

# Antimicrobial susceptibility and resistance gene transfer analysis of foodborne, clinical and environmental *Listeria* spp. isolated in Switzerland

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Bertsch, David

**Publication date:**

2012

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007594476>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 20620

**Antimicrobial susceptibility and resistance gene transfer analysis of foodborne,  
clinical and environmental *Listeria* spp. isolated in Switzerland**

A dissertation submitted to

**ETH Zurich**

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

**DAVID BERTSCH**

Dipl.-LM-Ing., University of Hohenheim

born February 19, 1983

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Leo Meile, examiner  
Prof. Dr. Christophe Lacroix, co-examiner  
Prof. Dr. Martin J. Loessner, co-examiner  
Prof. Dr. Wolfgang Kneifel, co-examiner

2012

## SUMMARY

*Listeria monocytogenes* is the causative microorganism of human listeriosis, an invasive disease that predominantly affects immunocompromised and elderly adults, pregnant women, as well as neonates almost exclusively after consumption of contaminated foodstuffs. The virulence genes that enable its intracellular survival are located on *Listeria* Pathogenicity Island 1 (LIPI-1). Both *L. ivanovii* and *L. seeligeri* also harbor modifications of this virulence gene cluster, whereas the remaining members of the genus *Listeria* are considered avirulent. Irrespective of its low incidence, listeriosis is among the leading causes of food-related deaths due to its high mortality. Even though other Gram-positive bacteria with high prevalence of antimicrobial resistance like methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE) are more worrying pathogens in hospital environments, early antibiotic therapy is the only effective treatment also for listeriosis. Since ABR in *L. monocytogenes* increases the risk of fatal treatment failure, constant surveillance is crucial in order to react to any changes in antimicrobial susceptibility by adaptation or development of new patient treatments. Furthermore, it is important to identify the location of ABR genes within *L. monocytogenes* genomes, as especially mobile genetic elements (MGEs) like conjugative plasmids and transposons are responsible for the dissemination of antimicrobial resistance among bacteria by horizontal gene transfer (HGT). Next to enterococci, staphylococci and streptococci, also *Listeria* species might constitute a reservoir of resistance genes for *L. monocytogenes*, justifying their investigation.

There is limited information on ABR prevalence of *Listeria* spp. and the development of antimicrobial resistances may be influenced by local prescription practices for antibiotics in each country. The purpose of this thesis, carried out as part of a broader collaborative project (“BactFlow”), was therefore the assessment of resistance pheno- and genotypes in *Listeria* isolates from Switzerland, further

## SUMMARY

---

characterization of isolates with unusual properties, as well as elucidating the HGT potential of detected ABR genes *in vitro* and *in situ*.

In total 524 foodborne ( $n = 266$ ), clinical ( $n = 155$ ) and environmental ( $n = 103$ ) *Listeria* strains isolated between 2006 and 2012 were assembled from culture collections of institutes at the ETH, the food industry, hospitals, as well as veterinary clinics in Switzerland and complemented by isolation from selected foodstuffs during this study. In Chapter 2, broth microdilution testing was used to screen for phenotypic resistances against 16 antimicrobials. The antibiotics were selected to include both different classes and compounds administered in human and veterinary medicine. Sixteen (3.1%) *Listeria* isolates displayed resistance to tetracycline ( $n = 11$ ), clindamycin ( $n = 4$ ) and trimethoprim ( $n = 3$ ) and additionally 92 (17.6%) strains revealed intermediate susceptibility to at least one antibiotic. A clinical *L. monocytogenes* (TTH-2007), as well as a foodborne *L. innocua* isolate (TTS-2011) displayed resistance phenotypes for both tetracycline and trimethoprim. By application of a microarray assay, all tetracycline resistances could be assigned to the *tet(M)* gene and three different trimethoprim resistance genes were detected [*dfr(A)*, *dfr(D)* and *dfr(G)*], whereas the clindamycin resistance phenotype could not be linked to any known resistance gene. Surprisingly, *L. innocua* TTS-2011 additionally harbored *erm(A)* and *erm(33)* encoding MLS<sub>B</sub>-type resistance, as well as *ant(9)-Ia* conferring resistance to spectinomycin. Only the latter one could subsequently be confirmed phenotypically. Transferability of the detected ABR genes, elucidated *in vitro* by filter matings, was demonstrated for *tet(M)*, *dfr(G)* and the unknown clindamycin resistance determinant. Transfer to the recipients *L. monocytogenes* 10403S and *Enterococcus faecalis* JH2-2 occurred at frequencies between  $10^{-8}$  and  $10^{-5}$  transconjugants per donor.

