rezultate med tehnologijama – epidemiološko povezani izolati so se razlikovali v največ dveh (Illumina) oz. treh (Ion Torrent) polimorfizmiwgSNP. Najverjetnejši razlog za skladnost rezultatov pri pristopu wgSNP je, da pristop uporablja strožje kriterije (filtre) kot pristopa, ki temeljita na aleilih. Metoda wgSNP namreč vključuje številne

filtre pri poravnavi (umeščanju) odčitkov na referenco (angl. *read mapping thresholds*), ki je predstopnja analize wgSNP, in pri sami analizi wgSNP (angl. *wgSNP analysis thresholds*). Naši rezultati kažejo, da je za analizo podatkov WGS, pridobljenih s tehnologijo Ion Torrent, tipizacija na osnovi alelov manj primerna kot tipizacija na osnovi polimorfizmov wgSNP, zlasti v primeru ozko sorodnih izolatov. Pokazali smo, da hkratna uporaba več analitičnih pristopov WGS poveča verjetnost za ugotavljanje pravih genetskih razdalj med mikroorganizmi in s tem zanesljivo ugotavljanje njihovih medsebojnih epidemioloških povezav. Izpostaviti velja tudi nevarnost lažno negativnih rezultatov, saj lahko ob uporabi prestrogih filtrov za ugotavljanje polimorfizmov wgSNP ali alelnih razlik podcenimo število genetskih razlik med izolati. Ugotovljena odstopanja med tehnologijama NGS kažejo na potrebo po dodatni validaciji in optimizaciji tehnologij ter analitičnih pristopov za tipizacijo bakterij, zlasti v primeru tehnologije Ion Torrent in tipizacije na osnovi alelov.

Z vsemi tremi analitičnimi pristopi, ki temeljijo na WGS, smo ugotovili majhno število genetskih razlik med epidemiološko povezanimi izolati (do sedem alelnih razlik cgMLST, do 12 alelnih razlik wgMLST in 13 polimorfizmov wgSNP), ki so bile primerljive s predhodno opisanimi epidemiološkimi rezultati (Jackson in sod., 2016). Pristopa wgMLST in wgSNP sta imela primerljivo moč razlikovanja in sta vodila v podobno grupiranje izolatov na filogenetskem drevesu, kar je v skladu z ugotovitvami drugih raziskovalcev (Jagadeesan in sod., 2019; Katz in sod., 2017). Tudi pristop cgMLST je vodil do podobnih rezultatov, vendar je imel manjšo moč razlikovanja kot pristopa wgMLST in wgSNP. Razlog je verjetno v tem, da shema cgMLST za bakterijo *L. monocytogenes* vsebuje le 1748 lokusov, kar predstavlja le ~54 % dolžine celotnega genoma, medtem ko pristopa wgMLST in wgSNP primerjata veliko večji del genoma (Moura in sod., 2016; Jagadeesan in sod., 2019). Rezultati kažejo, da je v primeru epidemiološke preiskave ozko sorodnih izolatov s pristopom cgMLST k analizi treba priključiti tudi pristopa wgMLST in/ali wgSNP, s čimer povečamo moč razlikovanja.

Interpretacija mikrobiološke povezanosti med izolati na osnovi genetskih razdalj ni preprosta. Naši rezultati podpirajo ugotovitve drugih raziskovalcev, da bi uporaba fiksnih mej morala služiti zgolj kot pomoč (in ne pravilo) pri zamejitvi epidemiološko povezanih sevov (Chen in sod., 2017a; Jagadeesan in sod., 2019; Pightling in sod., 2018). Smernice za interpretacijo podatkov WGS se bodo v prihodnosti zagotovo še spreminjače in dopolnjevale, k čemur bodo doprinesle tudi nove epidemiološke raziskave. Z javnozdravstvenega vidika je pravilna interpretacija epidemiološke povezanosti ključnega pomena, saj ima lahko regulatorne (zakonske) posledice, kot sta npr. umik živila iz prodaje in prepoved obratovanja živilskopredelovalnega obrata. Če tipizacijska metoda izolate, ki so v resnici mikrobiološko povezani, opredeli kot nepovezane, to lahko vodi do pojava dodatnih primerov bolezni. Po drugi strani lahko tipizacijska metoda s premajhno močjo razlikovanja mikrobiološko nepovezane izolate opredeli kot povezane, kar ima lahko za živilske obrate velike in nepotrebne finančne posledice. Interpretacijo dodatno otežuje uporaba različnih platform/tehnologij za sekvenciranje ter različnih analitičnih pristopov in orodij za obdelavo podatkov WGS. V fazi vpeljave metode WGS je ključnega pomena hranjenje neobdelanih podatkov (običajno v

formatu FASTQ), ki se med laboratoriji lahko izmenjujejo in jih lahko laboratoriji analizirajo s svojim analitičnim pristopom.

Naša raziskava predstavlja pomemben doprinos k razumevanju genetske raznolikosti epidemiološko povezanih in nepovezanih izolatov bakterije *L. monocytogenes* iz kmetijskega okolja, ki so v primerjavi z izolati iz živil in ljudi precej slabše raziskani. Po naših podatkih smo v tem delu prvi v svetu izolate iz izbruhoval listerioze pri živalih opredelili z metodo WGS. Ugotovili smo, da so izolati iz izbruhoval listerioze pri živalih pripadali klonom ST1 (CC1), ST18 (CC18), ST21 (CC21) in ST184. Potrdili smo monoklonalno naravo vseh sedmih izbruhoval. Čeprav je bilo pri izbruhu 6 (ST21) razvrščanje epidemiološko povezanih izolatov slabo statistično podprtlo in je bilo razvrščanje epidemiološko povezanih izolatov tudi parafiletsko, to po trenutnih smernicah za interpretacijo rezultatov WGS ne izključuje njihove epidemiološke povezave, če so izolati ozko sorodni in jih povezujejo epidemiološki podatki (Pightling in sod., 2018).

Klon CC1 je splošno razširjen, hipervirulentni klon, ki je značilno povezan s kliničnim izvorom pri ljudeh in živalih, kar smo potrdili tudi v naši raziskavi (Dreyer in sod., 2016; Moura in sod., 2016). Tudi klona ST18 in CC21 sta splošno razširjena klona, ki ju pogosto najdemo med kliničnimi izolati iz živali, ljudi, živil in kmetijskega okolja (Althaus in sod., 2014; Dreyer in sod., 2016; Félix in sod., 2018; Maury in sod., 2016). Po drugi strani naj bi bil klon ST184 zelo redek klon, ki po naših podatkih in po podatkih iz literature še ni bil povezan z okužbo pri živalih. V naši zbirki smo ugotovili 19 izolatov *L. monocytogenes* ST184, ki so po večini izvirali iz Slovenije (17/19) in iz živali z listeriozo (16/19). V zbirki izolatov »Institut Pasteur BIGSdb-Lm« (<https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>) klona ST184 nismo ugotovili. V podatkovni zbirki NCBI Pathogen Detection (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/>) smo ugotovili en izolat ST184, ki je bil povezan z listeriozo pri človeku. Rezultati nakazujejo, da gre za regionalno razširjen klon s potencialno povečanim infekcijskim potencialom pri živalih. Na ta način smo z metodo WGS oz. MLST ugotovili obstoj potencialnega porajajočega se, klinično relevantnega klona bakterije *L. monocytogenes*, kar je pomemben cilj njenega epidemiološkega spremljanja. Potrebno je nadaljnje (prospektivno) epidemiološko spremljanje, ki bo pokazalo trende v prevalenci, regionalno razširjenost in klinični pomen klona ST184 v Sloveniji in širše.

Pomembna pomanjkljivost preiskav izbruhoval listerioze pri živalih je bilo majhno število analiziranih izolatov na posamezen izbruh (2–5 izolatov). Pri večini izbruhoval je bilo število vseh obolelih živali večje kot število analiziranih kliničnih izolatov, kar je posledica diagnostičnih algoritmov pri potrditvi nevrolisterioze in s tem povezanih stroškov. Večje število izolatov bi lahko povečalo pravilnost filogenetske rekonstrukcije (Pollock in sod., 2002).

Izbruh listerioze pri ljudeh je povzročil sev ST8 (CC8). Klinični izolati so se od izolata iz živil in izolata iz salamoreznice razlikovali v več kot 101 polimorfizmu wgSNP, zato smo ovrgli njihovo mikrobiološko povezavo. Poleg tega so mikrobiološko (in epidemiološko) povezani klinični izolati oblikovali polifiletsko gručo glede na ostala izolata. Rezultati metod PFGE in WGS so tako dali skladne rezultate glede mikrobiološke povezanosti kliničnih izolatov in ovrgli

mikrobiološko povezavo ostalih dveh izolatov s kliničnimi izolati. Klon ST8 je splošno razširjen in ga pogosto najdemo med izolati iz živil in okolja ter izolati kliničnega izvora (Althaus in sod., 2014; Dreyer in sod., 2016b; Maury in sod., 2016). Predhodno je že bil odgovoren za številne izbruhe listerioze pri ljudeh (ECDC, 2018; Reimer in sod., 2019; Schjørring in sod., 2017). Klon je zanimiv tudi zaradi velike genetske ohranjenosti (klonalnosti) – presenetljivo se je več epidemiološko nepovezanih izolatov ST8 iz drugih evropskih držav na filogenetskem drevesu uvrščalo med izolate, ki so bili pridobljeni v okviru epidemiološke preiskave. Med njimi so bili tudi izolati, pri katerih so opisali sposobnost perzistence v živilskopredelovalnih obratih (Fagerlund in sod., 2016). Klon ST8 (CC8), ki se uvršča v filogenetsko linijo II, zaradi svoje sposobnosti perzistence in visoke prevalence tako med kliničnimi izolati kot med izolati iz živil predstavlja povečano tveganje za javno zdravje. Večina klonov, ki so značilno povezani s kliničnim izvorom, namreč pripada filogenetski liniji I, je hipovirulentna in ni sposobna perzistence (Fagerlund in sod., 2016; Maury in sod., 2016).

V tem delu smo potrdili številne epidemiološke povezave med izolati bakterije *L. monocytogenes*, s čimer smo doprinesli k boljšemu razumevanju ekologije in poti širjenja v kmetijskem okolju. Na primeru kmetije H smo potrdili, da kontaminacija surovga mleka s sevom ST5 (CC5) lahko izvira iz sistema za molžo. Sev, ki je povzročil kontaminacijo mleka v mlekomatu, smo ugotovili v cisterni za mleko in v starem robotu za molžo, ne pa v mleku posameznih krav. Gre za prvi tovrstni primer v Sloveniji, saj so pri podobnih predhodnih preiskavah poti širjenja bakterije *L. monocytogenes* na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete (IMP VF) omenjeno bakterijo vedno našli v mleku krav s subkliničnim mastitisom (podatki niso prikazani). Najverjetnejše se je sev ST5 prenesel iz starega robota za molžo v cisterno in v mlekomat. Ker naj bi bil klon ST5 tudi sposoben perzistence v živilskopredelovalnih obratih (Muhterem-Uyar in sod., 2018), se zdi zelo verjetna možnost, da je sposoben perzistence tudi v kmetijskem okolju oz. mlekovodnem sistemu. Za potrditev te hipoteze bi bilo potrebno dodatno vzorčenje in tipizacija izolatov skozi daljše časovno obdobje. Latorre in sod. (2010) so opisali, da je kontaminacija bazenskega mleka na kmetiji izvirala iz biofilma v sistemu za molžo. Poleg tega so Latorre in sod. (2011) ugotovili, da imajo sevi, ki so v sistemih za molžo prevladujoči in perzistentni, večjo *in vitro* sposobnost adherence kot ostali. Ker gre za precej pogost klon tudi med izolati iz živil, njegova perzistenca v kmetijskem okolju in v živilskopredelovalnih obratih predstavlja javnozdravstveni problem (Félix in sod., 2018; Maury in sod., 2016).

Kontaminacija mlečne žleze ali kontaminiran sistem za molžo veljata za najpogostejša vira kontaminacije surovga mleka. Čeprav subklinični listerijski mastitis velja za malo verjeten vir kontaminacije surovga mleka predvsem zaradi svoje redke pojavnosti (Castro in sod., 2018; Jensen in sod., 1996), so bili primeri kontaminacije bazenskega mleka zaradi subkliničnega mastitisa vendarle predhodno že opisani (Hasegawa in sod., 2013; Hunt in sod., 2012). Z epidemiološko preiskavo na kmetiji G smo potrdili, da kontaminacija surovga mleka lahko izvira tudi iz živali s subkliničnim mastitisom. Naši rezultati v kombinaciji z rezultati prehodnih preiskav podobnih primerov na IMP VF kažejo, da subklinični listerijski mastitis ni zanemarljiv vir kontaminacije bazenskega mleka. Na kmetiji smo ugotovili velik delež krav mlekaric s

subkliničnim mastitisom (9/47; 19,1 %), kar bi lahko spregledali, če ob pojavu živčnih znakov bolezni pri piginuli kravi ne bi izvedli epidemiološke preiskave, ki je obsegala tudi vzorčenje mleka iz mlečne žleze preostalih krav. Dva izolata iz mlečne žleze sta pripadala hipervirulentnemu klonu CC4, ki so ga pri živalih s subkliničnim mastitisom že opisali tudi v Švici (Dreyer in sod., 2016). Prisotnost hipervirulentnih klonov v surovem mleku predstavlja veliko tveganje za potrošnika zaradi možnosti kontaminacije sistema za molžo in živilske verige (mlekarne), pa tudi zaradi vse bolj priljubljenega uživanja surovega mleka in izdelkov iz nepasteriziranega mleka (Costard in sod., 2017). Mleko in mlečni izdelki so bili kot vir okužbe ljudi opisani v številnih primerih izbruhov listerioze (CDC, 2017; Jackson in sod., 2018).

Pri izbruhu 7 (ST184) pri živalih smo pokazali, da sta bila najverjetnejša vira okužbe kontaminirana voda in/ali silaža. Ker silaža slabe kakovosti predstavlja dober substrat za razmnoževanje bakterije, se ta zdi najverjetnejši vir okužbe. Kontaminirana voda bi lahko doprinesla k infekcijski dozi. S tem smo potrdili splošno sprejeto povezavo med kontaminirano silažo in listeriozo pri živalih (Nightingale in sod., 2004). Po drugi strani v primeru epidemiološke preiskave na kmetiji G povezave med izolatom iz silaže in kliničnim izolatom nismo potrdili. Pomembna omejitev omenjene preiskave je bila, da smo iz silaže pridobili in tipizirali le en izolat bakterije *L. monocytogenes*. Z bolj obsežnim vzorčenjem silaže bi morda lahko nakazali dodatne epidemiološke povezave in potrdili silažo kot vir okužbe.

