

7. Abstract

Yersinia enterocolitica is a causative agent of human yersiniosis widespread within humans, fattening pigs, domestic and wild-living animals. The main goal was investigation the incidence of *Yersinia* sp. in humans and prevalence within pigs and wild animals during the years of 2014-2018 in west Poland and comparison of *Yersinia* sp. identification methods. The following goal was phylogenetic analysis of *Yersinia* sp. strains to assess the potential similarity being a consequence of transmission between different hosts and the assessment of the role of particular virulence factors of *Yersinia* sp. in serum resistance. The final goal was the determination of potential pathogenicity of *Y. enterocolitica* and wild-living *Y. enterocolitica*-like strains isolated from wild animals.

Yersinia sp. occurred among 1.6% of wild boars, 1.1% of roe deer, 16.9% of pigs and 1.0% of humans in west Poland in the years 2014-2018. There were no discrepancies in identification of all human and pig isolates using MALDI TOF MS and VITEK® 2 Compact. However, MALDI Biotyper has identified the 3dz, 4dz, 8dz wild boar isolates as *Y. enterocolitica*. In turn, VITEK® 2 Compact identified 3dz and 8dz as *Y. kristensenii*, and isolate 4dz as *Y. enterocolitica*. The 16S rDNA sequence analysis identified these isolates as *Y. kristensenii* (3dz, 4dz) and *Y. pekkannenii* (8dz). The results of this dissertation indicate wild boars as a reservoir of *Yersinia* strains, for which protein and biochemical profiles are not included in the MALDI Biotyper or VITEK® 2 Compact databases. This work emphasizes the necessity of use of multiple methods for zoonotic *Yersinia* sp. identification. The main bioserotype present within pigs and human faeces was pathogenic 4/O:3.

Among n=51 *Yersinia* sp. strains 20 virulence profiles were determined. The most common virulence genes were *ymoA*, *ureC*, *inv*, *myfA* and *yst*. *Y. enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like strains are equipped with virulence determinants which may contribute to the invasion and colonization of the intestines as well as survival in response to human complement. *Y. enterocolitica* strains isolated from fattening pigs and dogs were equipped additionally in determinants such as *yadA* and *ail*. Moreover, one wild boar *Y. enterocolitica* 1A strain (205dz) possessed *ail* gene proving possible pathogenicity of 1A biotype. The correlation between bioserotype-virulotype of *Y. enterocolitica* was observed especially within the pig strains (4/O:3).

The clustering tendency among genotypes related to pig origin and 4/O:3 bioserotype and virulence profile was observed. Wild boar strains had not the predominant genotype and were unrelated to other strains, indicating that wild boars could be a new reservoir and no transmission between pigs and wild boars has been observed yet. Pig and human strains

formed the most closely related group, characterized by ~80% of genetic similarity. Among pig strains there was observed homogeneous genetic structure, while wild boar strains were not dominated by single genotypes, indicating that wild boars could be a new reservoir and no transmission between pigs and wild boars has been observed yet.

The serum resistant phenotype was observed within human (n=3/3) and pig (n=27/31, 87%) strains possessing *yadA* and *ail* genes but there was also sensitivity resulting from lacking the pYV plasmid and classification to 1A biotype. *Y. kristensenii* (4dz) and *Y. enterocolitica* 1A (10dz) isolated from wild boars were resistant and moderate resistant to serum action, respectively, however, *Y. enterocolitica* 1A (205dz) strain equipped in *ail* gene was not serum resistant.

The role of Ail, YadA and OmpC proteins in serum resistance were indirectly confirmed because *ail*, *yadA*, *ompC* genes expression after NHS treatment of selected strains were higher in comparison to iNHS treatment. The level of *ail* gene in the serum-sensitive 205dz strain did also change compared to iNHS treatment. This gene is likely nonfunctional in 1A biotype so far, due to the occurrence of SNPs that may contribute to changes in protein conformation and folding. The same SNPs were observed in moderate serum resistant reference 2/O:9 Ye9 strain, additionally equipped in other virulence factors, which will probably recompensate the lack of full- functional form of Ail protein.

08-04-2019

Łukasz Mordue

8. Streszczenie

Identyfikacja, analiza genotypowa i wirulotypowa *Yersinia* sp. izolowanych od ludzi, oraz domowych i dziko żyjących zwierząt.

Yersinia enterocolitica jest czynnikiem etiologicznym jersiniozy występującym wśród ludzi, świń, domowych i dziko żyjących zwierząt. Pierwszym celem było określenie roli rezerwuaru dla wspomnianych pałeczek poprzez ocenę występowania *Yersinia* sp. wśród ludzi, świń rzeźnych czy dziko żyjących zwierząt w latach 2014-2018 w zachodniej Polsce oraz porównanie metod identyfikacji *Yersinia* sp. Poprzez analizę filogenetyczną izolatów zaplanowano ocenić czy zjawisko transmisji pałeczek *Yersinia* sp. miało miejsce pomiędzy różnymi gospodarzami. Zaplanowano również ocenić rolę poszczególnych czynników wirulencji w nadawaniu *Yersinia* sp. oporności na surowicę ludzką. Finalnie celem było określenie potencjalnej patogenności *Y. enterocolitica* i innych gatunków z rodzaju *Yersinia* sp. izolowanych od dziko żyjących zwierząt.