The *dfr(G)* gene was always transferred together with *tet(M)* by conjugation in filter matings with *L. monocytogenes* TTH-2007 as the donor strain. This suggested that the double resistance is localized

## SUMMARY

---

on a single plasmid or transposon, which was further investigated in Chapter 3. Application of long PCR reactions with primers derived from sequences of the two resistance genes and a primer walking strategy revealed presence of a Tn916-like transposon. Ring closure with a published PCR assay targeting circular intermediates of such conjugative transposons led to a final sequence length of 21.3 kb. When this novel transposon, designated Tn6198, was compared to Tn916, it was obvious that a 3.2-kb fragment including *dfr*(G) has been inserted between ORFs 23 and 24 of Tn916. Presence of the original Tn916 transposon in addition to Tn6198 in the genome of *L. monocytogenes* TTH-2007 could be shown by PCR and consequently resulted in either tetracycline- and trimethoprim-resistant or solely tetracycline-resistant transconjugants after selection with tetracycline. After demonstrating the transferability of Tn6198 *in vitro*, *in situ* transfer experiments on the surface of smear-ripened cheese and smoked salmon were performed with the same recipients; they resulted in a transfer rate of about  $10^{-7}$ - $10^{-6}$  to *L. monocytogenes* 10403S. In contrast, experiments to demonstrate the transfer of *tet*(M) alone were only successful on salmon but not feasible on cheese due to the abundant background of this transferable gene within the typical cheese surface microbiota. We also observed that the transfer of the clindamycin resistance did not occur on both food matrices.

Resistance to clindamycin was detected in four identical strains isolated from cheese in 2006 and 2011, which could be assigned to the genus *Listeria* but not to any published species by PCR. Therefore, this hitherto undefined *Listeria* species, designated *Listeria fleischmannii* sp. nov., was further analyzed and described by a polyphasic approach (Chapter 4). Phenotypic as well as chemotaxonomic data were compatible with other *Listeria* species, except for the lack of motility. However, the flagellin gene *flaA* seemed to be present in the genome, since its central portion could be amplified by PCR. Phylogenetic characterization indicated relatedness to members of the genus *Listeria*, but it could be well separated from all currently published *Listeria* species *inter alia* using DNA-DNA-hybridization and therefore

## SUMMARY

---

warranted classification as a novel species. In contrast to *L. monocytogenes*, the isolates were not hemolytic, did not harbor known virulence genes and were not invasive in a Caco-2 cell tissue culture model. These findings suggested apathogenicity for humans, which is of general interest for consumer safety.

A partner of the project (Laboratory of Food Microbiology) observed that *Listeria* spp. and other motile bacteria attach to the surface of *Acanthamoeba* before they are gradually ingested. Therefore, we tested whether horizontal transfer of the ABR genes detected in our study can happen within these tight agglomerates (Chapter 5). Transmission of the *tet(M)* gene occurred among *Listeria* species in liquid media in presence of *Acanthamoeba castellanii* but could not be accurately quantified.

Conclusively, the prevalence of ABR in *Listeria* strains isolated in Switzerland within the last seven years is low (3.1%), which is in agreement with previous studies carried out in other European countries. However, both a clindamycin resistance determinant so far unknown in Gram-positive bacteria and the novel conjugative transposon Tn6198 were detected in this study. Along with the more frequently occurring *tet(M)* gene that was mostly associated with the conjugative transposon Tn916, several transferable resistance elements are present among *Listeria* spp. within Switzerland. Together with the recent rise in listeriosis cases, the results of this thesis reinforce the necessity of a comprehensive surveillance of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. Additionally, the correct measures have to be taken to prevent emergence and spread of further ABRs among bacteria. These might include a global ban of antibiotic growth promoters as well as constant optimization of both the antimicrobial dosage and the duration of therapy.

