

Kamila Beata Muskalska<sup>1\*</sup>, Barbara Szymczak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej,  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wpłynęło w marcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka rodzaju *Listeria*. 2.1. Filogenetyczne pokrewieństwo pomiędzy gatunkami rodzaju *Listeria*. 2.2. Serotypy. 2.3. Geny charakterystyczne dla *Listeria* sp. 2.3.1. Mechanizmy wirulencji *L. monocytogenes*. 2.4. Chorobotwórczość *L. monocytogenes*. 3. Szczepy atypowe. 3.1. Szczepy atypowe wyizolowane z sera. 3.2. Atypowa niehemolityczna *L. seeligeri*. 3.3. Atypowa hemolityczna *L. innocua*. 3.4. *L. marthii*. 3.5. *L. rocourtiae*. 3.6. *L. weihenstephanensis*. 3.7. *L. fleischmannii*. 4. Podsumowanie

### Progress in research on the genus *Listeria*

**Abstract:** The *Listeria*-like atypical strains have been identified in the natural environment and in the food samples lately. In recent times, *Listeria monocytogenes* isolates were characterized for molecular serogroup identification by multiplex PCR. Subsequently, virulence genes were detected. The results of the study show that the presence or absence of some virulence genes depends on the serotype of *L. monocytogenes*. The phylogenetic position and phenotypic character of isolated strains similar to *Listeria* spp. were studied. The atypical strains were examined based on diagnostic tests (hemolysis, CAMP, sugar fermentation, motility at 25°C) commonly used to identify *Listeria*. The isolates were highly similar phenotypically. The *rrs* gene sequence (encoding 16S rRNA) was analyzed in comparison to the genus *Listeria*. 16S rRNA sequencing data showed that these strains belong to the genus *Listeria*, but were different from all other known species. Phylogenetic distance from six known species of the genus *Listeria* indicated that they represent a novel species. The names *Listeria marthii*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis* and *Listeria fleischmannii* were proposed for the four novel species isolated from samples obtained from the natural environment and food. Moreover, the presence of natural atypical hemolytic *Listeria innocua* strains and natural atypical nonhemolytic *Listeria seeligeri* isolates was observed. These strains differed from known *L. innocua* and *L. seeligeri* in only one of the *hly* gene.

1. Introduction. 2. Characterization of the genus *Listeria*. 2.1. Phylogenetic relation between species of the genus *Listeria*. 2.2. Serotypes. 2.3. The specific genes of the *Listeria* sp. 2.3.1. Mechanisms of virulence of *L. monocytogenes*. 2.4. Diseases associated with *L. monocytogenes*. 3. Atypical strains. 3.1. Atypical strains isolated from cheese. 3.2. Atypical nonhemolytic *L. seeligeri* strains. 3.3. Atypical hemolytic *L. innocua* strains. 3.4. *L. marthii*. 3.5. *L. rocourtiae*. 3.6. *L. weihenstephanensis*. 3.7. *L. fleischmannii*. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** nowe gatunki, rodzaj *Listeria*, serotyp, szczepy atypowe

**Key words:** new species, genus of *Listeria*, serotype, atypical strains

## 1. Wstęp

Od końca lat '80 pojawiło się wiele publikacji dotyczących patogenności *Listeria monocytogenes*. Prowadzone badania analizowały korelację określonego serotypu *L. monocytogenes* z obecnością genów wirulencji. Okazało się bowiem, że nie wszystkie szczepy tego gatunku mają geny patogenności.

Nowym aspektem badań związanym z rodzajem *Listeria* było również wyizolowanie listeriopodobnych szczepów atypowych z prób żywności oraz ze środowiska naturalnego. Morfologia i pewne cechy biochemiczne szczepów wskazywały na ich przynależność do rodzaju *Listeria*. Mikroorganizmy te posiadały jednak unikatowe i odmienne właściwości, które nie pozwalały na ich klasyfikację do konkretnego gatunku *Listeria*.

Identyfikacja wyizolowanych szczepów atypowych opierała się na wykorzystaniu metod biochemicznych pozwalających na szczegółowe określenie cech fenotypowych bakterii, jak również na analizie genotypu badanych szczepów [1, 22, 23, 35, 50, 59, 60].

Kilka z wyizolowanych szczepów atypowych sklasyfikowano jako nowe gatunki *Listeria* [1, 22, 23, 35]. Pojawiły się również szczepy, których analiza wykazała przynależność do dwóch znanych już gatunków *Listeria*. Szczepy te cechowały się jednak atypową zdolnością do hemolizy [59, 60].

## 2. Charakterystyka rodzaju *Listeria*

*L. monocytogenes* po raz pierwszy została opisana przez Murray'a w 1926 roku [44]. Oficjalne odkrycie bakterii przypada jednak na rok 1924, kiedy to z chorujących na posocznice królików i świńek morskich wyizolowano nieznaną dotychczas drobnoustroje [4]. Murray początkowo określił wyodrębniony mikroorganizm jako *Bacterium monocytogenes*. Dopiero w 1940 roku Harvey Pirie zmienił nazwę rodzaju na *Listeria* [24].

Do 1961 roku *L. monocytogenes* była jedynym przedstawicielem *Listeria* sp., który do tego czasu uważany był za rodzaj monotypowy. W kolejnych latach do

\* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Papieża Pawła VI 3, 71-459 Szczecin; tel./fax 91 449 65 40; e-mail: kamila.muskalska@zut.edu.pl

*Listeria* sp. dołączały *Listeria denitryficans* (1961), *Listeria grayi* (1966), *Listeria murrayi* (1971). *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* oraz *Listeria seeligeri* zostały dodane do rodzaju w 1983 roku [16]. *Listeria ivanovii* została włączona jako ostatnia w 1985 roku. Rozdzielono ją następnie na dwa podgatunki *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* i *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* [22]. Jednak dalsze badania zarówno genotypowe jak i fenotypowe dokonały kolejnych weryfikacji. W konsekwencji *L. murrayi* włączono do gatunku *L. grayi*, a *L. denitryficans* została zaklasyfikowana do nowego rodzaju *Jonesia*, w wyniku czego przyjęła nazwę *Jonesia denitryficans* [39]. W wyniku powyższych zmian, aż do niedawna wśród rodzaju *Listeria* wyróżnić można było sześć gatunków: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* oraz *L. grayi* [59].

Wszystkie mikroorganizmy zaklasyfikowane do rodzaju *Listeria* to Gram-dodatnie krótkie pałeczki o długości 1,2 µm i szerokości 0,5 µm [4, 40], które zazwyczaj występują pojedynczo lub tworzą krótkie łańcuszki [40]. Mogą również organizować się w skupiska palisadowe i przyjmować kształt liter V i Y [51]. *Listeria* spp. nie wytwarzają spor ani otoczki. Są to mikroorganizmy względnie beztlenowe oraz psychrotrofowe [2], rosną w szerokim zakresie temp. 0–45°C oraz przy pH 6–9 [23]. Najlepiej rozwinięte zdolności adaptacyjne posiada *L. monocytogenes*, która wzrasta również w temperaturze –2°C oraz przy pH sięgającym do 4,4. Natomiast całkowita inaktywacja bakterii tego gatunku obserwowana jest dopiero w temperaturze powyżej 75°C [61]. Cechą identyfikacyjną wszystkich gatunków *Listeria* jest zdolność do ruchu w temp. 25°C [38], jak również fakt, iż są katalazo-dodatnie oraz oksydazo-ujemne [23]. Gatunki *Listeria* różnią się natomiast zdolnością do fermentacji cukrów oraz właściwościami litycznymi w stosunku do erytrocytów różnych gatunków zwierząt m.in. końskich, owczych [30], króliczych jak również człowieka [40]. Stanowi to podstawę do odróżniania gatunków hemolitycznych od pozostałych niehemolitycznych [59].