Występowanie *Yersinia* sp. oszacowano wśród 1,6% dzików łownych, 1,1% saren europejskich, 16,9% świń rzeźnych i 1,0% ludzi w zachodniej Polsce w latach 2014-2018. Wyniki identyfikacji izolatów wyosobnionych z kału ludzkiego oraz świń były zgodne pomiędzy MALDI TOF MS i VITEK[®] 2 Compact. Jednakże, MALDI Biotyper zidentyfikował 3dz, 4dz i 8dz jako *Y. enterocolitica*, podczas gdy VITEK[®] 2 Compact zidentyfikował jako *Y. kristensenii* (3dz i 8dz) oraz *Y. enterocolitica* (4dz). Analiza sekwencji 16S rDNA dowiodła, iż 3dz oraz 4dz przynależą do gatunku *Y. kristensenii*, podczas gdy 8dz do *Y. pekkanenii*. Dzikie łowne stanowią więc rezerwuar *Yersinia* sp. dla których molekularny odcisk palca czy profil biochemiczny nie występuje w bazie MALDI Biotyper czy VITEK[®] 2 Compact. Wyniki pracy doktorskiej uwydatniają konieczność stosowania kilku metod podczas identyfikacji *Yersinia* sp. Wśród izolatów pozyskanych z kału ludzkiego oraz świń dominował patogeny bioserotyp 4/O:3.

Wśród 51 izolatów *Yersinia* sp. oznaczono 20 wirulotypów. Najpowszechniej występującymi genami wirulencji były *ymoA*, *ureC*, *inv*, *myfA* i *yst*. *Y. enterocolitica*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. pekkanenii* są zaopatrzone w determinanty wirulencji, które umożliwiają inwazję i kolonizację jelit jak również zdolność przeżycia w surowicy ludzkiej. Izolaty *Y. enterocolitica* wyizolowane od świń rzeźnych oraz psów domowych dodatkowo posiadają geny *yadA* i *ail*. Jeden szczep *Y. enterocolitica* 1A wyosobniony od dzika łownego (205dz) posiadał w genomie gen *ail*, co wskazuje na potencjalną wirulencję biotypu 1A.

Korelacja bioserotyp-wirulotyp została zaobserwowana szczególnie wśród izolatów *Y. enterocolitica* wyizolowanych od świń rzeźnych (4/O:3).

Tendencję klasteryzacji szczególnie zaobserwowano wśród izolatów pochodzących od świń rzeźnych i bioserotypu 4/O:3. Natomiast wśród izolatów wyisobnionych od dzików łownych nie dominował żaden genotyp i jednocześnie izolaty te nie były podobne do pozostałych badanych izolatów. Na tej podstawie można twierdzić iż dziki mogą stanowić nowy rezerwuuar pałeczek *Yersinia* sp. i nie doszło póki co do transmisji bakterii pomiędzy badanymi gospodarzami. Szczepy wyizolowane od świń rzeźnych oraz z kału ludzkiego formowały najbardziej spokrewnioną grupę cechującą się 80% genetycznego podobieństwa.

Cecha oporności na surowicę ludzką występowała wśród izolatów ludzkich (n=3/3) i świńskich (n=27/31) posiadających w genomie *yadA* i *ail*. Szczepy *yadA*⁻ bądź przynależące do biotypu 1A były wrażliwe na działanie surowicy. Natomiast *Y. kristensenii* (4dz) i *Y. enterocolitica* 1A (10dz) były zdolne do przeżycia w surowicy ludzkiej. Szczep *Y. enterocolitica* 1A (205dz) pomimo posiadania genu *ail* pozostawał wrażliwy na działanie surowicy ludzkiej.

Rola białek Ail, YadA i OmpC w nadawaniu bakteriom oporności na działanie surowicy została pośrednio potwierdzona, ponieważ ekspresja genów *ail*, *yadA*, *ompC* była wyższa po inkubacji bakterii w surowicy aktywnej niż w surowicy inaktywowanej przynajmniej w jednym punkcie czasowym. Poziom ekspresji genu *ail* szczepu 205dz również był wyższy w surowicy aktywnej co na tym etapie nie wyjaśnia wrażliwości 205dz na surowicę. W sekwencji nukleotydowej genu *ail* szczepu 205dz odkryto SNP mogące wywoływać zmiany w konformacji i fałdowaniu białka Ail. Te same SNP zaobserwowano w sekwencji *ail* szczepu referencyjnego 2/O:9, średnio opornego na działanie NHS, który posiada inne czynniki wirulencji mogące rekompensować brak w pełni funkcjonującego białka Ail.

08-04-2019
Krzysztof Kosłowski