



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2023 r.



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Natalia Wiktorczyk-Kapischke

**Wpływ czynników stresowych na wybrane cechy
feno- i genotypowe badanych szczepów
*Listeria monocytogenes***

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotorzy:
Dr hab. inż. Krzysztof Skowron, prof. UMK
Dr hab. inż. Ewa Wałęcka-Zacharska, prof. UPWr

Bydgoszcz 2023

Serdecznie dziękuję

Promotorom niniejszej rozprawy

Dr hab. inż. Krzysztofowi Skowron, prof. UMK

Dr hab. inż. Ewie Wałeckiej-Zacharskiej, prof. UPWr

za bezcenne wsparcie, serdeczność, poświęcony czas, wyrozumiałość

oraz przede wszystkim zaangażowanie podczas realizacji

wszystkich etapów niniejszej rozprawy

Rodzicom,
z całego serca dziękuję za miłość, troskę i wsparcie
oraz nieustanną wiarę we mnie

Mężowi,
za miłość, niezwykłą cierpliwość, wsparcie
oraz wiarę w moje możliwości serdecznie dziękuję

Serdecznie dziękuję:
Pani prof. dr hab. n. med. Eugenii Gospodarek-Komkowskiej
za cenne wskazówki
dotyczące niniejszej rozprawy

Pani dr Katarzynie Grudlewskiej-Buda
i Pani dr Annie Budzyńskiej
za życzliwość i wsparcie
w realizacji niniejszej rozprawy

Pani dr hab. Katarzynie Buszko, prof. UMK
i Panu mgr Kacprowi Wnuk
z Katedry Biostatystyki i Teorii Układów Biomedycznych
za pomoc w doborze i wykonaniu części analiz statystycznych

Wykaz stosowanych skrótów

ActA	Powierzchniowe białko ActA (ang. actin assembly inducing protein)
ADI	System deiminazy argininowej (ang. putative arginine deiminase)
AM	Ampicylina (ang. ampicillin)
ATCC	Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych (ang. American Type Culture Collection)
ATP	Adenozyno-5'-trifosforan
ATR	Odpowiedź adaptacyjna ATR (ang. acid tolerance response)
BHI	Bulion mózgowo-sercowy (ang. brain heart infusion)
CAB	Podłoże Columbia Agar (ang. columbia agar base)
CDCs	Cytolizyny zależne od cholesterolu (ang. cholesterol-dependent cytolysins)
Clp	Proteaza zależna od ATP
Csp	Białko szoku zimna (ang. cold shock protein)
E	Erytromycyna (ang. erythromycin)
EDTA	Kwas wersenowy
EFSA	Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority)
ERM	Rodzina białek ezryna, radyksyna i meozyna (ang. ezrin, radixin and moesin)
EUCAST	Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (ang. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
FbpA	Białko wiążące fibronektynę
GAD	System dekarboksylazy glutaminianowej (ang. glutamate decarboxylase activity)
HtrA	Proteaza serynowa
InI	Internalina (ang. internalin)
j.t.k.	Jednostka tworząca kolonie
K	Szczep izolowany z materiału klinicznego
LGI-1, 2, 3	Wyspy genomowe <i>Listeria</i> spp. 1, 2, 3 (ang. <i>Listeria</i> Genomic Island 1, 2, 3)
LIPI-1, 3, 4	Wyspy patogenności <i>Listeria</i> spp. 1, 3, 4 (ang. <i>Listeria</i> Pathogenicity Island 1, 3, 4)
LLO	Listeriolizyna O
LLS	Listeriolizyna S
Ł	Szczep izolowany z łososia
M	Szczep izolowany z mrożonek warzywnych
MALDI TOF MS	Laserowa jonizacja próbki wspomagana matrycą z pomiarem czasu przelotu jonów (ang. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)
MBC	Minimalne stężenie bakteriobójcze (ang. minimum bactericidal concentration)
MEM	Meropenem (ang. meropenem)
MHF	Mueller Hinton Agar z 5,0% krwią końską i 20 mg/l β -NAD
MIC	Minimalne stężenie hamujące (ang. minimum inhibitory concentration)
Mpl	Metaloproteaza
P	Penicylina (ang. penicillin)
PBS	Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. phosphate-buffered saline)
PCR	Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
PFGE	Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (ang. pulsed field gel electrophoresis)
PFU	Jednostka tworząca łysinkę (ang. plaque forming unit)
PlcA	Fosfolipaza A
PlcB	Fosfolipaza B
PrfA	Pleiotropowy regulator wirulencji
qPCR	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. quantitative polymerase chain reaction)
RPM	Obroty na minutę (ang. revolutions per minute)
RTE	Żywność gotowa do spożycia (ang. ready to eat)

SSI-1, 2	Wysepka przetrwania stresu (ang. stress survival islet 1, 2)
SSR	Reakcja przeżycia głodowego (ang. starvation survival response)
SXT	Trimetoprim-sulfametoksazol (ang. trimethoprim-sulfamethoxazole)
TSB	Bulion tryptozowo-sojowy (ang. tryptic soy broth)
UPGMA	Nieważona metoda wielu grup ze średnią arytmetyczną (ang. unweighted pair group method with arithmetic mean)
W	Szczep izolowany z wędlin

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	14
1.1. Ogólna charakterystyka gatunku <i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.2. Systematyka	14
1.3. Charakterystyka <i>Listeria monocytogenes</i>	15
1.3.1. Morfologia i wybrane właściwości	15
1.3.2. Serotypy <i>Listeria monocytogenes</i>	15
1.3.3. Adaptacja do warunków środowiskowych	16
1.3.4. Występowanie	16
1.4. Patogeneza <i>Listeria monocytogenes</i>	17
1.4.1. Cykl wewnątrzkomórkowy i czynniki wirulencji	17
1.4.2. Wyspy patogenności i genomowe.....	20
1.5. Chorobotwórczość	23
1.5.1. Epidemiologia zakażeń	24
1.7. Zdolność tworzenia biofilmu.....	27
1.8. Czynniki stresowe	27
1.8.1. Stres osmotyczny.....	28
1.8.2. Stres temperaturowy.....	30
1.8.3. Stres kwasowy i zasadowy.....	34
1.8.4. Dostępność składników odżywczych	37
1.9. Adaptacja do stresu	37
1.10. Oporność krzyżowa	38
2. HIPOTEZA BADAWCZA I CEL PRACY	39
3. MATERIAŁ I METODY	40
3.1. Pierwszy etap badań	40
3.1.1. Materiał do badań	40
3.1.2. Przechowywanie izolatów	42
3.1.3. Przygotowanie izolatów do badań	42
3.1.4. Ocena podobieństwa genetycznego izolatów.....	42
3.1.5. Wstępna charakterystyka badanych szczepów	43
3.1.5.1. Izolacja genomowego DNA metodą termiczną	43
3.1.5.2. Ocena przynależności do grup serologicznych	44

3.1.5.3. Ocena występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji	45
3.1.5.4. Ocena wrażliwości na antybiotyki	47
3.1.5.5. Ocena wartości minimalnego stężenia hamującego i minimalnego stężenia bakteriobójczego bakteriofaga w preparacie PhageGuard L	47
3.1.6. Ocena wpływu czynników stresowych na wzrost i przeżywalność <i>Listeria monocytogenes</i>	48
3.1.6.1. Stres osmotyczny	48
3.1.6.2. Stres kwasowy i zasadowy	49
3.1.6.3. Stres cieplny	50
3.1.6.4. Stres niskiej temperatury	51
3.1.6.5. Stres cyklicznego zamrażania i rozmrażania	52
3.1.6.6. Stres związany z niedoborem i nadmiarem składników odżywczych	53
3.1.7. Metody statystyczne	54
3.2. Drugi etap badań	55
3.2.1. Materiał do badań	55
3.2.2. Przygotowanie szczepów <i>Listeria monocytogenes</i> do dalszych badań	56
3.2.3. Warunki stresowe	56
3.2.3.1. Stres cieplny	56
3.2.3.2. Stres niskiej temperatury	56
3.2.3.3. Stres osmotyczny	56
3.2.3.4. Stres kwasowy i zasadowy	56
3.2.3.5. Stres mrożenia	57
3.2.4. Wpływ czynników stresowych na cechy fenotypowe	57
3.2.4.1. Zdolność tworzenia biofilmu	57
3.2.4.2. Określenie minimalnego stężenia antybiotyków hamującego wzrost bakterii	58
3.2.4.3. Zdolność do ruchu	58
3.2.5. Wpływ czynników stresowych na poziom ekspresji wybranych genów	58
3.2.5.1. Izolacja RNA	58

3.2.5.2. Odwrotna transkrypcja	59
3.2.5.3. Real-Time qPCR.....	60
3.2.6. Metody statystyczne	60
4. WYNIKI	62
4.1. Ocena podobieństwa genetycznego izolatów	62
4.2. Wstępna charakterystyka badanych szczepów	64
4.2.1. Ocena przynależności do grup serologicznych	64
4.2.2. Ocena częstości występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji	65
4.2.3. Ocena wrażliwości na antybiotyki	70
4.2.4. Ocena wartości minimalnego stężenia hamującego i minimalnego stężenia bakteriobójczego bakteriofaga w preparacie PhageGuard L.....	72
4.3. Wpływ wybranych czynników stresowych na wzrost i przeżywalność badanych szczepów <i>Listeria monocytogenes</i>	74
4.3.1. Stres osmotyczny	74
4.3.2. Stres kwasowy i zasadowy.....	76
4.3.3. Stres cieplny.....	81
4.3.4. Stres niskiej temperatury	83
4.3.5. Stres cyklicznego zamrażania i rozmrażania.....	84
4.3.6. Stres związany z niedoborem i nadmiarem składników odżywczych.....	87
4.3.7. Klasyfikacja szczepów względem odpowiedzi na wybrane czynniki stresowe	89
4.4. Wpływ czynników stresowych na wybrane cechy fenotypowe i ekspresję wybranych genów trzech badanych szczepów <i>Listeria monocytogenes</i> ..	92
4.4.1. Zdolność tworzenia biofilmu po ekspozycji na czynniki stresowe ..	92
4.4.2. Zdolność do ruchu	94
4.4.3. Zmiany wartości minimalnego stężenia hamującego antybiotyków po ekspozycji na czynniki stresowe	94
4.4.4. Wpływ czynników stresowych na poziom ekspresji genów.....	96
4.4.4.1. Poziom ekspresji genu <i>sigB</i>	96
4.4.4.2. Poziom ekspresji genu <i>agrA</i>	97

5. DYSKUSJA	99
6. WNIOSKI.....	114
7. STRESZCZENIE	115
8. SUMMARY	117
9. PIŚMIENNICTWO	119
10. SPIS RYCIN	142
11. SPIS FOTOGRAFII.....	147
12. SPIS TABEL	148
Zgoda Komisji Bioetycznej	150

Wstęp do niniejszej rozprawy został napisany w oparciu o artykuły:

1. **Wiktorczyk-Kapischke N.**, Skowron K.*, Grudlewska-Buda K., Wałęcka-Zacharska E., Korkus J., Gospodarek-Komkowska E. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to the stress factors in the food processing environment. *Front. Microbiol.* 2021;12:710085.
doi: 10.3389/fmicb.2021.710085 [IF: 6,064; MEiN: 100]
[Cytowania: WoS-19; Scopus-19]
2. **Wiktorczyk-Kapischke N.**, Skowron K., Wałęcka-Zacharska E.* Genomic and pathogenicity islands of *Listeria monocytogenes*-overview of selected aspects. *Front. Mol. Biosci.* 2023; 10:1161486.
doi: 10.3389/fmolb.2023.1161486 [IF: 6,113; MEiN: 140]
[Cytowania: WoS-0; Scopus-0]

Część wyników zamieszczonych w niniejszej rozprawie została opublikowana w artykule:

1. **Wiktorczyk-Kapischke N.**, Skowron K.*, Wałęcka-Zacharska E., Grudlewska-Buda K., Wnuk K., Buszko K., Gospodarek-Komkowska E. Assessment of the influence of selected stress factors on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *BMC Microbiol.* 2023;23:27.
doi: 10.1186/s12866-023-02766-4 [IF: 4,465; MEiN: 70]
[Cytowania: WoS-0; Scopus-0]

* autor korespondencyjny

Źródła finansowania

Realizacja prac badawczych była możliwa, dzięki wymienionym źródłom finansowania:

1. Grant dla uczestników studiów doktoranckich na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu na finansowanie zadania badawczego: „Ocena wpływu wybranych czynników stresowych na przeżywalność pałeczek *Listeria monocytogenes*”
2. Grant4NCUStudent na finansowanie zadania badawczego: „Assesment of expression level of selected genes in *Listeria monocytogenes* exposed to stress factors” w ramach programu IDUB UMK
3. Środkom finansowym na podstawową działalność badawczą Katedry Mikrobiologii na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu

1. WSTĘP

1.1. Ogólna charakterystyka gatunku *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes to Gram-dodatnie, względnie beztlenowe, niewytwarzające przetrwalników pałeczki [1]. Obecne są w środowisku naturalnym, a także w zakładach przetwórstwa spożywczego [2-7]. Żywność jest głównym źródłem tych pałeczek dla ludzi [8-10].

Pałeczki *L. monocytogenes* po raz pierwszy zostały wyizolowane z krwi królików i świnek morskich w 1924 r. Wówczas nadano im nazwę *Bacterium monocytogenes*, a ich opis został przedstawiony przez Murray'a w 1926 r. [1,11,12]. Natomiast w 1927 r., Pirie wyizolował identyczne morfologicznie bakterie z wątroby myszokoczków nadając im nazwę *Listerella hepatolytica* [1,13]. Aktualnie obowiązująca nazwa gatunkowa *Listeria monocytogenes* została przyjęta w 1940 r. [14].

1.2. Systematyka

Przynależność systematyczna pałeczek *L. monocytogenes* przedstawia się następująco [15]: Królestwo: Bakterie, Typ: Firmicutes, Klasa: Bacilli, Rząd: Bacillales, Rodzina: *Listeriaceae*, Rodzaj: *Listeria*.

Rodzaj *Listeria* obejmuje aktualnie 30 gatunków [15]: *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. cossartiae*, *L. costaricensis*, *L. denitrificans*, *L. farberi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. goaensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. ilorinensis*, *L. immobilis*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. newyorkensis*, *L. portnoyi*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. rustica*, *L. seeligeri*, *L. swaminathanii*, *L. thailandensis*, *L. valentina*, *L. weihenstephanensis*, *L. welshimeri*.

L. monocytogenes jest czynnikiem etiologicznym listeriozy u ludzi, przenoszonej najczęściej drogą pokarmową [11]. Natomiast, *L. ivanovii* jest gatunkiem patogennym głównie dla bydła i owiec. Notowano przypadki

listeriozy o etiologii *L. ivanovii* u ludzi [1,16]. Pozostałe gatunki z rodzaju *Listeria* określane są jako niepatogenne [15].

1.3. Charakterystyka *Listeria monocytogenes*

1.3.1. Morfologia i wybrane właściwości

L. monocytogenes charakteryzuje się małymi, pozbawionymi otoczki cylindrycznymi komórkami o wymiarach około 0,5 µm szerokości oraz 1-1,5 µm długości [17]. Cechą charakterystyczną jest obecność pięciu lub sześciu dwubiegunowo ułożonych rzęsek, które umożliwiają *L. monocytogenes* ruch w temperaturze 22-28°C [18,19].

Gatunek *L. monocytogenes* to bakterie względnie beztlenowe [14,17]. Wzrastając na agarze z krwią wykazują hemolizę typu beta [17]. Wytwarzają katalazę i rozkładają eskulinę, natomiast nie wytwarzają oksydazy [1,20].

1.3.2. Serotypy *Listeria monocytogenes*

Podział na serotypy gatunku *L. monocytogenes* oparty jest na obecności na powierzchni komórki antygenu somatycznego O (15 podtypów: I-XV) i rzęskowego H (4 podtypy: A-D) [21–23]. Opisano 13 serotypów *L. monocytogenes* [24-26], które przedstawiono w tab. 1. Zidentyfikowano również serotyp 4h wśród szczepów reprezentujących hybrydową pod-linię HSL-II [27]. Serotypy zostały sklasyfikowane w cztery grupy serologiczne (1/2a-3a, 1/2b-3b-7, 1/2c-3c i 4b-4d-4e) [28]. Pałeczki *L. monocytogenes* podzielono również na trzy linie ewolucyjne (I, II, III) (tab. 1) [21,26] i cztery klony epidemiczne - ECI, ECII, ECIII i ECIV [29]. Wykazano, że ogniska listeriozy związane są głównie ze szczepami *L. monocytogenes* o serotypie 4b i 1/2b (98,0% udokumentowanych przypadków) [30].

Tabela 1. Serotypy *L. monocytogenes* w oparciu o podtyp antygenu O i H (na podstawie [21-26])

Linia ewolucyjna	Serotyp	Antygen O	Antygen H
II	1/2a	I, II, (III)	A, B
I	1/2b	I, II, (III)	A, B, C
II	1/2c	I, II, (III)	B, D
II	3a	II, (III), IV	A, B
I	3b	II, (III), IV, (XII), (XIII)	A, B, C
II	3c	II, (III), IV, (XII), (XIII)	B, D
III	4a	(III), (V), VII, IX	A, B, C
III	4ab	(III), V, VI, VII, IX, X	A, B, C
I	4b	(III), V, VI	A, B, C
III	4c	(III), V, VII	A, B, C
I	4d	(III), (V), VI, VII	A, B, C
I	4e	(III), V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
I	7	(III), XII, XIII	A, B, C

wartości w nawiasach-zmienne w zależności od szczepu

1.3.3. Adaptacja do warunków środowiskowych

Cechą charakterystyczną *L. monocytogenes* jest adaptacja do niekorzystnych i zmiennych warunków środowiskowych. Pałeczki te mogą wzrastać w szerokim zakresie temperatur (0-45°C), pH (4,3-9,6) oraz tolerują wysokie stężenia soli (do 12,0% NaCl) [1,31-33]. Pałeczki *L. monocytogenes* narażone są na niekorzystne warunki również w organizmie człowieka. Wykazują tolerancję na enzymy proteolityczne, kwaśny odczyn żołądka, a także sole kwasów żółciowych [11].

1.3.4. Występowanie

Adaptacja do niekorzystnych warunków determinuje obecność *L. monocytogenes* w środowisku. Pałeczki te izolowane są z gleby, wody, gnijącej roślinności, a także od różnych gatunków ryb, ptaków i ssaków [2-7]. Wśród żywności najczęściej zanieczyszczonej przez *L. monocytogenes* wymienić należy [8-10,34]:

- produkty rybne (najczęściej ryby surowe i wędzone, oraz przetwory rybne i owoce morza);
- produkty mięsne (surowe, m.in. drób, wieprzowina);
- produkty mleczne (wyprodukowane z niepasteryzowanego mleka [sery miękkie i półmiękkie], mleczne napoje fermentowane, lody);

- produkty gotowe do spożycia (ang. ready to eat, RTE) (nie wymagają wcześniejszej obróbki cieplnej);
- żywność nie pochodzącą od zwierząt (ang. food of non-animal origin, FNAO), czyli produkty roślinne obejmujące: surowe warzywa i owoce, orzechy, nasiona, zioła, przyprawy, grzyby i algi.

Według raportu Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority, EFSA) [35] w 2021 r. *L. monocytogenes* najczęściej izolowano z ryb i produktów rybołówstwa, wyrobów mięsnych pochodzących od trzody chlewnej, serów z mleka owczego oraz owoców i warzyw.

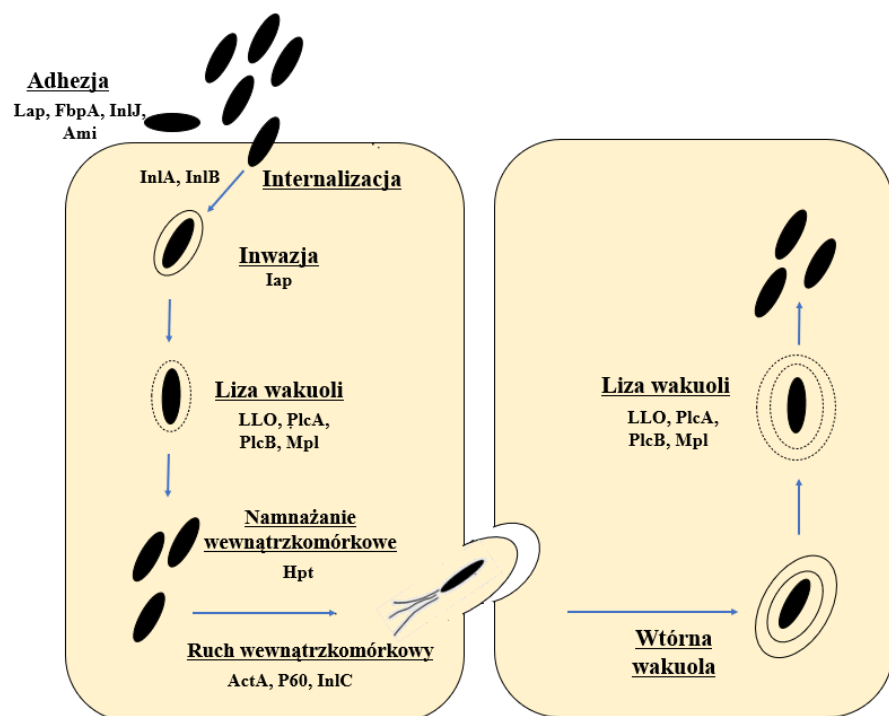
1.4. Patogeneza *Listeria monocytogenes*

1.4.1. Cykl wewnątrzkomórkowy i czynniki wirulencji

L. monocytogenes to patogen wewnątrzkomórkowy [36]. Pałeczki te są zdolne do pokonania najważniejszych barier w organizmie człowieka: jelitowej, krew-mózg i łożyskowej [1]. Pierwszym etapem cyklu wewnątrzkomórkowego *L. monocytogenes* jest adhezja do powierzchni komórek gospodarza, w której największy udział mają białka Ami, FbpA oraz Lap [37]. Rola białka Ami polega na rozszczepieniu wiązania amidowego w peptydoglikanie. Z kolei, Lap jest adhezyną i hydrolazą mureiny zaangażowaną w inwazję komórek niefagocytujących [14]. Istotne znaczenie na tym etapie ma również białko FbpA, które umożliwia wiązanie fibronektyny oraz chroni *L. monocytogenes* przed rozpoznaniem przez układ immunologiczny człowieka [14].

Kolejnym etapem rozwoju zakażenia jest internalizacja. U *L. monocytogenes* zidentyfikowano 27 internalin (białka powierzchniowe), z których najistotniejszą rolę odgrywają InIA i InIB [14]. Internalina A wykazuje ścisły tropizm komórkowy, który ograniczony jest do komórek pochodzenia nabłonkowego [38]. InIA jest kowalencyjnie przyłączona do ściany komórkowej bakterii poprzez motyw LPXTG [39,40]. InIA wiąże się z E-kadheryną, która oddziałuje z kateninami, co prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego komórek i fagocytozy [14]. Interakcja InIA/E-kadheryna jest

specyficzna gatunkowo [41,42]. Natomiast, internalina B wykorzystuje trzy receptory, tj. c-Met (transbłonowy receptor czynnika wzrostu hepatocytów–HGF), proteoglikan siarczanu heparyny (HPSG), glikoproteinę qC1q–R i heparynę [14,38]. InIB umożliwia inwazję komórek różnego pochodzenia, ponieważ receptor c-Met ulega ekspresji w szerokim zakresie komórek [43]. Rolę adhezyny i hydrolazy mureiny spełnia białko Iap (p60), które bierze udział w inwazji komórek nefagocytujących [14,44]. Ten etap cyklu wewnątrzkomórkowego *L. monocytogenes* kończy się wniknięciem do komórki w formie wakuoli (zamkniętego pęcherzyka) (ryc. 1) [14,43].



Rycina 1. Etapy cyklu życiowego *L. monocytogenes* (uwzględniono czynniki wirulencji związane z każdym etapem). Pierwszy etap obejmuje adhezję (Lap, FbpA, InlJ, Ami) oraz internalizację (InlA, InlB). Kolejne etapy to inwazja (Iap), liza wakuoli (LLO, PlcA, PlcB, Mpl), namnażanie wewnątrzkomórkowe (Hpt) i ruch wewnątrzkomórkowy (ActA, P60 (Iap), InlC). *L. monocytogenes* przedostaje się do sąsiedniej komórki w formie wtórnej wakuoli, która ulega lizie, a cykl życiowy inicjowany jest od nowa. Lap-ang. *Listeria* adhesion protein, FbpA-białko wiążące fibronektynę, Inl-interanlina, Ami-ang. autolysin amidase, LLO-listeriolizyna O, PlcA-fosfolipaza A, PlcB-fosfolipaza B, Mpl-metaloproteaza, ActA-białko powierzchniowe ActA, Hpt-białko transportera fosforanu heksozy (ang. hexose phosphate transporter protein (rycina własna, na podstawie [45-47])

W cytoplazmie komórki gospodarza, *L. monocytogenes* uwięziona jest w wakuoli. Na tym etapie największe znaczenie ma listeriolizyna O (LLO) (kodowana przez gen *hly* [1590 pz]), która była pierwszym zidentyfikowanym

czynnikiem wirulencji *L. monocytogenes* [48-51]. Główną funkcją LLO jest udział w lizie fagocytarnej wakuoli i uwolnieniu *L. monocytogenes* do cytoplazmy [52]. LLO należy do rodziny cytolizyn zależnych od cholesterolu (ang. cholesterol-dependent cytolysin, CDC) [53]. Wykazano, że aktywność LLO jest najwyższa w pH 5,5, co odpowiada kwaśnemu odczynowi środowiska wakuoli. Natomiast w neutralnym pH w cytoplazmie, aktywność LLO spada [14,54]. W pierwszym etapie LLO jest wydzielana jako rozpuszczalny w wodzie monomer, który wiąże się z cholesterolem w błonach komórkowych gospodarza. Następnie LLO oligomeryzuje do dużych kompleksów (od 30 do 50 podjednostek). Na tym etapie powstaje toksyna, generująca pory o średnicy około 50 nm [52,55,56]. Mutanty *L. monocytogenes*, które nie wytwarzają LLO, pozostają uwięzione w wakuoli i są mniej wirulentne niż pałeczki typu dzikiego [57]. Częstość występowania takich szczepów *L. monocytogenes* wynosi około 0,1% [58] i są najczęściej identyfikowane wśród izolatów ze środowiska przetwarzania żywności [58,59].