Opisani preiskavi kroženja listerij na kmetijah G in H sta pomembni tudi z vidika razumevanja prevalence listerij v kmetijskem okolju in njihove genetske raznolikosti. Obe preiskavi sta razkrili veliko genetsko raznolikost listerij v kmetijskem okolju tudi znotraj posameznega vzorca. V okviru preiskav okoljskih vzorcev (voda, iztrebki, mleko) smo tipizirali po pet izolatov bakterije *L. monocytogenes*. V vodi iz različnih virov (kmetija G) in v mleku (kmetija H) smo v večini primerov ugotovili po dva različna genotipa *L. monocytogenes*. Naši rezultati so v skladu s predhodno opisano veliko genetsko raznolikostjo listerij v kmetijskem okolju (Dreyer in sod., 2016; Castro in sod., 2018) in kažejo, da je za zanesljivo epidemiološko preiskavo potrebna tipizacija več izolatov iz izbranega okolja. Ker je koncentracija listerij v vodi nizka, je za njihovo uspešno ugotavljanje potrebna filtracija večje količine vzorca (≥ 1 L), s čemer povečamo verjetnost za izolacijo listerij iz vode. To je pomembna ugotovitev, ki prispeva k izboljšanju poteka vzorčenja pri prihodnjih epidemioloških preiskavah.

5.2 POPULACIJSKA STRUKTURA IZOLATOV BAKTERIJE *L. monocytogenes*

V drugem sklopu naloge smo analizirali populacijsko strukturo izolatov *L. monocytogenes* živalskega kliničnega izvora in iz naravnega okolja. Za ta namen smo sestavili dve veliki podatkovni zbirki izolatov bakterije *L. monocytogenes*: Živalski klinični izvor ($n = 350$) in Naravno okolje ($n = 253$). Obe okolji sta z vidika populacijske strukture izolatov bakterije *L. monocytogenes* precej slabše preučeni v primerjavi z izolati človeškega kliničnega izvora in iz živil. Pomembni omejitvi predhodnih raziskav sta njihova geografska omejenost in/ali prisotnost epidemioloških duplikatov. Sestavljeni podatkovni zbirki sta največji podatkovni

zbirki izolatov *L. monocytogenes* iz tovrstnih okolij v Evropi doslej. Poleg tega gre za prvi opis populacijske strukture izolatov *L. monocytogenes* v Sloveniji.

Ugotovili smo, da sta v obeh zbirkah prevladovala hipervirulentna klona CC1 in CC4. Čeprav kombinirane skupine CC4-CC217 na osnovi kombiniranega profila PFGE nismo uspeli razlikovati, smo pokazali, da znotraj skupine prevladujejo izolati CC4, zato lahko poenostavljeno govorimo o prevladi klona CC4. Ugotovitev je pomembna z vidika poznavanja ekologije bakterije *L. monocytogenes* v kmetijskem okolju, saj kaže, da so živali stalno izpostavljene zelo heterogeni populaciji listerij, v kateri prevladujeta hipervirulentna klona CC1 in CC4. Živali so očitno izpostavljene drugačni populacijski strukturi listerij kot ljudje, ki so preko živil najbolj izpostavljeni hipovirulentnima klonoma CC9 in CC121 (Maury in sod., 2016).

Nedavna raziskava je pokazala, da sta hipervirulentna klona CC1 in CC4 značilno povezana z mlečnimi izdelki in imata večjo sposobnost kolonizacije črevesja v primerjavi s hipovirulentnima klonoma CC9 in CC121, ki sta značilno povezana z mesnimi izdelki (Maury in sod., 2019). Zdi se, da sta klona CC1 in CC4 bolj prilagojena na preživetje v gostitelju, medtem ko sta klona CC9 in CC121 bolj prilagojena na preživetje v živilskopredelovalnih obratih. Naši rezultati podpirajo to hipotezo, saj sta bila hiperviruletna klona najbolj razširjena v obeh analiziranih okoljih. Klona CC1 in CC4 se najverjetneje bolj uspešno ohranjata v kmetijskem okolju, saj bolj uspešno kolonizirata črevesje prežvekovcev in se v večjem številu izločata v okolje z iztrebki (asimptomatsko klicenoštvo), kar vodi v sklenitev poti kroženja v kmetijskem okolju.

Visoka prevalenca hipervirulentnih klonov v krmi kaže na potrebo po večjem mikrobiološkem nadzoru kmetijskega okolja, zlasti krme (silaže). Prevalenca listerij v kmetijskem okolju je povezana tudi s slabimi higieniskimi praksami in prevalenco asimptomatskega klicenoštva. Večja prevalenca listerij v kmetijskem okolju vodi v večjo verjetnost za kontaminacijo surovin za proizvodnjo silaže. Na zmanjšanje prevalence listerij v kmetijskem okolju lahko vplivamo z dobro kmetijsko (živinorejsko in poljedelsko) prakso, ki med drugim vključuje tudi dobre higienске razmere v hlevu, dobro prakso gnojenja z živinskimi gnojili ter dobro prakso pri proizvodnji in uporabi silaže (Bernardes in do Rego, 2014; Castro in sod., 2018; Verbič in sod., 2006). Manjša prevalenca listerij v kmetijskem okolju pomeni manjše tveganje za pojav bolezni pri živalih in ljudeh.

Klona CC1 in CC4 sta ena od prevladujočih klonov tudi med kliničnimi izolati iz ljudi. Čeprav sta značilno povezana s kliničnim izvorom, ju pogosto ugotovimo tudi v živilih (Félix in sod., 2018; Maury in sod., 2016). Dreyer in sod. (2016) so ugotovili, da večina okoljskih izolatov CC1 in CC4 izhaja iz kmetij, na katerih so pred ali ob njihovi izolaciji beležili izbruh listerioze, zato se zdi verjetno, da so bile bolne živali vir kontaminacije kmetijskega okolja in asimptomatskih klicenoscev. Čeprav so za potrditev te hipoteze potrebne dodatne raziskave, bi uvedba dodatnih higieniskih ukrepov in povečanega mikrobiološkega nadzora na kmetijah s

primeri listerioze verjetno lahko doprinesla k znižanju prevalence listerij (zlasti hipervirulentnih klonov) v kmetijskem okolu.

Potrdili smo, da je klon CC1 v Evropi prevladujoč klon med izolati kliničnega izvora, ki je značilno povezan z nevrolisteriozo. Klon je prevladoval tudi v podmnožici izolatov iz Slovenije in med vsemi izolati iz živali z invazivno obliko bolezni (nevrolisterioza, abortus in septikemija), kar dodatno potrjuje njegovo hipervirulenco. Prihodnje raziskave povezav med genotipom in fenotipom, osredotočene na klon CC1, bi lahko odkrile nove domnevne determinante, ki pogojujejo njegovo hipervirulenco in nevrotropizem. Aguilar-Bultet in sod. (2018) so z bioinformacijskimi analizami identificirali šest kandidatnih genetskih determinant, ki so potencialno udeležene pri nevrotropizmu klena CC1.

Klon CC4 je bil drugi najpogostejši klon v obeh okoljih. Gre za hipervirulentni klon, ki je bil značilno povezan s kliničnim izvorom pri ljudeh (Maury in sod., 2016). Njegove povezave s kliničnim izvorom pri živalih v tem delu nismo ugotovili. Nedavno so pri klonu CC4 opisali nov otok patogenosti LIPI-4, ki je povezan s tropizmom do posteljice in možganov. Poleg tega so avtorji identificirali številne druge kandidatne determinante virulence, ki so značilno povezane s hipervirulentnimi kloni (Maury in sod., 2016).

V okviru našega dela smo kot prvi v svetu opisali statistično značilno povezavo klonov CC37 in CC6 z abortusom pri živalih. Ugotovitev je pomembna za prihodnje raziskave povezave med genetskimi determinantami, ki pogojujejo tropizem do posteljice, in njihovih mehanizmov. Mnenja glede obstoja aktivnega (»pravega«) tropizma klonov bakterije *L. monocytogenes* do posteljice so deljena. Predpostavka dosedanjih raziskav je bila, da bo imel sev s tropizmom do posteljice v posteljničnem tkivu značilno večje število bakterij v primerjavi z drugimi tkivi, vendar je to lahko posledica aktivnega tropizma do posteljice ali pa zgolj imunsko precej permisivnega okolja gravidne maternice v primerjavi z drugimi tkivi (pasivni tropizem). Faralla in sod. (2016, 2018) so dokazali vlogo internalina P (InlP) pri tropizmu do posteljice, kar ne izključuje možnosti pasivnega tropizma. Naša raziskava predstavlja pomembno osnovo za prihodnje raziskave tropizma klonov bakterije *L. monocytogenes*, ki so povezani z abortusom. Prihodnje asociacijske raziskave na ravni celotnega genoma, osredotočene na klena CC37 in CC6, bi lahko vodile v odkritje novih determinant, ki so specifično povezane s tropizmom do posteljice.

Pri nekaterih klonih smo ugotovili zanimiva odstopanja v prevalenci med kliničnimi izolati iz ljudi in živali. Klon CC37 je bil tretji najpogostejši klon med izolati iz živali, medtem ko je bil precej redek med izolati iz ljudi (Kuch in sod., 2018; Maury in sod., 2016). Klon CC37 sicer pogosto ugotovimo tudi v živilih in v naravnem okolju (Félix in sod., 2018; Maury in sod., 2016). Klon CC412 je bil peti najpogostejši klon med kliničnimi izolati iz živali, medtem ko je klon redek med izolati iz ljudi, naravnega okolja in živil (Félix in sod., 2018; Kuch in sod., 2018; Maury in sod., 2016). Rezultati nakazujejo, da bi klon CC412 lahko imel povečan infekcijski potencial za okužbo živali, vendar statistično značilne povezave s kliničnim izvorom

nismo ugotovili. Ker je to lahko posledica premajhnega števila analiziranih izolatov, bi bilo v prihodnjih raziskavah smiselno preiskati večje število izolatov.

Prevalence klonov med izolati iz živali z redko obliko listerioze (septikemija, gastroenteritis, mastitis in očesna listerioza) nismo mogli statistično ovrednotiti zaradi majhnega števila izolatov ($n = 28$), ki je posledica redke pojavnosti tovrstnih oblik bolezni. Naši rezultati nakazujejo, da je genetska raznolikost izolatov iz živali z redkimi oblikami listerioze večja kot pri nevrolisteriozi in abortusu. Med redkimi oblikami bolezni pogosto ugotovimo tudi nehipervirulentne klone, kar nakazuje na možnost, da imajo pri tovrstnih kliničnih oblikah dejavniki gostitelja (npr. oslabljen imunski sistem, pridružena obolenja) pomembnejšo vlogo kot pri invazivnih oblikah listerioze, pri katerih prevladujejo hipervirulentni kloni. To je v skladu z raziskavo, ki je pokazala, da sta hipovirulentna klena CC9 in CC121 značilno povezana s septikemijo in se pogosteje pojavljata pri ljudeh s pridruženimi obolenji (Dreyer in sod., 2016). Hipoteza, da med izolati iz živali s septikemijo ne prevladujejo hipervirulentni kloni, je podprtta tudi z ugotovitvami ameriške raziskave (Steckler in sod., 2018), v kateri so pri izolatih iz živali s septikemijo prevladovali kloni iz filogenetske linije II.

Klone bakterije *L. monocytogenes*, ki so bili opisani kot hipervirulentni (CC1, CC2, CC4 in CC6; Maury in sod., 2016), smo združili v enotno skupino in ugotavljali njihovo zastopanost med izolati iz živali z različnimi kliničnimi oblikami listerioze. Prisotnost hipervirulentnih klonov smo ugotovili pri vseh kliničnih oblikah listerioze, vključno z vsemi redkimi oblikami bolezni. Hipervirulentni kloni so močno prevladovali pri nevrolisteriozi; njihova relativna frekvenca je bila značilno višja kot pri izolatih iz vseh ostalih kliničnih oblik listerioze. Značilnih razlik v relativni frekvenci hipervirulentnih klonov med izolati iz živali z abortusom in redkimi oblikami listerioze nismo ugotovili. S tem smo delno ovrgli drugo hipotezo o prevladi hipervirulentnih klonov bakterije *L. monocytogenes* pri vseh kliničnih oblikah listerioze. Čeprav smo prisotnost hipervirulentnih klonov ugotovili pri vseh oblikah bolezni, smo izrazito in statistično značilno prevlado hipervirulentnih klonov, zlasti klena CC1, ugotovili le pri nevrolisteriozi. Izpostaviti velja, da bi bilo za zanesljivo določitev relativne frekvence hipervirulentnih klonov med redkimi oblikami listerioze treba preiskati večje število izolatov.

Ugotovili smo značilno povezavo klonov CC9, CC14 in CC29 z naravnim okoljem. Znano je, da je klon CC9 značilno povezan z živili in eden od prevladujočih klonov med izolati iz živilskopredelovalnih obratov, pri katerem so opisali tudi sposobnost perzistence v tovrstnih obratih (Maury in sod., 2016; Stoller in sod., 2019). Povezava omenjenih klonov bi lahko bila posledica njihove perzistence v naravnem (kmetijskem) okolju, vendar so za potrditev perzistence klonov in razumevanje njenih mehanizmov potrebne nadaljnje raziskave. Tudi pri klonu CC14, ki je sicer redek klon med izolati kliničnega izvora pri ljudeh in iz živil, so opisali sposobnost perzistence v živilskopredelovalnih obratih in filmotvornost (Maury in sod., 2016; Palma in sod., 2017). Ker so sevi CC9 in CC14 sposobni perzistence v živilskopredelovalnih obratih, se zdi verjetno, da bi sposobnost perzistence v omenjenem okolju omogočala oz. olajšala tudi perzistenco v naravnem okolju, saj so bakterije v obeh okoljih lahko izpostavljene

podobnim stresorjem (skrajnim vrednostim fizikalno-kemijskih parametrov). Pomemben dejavnik pri ohranjanju listerij v kmetijskem okolju je tudi asimptomatsko klicenoštvo, zato bi bilo pomembno preučiti populacijsko strukturo izolatov, ki jih živali brez kliničnih znakov izločajo z iztrebki v okolje, in njihovo sposobnost ohranjanja v okolju.

Kljud velikemu številu izolatov, ki smo jih zajeli v raziskavo populacijske strukture, smo z rarefakcijsko analizo pokazali, da celotne taksonomske raznolikosti v preiskovanih okoljih nismo uspeli popisati. Čeprav v splošnem velja, da je vrstna pestrost izolatov iz naravnega okolja in živil večja od raznolikosti med izolati kliničnega izvora, smo pokazali, da se raznolikosti ne razlikujeta značilno in da bi nadaljnje vzorčenje lahko razkrilo večjo taksonomsko pestrost med izolati živalskega kliničnega izvora v primerjavi z okoljskimi izolati. Rezultati torej kažejo na potrebo po tipizaciji dodanih izolatov iz omenjenih okolij, da bi opisali večino taksonomske raznolikosti listerij.