Wszystkie bakterie z rodzaju *Listeria* a w szczególności *L. monocytogenes* tolerują ekstremalne warunki takie jak: niskie pH, niska temperatura oraz wysokie zasolenie. Te właściwości powodują, że są one szeroko rozpowszechnione w wielu naturalnych i miejskich środowiskach [23]. Można wyizolować je z różnych biocenoz [59] m.in. z gleby, ścieków, wody, pasz tzw. kiszonek czy produktów spożywczych [28].

W rutynowej procedurze identyfikacji szczepów bakteryjnych pod względem ich przynależności do określonego gatunku stosuje się metody fenotypowe, wśród których wykorzystywane są m.in. testy API *Listeria*, jak i niekiedy metody genetyczne oparte na reakcji PCR [35].

Co więcej szczepy bakterii należące do *Listeria* sp. charakteryzują się określonym serotypem [28, 37] oraz

posiadają typowe dla siebie warianty genów. Determinują one zarówno przynależność szczepów do jednego z sześciu występujących gatunków [5], jak również pozwalają na określenie pokrewieństwa pomiędzy gatunkami [12, 22].

## 2.1. Filogenetyczne pokrewieństwo pomiędzy gatunkami rodzaju *Listeria*

Gatunki *Listeria* wykazują między sobą różny stopień pokrewieństwa. Obecnie wyróżnia się dwa kłady zawierające odpowiednie gatunki bakterii. Pierwszy z kładów składa się z *L. monocytogenes* i *L. innocua* a drugi obejmuje *L. seeligeri*, *L. ivanovii* oraz *L. welshimeri*. Oba kłady zawierają zarówno przedstawicieli gatunków posiadających odpowiednie warianty klastra genów wirulencji tj. *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* i *L. seeligeri* jak również te gatunki, które go nie mają tj. *L. innocua* i *L. welshimeri* [12]. Ciekawy jest fakt, że klastery genów wirulencji ma tę samą lokalizację genomową, pomimo iż bakterie należą do dwóch różnych kładów [22].

Interesujące jest również, że istnieje bliskie pokrewieństwo pomiędzy gatunkami patogennymi i niepatogennymi. Chorobotwórcza *L. monocytogenes* jest najbliższa filogenetycznie z niejadliwą *L. innocua*. Natomiast patogenna *L. ivanovii* z *L. seeligeri*, która pomimo posiadanego klastra wirulencji uważana jest za formę niepatogenną. Może być to związane z brakiem innych nieznanych jeszcze czynników, które wpływają na zdolności chorobotwórcze *L. seeligeri* [12].

Prowadzone badania filogenetyczne sugerują więc obecność wspólnego przodka dla obu wymienionych kładów. Przodek ten posiadał klastery genów wirulencji, po czym wystąpiły dwie niezależne delecje, które doprowadziły do straty powyższego klastra genów u pozostałych niepatogennych członków obu kładów.

Status *L. grayi* jest do tej pory nieokreślony [22]. Wiadomo jedynie, iż jest najbardziej odległa filogenetycznie od pozostałych gatunków *Listeria* [12].

## 2.2. Serotypy

Szczepy bakteryjne należące do określonych gatunków rodzaju *Listeria* różnią się dodatkowo między sobą determinantami antygenowymi znajdującymi się na powierzchni komórki. Różnice antygenowe są wynikiem obecności różnych związków chemicznych takich jak białka błonowe czy kwas lipoteichojowy, które warunkują strukturę błony komórkowej [25]. Takie odmienności pomiędzy szczepami mogą być identyfikowane dzięki wykorzystaniu typowania serologicznego. Pozwala to na bardziej szczegółowy podział *Listeria* spp. ze względu na posiadany serotyp, który określany jest na podstawie ciepło-stabilnego antygeny

somatycznego O (15 podtypów I–XV) oraz ciepło-labilnego antygenu rzęskowego H (4 podtypy A–D) i determinowany ich odpowiednią kombinacją [28].

Początkowo do przeprowadzania serotypowania wykorzystywano przede wszystkim metody immunologiczne, które opierały się na specyficznej reakcji antygen-przeciwciała [56]. W wyniku tego wśród szczepów *L. monocytogenes* wyróżniono 12 serotypów (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e i 7) [37]. Niektóre źródła podają jednak występowanie dodatkowo trzynastego serotypu tj. 4ab [25]. W przypadku *L. seeligeri* wymieniono natomiast 7 serotypów (1/2a, 1/2b, 3b, 4a, 4b, 4c i 6b), jeden w *L. ivanovii* (5) i kilka w *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi* (1/2b, 6a i 6b) [28].

Ze wszystkich serotypów *L. monocytogenes* za najbardziej niebezpieczne dla człowieka uważane są 1/2a, 1/2b i 4b, którym przypisuje się 95% przypadków ludzkiej listeriozy [33, 34]. Z powyższych trzech serotypów 4b jest przyczyną 50% zachorowań w skali światowej [20].

Przeprowadzone badania szczepów bakteryjnych należących do gatunku *L. monocytogenes* wykazały, iż istnieje również zależność pomiędzy ich serotypem a przynależnością do odpowiedniej linii filogenetycznej, którą określano metodami genetycznymi [36]. Jak do tej pory wśród gatunku wyróżniono 3 odrębne linie ewolucyjne. Klasyfikację przeprowadzono na podstawie różnic w sekwencji nukleotydowej 3 genów: *flaA* (kodujący flagelinę), *iap* (kodujący p60) i *hly* (kodujący LLO) [29]. Co więcej każdej linii filogenetycznej przyporządkowano odpowiednie serotypy [10, 13, 53].

Po raz pierwszy podziału takiego dokonał Piffaretti i wsp., w 1989 roku, kiedy to badał powiązania genetyczne wśród wyizolowanych szczepów *L. monocytogenes*. Wyodrębnił on wówczas dwie linie filogenetyczne I i II do których przyporządkował następujące serotypy 1/2b, 4b, 4a do linii ewolucyjnej I, natomiast 1/2c i /2a do II [48]. Wielu autorów kolejnych publikacji opiera się właśnie na niniejszym podziale, uzupełniając go w kolejne serotypy oraz wprowadzając zmiany m.in. w postaci dodania kolejnej trzeciej linii ewolucyjnej [10, 46].

Tabela I

Podział *L. monocytogenes* na 5 grup serotypowych w zależności od linii filogenetycznej

Linia filogenetyczna	I	II	III
Grupa serotypowa	(1/2b; 3b; 7)	(1/2a; 3a)	(4a; 4c)
	(4b; 4d; 4e)	(1/2c; 3c)	

W tabeli pogrubieniem zaznaczono serotypy będące najczęstszą przyczyną ludzkiej listeriozy.

Powyższy podział przyjmowany jest obecnie jako najbardziej poprawny. Jednakże istnieje również inny, który w 2004 wprowadził Doumith. Wykorzystując

metodę multiplex PCR, *L. monocytogenes* została podzielona przez niego na 5 grup serotypowych skorelowanych z odpowiednią linią ewolucyjną [13].

Tabela II

Podział *L. monocytogenes* na 5 grup serotypowych zastosowany w metodzie multiplex PCR

Linia filogenetyczna	I	II	III
Grupa serotypowa	(1/2a; 3a)	(1/2b; 3b; 7)	(4a; 4c)
	(1/2c; 3c)	(4b; 4d; 4e)	

W tabeli pogrubieniem zaznaczono serotypy będące najczęstszą przyczyną ludzkiej listeriozy.