### ZUSAMMENFASSUNG

*Listeria monocytogenes* ist der Erreger der menschlichen Listeriose, einer invasiven Erkrankung, die vor allem immungeschwächte und ältere Menschen, Schwangere, sowie Neugeborene betrifft und zwar fast ausschließlich nach dem Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln. Die Virulenzgene, die sein intrazelluläres Überleben ermöglichen, befinden sich auf *Listeria*-Pathogenitätsinsel 1 (LIPI-1). Des Weiteren tragen sowohl *L. ivanovii* als auch *L. seeligeri* dieses Virulenzgen-Cluster in einer modifizierten Version, während die übrigen Vertreter des Genus *Listeria* als avirulent gelten. Trotz geringer Verbreitung ist die Listeriose aufgrund ihrer hohen Mortalität einer der wichtigsten Gründe lebensmittelbedingter Todesfälle. Obwohl andere Gram-positive Bakterien, wie zum Beispiel Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) aufgrund vieler Antibiotika-Resistenzen die besorgniserregenderen Keime in Krankenhäusern sind, ist eine frühe Antibiotika-Therapie auch bei Listeriose-Fällen die einzig wirksame Behandlungsmöglichkeit. Da Antibiotika-resistente *L. monocytogenes* das Risiko eines Therapieversagens mit Todesfolge erhöhen, ist eine ständige Überwachung der Wirksamkeit von Antibiotika unerlässlich, um die bestehenden Behandlungen von Patienten anzupassen beziehungsweise neue zu entwickeln. Darüber hinaus ist es wichtig, die genaue Lage der Antibiotika-Resistenzgene innerhalb des Genoms von *L. monocytogenes* zu identifizieren, da vor allem mobile genetische Elemente (MGE) wie konjugative Plasmide und Transposons für die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen durch horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien verantwortlich sind. Neben Enterokokken, Staphylokokken und Streptokokken könnten auch *Listeria*-Spezies ein Reservoir an Resistenzgenen für *L. monocytogenes* darstellen, weshalb auch diese untersucht werden sollten.

Zum einen ist allgemein wenig über die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen in *Listeria* spp. bekannt und zum anderen wird die Entwicklung von antimikrobiellen Resistenzen möglicherweise durch lokale Unterschiede bei der Anwendung von Antibiotika in den einzelnen Ländern beeinflusst. Diese Dissertation, welche im Rahmen des Gemeinschaftsprojektes "BactFlow" durchgeführt wurde, hatte deshalb zum Ziel, phänotypische und genotypische Resistenzen in Listerien-Isolaten aus der Schweiz zu ermitteln, auffällige Isolate weiter zu charakterisieren und das Gentransfer-Potential der gefundenen Antibiotika-Resistenzgene sowohl *in vitro* als auch *in situ* zu bestimmen.

Insgesamt umfasste die Studie 524 aus Lebensmitteln isolierte ( $n = 266$ ), klinische ( $n = 155$ ) sowie aus der Umwelt isolierte ( $n = 103$ ) *Listeria*-Stämme der Jahre 2006 bis 2012. Diese stammten aus den Sammlungen diverser Institute an der ETH, aus der Lebensmittelindustrie, Krankenhäusern, sowie Tierkliniken in der Schweiz und wurden durch Isolation von Listerien aus ausgewählten Lebensmitteln ergänzt. In Kapitel 2 wurde die Methode der Bouillon-Mikrodilution (Broth Microdilution Testing) angewendet, um phänotypische Resistenzen gegen 16 Antibiotika nachzuweisen. Die Antibiotika wurden so ausgewählt, dass sowohl unterschiedliche Klassen als auch Substanzen, die in der Human- und Tiermedizin angewendet werden, vertreten sind. Resistenzen gegen Tetracyclin ( $n = 11$ ), Clindamycin ( $n = 4$ ) und Trimethoprim ( $n = 3$ ) wurden in 16 *Listeria*-Isolaten (3.1%) gefunden und weitere 92 Stämme (17.6%) wiesen intermediäre Empfindlichkeiten gegen mindestens ein Antibiotikum auf. Sowohl ein klinisches *L. monocytogenes* Isolat (TTH-2007), als auch ein aus Lebensmitteln isolierter *L. innocua* Stamm (TTS-2011) waren multiresistent aufgrund phänotypischer Resistenzen gegen Tetracyclin und Trimethoprim. Durch Anwendung eines Microarray-Assays konnten alle Tetracyclin-Resistenzen dem *tet(M)*-Gen zugeordnet werden, drei unterschiedliche Trimethoprim-Resistenzgene wurden detektiert [*dfr(A)*, *dfr(D)* und *dfr(G)*], wohingegen die phänotypische Resistenz gegen Clindamycin mit keinem der bekannten Resistenzgene in Verbindung gebracht werden konnte. Überraschenderweise trug