V tem delu smo z analizo prisotnosti/odsotnosti 151 determinant virulence ugotovljali virulenčni potencial 16 izolatov bakterije *L. monocytogenes* iz kmetije G. Ugotovili smo, da je 111 predhodno opisanih determinant virulence po večini ohranjenih ne glede na njihov MLST CC ali izvor (okoljski ali klinični). S tem smo potrdili, da so determinante virulence pri listerijah dobro ohranjene, kar je posledica njihove klonalnosti in dejstva, da je večina determinant zapisana v kromosому (Painset in sod., 2019). Otok patogenosti LIPI-3, ki kodira listeriolizin S in je značilno povezan s povečanim infekcijskim potencialom na ravni populacije (Maury in sod., 2016), je bil prisoten pri štirih izolatih iz filogenetske linije I. Otok patogenosti LIPI-4, ki je udeležen pri tropizmu do posteljničnega in možganskega tkiva (Maury in sod., 2016), je bil prisoten pri dveh izolatih CC4. Med izolati, ki so bili sekvencirani z metodo WGS, je bil gen *inlF* prisoten pri izolatu iz živali z nevrolisteriozo in pri 3/7 izolatih iz živali s subkliničnim mastitisom, medtem ko je bil odsoten pri 4/7 izolatih iz živali s subkliničnim mastitisom. Nedavno so opisali vlogo internalina F pri tropizmu do živčnega tkiva (Ghosh in sod., 2018), zato bi lahko prisotnost *inlF* delno pojasnila povezavo med različnimi kloni listerij in klinično obliko listerioze (nevrolisterioza). Presenetljivo je bil gen *vip* prisoten pri 8/8 kliničnih izolatih (neodvisno od klinične oblike bolezni in filogenetske linije), medtem ko je bil prisoten le pri 4/8 izolatih iz naravnega okolja. Gen *vip* kodira površinsko beljakovino Vip, ki je udeležena pri invaziji listerij v gostiteljsko celico (Cabanes in sod., 2005).

Prevalenca šestih nedavno opisanih kandidatnih determinant virulence, ki so povezane s filogenetsko linijo I (Aguilar-Bultet in sod., 2018), je bila visoka: 11/16 izolatov je imelo vsaj enega od preiskovanih genov. Njihova prisotnost je bila pretežno omejena na izolate iz filogenetske linije I, vendar ni bila omejena le na izolate CC1. V našem delu je bila vsaka od 34 nedavno opisanih kandidatnih determinant virulence, ki so povezane s klinično relevantnimi (hipervirulentnimi) kloni (Maury in sod., 2016), prisotna pri vsaj enim izolatu. Omenjene gene smo ugotovili tudi pri izolatih, ki niso pripadali hipervirulentnim klonom. Posebne povezave med prisotnostjo kandidatnih determinant virulence in filogenetsko linijo ali virom izolacije nismo ugotovili. Zaključimo lahko, da je večina predhodno opisanih determinant virulence preveč ohranjena, da bi omogočala razlikovanje med hipovirulentnimi in hipervirulentnimi sevi

bakterije *L. monocytogenes* z molekularnimi metodami. Nedavno opisane kandidatne determinante virulence obetajo večjo moč razlikovanja, vendar je njihova vloga v patogenezi še premalo poznana. Poleg tega smo v tem delu ugotovili, da je prevalenca omenjenih determinant visoka tudi med izolati, ki ne pripadajo hipervirulentnim klonom. Alternativni pristop k razlikovanju hiper- in hipovirulentnih klonov z molekularnimi metodami (npr. z metodo PCR) bi bilo ciljano ugotavljanje hipervirulentnih klonov (CC1, CC2, CC4 in CC6) na osnovi ohranjenih regij, neodvisno od njihovega profila prisotnosti/odsotnosti determinant virulence.

Ugotovili smo tudi, da je bilo vseh 16 izolatov s kmetije G sposobnih okužbe celičnih linij BoMac in Vero. Na celični liniji BoMac smo ugotovili številne značilne razlike v invazivnosti in replikativnosti izolatov, ki so pripadali različnim klonom *L. monocytogenes*. Ugotovljene razlike bi lahko bile delno tudi posledica razlik v naboru determinant virulence. Posebnih povezav med hipoinvazivnostjo in hiperreplikativnostjo oz. hiperinvazivnostjo in hiperreplikativnostjo nismo ugotovili, prav tako nismo ugotovili korelacije med filogenetsko linijo in invazivnostjo oz. replikativnostjo. Ugotovili smo, da je bil izolat ST29 (CC29) hipoinvaziven in hiporeplikativen na celični liniji BoMac. Za klon CC29 smo v naši raziskavi pokazali tudi, da je značilno povezan z naravnim okoljem, zato se zdi, da je za njegovo ohranjanje v naravnem okolju sposobnost preživetja v skrajnih razmerah (ekofiziološke prilagoditve) bolj pomembna kot povečana virulenta (hiperinvazivnost, hiperreplikativnost). Izolat ST21 (CC21) je bil hiperinvaziven in hiperreplikativen na celični liniji BoMac. Pri izolatih, ki so pripadali hipervirulentnim klonom (CC1, CC2 in CC4), smo ugotovili značilne razlike glede njihove invazivnosti in replikativnosti. Naši rezultati so v nasprotju z ugotovitvami drugih raziskovalcev (Dreyer in sod., 2016), ki so ugotovili, da so vsi kloni ST1, ST4 in ST412 v celični liniji BoMac hiperinvazivni in hiperreplikativni v primerjavi s klonoma ST18 in ST37. Pri celični liniji Vero smo ugotovili veliko manjše število značilnih razlik, zato se zdi celična linija Vero manj primerna za ugotavljanje razlik v invazivnosti in replikativnosti bakterije *L. monocytogenes* oz. bi bila potrebna optimizacija testa. Izpostaviti velja, da je gentamicinski test *in vitro* test, ki ga težko optimiziramo, saj nanj vplivajo mnogi dejavniki in ima številne pomanjkljivosti (Edwards in Massey, 2011; VanCleave in sod., 2017). Poleg tega rezultati *in vitro* testov ne odražajo nujno razmer *in vivo*. Uporabljeni celični liniji (BoMac in Vero) se v svojih fizioloških in morfoloških značilnostih pomembno razlikujeta, kar vsaj deloma pojasni ugotovljene razlike v invazivnosti in replikativnosti preiskovanih izolatov. Celice BoMac so imunske (makrofagne) celice, v katere bakterija vstopa s fagocitozo, preko aktivacije Tollu podobnih receptorjev tipa 2 (Torres in sod., 2004). Celice Vero so nepolarizirane epitelijske celice, v katere bakterija vstopa aktivno, predvsem preko vezave liganda InlB z receptorjem Met in gC1qR (Braun in sod., 1998).

Na osnovi profila prisotnosti/odsotnosti determinant virulence in rezultatov gentamicinskega testa lahko zaključimo, da se izolati bakterije *L. monocytogenes* iz kmetijskega okolja razlikujejo v svojem virulenčnem potencialu. Hipoinvazivnost in hiporeplikativnost oz. hiperinvazivnost in hiperreplikativnost nista vedno korelirali. Virulenčni potencial je bil bolj kot z izvorom izolacije povezan s klonalnim kompleksom oz. filogenetsko linijo. Znane

determinante virulence so bile po večini ohranjene pri vseh preiskovanih izolatih. S tem smo delno potrdili tretjo hipotezo o različnem naboru determinant virulence, različne invazivnosti in različne replikativnosti izolatov bakterije *L. monocytogenes* iz kmetijskega okolja.

Pomembna omejitev analize determinant virulence pri izolatih iz epidemiološke preiskave na kmetiji G je bila, da vanjo nismo mogli vključiti vseh klonov, ki so na ravni populacije značilno povezani z izbranim okoljem (klinični ali okoljski izvor). Zato smo v nadaljevanju analizirali prisotnost/odsotnost determinant virulence tudi pri vseh klonih, ki so značilno povezani z virom izolacije (CC1, CC9, CC14 in CC29) ali klinično obliko listerioze (CC1, CC6 in CC37). V analizo smo zajeli po deset naključno izbranih, javno dostopnih genomskeh zaporedij vsakega klena. Ugotovili smo, da so tudi ti kloni po večini ohranjeni tako znotraj posameznega klena kot tudi med različnimi filogenetskimi linijami. Prisotnost manj ohranjenih determinant virulence je bila po večini vezana na klen oz. filogenetsko linijo. Najmanj ohranjeni so bile nedavno opisane, kandidatne determinantne virulence, vendar je bila tudi njihova frekvenca precej visoka in ni bila omejena na izolate iz filogenetske linije I. S tem smo potrdili ugotovitve predhodnih raziskav, da so determinantne virulence po večini ohranjeni in so pretežno vezane na klen oz. filogenetsko linijo (Painset in sod., 2019; Tan in sod., 2015).

Naša raziskava predstavlja temelj za prihodnje raziskave povezav med genotipom in fenotipom, v katere bi bilo smiselno zajeti klone bakterije *L. monocytogenes*, ki so značilno povezani z izbranim okoljem oz. fenotipom (vir izolacije, klinična oblika bolezni). Ugotavljanje novih kandidatnih determinant virulence in tropizma bi moralo biti osredotočeno na klone, ki so značilno povezani s kliničnim izvorom (CC1) in/ali obliko listerioze (CC1, CC6 in CC37). Tovrstne raziskave, ki so osredotočene na klinično relevantne (hipervirulentne) klone, so se že izkazale za uspešne pri ugotavljanju novih kandidatnih determinant virulence (Aguilar-Bultet in sod., 2018; Maury in sod., 2016).

Razlikovanje hipovirulentnih in hipervirulentnih ter perzistentnih in neperzistentnih sevov je pomemben cilj epidemiološkega spremljanja bakterije *L. monocytogenes*, ki bi lahko poleg uveljavljenih predpisov (zakonodaje) vodilo v vpeljavo dodatnih nadzornih in sanacijskih ukrepov. V primeru kontaminacije živilskopredelovalnih obratov s hipervirulentnimi kloni bi bila smiselna uvedba povečanega mikrobiološkega nadzora. Izpostaviti velja, da nam metoda WGS poleg tipizacije na osnovi alelov ali polimorfizmov posameznih nukleotidov omogoča tudi napoved drugih relevantnih fenotipskih oz. ekofizioloških lastnosti (npr. odpornosti proti razkužilom, visokim temperaturam) in nam s tem pomaga pri uvedbi bolj učinkovitih sanacijskih ukrepov, ciljanih na izbrani (problematični) klen oz. sev (npr. ciljano razkuževanje). Metoda WGS lahko izboljša tudi mikrobiološko analizo tveganja v živilski industriji (Rantsiou in sod., 2018).

6 ZAKLJUČKI

Metoda PFGE nima vedno zadostne moči razlikovanja za zanesljivo ugotavljanje mikrobioloških povezav med izolati. Poleg tega imajo lahko mikrobiološko povezani izolati različen profil PFGE, kar otežuje interpretacijo njihove mikrobiološke povezanosti. Metoda WGS bi morala nadomestiti metodo PFGE za epidemiološki nadzor bakterije *L. monocytogenes*, zlasti v primeru preiskav izbruhov.

Za zanesljivo opredelitev mikrobiološko in epidemiološko povezanih izolatov je treba k izolatom iz izbruga priključiti ozko sorodne, a epidemiološko nepovezane izolate in izbruh interpretirati v kontekstu filogenije. Veliko število ozko sorodnih, sporadičnih izolatov iz kmetijskega okolja kaže na splošno razširjenost in visoko klonalnost (genetsko ohranjenost) skupin bakterije *L. monocytogenes*, ki so odgovorne za izbruhe listerioze pri živalih. Uporaba več analitičnih pristopov WGS poveča zanesljivost pri ugotavljanju genetskih razdalj med ozko sorodnimi izolati. Rezultate analize mobilnih genetskih elementov v kontekstu epidemioloških povezav je treba interpretirati s previdnostjo. Za dokončno potrditev izbruga so ključni epidemiološki podatki.

Populacijska struktura izolatov bakterije *L. monocytogenes* živalskega kliničnega izvora in iz naravnega okolja je precej heterogena. Kloni CC1, CC4 in CC37 prevladujejo v obeh okoljih. Hipervirulentni klon CC1 je značilno povezan s kliničnim izvorom in z nevrrolisteriozo. Na novo smo opisali značilno povezavo klonov CC37 in CC6 z abortusom. Klona CC9 in CC29 sta značilno povezana z naravnim okoljem. Hipervirulentna klona CC1 in CC4 prevladujeta med izolati iz živali z invazivno obliko listerioze. Poleg tega smo med izolati iz živali s subkliničnim mastitisom ugotovili tudi hipervirulentni klon CC4, ki je imel determinante virulence, ki so povezane s povečanim infekcijskim potencialom na ravni populacije (InlA polne dolžine, otoka patogenosti LIPI-3 in LIPI-4).

Kmetijsko okolje je vir genetsko zelo raznolikih izolatov, vključno s hipervirulentnimi kloni. Determinante virulence so po večini dobro ohranjene pri vseh klonih ne glede na njihov izvor (klinični ali okoljski). Determinante, ki so povezane s povečanim infekcijskim potencialom na ravni populacije (InlA polne dolžine, otoka patogenosti LIPI-3 in LIPI-4), najdemo tudi pri izolatih iz kmetijskega okolja. Kloni bakterije *L. monocytogenes* se razlikujejo v svoji sposobnosti invazije in replikacije na goveji makrofagni celični liniji (BoMac). Posebne povezave med hipervirulenco in hiperreplikativnostjo oz. hipovirulenco in hiporeplikativnostjo ali njihovih povezav s filogenetsko linijo ali virom izolacije nismo ugotovili.

7 POVZETEK

Bakterija *Listeria monocytogenes* povzroča listeriozo, resno obolenje ljudi in živali. Sestavni del epidemiološkega nadzora listerioze, vključno s preiskavami izbruhov, je zanesljiva tipizacija povzročitelja. V zadnjih letih se sekvenciranje celotnih genomov (angl. *whole-genome sequencing*, WGS) vse bolj uveljavlja kot metoda izbora za tipizacijo bakterije *L. monocytogenes* zaradi svoje velike moči razlikovanja in vpogleda v celoten genom bakterije.