Ostatnio pojawiają się jednak publikacje informujące o wyodrębnieniu wśród linii filogenetycznej III trzech podgrup tj. IIIA, IIIB, IIIC, z których IIIB w istotnym stopniu odróżnia się od dwóch pozostałych [10]. Stanowi to podstawę do utworzenia kolejnej IV grupy filogenetycznej [10, 53]. Okazuje się również, że przebadane szczepy w zależności od swojego serotypu mogą posiadać lub być pozbawione określonych genów kodujących wirulencję *L. monocytogenes* [53].

### 2.3. Geny charakterystyczne dla *Listeria* sp.

Wszystkie gatunki *Listeria* posiadają gen *rrs* kodujący 16S rRNA [35]. Analiza tego genu pozwala na określenie przynależności rodzajowej dzięki stwierdzeniu obecności produktu o długości 938 pz [3]. Sekwencja 16S rRNA pozwoliła w przeszłości ostatecznie ustalić odrębność rodzaju *Listeria* od pozostałych blisko spokrewnionych rodzajów bakterii m.in. *Brochothrix* sp. [51]. Obecnie pierwszym etapem identyfikacji genetycznej, jaką przeprowadza się w celu określenia przynależności bakterii do *Listeria* sp. jest właśnie analiza sekwencji 16S rRNA. Na tej podstawie ustalany jest stopień pokrewieństwa z pozostałymi gatunkami [1, 22, 23, 35, 50, 59, 60].

Istotną częścią genomu bakterii *Listeria* jest również obecność lub brak wspomnianego wcześniej klastra genów wirulencji [22], określanego także wyspą patogenności *Listeria* tzw. LiPI (*Listeria* Pathogenicity Island) [12]. Wśród genów klastra, *prfA* stanowi plejotropowy regulator wirulencji [28], którego produkt aktywuje transkrypcję wszystkich genów LiPI tj. *hly*, *plcA*, *mpl*, *actA* i *plcB* [41]. Geny klastra kodują białka niezbędne bakteriom do przeżycia wewnątrz komórek oraz umożliwiające im przemieszczanie się w obrębie tkanek [12].

Wśród genów wyspy patogenności *Listeria* bardzo ważny jest gen *hly* kodujący hemolizynę. Gen warunkujący hemolizytność *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* i *L. seeligeri* zlokalizowany jest pomiędzy genami *prs* i *ldh*. Brak niniejszego genu w genomie *L. innocua*,



*L. welshimeri* oraz *L. grayi* czyni je gatunkami niehemolitycznymi [59]. Z trzech gatunków posiadających gen *hly* tylko dwa są chorobotwórcze: *L. monocytogenes* (dla człowieka i zwierząt) i *L. ivanovii* (dla zwierząt). *L. ivanovii* jest patogenem zwierzęcym w szczególności infekującym bydło [23] i owce [22]. Uważany za niepatogenny dla człowieka był jednak przyczyną pojedynczych zakażeń u ludzi [12].

Pozostałe geny należące do LiPI to *plcA* i *plcB* kodują dwie fosfolipazy, gen *mpl* metaloproteazę, a gen *actA* białko warunkujące polimeryzację włókien aktynowych. Wymienione białka pozwalają na wydostanie się z fagosomu komórki żywiciela i rozprzestrzenianie międzykomórkowe.

Druga grupa genów jest odpowiedzialna za kodowanie białek z rodziny internalin w zakażonych tkankach, stanowi co najmniej 27 różnych białek, a każdego roku opisywanych jest kilka nowych. Występują one zarówno u patogennych jak i niepatogennych gatunków *Listeria*. Wśród nich wymienić można geny związane ze zdolnością do wirulencji tj. *inlA* i *inlB* kodujące białka odpowiedzialne za inwazję komórek różnych typów [12] oraz gen *inlC* i *inlJ* [53].

Charakterystycznym dla wszystkich gatunków genem jest również *iap*. Posiada on konserwatywny region na końcach 5' i 3', taki sam dla wszystkich przedstawicieli *Listeria* spp. Domeną różnicującą *iap* u poszczególnych gatunków jest jego specyficzny region zlokalizowany w centralnej części genu [5]. Gen *iap* jest również czynnikiem warunkującym wirulencję i patogenność u *L. monocytogenes* [28] dzięki kodowanemu zewnątrzkomórkowemu białku p60 (invasion-associated protein) [63]. Oprócz udziału w procesie wirulencji białko p60 jest odpowiedzialne za przeprowadzenie prawidłowego podziału komórkowego dzięki aktywności hydrolazy mureiny [6, 52].

Cechą charakterystyczną genu *iap* u *L. monocytogenes* jest domena, która składa się z tandemu powtarzających się sekwencji (TRS): ACAAAT. Domena ta koduje centralną część białka p60, odpowiadając kolejno dwóm aminokwasom takim jak: treonina i asparagina. Fakt ten wykorzystuje się do wykrywania różnic pomiędzy szczepami *L. monocytogenes* [11].

### 2.3.1. Mechanizmy wirulencji *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes* jest wewnątrzkomórkowym patogenem, który ma zdolność pokonywania trzech głównych barier w organizmie ludzkim: bariery jelitowej, bariery łożyskowej oraz bariery krew-mózg. Bakterie tego gatunku potrafią wnikać do różnego typu komórek niefagocytujących oraz przemieszczać się w tkankach w wyniku przechodzenia z komórki do komórki [58].

Pierwszą przeszkodą, z którą spotyka się *L. monocytogenes* jest wysoce kwasowe środowisko (pH 2,0)

żołądka żywiciela oraz obecność soli kwasów żółciowych. Zdolność *L. monocytogenes* do przeżycia i przejścia przez stadium żołądkowe jest możliwa, dzięki obecności białkowej podjednostki polimerazy RNA (RNAP) – alternatywny czynnik sigma  $\sigma^B$  (kodowany przez *sigB*). Reguluje on geny chroniące bakterie przed stresem tj.: *opuCA*, *lmo1421*, *bsh* oraz związane z nimi białka. Bez poprawnie funkcjonującego genu *sigB*, przeżywalność *L. monocytogenes* w warunkach stresowych jest znacznie osłabiona.

W kolejnym, jelitowym etapie infekcji *L. monocytogenes* przylega i wnika do komórek żywiciela w sposób bierny dzięki procesowi fagocytozy, jak i aktywnie przez działanie listeriowych białek powierzchniowych tj. internalin, wśród których najbardziej znaczące i najlepiej scharakteryzowane są internalina A (InlA) i internalina B (InlB) [38]. Dwa inne białka z tej samej rodziny: InlC i InlJ kodowane przez geny *inlC* i *inlJ* odgrywają znacznie mniejszą rolę od InlA i InlB. Geny te określane są jako jedne z bardziej istotnych markerów wirulencji [53]. Delecja w genie *inlC* lub *inlJ* znacznie osłabia zdolności patogenne *L. monocytogenes* [38].

Po wnikięciu bakterii do komórki gospodarza jest ona zamykana w pęcherzyku fagocytarnym, z którego uwalnia się przechodząc do cytoplazmy. Ucieczka *L. monocytogenes* jest możliwa dzięki obecności molekuł związanych z procesami wirulencji tj.: listeriolizynie O (LLO) kodowanej przez gen *hly*, oraz dwóm fosfolipazom kodowanym przez geny *plcA* i *plcB*, jak również pomocniczej metaloproteazie. Należy podkreślić, że gen *hly* odgrywa bardzo istotną rolę w patogenie *L. monocytogenes*, ponieważ szczepy posiadające mutację tego genu nie są chorobotwórcze [38].