Uwolnienie pałeczek z wakuoli wspierane jest przez dwie fosfolipazy, specyficzną dla fosfatydyloinozytolu - fosfolipazę A (PlcA, kodowana przez gen *plcA* [954 pz]) i fosfolipazę B o szerokim zakresie (PlcB, kodowana przez gen *plcB* [870 pz]). Główną funkcją PlcA i PlcB jest hydroliza fosfolipidów, a co za tym idzie uszkodzenie błony cytoplazmatycznej [60,61]. PlcB jest metaloenzymem zależnym od cynku, wydzielanym jako nieaktywny proenzym składający się z 264 aminokwasów. PlcB (29-30 kDa) jest aktywowany poprzez cięcie proteolityczne w środowisku zewnątrzkomórkowym. PlcB hydrolizuje fosfatydylocholinę, fosfatydyloetanolaminę, fosfatydyloserynę i sfingomielinę. Natomiast wykazuje słabą aktywność wobec fosfatydyloinozytolu oraz hemolityczną w temperaturze 37°C [60]. PlcB odgrywa kluczową rolę w ucieczce z wakuoli [62,63], poprzez hydrolizę wiązania glicylofosforanowego w cząsteczce fosfolipidu [63]. Natomiast PlcA także w niewielkim stopniu hydrolizuje eukariotyczny glikozyl PI [64]. PlcA uczestniczy w lizie i opuszczeniu pierwotnych fagosomów i wtórnej błony wakuolowej [62]. Istotną rolę na tym etapie cyklu wewnątrzkomórkowego odgrywa

metaloproteaza (Mpl), która aktywuje PlcB [65]. Wykazano, że Mpl utrzymuje polimeryzację ActA we wtórnych fagosomach, co przyczynia się do wydajniejszej polimeryzacji aktyny [66].

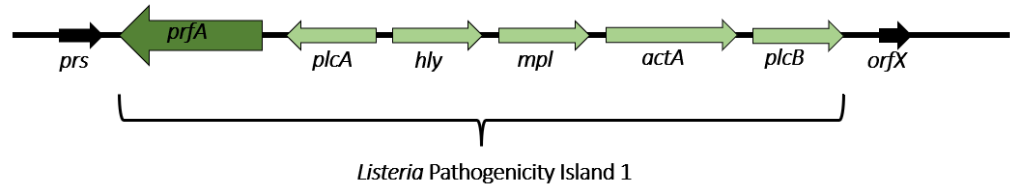
Po uwolnieniu *L. monocytogenes* z fagosomu następuje namnażanie wewnątrzkomórkowe oraz rozprzestrzenianie się do sąsiadujących komórek. Ten etap cyklu związany jest z białkiem ActA, które zapewnia wewnątrz- i międzykomórkowy ruch *L. monocytogenes* [67]. ActA odpowiada za polimeryzację włókien aktynowych na jednym biegunie komórki, tworząc strukturę przypominającą tzw. „ogon komety” [14], który umożliwia pałeczkom ruch w cytoplazmie, utworzenie wtórnego fagosomu i przemieszczenie się do sąsiedniej komórki [14,65]. Centralna domena ActA (region bogaty w prolinę) oddziałuje z białkami kompleksu Ena/VASP, które modulują prędkość i kierunek ruchu *L. monocytogenes* [14]. Wykorzystując zdolność ruchu za pośrednictwem ActA, *L. monocytogenes* dostaje się do sąsiedniej komórki z utworzeniem wtórnej wakuoli. Po uwolnieniu się do cytoplazmy, cykl inicjowany jest na nowo (ryc. 1).

Wykazano, że białko ActA ma udział w rozprzestrzenianiu się *L. monocytogenes* w łożysku [68,69]. Opisano model, w którym ActA uczestniczy w przekraczaniu bariery krew-mózg, przynajmniej częściowo, poprzez mechanizm tzw. „konja trojańskiego”. Jednakże model ten nie został dotychczas dokładnie opisany [70,71].

1.4.2. Wyspy patogenności i genomowe

Genom *L. monocytogenes* ma około 3 Mbp (miliony par zasad) i koduje około 2910 genów rdzeniowych [72]. Geny wirulencji *L. monocytogenes* są zorganizowane w obrębie wysp patogenności i genomowych.

Wyspa patogenności LIPI-1 (ang. *Listeria Pathogenicity Island 1*) zawiera geny wirulencji zaangażowane w wewnątrzkomórkowy cykl życiowy *L. monocytogenes* [60,61]. Ten klaster genów o wielkości 9 kbp (tysiący par zasad) znajduje się między *prs* i *orfX* i składa się z sześciu genów: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* i *plcB* [60,61,73]. Organizację LIPI-1 przedstawiono na ryc. 2.

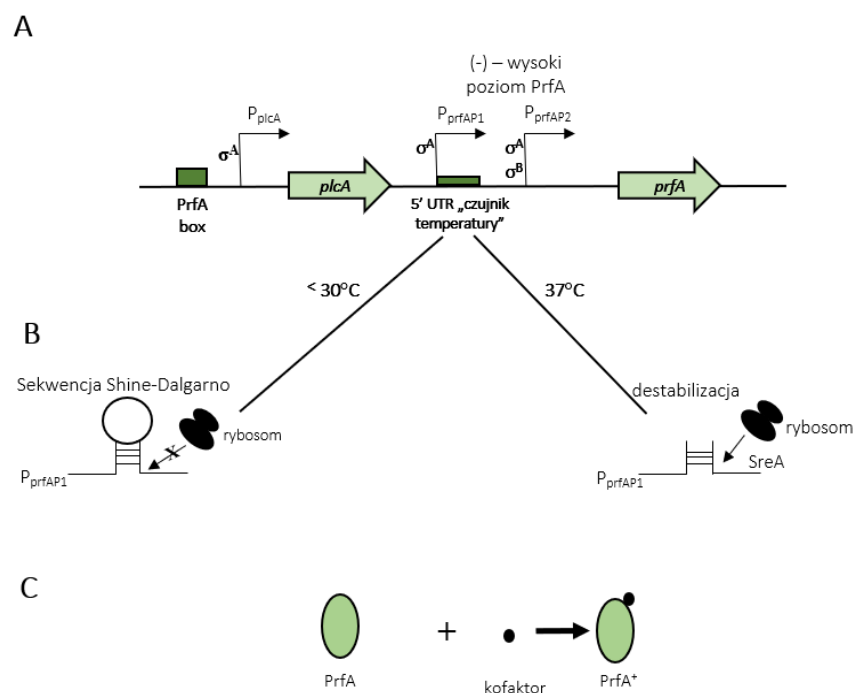


Rycina 2. Organizacja *Listeria Pathogenicity Island 1*. Kierunek transkrypcji jest wskazany przez odpowiednie strzałki (rycina własna, na podstawie [60,61])

Poniżej genu *hly* znajduje się operon *mpl-actA-plcB* o wielkości 5,7 kbp transkrybowany w tej samej orientacji [74]. Z kolei, geny powyżej *hly*, zorganizowane są w operon *plcA-prfA* i są transkrybowane w przeciwnej orientacji (bicystronowej lub monocystronowej) [75,76] (ryc. 2). Najintensywniejsza ekspresja tych genów zachodzi w temperaturze 37°C, natomiast spadek do 30°C przyczynia się do wyciszenia ich ekspresji [77]. LIPI-1 jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny PrfA [78].

Gen *prfA* może występować w dwóch stanach funkcjonalnych, będąc słabo lub wysoce aktywnym. Stopień aktywności zależy od temperatury, obecności węgla i łatwo metabolizowanych cukrów (np. celobiozy) [79]. Regulacja poziomu ekspresji genu *prfA* oraz aktywności białka obejmuje transkrypcję, mechanizmy potranskrypcyjne i potranslacyjne, które przedstawiono na ryc. 3 [80]. Gen *prfA* rozpoznaje palindromową sekwencję o długości 14 bp, określaną jako tzw. „PrfA box”, która usytuowana jest 40 nukleotydów powyżej miejsca startu transkrypcji [81,82]. Gen *prfA* wykorzystuje trzy promotory. Pierwszy z nich, P_{plcA} (ekspresja bicystronowa), poprzez związanie się z „PrfA box” pozytywnie kieruje ekspresją genu *prfA* (ryc. 3A). Kolejne promotory, tj. P_{prfAP1} i P_{prfAP2} kontrolują reakcje monocystronowe. Promotor P_{prfAP1} posiada nieulegający translacji region 5' (5'-UTR), który działa jako czujnik temperatury. W 30°C, w regionie zawierającym sekwencję Shine-Dalgarno, tworzy się stabilna struktura przestrzenna, określana jako „spinka do

włosów”. Uniemożliwia ona przyłączenie rybosomu oraz syntezę polipeptydu. W temperaturze 37°C następuje destabilizacja struktury „spinka do włosów”, co umożliwia dołączenie rybosomu oraz syntezę białka PrfA. Ekspresja promotorów P_{plcA} i P_{prfAP2} jest niezależna od temperatury [83]. Promotor P_{prfAP1} jest rozpoznawany przez czynnik σ^A , podczas gdy P_{prfAP2} może być rozpoznawany zarówno przez czynnik σ^A , jak i σ^B (ryc. 3B) [83-86]. Kofaktorem, który jest niezbędny do pełnej aktywacji PrfA jest glutation wiążący się allosterycznie z białkiem (ryc. 3C) [86]. Białko PrfA (27 kDa) należy do rodziny CRP (białko receptora cyklicznego AMP)/FNR (regulator redukcji fumaratów i azotanów) i zbudowane jest z 233 aminokwasów [52].



Rycina 3. Regulacja ekspresji genu *prfA* i aktywności białka PrfA. A. kontrola transkrypcji *prfA* (trzy promotory genu *prfA*: P_{plcA} pozytywnie kieruje ekspresją *prfA* poprzez wiązanie się z „PrfA box”. P_{prfAP1} i P_{prfAP2} kontrolują reakcje monocistronowe. Promotor P_{prfAP1} ma nieulegający translacji region 5'UTR, który działa jako czujnik temperatury), B. potranskrypcyjna kontrola *prfA* (w temperaturze 30°C w regionie zawierającym sekwencję Shine-Dalgarno tworzy się stabilna struktura przestrzenna, określana jako „spinka do włosów”. W 37°C, struktura ta ulega destabilizacji, co umożliwia przyłączenie rybosomu i syntezę białka PrfA), C. kontrola potranslacyjna PrfA (przyłączenie cząsteczki kofaktora (glutationu) do białka PrfA) (rycina własna, na podstawie [83-86])

LIPI-3 składa się z ośmiu genów: *llsA*, *llsG*, *llsH*, *llsX*, *llsB*, *llsY*, *llsD*, *llsP* [87]. Operon LLS koduje listeriolizynę S (LLS), zmodyfikowaną potranslacyjnie

peptyd, który wykazuje właściwości zarówno bakteriocyny, jak i hemolitycznego czynnika cytotoksycznego [87-89]. Jako bakteriocyna, LLS ogranicza wzrost innych bakterii Gram-dodatnich, takich jak: *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, a nawet *L. monocytogenes* linii II (EGD i 10403S), u których brak operonu LLS [87,90].

Obecność LIPI-4 została wykazana wśród szczepów klinicznych wyosobnionych z zakażeń ośrodkowego układu nerwowego i łożyska [91], a także wśród szczepów *L. monocytogenes* SL87 (CC87) rozpowszechnionych w Azji [92].

Wyspa genomowa LGI-1 (ang. *Listeria* Genomic Island 1) koduje geny odpowiedzialne za wirulencję, oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe oraz czynniki stresowe [93]. Obecność LGI-2 wykazano po raz pierwszy u *L. monocytogenes* Scott A [94–96]. LGI-2 zawiera kasetę genów oporności na arsen (*arsR1D2R2A2B1B2*), dwa dodatkowe geny - *arsD1A1* i *cadA4* (oporność na kadm) [94,97]. Obecność LGI-3 (31,5 kbp) została potwierdzona w 2020 r. wśród przetrwałych szczepów *L. monocytogenes* [98]. LGI-3 zawiera 29 sekwencji kodujących (większość o niepoznanej dotychczas funkcji), prawdopodobnie zaangażowanych w oporność na kadm [98].

Wysepka przetrwania stresu 1 (ang. stress survival islet 1, SSI-1) (8,7 kbp) składa się z pięciu genów: *lmo0444*, *lmo0464*, *pva* (*lmo0446*), *gadD1* (*lmo0447*) i *gadT1* (*lmo0448*), które są związane z tolerancją na stres kwasowy, osmotyczny i żółciowy [99-102]. Obecność SSI-1 wśród szczepów *L. monocytogenes* jest istotna do adaptacji i przetrwania w środowisku przetwarzania żywności [101]. Z kolei, SSI-2 składa się z dwóch genów: *lin0464* i *lin0465*, kodujących odpowiednio czynnik transkrypcyjny LIN0464 oraz proteazę Pfpl korzystną dla przetrwania w warunkach stresu zasadowego i oksydacyjnego [103].

1.5. Chorobotwórczość

Pałeczki *L. monocytogenes* są czynnikiem etiologicznym listeriozy. Główną drogą zakażenia jest spożycie zanieczyszczonej żywności [104]. Częstość

występowania listeriozy jest niska, jednak wiąże się z wysokim współczynnikiem śmiertelności wśród chorych, sięgającym nawet do 30,0% [104]. Najwyższe ryzyko zachorowania występuje wśród osób starszych (powyżej 65 roku życia), kobiet w ciąży i noworodków oraz chorych z obniżoną odpornością (po przeszczepach, alkoholików, w trakcie chemioterapii, chorych na zespół nabytego niedoboru odporności (ang. acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)) [104]. Wśród kobiet w ciąży, częstość występowania listeriozy jest 20-krotnie wyższa niż w populacji ogólnej [105]. Do zakażenia płodu może dojść w łonie matki drogą transmisji pałeczek przez łożysko lub podczas porodu (na skutek kontaktu z skolonizowanym kanałem rodnym matki, która jest bezobjawową nosicielką *L. monocytogenes*) [106]. Rozwój listeriozy u ciężarnej obciążony jest ryzykiem poronienia, urodzenia martwego dziecka lub listeriozą u noworodków [106]. Listerioza u osób dorosłych występuje w formie nieinwazyjnej, której objawy obejmują głównie przewód pokarmowy (nudności, wymioty, biegunka) oraz inwazyjnej (przebiega z zakażeniem ośrodkowego układu nerwowego) [104]. U noworodków wyróżnia się dwie formy listeriozy: wczesna listerioza (charakterystyczna dla noworodków urodzonych przedwcześnie), której objawy pojawiają się około 36 godzin od narodzin i obejmują sepsę, zaburzenia oddechowe i zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych oraz późna listerioza, która dotyczy noworodków urodzonych w prawidłowym terminie, a objawy pojawiają się od dwóch do kilku tygodni od porodu i obejmują sepsę i zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych [107].

1.5.1. Epidemiologia zakażeń

Według danych przedstawionych przez EFSA, w 2021 r., listerioza była piątą najczęściej zgłaszaną chorobą odzwierzęcą w Unii Europejskiej [35]. Potwierdzono 2183 przypadki listeriozy, obejmujące 923 hospitalizacje oraz 196 zgonów [35]. Liczba przypadków listeriozy w Polsce w ostatnich latach utrzymywała się na stałym poziomie. W 2022 r. potwierdzono 142 przypadki tej choroby [108].

Na świecie notowanych było wiele epidemii listeriozy, związanych głównie ze spożyciem zanieczyszczonej żywności. Najważniejsze z nich przedstawiono w tab. 2

Tabela 2. Najważniejsze epidemie listeriozy na świecie związane z żywnością

	Rok	Kraj / Liczba stanów	Źródło <i>L. monocytogenes</i>	Liczba chorych	Liczba zgonów (liczba poronień)	Piśmien-nictwo
STANY ZJEDNOCZONE	1985	Los Angeles	Ser typu meksykańskiego	142	41 (0)	[109]
	1998-1999	11 stanów	Hot dog	108	14 (4)	[110]
	2011	28 stanów	Kantalupa	147	33 (1)	[111]
	2012	13 stanów	Ser Ricotta	22	4 (1)	[112]
	2015	10 stanów	Sery miękkie dystrybuowane przez Karoun Dairies	30	3 (1)	[113]
	2014-2015	12 stanów	Jabłka w karmelu	35	7 (1)	[114]
	2016	9 stanów	Pakowana sałata	19	1 (0)	[115]
	2017	4 stany	Miękki ser z surowego mleka	8	2 (0)	[116]
	2020	17 stanów	Grzyby Enoki	36	4 (2)	[117]
	2020	4 stany	Wędliny	12	1 (0)	[118]
	2021	4 stany	Meksykański ser „Queso Fresco”	11	1 (0)	[119]
	EUROPA	2015-2018	Austria, Dania, Finlandia, Szwecja, Wielka Brytania	Mrożona kukurydza	41	6 (0)
2017-2019		Holandia, Belgia	Mięsne produkty RTE	21	3 (1)	[121]
od 2015		Dania, Niemcy, Francja	Produkty RTE z łososia	12	4 (0)	[122]
2014-2019		Dania, Estonia, Finlandia, Francja, Szwecja	Produkty rybne wędzone na zimno	22	5 (0)	[123]
2019		Hiszpania	Chłodzony, pieczony wyrób z mięsa wieprzowego	222	3 (6)	[124]
AUSTRALIA	2018	Australia	Melony	20	7 (1)	[125]
AFRYKA	2017-2018	Republika Afryki Południowej	Mięsne produkty RTE	1024	200	[126]

RTE-żywność gotowa do spożycia (ang. ready to eat)

1.6. Antybiotykooporność *Listeria monocytogenes*

Podstawową formą leczenia chorych z potwierdzoną listeriozą jest antybiotykoterapia. W leczeniu najczęściej wykorzystuje się antybiotyki beta-laktamowe (penicylina, ampicylina) w monoterapii lub w połączeniu z aminoglikozydami (gentamycyna) [127-129]. U pacjentów uczulonych na antybiotyki beta-laktamowe stosuje się trimetoprim-sulfametoksazol [129,130]. W leczeniu listeriozy zastosowanie ma również linezolid, wankomycyna, ryfampicyna, czy kabapenemy [129,130]. Erytromycyna jest stosowana w przypadku listeriozy u kobiet w ciąży [131].

Pałeczki *L. monocytogenes* są wrażliwe na większość antybiotyków stosowanych w lecznictwie [127]. Niepokojącym zjawiskiem notowanym w ostatnich latach jest wzrost oporności na antybiotyki wśród opisanych bakterii [132]. Wykazano ich naturalną oporność na oksacylinę, cefalosporyny, linkozamidy i fosfomycynę [127]. Profil antybiotykooporności jest zróżnicowany w zależności od źródła izolacji szczepu oraz regionu geograficznego, ponieważ w różnych rejonach świata zastosowanie mają różne antybiotyki w leczeniu chorych oraz w hodowli zwierząt [133]. Pierwszy wieloantybiotykooporny szczep *L. monocytogenes* wyizolowany z materiału klinicznego został opisany w 1988 r. [132]. Od tego czasu opisywano kolejne wieloantybiotykooporne szczepy tego gatunku [134–136].

Mechanizmy oporności na antybiotyki u *L. monocytogenes* związane są z pompami wyrzutu (ang. efflux pumps) (oporność na cefotaksym, makrolidy i fluorochinolony) [137] oraz pozyskiwaniem genów oporności na drodze koniugacji, głównie od bakterii z rodzaju *Enterococcus* i *Streptococcus* [138].

Stres środowiskowy może również przyczyniać się do rozwoju oporności na szereg środków przeciwdrobnoustrojowych [133]. Al-Nabulsi i wsp. [139] wykazali, że narażenie na wybrane warunki stresowe (osmotyczny, kwasowy i niskie temperatury) powszechnie występujące w przetwórstwie żywności zwiększa minimalne stężenie hamujące (ang. minimum inhibitory concentration, MIC) wybranych antybiotyków (ampicyliny, tetracykliny,

doksycyliny i wankomycyny). Stałe monitorowanie oporności na antybiotyki wśród szczepów *L. monocytogenes* jest niezbędne, aby zapewnić prawidłowe leczenie pacjentów z rozpoznaną listeriozą.

1.7. Zdolność tworzenia biofilmu

Jednym z mechanizmów adaptacyjnych, pozwalającym przetrwać niekorzystne warunki środowiskowe, jest zdolność tworzenia biofilmu. Biofilm definiuje się jako zorganizowaną społeczność komórek otoczonych matrycą polimerową (wytworzoną przez drobnoustroje) i przytwierdzonych do powierzchni (biotycznej lub abiotycznej) [140].

L. monocytogenes wykazuje zdolność do tworzenia biofilmu na wielu różnych powierzchniach (w tym mających kontakt z żywnością), m.in. na stali nierdzewnej, polipropylenie czy gumie [141-143]. Struktura biofilmu chroni komórki przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi, również przed działaniem środków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (antybiotyki, preparaty dezynfekcyjne), co pozwala na przetrwanie *L. monocytogenes* w środowisku przetwarzania żywności (nawet do 10 lat) [143,144]. Zdolność tworzenia biofilmu jest cechą indywidualną szczepu i zależy od wielu czynników, m.in.: temperatury, czasu, rodzaju powierzchni i dostępności składników odżywczych [145,146].

W etapie przylegania do powierzchni, największe znaczenie ma zdolność do ruchu. Geny związane z syntezą rzęsek i ruchliwością obejmują: *flaA*, *fljP*, *fliG*, *flgE*, *motA*, *motB*, *mogR* i *degU* [147]. Ponadto *quorum sensing* jest istotny w tworzeniu biofilmu. System *agr* u *L. monocytogenes* składa się z czterech genów: *agrB*, *agrD*, *agrC* i *agrA* [148]. Wykazano, że istotny udział w rozwoju biofilmu odgrywa również czynnik σ^B i PrfA [148].

1.8. Czynniki stresowe

W środowisku przetwórstwa żywności, pałeczki *L. monocytogenes* narażone są na wysoką i niską temperaturę, zmienny odczyn środowiska, wysoką osmolarność, czy środki dezynfekcyjne, które wywołują u bakterii stres. Stres

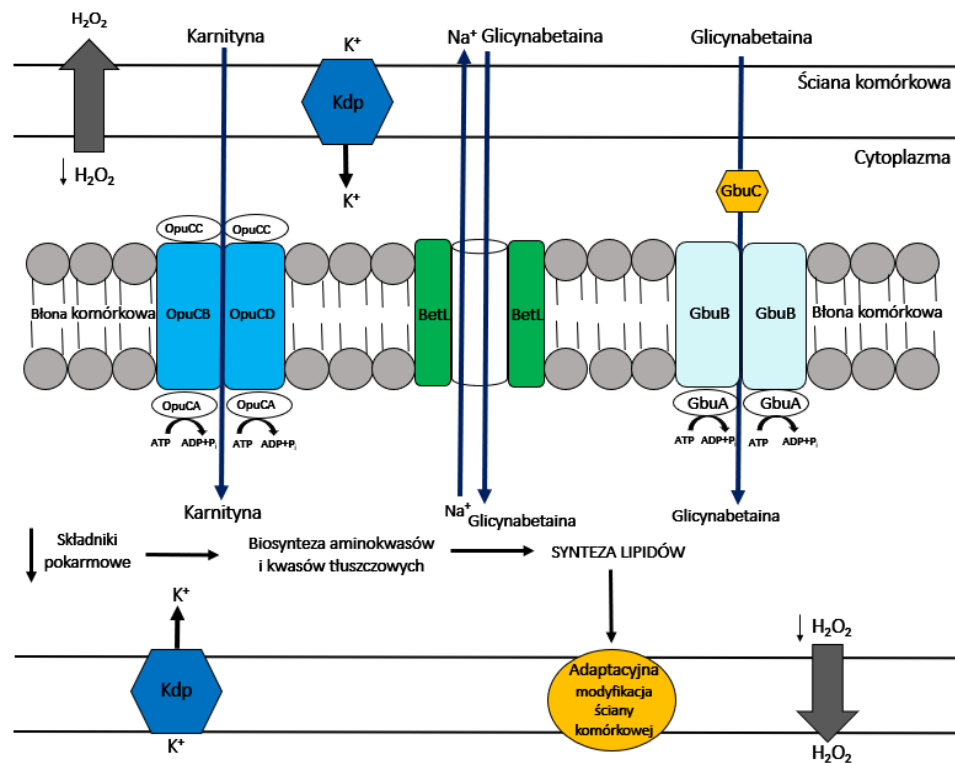
ten może prowadzić do śmierci komórki (być letalny) na skutek nieodwracalnych jej uszkodzeń lub subletalny, umożliwiający przeżycie. W przypadku stresu subletalnego może dojść do wytworzenia mechanizmów adaptacyjnych skutkujących zwiększoną opornością na kolejne dawki czynnika stresowego lub opornością krzyżową na inne niekorzystne czynniki [32].

1.8.1. Stres osmotyczny

Sól, to jeden z najczęściej wykorzystywanych środków konserwujących, zwłaszcza w przemyśle rybnym i mięsnym [149], dlatego stres osmotyczny jest częsty w środowisku przetwórstwa spożywczego. Wynikiem zmian osmolarności jest obrzęk lub kurczenie się komórki, a także zmiany w płynności błony cytoplazmatycznej i rozkład białek oraz materiału genetycznego [150]. Wykazano, że *L. monocytogenes* może tolerować wyższe stężenia soli, sięgające nawet do 12,0% [151]. Odpowiedź na warunki stresu osmotycznego u *L. monocytogenes* obejmuje: transport substancji kompatybilnych (osmolitów/osmoprotektantów), białka modyfikujące ścianę komórkową i białka ogólnej odpowiedzi na stres [32]. Mechanizmy zaangażowane w odpowiedź na stres osmotyczny u *L. monocytogenes* przedstawiono na ryc. 4.