V tem delu smo za podrobno opredelitev epidemiološko povezanih sevov *L. monocytogenes* uporabili dve tehnologiji sekvenciranja naslednje generacije (Ion Torrent in Illumina) in tri različne analitične pristope za tipizacijo bakterij na osnovi metode WGS: (i) tipizacijo na osnovi zaporedij lokusov osrednjega genoma (angl. *core genome multilocus sequence typing*, cgMLST), (ii) tipizacijo na osnovi zaporedij lokusov celotnega genoma (angl. *whole-genome multilocus sequence typing*, wgMLST) ter (iii) tipizacijo na osnovi polimorfizmov posameznih nukleotidov v celotnem genomu (angl. *whole-genome single nucleotide polymorphism typing*, wgSNP). Sevi *L. monocytogenes*, ki so bili odgovorni za izbruhe listerioze pri živalih, so pripadali klonom ST1 (CC1), ST18 (CC18), ST21 (CC21) in ST184. Pristopa wgMLST in wgSNP sta imela primerljivo moč razlikovanja ozko sorodnih izolatov, ki je bila večja od pristopa cgMLST. Mikrobiološko in epidemiološko povezani izolati so se razlikovali v največ sedmih alelih cgMLST, 12 alelih wgMLST in 13 polimorfizmih wgSNP. Izbruh listerioze pri ljudeh je povzročil sev ST8 (CC8); epidemiološko povezani izolati so se razlikovali v največ dveh (Illumina) oz. treh (Ion Torrent) polimorfizmih wgSNP. Potrdili smo monoklonalno naravo sedmih izbruhov pri živalih in enega izbruha pri ljudeh. Večina sevov je pripadala genetsko zelo ohranjenim (klonalnim) skupinam bakterije *L. monocytogenes*, kar je oteževalo interpretacijo njihove mikrobiološke povezanosti. Naši rezultati kažejo, da uporaba fiksnih mej za zamejitev epidemiološko povezanih izolatov lahko vodi v napačno interpretacijo rezultatov metode WGS. Ugotovili smo, da so za zanesljivo epidemiološko preiskavo na osnovi WGS potrebni:

- temeljiti nadzor kakovosti podatkov WGS na več stopnjah (pred, med in po obdelavi z bioinformacijskimi orodji);
- uporaba več analitičnih pristopov WGS, vključno z izdelavo statistično podprtrega filogenetskega drevesa na osnovi polimorfizmov wgSNP;
- primerjava epidemiološko povezanih izolatov z epidemiološko nepovezanimi, a ozko sorodnimi izolati bakterije *L. monocytogenes*;
- izčrpljni epidemiološki podatki.

Analiza mobilnih genetskih elementov je bila pri epidemioloških preiskavah le delno informativna, saj v vseh primerih ni imela zadostne dodatne moči razlikovanja oz. elementi niso bili prisotni pri vseh analiziranih izbruhih. Poleg tega smo pri mikrobiološko povezanih izolatih ST8 ugotovili izgubo plazmida, kar kaže na nestabilno naravo tovrstnih genetskih elementov.

Analizirali smo populacijsko strukturo izolatov bakterije *L. monocytogenes* iz živalskega kliničnega izvora in iz naravnega okolja, ki je slabo poznana in na ravni celotne Evrope še ni

bila raziskana v večjem obsegu. Za ta namen smo sestavili dve obsežni zbirki izolatov bakterije *L. monocytogenes*: Živalski klinični izvor ($n = 350$) in Naravno okolje ($n = 253$). V obeh okoljih sta prevladovala hipervirulentna klena CC1 in CC4. Dokazali smo, da so živali stalno izpostavljene genetsko zelo heterogenim izolatom *L. monocytogenes*, zlasti hipervirulentnima klonoma CC1 in CC4. Klena CC9 in CC29 sta bila značilno povezana z naravnim okoljem. Klon CC1 je bil značilno povezan z nevrolisteriozo. Na novo smo opisali značilno povezavo klonov CC6 in CC37 z abortusom. Med izolati iz živali s subkliničnim mastitisom ($n = 16$) smo ugotovili hipervirulentni klon CC4 (2/16). Njegova prisotnost v surovem mleku predstavlja povečano tveganje za potrošnika, zato bi bilo smiselno povečati mikrobiološki nadzor surovega mleka in ugotavljanje subkliničnega mastitisa pri govedu. Analize predstavljajo pomembno osnovo za nadaljnje raziskave povezav med genotipom in fenotipom pri izbranih klonih bakterije *L. monocytogenes*.

Pri klonih, ki so bili značilno povezani z virom izolacije (CC1, CC9, CC14 in CC29) ali klinično obliko listerioze (CC1, CC6 in CC37), smo ugotavljali prisotnost 151 determinant virulence. Te so bile po večini ohranjene tako znotraj klena kot med različnimi filogenetskimi linijami. Manj ohranjene determinante virulence so bile bolj kot na vir izolacije vezane na klon oz. filogenetsko linijo.

Na kmetiji z visoko pojavnostjo subkliničnega mastitisa (9/47; 19,1 %) smo ugotovili prisotnost hipervirulentnih klonov CC1, CC2 in CC4. Kloni so imeli determinante virulence, ki so povezane s povečano sposobnostjo okužbe ljudi na ravni populacije (LIPI-3, LIPI-4 in InlA polne dolžine).

Pridobljene informacije o genetski raznolikosti epidemiološko povezanih in nepovezanih izolatov v kombinaciji z boljšim poznavanjem populacijske strukture bakterije v kmetijskem okolju bodo vodile v izboljšanje epidemiološkega spremmljanja bakterije *L. monocytogenes* in olajšale prospektivno ugotavljanje izbruhov listerioze. Bioinformacijska orodja in pristopi za obdelavo podatkov WGS, ki smo jih v okviru tega dela vzpostavili na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, bodo pomembno doprinesli k epidemiološkemu nadzoru bakterije *L. monocytogenes* in drugih patogenih bakterij.

8 SUMMARY

Listeria monocytogenes is the causative agent of listeriosis, a serious disease affecting both humans and animals. An integral part of the epidemiological surveillance of listeriosis, including outbreak investigations, is reliable typing of the pathogen. In recent years, whole-genome sequencing (WGS) has been increasingly recognized as the method of choice for typing of *L. monocytogenes* because of its high discriminatory power and the ability to provide an insight into the complete bacterial genome.

In the present study, two next-generation sequencing technologies (Ion Torrent and Illumina) and three different WGS-based analytical approaches for bacterial typing were used to characterize epidemiologically associated *L. monocytogenes* strains: (i) core-genome multilocus sequence typing (cgMLST) (ii) whole-genome multilocus sequence typing (wgMLST), and (iii) whole-genome single nucleotide polymorphism-based typing (wgSNP). The strains responsible for the outbreaks of listeriosis in animals belonged to ST1 (CC1), ST18 (CC18), ST21 (CC21) and ST184 clones. wgMLST and wgSNP approaches had a comparable discriminatory power to distinguish closely related isolates and their discriminatory power was higher than in cgMLST. Microbiologically and epidemiologically related isolates differed in up to seven cgMLST alleles, 12 wgMLST alleles and 13 wgSNPs. The outbreak of listeriosis in humans was caused by the ST8 (CC8) strain; the epidemiologically related isolates differed in up to two (Illumina) or three (Ion Torrent) wgSNPs. We confirmed the monoclonal nature of all seven analyzed outbreaks in animals and one outbreak in humans. Most strains belonged to genetically highly conserved (clonal) *L. monocytogenes* groups, hindering the interpretation of their microbiological association. The results presented herein show that the use of fixed thresholds for the delineation of epidemiologically related isolates can lead to a spurious interpretation of WGS-based results. A reliable WGS-based epidemiological investigation should therefore include:

- thorough quality control of WGS data at several stages (before, during and after the bioinformatic analysis);
- the use of several WGS-based analytical approaches, including the construction of a statistically supported wgSNP-based phylogenetic tree;
- a comparison of epidemiologically linked isolates with epidemiologically unlinked, but closely genetically related *L. monocytogenes* isolates;
- comprehensive epidemiological data.

In epidemiological investigations, the analysis of mobile genetic elements was only partially informative because in some of the analyzed cases, it did not provide any additional discriminatory power or the mobile genetic elements were absent in outbreak strains. In addition, in microbiologically linked ST8 isolates, loss of plasmid was detected, indicating the unstable nature of the mobile genetic elements.

We analyzed the population structure of *L. monocytogenes* isolates from the natural environment and of animal clinical origin, which is poorly understood since no large-scale,

European-wide studies have been performed yet. To this aim, we constructed two comprehensive datasets of *L. monocytogenes* isolates: Animal clinical origin ($n = 350$) and Natural environment ($n = 253$). In both datasets, the hypervirulent clones CC1 and CC4 were predominant. We showed that animals are constantly exposed to genetically highly heterogeneous *L. monocytogenes* isolates, in particular the hypervirulent clones CC1 and CC4. CC9 and CC29 were significantly associated with the natural environment. The CC1 clone was significantly associated with neurolisteriosis. We described a novel and significant association of CC6 and CC37 with abortion. The hypervirulent clone CC4 was found in isolates from animals with subclinical mastitis (2/16). The presence of hypervirulent clones in raw milk represents an increased risk for the consumer, which calls for an improved microbiological control of raw milk and detection of subclinical mastitis in cattle. The analyses presented herein represent an important basis for further genotype–phenotype correlation studies in the selected *L. monocytogenes* clones.

Clones that were significantly associated with the origin of isolation (CC1, CC9, CC14 and CC29) or clinical form of listeriosis (CC1, CC6 and CC37) were analyzed for the presence of 151 virulence genes. These were highly conserved within the clone and between different phylogenetic lineages. The presence of the less-conserved virulence genes was associated with clone and/or phylogenetic lineage rather than the origin of isolation.

On the farm with a high occurrence of subclinical mastitis (9/47; 19.1 %), the presence of hypervirulent clones CC1, CC2 and CC4 was observed. The clones had virulence traits that are associated with an increased infectious potential in humans at a population level (LIPI-3, LIPI-4 and a full-length InlA).

Information on the genetic diversity of epidemiologically linked and unlinked *L. monocytogenes* isolates combined with improved knowledge of their population structure in the farm environment will improve the epidemiological surveillance of *L. monocytogenes* and facilitate prospective outbreak investigations. The bioinformatic tools and WGS-based analytical approaches that were established within the framework of this study at the Institute of Microbiology and Parasitology of the Veterinary Faculty, University of Ljubljana, will considerably improve the epidemiological surveillance of *L. monocytogenes* and other pathogenic bacteria.

9 ZAHVALE

Doktorskega dela ne bi bilo mogoče opraviti brez nesebične pomoči mentorjev, družine in prijateljev. Mentorici dr. Mateji Pate in somentorici dr. Darji Kušar najlepša hvala za vse strokovne nasvete in vodenje skozi celotno obdobje doktorskega študija. Dr. Ireni Zdovc se zahvaljujem za vodenje in nesebično deljenje znanja. Svoji družini in prijateljem se najlepše zahvaljujem, da so mi bili na tej poti vedno v pomoč in oporo.

*I warmly acknowledge Benjamin Félix from EURL for *L. monocytogenes*, ANSES, for his support and guidance throughout my PhD years.*

Dela ne bi bilo mogoče izvesti tudi brez pomoči:

- Aleša Budkoviča, ki je bil glavna podpora pri vzpostavitvi bioinformacijskih programov, uporabljenih v tem delu;
- Maje Kavalič, ki je izvedla PFGE-tipizacije;
- Olge Kosar, Maje Lepen in Majde Golob, ki so vzdrževale SI NRL zbirkko izolatov bakterije *L. monocytogenes*;
- Tamare Dolenšek, Vasilija Cociancicha in Dr. Polone Juntes, ki so mi omogočili vpogled v diagnostiko listerioze s patološkega vidika.

Članom komisije dr. Ireni Zdovc, dr. Darji Barlič Maganja in dr. Gregorju Anderluhu se zahvaljujem za temeljit pregled doktorske disertacije.

Vsem sodelavcem na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo VF, Enoti za bakteriologijo in mikologijo, hvala za strokovne nasvete in prijetne skupne trenutke.

Za pregled referenc se zahvaljujem mag. Giti Greč-Smole. Zahvala za pomoč pri premostitvi vseh birokratskih ovir gre Biljani Grubišić.

Delo je finančno podprla Slovenska agencija za raziskovalno dejavnost RS (ARRS).

~♥️☀️♥~

Posebna zahvala za uspešno preprečevanje živčnih zlomov med doktorskim študijem in čudovite skupne trenutke gre doktorskemu študentu Veterinarske fakultete – Tanji, Tamari, Sabini, Kristini in Janu.

~♥️☀️♥~

10 LITERATURA

Aguilar-Bultet L, Nicholson P, Rychener L, et al. Genetic separation of *Listeria monocytogenes* causing nervous system infections in animals. Front Cell Infect Microbiol (Online) 2018; 8: e20 (16 str.). DOI: 10.3389/fcimb.2018.00020 (13. junij 2019)

Akpavie SO, Ikheloa JO. An outbreak of listeriosis in cattle in Nigeria. Rev Elev Med Vet Pays Trop 1992; 45(3/4): 263–4.

Althaus D, Lehner A, Brisse S, Maury M, Tasara T, Stephan R. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011-2013 from human infections in Switzerland. Foodborne Pathog Dis 2014; 11(10): 753–8.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990; 215(3): 403–10.

Ambardar S, Gupta R, Trakroo D, Lal R, Vakhlu J. High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. Indian J Microbiol 2016; 56(4): 394–404.

Antipov D, Hartwick N, Shen M, Raiko M, Lapidus A, Pevzner PA. plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. Bioinformatics 2016; 32: 3380–7.

Arndt D, Grant JR, Marcu A, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic Acids Res (Online) 2016; 44: W16–21. DOI: 10.1093/nar/gkw387 (17. junij 2019)

Ayangbenro AS, Babalola OO. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. Int J Environ Res Public Health (Online) 2017; 14(1): e94 (16 str.). DOI: 10.3390/ijerph14010094 (17. junij 2019).

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol 2012; 19(5): 455–77.

Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature 2008; 456: 53–9.

Bernardes TF, do Rego AC. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. J Dairy Sci 2014; 97(3): 1852–61.

B. Papić: Ugotavljanje značilnosti ... *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Doktorska disertacija

Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. Clin Microbiol Infect 2018; 24(4): 335–41.

Blom J, Kreis J, Spanig S, et al. EDGAR 2.0: an enhanced software platform for comparative gene content analyses. Nucleic Acids Res (Online) 2016; 44: W22–28. DOI: 10.1093/nar/gkw255 (21. junij 2019)

Bosi E, Donati B, Galardini M, et al. MeDuSa: a multi-draft based scaffolder. Bioinformatics 2015; 31: 2443–51.

Braun L, Ohayon H, Cossart P. Mol Microbiol. The InIB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. Mol Microbiol 1998; 27(5): 1077–87.

Cabanes D, Sousa S, Cebria A, Lecuit M, Garcia-del Portillo F, Cossart P. Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. EMBO J 2005; 24(15): 2827–38.

Camejo A, Carvalho F, Reis O, Leitao E, Sousa S, Cabanes D. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. Virulence 2011; 2(5): 379–94.

Carrico JA, Rossi M, Moran-Gilad J, Van Domselaar G, Ramirez M. A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians. Clin Microbiol Infect 2018; 24(4): 342–9.