Przedostawaniu się *L. monocytogenes* do kolejnych komórek oraz rozprzestrzenianiu infekcji w obrębie organizmu gospodarza sprzyja obecności powierzchniowego białka ActA odpowiedzialnego za zdolność do ruchu [38] (Tab. III).

Ostatnie badania wskazują na obecność kolejnego czynnika wirulencji jakim jest nowoodkryty peptyd hemolityczny – listeriolizyna S (LLS) [9]. Prowadzone doświadczenia sugerują, że LLS odgrywa rolę w przeżywalności *L. monocytogenes*, ponieważ warunkuje odporność względem granulocytów obojętnochłonnych przez co podnosi potencjał chorobotwórczy bakterii.

Wytwarzanie LLS związane jest ze stresem oksydacyjnym, co sugeruje iż peptyd ten może poprawiać zdolności LLS-pozytywnych szczepów *L. monocytogenes* do ucieczki z fagosomu lub makrofagów, jak również może to stanowić kluczowy element jeśli chodzi o patogenność bakterii [8]. Należy zaznaczyć, że LLS nie jest tak rozpowszechniona jak LLO i jest ograniczona do linii I linii ewolucyjnej.

Jak na razie nie sprawdzono całej puli genów wirulencji, lecz tylko wybrane czynniki. Pozwoliło to jed-

Tabela III  
Geny wirulencji *L. monocytogenes* i funkcja kodowanych białek

Gen	Funkcja kodowanego białka
<i>iap</i>	P60 umożliwia adhezję bakterii do komórek gospodarza [5].
<i>inlA</i>	InlA oddziałuje z E-kadheryną, prowadząc do rearanżacji cytoszkieletu i fagocytozy przez internalizację do komórek nabłonka jelita [38].
<i>inlB</i>	InlB reaguje z receptorami Met i Clq, umożliwiając internalizację hepatocytów, fibroblastów oraz komórek nabłonka [38].
<i>inlC, inlJ</i>	InlC i InlJ odgrywają rolę w późniejszych pozajelitowych stadiach infekcji [38].
<i>hly</i>	LLO pozwala na przejście z fagosomu [26] do cytoplazmy, dzięki lizie błony pęcherzyka fagocytarnego [39].
<i>plcA, plcB</i>	PlcA i PlcB wspomagają LLO w lizie błony wakuolarniej i ułatwiają ucieczkę z fagosomu [38].
<i>mpl</i>	Mpl aktywuje białko PlcB [62].
<i>atcA</i>	AtcA pozwala na migrację <i>L. monocytogenes</i> do sąsiednich komórek, dzięki ogonowi aktynowemu [38].

W tabeli w nawiasach kwadratowych podano pozycje cytowanego piśmiennictwa.

nak wnioskować, że odpowiednie serotypy różnicują bakterie pod względem posiadanych genów zjadliwości. Szczególnie ubogie w geny wirulencji zdają się być szczepy należące do trzeciej linii ewolucyjnej o serotypie 4a i 4c, które to charakteryzują się często brakiem *inlJ*, *inlC*, *iap* czy LLS. Może to stanowić powód do polemiki nad ich zdolnościami chorobotwórczymi, pomimo iż należą do potencjalnie chorobotwórczego gatunku [37, 46, 53].

#### 2.4. Chorobotwórczość *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes* jest odpowiedzialna za wywołanie tzw. listeriozy [31]. Bakteria infekuje wątrobę i trzustkę, obecna jest w płynie mózgowo-rdzeniowy oraz we krwi [57]. Do zakażeń dochodzi w wyniku spożycia zanieczyszczonej bakteriami żywności [55]. Częste są również zakażenia płodów i noworodków od matki [49].

*L. monocytogenes* może być przyczyną zachorowań wśród zdrowych dorosłych [57] i osób z grupy wysokiego ryzyka tzw. YOPI (Young, Old, Pregnant, Immunocompromised) wśród których wymienia się: osoby starsze, kobiety w ciąży, osoby z osłabionym układem odporności [43], alergicy, chorzy po przeszczepach, diabetycy, dzieci [61], noworodki lub niemowlęta w wieku okołoporodowym [28]. W zależności od podatności organizmu ludzkiego listerioza może mieć różnoraki przebieg [57].

Ok. 20% wszystkich zachorowań na listeriozę dotyczy osób dorosłych [33]. Choroba występuje u nich głównie w formie łagodnej zwykle bez objawów lub z objawami grypopodobnymi. Obserwuje się także postać jelitową z bólem brzucha i biegunką [42]. Szczególnie niebezpieczne są przypadki, w których choroba przybiera postać ostrą w postaci bakteriemii czy zapalenia opon mózgowych [43]. Większość potwierdzonych zachorowań dotyczy osób powyżej 65 roku życia.

U ludzi z obniżoną odpornością chorujących na nowotwory, cukrzycę, HIV/AIDS, choroby wątroby czy będących po przeszczepie, przebieg listeriozy jest zazwyczaj ciężki. Choroba objawia się w postaci posocznicy, zapalenia opon mózgowych oraz bardzo poważnych infekcji atakujących centralny układ nerwowy [57].

Listerioza jest szczególnie niebezpieczna dla kobiet w ciąży [15], stanowi bowiem duże zagrożenie poronieniem, urodzeniem martwego lub zarażonego dziecka, jak również przedwczesnych narodzin [49]. Noworodki zainfekowane *L. monocytogenes* chorują na zapalenie płuc, sepsę i zapalenie opon mózgowych.

*L. monocytogenes* jest mikroorganizmem groźnym nie tylko dla populacji ludzkiej. Bakteria wywołuje bowiem zachorowania również u zwierząt [57]. Przyczyną listeriozy zwierzęcej jest przede wszystkim *L. monocytogenes*, a stosunkowo rzadko *L. ivanovii*. Listerioza notowana jest często u przeżuwaczy (bydło, kozy, owce). Zostają one zainfekowane w wyniku spożycia zanieczyszczonych kiszzonek, w których patogen może przeżyć ponad 2 lata. Bakteria może również rozmnażać się w kiszczonkach, gdy ich pH przekracza 5. U wszystkich gatunków zakażenie może doprowadzić do zapalenia łożyska i macicy, być przyczyną roniń, przedwczesnych porodów oraz śmierci płodu. Noworodki, które przeżyją stają się nosicielami bakterii. U bydła rzadko występują objawy kliniczne w postaci posocznicy czy zapalenia mózgu, częste natomiast są poronienia w 4–7 miesiącu ciąży.

Oprócz zwierząt przeżuwających również trzoda chlewna może ulec infekcji. W tym wypadku do zakażeń dochodzi drogą pokarmową, oddechową czy przez spojówkę oczu. U trzody chlewnej mogą występować zakażenia bezobjawowe, ale także posocznica czy postać nerwowa. Zdarza się, że jedynym objawem listeriozy mogą być ronięcia.

Na infekcję narażone są również psy, koty, drób, ptaki, ryby, owady, kleszcze, skorupiaki i ostrygi. Ze względu na wysokie niebezpieczeństwo związane

z infekcją *L. monocytogenes*, listerioza jest w Polsce chorobą podlegającą obowiązkowemu rejestrowi [21].

Pierwsze udokumentowane przypadki ludzkiej listeriozy przenoszonej drogą pokarmową sięgają 1981 roku. W jednej z prowincji w Kanadzie doszło tam do zakażenia 7 osób dorosłych i 34 dzieci w okresie okołoporodowym. Przyczyną zachorowań była sałatka tzw. coleslaw, a źródło zakażenia stanowiła *L. monocytogenes* obecna w magazynowanej kapuście. Istnieją również wcześniejsze doniesienia o zakażeniach, pochodzące z 1979 roku. Wówczas zachorowały 23 osoby. Epidemia ta była związana ze spożyciem sałatki z surowych warzyw takich jak: seler, pomidor i sałata. Źródłem zanieczyszczenia bakteriami *L. monocytogenes* była sałata [17].