Odpowiedź na stres osmotyczny u *L. monocytogenes* przebiega dwuetapowo. Początkowo, następuje gromadzenie jonów K^+ i glutaminianu, a następnie substancji kompatybilnych [152]. Funkcją osmolitów jest przywrócenie turgoru komórki oraz stabilizacja struktury enzymów [152]. Wśród substancji kompatybilnych wykorzystywanych jako osmoprotektanty przez *L. monocytogenes* zidentyfikowano: karnitynę, glicynabetinę, prolinę, acetylokarnitynę oraz gammabutYRObetaninę. L-karnityna występuje w surowym mięsie, natomiast glicynabetaina w warzywach, np. buraku cukrowym, szpinaku czy zbożach [152]. Pałeczki nie potrafią ich syntetyzować, zatem transportują je do komórki ze środowiska [153]. U *L. monocytogenes* wykazano trzy transportery substancji kompatybilnych, tj. BetL, Gbu i OpuC [32,152] (ryc. 4). Wyróżniono dwa transportery glicynabetainy. Jeden z nich -

Gbu jest zależny od ATP (adenozyno-5'-trifosforan), natomiast drugi zależny od Na^+ - BetL. Transporter BetL kodowany jest przez gen *betL*, którego ekspresja następuje natychmiast po ekspozycji na stres osmotyczny, co zapewnia ochronę w warunkach niskiego stężenia soli. Z kolei, Gbu (operon *gbuABC*) jest istotny w wyższych stężeniach soli [154]. Transporter OpuC (kodowany przez operon *opuCABCD*) jest aktywnym transporterem karnityny zależnym od ATP [152]. System ten jest utworzony z OpuCA, który hydrolizuje ATP dostarczając energię do transportu substratu przez kompleks składający się z dwóch białek transbłonowych (OpuCB i OpuCD) oraz białka wiążącego substancję rozpuszczoną (OpuCC) (ryc. 4) [155]. Jeżeli w środowisku nie są obecne osmoprotektanty, odpowiedź na stres osmotyczny oparta jest na białkach rybosomalnych Ctc [156] oraz białkach ogólnej odpowiedzi na stres, obejmujących: proteazę serynową (HtrA), której rolą jest rozkład niewłaściwie sfałdowanych białek, dwuskładnikowy układ regulacyjny LisRK, białko ClpC (ATPaza) i ClpP (proteaza), białka szoku zimna (ang. cold shock protein, csp), a także RelA (syntetaza pentaosforanu guanozyny [(p)ppGpp]) [157]. Niska dostępność składników odżywczych prowadzi do biosyntezy aminokwasów i kwasów tłuszczowych, co wpływa na adaptacyjne modyfikacje ściany komórkowej. Z kolei, Kdp (ang. transcriptional response regulator) to system wychwytu potasu w warunkach zmiennej osmolarności (ryc. 4) [32].

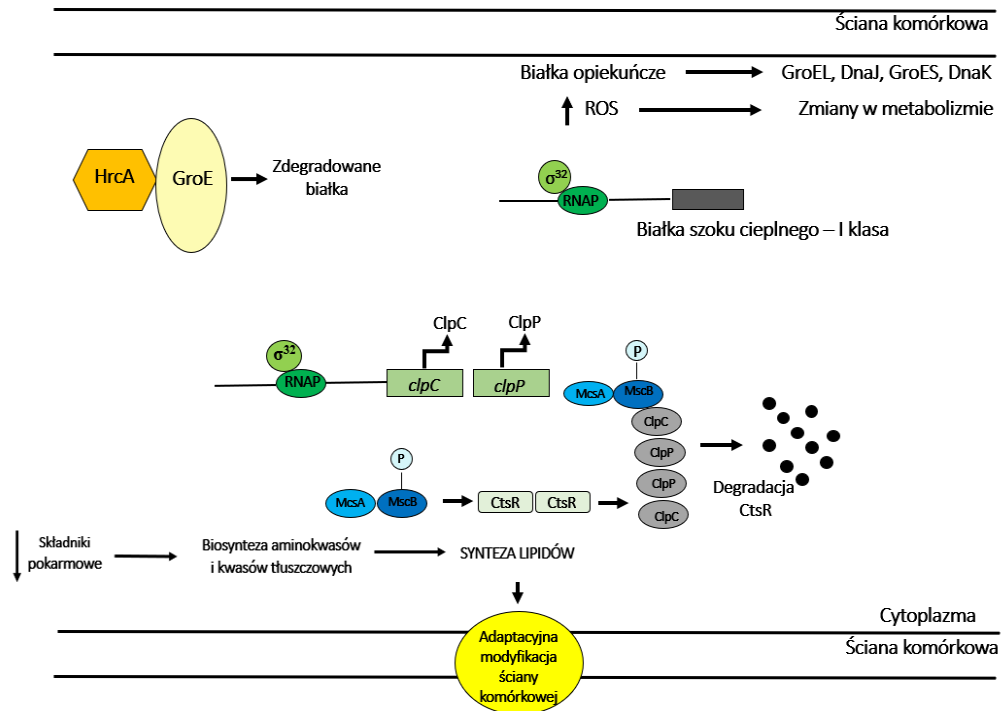


Rycina 4. Mechanizmy odpowiedzi na stres osmotyczny u *L. monocytogenes* oparte na transporcie kompatybilnych substancji rozpuszczonych. Karnityna jest transportowana przez system OpuCABCD, podczas gdy glicynobetaina może być gromadzona zarówno przez system GbuB, jak i BetL. Niska dostępność składników pokarmowych prowadzi do biosyntezy aminokwasów i kwasów tłuszczowych, co wpływa na adaptacyjne modyfikacje ściany komórkowej. Kdp (ang. transcriptional response regulator) to system wychwytu potasu w warunkach zmiennej osmolarności (rycina własna, na podstawie [32])

1.8.2. Stres temperaturowy

Temperatura, zarówno wysoka jak i niska jest powszechnie wykorzystywana celem zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności [156]. Reakcja na wysokie temperatury (stres cieplny) związana jest ze wzrostem ekspresji białek szoku cieplnego (ang. heat shock protein, Hsp). Białka Hsp stabilizują oraz zapobiegają niewłaściwemu fałdowaniu i agregacji białek (ryc. 5). Wykazano, że pałeczki *L. monocytogenes* wytwarzają trzy klasy Hsp. Geny białek klasy I i III są regulowane ujemnie, odpowiednio przez HrcA (ang. Heat-inducible transcription repressor) i CtsR (ang. negative transcription regulator) [158]. Natomiast, geny klasy II są zależne od czynnika alternatywnego σ^B . Geny białek klasy I (*groE*, *dnaK*, *dnaJ*, *groEL* i *groES*) ulegają nadekspresji podczas gromadzenia zdenaturowanych białek w cytoplazmie i działają jako opiekuńcze

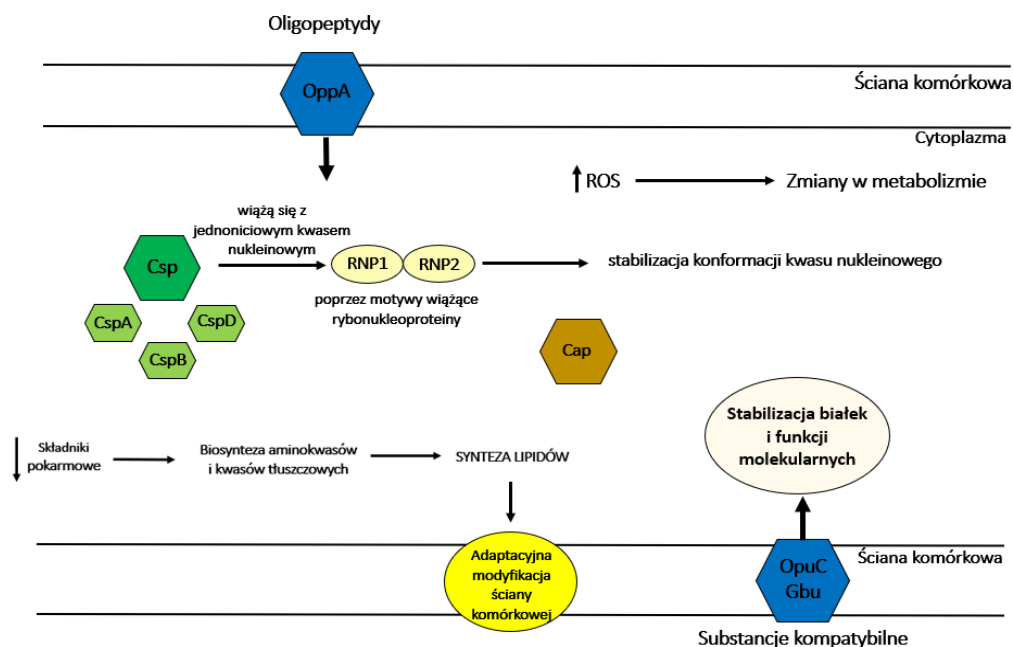
białka wewnątrzkomórkowe. Po denaturacji pod wpływem stresu cieplnego, nieprawidłowo sfałdowany HrcA nie jest w stanie związać się z docelowym DNA. W konsekwencji polimeraza RNA- σ^{32} wiąże się z docelowymi promotorami, umożliwiając transkrypcję genów szoku cieplnego klasy I. Białka GroEL i GroES (regulujące podstawowe procesy komórkowe) oraz DnaK i DnaJ (stabilizujące konformację niesfałdowanych białek) zaangażowane są w odpowiedź na stres cieplny u *L. monocytogenes*. Natomiast, geny Hsp klasy III, kodują zależne od ATP białka o aktywności kazeinolitycznej (ClpB, ClpC, ClpP i ClpE) [152]. Regulator transkrypcji genów klasy III, CtsR ulega zmianom konformacyjnym wywołanym stresem cieplnym, które uniemożliwiają jego interakcję z docelowymi promotorami. Związanie polimerazy RNA- σ^{32} z promotorami genów *clp* indukuje transkrypcję *clpC* i *clpP*. Po autofosforylacji zależnej od temperatury, McsB, wspomagany przez McsA, kieruje CtsR do degradacji przez proteazę ClpC i ClpP (ryc. 5) [32,152]. Białka szoku cieplnego klasy III wymagane są do degradacji nieprawidłowo sfałdowanych białek obecnych w cytoplazmie w warunkach stresowych (ryc. 5). Podczas stresu cieplnego można również stwierdzać ekspresję genu *recA*, aktywatora odpowiedzi SOS zaangażowanej w naprawę DNA [159].



Rycina 5. Mechanizmy odpowiedzi na stres cieplny u *L. monocytogenes*. A. Obecność w cytoplazmie niesfałdowanych białek uniemożliwia ich interakcje z HrcA (ang. Heat-inducible transcription repressor). Białko GroE działa jako wewnątrzkomórkowe białko opiekuńcze. Po denaturacji pod wpływem stresu cieplnego, nieprawidłowo sfałdowany HrcA nie jest w stanie związać się z docelowym DNA. W konsekwencji polimeraza RNA- σ^{32} wiąże się z docelowymi promotorami, umożliwiając transkrypcję genów szoku ciepłego klasy I. B. Podobnie, CtsR (ang. negative transcription regulator) ulega zmianom konformacyjnym wywołanym stresem cieplnym, które uniemożliwiają jego interakcję z docelowymi promotorami. Związanie polimerazy RNA- σ^{32} z promotorami genów *clp* indukują transkrypcję *clpC* i *clpP*. Po autofosforylacji zależnej od temperatury, McsB, wspomagany przez McsA, kieruje CtsR do degradacji przez proteazę ClpC i ClpP. Niska dostępność składników pokarmowych prowadzi do biosyntezy aminokwasów i kwasów tłuszczowych, co wpływa na adaptacyjne modyfikacje ściany komórkowej (rycina własna, na podstawie [32,152])

Kolejnym wariantem ekspozycji na niekorzystne warunki jest stres niskich temperatur, czyli spadek temperatury poniżej optymalnej. Reakcja bakterii na ten stres jest trzyetapowa i obejmuje: szok zimna, aklimatyzację i adaptację [160]. Podczas ekspozycji na niskie temperatury w komórce bakteryjnej stwierdza się nieprawidłowo sfałdowane białka, reorganizację ściany komórkowej, czy zmiany w metabolizmie [161]. W odpowiedzi na spadek temperatury u *L. monocytogenes* rozpoczyna się synteza Csp. Csp to małe białka

(65-70 aminokwasów) o wysoce konserwatywnej strukturze [162]. Csp określane są jako molekularne białka opiekuńcze, które umożliwiają replikację, transkrypcję oraz translację w warunkach niskiej temperatury [163]. Csp wiążą się do jednoniciowego kwasu nukleinowego poprzez motyw rybonukleoproteiny: RNP1 i RNP2, stabilizując w ten sposób konformację kwasu nukleinowego i zapobiegając jego degradacji (ryc. 6) [164]. Udział białek CspA, CspB i CspD w odpowiedzi na stres niskich temperatur jest zróżnicowany [162]. Podczas ekspozycji na stres niskich temperatur następuje synteza białek aklimatyzacji do zimna (ang. cold acclimatization protein, Cap), które wspierają działanie Csp (ryc. 6) [164]. Wśród innych mechanizmów, uzupełniających działanie Csp i Cap są również osmolity: glicynobetaina, karnityna, γ -butyrobetaina, betaina proliny i 3-dimetylosulfoniopropionian i krioprotektanty [165]. Transport osmolitów odbywa się za pośrednictwem BetL, Gbu i OpuC [152]. Kluczową rolę jako krioprotektantów przypisuje się kwasom tłuszczowym o rozgałęzionych łańcuchach, które zapewniają integralność błony [166]. Wychwytywanie oligopeptydów ze środowiska za pośrednictwem transportera OppA może także przyczynić się do odpowiedzi adaptacyjnej na stres niskich temperatur u *L. monocytogenes* [152]. Mechanizmy zaangażowane w stres niskich temperatur u *L. monocytogenes* przedstawiono na ryc. 6.



Rycina 6. Mechanizmy odpowiedzi na stres niskich temperatur u *L. monocytogenes*. Csp (ang. cold shock protein) wiążą się do jednoniciowego kwasu nukleinowego poprzez motyw rybonukleoproteiny: RNP1 i RNP2, stabilizując w ten sposób konformację kwasu nukleinowego i zapobiegając jego degradacji. Udział w stresie niskich temperatur mają również białka Cap (ang. cold acclimatization protein), substancje kompatybilne transportowane za pośrednictwem OpuC i Gbu do komórki, a także modyfikacje ściany komórkowej (rycina własna, na podstawie [32])

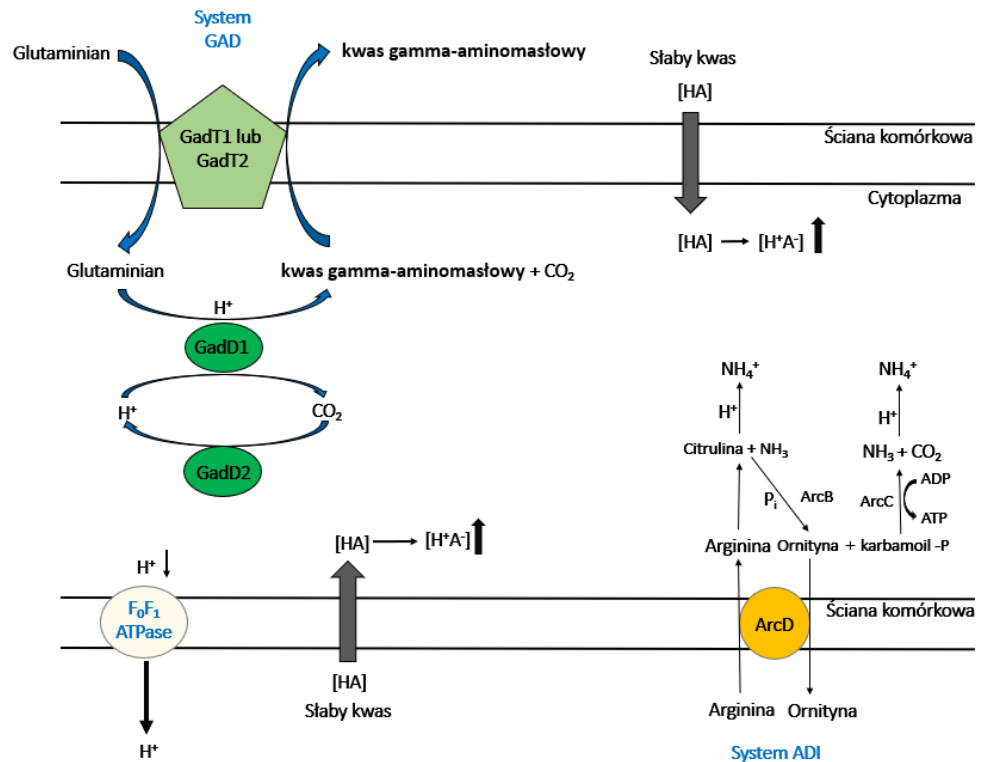
1.8.3. Stres kwasowy i zasadowy

W zakładach przetwórstwa spożywczego pałeczki *L. monocytogenes* narażone są na działanie wielu kwasów (benzoesowy, salicylowy, mlekowy, czy propionowy), które są powszechnie stosowane jako środki konserwujące, czy dezynfekujące. Inne wyzwania związane z niskim pH występują podczas zakażenia, w żołądku człowieka [167,168].

Podczas stresu kwasowego, niskie pH wpływa na zwiększenie stężenia jonów H^+ , obniżając wewnątrzkomórkowe pH (pH_i) i hamując wzrost drobnoustrojów [167]. Bakterie przywracają homeostazę wewnątrz komórki za pośrednictwem mechanizmu biernego (zwiększenie pojemności buforowej cytoplazmy) lub aktywnego (za pomocą pompy protonowej) [167].

U *L. monocytogenes* wykazano cztery potencjalne mechanizmy odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy podczas stresu kwasowego i są to:

odpowieź adaptacyjna ATR (ang. acid tolerance response), system dekarboksylazy glutaminianowej (ang. glutamate decarboxylase activity, GAD), system domniemanej deiminazy argininowej (ang. putative arginine deiminase, ADI) i enzym F_1F_0 -ATPaza [114], które przedstawiono na ryc. 7. ATR odpowiedzialny jest za ochronę komórki po krótkotrwałej ekspozycji na łagodne kwasy i dotyczy zarówno form planktonicznych, jak i komórek w strukturze biofilmu [169]. ATR warunkuje tolerancję na niższe pH, po wcześniejszej ekspozycji na stres kwasowy [169]. Z kolei, system GAD umożliwia przeżywalność w produktach spożywczych o niskim pH (np. soki, jogurty, sałatki, majonez). GAD regulowany jest przez pięć genów: *gadD1*, *gadD2* i *gadD3*, które kodują dekarboksylazy oraz *gadT1* i *gadT2* - antyportery [170]. System GAD przekształca zewnątrzkomórkowy glutaminian do kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), co skutkuje podniesieniem pH_i [171]. Następnie, GABA jest wymieniany na glutaminian za pośrednictwem antyportera GadT1 lub GadT2, co przyczynia się do alkalizacji środowiska i przywrócenia homeostazy pH [101]. Z kolei, system ADI aktywowany jest w odpowiedzi na ekstremalny stres kwasowy [172]. ADI konwertuje, importowaną ze środowiska zewnętrznego, argininę do ornityny, CO₂, amoniaku i ATP. W procesie tym uczestniczą trzy enzymy, tj. ADI, karbamoiltransferaza i kinaza karbaminianowa, kodowane odpowiednio przez geny *arcA*, *arcB* i *arcC*. Ornityna jest następnie transportowana z komórki, w sposób niezależny od ATP, poprzez związany z błoną antyporter, kodowany przez gen *arcD*. Natomiast amoniak, powstający jako produkt uboczny, reaguje z wewnątrzkomórkowymi protonami wytwarzając NH⁴⁺, a tym samym prowadząc do podniesienia pH cytoplazmy i ochrony komórki przed kwaśnym środowiskiem (ryc. 7) [173]. ATP powstałe podczas konwersji argininy może być wykorzystywane przez F_1F_0 -ATPazę. Enzym ten generuje gradient protonów, wypływ H⁺ i przywrócenie homeostazy [101]. Składa się z dwóch odrębnych domen: błonowej (F₀), działającej jako kanał dla translokacji protonów oraz cytoplazmatycznej (F₁), która katalizuje syntezę ATP (ryc. 7) [174].



Rycina 7. Systemy odpowiedzi na stres kwasowy u *L. monocytogenes*. GAD (ang. glutamate decarboxylase activity) przekształca zewnątrzkomórkowy glutaminian w kwas gamma-aminomasłowy (GABA), co powoduje wzrost pH. Następnie GABA jest wymieniany na glutaminian poprzez antyporter GadT1 lub GadT2, co przyczynia się do alkalizowania środowiska i przywracania homeostazy pH. Natomiast system ADI (ang. putative arginine deiminase) przetwarza importowaną ze środowiska zewnętrznego argininę w ornitynę, CO₂, amoniak i ATP. W procesie tym biorą udział trzy enzymy: ADI, karbamoilotransferaza i kinaza karbaminianowa. Powstający jako produkt uboczny amoniak reaguje z protonami wewnątrzkomórkowymi, wytwarzając NH₄⁺, co prowadzi do wzrostu pH cytoplazmy i ochrony komórki przed kwaśnym środowiskiem. F₁F₀-ATPaza generuje gradient protonów, wpływ H⁺ przywraca homeostazę (rycina własna, na podstawie [32])

W środowisku przetwarzania żywności *L. monocytogenes* może być narażona na stres związany z stosowaniem środków dezynfekujących o wyższym pH (odczyn zasadowy). Informacje dotyczące odpowiedzi na stres zasadowy (ang. Alkali-Tolerance Response, AITR) u tych pałeczek są ograniczone. Mechanizm tolerancji na wyższe pH związany jest z indukcją transporterów i enzymów odpowiedzialnych na zatrzymanie protonów i modyfikację ściany komórkowej [175]. Podczas stresu zasadowego, udział mają ogólne białka stresowe oraz notuje się zwiększone wytwarzanie ATP [176]. Natomiast Giotis i wsp. [177] sugerują, że synteza fosfatyz (zwłaszcza fosfatazy zasadowej) wspomagają odpowiedź *L. monocytogenes* na wyższe pH. Zasadowy

odczyn środowiska indukuje u tych bakterii niespecyficzną oporność na wiele stresów [177].

1.8.4. Dostępność składników odżywczych

Dostępność składników odżywczych w przyrodzie jest zróżnicowana. Środowisko przetwarzania żywności jest zasobne w odpady, takie jak krew, soki owocowe, czy resztki pokarmu. Jednak dostępność składników odżywczych znacznie spada po procesach dezynfekcji. *L. monocytogenes* wykazuje zdolność do wzrostu zarówno przy niedoborze, jak i nadmiarze składników odżywczych [178]. Przy niedostatecznej ich dostępności pałeczki inicjują reakcję przeżycia głodowego (ang. starvation survival response, SSR) [179]. Prawdopodobnie podczas stresu niedoboru składników, substancje uwolnione z martwych komórek własnych są wykorzystywane przez *L. monocytogenes*, aby umożliwić przetrwanie pozostałej populacji [180]. Dane na temat wpływu nadmiaru składników odżywczych na *L. monocytogenes* są ograniczone i dotyczą głównie wpływu na zdolność tworzenia biofilmu [141-143].

1.9. Adaptacja do stresu

Inicjowana stresem występującym w środowisku, adaptacyjna odpowiedź na stres kwasowy, osmotyczny i oksydacyjny może chronić pałeczki *L. monocytogenes* przed podobnymi warunkami występującymi w przewodzie pokarmowym człowieka, a tym samym bezpośrednio wspomagać ich potencjał chorobotwórczy [181]. Wykazano, że ekspozycja na subletalny stres kwasowy (pH 5,0), cieplny (46°C) i oksydacyjny (100 ppm H₂O₂) zwiększała tolerancję bakterii na kolejne letalne warunki, odpowiednio pH 3,5, wyższą temperaturę (63°C) i wysokie stężenia H₂O₂ (1000 ppm) [182-184].

L. monocytogenes może regulować poziom ekspresji genów i dostosować go do różnych warunków stresowych [185]. Większość szczepów tego gatunku ma pięć czynników sigma, w tym jeden główny – σ^A i cztery alternatywne - σ^B , σ^C , σ^H i σ^L [33]. U *L. monocytogenes*, czynniki te kontrolują ponad 300 genów, w tym geny związane ze stresem i kodujące czynniki wirulencji. Główne mechanizmy odpowiedzi na stres związane są

z alternatywnymi czynnikami sigma, z których σ^B odgrywa kluczową rolę [186]. Po raz pierwszy, rola σ^B została wykazana w odpowiedzi na stres osmotyczny [187]. Dotychczas stwierdzono udział σ^B podczas ekspozycji na wiele stresów środowiskowych, w tym osmotycznego [187,188], związanego ze zmiennym pH [189,190], temperaturowego [191] oraz oksydacyjnego [192]. Aktywność σ^B , a tym samym ogólna aktywacja odpowiedzi na stres w komórkach *L. monocytogenes*, jest regulowana przez złożoną strukturę znaną jako stresosom [193]. Z kolei, PrfA kontroluje ekspresję genów wirulencji. Istnieje rozbudowany system powiązań pomiędzy σ^B i PrfA, którego celem jest zapewnienie optymalnej ekspresji genów [194], zarówno podczas cyklu wewnątrzkomórkowego, jak i odpowiedzi na warunki stresowe. Wykazano [195,196], że istnieje system powiązań pomiędzy σ^B a AgrA w tworzeniu biofilmu w warunkach stresu środowiskowego.