Castro H, Jaakkonen A, Hakkinen M, Korkeala H, Lindström M. Occurrence, persistence, and contamination routes of *Listeria monocytogenes* genotypes on three Finnish dairy cattle farms: a longitudinal study. Appl Environ Microbiol (Online) 2018; 84(4): e02000-17 (14 str.). DOI: 10.1128/AEM.02000-17 (27. junij 2019)

CDC. Introduction to public health surveillance. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2018a. <https://www.cdc.gov/publichealth101/surveillance.html> (17. junij 2019)

CDC. Multistate outbreak of listeriosis linked to soft raw milk cheese made by Vulto Creamery. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2017. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheese-03-17/index.html> (17. junij 2019)

Chen Y, Knabel SJ. Prophages in *Listeria monocytogenes* contain single-nucleotide polymorphisms that differentiate outbreak clones within epidemic clones. J Clin Microbiol 2008; 46(4): 1478–84.

Chen Y, Luo Y, Carleton H, et al. Whole genome and core genome multilocus sequence typing and single nucleotide polymorphism analyses of *Listeria monocytogenes* associated with an outbreak linked to cheese, United States, 2013. *Appl Environ Microbiol* (Online) 2017a; 83(15): e00633–17. DOI: 10.1128/AEM.00633-17 (27. junij 2019)

Chen Y, Luo Y, Curry P, et al. Assessing the genome level diversity of *Listeria monocytogenes* from contaminated ice cream and environmental samples linked to a listeriosis outbreak in the United States. *PLoS One* (Online) 2017b; 12: e0171389 (19 str.). DOI: 10.1371/journal.pone.0171389 (27. junij 2019)

Cherifi T, Carrillo C, Lambert D, et al. Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates reveals that their persistence in a pig slaughterhouse is linked to the presence of benzalkonium chloride resistance genes. *BMC Microbiol* (Online) 2018; 18: 220 (13 str.). DOI: 10.1186/s12866-018-1363-9 (27. junij 2019)

Cossart P, Lebreton A. A trip in the "New Microbiology" with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *FEBS Lett* 2014; 588(15): 2437–45.

Costard S, Espejo L, Groenendaal H, Zagmutt FJ. Outbreak-related disease burden associated with consumption of unpasteurized cow's milk and cheese, United States, 2009–2014. *Emerg Infect Dis* 2017; 23(6): 957–64.

den Bakker HC, Bowen BM, Rodriguez-Rivera LD, Wiedmann M. FSL J1-208, a virulent uncommon phylogenetic lineage IV *Listeria monocytogenes* strain with a small chromosome size and a putative virulence plasmid carrying internalin-like genes. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(6): 1876–89.

Doganay M. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 35(3): 173–5.

Dreyer M, Aguilar-Bultet L, Rupp S, et al. *Listeria monocytogenes* sequence type 1 is predominant in ruminant rhombencephalitis. *Sci Rep* (Online) 2016; 6: 36419 (11 str.). DOI: 10.1038/srep36419 (17. junij 2019)

Dreyer M, Thomann A, Böttcher S, Frey J, Oevermann A. Outbreak investigation identifies a single *Listeria monocytogenes* strain in sheep with different clinical manifestations, soil and water. *Vet Microbiol* 2015; 179(1/2): 69–75.

Ebner R, Stephan R, Althaus D, Brisse S, Maury M, Tasara T. Phenotypic and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011–2014 from different food matrices in Switzerland. *Food Control* 2015; 57: 321–6.

B. Papić: Ugotavljanje značilnosti ... *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Doktorska disertacija

Edwards AM, Massey RC. Invasion of human cells by a bacterial pathogen. J Vis Exp (Online) 2011; 49: e2693 (4 str.). DOI: 10.3791/2693 (12. junij 2019)

Eid J, Fehr A, Gray J, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. Science 2009; 323: 133–8.

Elhanafi D, Dutta V, Kathariou S. Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak. Appl Environ Microbiol 2010; 76(24): 8231–8.

Eriksen L, Larsen HE, Christiansen T, Jensen MM, Eriksen E. An outbreak of meningoencephalitis in fallow deer caused by *Listeria monocytogenes*. Vet Rec 1988; 122(12): 274–6.

Esteban JI, Oporto B, Aduriz G, Juste RA, Hurtado A. Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. BMC Vet Res (Online) 2009; 5: e2 (10 str.). DOI: 10.1186/1746-6148-5-2 (17. junij 2019)

ECDC. Listeriosis: annual epidemiological report for 2016 (Online). Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2018: 7 str. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/listeriosis-annual-epidemiological-report-2016> (17. junij 2019)

ECDC. Multi-country cluster of *Listeria monocytogenes* ST1247 in five EU countries (Online). Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2019a. <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/multi-country-cluster-listeria-monocytogenes-st1247-five-eu-countries> (17. junij 2019)

ECDC. Proficiency test for *Listeria monocytogenes* whole genome assembly 2018. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2019b: 20 str. DOI: 10.2900/188017 (27. junij 2019)

EFSA, ECDC. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 infections linked to consumption of salmon products (Online). Stockholm: European Food Safety Authority (EFSA); Parma: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2018b: 14 str. DOI: 10.2903/sp.efsa.2018.EN-1496 (17. junij 2019)

EFSA, ECDC. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections probably linked to frozen corn (Online). Parma: European Food Safety Authority (EFSA); Stockholm: European Centre for Disease Control (ECDC), 2018: 22 str. DOI: 10.2903/sp.efsa.2018.EN-1448 (27. junij 2019)

Evans K, Smith M, McDonough P, Wiedmann M. Eye infections due to *Listeria monocytogenes* in three cows and one horse. J Vet Diagn Invest 2004; 16(5): 464–9.

Fagerlund A, Langsrud S, Schirmer BC, Moretro T, Heir E. Genome analysis of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 strains persisting in salmon and poultry processing environments and comparison with related strains. PLoS One (Online) 2016; 11: e0151117 (22 str.). DOI: 10.1371/journal.pone.0151117 (17. julij 2019)

Faralla C, Bastounis EE, Ortega FE, et al. *Listeria monocytogenes* InlP interacts with afadin and facilitates basement membrane crossing. PLoS Pathog (Online) 2018; 14(5): e1007094 (26 str.). DOI: 10.1371/journal.ppat.1007094 (17. junij 2019)

Faralla C, Rizzuto GA, Lowe DE, et al. 2016. InlP, a new virulence factor with strong placental tropism. Infect Immun 2016; 84(12): 3584–96.

Félix B, Feurer C, Maillet A, Guillier L, Boscher E, Kerouanton A, Denis M, Roussel S. Population genetic structure of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the pig and pork production chain in France. Front Microbiol (Online) 2018; 9: e684 (11 str.). DOI: 10.3389/fmicb.2018.00684 (27. junij 2019)

Freitag NE, Port GC, Miner MD, *Listeria monocytogenes*: from saprophyte to intracellular pathogen. Nat Rev Microbiol 2009; 7(9): 623–8.

Fretz R, Sagel U, Ruppitsch W, et al. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese ‘Quargel’, Austria and Germany 2009. Euro Surveill (Online) 2010; 15(5): 19477 (2 str.) <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.15.05.19477-en> (17. junij 2019)

Fujita S, Masago K, Okuda C, et al. Single nucleotide variant sequencing errors in whole exome sequencing using the Ion Proton System. Biomed Rep 2017; 7(1): 17–20.

Galata V, Fehlmann T, Backes C, Keller A. PLSDB: a resource of complete bacterial plasmids. Nucleic Acids Res 2019; 47(D1): D195–202.

Garcia JA, Micheloud JF, Campero CM, Morrell EL, Odriozola ER, Moreira AR. Enteric listeriosis in grazing steers supplemented with spoiled silage. J Vet Diagn Invest 2016; 28(1): 65–9.

Ghosh P, Halvorsen EM, Ammendolia DA, et al. Invasion of the brain by *Listeria monocytogenes* is mediated by InlF and host cell vimentin. mBio (Online) 2018; 9(1): e00160-18. DOI: 10.1128/mBio.00160-18 (26. julij 2019)

Graves LM, Swaminathan B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. Int J Food Microbiol 2001; 65(1/2): 55–62.

Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 2013; 29(8): 1072–5.

Haase JK, Didelot X, Lecuit M, Korkeala H, Achtman M, Group LmMS. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale multilocus sequence typing study. Environ Microbiol 2014; 16(2): 405–16.

Hasegawa M, Iwabuchi E, Yamamoto S, et al. Prevalence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in bovine colostrum in Japan. J Food Prot 2013; 76(2): 248–55.

Henri C, Leekitcharoenphon P, Carleton HA, et al. An assessment of different genomic approaches for inferring phylogeny of *Listeria monocytogenes*. Front Microbiol 2017; 8: e2351 (13 str.). DOI: 10.3389/fmicb.2017.02351 (13. junij 2019)

Ho AJ, Ivanek R, Grohn YT, Nightingale KK, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L. monocytogenes* subtypes. Prev Vet Med 2007; 80(4): 287–305.

Hunt K, Drummond N, Murphy M, Butler F, Buckley J, Jordan K. A case of bovine raw milk contamination with *Listeria monocytogenes*. Ir Vet J (Online) 2012; 65(1): e13 (5 str.). DOI: 10.1186/2046-0481-65-13 (13. junij 2019)

ISO 11290-2:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method. Geneva: International Organization for Standardization (ISO), 1998: 26 str.

ISO 11290-2:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method. Geneva: International Organization for Standardization (ISO), 2017: 26 str.

ISS. Report of the first inter-laboratory exercise on whole genome sequencing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains 2017-2018 (PT-WGS1) (Online). ISS, EU Reference Laboratory for *E. coli*. Rim: Istituto Superiore di Sanità (ISS), 2018: 31 str. http://old.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT_WGS1.pdf (27. junij 2019)

Jackson BR, Tarr C, Strain E, et al. Implementation of nationwide real-time whole-genome sequencing to enhance listeriosis outbreak detection and investigation. Clin Infect Dis 2016; 63(3): 380–6.

Jackson KA, Gould LH, Hunter JC, Kucerova Z, Jackson B. Listeriosis outbreaks associated with soft cheeses, United States, 1998-2014. Emerg Infect Dis 2018; 24(6): 1116–8.

Jagadeesan B, Baert L, Wiedmann M, Orsi RH. Comparative analysis of tools and approaches for source tracking *Listeria monocytogenes* in a food facility using whole-genome sequence

B. Papić: Ugotavljanje značilnosti ... *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Doktorska disertacija

data. Front Microbiol (Online) 2019; 10: 947 (18 str.). DOI: 10.3389/fmicb.2019.00947 (16. junij 2019)

Jennison AV, Masson JJ, Fang NX, et al. Analysis of the *Listeria monocytogenes* population structure among isolates from 1931 to 2015 in Australia. Front Microbiol (Online) 2017; 8: e603 (13 str.). DOI: 10.3389/fmicb.2017.00603 (16. junij 2019)

Jensen NE, Aarestrup FM, Jensen J, Wegener HC. *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Possible implication for human health. Int J Food Microbiol 1996; 32(1/2): 209–16.

Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. PLoS One (Online) 2014; 9: e104984 (8 str.). DOI: 10.1371/journal.pone.0104984 (12. junij 2019)

Katz LS, Griswold T, Williams-Newkirk AJ, et al. A comparative analysis of the Lyve-SET phylogenomics pipeline for genomic epidemiology of foodborne pathogens. Front Microbiol (Online) 2017; 8: 375 (13 str.). DOI: 10.3389/fmicb.2017.00375 (12. junij 2019)

Keller MW, Rambo-Martin BL, Wilson MM, et al. Direct RNA sequencing of the coding complete influenza A virus genome. Sci Rep (Online) 2018; 8: 14408 (8 str.). DOI: 10.1038/s41598-018-32615-8 (12. junij 2019)

KIS. Priloga 29: Število živine in živinorejska proizvodnja; 2005–2017. In: Poročilo o stanju kmetijstva, živilstva, gozdarstva in ribištva v letu 2017. Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije (KIS), 2018: 193.

https://www.kis.si/f/docs/Porocila_o_stanju_v_kmetijstvu_OEK/ZP_2017_splosno__priloge_za_net_2.pdf (17. junij 2019)

Kuch A, Goc A, Belkiewicz K, et al. Molecular diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections in Poland (1997–2013). Sci Rep (Online) 2018; 8: e14562 (11 str.). DOI: 10.1038/s41598-018-32574-0 (12. junij 2019)

Kumar H, Singh BB, et al. Pathological and epidemiological investigations into listerial encephalitis in sheep. Small Ruminant Res 2007; 71(1/3): 293–7.

Kühbacher A, Pascale Cossart P, Pizarro-Cerdá J. Internalization assays for *Listeria monocytogenes*. Methods Mol Biol 2013, 1157; 167–78.

Kwong JC, Mercoulia K, Tomita T, et al. Prospective whole-genome sequencing enhances national surveillance of *Listeria monocytogenes*. J Clin Microbiol 2016; 54(2): 333–42.

B. Papić: Ugotavljanje značilnosti ... *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Doktorska disertacija

Latorre AA, Van Kessel JA, Karns JS, et al. Increased *in vitro* adherence and on-farm persistence of predominant and persistent *Listeria monocytogenes* strains in the milking system. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(11): 3676–84.

Latorre AA, Van Kessel JS, Karns JS, et al. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J Dairy Sci* 2010; 93(6): 2792–802.

Lebrun M, Audurier A, Cossart P. Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are present on Tn5422, a novel transposon closely related to Tn917. *J Bacteriol* 1994; 176(10): 3049–61.

Lee S, Chen Y, Gorski L, Ward TJ, Osborne J, Kathariou S. *Listeria monocytogenes* source distribution analysis indicates regional heterogeneity and ecological niche preference among serotype 4b clones. *MBio* (Online) 2018; 9(2): e00396-18 (12 str.). DOI: 10.1128/mBio.00396-18 (17. junij 2019)

Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 2019; 47(W1): eW256–9 (4 str.). DOI: 10.1093/nar/gkz239 (17. junij 2019)

Levy SE, Myers RM. Advancements in next-generation sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2016; 17: 95–115.

Li R, Xie M, Dong N, et al. Efficient generation of complete sequences of MDR-encoding plasmids by rapid assembly of MinION barcoding sequencing data. *Gigascience* 2018; 7(3): gix132 (9 str.). DOI: 10.1093/gigascience/gix132 (17. junij 2019)

Linke K, Rückerl I, Brugger K, et al. Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80(18): 5583–92.

Lomonaco S, Gallina S, Filipello V, et al. Draft genome sequences of 510 *Listeria monocytogenes* strains from food isolates and human listeriosis cases from Northern Italy. *Genome Announc* 2018 (Online); 6(3): e01276-17 (10 str.). DOI: 10.1128/genomeA.01276-17 (17. junij 2019)

Lopez-Valladares G, Danielsson-Tham ML, Tham W. Implicated food products for listeriosis and changes in serovars of *Listeria monocytogenes* affecting humans in recent decades. *Foodborne Pathog Dis* 2018; 15(7): 387–97.

Low JC, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J* 1997; 153(1): 9–29.

B. Papić: Ugotavljanje značilnosti ... *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Doktorska disertacija

Lungu B, Ricke SC, Johnson MG. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: a review. *Anaerobe* 2009; 15(1–2): 7–17.