Obecnie listerioza uważana jest za chorobę poważną [33], ponieważ cechuje się wysokim poziomem śmiertelności 20–30% [15]. W państwach Unii Europejskiej odsetek chorych na listeriozę wzrósł o 19,1% porównując rok 2008 i 2009. W 2009 roku odnotowano 1601 zachorowań, poziom ten utrzymywał się również w 2010 roku. W 2009 roku *L. monocytogenes* doprowadziła do 270 zgonów [33]. Natomiast w Stanach Zjednoczonych mikroorganizm ten był przyczyną 2500 zachorowań, 2289 hospitalizacji i 449 zgonów [33, 43]. W 2011 roku wybuchła w USA epidemia listeriozy spowodowana spożyciem melona kantalupa, która przyniosła 146 zachorowań, 29 zgonów i 1 poronienie [53]. Listerioza stanowi więc jedną ze śmiertelnych chorób przenoszonych drogą pokarmową odnotowywanych na terenie Stanów Zjednoczonych czy krajów Unii Europejskiej [33, 53].

W Polsce w oparciu o dane z Meldunków Rocznych NIZP-PZH/GIS dotyczących zachorowań na choroby zakaźne i zatrucia, rejestruje się również przypadki zachorowań na listeriozę. Dokumenty te obrazują występowanie choroby w latach 1970–2009. Największa liczba zachorowań miała miejsce w roku: 1979 (32 zachorowań), 1977 (26 zachorowań) oraz 1978 (25 zachorowań). Natomiast w roku 1986 i 1990 nie odnotowano żadnych wystąpień ludzkiej listeriozy. Kolejne częste pojawienie się choroby zarejestrowano dopiero w roku 2002 (31 zachorowań), 2005 (22 zachorowań), 2006 (28 zachorowań) i w 2007 (43 zachorowań). Łącznie w latach 1970–2008 na terenie Polski odnotowano 371 przypadków listeriozy, z czego 289 osób było hospitalizowane, a 16 chorych zmarło [18]. Istotny jest fakt, że opisywane zachorowania stanowią w Polsce głównie odosobnione przypadki. Jak do tej pory w ramach prowadzonego w Polsce nadzoru sanitarnego zgłoszono dwa niewielkie ogniska zatruc pokarmowych, jedno w roku 2005 a drugie w 2010 [32].

Wysoki poziom zachorowań na listeriozę związany jest z powszechnym występowaniem *L. monocytogenes* w środowisku, a co za tym idzie ze skażoną żywnością [33]. Z tego względu istnieje obowiązek badania

produktów spożywczych pod względem obecności powyższego patogenu. Amerykańska Agencja Żywności i Leków ogłosiła bowiem „zero tolerancji” (< 1 organizm na 25 g próby) dla *Listeria* spp. w żywności [7]. Niniejsza norma obowiązuje także w Polsce i innych krajach Unii Europejskiej.

*L. monocytogenes* w stosunkowo dużych ilościach obecna jest w określonych grupach żywności takich jak: miękkie sery, sery pleśniowe, pasztety, niepasteuryzowane mleko [33], lody [54], różne typy mięsa takie jak: fermentowane wędliny, parówki, hot-dogi [33], indyk, szynka RTE (ready-to-eat) [45] czy produkty pochodzenia morskiego [61] m.in. wędzone na zimno lub na ciepło łososie, krewetki, małże, marynaty, sałatki rybne [55]. *L. monocytogenes* znajduje się również w wielu rodzajach warzyw [43], owocach [14] oraz sokach owocowych [54].

Dokładna identyfikacja mikroorganizmów wyizolowanych z żywności czy środowiska odgrywa zatem istotną rolę. Badania takie oprócz wykrycia lub wykluczenia obecności *L. monocytogenes*, pozwalają również na wyizolowanie szczepów o nowych nietypowych cechach, które mogą być groźne dla zdrowia człowieka.

### 3. Szczepy atypowe

Szczepy atypowe z definicji są mikroorganizmami nieposiadającymi określonej cechy lub cech charakterystycznych dla danego gatunku, bądź też posiadające nowe odmienne cechy, które odgrywają znaczącą rolę w systematyce.

Doniesienia o występowaniu szczepów posiadających nietypowe właściwości pojawiają się sporadycznie już w starszych publikacjach, lecz traktowane są tam jako anomalia [19].

Jednak dopiero od niedawna udaje się wyizolować listeriopodobne szczepy atypowe, które pomimo wysokiego podobieństwa do poznanych już gatunków nie wykazują przynależności do żadnego z nich.

Obecnie ukazały się publikacje, które informują o pojawianiu się takich mikroorganizmów [1, 22, 23, 35, 50, 59, 60]. Kilka z wyizolowanych szczepów atypowych sklasyfikowano już jako nowe gatunki *Listeria*, kolejno dołączały *Listeria marthii* [22], *Listeria rocourtiae* [35], *Listeria weihenstephanensis* [23] oraz *Listeria fleischmannii* [1], jak również pojawiły się szczepy charakteryzujące się atypową zdolnością do hemolizy tj.: niehemolityczna *L. seeligeri* [59] oraz hemolityczna *L. innocua* [60].

Pierwsze doniesienia o występowaniu listeriopodobnych szczepów atypowych zostały opublikowane w 1998 roku. Szczepy wyizolowano podczas rutynowej analizy mikrobiologicznej sera na obecność *L. monocytogenes*. Z dwóch gatunków serów: miękkiej z czerwonym przerostem oraz miękkiej dojrzewającej ser pleś-



niowy pozyskano cztery szczepy (MB417, MB419, MB421, MB422).

Fenotypowo bakterie różniły się tylko jedną cechą w stosunku do pozostałych gatunków *Listeria*, nie wykazywały one bowiem zdolności do ruchu w temp. 25°C.

Analiza sekwencji genu 16S rRNA wykazała homologię szczepów atypowych na poziomie 94% w stosunku do pozostałych gatunków *Listeria*. Badania potwierdziły, że wyizolowane mikroorganizmy należą do odrębnego taksonu, bardziej spokrewnionego z rodzajem *Listeria* niż z *Brochothrix* sp.

Dalsze badania zdecydowały czy powyższe szczepy atypowe utworzą osobny taksonomicznie rodzaj czy zostaną zaklasyfikowane jako nowy gatunek *Listeria* [50].

### 3.1. Atypowa niehemolityczna *L. seeligeri*

Kolejne informacje o pojawieniu się szczepów atypowych *Listeria* ukazały się w 2006 roku. Z prób z żywności tj. surowego mleka i mięsa z krabów oraz z prób środowiskowych pochodzących ze słonych bagien, ujęć wody oraz osadu, wyizolowano siedem szczepów (LS159, LS165, LS160, SE107, SE116, LS166, 2436KA).

Przeprowadzone testy wskazywały na jeden z gatunków należących do *Listeria*. Ze względu na fakt, że badane szczepy nie wykazywały zdolności do lizy erytrocytów, wykluczono ich przynależność do hemolitycznych *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* i *L. ivanovii*. Badane szczepy nie powodowały rozkładu L-ramnozy i mannitolu, natomiast fermentowały D-ksylozę. Cechy fenotypowe mikroorganizmów sugerowały, iż są to przedstawiciele gatunku *L. welshimeri*.