1.10. Oporność krzyżowa

Pałeczki *L. monocytogenes* narażone na jeden czynnik stresowy mogą nabyć oporność na inne niekorzystne warunki, co określa się jako oporność krzyżową [197]. Oporność krzyżowa jest istotnym aspektem w przemyśle spożywczym, gdzie często stosuje się wiele czynników jednocześnie w celu zapewnienia bezpieczeństwa i jakości żywności [197,198]. Wykazano [197], że wstępna ekspozycja na stres osmotyczny umożliwia bakteriom wzrost w niskich temperaturach. Z kolei, eksponowane na stres kwasowy komórki *L. monocytogenes* wykazują wyższą oporność na H₂O₂, etanol oraz stres cieplny, osmotyczny i oksydacyjny [199,200]. Ochrona przed śmiertelnym stresem kwasowym u *L. monocytogenes* może być indukowana przez subletalne ekspozycje na pH, NaCl i stres cieplny [32]. Podkreślić należy, że ekspozycja na warunki stresowe może przyczynić się do wzrostu oporności na antybiotyki u *L. monocytogenes*. Oporność m.in. na penicylinę, ampicylinę, gentamycynę oraz tetracykliny po ekspozycji na stres osmotyczny i kwasowy wykazali Faezi-Ghasemi i Kazemi [201]. Nabycie oporności na antybiotyki w warunkach stresowych, zwłaszcza izolatów pokarmowych, może prowadzić do niepowodzenia leczenia pacjentów z listeriozą.

2. HIPOTEZA BADAWCZA I CEL PRACY

Obecność pałeczek *L. monocytogenes* w środowisku oraz ich szybka adaptacja do zmieniających się warunków stanowią istotny element zagrożenia dla ochrony zdrowia publicznego. Ze względu na wysoką śmiertelność z powodu listeriozy, poznanie wpływu czynników stresowych na *L. monocytogenes* wydaje się koniecznością.

W badaniach własnych przyjęto hipotezę badawczą zakładającą, że czynniki stresowe, z którymi pałeczki *L. monocytogenes* mogą mieć kontakt w różnych środowiskach, wywołują zmiany w ich cechach fenotypowych i genotypowych.

Stąd, celem głównym niniejszej rozprawy była ocena wpływu wybranych czynników stresowych na cechy fenotypowe i genotypowe u badanych szczepów *L. monocytogenes*.

Cele szczegółowe niniejszej rozprawy to:

- 1) ocena podobieństwa genetycznego izolatów *L. monocytogenes* oraz charakterystyka fenotypowa i genotypowa różnych genetycznie szczepów,
- 2) ocena wpływu wybranych czynników stresowych na wzrost i przeżywalność badanych szczepów *L. monocytogenes*,
- 3) ocena wpływu czynników stresowych na zmiany cech fenotypowych oraz poziom ekspresji genu *sigB* i *agrA* względem genu referencyjnego *gap*.

3. MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzane w ramach niniejszej rozprawy podzielono na dwa etapy. Pierwszy z nich obejmował wstępną charakterystykę szczepów *L. monocytogenes* oraz ocenę wpływu czynników stresowych na ich wzrost i przeżywalność. Z kolei, w drugim etapie oceniano wpływ wybranych warunków stresowych na zmiany cech fenotypowych i poziom ekspresji genów (*sigB* i *agrA*).

3.1. Pierwszy etap badań

3.1.1. Materiał do badań

Materiał do badań stanowiło 80 izolatów *L. monocytogenes* pochodzących z kolekcji Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, izolowanych z materiału klinicznego oraz z żywności. Uprzednio dokonywano potwierdzenia przynależności do gatunku z zastosowaniem metody MALDI TOF MS (laserowa jonizacja próbki wspomagana matrycą z pomiarem czasu przelotu jonów, ang. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) przy użyciu platformy IVD MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH). W przypadku izolatów klinicznych, numeracja szczepów wchodzących w skład kolekcji uniemożliwia osobom niepowołanym powiązanie ich w jakikolwiek sposób z pacjentem, od którego je izolowano. Szczepy z materiału klinicznego stanowiły część populacji badanej przez Panią dr Katarzynę Grudlewską-Buda w ramach Jej rozprawy doktorskiej i zostały przez Nią scharakteryzowane pod kątem przynależności do grup serologicznych, obecności genów kodujących wybrane czynniki wirulencji oraz antybiotykowrażliwości. Danych tych użyto w pracy w celu przedstawienia pełnej i spójnej charakterystyki wszystkich szczepów ujętych w badaniu. Pozostałe badania z wykorzystaniem szczepów wyhodowanych z materiału klinicznego przeprowadzono w ramach niniejszej rozprawy. Pochodzenie badanych izolatów *L. monocytogenes* przedstawiono w tab. 3. W doświadczeniu wykorzystano szczep wzorcowy *L. monocytogenes* ATCC 19111 z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych (ang. American Type

Culture Collection, ATCC) oraz *L. monocytogenes* IW 41 z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów.

Tabela 3. Pochodzenie badanych izolatów (n=80)

	Pochodzenie izolatów	Oznakowanie izolatów	Liczba i procent izolatów
Materiał kliniczny	Krew	53K, 56K, 57K, 58K	4; 5,0%
	Płyn mózgowo-rdzeniowy	29K, 34K, 38K, 55K	4; 5,0%
	Wymaz z pochwy	15K, 16K, 30K, 32K	4; 5,0%
	Wymaz z kanału szyjki macicy	8K	1; 1,25%
	Guz zstępnicy	50K	1; 1,25%
	Zastawka serca	52K	1; 1,25%
	Krew z cewnika	49K	1; 1,25%
	Wymaz z ucha	23K	1; 1,25%
	Wymaz z gardła	54K	1; 1,25%
	Płyn z otrzewnej	18K	1; 1,25%
	Płyn dializacyjny	37K	1; 1,25%
Żywność	Łosoś	1ł, 2ł, 3ł, 4ł, 5ł, 6ł, 7ł, 8ł, 11ł, 14ł, 15ł, 17ł, 19ł, 20ł, 22ł, 24ł, 26ł, 27ł, 28ł, 33ł	20, 25,0%
	Mrożonki warzywne	113M, 131M, 132M, 138M, 150M, 153M, 155M, 163M, 224M, 243M, 258M, 260M, 261M, 268M, 297M, 299M, 307M, 314M, 317M, 340M	20, 25,0%
	Wędliny	458W, 459W, 460W, 461W, 462W, 463W, 464W, 465W, 469W, 470W, 471W, 472W, 473W, 474W, 475W, 476W, 477W, 479W, 481W, 482W	20, 25,0%

K-materiał kliniczny, ł-łosoś, M-mrożonki warzywne, W-wędliny

3.1.2. Przechowywanie izolatów

Do czasu rozpoczęcia badań, izolaty *L. monocytogenes* przechowywano w temperaturze -80°C w bulionie mózgowo-sercowym (ang. brain heart infusion, BHI) (bioMérieux) z dodatkiem 15,0% glicerolu (Avantor).

3.1.3. Przygotowanie izolatów do badań

Badane izolaty wysiewano z zamrożenia na podłoże columbia agar z dodatkiem 5,0% krwi baraniej (CAB, Graso), inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C . Następnie z wyrosłych kolonii zakładano hodowlę, którą prowadzono w tych samych warunkach. Wyrosłe izolaty *L. monocytogenes* wykorzystywano do dalszych badań.

3.1.4. Ocena podobieństwa genetycznego izolatów

Ocenę podobieństwa genetycznego badanych izolatów przeprowadzono z zastosowaniem elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (ang. pulsed field gel electrophoresis, PFGE), która uznawana jest za, tzw. „złoty standard”. Genotypowanie wykonywano zgodnie ze standardową procedurą operacyjną PulseNet PFGE dla *L. monocytogenes* [202].

W tym celu, z 20-godzinnych hodowli *L. monocytogenes* na podłożu CAB, przygotowywano zawiesinę bakterii w 3 ml buforu TE (10 mM Tris-HCl, 100mM EDTA, pH 8,0) (Novazym) o gęstości 4,0 w skali MacFarlanda. Następnie, 200 μl zawiesiny przenoszono do probówki typu eppendorf i dodawano 40 μl lizozymu (10 mg/ml, Eurx). Próby inkubowano w temperaturze 55°C przez 40 minut. Dodawano 10 μl proteiny K (20 mg/ml, Thermo Fisher Scientific) i delikatnie mieszano poprzez pipetowanie. Następnie, mieszaninę zawieszano w 200 μl 1,0% agarozы (Certified Megabase) (Bio-Rad) i umieszczano w foremkach do bloczków (Bio-Rad). Po zestaleniu (temperatura pokojowa, 15 minut), bloczki inkubowano w temperaturze 54°C przez 2 godziny w 1 ml buforu litycznego (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 1,0 % laurylosarkosyl (Sigma-Aldrich), 0,15 mg/ml proteiny K). Po okresie inkubacji, bloczki przemywano dwukrotnie w wodzie ultraczystej (A&A

Biotechnology) i czterokrotnie w buforze TE, w temperaturze 50°C, odpowiednio po 15 minut z delikatnym mieszaniem i po 10 minut bez mieszania.

Przed etapem cięcia enzymatycznego chromosomalnego DNA, bloczki umieszczano w buforze do pre-restrykcji o składzie: 20 µl buforu Tango (Thermo Fisher Scientific) oraz 180 µl wody ultraczystej. Pre-restrykcję prowadzono w temperaturze 30°C przez 10 minut. Restrykcję DNA prowadzono w temperaturze 30°C przez 7 godzin w 200 µl buforu do restrykcji o składzie: 2,5 µl enzymu *Apal* (10 U/µl) (Thermo Fisher Scientific), 20 µl buforu Tango i 177,5 µl wody ultraczystej. Następnie, bloczki umieszczano w buforze 0,5×TBE (Tris/Kwas Borowy/EDTA) (Bio-Rad) w temperaturze pokojowej na 10 minut.

Rozdział elektroforetyczny prowadzono w 1,0% żelu agarozowym (Certified Megabase) (Bio-Rad) z dodatkiem barwnika interkalującego Midori Green (ABO) w buforze 0,5×TBE w aparacie CHEF Mapper (Bio-Rad) stosując następujące warunki elektroforezy: początkowy i końcowy czas trwania pulsu: 4-40 sekund, napięcie: 6 V/cm, kąt pulsu: 120°, temperatura 14°C. Elektroforezę prowadzono przez 17 godzin. Wzorzec wielkości fragmentów DNA stanowił Lambda Ladder Standard (LL) (Bio-Rad). Wizualizacji obrazu dokonywano przy użyciu systemu GelDoc XR (Bio-Rad).

W celu zwizualizowania stopnia podobieństwa genetycznego między izolatami sporządzano dendrogram filogenetyczny w programie CLIQS 1D Pro (TotalLab). Analizę skupień przeprowadzono przy użyciu grupowania hierarchicznego techniką UPGMA (nieważona metoda wielu grup ze średnią arytmetyczną, ang. unweighted pair group method with arithmetic mean) i współczynnika Dice'a, jako miary odległości.

3.1.5. Wstępna charakterystyka badanych szczepów

3.1.5.1. Izolacja genomowego DNA metodą termiczną

Izolację genomowego DNA przeprowadzano z zastosowaniem metody termicznej. Pojedynczą kolonię, z hodowli 24-godzinnej na podłożu CAB,

zawieszano w 100 µl buforu 1 × Tris-EDTA (pH 8,0) (Sigma-Aldrich), następnie poddawano działaniu temperatury 90°C (termoblok, Eppendorf) przez 10 minut. Próbkę schładzano na lodzie (2 minuty), a następnie wirowano przez 5 minut (16 000 × g). Uzyskany supernatant przenoszono do kolejnych, jałowych probówek typu eppendorf. Oceniano stężenie oraz czystość otrzymanego DNA (A_{260}/A_{280}) z zastosowaniem BioPhotometru D30 (Eppendorf). Za wartość graniczną przyjmowano stosunek absorpcji przy długości fali 260 nm do absorpcji przy długości fali 280 nm (Ab_{S260}/Ab_{S280}), który wynosił 1,8-2,0.

3.1.5.2. Ocena przynależności do grup serologicznych

Ocenę przynależności badanych szczepów do grup serologicznych (1/2a-3a, 1/2b-3c, 1/2c-3c, 4b-4d-4e) przeprowadzano według metodyki opisanej przez Doumith i wsp. [28]. Jako szczepy wzorcowe, reprezentujące określone grupy serologiczne, wykorzystywano szczepy badane przez Wałęcka-Zacharska i wsp. [203]. Sekwencje starterów przedstawiono w tab. 4.

Tabela 4. Sekwencje starterów (na podstawie [28]) oraz wielkość produktów wykorzystywanych w celu oceny przynależności do grup serologicznych

Nazwa startera	Sekwencja (5' - 3')	Wielkość produktu [pz]	Serotyp <i>L. monocytogenes</i>
<i>Imo0737</i>	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	691	1/2a, 1/2c, 3a, 3c
	ACGATTTCTGCTTGCCATTC		
<i>Imo1118</i>	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	906	1/2c, 3c
	CGGCTTGTTCCGCATACTTA		
ORF2819	AGCAAAATGCCAAAACCTCGT	471	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e
	CATCACTAAAGCCTCCATTG		
ORF2110	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	597	4b, 4d, 4e
	CATCCATCCCTTACTTTGGAC		
<i>prs</i>	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	370	Wszystkie szczepy z rodzaju <i>Listeria</i>
	CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG		

pz – par zasad

Reakcję PCR przeprowadzano w 25 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej: bufor Green GoTaq®Flexi Buffer (1x) (Promega), $MgCl_2$ (2 mM) (Promega), dNTPs (0,2 mmol) (Promega), 5 par starterów: *Imo0737*, ORF2819 i ORF2110 o stężeniu 1 μ M oraz *Imo1118* (1,5 μ M) i *prs* (0,2 μ M), polimerazę DNA GoTaq (1U) (Promega), wodę ultraczystą oraz wyizolowane uprzednio DNA (2 μ l). Wykorzystywane w badaniach startery zostały zsyntetyzowane przez Pracownię Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Reakcje przeprowadzano w termocyklerze MasterCycler Pro (Eppendorf) stosując następujące warunki amplifikacji: wstępna denaturacja w temperaturze 94°C przez 3 minuty, następnie 35 cykli obejmujących: wstępną denaturację DNA (94°C, 0,5 minuty), przyłączanie starterów (53°C, 1,15 minuty), wydłużanie starterów (72°C, 1,15 minuty) oraz końcowe wydłużanie starterów (72°C, 10 minut) i przechowywanie w temperaturze 4°C do momentu wyjęcia prób.

Uzyskane produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym (Blirt) z dodatkiem barwnika Midori Green (ABO) w buforze 1xTBE w obecności wzorca wielkości DNA (GeneRuler™ 3000 bp DNA Ladder) (Fermentas). Elektroforezę prowadzono przez jedną godzinę przy napięciu 90V. Wizualizacji i archiwizacji elektroforegramów dokonywano z zastosowaniem systemu GelDoc XR.

3.1.5.3. Ocena występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji

Wśród badanych szczepów *L. monocytogenes* wykrywano obecność 10 genów kodujących wybrane czynniki wirulencji: białko powierzchniowe ActA (*actA*), białko FbpA (*fbpA*), listeriolizynę O (*hly*), adhezynę (*iap*), internaliny A i B (*inIA*, *inIB*), metaloproteazę (*mpl*), fosfolipazy (*plcA*, *plcB*) oraz plejotropowy regulator wirulencji (*prfA*) z zastosowaniem techniki multipleks PCR. Przygotowywano trzy oddzielne reakcje: I (geny: *fbpA*, *plcA*, *hlyA*), II (geny: *plcB*, *inIB*, *actA*, *iap*) i III (geny: *inIA*, *mpl*, *prfA*). Sekwencje starterów oraz warunki amplifikacji przedstawiono w tab. 5.

Tabela 5. Sekwencje starterów oraz warunki amplifikacji trzech reakcji multipleks PCR określających obecność genów kodujących uwzględnione w badaniu czynniki wirulencji

Reakcja	Gen	Sekwencja starterów (5'-3')	Wielkość produktu [pz]	Písmien-nictwo	Warunki amplifikacji
I	<i>fbpA</i>	TTATTCCTCGCATCCTAGC	435	[3]	Wstępna denaturacja: 94°C/2 min <u>35 cykli:</u> Denaturacja: 94°C/15 s Przyłączenie: 48,5°C/30 s Elongacja: 72°C/50 s Końcowa elongacja: 72°C/1 min
		TATCAATTCGACCTGCTGAG			
	<i>plcA</i>	ACACGAGCAATAAAATCCCT	278	[204]	
		ATACTGACGAGGTGTGAATG			
	<i>hly</i>	TTTTCGATTGGCGTCTTAGGA	101	[3]	
		ACTGAAGCAAAGGATGCATCTG			
II	<i>plcB</i>	GCAAGTGTCTAGTCTTTCCGG	794	[205]	Wstępna denaturacja 94°C/2 min <u>16 cykli:</u> Denaturacja: 94°C/30 s Przyłączenie: 57°C/45 s Elongacja: 72°C/45 s <u>19 cykli:</u> Denaturacja: 94°C/30 s Przyłączenie: 49°C/45 s Elongacja: 72°C/45 s Końcowa elongacja: 72°C/1 min
		ACCTGCCAAAGTTTGCTGTGA			
	<i>inlB</i>	TCCGACTAAACAAGGCTATG	302	[3]	
		TGTACCATAATTTCCGCCA			
	<i>actA</i>	ACGAACAAAGCAGACCTAAT	231	[206]	
		TGTACCATAATTTCCGCCA			
	<i>iap</i>	ACAAGCTGCACCTGTTGCAG	131	[206]	
		TGACAGCGTGTGTAGTAGCA			
III	<i>inlA</i>	CAGGCAGCTACAATTACACA	2341	[205]	
		ATATAGTCCGAAAACCACATCT			
	<i>mpl</i>	TATGACGGTAAAAGCAGATT	1458	[205]	
		TTCCAAGCTTCAGCAACTT			
	<i>prfA</i>	CATGAACGCTCAAGCAGAAG	706	[205]	
		AATTTTCCAAGTAGCAGGA			

pz – par zasad

Reakcję multipleks PCR przeprowadzano w objętości 25 µl, a skład mieszaniny reakcyjnej stanowił: bufor Green GoTaq®Flexi Buffer (1x), MgCl₂ (2 mM), dNTPs (0,2 mmol), pary starterów o stężeniu 0,4 µM (Oligo.pl) w przypadku reakcji I i II oraz o stężeniu 0,2 µl (Oligo.pl) – reakcja III, polimeraza DNA GoTaq (1U), woda ultraczysta oraz 2 µl DNA. Kontrolę dodatnią reakcji PCR

stanowiło DNA szczepu wzorcowego *L. monocytogenes* IW 41, mającego wszystkie wykrywane w badaniu geny odpowiedzialne za wirulencję.

Uzyskane produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Midori Green w buforze 1×TBE w obecności wzorca wielkości DNA (GeneRuler™ 1000 bp DNA Ladder (produkty reakcji I i II) oraz GeneRuler™ 3000 bp DNA Ladder (produkty reakcji III) (Fermentas). Elektroforezę prowadzono przez jedną godzinę przy napięciu 90V. Wizualizację i archiwizację elektroforegramów przeprowadzono z zastosowaniem systemu GelDoc XR.

3.1.5.4. Ocena wrażliwości na antybiotyki

Ocenę wrażliwości na antybiotyki przeprowadzano z zastosowaniem metody krążkowo-dyfuzyjnej. W tym celu, z 24-godzinnych hodowli badanych szczepów, przygotowywano zawiesinę o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda w 0,9% roztworze soli fizjologicznej (Avantor). Zawiesiny wysiewano na podłoże Mueller Hinton Agar z 5,0% krwią końską i 20 mg/l β-NAD (MHF, Graso), a następnie nakładano krążki z antybiotykiem. Oceniano wrażliwość szczepów na penicylinę (1 IU), ampicylinę (2 µg), meropenem (10 µg), erytromycynę (15 µg) i trimetoprim-sulfametoksazol (1,25-23,75 µg) (Argenta). Przygotowane antybiogramy inkubowano w temperaturze 35°C przez 20 godzin. Po okresie inkubacji mierzono strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków z antybiotykiem. Wyniki analizowano zgodnie z zaleceniami Europejskiego Komitetu ds. Lekowrażliwości (ang. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) wersja 12.0 [207]. Jako kontrolę prawidłowości wykonania oznaczenia antybiotykowrażliwości zastosowano szczep wzorcowy *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

3.1.5.5. Ocena wartości minimalnego stężenia hamującego i minimalnego stężenia bakteriobójczego bakteriofaga w preparacie PhageGuard L

Oceny wartości MIC i minimalnego stężenia bakteriobójczego (ang. minimum bactericidal concentration, MBC) dokonywano na podstawie metodyki przedstawionej przez Vipra i wsp. [208]. Przygotowywano 24-godzinne

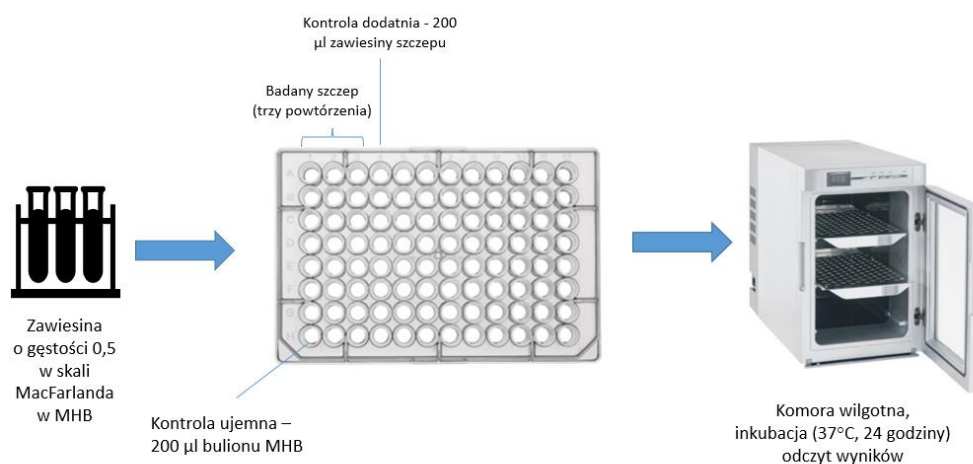
hodowle bakteryjne na podłożu CAB. Z wyrosłych kolonii sporządzano zawiesinę o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda w bulionie tryptozowo-sojowym (ang. tryptic soy broth, TSB) (Becton Dickinson). Zawiesinę rozcieńczano zgodnie z zaleceniami EUCAST, otrzymując stężenie końcowe: 5×10^5 j.t.k. (jednostka tworząca kolonie)/ml [207]. Następnie, 100 μ l zawiesiny bakteryjnej wprowadzano do 96-dołkowej płytki (Profilab) w trzech powtórzeniach. Do zawiesiny dodawano 100 μ l bakteriofaga w preparacie PhageGuard L (Microcos Food Safety), uzyskując stężenie końcowe w zakresie od 5×10^4 do 5×10^{10} PFU (ang. plaque forming unit)/ml. Kontrolę ujemną stanowiło 100 μ l bakteriofaga (dla każdego stężenia osobno) i 100 μ l jałowego TSB. Natomiast kontrolę dodatnią - 200 μ l rozcieńczonych zawiesin bakteryjnych. Inkubację przeprowadzano w wilgotnej komorze w temperaturze 35°C przez 20 godzin. Po okresie inkubacji, wizualnie oceniano obecność zmętnienia. Zmętnienie wskazywało na wzrost badanych szczepów, a jego brak przy określonym stężeniu bakteriofaga oznaczało zahamowanie wzrostu *L. monocytogenes*, co określano jako wartość MIC bakteriofaga dla danego szczepu. Dla określonej wartości MIC i trzech stężeń powyżej tej wartości, bakterie wysiewano na podłożu CAB w celu określenia wartości MBC. Po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C oceniano wzrost. Za wartość MBC przyjmowano brak wzrostu na podłożu stałym po okresie inkubacji poprzedzonej wcześniejszą ekspozycją na określone stężenie bakteriofaga w preparacie PhageGuard L.

3.1.6. Ocena wpływu czynników stresowych na wzrost i przeżywalność *Listeria monocytogenes*

3.1.6.1. Stres osmotyczny

W badaniu oceniano wpływ stężenia NaCl (stres osmotyczny) w zakresie 0,0-20,0% (zmienność co 1,0%) na wzrost *L. monocytogenes*. Przygotowywano 24-godzinne hodowle badanych szczepów na podłożu CAB. Z wyrosłych kolonii sporządzano zawiesiny o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda w bulionie Mueller Hinton (MHB, Becton Dickinson). Następnie do jałowej studzienki płytki 96-dołkowej przenoszono po 100 μ l zawiesiny danego szczepu oraz dodawano 100 μ l roztworu NaCl o odpowiednim stężeniu. Procedurę powtarzano

trzykrotnie dla każdego badanego szczepu i każdego badanego stężenia NaCl (ryc. 8). Kontrolę ujemną stanowiło 200 μ l jałowego MHB, a kontrolę dodatnią - 200 μ l zawiesiny każdego szczepu *L. monocytogenes*. Płytki inkubowano w komorze wilgotnej w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po okresie inkubacji oceniano wizualnie obecność zmętnienia. Brak zmętnienia przyjmowano jako zahamowanie wzrostu badanych pałeczek *L. monocytogenes* przy danym stężeniu NaCl.



Rycina 8. Schemat metodyki oceny wpływu stresu osmotycznego, kwasowego i zasadowego na wzrost badanych szczepów ($n=50$) *L. monocytogenes*. MHB-bulion Mueller Hinton

3.1.6.2. Stres kwasowy i zasadowy

Ocenie poddawano wpływ pH w zakresie 3,0-10,0 (zmienność co 1 stopień) (stres kwasowy i zasadowy) na wzrost badanych szczepów *L. monocytogenes*.