Madjunkov M, Chaudhry S, Ito S. Listeriosis during pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2017; 296(2): 143–52.

Maury MM, Bracq-Dieye H, Huang L, et al. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat Commun* (Online) 2019; 10: e2488 (13 str.). DOI: 10.1038/s41467-019-10380-0 (17. junij 2019)

Maury MM, Tsai YH, Charlier C, et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet* 2016; 48(3): 308–13.

Mellmann A, Andersen PS, Bletz S, et al. High interlaboratory reproducibility and accuracy of next-generation-sequencing-based bacterial genotyping in a ring trial. *J Clin Microbiol* 2017; 55(3): 908–13.

Moura A, Criscuolo A, Pouseele H, et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat Microbiol* (Online) 2016; 2: 16185 (10 str.). DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.185 (17. junij 2019)

Moura A, Tourdjman M, Leclercq A, et al. Real-time whole-genome sequencing for surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. *Emerg Infect Dis* 2017; 23(9): 1462–70.

Muhterem-Uyar M, Ciolacu L, Wagner KH, Wagner M, Schmitz-Esser S, Stessl B. New aspects on *Listeria monocytogenes* ST5-ECVI predominance in a heavily contaminated cheese processing environment. *Front Microbiol* (Online) 2018; 9: e64 (14 str.). DOI: 10.3389/fmicb.2018.00064 (20. junij 2019)

NIJZ. eNboz - elektronske novice s področja nalezljivih bolezni in okoljskega zdravja, julij–avgust 2014. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ), 2014. 34 str. https://www.nizj.si/sites/www.nizj.si/files/uploaded/enboz_julij_in_avgust_2014.pdf (17. junij 2019)

Nadon C, Walle IV, Gerner-Smidt P, et al. PulseNet International: vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. *Euro Surveill* (Online) 2017; 22(23): e30544 (12 str.). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.23.30544. (20. junij 2019)

Nash ML, Hungerford LL, Nash TG, Zinn GM. Epidemiology and economics of clinical listeriosis in a sheep flock. *Prev Vet Med* 1995; 24: 147–56.

B. Papić: Ugotavljanje značilnosti ... *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Doktorska disertacija

Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, et al. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(8): 4458–67.

Norton DM, Braden CR. Chapter 10: Foodborne listeriosis. In: Ryser ET, Ryser ET, Marth EH, eds. *Listeria, listeriosis, and food safety*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007: 305–56.

Oevermann A, Botteron C, Seuberlich T, et al. Neuropathological survey of fallen stock: active surveillance reveals high prevalence of encephalitic listeriosis in small ruminants. *Vet Microbiol* 2008; 130(3/4): 320–9.

Oevermann A, Di Palma S, Doherr MG, Abril C, Zurbriggen A, Vandeveld M. Neuropathogenesis of naturally occurring encephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in ruminants. *Brain Pathol* 2010a; 20(2): 378–390.

Oevermann A, Zurbriggen A, Vandeveld M, 2010b. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise? *Interdiscip Perspect Infect Dis* (Online) 2010; 2010: e632513 (12 str.). DOI: 10.1155/2010/632513 (20. junij 2019)

Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol* 2011; 301(2): 79–96.

Painset A, Bjorkman JT, Kiiil K, et al. LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe. *Microb Genom* (Online) 2019; 5(2): e1–11. DOI: 10.1099/mgen.0.000257 (20. junij 2019)

Palma F, Pasquali F, Lucchi A, Cesare AD, Manfreda G. Whole genome sequencing for typing and characterisation of *Listeria monocytogenes* isolated in a rabbit meat processing plant. *Ital J Food Saf* (Online) 2017; 6: e6876 (6 str.). DOI: 10.4081/ijfs.2017.6879 (20. junij 2019)

Papić B, Pate M, Félix B, Kušar D. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* strains in ruminant abortion and rhombencephalitis cases in comparison with the natural environment. *BMC Microbiol* (Online) 2019; 19: e299 (13 str.). DOI: 10.1186/s12866-019-1676-3 (19. december 2019)

Pasquali F, Palma F, Guillier L, Lucchi A, De Cesare A, Manfreda G. *Listeria monocytogenes* sequence types 121 and 14 repeatedly isolated within one year of sampling in a rabbit meat processing plant: persistence and ecophysiology. *Front Microbiol* (Online) 2018; 9: 596 (12 str.). DOI: 10.3389/fmicb.2018.00596 (20. junij 2019).

Phelan J, O'Sullivan DM, Machado D, et al. The variability and reproducibility of whole genome sequencing technology for detecting resistance to anti-tuberculous drugs. *Genome Med* (Online) 2016; 8(1): e132 (9 str.). DOI: 10.1186/s13073-016-0385-x (20. junij 2019)

Pightling AW, Pettengill JB, Luo Y, Baugher JD, Rand H, Strain E. Interpreting whole-genome sequence analyses of foodborne bacteria for regulatory applications and outbreak investigations. *Front Microbiol* (Online) 2018; 9: e1482 (13 str.). DOI: 10.3389/fmicb.2018.01482 (20. junij 2019).

Pirš T, Zdovc I, Gombač M, Švara T, Juntes P, Vengušt M. *Listeria monocytogenes* septicaemia in a foal. *Slov Vet Res* 2005; 42(1/2): 49–53.

Pollock DD, Zwickl DJ, McGuire JA, Hillis DM. Increased taxon sampling is advantageous for phylogenetic inference. *Syst Biol* 2002; 51(4): 664–71.

Pöntinen A, Aalto-Araneda M, Lindström M, Korkeala H. Heat resistance mediated by pLM58 plasmid-borne ClpL in *Listeria monocytogenes*. *mSphere* (Online) 2017; 2(6): e00364-17 (13 str.). DOI: 10.1128/mSphere.00364-17 (20. junij 2019)

Ragon M, Wirth T, Hollandt F, et al. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog* (Online) 2008; 4(9): e1000146 (14 str.). DOI: 10.1371/journal.ppat.1000146 (20. junij 2019)

Rantsiou K, Kathariou S, Winkler A, et al. Next generation microbiological risk assessment: opportunities of whole genome sequencing (WGS) for foodborne pathogen surveillance, source tracking and risk assessment. *Int J Food Microbiol* 2018; 287: 3–9.

Reimer A, Weedmark K, Petkau A, et al. Shared genome analyses of notable listeriosis outbreaks, highlighting the critical importance of epidemiological evidence, input datasets and interpretation criteria. *Microb Genom* (Online) 2019; 5(1): e000237 (16 str.). DOI: 10.1099/mgen.0.000237 (20. junij 2019)

Robertson J, Nash JHE. MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microb Genom* (Online) 2018; 4(8): e000206 (7 str.). DOI: 10.1099/mgen.0.000206 (20. junij 2019)

Rocha PR, Lomonaco S, Bottero MT, et al. Ruminant rhombencephalitis-associated *Listeria monocytogenes* strains constitute a genetically homogeneous group related to human outbreak strains. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(9): 3059–66.

Roussel S, Michelon D, Lombard B, Lailler R. Molecular typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, feed and animals: state of play and standard operating procedures for pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing, profile interpretation and curation. Stockholm: European Food Safety Authority (EFSA) Supporting Publ (Online) 2014; 11(12): e702E (81 str.). DOI: 10.2903/sp.efsa.2014.EN-702 (20. junij 2019)

Ruppitsch W, Pietzka A, Prior K, et al. Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Listeria monocytogenes*. J Clin Microbiol 2015; 53(9): 2869–76.

Schjørring S, Gillesberg Lassen S, et al. Cross-border outbreak of listeriosis caused by cold-smoked salmon, revealed by integrated surveillance and whole genome sequencing (WGS), Denmark and France, 2015 to 2017. Euro Surveill (Online) 2017; 22(50): e17-00762. (5 str.). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.50.17-00762. (20. junij 2019)

Schmitz-Esser S, Müller A, Stessl B, Wagner M. Genomes of sequence type 121 *Listeria monocytogenes* strains harbor highly conserved plasmids and prophages. Front Microbiol (Online) 2015; 6: e380 (10 str.). DOI: 10.3389/fmicb.2015.00380 (17. junij 2019)

Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. Clin Microbiol Infect 2018; 24(4): 350–4.

Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 2014; 30(14): 2068–9.

Smith AM, Tau NP, Smouse SL, et al. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017-2018: laboratory activities and experiences associated with whole-genome sequencing analysis of isolates. Foodborne Pathog Dis (Online) 2019; 16(7): 524–30.

Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 2014; 30(9): 1312–3.

Starč J, Križanec F, Zadnik T. *Listeria monocytogenes* keratoconjunctivitis and uveitis in dairy cattle. Bull Vet Inst Pulawy 2008; 52: 351–5.

Steckler AJ, Cardenas-Alvarez MX, Townsend Ramsett MK, Dyer N, Bergholz TM. Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* from ruminant listeriosis from different geographical regions in the U.S. Vet Microbiol 2018; 215: 93–7.

Stein H, Stessl B, Brunthaler R, et al. Listeriosis in fattening pigs caused by poor quality silage: a case report. BMC Vet Res (Online) 2018; 14(1): e362 (9 str.). DOI: 10.1186/s12917-018-1687-6 (17. junij 2019)

Stoller A, Stevens MJA, Stephan R, Guldmann C. Characteristics of *Listeria monocytogenes* strains persisting in a meat processing facility over a 4-year period. *Pathogens* (Online) 2019; 8(1): 32 (16 str.). DOI: 10.3390/pathogens8010032 (17. junij 2019)

Tan MF, Siow CC, Dutta A, et al. Development of ListeriaBase and comparative analysis of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genomics* (Online) 2015; 16: 755 (19 str.). DOI: 10.1186/s12864-015-1959-5 (17. junij 2019)

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(22): 4673–80.

Torres D, Barrier M, Bihl F, et al. Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 2004; 72(4): 2131–9.

UVHVVR. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz, 2016. Ljubljana: Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR), 2017. 83 str. <https://www.gov.si/assets/organi-v-sestavi/UVHVVR/Varna-hrana/Porocila-bioloska-varnost/2016-Letno-porocilo-programa-monitoringa-zoonoz-in-povzrociteljev-zoonoz-2016.pdf> (10. december 2019)

UVHVVR. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz, 2013. Ljubljana: Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR), 2014. 85 str. [www.uhvvr.gov.si](http://www.uvhvvr.gov.si) (17. junij 2019)

UVHVVR. Program monitoringa zoonoz in povzročiteljev zoonoz 2018. Ljubljana: Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR), 2018. 127 str. http://www.uhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/DELOVNA_PODROCJA/Zivila/zoonoze/PROGRAM_monitoringa_zoonoz_in_povzrociteljev_zoonoz_2018_.pdf (17. junij 2019)

van Stelten A., Roberts AR, Manuel, CS, Nightingale, KK. *Listeria monocytogenes* isolates carrying virulence-attenuating mutations in internalin A are commonly isolated from ready-to-eat food processing plant and retail environments. *J Food Prot* 2016; 79(10): 1733–40.

VanCleave TT, Pulsifer AR, Connor MG, Warawa JM, Lawrenz MB. Impact of gentamicin concentration and exposure time on intracellular *Yersinia pestis*. *Front Cell Infect Microbiol* (Online) 2017; 7: e505 (11 str.). DOI: 10.3389/fcimb.2017.00505 (17. junij 2019)

Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(3): 584–640.

B. Papić: Ugotavljanje značilnosti ... *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Doktorska disertacija

Verbič J, Sušin J, Simončič A, et al. Svetovalni kodeks dobre kmetijske prakse: varovanje voda, tal, zraka in ohranjanje biotske raznovrstnosti. Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije (KIS), 2006: 200 str.

https://www.kis.si/f/docs/Druge_publikacije/Kodeks_dobre_kmetijske_prakse_1.pdf
(18. junij 2019)

Verghese B, Lok M, Wen J, Alessandria V, Chen Y, Kathariou S, Knabel S. *comK* prophage junction fragments as markers for *Listeria monocytogenes* genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific adaptation, biofilm formation, and persistence. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(10): 3279–92.

Wagner M, Melzner D, Bagò Z, et al. Outbreak of clinical listeriosis in sheep: evaluation from possible contamination routes from feed to raw produce and humans. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52(6): 278–83.

Wang Q, Holmes N, Martinez E, Howard P, Hill-Cawthorne G, Sintchenko V. It is not all about single nucleotide polymorphisms: comparison of mobile genetic elements and deletions in *Listeria monocytogenes* genomes links cases of hospital-acquired listeriosis to the environmental source. *J Clin Microbiol* 2015; 53(11): 3492–500.

Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microb Genom* (Online) 2017; 3(10): e000132 (7 str.). DOI: 10.1099/mgen.0.000132 (21. junij 2019)

Wilkerson MJ, Melendy A, Stauber E. An outbreak of listeriosis in a breeding colony of chinchillas. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9(3): 320–3.

OIE. Animal health surveillance. In: Terrestrial Animal Health Code (Online). 27th ed. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE), 2018: Chapter 1.4. (10 str.) <http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-code/access-online/> (17. junij 2019)

Zelenik K, Avberšek J, Pate M, et al. Cutaneous listeriosis in a veterinarian with the evidence of zoonotic transmission: a case report. *Zoonoses Public Health* 2014; 61(4): 238–41.

Zdovc I. Končno poročilo ciljnega raziskovalnega projekta V4-1106, poročilo ARRS-CRP-ZP-2015/20ARRS. Ljubljana: Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS), 2015: 53 str. <https://www.dlib.si/stream/URN:NBN:SI:DOC-A28PJOJ6/d25bc6f5-0130-4a17-be2c-b0667e9cec1e/PDF> (12. junij 2019)

Zeng F, Jiang R, Chen T. PyroHMMsnp: an SNP caller for Ion Torrent and 454 sequencing data. *Nucleic Acids Res* (Online) 2013; 41(13): e136 (13 str.). DOI: 10.1093/nar/gkt372 (21. junij 2019)

11 PRILOGE

Priloga 1: Seznam 151 determinant virulence, ki smo jih uporabili v tem delu. ND, ni definirano.

Supplementary data 1: List of 151 virulence genes used in the present study. ND, not defined.