Dopiero analiza genetyczna oparta na hybrydyzacji z wykorzystaniem mikromacierzy DNA oraz zsekwencjonowaniu genów *iap*, *prfA* i 16S rRNA pozwoliła na prawidłową klasyfikację badanych bakterii. W wyniku wykonanych badań okazało się, iż są to atypowe niehemolityczne szczepy *L. seeligeri*, a powodem braku genu *hly* była delecja w centralnej części klastra genów wirulencji [59].

### 3.2. Atypowa hemolityczna *L. innocua*

Rok później opublikowano kolejne badania dotyczące listeriopodobnych szczepów atypowych. Wówczas z prób żywności wyizolowano bakterie, które sklasyfikowano jako atypowy gatunek *L. innocua* z niespecyficzną dla siebie zdolnością do przeprowadzania hemolizy.

Szczepy posiadały w swoim genomie klastry genów analogiczny do wyspy patogenności LiPI występując m.in. u *L. monocytogenes*. Obecność klastra z genem *hly* determinowała zdolności hemolityczne badanych bakterii. Dalsza analiza genetyczna pozyskanych szczepów nie wykazała jednak obecności innych genów wirulencji specyficznych dla *L. monocytogenes*.

Pojawienie się atypowych hemolitycznych szczepów *L. innocua* sugeruje, że *L. monocytogenes* oraz *L. innocua* musiały posiadać i wywodzić się od wspólnego przodka [60].

### 3.3. *L. marthii*

W 2010 roku ukazały się kolejne doniesienia o szczepach atypowych, które zostały sklasyfikowane jako nowy gatunek *Listeria*. Cztery listeriopodobne szczepy (FSL S4-120T, FSL S4-696, FSL S4-710, FSL S4-965) pochodziły z naturalnego środowiska jezior Finger znajdujących się na terenie Parku Narodowego w Nowym Jorku. Szczepy atypowe zostały wyizolowane z próbek gleby, wody płynącej oraz stojącej na terenie parku.

Bakterie fenotypowo przypominały rodzaj *Listeria*. Były to Gram-dodatnie, względnie beztlenowe, zdolne do ruchu w temp. 25°C, niehemolityczne oraz niewytwarzające spor pałeczeki.

Przeprowadzona analiza sekwencji genu 16S rRNA wykazała bliskie filogenetyczne pokrewieństwo z *L. monocytogenes* (99,3–99,8%) i *L. innocua* (99%) oraz bardziej odległe relacje z *L. welshimeri*, *L. seeligeri* i *L. grayi*. Kolejno wykonano hybrydyzację DNA, która wykazała stosunkowo dużą różnicę pomiędzy szczepami atypowymi a *L. monocytogenes* oraz *L. innocua*.

Ostatecznie opierając się na cechach fenotypowych oraz na genotypowej odrębności od *L. monocytogenes* i *L. innocua*, cztery wyizolowane szczepy zostały sklasyfikowane jako nowy gatunek tj. *L. marthii*. Mikroorganizm ten określony jest jako niepatogenny, do tej pory niepowiązany z występowaniem chorób u ludzi czy zwierząt [22].

### 3.4. *L. rocourtiae*

W tym samym roku opisano również kolejny gatunek *L. rocourtiae*, który wyizolowano z sałaty w austriackim laboratorium w Salzburgu. Scharakteryzowanie tego szczepu dało podstawy do wyodrębnienia go jako nowego gatunku *Listeria*.

Badany szczep wykazywał cechy charakterystyczne dla rodzaju *Listeria*. Była to Gram-dodatnia, nie wytwarzająca spor pałeczka, która cechowała się zdolnością do ruchu oraz obecnością katalazy. Względnie beztlenowy i niehemolityczny szczep atypowy wykazywał wzrost tylko na jednym z użytych podłoży chromogennych. Tworzone przez niego kolonie na podłożu Rapid' *L. mono* były białe i otoczone żółtym halo, co świadczyło, iż nie posiada on enzymu PIPLC, ale cechuje się zdolnością do metabolizmu ksylozy.

Analiza genetyczna sekwencji genu *rrs* (kodującego 16S rRNA) wykazała przynależność szczepu do rodzaju *Listeria*, a badania filogenetyczne ostatecznie potwierdziły obecność odrębnego gatunku. Szczep nazwano

*L. rocourtiae* w celu upamiętnienia francuskiego biologa Jocelyne Rocourt, który specjalizował się w systematyce *Listeria*.

Na podstawie analizy hodowli komórkowej i badaniach przeprowadzonych na myszach szczep ostatecznie został oznaczony jako awirulentny [35].

### 3.5. *L. weihenstephanensis*

Najnowsza publikacja z 2013 roku opisała kolejne dwa listeriopodobne szczepy atypowe wyizolowane z rzęsy trójrowkowej *Lemna trisulca* (roślina wodna), która została pobrana ze stawu wodnego w Bawarii.

W wyniku analizy sekwencji 16S rRNA wyizolowanych szczepów okazało się, że wykazują one blisko spokrewnione z nowym gatunkiem tj. *L. rocourtiae* (homologia 22,5%) i są bardziej odległe filogenetycznie od pozostałych gatunków *Listeria*. Ze względu na różnice fenotypowe i genotypowe w stosunku do *L. rocourtiae*, szczepy zostały sklasyfikowane jako nowy gatunek *L. weihenstephanensis*.

*L. weihenstephanensis* to regularne pałeczki o średnicy 0,4–0,5 µm i długości 2–4,5 µm. Nie tworzą spor ani otoczki. Rosną w warunkach beztlenowych oraz wykazują zdolność do ruchu w hodowlach w zakresie temp. 15–30°C. Optymalne parametry dla wzrostu tego gatunku to pH 7–8 oraz temp. 28–34°C, w temp. 38°C obserwuje się brak wzrostu. *L. weihenstephanensis* jest niehemolityczny oraz niepatogenny dla człowieka i zwierząt [23].

### 3.6. *L. fleischmannii*

Następnym niedawno odkrytym i opublikowanym w 2013 roku gatunkiem, który dołączył do rodzaju *Listeria* jest *L. fleischmannii*. W tym przypadku szczepy atypowe pochodziły z sera szwajcarskiego. Pierwsze trzy szczepy (LU2006-1(T), LU2006-2, LU2006-3) wyizolowano z odrębnych prób tego samego rodzaju sera. Kolejno po 5 latach udało się pozyskać jeszcze jeden szczep (A11-3426) o takich samych właściwościach jakie przedstawiali jego poprzednicy.

Cztery „nowo odkryte” szczepy pozyskano z jednakowego rodzaju sera, wzrastającego w tych samych warunkach piwnicznych, co świadczyło o tym, iż badane mikroorganizmy wykazywały cechy adaptacyjne do środowiska, w którym rosły.

Właściwości fenotypowe i chemotaksonomiczne szczepów atypowych świadczyły o ich przynależności do *Listeria* sp. Jednak ich odrębność określona na podstawie hybrydyzacji DNA, nie pozwalała na zaklasyfikowanie ich do żadnego z dotychczas poznanych gatunków.

Ze względu na swoją odmienność bakterie zostały oznaczone jako nowy gatunek *L. fleischmannii*. Szczepy

nie posiadają zdolności do hemolizy oraz nie są chorobotwórcze dla ludzi [1].

## 4. Podsumowanie

Nie wszystkie szczepy *L. monocytogenes* odpowiedzialne są za wywoływanie epidemii listeriozy. Co więcej w żywności występują różne serotypy tego gatunku. Mikroorganizmy o serotypach 3a, 3c, 3b, 7, 4d, 4e izolowane są z niewielką częstotliwością i bardzo rzadko stanowią przyczynę ludzkiej listeriozy. Powszechniej pojawiają się natomiast bakterie o serotypach 1/2a oraz 1/2b, 4b.