*L. innocua* TTS-2011 zusätzlich sowohl die MLS<sub>B</sub>-Resistenz verursachenden Gene *erm(A)* und *erm(33)*, als auch das Spectinomycin-Resistenz verursachende Gen *ant(9)-Ia* in seinem Genom, wobei nur letzteres phänotypisch bestätigt werden konnte. Übertragbarkeit der gefundenen Antibiotika-Resistenzgene konnte im Falle von *tet(M)*, *dfr(G)* und der unbekanntenen Clindamycin-Resistenz *in vitro* mittels Kreuzungen auf Filtern (Filter Mating) nachwiesen werden. Transfer auf die Rezipienten-Stämme *L. monocytogenes* 10403S und *Enterococcus faecalis* JH2-2 fand in Frequenzen zwischen 10<sup>-8</sup> und 10<sup>-5</sup> Transkonjuganten pro Donor statt.

In Konjugations-Experimenten auf Filtern mit *L. monocytogenes* TTH-2007 als Donor-Stamm wurde das *dfr(G)* Gen immer zusammen mit *tet(M)* übertragen. Dies liess vermuten, dass die Doppel-Resistenz auf demselben Plasmid oder Transposon vorliegt, was in Kapitel 3 genauer untersucht wurde. Die Anwendung von long-PCR-Reaktionen mit Primern, die anhand von Sequenzen der beiden Resistenzgene konstruiert wurden, in Kombination mit einer Primer-Walking-Strategie ergab, dass ein Transposon vorliegt, welches dem Transposon Tn916 ähnlich ist. Mit Hilfe eines publizierten PCR-Assays zur Detektion zirkulärer intermediärer Formen solcher konjugativen Transposons, konnte ein Ringschluss erzielt werden, wodurch sich am Ende eine Sequenzlänge von 21.3 kb ergab. Durch Vergleich dieses neuen Transposons, welches die Bezeichnung Tn6198 erhielt, mit Tn916 zeigte sich, dass sich *dfr(G)* auf einem insgesamt 3.2-kb grossen Fragment zwischen die offenen Leseraster ORFs 23 und 24 von Tn916 integriert hat. Mittels PCR konnte nachgewiesen werden, dass das ursprüngliche Transposon Tn916 zusätzlich zu Tn6198 im Genom von *L. monocytogenes* TTH-2007 vorliegt. Dies führte dazu, dass durch Selektion mit Tetracyclin sowohl Transkonjuganten mit Tetracyclin- und Trimethoprim-Resistenz, als auch Transkonjuganten nur mit Tetracyclin-Resistenz auftraten. Nachdem die Übertragbarkeit von Tn6198 *in vitro* nachgewiesen werden konnte, wurden *in situ* Transferexperimente auf der Oberfläche von geschmiertem Käse und geräuchertem Lachs mit denselben Rezipienten

durchgeführt. Im Falle des Rezipienten-Stammes *L. monocytogenes* 10403S ergaben sich Transferraten von ungefähr  $10^{-7}$  bis  $10^{-6}$ . Im Gegensatz dazu war der Transfer von ausschliesslich *tet(M)* aufgrund der weiten Verbreitung dieses übertragbaren Genes innerhalb der typischen Käseflora nicht durchführbar und nur auf dem Lachs erfolgreich. Des Weiteren konnten wir in beiden Lebensmittelmatrices keine Übertragung der Clindamycin-Resistenz feststellen.