Gen	Locus_tag	Opis	Skupina genov	Dostopna številka genoma	Referenca
actA	lmo0204	actin-assembly inducing protein precursor	LIP1-1	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
hly	lmo0202	listeriolysin O precursor	LIP1-1	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
mpl	lmo0203	Zinc metalloproteinase precursor	LIP1-1	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
ND	lmo0206	ND	LIP1-1	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
plcA	lmo0201	phosphatidylinositol-specific phospholipase c	LIP1-1	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
plcB	lmo0205	phospholipase C	LIP1-1	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
prfA	lmo0200	listeriolysin positive regulatory protein	LIP1-1	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
llsA	ND	LLS toxic peptide	LIP1-3	AE017262.2	BIGSdb Lm Database
llsB	ND	ND	LIP1-3	AE017262.2	BIGSdb Lm Database
llsD	ND	ND	LIP1-3	AE017262.2	BIGSdb Lm Database
llsG	ND	ND	LIP1-3	AE017262.2	BIGSdb Lm Database
llsH	ND	ND	LIP1-3	AE017262.2	BIGSdb Lm Database
llsP	ND	putative protease	LIP1-3	AE017262.2	BIGSdb Lm Database
llsX	ND	ND	LIP1-3	AE017262.2	BIGSdb Lm Database
llsY	ND	ND	LIP1-3	AE017262.2	BIGSdb Lm Database
ND	LM9005581_70009	ND	LIP1-4	not determined	BIGSdb Lm Database
ND	LM9005581_70010	ND	LIP1-4	not determined	BIGSdb Lm Database
ND	LM9005581_70011	ND	LIP1-4	not determined	BIGSdb Lm Database
ND	LM9005581_70012	ND	LIP1-4	not determined	BIGSdb Lm Database
ND	LM9005581_70013	ND	LIP1-4	not determined	BIGSdb Lm Database
ND	LM9005581_70014	ND	LIP1-4	not determined	BIGSdb Lm Database
inIC	lmo1786	internalin C	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
inIA	lmo0433	internalin A	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
inIB	lmo0434	internalin B	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
inIE	lmo0264	internalin E	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
inIF	lmo0409	internalin F	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
inIH	lmo0263	internalin H	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
inII	lmo0333	internalin I	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
inIJ	lmo2821	Internalin J	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
inIK	lmo1290	Internalin K	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
inLP	lmo2470	internalin P	ND	NC_003210.1	Faralla in sod. (2016) Infect Immun 84: 3584-3596
agrA	lmo0051	response regulator	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
agrC	lmo0050	histidine kinase	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
amii	lmo2558	autolysin, amidase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
aut	lmo1076	autolysin	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
aut_lvb	LMOF2365_RS00075	ND	ND	ND	BIGSdb Lm Database
biLE	ND	ND	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
bsh	lmo2067	ND	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
cheA	lmo0692	two-component sensor histidine kinase CheA	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
cheY	lmo0691	chemotaxis response regulator CheY	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
chiA	lmo1883	chitinase	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
clpB	lmo2206	Clp protease subunit B	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
clpC	lmo0232	endopeptidase Clp ATP-binding chain C	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
clpE	lmo0997	ATP-dependent protease	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
clpP	lmo2468	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
codY	lmo1280	transcriptional repressor CodY	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
comK	lmo2270	competence protein ComK	ND	ND	BIGSdb Lm Database
ctap	lmo0135	peptide ABC transporter substrate-binding protein	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
ctsR	lmo0229	CtsR family transcriptional regulator	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
dal	lmo0886	alanine racemase	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
degU	lmo2515	two-component response regulator DegU	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
dltA	lmo0974	D-alanine-poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
Eut_operon	ND	not determined	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
fbpA	lmo1829	fibronectin-binding proteins	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
flaA	lmo0690	flagellin	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
fri	lmo0943	non-heme iron-binding ferritin	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
fur	lmo1956	Fur family transcriptional regulator	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
gap	lmo2459	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
gltA	ND	ND	ND	ND	BIGSdb Lm Database
gltB	ND	ND	ND	ND	BIGSdb Lm Database
gmaR	LMM7_0723	putative glycosyl transferases; flagella synthesis antirepressor	ND	NC_017537.1	CGE VirulenceFinder
gtcA	lmo2549	wall teichoic acid glycosylation protein GtcA	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
hfq	lmo1295	host factor-1 protein	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
htrA	lmo0292	heat-shock protein htrA serine protease	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
iap	lmo0582	invasion associated secreted endopeptidase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
intA	lmo0438	ND	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
lap	lmo1634	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
lgt	lmo2482	prolipoprotein diacylglycerol transferase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
lhrC	ND	not determined	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
lipA	lmo1800	protein-tyrosine phosphatase	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder

B. Papić: Ugotavljanje značilnosti ... *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Doktorska disertacija

lisK	lmo1378	two-component sensor histidine kinase	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
lisR	lmo1377	two-component response regulator	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
lpeA	lmo1847	metal ABC transporter	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
lplA1	lmo0931	bcrC	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
lsp	lmo1844	lipoprotein signal peptidase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
mdrM	lmo1617	multidrug transporter	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
mogR	lmo0674	not determined	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
mprF	lmo1695	hypothetical protein	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
murA	lmo2691	autolysin	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
ND	lmo2026	peptidoglycan binding protein	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
oatA	lmo1291	acyltransferase	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
oppA	lmo2196	peptide ABC transporter substrate-binding protein	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
pdeE	lmo2491		ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
perR	ND	not determined	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
pgdA	lmo0415	endo-1,4-beta-xylanase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
pgl	lmo0558	hypothetical protein	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
prsA2	lmo2219	foldase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
purQ	lmo1769	phosphoribosylformylglycinamide synthase II	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
pycA	lmo1072	pyruvate carboxylase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
reCA	lmo1398	recombinase A	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
relA	lmo1523	(p)ppGpp synthetase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
Rli55	lmos43	not determined	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
Rli60	lmos76	not determined	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
rsbV	lmo0893	anti-anti-sigma factor (antagonist of RsbW)	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
secA2	lmo0583	preprotein translocase subunit SecA	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
sigB	lmo0895	RNA polymerase sigma factor SigB	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
sipX	ND	not determined	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
sipZ	lmo1271	type I signal peptidase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
sod	lmo1439	superoxide dismutase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
srtA	lmo0929	sortase	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
stp	lmo1821	phosphoprotein phosphatase	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
svpA	lmo2185	not determined	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
tagB	lmo1088	teichoic acid biosynthesis protein B	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
tcsA	lmo1388	CD4+ T cell-stimulating antigen, lipoprotein	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
tig	lmo1267	trigger factor	ND	NC_003210.1	CGE VirulenceFinder
uhpT	lmo0838	sugar:phosphate antiporter	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
vip	lmo0320	peptidoglycan-bound surface protein	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
virR	lmo1745	two-component response regulator	ND	NC_003210.1	Camejo in sod. (2011) Virulence 2:5, 379-394
virS	lmo1741	histidine kinase	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
lapB	lmo1666	peptidoglycan-linked protein	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
srtB	lmo2181	hypothetical protein	ND	NC_003210.1	BIGSdb Lm Database
ND	LHMCC_2303		ND	candidate	NC_011660.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	lm4b_00071b		ND	candidate	NC_002973.6 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	lm4b_00072b		ND	candidate	NC_002973.6 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	Lm4b_00073		ND	candidate	NC_002973.6 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	Lm4b_00075		ND	candidate	NC_012488.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	Lm4b_00076b		ND	candidate	NC_012488.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	Lm4b_00077		ND	candidate	NC_012488.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	Lm4b_00078		ND	candidate	NC_012488.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMJF5203_00013		ND	candidate	LT985474.1 Aguilar-Bulet in sod. (2018) Front Cell Infect
ND	LMJF5203_00294		ND	candidate	LT985474.1 Aguilar-Bulet in sod. (2018) Front Cell Infect
ND	LMJF5203_00370		ND	candidate	LT985474.1 Aguilar-Bulet in sod. (2018) Front Cell Infect
ND	LMJF5203_00470		ND	candidate	LT985474.1 Aguilar-Bulet in sod. (2016) Front Cell Infect
ND	LMJF5203_01155		ND	candidate	LT985474.1 Aguilar-Bulet in sod. (2018) Front Cell Infect
ND	LMJF5203_02482		ND	candidate	LT985474.1 Aguilar-Bulet in sod. (2018) Front Cell Infect
ND	lmo0463		ND	candidate	NC_003210.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
hisE	lmo0561		ND	candidate	NC_003210.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
hisI	lmo0562	phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	candidate	NC_003210.1	Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	lmo1810	fatty acid biosynthesis transcriptional regulator	candidate	NC_003210.1	Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	lmo2192	peptide ABC transporter ATP-binding protein	candidate	NC_003210.1	Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	lmo2193	peptide ABC transporter ATP-binding protein	candidate	NC_003210.1	Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	lmo2378	monovalent cation/H ⁺ antiporter subunit A	candidate	NC_003210.1	Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	lmo2379	monovalent cation/H ⁺ antiporter subunit B	candidate	NC_003210.1	Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOATCC19117_0357		ND	candidate	FR733643.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOATCC19117_0358		ND	candidate	FR733643.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOATCC19117_0359		ND	candidate	FR733643.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOATCC19117_0360		ND	candidate	FR733643.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOATCC19117_2375		ND	candidate	FR733643.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOATCC19117_2377		ND	candidate	FR733643.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOATCC19117_2378		ND	candidate	FR733643.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOATCC19117_2379		ND	candidate	FR733643.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOATCC19117_2380		ND	candidate	FR733643.1 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOI2365_0032		ND	candidate	NC_002973.6 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOI2365_0036		ND	candidate	NC_002973.6 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOI2365_0037		ND	candidate	NC_002973.6 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOI2365_0038		ND	candidate	NC_002973.6 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOI2365_0325		ND	candidate	NC_002973.6 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOI2365_0326		ND	candidate	NC_002973.6 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOI2365_0328		ND	candidate	NC_002973.6 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOI2365_0693		ND	candidate	NC_002973.6 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313
ND	LMOI2365_2627		ND	candidate	NC_002973.6 Maury in sod. (2016) Nat Genet 48(3):308-313

Priloga 2: Genomska zaporedja bakterije *L. monocytogenes*, ki smo jih zajeli v analizo prisotnosti/odsotnosti 151 determinant virulence. V analizo smo zajeli po 10 naključno izbranih, javno dostopnih genomov na vsak klonalni kompleks (CC).

Supplementary data 2: *L. monocytogenes* genomes that were used for the analysis of the gene presence/absence of 151 virulence genes. Ten genomes per each clonal complex (CC) were included into the analysis.

Dostopna številka genoma (NCBI* ali RIDOM**)	CC
NC_002973.6	CC1
NC_018585.1	
NC_019556.1	
NC_021825.1	
NZ_CP007210.1	
NZ_CP007459.1	
NZ_CP007460.1	
NZ_CP007492.1	
NZ_CP009897.1	
NZ_CP013285.1	
NC_021827.1	CC6
NC_021829.3	
NC_021839.1	
NC_021840.1	
NZ_CP007600.1	
NZ_CP010346.1	
NZ_CP019625.1	
RID005242	
RID005274	
RID005464	
CP025442.1	CC9
NC_017546.1	
NC_018589.1	
NZ_CP007194.1	
NZ_CP007195.1	
NZ_CP007196.1	
NZ_CP023752.1	
NZ_CP023754.1	
NZ_CP025082.1	
NZ_CP025259.1	
NC_018593.1	CC14
RID005492	
RID005512	
RID006013	
RID006926	
RID007016	
RID010728	
RID011051	
RID011161	
RID011294	
NZ_CP007687.1	CC29
NZ_CP020832.1	
RID005439	
RID005440	
RID005505	
RID005506	
RID005777	
RID006291	
RID006382	
RID006387	
NZ_CP007197.1	CC37
NZ_CP007198.1	
RID005453	
RID005988	
RID006100	
RID006111	
RID006266	
RID006451	
RID006486	
RID006803	

* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

** <https://www.cgmlst.org/>

Priloga 3: Vpliv tehnologije sekvenciranja na rezultate WGS-tipizacije. Številke predstavljajo alelne razlike (cg/wgMLST) oz. število polimorfizmov wgSNP za posamezen izolat *L. monocytogenes* ($n = 11$), ki so posledica razlik v uporabljeni tehnologiji sekvenciranja (Illumina in Ion Torrent). Tipizacijo smo izvedli s programsko opremo BioNumerics.

Supplementary data 3: The effect of WGS sequencing technology on WGS-typing results. The numbers indicate pairwise SNP/allelic differences of 11 *L. monocytogenes* isolates that were sequenced using Illumina and Ion Torrent technology. WGS typing was performed using the BioNumerics software.

Izolat	cgMLST	wgMLST	wgSNP
L1323	0	8	0
L577	0	2	1
L590	9	12	2
L592	14	26	4
L594	8	11	0
L595	7	15	0
L596	8	18	0
L597	7	16	1
L630	2	9	3
L637	0	4	0
L639	2	5	0
Mediana (min–max)	7 (0–14)	11 (2–26)	1 (0–4)

Priloga 4: Parametri kakovosti podatkov, pridobljenih s tehnologijama Ion Torrent in Illumina, na ravni odčitkov in sestavljenih zaporedij. Parametre kakovosti smo izračunali in vizualizirali s programsko opremo BioNumerics. **A**, povzetek rezultatov za nadzor kakovosti. Z rdečo barvo so označeni izolati, ki odstopajo od predpisanih vrednosti kakovosti, intenziteta rdeče barve sovpada z odstopanjem od predpisanih vrednosti. **B**, vrednosti parametrov kakovosti za vzorec L590, tehnologija Illumina. **C**, vrednosti parametrov kakovosti za vzorec L590, tehnologija Ion Torrent.

Supplementary data 4: Read- and assembly-based quality control parameters of Ion Torrent and Illumina data. Quality control parameters were calculated and visualized using the BioNumerics software. **A**, summary of quality control parameters. Non-optimal parameters are depicted in red; colour intensity corresponds to the level of deviation from optimal values. **B**, quality parameters for L590 isolate, Illumina technology. **C**, quality parameters for L590 isolate, Ion Torrent technology.