Jak wspomniano wcześniej bardzo ważnym aspektem determinującym patogenność szczepów jest dodatkowo posiadanie istotnych markerów wirulencji m.in.: genu *inlC*, *inlJ*, *inlA*, jak również listeriolizyny S. Czynniki wirulencji nie występują jednak u wszystkich szczepów *L. monocytogenes*. Często ich obecność jest powiązana z odpowiednim serotypem mikroorganizmu.

Obowiązujące obecnie normy dla *L. monocytogenes* (w tym polska norma dotycząca żywności ISO 11290-2) nie zawierają obowiązku badania przynależności do określonego serotypu, jak również obecności genów wirulencji. W tej sytuacji aktualne normy eliminują żywność w przypadku stwierdzenia *L. monocytogenes* identyfikowanej na podstawie kilku prostych testów biochemicznych. Znajomość serotypu i czynników wirulencji pozwoliłaby poznać potencjalne możliwości chorobotwórcze szczepów zidentyfikowanych jako *L. monocytogenes* oraz wykrywać właściwości nowych gatunków czy szczepów atypowych [1, 22, 23, 35, 50, 59, 60].

Szczepy atypowe w starszym piśmiennictwie uważane za anomalia, obecnie coraz częściej pojawiają w środowisku naturalnym i produktach spożywczych. Od 2006 do 2013 roku wyizolowano już kilka listeriopodobnych szczepów atypowych, które ostatecznie sklasyfikowano do konkretnych gatunków.

Rodzaj *Listeria* składający się do tej pory z sześciu gatunków, został powiększony o kolejne cztery. Z środowiska naturalnego jezior Finger pozyskano gatunek *L. marthii*, a z rosnącej w bawarski stawie rzęsy trójrowkowej wyizolowano *L. weihenstephanensis*. Kolejne dwa nowe gatunki otrzymano z prób żywności. *L. rocourtiae* stanowiła pojedynczy szczep wyizolowany z sałaty, natomiast *L. fleischmannii* została pozyskana z prób sera szwajcarskiego [1, 22, 23, 35].

W trakcie przygotowywania artykułu do druku odkryto siedem nowych gatunków, a wśród nich: *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. grandensis*, *L. riparia* (środowisko), *L. booriae* i *L. newyorkensis* (żywność). Co więcej wyodrębniono również szczepy, które w prawdzie ostatecznie sklasyfikowano jako dwa ze znanych już gatunków *Listeria*, jednak różniące się



od nich zdolnością do przeprowadzania hemolizy. Z prób żywności wyizolowano atypową hemolityczną *L. innocua*, natomiast zarówno z produktów spożywczych jak i środowiska naturalnego pozyskano atypową niehemolityczną *L. seeligeri* [59, 60].

Występowanie listeriopodobnych szczepów atypowych staje się więc zjawiskiem coraz bardziej powszechnym. Pomimo ukazania się jak do tej pory dopiero kilku publikacji związanych z tą tematyką, istnieje wysokie prawdopodobieństwo izolowania kolejnych takich szczepów. Co więcej mogą stać się one pionierem nowego gatunku lub posiadać unikatowe właściwości, podobnie jak powyższe szczepy, opublikowane w ostatnim czasie w literaturze naukowej.

Fakty te pozwalają na spekulacje i wysnuwanie hipotez, że być może istnieje jeszcze wiele nieodkrytych niszek ekologicznych, z których wyizolować można nieznaną do tej pory mikroorganizmy. Tak więc ciągłe badanie, zarówno środowiska, jak i produktów żywnościowych będących z nim w ścisłym kontakcie, jest niezwykle ważnym aspektem pozwalającym na progres i przełomy w dziedzinie mikrobiologii. Kolejne nowe odkrycia mogą wzbogacić królestwo bakterii w dodatkową pulę mikroorganizmów o nowych nietypowych cechach, jak również pozwolą zgłębić wiedzę na temat ciągle jeszcze nie do końca poznanego mikrośrodowiska.

Praca napisana na podstawie pracy magisterskiej pod kierunkiem dr inż. Barbary Szymczak z Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

## Piśmiennictwo

- Bertsch D., Rau J., Eugster M.R., Haug M.C., Lawson P.A., Lacroix C., Meile L.: *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 526–532 (2013)
- Bille J., Catimel B., Bannerman E., Jacquet C., Yersin M.N., Caniaux I., Monget D., Rocourt J.: API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1857–1860 (1992)
- Border P.M., Howard J.J., Plastow G.S., Siggins K.W.: Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Letts. Appl. Microbiol.* **11**, 158–162 (1990)
- Brugère-Picoux J.: Ovine listeriosis. *Small Rum. Res.* **76**, 12–20 (2008)
- Bubert A., Hein I., Rauch M., Lehner A., Yoon B., Goebel W., Wagner M.: Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4688–4692 (1999)
- Bubert A., Kestler H., Götz M., Böckmann R., Goebel W.: The *Listeria monocytogenes iap* gene as an indicator gene for the study of PrfA-dependent regulation. *Mol. Gen. Genet.* **1**, 54–62 (1997)
- Butman B.T., Plank M.C., Durham R.J., Mattingly J.A.: Monoclonal antibodies which identify a genus-specific *Listeria* antigen. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1564–1569 (1988)
- Clayton E.M., Hill C., Cotter P.D., Ross R.P.: Real-time PCR assay to differentiate listeriolysin S-positive and -negative strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 163–171 (2011)
- Cotter P.D., Draper L.A., Lawton E.M., Daly K.M., Groeger D.S., Casey P.G., Ross R.P., Hill C.: Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.* **4**, DOI:10.1371/journal.ppat.1000144 (2008)
- Davis R., Mauer L.J.: Subtyping of *Listeria monocytogenes* at the haplotype level by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **150**, 140–149 (2011)
- De Mello J.F., Einsfeldt K., Frazzon A.P.G., Da Costa M., Frazzo J.: Molecular analysis of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* isolated from cheeses in Rio Grande do Sul. *Brazil. J. Microbiol.* **39**, 169–172 (2008)
- Den Bakker H.C., Cummings C.A., Ferreira V., Vatta P., Orsi R.H., Degoricija L., Barker M., Petrauskene O., Furtado M.R., Wiedmann M.: Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics*, **11**, 1471–2164 (2010)
- Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P.: Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3819–3822 (2004)
- Dzwolak W.: (Nie)bezpieczne warzywa i owoce. *Przem. Spoż.* **9**, 51–55 (2008)
- Esteban J.I., Oporto B., Aduriz G., Juste R.A., Hurtado A.: Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Vet. Res.* **5**, 1746–6148 (2009)
- Farber J.M., Peterkin P.I.: *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **55**, 476–511 (1991)
- Francis G.A., Thomas C., O'Beirne D.: The microbiological safety of minimally processed vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* **34**, 1–22 (1999)
- Galińska E., Knap J.P., Stoczyńska-Sikorska M.: Listerioza – mało znana, niebezpieczna choroba zakaźna. *Med. Ogólna*, **16**, 516–527 (2010)
- Garbacz K., Galiński J.: Atypowe szczepy gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) nieposiadające koagulazy lub czynnika zlepnego (CF). *Post. Mikrobiol.* **45**, 39–43 (2006)
- Gilbreth S.E., Call J.E., Wallace F.M., Scott V.N., Chen Y., Luchansky J.B.: Relatedness of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from selected ready-to-eat foods and listeriosis patients in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8115–8122 (2005)
- Gliński Z., Kostro K.: Listerioza współczesnym zagrożeniem. *Życie Wet.* **7**, 577–581 (2012)
- Graves L.M., Sauders B.D. i współ.: *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1280–1288 (2010)
- Halter E.L., Neuhaus K., Scherer S.: *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* of German fresh water pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 641–647 (2013)
- Harvey P.J.H.: *Listeria*: change of name for a genus of bacteria. *Nature* **145**, 264 (1940)
- Hodžić S., Hukic M.: Presence and serological characteristics of *Listeria monocytogenes* in meat and meat products. *Health Med.* **6**, 2593–2599 (2012)
- Izar B., Mraheil M.A., Hain T.: Identification and role of regulatory non-coding RNAs in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 5070–5079 (2011)
- Jagielski T., Osińska O.A., Bielecki J.: Molekularne determinanty wirulencji *Listeria monocytogenes* II. Czynniki wirulencji uczestniczące w wewnątrzkomórkowym etapie patogenyzy: listeriolizyna O (LLO), fosfolipaza B (PlcB), metaloproteaza