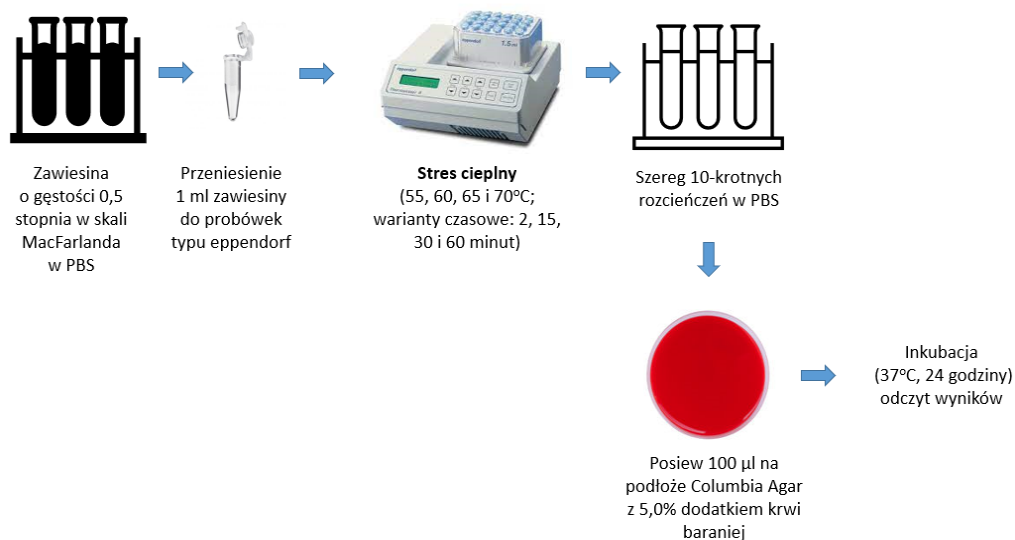
Przygotowywano zawiesiny o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda w MHB. Następnie do studzienek płytki 96-dołkowej wprowadzano po 100 μ l zawiesiny danego szczepu oraz dodawano 100 μ l jałowego MHB o odpowiednim pH. Właściwe pH ustalano z zastosowaniem roztworu HCl (POCH) i NaOH (POCH) i mierzono przy użyciu pehametru (HANNA Instruments). Procedurę powtarzano trzykrotnie dla każdego uwzględnionego szczepu i każdej badanej wartości pH. Kontrolę ujemną stanowiło 200 μ l jałowego MHB, a kontrolę dodatnią - 200 μ l zawiesiny każdego szczepu. Płytki umieszczano w komorze wilgotnej w temperaturze 37°C na 24 godziny. Po okresie inkubacji, oceniano

wizualnie obecność zmętnienia. Brak zmętnienia przyjmowano jako zahamowanie wzrostu badanych szczepów *L. monocytogenes* przy określonym odczynie (ryc. 8).

3.1.6.3. Stres cieplny

Oceniano wpływ stresu cieplnego na przeżywalność badanych szczepów *L. monocytogenes*. Bakterie poddawano działaniu temperatury 55°C, 60°C, 65°C i 70°C przez 2, 15, 30 i 60 minut.

Zawiesiny badanych szczepów o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda w jałowym roztworze zbuforowanej soli fizjologicznej (ang. phosphate-buffered saline, PBS) przenoszono do jałowych probówek typu eppendorf, umieszczano w termobloku i poddawano działaniu wysokiej temperatury przez 2, 15, 30 i 60 minut. Po tym czasie (dla każdego wariantu czasowego oddzielnie) wykonywano szereg 10-krotnych rozcieńczeń w PBS. W wariacie po 2 i 15 minutach uwzględniano rozcieńczenie 10^{-6} , 10^{-7} i 10^{-8} , a po 30 i 60 minutach próbę wyjściową oraz rozcieńczenie 10^{-1} . Wykonywano posiew powierzchniowy na podłoże CAB (100 μ l) (w dwóch powtórzeniach). Hodowle inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Wyrosłe kolonie liczone i wyniki podawano jako log j.t.k/ml. Kontrolę ujemną stanowiło 100 μ l jałowego PBS, natomiast kontrolę dodatnią - zawiesina danego szczepu nie poddana działaniu czynnika stresowego, którą uprzednio rozcieńczano (ryc. 9).

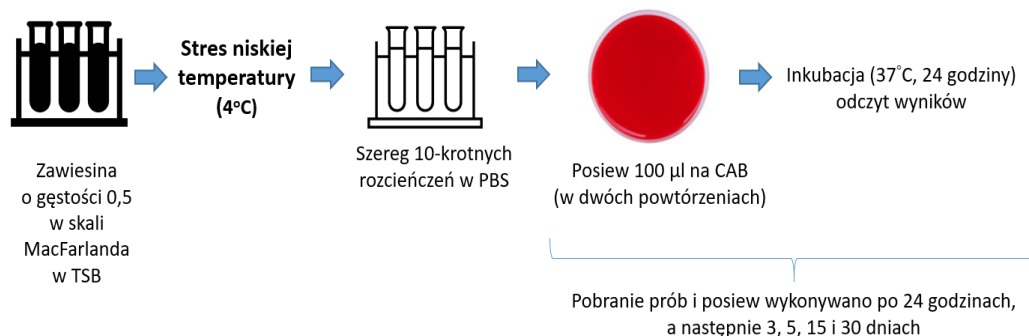


Rycina 9. Schemat metodyki oceny wpływu stresu cieplnego na przeżywalność badanych szczepów (n=50) *L. monocytogenes*. PBS-zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

3.1.6.4. Stres niskiej temperatury

W badaniu oceniano wpływ temperatury 4°C na przeżywalność pałeczek *L. monocytogenes* (stres niskiej temperatury).

Procedurę rozpoczynano od przygotowywania zawiesin badanych szczepów (z hodowli 24-godzinnych) o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda w TSB. Zawiesiny umieszczano w jałowej komorze w temperaturze 4°C. Po 24 godzinach, a następnie po 3, 15, 15 i 30 dniach pobierano próbki i wykonywano szereg 10-krotnych rozcieńczeń w PBS. Wybrane rozcieńczenia (10^{-3} do 10^{-9}) posiewano na podłoże CAB (100 µl) (w dwóch powtórzeniach) (ryc. 10). Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C zliczano wyrosłe kolonie, wynik podawano jako log j.t.k./ml (ryc. 10).

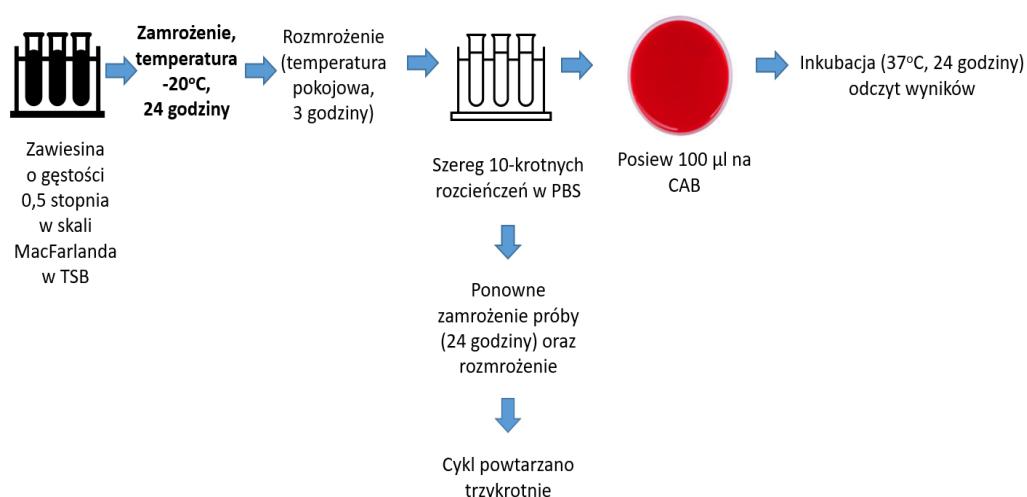


Rycina 10. Schemat metodyki oceny wpływu stresu niskiej temperatury na przeżywalność badanych szczepów (n=50) *L. monocytogenes*. TSB-bulion tryprozowo-sojowy, PBS-zbuforowany roztwór soli fizjologicznej, CAB-podłoże columbia agar

3.1.6.5. Stres cyklicznego zamrażania i rozmrażania

Oceniano wpływ cyklicznego zamrażania (-20°C) i rozmrażania na przeżywalność badanych szczepów *L. monocytogenes*.

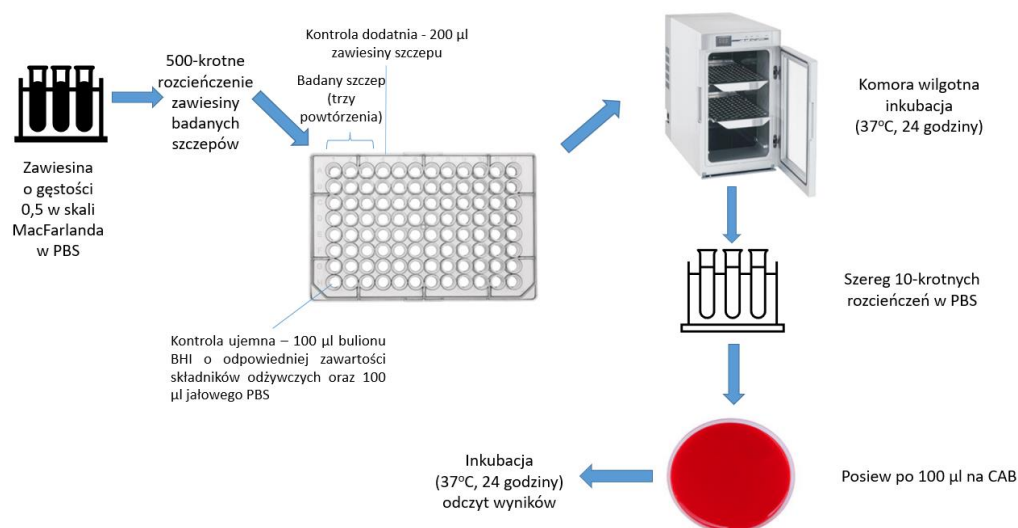
Z wyrosłych kolonii (po 24-godzinnej inkubacji) wykonywano zawiesinę o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda w TSB. Następnie, badane zawiesiny umieszczano w temperaturze -20°C na 24 godziny. Po tym czasie, próby rozmrażano w temperaturze pokojowej (23°C) przez trzy godziny (do całkowitego rozmrożenia). Następnie wykonywano szereg 10-krotnych rozcieńczeń w PBS, a wybrane rozcieńczenia (10^{-3} do 10^{-7} , w dwóch powtórzeniach) posiewano powierzchniowo (100 μ l) na podłoże CAB. Po okresie 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, liczone wyrosłe kolonie i wynik podawano jako log j.t.k./ml. Po pobraniu prób do rozcieńczeń, zawiesiny umieszczano ponownie w temperaturze -20°C. Procedurę cyklicznego zamrażania i rozmrażania przeprowadzano jeszcze trzykrotnie, uzyskując 4 cykle (ryc. 11). Przygotowywano również wariant niepoddany cyklicznemu zamrażaniu-rozmrażaniu. Próbę zamrażano i przechowywano w temperaturze -20°C, a rozmrażano dopiero w ostatnim cyklu trwającego doświadczenia.



Rycina 11. Schemat metodyki oceny wpływu stresu cyklicznego zamrażania i rozmrażania na przeżywalność badanych szczepów ($n=50$) *L. monocytogenes*. TSB-bulion tryptozowo-sojowy, PBS-zbuforowany roztwór soli fizjologicznej, CAB-podłoże Columbia Agar

3.1.6.6. Stres związany z niedoborem i nadmiarem składników odżywczych

Oceniano wpływ dostępności składników odżywczych z BHI na przeżywalność badanych szczepów *L. monocytogenes* (niedobór i nadmiar składników odżywczych). Sporządzano bulion, do którego przygotowania wykorzystywano naważkę podłoża sypkiego o wadze 20,0 - 400,0% zalecanej przez producenta (zmienność co 20,0%). Przygotowywano zawiesiny szczepów *L. monocytogenes* w BHI o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda i rozcieńczano je 500-krotnie. Następnie, 100 µl rozcieńczonej zawiesiny szczepu umieszczano w studziencie płytki 96-dołkowej, dodawano 100 µl podłoża BHI przygotowywanego z odpowiedniej naważki, co pozwoliło na uzyskanie odpowiednio 10,0–200,0% dostępności składników odżywczych w odniesieniu do zalecanej przez producenta naważki podłoża. Kontrolę ujemną stanowiła mieszanina 100 µl jałowego bulionu BHI o odpowiedniej zawartości substancji odżywczych oraz 100 µl jałowego BHI, a kontrolę dodatnią - 200 µl zawiesiny każdego szczepu *L. monocytogenes* w bulionie BHI przygotowywanym z naważki zalecanej przez producenta. Płytki inkubowano w komorze wilgotnej w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Następnie wykonywano szeregi 10-krotnych rozcieńczeń i posiewano (100 µl) (rozcieńczenia: 10^{-3} do 10^{-10}) na podłoże CAB (w dwóch powtórzeniach) (ryc. 12). Po okresie inkubacji (37°C, 24 godziny), liczone wyrosłe kolonie i podawano jako log j.t.k./ml.



Rycina 12. Schemat metodyki oceny wpływu stresu związanego z niedoborem i nadmiarem składników odżywczych na przeżywalność badanych szczepów ($n=50$) *L. monocytogenes*. PBS–zbuforowany roztwór soli fizjologicznej, BHI-bulion móżgowo-sercowy, CAB-podłoże columbia agar

3.1.7. Metody statystyczne

Wszystkie analizy statystyczne pierwszego etapu badań przeprowadzono za pomocą oprogramowania R [209]. Ze względu na brak rozkładu normalnego (test Shapiro-Wilka), wszystkie zmienne ciągłe analizowano za pomocą testów nieparametrycznych. Podstawowym analizowanym parametrem w tym badaniu była zmiana liczby bakterii wyrażona jako logarytmiczna wartość j.t.k. na ml. Różnice między grupami (ze względu na pochodzenie (materiał kliniczny, łośoś, wędliny, mrożonki warzywne)) oceniano za pomocą testu Kruskala-Wallisa i Friedmana, a następnie, przeprowadzono analizę *post hoc*, wykorzystując test porównań wielokrotnych Dunna z poprawką Bonferroniego. Do analizy pomiarów powtarzanych zastosowano sparowany test Wilcozona z poprawką Bonferroniego. W celu analizy zmiennych jakościowych przeprowadzono dokładny test Fishera. Wartość p równa lub mniejsza niż 0,05 została uznana za istotną statystycznie.

W celu wyselekcjonowania najbardziej opornych szczepów zastosowano system punktacji oparty na nieparametrycznym podejściu rangowym. Szczepy uszeregowano na podstawie ich podatności na każdy z pięciu zastosowanych stresów w następujący sposób:

- stres osmotyczny - na podstawie stężenia NaCl, które hamowało wzrost szczepu (im wyższe stężenie - wyższy stopień);
- zakres pH - na podstawie zakresu, w którym wzrost szczepu nie został zahamowany (im szerszy zakres - wyższy stopień);
- stres cieplny - na podstawie wartości log j.t.k./ml (wyrażony jako zmiana liczby bakterii po ekspozycji na stres); ponieważ istniało wiele warunków (cztery punkty czasowe i cztery temperatury), średnie rangi dla każdej kombinacji punkt czasowy/temperatura zostały obliczone w celu uzyskania ostatecznej rangi;
- niski (10,0–40,0%) dostęp składników odżywczych - również na podstawie wartości log j.t.k./ml; średnie rangi dla każdego poziomu

dostępności składników odżywczych zostały obliczone w celu uzyskania ostatecznej rangi;

- wysoki (130,0 – 200,0%) dostęp składników odżywczych - j.w.

Dobór zakresów związanych z dostępnością składników odżywczych został dokonany na podstawie obserwowanych różnic we wzroście badanych szczepów w porównaniu z wariantem o optymalnej zawartości substancji odżywczych (wariant kontrolny, 100%).

W zaproponowanej procedurze rangowania poszczególnym szczepom przyznawano punkty od 0 do 50 za każdy stres (maksymalna wartość wynika z liczby badanych szczepów). Sumaryczna liczba punktów przyznanych każdemu szczepowi wynosiła od 0 do 250. W przypadku jednakowych punktacji w poszczególnych stresach każdej z obserwacji przypisywano rangę związaną równą średniej arytmetycznej kolejnych miejsc rankingowych zajmowanych przez dane szczepy. Badane pałeczki *L. monocytogenes*, którym w przedstawionej procedurze przyznano najwięcej punktów, uznano za najbardziej odporne. Ograniczeniem przedstawionego powyżej podejścia jest to, że w przypadku zmiennych dyskretnych wyrażanych w skali porządkowej występują wielokrotne rangi związane.

3.2. Drugi etap badań

3.2.1. Materiał do badań

Na podstawie przeprowadzonej klasyfikacji szczepów (nieparametryczne podejście rangowe) w pierwszym etapie badań, do dalszych doświadczeń wybrane zostały dwa szczepy, które uplasowały się na miejscu pierwszym oraz na ostatnim, uwzględniając sumaryczną liczbę uzyskanych punktów. Do badań włączono szczep wzorcowy *L. monocytogenes* ATCC 19111. Szczepy do czasu przeprowadzenia badań przechowywano w temperaturze -80°C , jak opisano w punkcie 3.1.2. Szczepy poddawano działaniu czynników stresowych (stres cieplny, niskiej temperatury, mrożenia, kwasowy, zasadowy, osmotyczny). Wariant kontrolny stanowiły trzy badane szczepy niepoddawane działaniu warunków stresowych.

3.2.2. Przygotowanie szczepów *Listeria monocytogenes* do dalszych badań

Badane szczepy wysiewano z zamrożenia na podłoże CAB i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Następnie, pojedynczą kolonię posiewano na CAB (posiew redukcyjny). Po inkubacji przez 24 godziny w temperaturze 37°C, trzy pojedyncze kolonie wprowadzano do 10 ml TSB i inkubowano przez 20 godzin w temperaturze 37°C.

3.2.3. Warunki stresowe

3.2.3.1. Stres cieplny

Zawiesinę bakteryjną umieszczano w termobloku i poddawano działaniu wysokiej temperatury (55°C) przez 20 minut.

Następnie, próbkę po ekspozycji na stres, wirowano przez 5 minut (12 000 x g) i usuwano supernatant. Otrzymany osad przemywano buforem TE, ponownie wirowano (5 minut, 12000 x g) i zlewano supernatant. Otrzymany osad wykorzystywano do dalszych badań. Równocześnie przygotowywano wariant niepoddany danemu stresowi (kontrolny).

3.2.3.2. Stres niskiej temperatury

Zawiesinę bakterii umieszczano w temperaturze 4°C na okres 7 dni. Po tym czasie z próbką postępowano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.3.1.

3.2.3.3. Stres osmotyczny

Badane szczepy *L. monocytogenes* poddawano działaniu 4,5% NaCl. W tym celu zawiesinę bakteryjną mieszano z równą objętością TSB z dodatkiem 9,0% NaCl (Avantor), a następnie inkubowano przez 3 godziny w 37°C (czas ustalono na podstawie [210]). Po tym czasie z próbką postępowano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.3.1.

3.2.3.4. Stres kwasowy i zasadowy

Zawiesinę bakteryjną mieszano z równą objętością TSB o odpowiednim pH (5,0 (stres kwasowy) i 8,0 (stres zasadowy)), a następnie inkubowano przez 80 minut w temperaturze 37°C (czas ustalono na podstawie [211]). Właściwe pH zostało

ustalone za pomocą roztworu HCl (POCH) i NaOH (POCH) oraz sprawdzone przy użyciu pehametru (HANNA Instruments). Po tym czasie z próbką postępowano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.3.1.

3.2.3.5. Stres mrożenia

Zawiesinę bakteryjną umieszczono w temperaturze -20°C na 24 godziny. Po tym czasie hodowlę wyjmowano z zamrożenia i pozostawiano na trzy godziny w temperaturze pokojowej (23°C) do całkowitego rozmrożenia. Następnie, z próbką postępowano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.3.1.

3.2.4. Wpływ czynników stresowych na cechy fenotypowe

3.2.4.1. Zdolność tworzenia biofilmu

Otrzymany osad (wariant kontrolny oraz po stresie) rozpuszczano w MHB uzyskując zawiesinę o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda. Następnie 20 μl zawiesiny umieszczano w dołkach 96-dołkowej płytki (w trzech powtórzeniach) i uzupełniano objętością 180 μl MHB, uzyskując 10-krotne rozcieńczenie. Kontrolę ujemną stanowiło 200 μl jałowego MHB (trzy powtórzenia), a dodatnią 200 μl zawiesiny. Płytki inkubowano 24 godziny w komorze wilgotnej (37°C). Po tym czasie, usuwano zawiesiny za pomocą pipety i przemywano studzienki trzykrotnie jałową wodą destylowaną. Płytki pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze 37°C (20 minut). Po tym czasie do studzienek dodawano 200 μl metanolu CZDA (POCH) i wytrząsano (400 obrotów na minutę (ang. revolutions per minute, RPM)) w temperaturze pokojowej (20 minut). Metanol usuwano i dodawano 200 μl 0,1% roztworu fioletu krystalicznego (POCH). Płytki wytrząsano (400 RPM) w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Następnie, usuwano fiolet krystaliczny i przemywano wodą do uzyskania bezbarwnych popłuczyn. Płytkę pozostawiano do odparowania w temperaturze 37°C przez 20 minut. Następnie do studzienek dodawano 200 μl metanolu CZDA (POCH) i wytrząsano (400 RPM) w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Dokonywano odczytu absorbancji przy długości fali 570 nm (Abs_{570}) w czytniku Synergy™HT (BIO-TEK) przy użyciu oprogramowania Gen5 3.11. Średnią wartość Abs_{570} uzyskaną z trzech powtórzeń dla każdego szczepu określano w programie Gen5

3.11. Porównując absorbancję szczepów (A) z absorbancją kontroli ujemnej (K-), sklasyfikowano szczepy jako silnie, umiarkowanie i słabo tworzące biofilm, zgodnie z metodą opisaną przez Stepanović i wsp. [212]. Wyznaczono wartości graniczne: $K- < A \leq 2 \times K-$ - szczepy słabo tworzące biofilm; $2 \times K- < A \leq 4 \times K-$ - szczepy umiarkowanie tworzące biofilm, $4 \times K- < A$ - szczepy silnie tworzące biofilm.

3.2.4.2. Określenie minimalnego stężenia antybiotyków hamującego wzrost bakterii

Otrzymany osad (wariant kontrolny oraz po stresie) rozpuszczano w roztworze 0,9% jałowej soli fizjologicznej uzyskując zawiesinę o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda. Przygotowaną zawiesinę wysiewano na podłoże MHF, a następnie nanoszono paski z gradientem stężeń uwzględnionych w badaniu antybiotyków: penicyliną (0,016-256 $\mu\text{g/ml}$), ampicyliną (0,016-256 $\mu\text{g/ml}$), meropenemem (0,002-32 $\mu\text{g/ml}$), erytromycyną (0,016-256 $\mu\text{g/ml}$) i trimetoprimem*/sulfametoksazolem (1/19) (0,002-32* $\mu\text{g/ml}$) (Liofilchem). Po 20-godzinnej inkubacji w temperaturze 35°C określano wartości MIC (w oparciu o eliptyczną strefę zahamowania wzrostu). Wyniki interpretowano zgodnie z zaleceniami EUCAST, wersja 13.0 [213].

3.2.4.3. Zdolność do ruchu

Aby ocenić zdolność do ruchu, 0,4% agar (BTL) (dwa powtórzenia) nakłuwano eżą typu igła (około 1 cm) zawiesiną bakteryjną o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda (przygotowywaną jak w punktach 3.2.4.1 i 3.2.4.2.) i inkubowano w temperaturze 22°C przez 48 godzin. W przypadku potwierdzenia zdolności do ruchu, około 0,5 cm pod powierzchnią agaru obserwowano wzrost w formie tzw. „parasola” (na podstawie [214]).

3.2.5. Wpływ czynników stresowych na poziom ekspresji wybranych genów

3.2.5.1. Izolacja RNA

Otrzymany osad (wariant kontrolny oraz po stresie) zawieszano w 0,1 M Tris-HCl o pH 7,4 (Sigma-Aldrich) z dodatkiem lizozymu (10 mg/ml, Eur_x), proteinyzy

K (~20 mg/ml) oraz 10,0% SDS (Sigma-Aldrich) i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C (termoblok). Zawiesinę umieszczano na 5 minut w temperaturze 80°C (termoblok). Następnie dodawano 1 ml odczynnika TRI (Sigma-Aldrich) i umieszczano na 20 minut w temperaturze w -80°C. Po danym czasie, próbki przenoszono do temperatury pokojowej (23°C) i pozostawiano na około 7 minut do całkowitego rozmrożenia. Następnie dodawano 200 µl chloroformu (POCH) i pozostawiano na 5 minut w temperaturze 23°C w celu rozdzielania faz. Kolejno, wirowano przez 15 minut (4°C, 12 000 x g), górną fazę (500 µl) przenoszono do jałowej probówki typu eppendorf i dodawano równą objętość alkoholu izopropylowego (POCH). Badane próby umieszczano na 20 minut w temperaturze -20°C. Po tym czasie próbki wirowano przez 10 minut (4°C, 12 000 x g). Następnie, osad przemywano 1 ml 70,0% etanolu (POCH) i wirowano (5 minut, 4°C, 7 600 x g). Zlewano supernatant, a osad pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej (23°C) przez 7 minut. Następnie, osad rozpuszczano w 20 µl wody wolnej od RNaz (Eur_x). Mierzono stężenie oraz oceniano czystość otrzymanego RNA z zastosowaniem BioPhotometru D30. Za wartość graniczną przyjmowano stosunek absorbancji przy długości fali 260 nm do absorbancji przy długości fali 280 nm (Abs_{260}/Abs_{280}), który wynosił 1,8-2,05. Następnie 1 µg RNA trawiono DNazą (2U; A&A Biotechnology) przez 90 minut w temperaturze 37°C, zgodnie z instrukcją producenta. Inaktywację procesu przeprowadzano poprzez umieszczenie badanych prób na 10 minut w temperaturze 65°C (termoblok). RNA po trawieniu DNazą wykorzystywano do syntezy cDNA. Pozostałe RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

3.2.5.2. Odwrotna transkrypcja

Syntezę cDNA przeprowadzano na 1 µg RNA według zaleceń producenta zestawu iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Mieszanina reakcyjna (20 µl) zawierała: iScript Reaction Mix (5x), iScript Reverse Transcriptase, 1 µg RNA oraz wodę wolną od RNaz.