A

Entry	Raw data statistics	Raw data statistics after trimming	De novo assembly	Assembly-free calls	Assembly-based calls	Summary calls
L597_Ion_Torrent	Not ok: Q30 frequency	Not ok: Q30 frequency	ok	ok	Not ok: Alleles to submit	Not ok: Unknown alleles
L597_Illumina	ok	ok	ok	Not ok: Multiple alleles	ok	ok
L596_Ion_Torrent	Not ok: Q30 frequency	Not ok: Q30 frequency	Not ok: Average coverage	Not ok: Perfect matches	Not ok: Perfect matches	Not ok: Confirmed alleles
L596_Illumina	ok	ok	ok	ok	ok	ok
L595_Ion_Torrent	Not ok: Q30 frequency	Not ok: Q30 frequency	Not ok: Average coverage	Not ok: Perfect matches	Not ok: Alleles to submit	Not ok: Confirmed alleles
L595_Illumina	Not ok: Q30 frequency 1st end	Not ok: Average read quality	ok	ok	ok	ok
L592_Ion_Torrent	Not ok: Q30 frequency	Not ok: Q30 frequency	Not ok: Average coverage	Not ok: Perfect matches	Not ok: Alleles to submit	Not ok: Confirmed alleles
L592_Illumina	ok	ok	ok	ok	ok	ok
L590_Ion_Torrent	Not ok: Q30 frequency	Not ok: Q30 frequency	ok	Not ok: Perfect matches	ok	Not ok: Unknown alleles
L590_Illumina	ok	ok	ok	Not ok: Multiple alleles	ok	ok
L1323_Ion_Torrent	Not ok: Average read quality	Not ok: Average read quality	ok	ok	ok	ok
L1323_Illumina	ok	ok	ok	ok	ok	ok

B

Quality control for entry 'L590_Illumina'		
Parameter	Value	Acceptable
De novo assembly: Bases N	2	< 146072
De novo assembly: Bases non ACGTN	34	< 2921
Assembly-free calls: Average coverage	96.4	> 6.0
Assembly-free calls: Multiple alleles	99	< 60
Assembly-free calls: Perfect matches	2935	> 2408
Assembly-free calls: Present alleles	3010	[1879, 3121]
Assembly-based calls: Multiple alleles	1	< 12
Assembly-based calls: Perfect matches	2895	> 2390
Assembly-based calls: Alleles to submit	89	< 299
Assembly-based calls: Submitted alleles	0	< 149
Assembly-based calls: Present alleles	2907	[1879, 3121]
Assembly-based calls: Average locus coverage	79	> 4
Summary calls: Unknown alleles	0	< 3
Summary calls: Multiple alleles	5	< 29
Summary calls: Discrepant alleles	0	< 15
Summary calls: Confirmed alleles	2896	> 2642
Summary calls: Present alleles	2995	[1879, 3121]
Summary calls: % core present	99.8	> 80.0

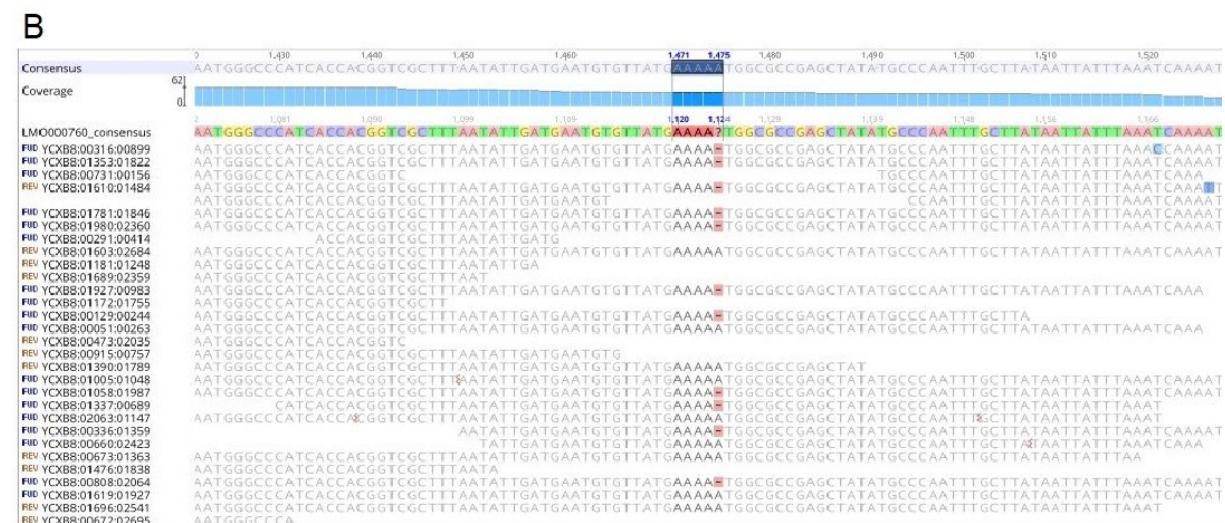
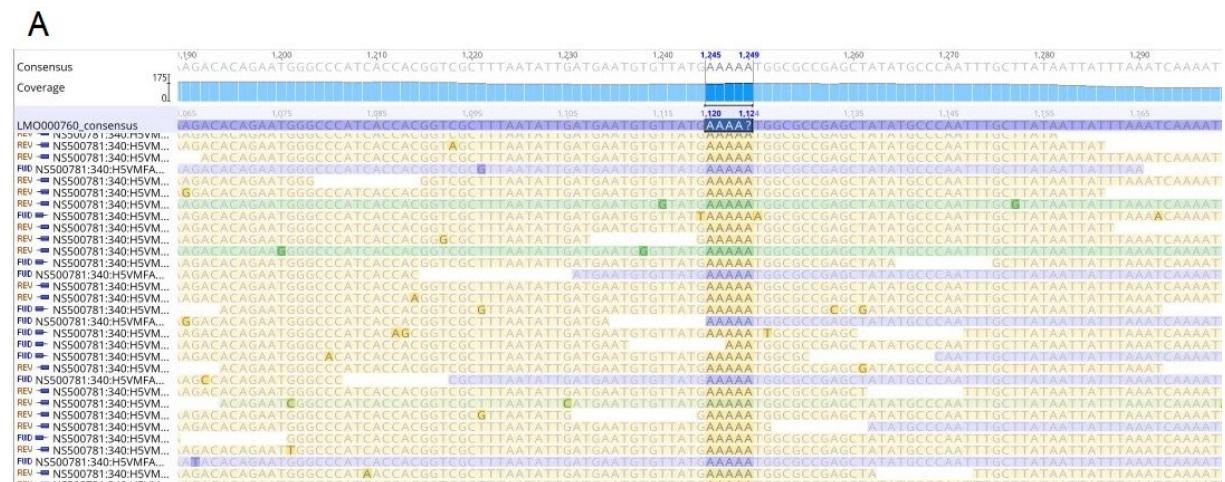
C

Quality control for entry 'L590_Ion_Torrent'		
Parameter	Value	Acceptable
De novo assembly: Bases N	3066	< 150250
De novo assembly: Bases non ACGTN	289	< 3005
Assembly-free calls: Average coverage	33.6	> 6.0
Assembly-free calls: Multiple alleles	37	< 60
Assembly-free calls: Perfect matches	2292	> 2401
Assembly-free calls: Present alleles	3001	[1879, 3121]
Assembly-based calls: Multiple alleles	0	< 12
Assembly-based calls: Perfect matches	2563	> 2458
Assembly-based calls: Alleles to submit	312	< 307
Assembly-based calls: Submitted alleles	0	< 154
Assembly-based calls: Present alleles	3072	[1879, 3121]
Assembly-based calls: Average locus coverage	25	> 4
Summary calls: Unknown alleles	8	< 3
Summary calls: Multiple alleles	6	< 27
Summary calls: Discrepant alleles	0	< 14
Summary calls: Confirmed alleles	2166	> 2457
Summary calls: Present alleles	2730	[1879, 3121]
Summary calls: % core present	93.1	> 80.0

B. Papić: Ugotavljanje značilnosti ... *Listeria monocytogenes* s sekvenciranjem naslednje generacije. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2020. Doktorska disertacija

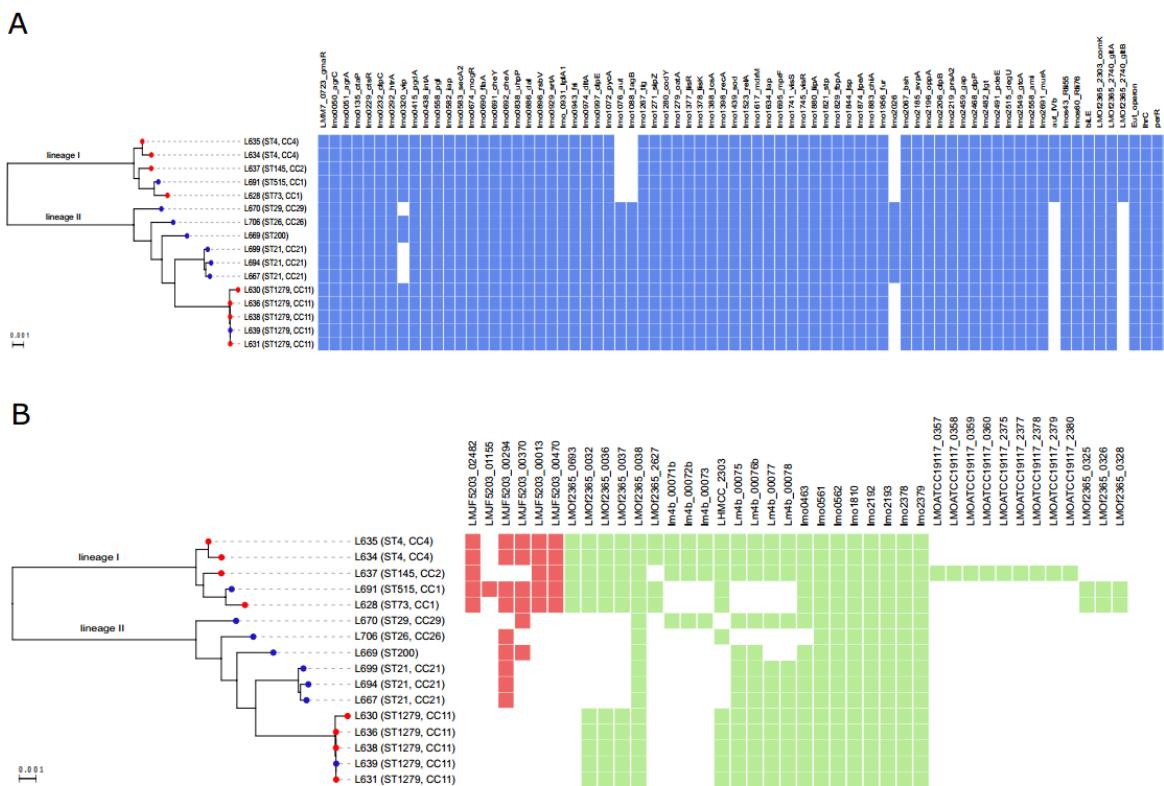
Priloga 5: Alel LMO000760 pri izolatu L590. Alel je bil pri tipizaciji wgMLST variabilen in vezan na tehnologijo sekvenciranja. Odčitke tehnologij Illumina (**A**) in Ion Torrent (**B**) smo z orodjem Geneious poravnali na konsenzno zaporedje LMO000760_consensus. Homopolimerna regija, v kateri je prišlo do odstopanja v alelnem zaporedju na zadnji poziciji (označena z "?"), je predstavljena s poudarjeno barvo.

Supplementary data 5: LMO000760 allele in L590 isolate. This allele was variably called in wgMLST typing with regard to the sequencing technology. Raw reads from Illumina (**A**) and Ion Torrent (**B**) were mapped to the LMO000760_consensus reference sequence using Geneious. Homopolymer region, in which the variation in allele calls occurred at position "?", is highlighted.



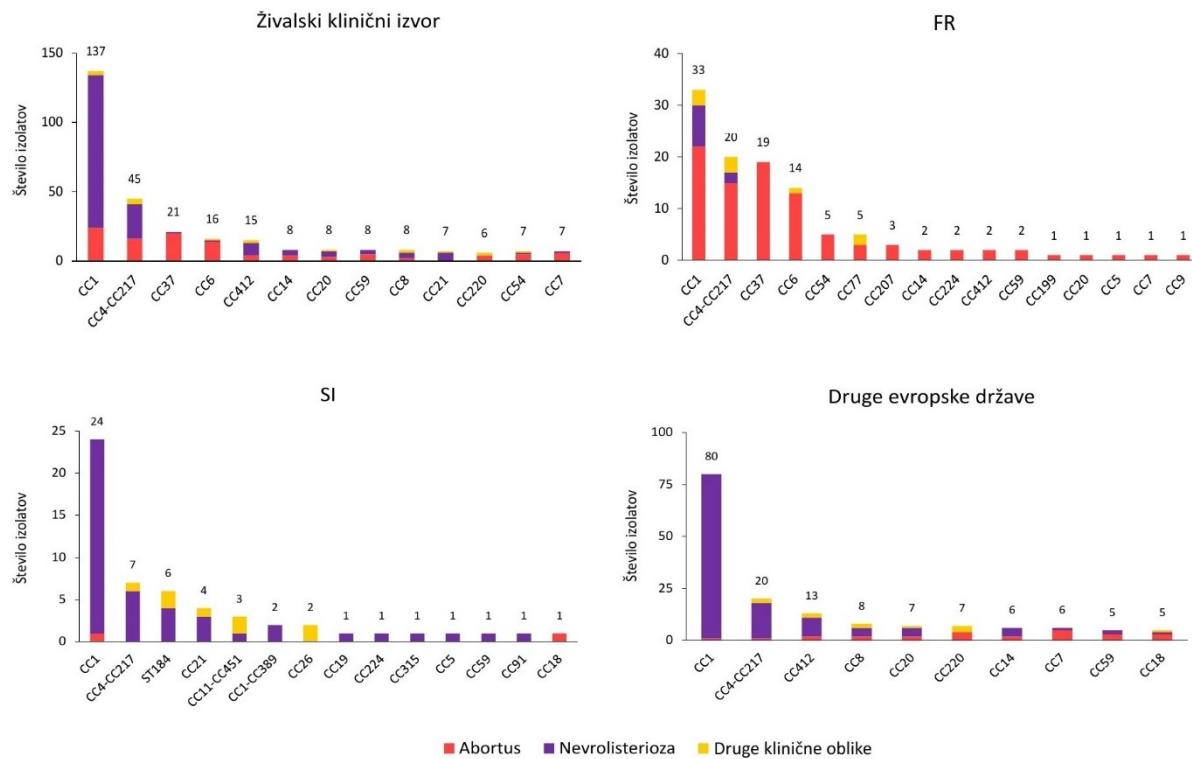
Priloga 6: Profil prisotnosti/odsotnosti 120 determinant virulence pri 16 izolatih bakterije *L. monocytogenes* s kmetije G. Polni kvadratki predstavljajo prisotnost gena. A, 80 predhodno opisanih determinant virulence. B, 40 nedavno opisanih, domnevnih determinant virulence. Merilo predstavlja število aminokislinskih zamenjav na pozicijo.

Supplementary data 6: The presence/absence pattern of 120 virulence genes in 16 *L. monocytogenes* isolates from farm G. The gene presence is denoted by a full square. A, 80 previously described virulence factors. B, 40 recently described putative virulence factors. Scale, number of amino acid substitutions per site.



Priloga 7: Prevalenca klonalnih kompleksov (CC) bakterije *L. monocytogenes* v podatkovni zbirki Živalski klinični izvor ter njenih podmnožicah izolatov iz Francije (FR), Slovenije (SI) in predhodno tipiziranih izolatov iz drugih evropskih držav.

Supplementary data 7: Prevalence of *L. monocytogenes* clonal complexes (CCs) in the Animal clinical dataset and its subsets of isolates from Slovenia (SI), France (FR) and previously typed isolates from other European countries.



Priloga 8: Prevalenca klonalnih kompleksov (CC) bakterije *L. monocytongenes* v zbirki Naravno okolje in njeni podmnožici izolatov iz Slovenije (SI).

Supplementary data 8: Prevalence of *L. monocytogenes* clonal complexes (CCs) in the Natural environment dataset and its subset of isolates from Slovenia (SI).