- (Mpl), fosfolipaza A (PlcA), i białko ActA. *Post. Mikrobiol.* **45**, 303–313 (2006)
28. Jeyaletchumi P., Tunung R., Margaret S.P., Son R., Farinazleen M.G., Cheah Y.K.: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int. Food Res. J.* **17**, 1–11 (2010)
  29. Jinneman K.C., Hill W.E.: *Listeria monocytogenes* lineage group classification by MAMA-PCR of the listeriolysin gene. *Curr. Microbiol.* **43**, 129–133 (2001)
  30. Johnson J., Hitchins A.D. i współ.: Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* Pathogenicity Island 1 genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4256–4266 (2004)
  31. Kastbjerg V.G., Gram L.: Industrial disinfectants do not select for resistance in *Listeria monocytogenes* following long term exposure. *Int. J. Food Microbiol.* **160**, 11–15 (2012)
  32. Kołakowska A., Madajczak G.: Pałeczki *Listeria monocytogenes* w zakażeniach ludzi. *Przegl. Epidemiol.* **65**, 57–62 (2011)
  33. Kramarenko T., Roasto M., Meremäe K., Kuningas M., Pölsama P., Elias T.: *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* **30**, 24–29 (2013)
  34. Kuenne C., Voget S., Pischimarov J., Oehm S., Goesmann A., Daniel R., Hain T., Chakraborty T.: Comparative analysis of plasmids in the genus *Listeria*. *Plos One*, **5**, DOI: 10.1371/journal.pone.0012511 (2010)
  35. Leclercq A., Allerberger F. i współ.: *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2210–2214 (2010)
  36. Lee S., Ward T.J., Graves L.M., Wolf L.A., Sperry K., Siletzky R.M., Katharioua S.: Atypical *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains harboring a lineage II-Specific Gene Cassette. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 660–667 (2012)
  37. Liu D.: Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J. Med. Microbiol.* **55**, 645–659 (2006)
  38. Liu D., Lawrence M.L., Ainsworth A.J., Austin F.W.: Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int. J. Food Microbiol.* **118**, 101–115 (2007)
  39. Low J.C., Donachie W.: A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Vet. J.* **153**, 9–29 (1997)
  40. Mclauchun J., Ress C.E.D.: Genus *Listeria* (w) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes, red. De Vos P., Boone D.R., Garrity G.M., Castenholz R.W., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Springer, Dordrecht, 2009, s. 244–257
  41. Milohanic E., Glaser P., Coppée J.Y., Frangeul L., Vega Y., Vázquez-Boland J.A., Kunst F., Cossart P., Buchrieser C.: Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol. Microbiol.* **47**, 1613–1625 (2003)
  42. Molenda J.: Listerioza – patogeneza, perspektywy bezpieczeństwa żywności. *Med. Wet.* **65**, 151–154 (2009)
  43. Molinos A.C., Abriouel H., Omar N.B., Valdivia E., Lopez R.L., Maqueda M., Canamero M.M., Galvez A.: Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7781–7787 (2005)
  44. Murray E.G.D., Webb R.E., Swann M.B.R.: A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* **29**, 407–439 (1926)
  45. Myers K., Montoya D., Cannon J., Dickson J., Sebranek J.: The effect of high hydrostatic pressure, sodium nitrite and salt concentration on the growth of *Listeria monocytogenes* on RTE ham and turkey. *Meat Sci.* **93**, 263–268 (2013)
  46. Niederhauser C., Candrian U., Hofelein C., Jermini M., Buhler H.P., Luthy J.: Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1564–1568 (1992)
  47. Osińska O.A., Jagielski T., Bielecki J.: Molekularne determinanty wirulencji *Listeria monocytogenes* I. Patogeneza listeryjna. Czynniki wirulencji: białka powierzchniowe uczestniczące w adhezji do komórek gospodarza. *Post. Mikrobiol.* **45**, 209–220 (2006)
  48. Piffaretti J.C., Kressebuch H., Aeschbacher M., Bille J., Bannerman E., Musser J.M., Selander R.K., Rocourt J.: Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3818–3822 (1989)
  49. Pinto A.D., Novello L., Montemurro F., Bonerba E., Tantillo G.: Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy. *New Microbiol.* **33**, 249–252 (2010)
  50. Rijpens N., Vlaemynck G., Rossau R., Herman L., Jannes G.: Unidentified *Listeria*-like bacteria isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **27**, 198–202 (1998)
  51. Rocourt J., Buchrieser C.: The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification (w) *Listeria*, listeriosis and food safety: Third Edition, red. Ryser E.T., Marth E.H., Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2007, s. 1–21
  52. Schmid M.W., Ng E.Y.W., Lampidis R., Emmerth M., Walcher M., Kref J., Goebel W., Wagner M., Schleifer K.-H.: Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**, 1–18 (2005)
  53. Shen J., Rump L., Zhang Y., Chen Y., Wang X., Meng J.: Molecular subtyping and virulence gene analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from food. *Food Microbiol.* **35**, 58–64 (2013)
  54. Shrinithivihahshini N.D., Sheelamary M., Mahamuni D., Chithradevi R.: Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food and ready to eat food products available in Tiruchirappalli, Tamil Nadu, India. *World J. Life Sci. Med. Res.* **4**, 70–75 (2011)
  55. Slama B.R., Bekir K., Miladi H., Noumi A., Bakhrouf A.: Adhesive ability and biofilm metabolic activity of *Listeria monocytogenes* strains before and after cold stress. *Afr. J. Biotechnol.* **61**, 12475–12482 (2012)
  56. Snehaj J., Bhawe M., Palombo E.A.: Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Meth.* **88**, 327–341(2012)
  57. Todd E.C.D., Notermans S.: Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* **22**, 1484–1490 (2011)
  58. Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kref J.: *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 584–640 (2001)
  59. Volokhov D., George J., Anderson C., Duvall R.E., Hitchins A.D.: Discovery of natural atypical nonhemolytic *Listeria seeligeri* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2439–2448 (2006)
  60. Volokhov D.V., Duperrier S., Neverov A.A., George J., Buchrieser C., Hitchins A.D.: The presence of the internalin gene in natural atypically hemolytic *Listeria innocua* strains suggests descent from *L. monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1928–1939 (2007)
  61. Wálczycka M.: Metody inaktywacji i hamowania wzrostu *Listeria monocytogenes* w przetworach mięsnych. *Żywn. Nauk. Technol. Jakość.* **43**, 61–72 (2005)
  62. Ward T.J., Gorski L., Borucki M.K., Mandrell R.E., Hutchins J., Papedis K.: Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **186**, 4994–5002 (2004)
  63. Wiedmann M., Bruce J.L., Keating C., Johnson A.E., McDonough P.L., Batt C.A.: Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.* **65**, 2707–2716 (1997)