Reakcje przeprowadzano w termocyklerze MasterCycler Pro stosując następujące warunki: etap wstępny (25°C, 5 minut), odwrotna transkrypcja (46°C, 20 minut), inaktywacja odwrotnej transkryptazy (95°C, 1 minuta).

Uzyskane po reakcji odwrotnej transkrypcji cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

3.2.5.3. Real-Time qPCR

Względne poziomy ekspresji genów *sigB* i *agrA* określano za pomocą systemu optycznego CFX96 (Bio-Rad). W tab. 6 przedstawiono sekwencje starterów zastosowanych w badaniu. Normalizacji ilości cDNA dokonywano w stosunku do genu metabolizmu podstawowego - *gap* (kodującego dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego) [215]. Każdy PCR przeprowadzono w dwóch powtórzeniach, z dwóch niezależnych izolacji RNA. PCR prowadzono w mieszaninie zawierającej: 1 µl cDNA, startery *gap*, *sigB* i *agrA* (Oligo.pl) o stężeniu 500 nM (0,4 µl), 10 µl iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) i 8,2 µl wody. Reakcja obejmowała 40 cykli: denaturację w temperaturze 95°C przez 30 sekund, hybrydyzację w 60°C przez 30 sekund i elongację w 72°C przez 45 sekund, poprzedzonych wstępną denaturacją w temperaturze 95°C przez 3 minuty. W celu określenia stopnia zanieczyszczenia RNA genomowym DNA dla każdej próbki włączono kontrole bez odwrotnej transkryptazy (ang. no reverse transcriptase control, NRT). Dla każdego startera określano wydajność reakcji PCR stosując seryjne 10-krotne rozcieńczenia matrycy (genomowe DNA). Określone wydajności zostały uwzględnione przy obliczaniu względnych poziomów ekspresji genów według Pfaffla [216].

Tabela 6. Sekwencje starterów wykorzystane w reakcji Real-Time qPCR

Gen	Sekwencja starterów (5'-3')	Piśmiennictwo
<i>gap</i>	TGGTGTGTTGAAGGTCTAATG GCAGCTCCGTCTAATTTACC	[215]
<i>sigB</i>	TGGTGTCACGGAAGAAGAAG TCCGTACCACCAACAACATC	[217]
<i>agrA</i>	CGGGTACTTGCCTGTATGAA TGAATAGTTGGCGCTGTCTC	

3.2.6. Metody statystyczne

Analizę statystyczną drugiego etapu badań przeprowadzono w programie Excel (Microsoft). Wykonano dwukierunkową analizę wariancji (ANOVA)

i zastosowano test Tukeya w programie Statistica 13.0 PL (TIBCO Software) w celu określenia, czy istnieją różnice statystyczne między różnymi grupami eksperymentalnymi. Wartość p równa lub mniejsza niż 0,05 została uznana za istotną statystycznie.

4. WYNIKI

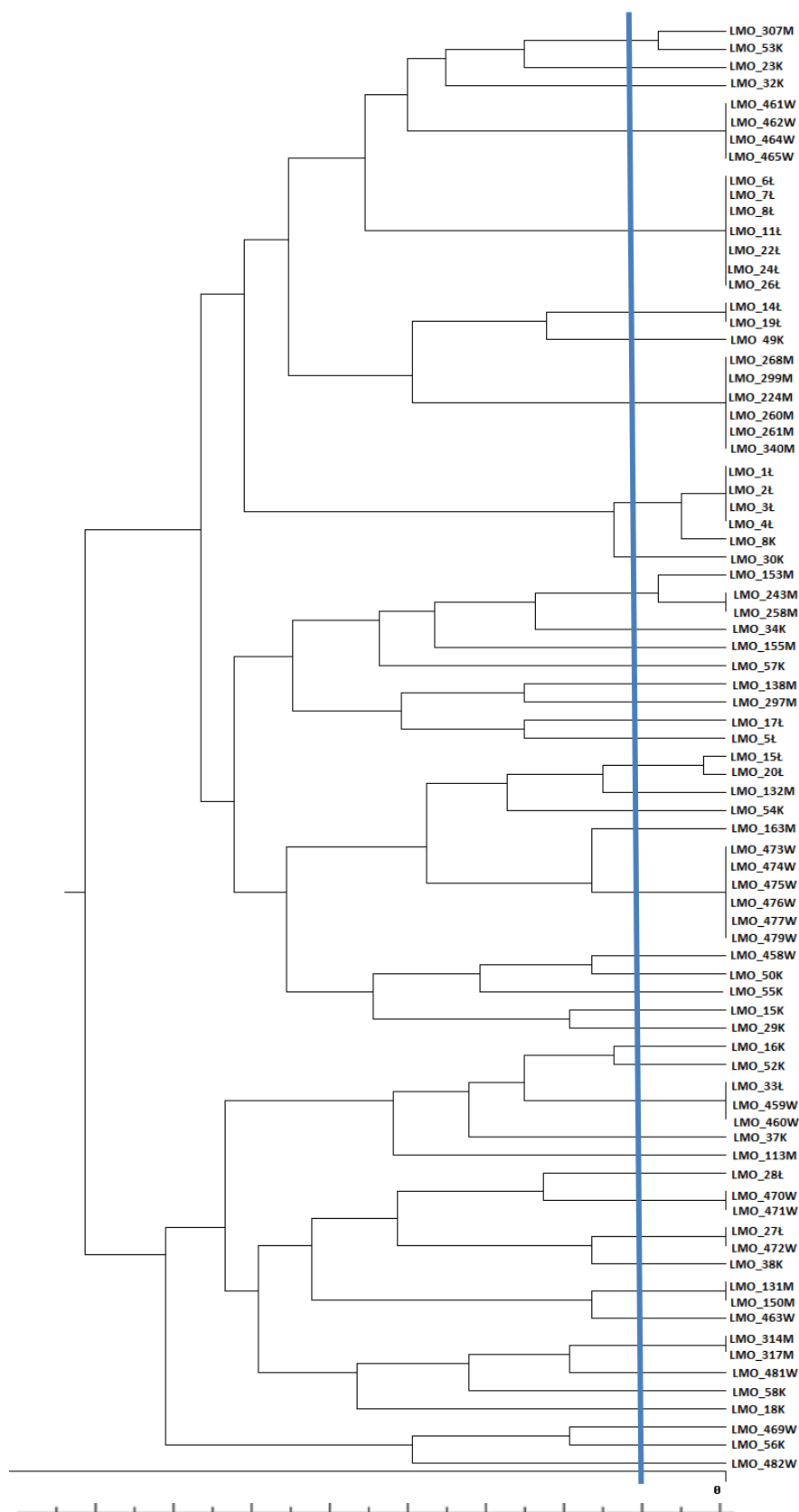
4.1. Ocena podobieństwa genetycznego izolatów

Przeprowadzona ocena podobieństwa genetycznego, z zastosowaniem metody PFGE, pozwoliła wyodrębnić 50 wzorów prążków. Na podstawie uzyskanych wyników, wykreślono dendrogram filogenetyczny badanych izolatów (ryc. 13). Punkt odcięcia (ang. cutt-off value) przyjęto na poziomie 80,0%, zgodnie z ustalonym standardem [218]. Umożliwiło to przyporządkowanie 45 (57,5%) izolatów do 14 klastrow, co świadczy o znacznym podobieństwie izolatów w obrębie danego klastra. Klastry od P2 do P7 oraz od P9 do P14 obejmowały identyczne genetycznie izolaty (ryc. 13, tab. 7). Klaster P1 zawierał izolat z mrozonek warzywnych i z materiału klinicznego, natomiast P8 - dwa izolaty z łososia (ryc. 13, tab. 7). W grupie szczepów z żywności wykazano identyczne genetycznie izolaty pochodzące z różnych źródeł. Klaster P10 obejmował dwa izolaty z wędlin oraz jeden izolat z łososia, a P12 po jednym izolacie z łososia i wędlin (ryc. 13, tab. 7). Pozostałe 34 (42,5%) izolaty miały unikalne profile i nie zostały zaklasyfikowane do żadnego z klastrow, przy przyjętym poziomie punktu odcięcia. W dalszych badaniach wykorzystano 50 różnych genetycznie szczepów *L. monocytogenes*.

Tabela 7. Klastry wyodrębnione w oparciu o technikę PFGE z wykorzystaniem grupowania hierarchicznego techniką UPGMA z przyjętym punktem odcięcia 80,0%

Klastry PFGE	Numery izolatów
P1	307M, 53 K
P2	461W, 462W, 464W, 465W
P3	6Ł, 7Ł, 8Ł, 11Ł, 22Ł, 24Ł, 26Ł
P4	14Ł, 19Ł
P5	268M, 299M, 224M, 260M, 261M, 340M
P6	1Ł, 2Ł, 3Ł, 4Ł
P7	243M, 258M
P8	15Ł, 20Ł
P9	473W, 474W, 475W, 476W, 477W, 479W
P10	33 Ł, 459W, 460W
P11	470W, 471W
P12	27Ł, 472W
P13	131M, 150M
P14	314M, 317M

Kolorem czerwonym oznaczono izolaty identyczne genetycznie, K-materiał kliniczny, Ł-łosos, M-mrozonki warzywne, W-wędliny, PFGE-elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (ang. Pulsed-Field Gel Electrophoresis), UPGMA-nieważona metoda wielu grup ze średnią arytmetyczną (ang. unweighted pair group method with arithmetic mean)

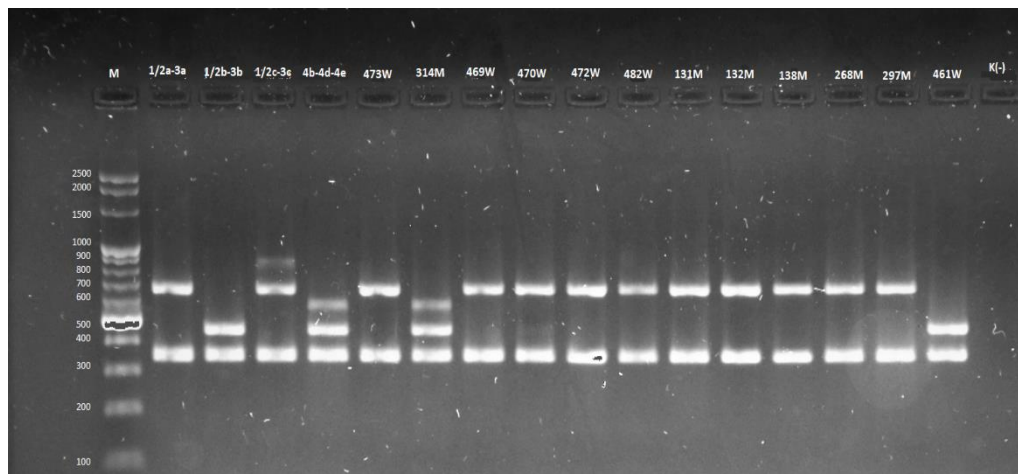


Rycina 13. Dendrogram podobieństwa genetycznego badanych izolatów (n=80) w oparciu o wyniki uzyskane z zastosowaniem metody PFGE z wykorzystaniem grupowania hierarchicznego techniką UPGMA. K-materiał kliniczny, Ł-łosoś, M-mrożonki warzywne, W-wędliny

4.2. Wstępna charakterystyka badanych szczepów

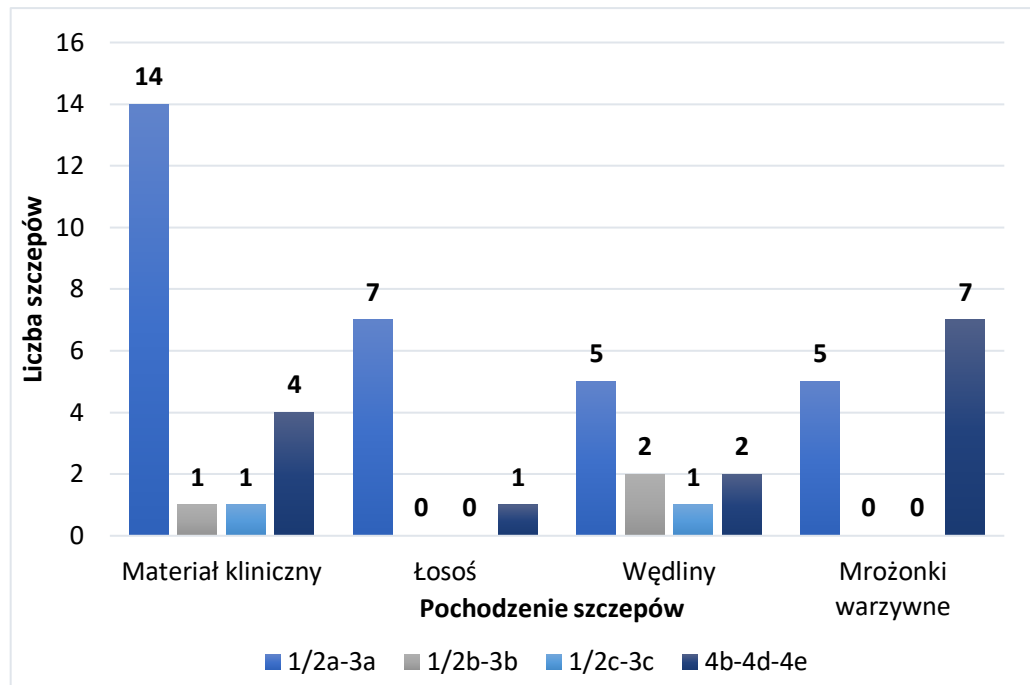
4.2.1. Ocena przynależności do grup serologicznych

Oceny przynależności do grup serologicznych (1/2a-3a, 1/2b-3b, 1/2c-3c, 4b-4d-4e) dokonywano z zastosowaniem reakcji multipleks PCR. Na fot. 1 przedstawiono przykładowy elektroforegram produktów PCR dla czterech szczepów wzorcowych oraz 12 badanych szczepów *L. monocytogenes*.



Fotografia 1. Elektroforegram produktów amplifikacji reakcji multipleks PCR zastosowanej do określenia przynależności do grup serologicznych badanych szczepów *L. monocytogenes*. Ścieżka 1: marker wielkości (100-2500 pz), ścieżka 2: kontrola dodatnia 1/2a-3a, ścieżka 3: kontrola dodatnia 1/2b-3b, ścieżka 4: kontrola dodatnia 1/2c-3c, ścieżka 5: kontrola dodatnia 4b-4d-4e, ścieżki 6–17: badane szczepy *L. monocytogenes*, ścieżka 18: kontrola ujemna [fotografia własna]

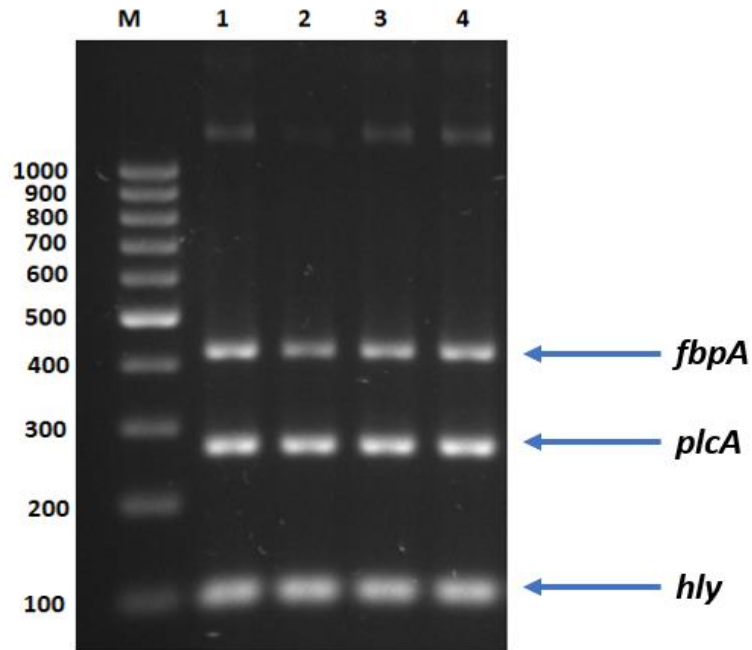
Na ryc. 14 przedstawiono wyniki przynależności do grup serologicznych badanych szczepów (n=50). Stwierdzono, że najliczniejszą była serogrupa 1/2a-3a, którą reprezentowało 31 (62,0%) szczepów, w tym 14, 7, 5 i 5 izolowanych odpowiednio z materiału klinicznego, łososia, wędlin i mrozonek warzywnych. Drugą, pod względem liczebności, była serogrupa 4b-4d-4e, którą potwierdzono wśród 14 (28,0%) badanych szczepów. Wśród tej serogrupy dominowały szczepy izolowane z mrozonek warzywnych (7 szczepów). Z kolei, do grupy serologicznej 1/2b-3b sklasyfikowano trzy szczepy, w tym dwa wyosobnione z wędlin i jeden izolowany z materiału klinicznego. Grupa serologiczna 1/2c-3c została potwierdzona u trzech szczepów (ryc. 14). Nie wykazano istotnych statystycznie zależności ($p = 0,143$; test Fishera) pomiędzy przynależnością do grupy serologicznej a pochodzeniem szczepów.



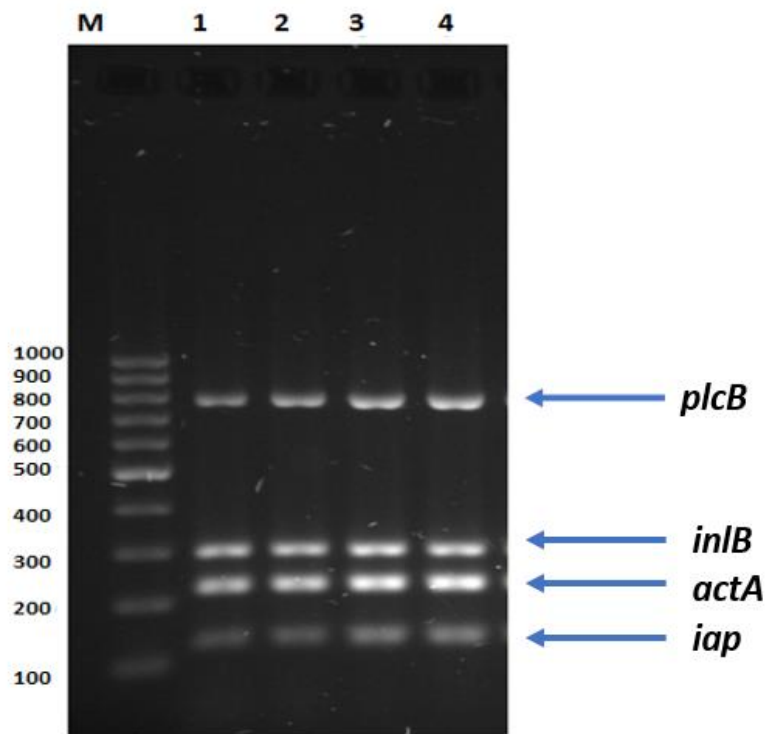
Rycina 14. Przynależność do grup serologicznych w zależności od pochodzenia badanych szczepów (n=50) *L. monocytogenes*

4.2.2. Ocena częstości występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji

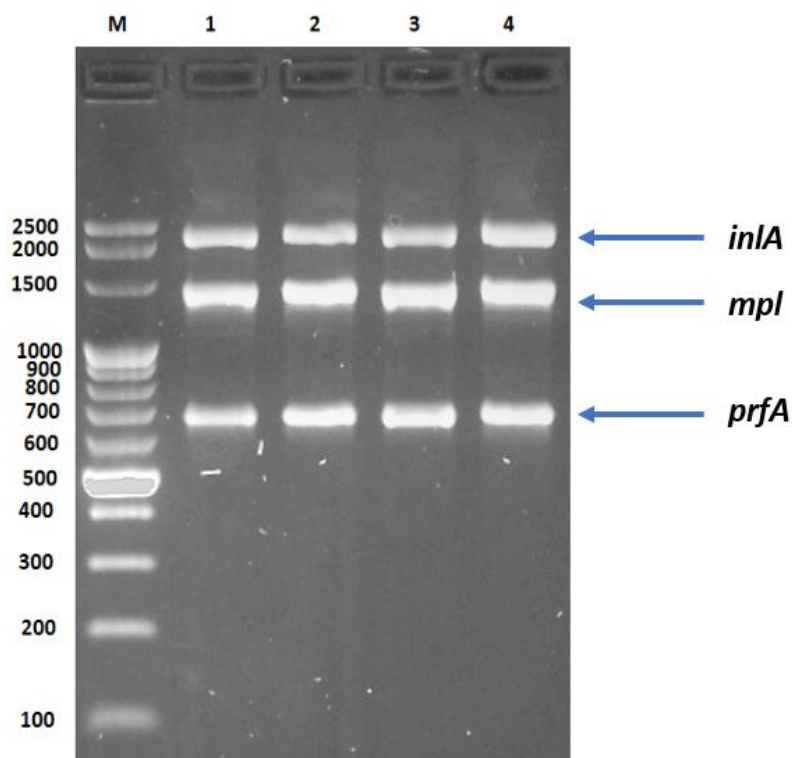
Analiza obejmowała ocenę częstości występowania 10 genów kodujących wybrane czynniki wirulencji, tj. *actA*, *fbpA*, *hly*, *iap*, *inIA*, *inIB*, *mpl*, *prfA*, *plcA*, *plcB* wśród 50 badanych szczepów *L. monocytogenes*. Na fot. 2-4 przedstawiono przykładowe elektroforegramy produktów amplifikacji przeprowadzonych w trzech reakcjach multipleks PCR.



Fotografia 2. Elektroforegram produktów amplifikacji reakcji multipleks I, obejmującej geny: *fbpA* (435 pz), *plcA* (278 pz), *hly* (101 pz). Ścieżka 1: marker wielkości (100-1000 pz), ścieżka 2: kontrola dodatnia szczep IW41, ścieżki 3-5: badane szczepy *L. monocytogenes* [fotografia własna]



Fotografia 3. Elektroforegram produktów amplifikacji reakcji multipleks II, obejmującej geny: *plcB* (794 pz), *inlB* (302 pz), *actA* (231 pz), *iap* (131 pz). Ścieżka 1: marker wielkości (100-1000 pz), ścieżka 2: kontrola dodatnia szczep IW41, ścieżki 3-5: badane szczepy *L. monocytogenes* [fotografia własna]



Fotografia 4. Elektroforegram produktów amplifikacji reakcji multipleks III, obejmującej geny: *inlA* (2341 pz), *mpl* (1458 pz), *prfA* (706 pz). Ścieżka 1: marker wielkości (100-2500 pz), ścieżka 2: kontrola dodania szczep IW41, ścieżki 3–5: badane szczepy *L. monocytogenes* [fotografia własna]

Wykazano obecność genów: *actA*, *hly*, *iap*, *inlA*, *inlB*, *plcA*, *plcB* i *prfA* wśród wszystkich badanych szczepów (n=50) *L. monocytogenes*. Z kolei, gen *fbpA* potwierdzono u 35 (75,0%) szczepów, a jego brak u 7 izolowanych z mrozonek warzywnych, 6 z wędlin oraz po jednym szczepie z materiału klinicznego i z łososia. Częstość występowania genu *mpl* w badanej populacji *L. monocytogenes* dotyczyła 38 (76,0%) szczepów. Genu tego nie stwierdzono u 12 (24,0%) szczepów, w tym u 5 szczepów izolowanych z materiału klinicznego, trzech z mrozonek warzywnych, dwóch z łososia oraz dwóch z wędlin.

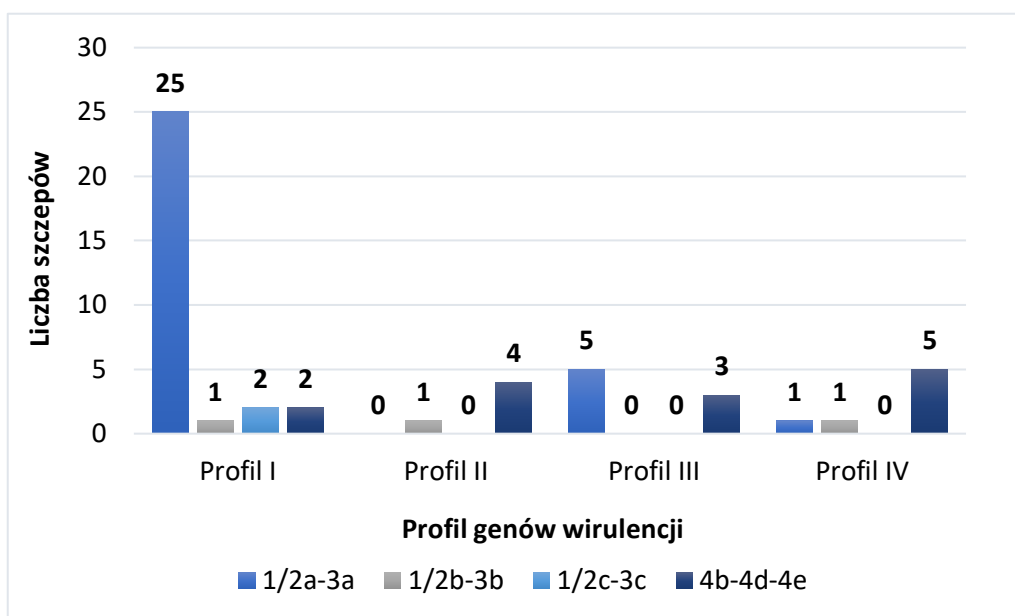
Wśród 50 badanych szczepów *L. monocytogenes* wyodrębniono cztery profile (I-IV) genów wirulencji, które ujęto w tab. 8. Najliczniejszy profil I (obecność wszystkich genów kodujących wybrane czynniki wirulencji) wykazano u 30 (60,0%) badanych szczepów *L. monocytogenes*. Z kolei, profil II (brak genu *mpl*, przy obecności pozostałych wykrywanych genów wirulencji)

reprezentowało 5 (10,0%) badanych szczepów. Nie stwierdzono szczepów wyosobnionych z wędlin i mrozonek warzywnych należących do profilu II. Profil III był charakterystyczny dla szczepów izolowanych z żywności, gdyż reprezentowany był przez cztery szczepy izolowane z wędlin oraz cztery z mrozonek warzywnych. Częstość występowania profilu III w badanej populacji wynosiła 16,0%. Profilu III (brak genu *fbpA*, przy obecności pozostałych genów wirulencji) nie stwierdzono wśród szczepów izolowanych z materiału klinicznego i z łososia (tab. 8). Profil IV, obejmował szczepy, u których nie wykryto genu *fbpA* oraz *mpl* (przy obecności pozostałych wykrywanych genów wirulencji) i występował u 7 (14,0%) badanych *L. monocytogenes*. Profil IV reprezentowały szczepy izolowane zarówno z materiału klinicznego, jak i z żywności (tab. 8). Wykazano istotny statystycznie związek ($p=0,007$; test Fishera) pomiędzy profilem genów wirulencji a pochodzeniem badanych szczepów.