Die Clindamycin-Resistenz trat in vier identischen Stämmen auf, welche in den Jahren 2006 und 2011 aus Käse isoliert wurden. Mittels PCR konnten diese Stämme dem Genus *Listeria*, jedoch keiner publizierten Spezies zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurde diese bislang unbekannte *Listeria*-Spezies, welche die Bezeichnung *Listeria fleischmannii* sp. nov. erhielt, ausführlich untersucht und beschrieben (Kapitel 4). Bis auf die fehlende Motilität waren alle ermittelten phänotypischen und chemotaxonomischen Daten vergleichbar mit den entsprechenden Werten anderer *Listeria*-Spezies. Dennoch schien das Flagellin enkodierende Gen *flaA* im Genom vorhanden zu sein, da dessen Mittelstück mit einem PCR-Assay amplifiziert werden konnte. Eine verwandtschaftliche Beziehung zum Genus *Listeria* wurde anhand der Resultate einer phylogenetischen Charakterisierung angedeutet. Jedoch konnten die Isolate unter anderem mittels DNA-DNA-Hybridisierung eindeutig von allen zurzeit bekannten *Listeria*-Spezies unterschieden werden, was deren Klassifizierung als neuartige Spezies rechtfertigte. Im Gegensatz zu *L. monocytogenes* waren diese Isolate nicht hämolytisch, trugen keine bekannten Virulenzgene im Genom und waren in einem Zellkultur-Versuch mit Caco-2 Zellen auch nicht invasiv. Diese Erkenntnisse liessen darauf schliessen, dass die Isolate für den Menschen nicht pathogen sind, was in Bezug auf die Konsumentensicherheit entscheidend ist.

Ein Projektpartner (Labor für Lebensmittelmikrobiologie) hatte beobachtet, dass sich *Listeria* spp. und andere bewegliche Bakterien an der Oberfläche von Acanthamöben anlagern, bevor sie nach und nach gefressen werden. Aufgrund dieser Beobachtung haben wir untersucht, ob die im Rahmen dieser Studie

gefundenen Antibiotika-Resistenzgene innerhalb dieser kompakten Anlagerungen zwischen Bakterien übertragbar sind (Kapitel 5). Übergang des *tet(M)* Genes fand in Flüssigkultur zwischen *Listeria*-Spezies in Anwesenheit von *Acanthamoeba castellanii* statt, konnte jedoch nicht genau quantifiziert werden.

Abschliessend lässt sich sagen, dass Antibiotika-Resistenzen in Listerien-Stämmen, welche in den letzten sieben Jahren in der Schweiz isoliert wurden, selten auftreten (3.1%). Dies entspricht den Aussagen früherer Studien aus anderen europäischen Ländern. Jedoch wurde sowohl ein Clindamycin-Resistenzmechanismus, welcher in Gram-positiven Bakterien bisher nicht bekannt ist, als auch das neuartige konjugative Transposon Tn6198 in dieser Studie entdeckt. Zusammen mit dem häufiger auftretenden *tet(M)* Gen, welches in den meisten Fällen mit Transposon Tn916 im Zusammenhang stand, zeigt sich, dass diverse übertragbare Resistenzelemente in Listerien-Stämmen aus der Schweiz vorhanden sind. Unter Berücksichtigung der aktuellen Zunahme von Listeriose-Fällen, bekräftigen die Erkenntnisse dieser Studie den Bedarf einer flächendeckenden Überwachung von *L. monocytogenes* und den weiteren *Listeria*-Spezies. Ausserdem müssen die richtigen Massnahmen ergriffen werden, um sowohl die Entstehung als auch die Verbreitung weiterer Antibiotika-Resistenzen in Bakterien zu verhindern. Solche Massnahmen wären zum Beispiel ein globales Verbot von Antibiotika als Wachstumsförderer, sowie eine regelmässige Optimierung der Behandlungsdauer mit Antibiotika und der verwendeten Dosierung.