Tabela 8. Profile genów wirulencji wśród badanych szczepów (n=50) *L. monocytogenes*

Profil	Geny kodujące czynniki wirulencji	Liczba szczepów w zależności od pochodzenia [n (%)]				Ogółem (n=50)
		Materiał kliniczny (n=20)	Łosoś (n=8)	Wędliny (n=10)	Mrożonki warzywne (n=12)	
I	<i>fbpA, hly, plcA, actA, inlB, plcB, iap, inlA, mpl, prfA</i>	15 (75,0%)	6 (75,0%)	4 (40,0%)	5 (41,7%)	30 (60,0%)
II	<i>fbpA, hly, plcA, actA, inlB, plcB, iap, inlA, prfA</i>	4 (20,0%)	1 (12,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5 (10,0%)
III	<i>hly, plcA, actA, inlB, plcB, iap, inlA, mpl, prfA</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (40,0%)	4 (33,3%)	8 (16,0%)
IV	<i>hly, plcA, actA, inlB, plcB, iap, inlA, prfA</i>	1 (5,0%)	1 (12,5%)	2 (20,0%)	3 (25,0%)	7 (14,0%)

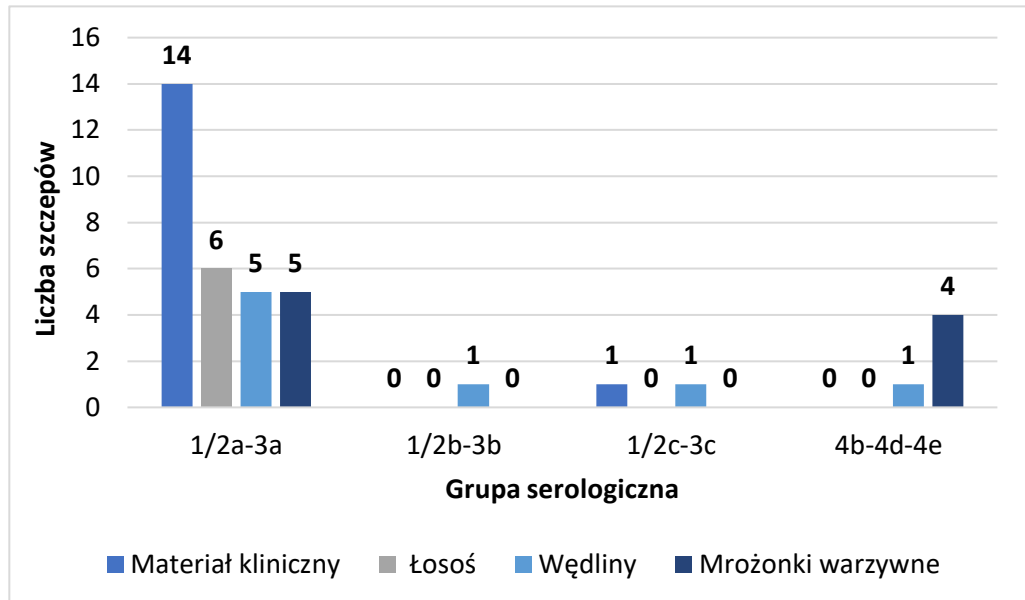
Wykazano, że szczepy zakwalifikowane do I profilu genów wirulencji w większości (25; 83,4%) należały do grupy serologicznej 1/2a-3a (ryc. 15). Z kolei, profil II najliczniej (4; 80,0%) reprezentowały szczepy serogrupy 4b-4d-4e. W obrębie profilu III, 5 (62,5%) szczepów należało do grupy serologicznej 1/2a-3a, a trzy szczepy do serogrupy 4b-4d-4e. Natomiast profil IV genów wirulencji najliczniej (5; 71,4%) obejmowały szczepy z potwierdzoną serogrupą 4b-4d-4e (ryc. 15).



Rycina 15. Liczba szczepów reprezentujących dany profil genów wirulencji a przynależność do grupy serologicznej. Profil I-obecność 10 uwzględnionych w badaniu genów kodujących czynniki wirulencji, Profil II-brak genu *mpl*, przy obecności pozostałych genów wirulencji; Profil III-brak genu *fbpA*, przy obecności pozostałych genów wirulencji, Profil IV-brak genu *mpl* i *fbpA*, przy obecności pozostałych genów wirulencji

Określono częstość występowania LIPI-1 obejmującej następujące geny wirulencji: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB* wśród badanej populacji *L. monocytogenes*. Wykazano obecność LIPI-1 u 38 (76,0%) badanych szczepów, w tym u 15, 9, 8 i 6 izolowanych odpowiednio z materiału klinicznego, mrozonek warzywnych, wędlin i łososia. Szczepy, u których potwierdzono obecność LIPI-1 najliczniej sklasyfikowano do grupy serologicznej 1/2a-3a (30; 80,0%). Grupa serologiczna 1/2b-3b i obecność LIPI-1 została potwierdzona u jednego szczepu izolowanego z wędlin. U jednego szczepu wyosobnionego z materiału

klinicznego i jednego z wędlin wykazano LIPI-1 oraz przynależność do serogrupy 1/2c-3c. Natomiast grupa serologiczna 4b-4d-4e i obecność LIPI-1 została wykazana u czterech szczepów wyosobnionych z mrozonek warzywnych oraz jednego szczepu izolowanego z wędlin (ryc. 16).



Rycina 16. Przynależność do grupy serologicznej w zależności od pochodzenia wśród szczepów (n=38) u których wykazano obecność LIPI-1 (ang. *Listeria Pathogenicity Island 1*)

4.2.3. Ocena wrażliwości na antybiotyki

Oceniono wrażliwość badanych szczepów na 5 antybiotyków, tj. penicylinę, ampicylinę, meropenem, erytromycynę oraz trimetoprim-sulfametoksazol.

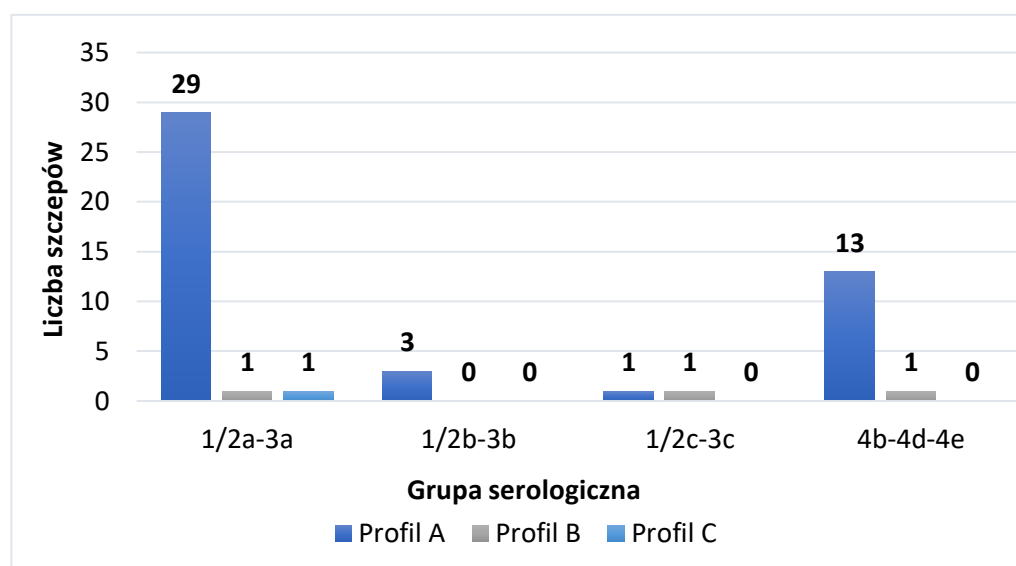
Wśród badanych szczepów wyodrębniono trzy profile wrażliwości na antybiotyki (A-C), które ujęto w tab. 9. Najliczniejszy, profil A (wrażliwość na wszystkie uwzględnione w ocenie antybiotyki) reprezentowało 46 (92,0%) szczepów. Natomiast profil B (oporność na penicylinę, przy wrażliwości na pozostałe antybiotyki) potwierdzono wśród trzech szczepów z materiału klinicznego. Oporność na erytromycynę (przy wrażliwości na pozostałe antybiotyki) wykazano u jednego szczepu izolowanego z łososia (profil C) (tab. 9). Nie stwierdzono istotnie statystycznego ($p=0,180$; test Fishera) związku pomiędzy profilem wrażliwości na antybiotyki a pochodzeniem szczepów.

Tabela 9. Profile wrażliwości na antybiotyki wśród badanych szczepów (n=50) *L. monocytogenes*

Profil	Antybiotyki	Liczba szczepów w zależności od pochodzenia [n (%)]				Ogółem (n=50)
		Materiał kliniczny (n=20)	Łosoś (n=8)	Wędliny (n=10)	Mrożonki warzywne (n=12)	
A	O: - W: P, AMP, MEM, E, STX	17 (85,0)	7 (87,5)	10 (100,0)	12 (100,0)	46 (92,02%)
B	O: P W: AMP, MEM, E, STX	3 (15,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (6,0%)
C	O: E W: P, AMP, MEM, E, STX	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,0%)

O-oporny, W-wrażliwy, P-penicylina, AMP-ampicylina, MEM-meropenem, E-erytromycyna, STX-trimetoprim-sulfametoksazol

Wśród badanych szczepów *L. monocytogenes* sklasyfikowanych do profilu A, 29 (63,0%) należało do grupy serologicznej 1/2a-3a (ryc. 17). Szczepy, u których wykazano oporność na penicylinę (profil B) reprezentowały trzy różne grupy serologiczne: 1/2a-3a, 1/2c-3c, 4b-4d-4e (ryc. 17). Natomiast szczep wyisobniony z łososa, z potwierdzoną opornością na erytromycynę (profil C), został zaklasyfikowany do serogrupy 1/2a-3a (ryc. 17).



Rycina 17. Przynależność do grupy serologicznej badanych szczepów (n=50) w zależności od profilu antybiotykowrażliwości. Profil A-wrażliwość na wszystkie badane antybiotyki, Profil B-oporność na penicylinę, przy wrażliwości na cztery pozostałe antybiotyki, Profil C-oporność na erytromycynę, przy wrażliwości na cztery pozostałe antybiotyki

4.2.4. Ocena wartości minimalnego stężenia hamującego i minimalnego stężenia bakteriobójczego bakteriofaga w preparacie PhageGuard L

Ocenie poddawano wpływ bakteriofaga w preparacie PhageGuard L o stężeniu od 5×10^4 do 5×10^5 PFU/ml na wzrost badanych szczepów *L. monocytogenes*. Wykazano, że stężenie w zakresie 5×10^4 do 5×10^5 PFU/ml nie hamowało wzrostu badanych szczepów (tab. 10). Stężenie 5×10^6 PFU/ml zahamowało wzrost jednego szczepu izolowanego z materiału klinicznego. Szczep ten reprezentował grupę serologiczną 1/2a-3a (ryc. 18). Z kolei, stężenie bakteriofaga 5×10^7 PFU/ml zahamowało wzrost 5 (10,0%) szczepów należących do grupy serologicznej 1/2a-3a (tab. 10, ryc. 18).

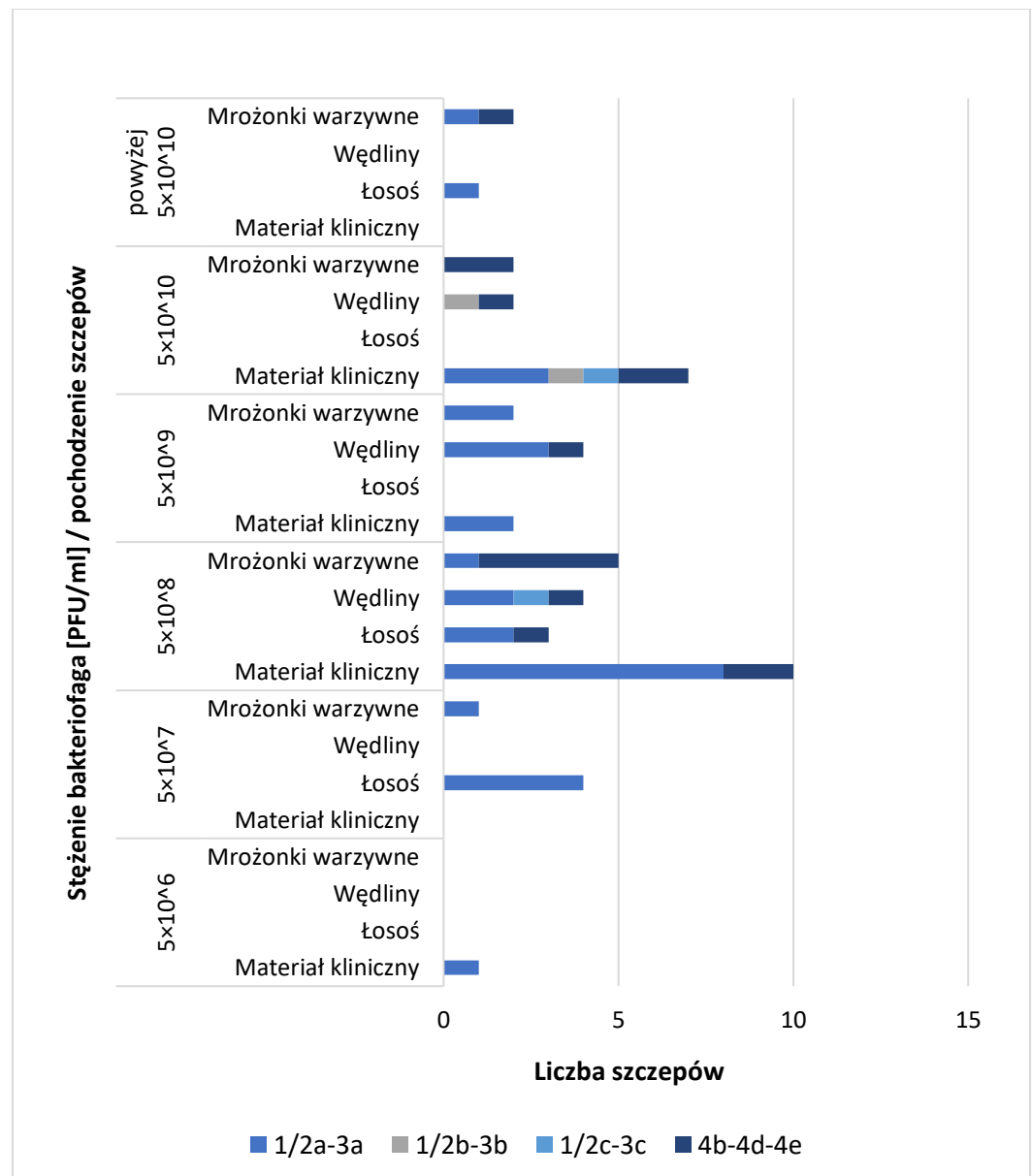
Tabela 10. Minimalne stężenie hamujące bakteriofaga w preparacie PhageGuard L wobec badanych szczepów (n=50) *L. monocytogenes*

Wartość MIC [PFU/ml]	Liczba szczepów w zależności od pochodzenia [n(%)]				Ogółem (n=50)
	Materiał kliniczny (n=20)	Łosoś (n=8)	Wędliny (n=10)	Mrożonki warzywne (n=12)	
5×10^4	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0%)
5×10^5	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0%)
5×10^6	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,0%)
5×10^7	0 (0,0)	4 (50,0)	0 (0,0)	1 (8,3)	5 (10,0%)
5×10^8	10 (50,0)	3 (37,5)	4 (40,0)	5 (41,7)	22 (44,0%)
5×10^9	2 (10,0)	0 (0,0)	4 (40,0)	2 (16,7)	8 (16,0%)
5×10^{10}	7 (35,0)	0 (0,0)	2 (20,0)	2 (16,7)	11 (22,0%)
powyżej 5×10^{10}	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	2 (16,7)	3 (6,0%)

MIC-minimalne stężenie hamujące (ang. minimum inhibitory concentration), PFU-plaque forming unit (jednostka tworząca łysinę)

Najskuteczniejszym stężeniem bakteriofaga w preparacie PhageGuard L, hamującym wzrost największej liczby szczepów (22; 44,0%) było 5×10^8 PFU/ml (tab. 10). Szczepy, dla których to stężenie przyjęto za wartość MIC najliczniej (13; 59,0%) reprezentowały grupę serologiczną 1/2a-3a (ryc. 18). Stężenie 5×10^{10} PFU/ml hamowało wzrost 11 (22,0%) szczepów (tab. 10). Dla szczepów sklasyfikowanych do grupy serologicznej 1/2b-3b (jeden szczep

izolowany z materiału klinicznego oraz jeden z wędlin), wartość MIC bakteriofaga wynosiła 5×10^{10} PFU/ml (ryc. 18). Dwa szczepy wyosobnione z mrożonek warzywnych i jeden szczep wyizolowany z łososa i pozostawały niewrażliwe na wszystkie uwzględnione w badaniu stężenia PhageGuard L (tab. 10). Szczepy te zaklasyfikowano do grupy serologicznej 1/2a-3a (szczep wyosobniony z łososa i mrożonek warzywnych) oraz 4b-4d-4e (szczep izolowany z mrożonek warzywnych) (ryc. 18).



Rycina 18. Wartość minimalnego stężenia hamującego (ang. minimum inhibitory concentration, MIC) bakteriofaga w preparacie PhageGuard L w zależności od przynależności do grupy serologicznej i pochodzenia badanych szczepów (n=50) *L. monocytogenes*. PFU—plaque forming unit (jednostka tworząca łysinkę)

Wartość MBC wykazano dla 5 badanych szczepów *L. monocytogenes*. Stężenie 5×10^8 PFU/ml określono jako wartość MBC dla 4 (8,0%) szczepów, w tym trzech izolowanych z materiału klinicznego i jednego z mrozonek warzywnych. Natomiast 5×10^9 PFU/ml było bakteriobójcze dla jednego szczepu wyosobnionego z materiału klinicznego (tab. 11). Wzrost na podłożu stałym po ekspozycji na pełen zakres uwzględnionego w badaniu stężenia bakteriofaga w preparacie PhageGuard L wykazano wśród 42 (84,0%) badanych szczepów. W odniesieniu do dwóch szczepów izolowanych z mrozonek warzywnych i jednego wyosobnionego łososia nie wykazano działania hamującego wzrost ani bakteriobójczego (tab. 10, 11).

Tabela 11. Minimalne stężenie bakteriobójcze bakteriofaga w preparacie PhageGuard L wobec badanych (n=50) szczepów *L. monocytogenes*

Wartość MBC [PFU/ml]	Liczba szczepów w zależności od pochodzenia [n(%)]				Ogółem (n=50)
	Materiał kliniczny (n=20)	Łosoś (n=8)	Wędliny (n=10)	Mrożonki warzywne (n=12)	
5×10^8	3 (15,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (8,3)	4 (8,0%)
5×10^9	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	(0,0)	1 (2,0%)
wzrost przy 5×10^{10}	16 (80,0)	7 (87,5)	10 (100,0)	9 (75,0)	42 (84,0%)
brak wpływu	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	2 (16,7)	3 (6,0%)

MBC-minimalne stężenie bakteriobójcze (ang. minimum bactericidal concentration), PFU-plaque forming unit (jednostka tworząca łysinkę)

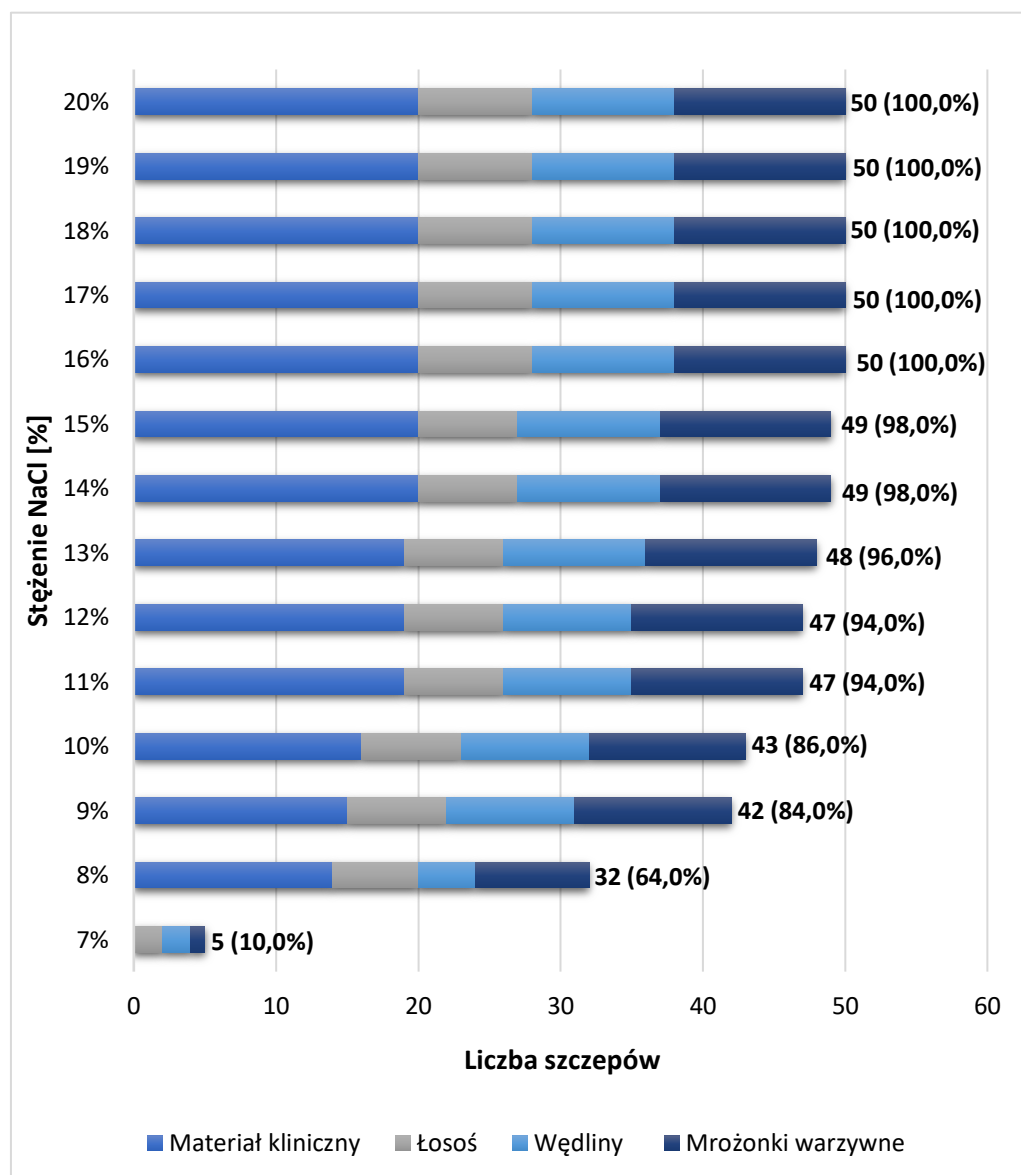
4.3. Wpływ wybranych czynników stresowych na wzrost i przeżywalność badanych szczepów *Listeria monocytogenes*

W niniejszym badaniu oceniano wpływ stresu osmotycznego, kwasowego i zasadowego na wzrost badanych szczepów *L. monocytogenes* oraz niskiej i wysokich temperatur, cyklicznego zamrażania i rozmrażania, niedoboru i nadmiaru składników odżywczych na przeżywalność badanych szczepów.

4.3.1. Stres osmotyczny

Ocenie poddawano wpływ stężenia NaCl w zakresie 0,0 - 20,0% na wzrost badanych szczepów. Uzyskane wyniki przedstawiono na ryc. 19. Wykazano

wzrost wszystkich badanych szczepów (n=50) w zakresie stężeń od 0,0% do 6,0% NaCl.

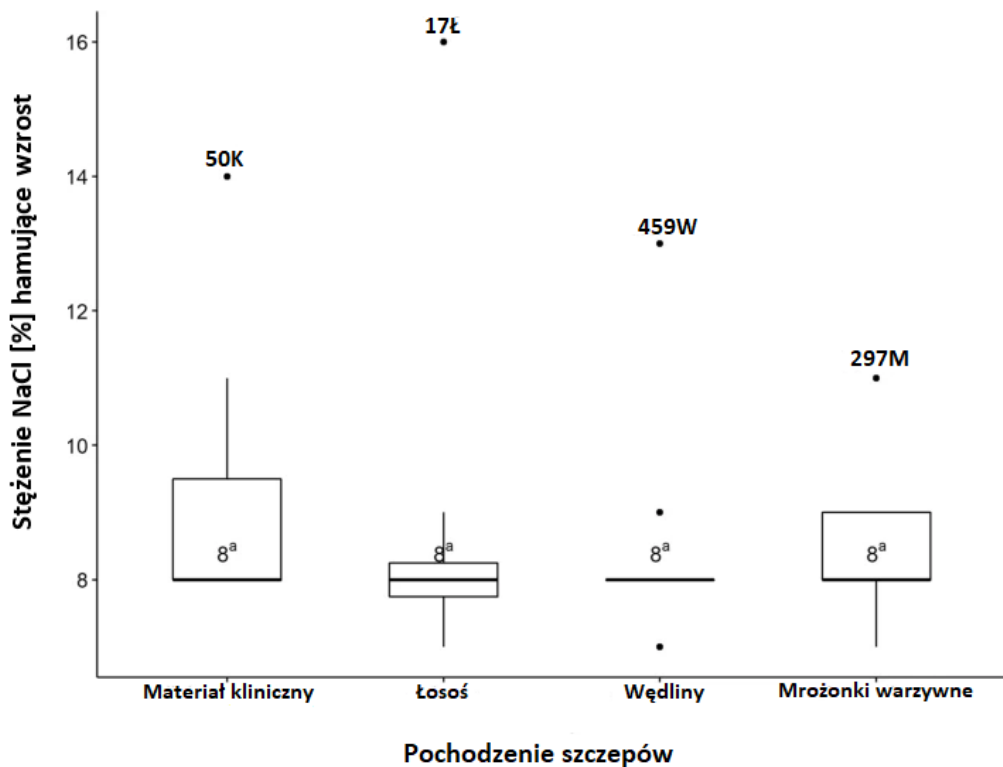


Rycina 19. Wartość NaCl hamująca wzrost badanych szczepów w zależności od pochodzenia (uwzględniono tylko stężenia hamujące wzrost)

Najniższym stężeniem hamującym wzrost badanych szczepów było 7,0% NaCl, przy którym zahamowanie wzrostu zaobserwowano dla 5 (10,0%) szczepów (ryc. 19). Stężenie 8,0% NaCl zahamowało wzrost 32 (64,0%) szczepów, a stężenie 9,0% NaCl - 42 (84,0%) szczepów. Po ekspozycji na 10,0; 11,0; 12,0 i 13,0% NaCl wykazano brak wzrostu odpowiednio 43 (86,0%); 47 (94,0%); 48 (96,0%) badanych szczepów. Natomiast stężenie NaCl w zakresie

16,0-20,0% zahamowało wzrost wszystkich badanych szczepów (n=50) (ryc. 19).

Mediana stężenia NaCl hamującego wzrost dla szczepów ze wszystkich grup ze względu na pochodzenie wynosiła 8,0% (ryc. 20). Najwyższe stężenie tolerowane przez jeden szczep (17Ł), wyizolowany z łososia, wynosiło 15,0%. W pozostałych grupach najwyższe stężenie NaCl umożliwiające przeżycie wyniosło 10,0%, 12,0%, 13,0% dla szczepów wyosobnionych odpowiednio z mrozonek warzywnych (297M), wędlin (459W) i z materiału klinicznego (50K). Nie wykazano istotnych statystycznie zależności w odpowiedzi na stres osmotyczny pomiędzy grupami szczepów ze względu na pochodzenie (ryc. 20).



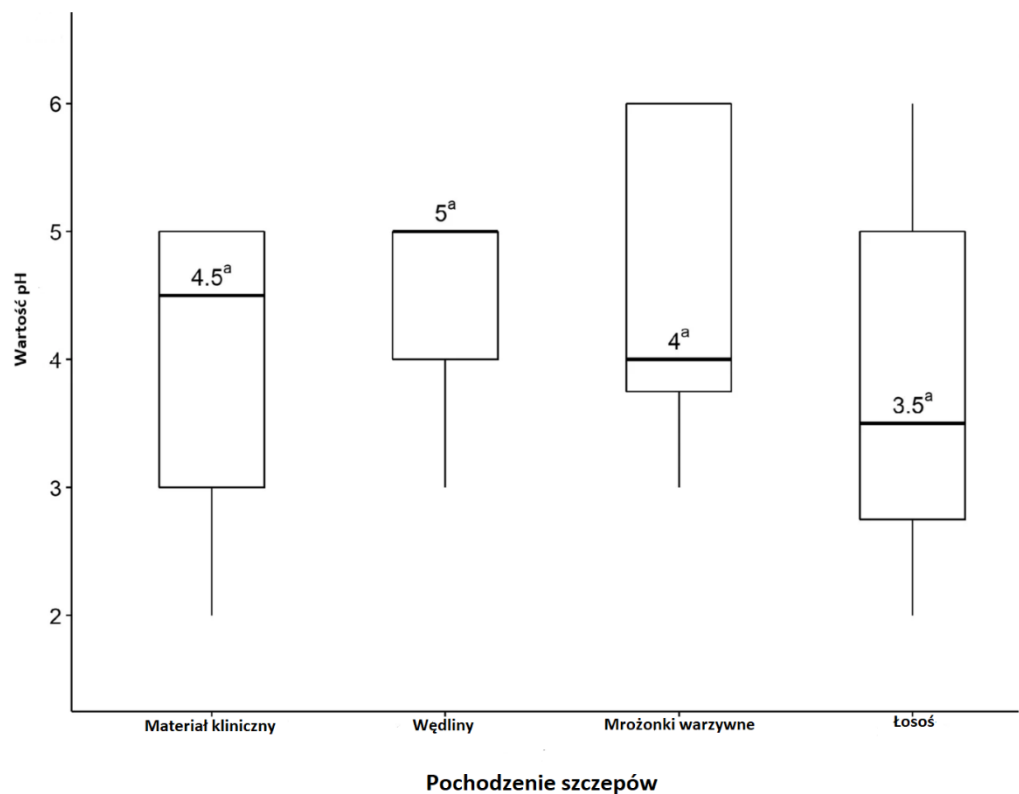
Rycina 20. Porównanie grup szczepów (ze względu na pochodzenie) w odpowiedzi na stres osmotyczny. Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25. i 75. centyl, wąsy rozciągają się do najmniejszej/największej wartości nie dalej niż mediana \pm 1,5-krotność przedziału międzykwartylowego. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$). K-materiał kliniczny, Ł-łosoś, W-wędliny, M-mrożonki warzywne

4.3.2. Stres kwasowy i zasadowy

W badaniu oceniano wpływ stresu kwasowego i zasadowego na wzrost badanych szczepów *L. monocytogenes*. Przy pH 7,0 wykazano wzrost wszystkich

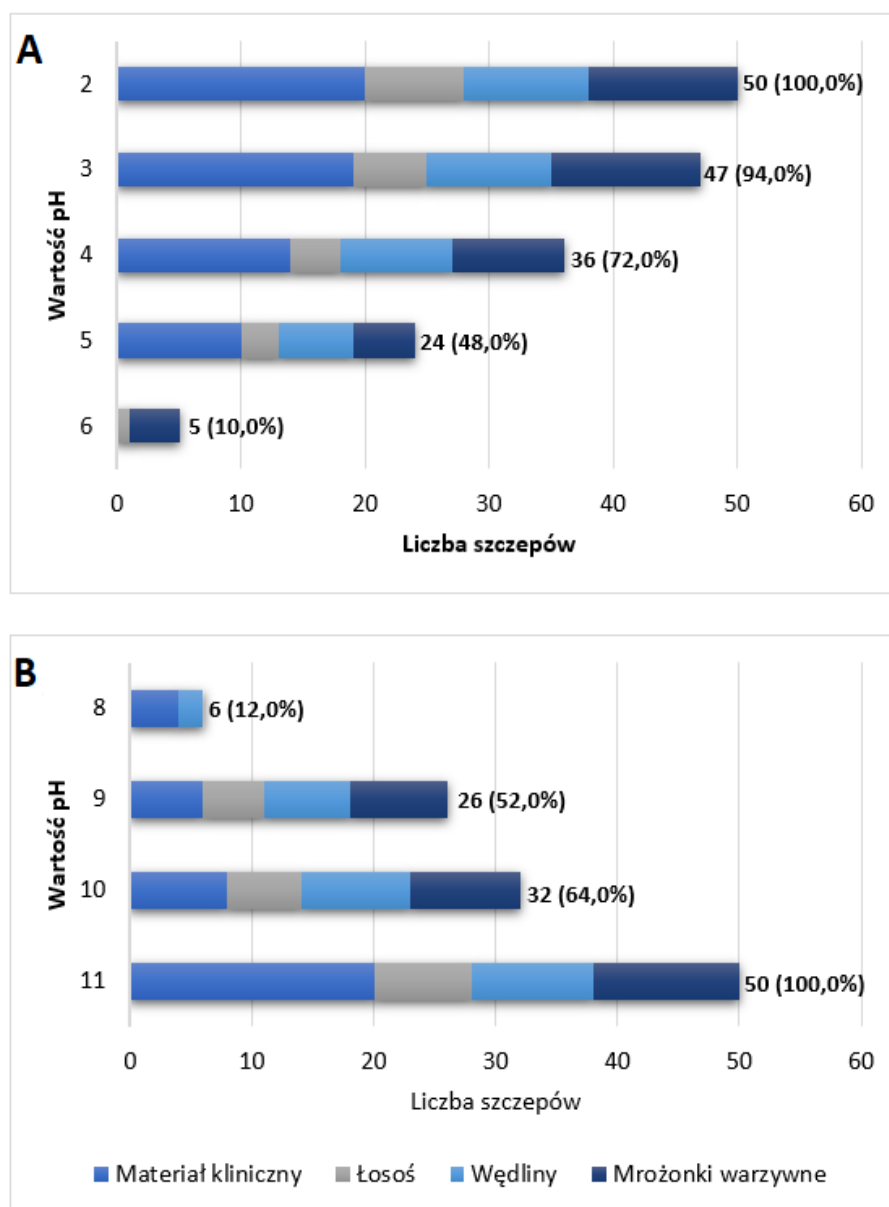
badanych szczepów (n=50). W analizie wyników uwzględniono dwa warianty, tj. „wartość pH < 7,0 hamująca wzrost” (stres kwasowy) oraz „wartość pH > 7,0 hamująca wzrost” (stres zasadowy). W przypadku, gdy stwierdzono wzrost (widoczne zmętnienie w bulionie, w trzech powtórzeniach) przy pH 10,0 i pH 3,0, arbitralnie przyjęto odpowiednio wartości 11,0 i 2,0 jako hamujące wzrost.

Mediana dla „wartości pH < 7,0 hamująca wzrost” wynosiła 5,0; 4,5; 4,0 i 3,5 dla szczepów izolowanych odpowiednio z wędlin, materiału klinicznego, mrożonek warzywnych i łososia (ryc. 21). Nie wykazano istotnych statystycznie zależności w odpowiedzi na stres kwasowy w zależności od pochodzenia szczepów (ryc. 21).



Rycina 21. Porównanie grup szczepów na podstawie pH<7, które hamowało wzrost (stres kwasowy). Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25 i 75 centyl, wąsy: minimum i maksimum. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie (p<0,05)

Wykazano, że pH 6,0 zahamowało wzrost 5 (10,0%) szczepów. Dalsze obniżanie pH powodowało zahamowanie wzrostu 24 (48,0%), 36 (72,0%) i 47 (94,0%) szczepów, odpowiednio przy pH 5,0, 4,0 i 3,0 (ryc. 22A).

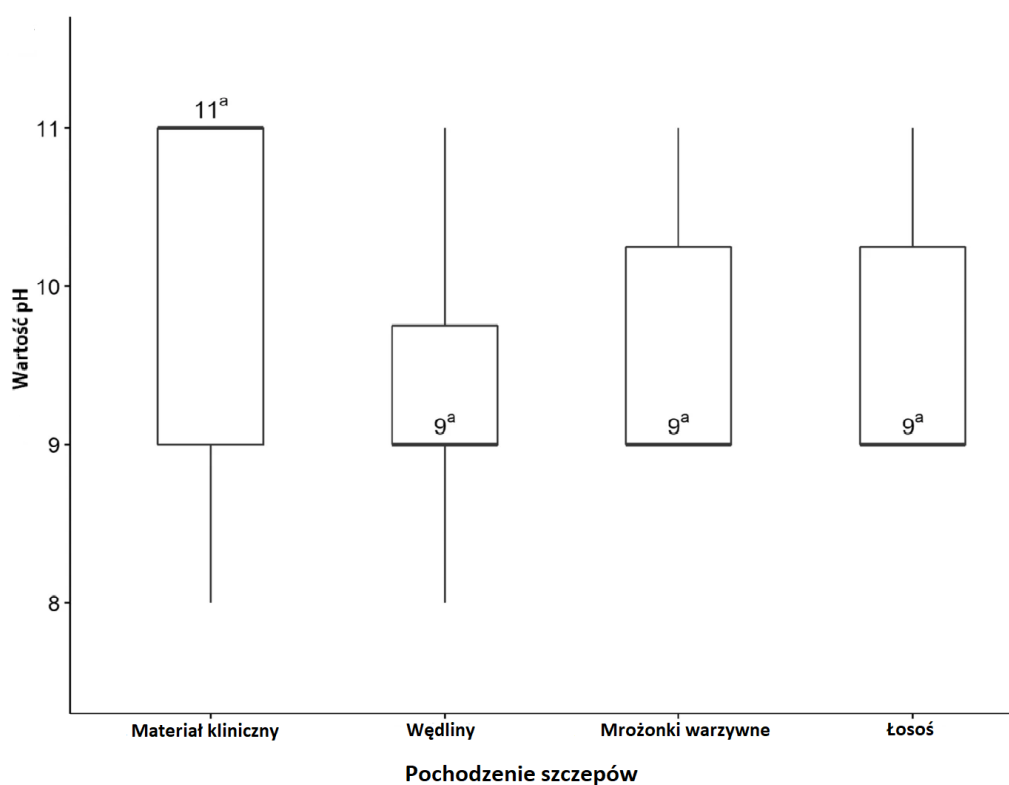


Rycina 22. Liczba szczepów, u których wykazano zahamowanie w zależności od wartości pH. A. wartości w wariacie pH<7,0, B. wartości w wariacie pH>7,0

Wykazano, że wartość pH 8,0 zahamowała wzrost 6 (12,0%) szczepów (ryc. 22B). Natomiast, przy pH 9,0 wykazano brak wzrostu 26 (52,0%) szczepów, a przy pH 10,0 - 32 (64,0%) badanych *L. monocytogenes* (ryc. 22B). Co istotne, 18 (36,0%) szczepów, w tym 12 wyosobnionych z materiału klinicznego, trzech

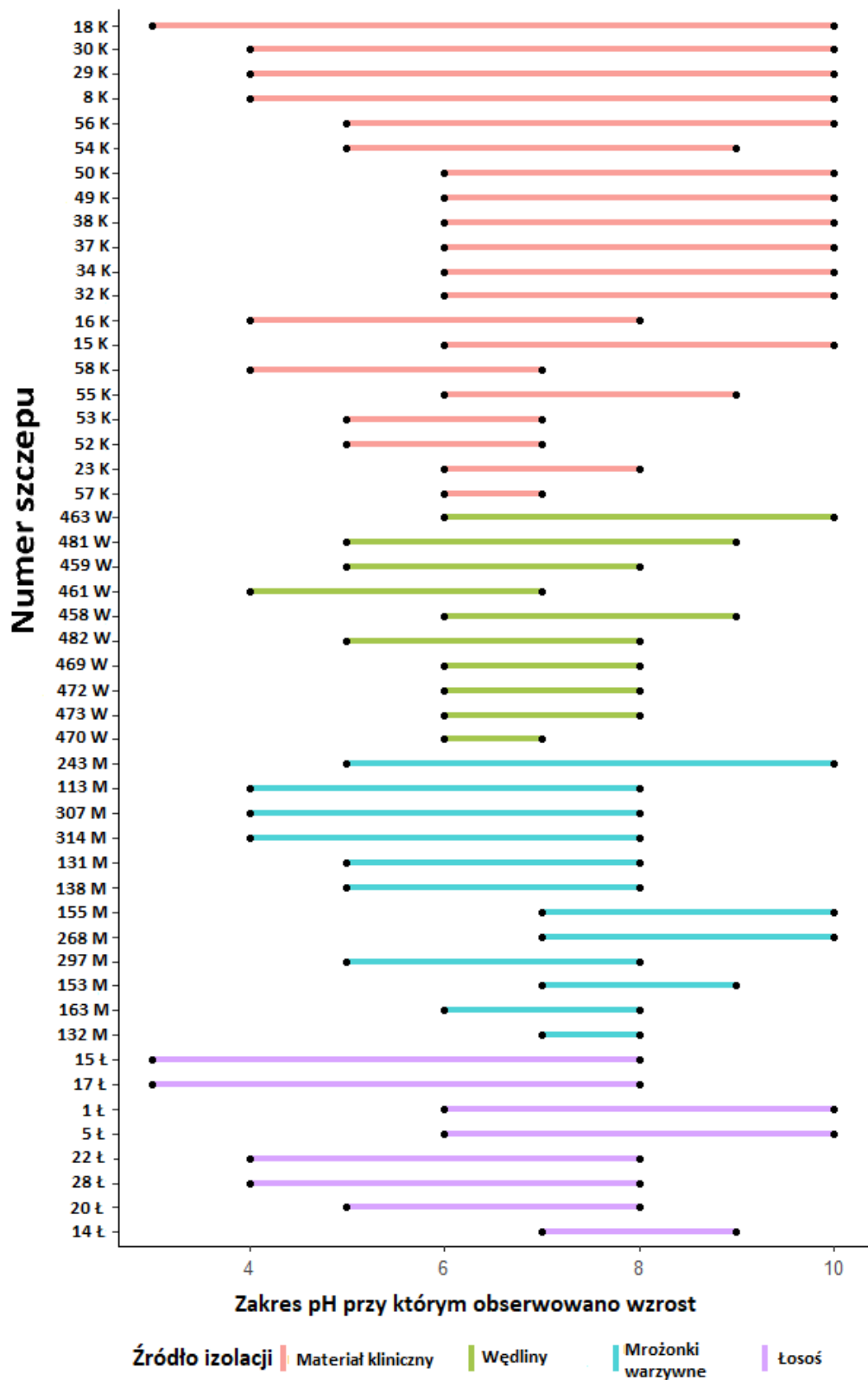
z mrozonek warzywnych, dwóch z łososia i jednego z wędlin, wzrastało przy pH 10,0.

Mediana w wariancie „wartość pH > 7,0 hamująca wzrost” wynosiła 11,0 dla szczepów wyosobnionych z materiału klinicznego oraz 9,0 dla szczepów izolowanych z wędlin, mrozonek warzywnych i łososia (ryc. 23). Nie wykazano istotnych statystycznie zależności w odpowiedzi na stres zasadowy w zależności od pochodzenia szczepów (ryc. 23).



Rycina 23. Porównanie grup szczepów na podstawie pH>7, które hamowało wzrost (stres zasadowy). Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25 i 75 centyl, wąsy: minimum i maksimum. a, b—wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$)

Zakres pH, przy którym obserwowano wzrost badanych szczepów ($n=50$) przedstawiono na ryc. 24. Wykazano, że 10 (20,0%) szczepów z zahamowanym wzrostem przy pH 5,0 tolerowało szerszy zakres pH, aż do wartości 10,0. Natomiast, szczep izolowany z materiału klinicznego (18K) tolerował najszerszy zakres ujętego w badaniu pH (od 3,0 do 10,0). Wykazano, że trzy szczepy namnażały się tylko w bardzo wąskim zakresie pH (zakres 6,0-7,0 [szczepy 57K i 470W] oraz zakres 7,0-8,0 [szczep 132M]) (ryc. 24).



Rycina 24. Zakres pH, w którym wykazano wzrost badanych szczepów (n=50) *L. monocytogenes*. K-materiał kliniczny, W-wędliny, M-mrożonki warzywne, Ł-łosoś

4.3.3. Stres cieplny

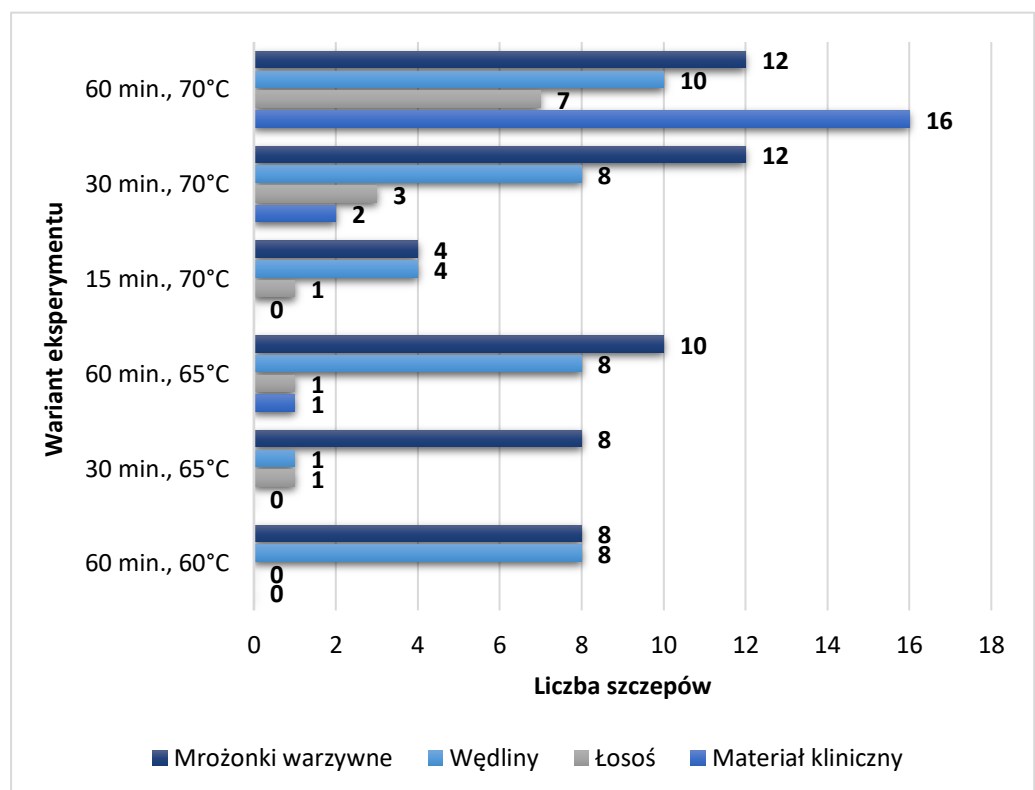
Analizie poddano przeżywalność badanych szczepów *L. monocytogenes* po ekspozycji na cztery warianty wysokiej temperatury (55, 60, 65 i 70°C) w następujących punktach czasowych: 2, 15, 30 i 60 minut (stres cieplny). W tab. 12 przedstawiono mediany liczby komórek dla każdego wariantu badania w zależności od pochodzenia badanych szczepów.

Tabela 12. Mediana liczby komórek po ekspozycji na stres cieplny w zależności od pochodzenia badanych szczepów

Wariant stresu	Mediana liczby komórek [log j.t.k./ml]			
	Szczepy z materiału klinicznego (n=20)	Szczepy z łososia (n=8)	Szczepy z wędlin (n=10)	Szczepy z mrożonek warzywnych (n=12)
Bez czynnika stresowego	11,39	11,21	10,92	11,44
2 minuty, 55°C	10,97	10,84	10,67	11,06
15 minut, 55°C	6,89	6,93	6,89	6,54
30 minut, 55°C	5,47	5,49	5,28	5,49
60 minut, 55°C	3,85	3,73	3,63	3,48
2 minuty, 60°C	10,46	10,45	10,19	10,24
15 minut, 60°C	6,04	5,85	5,13	4,96
30 minut, 60°C	5,35	3,60	4,04	3,33
60 minut, 60°C	3,60	3,03	0,0	0,0
2 minuty, 65°C	9,92	9,92	10,28	10,11
15 minut, 65°C	5,45	3,39	3,96	3,52
30 minut, 65°C	4,15	2,25	2,76	0,00
60 minut, 65°C	1,48	1,30	0,00	0,00
2 minuty, 70°C	9,08	9,24	9,06	8,81
15 minut, 70°C	3,69	2,46	1,30	1,54
30 minut, 70°C	1,15	1,15	0,00	0,00
60 minut, 70°C	0,00	0,00	0,00	0,00

j.t.k.-jednostka tworząca kolonie

Ekspozycja badanych szczepów *L. monocytogenes* na stres cieplny skutkowała zmniejszeniem liczby komórek, w każdym wariancie temperaturowym oraz czasowym dla wszystkich badanych szczepów niezależnie od pochodzenia (tab. 12). Odpowiedź na stres cieplny była cechą indywidualną szczepów. Wykazano przeżywalność wszystkich badanych szczepów w temperaturze 55°C (2, 15, 30 i 60 minut) oraz 60°C (2, 15 i 30 minut). Najniższa temperatura, która zahamowała wzrost *L. monocytogenes* wynosiła 60°C, czas ekspozycji 60 minut. W tym wariancie wykazano zahamowanie wzrostu u 16 (32,0%) badanych szczepów. Udokumentowano, że zwiększenie temperatury do 70°C skutkowało zahamowaniem wzrostu kolejnych szczepów, odpowiednio czterech, czterech i jednego wyosobnionych z wędlin, mrożonek warzywnych i łososa dla czasu 15 minut (ryc. 25). W wariancie, w którym szczepy *L. monocytogenes* poddano działaniu 70°C przez 60 minut wykazano przeżywalność 5 (10,0%) szczepów, w tym czterech izolowanych z materiału klinicznego oraz jednego szczepu wyosobnionego z łososa.



Rycina 25. Liczba szczepów niewykazujących wzrostu po ekspozycji na stres cieplny. Na rycinie przedstawiono tylko warianty badania, które zahamowały wzrost wśród badanych szczepów

4.3.4. Stres niskiej temperatury

Określono przeżywalność badanych szczepów *L. monocytogenes* po ekspozycji na temperaturę 4°C (stres niskiej temperatury) przez 1, 3, 5, 10, 15 i 30 dni. W tab. 13 przedstawiono mediany liczby bakterii na każdym etapie eksperymentu z uwzględnieniem pochodzenia tych szczepów.

Tabela 13. Mediana liczby komórek po ekspozycji na stres niskiej temperatury w zależności od pochodzenia szczepów *L. monocytogenes*

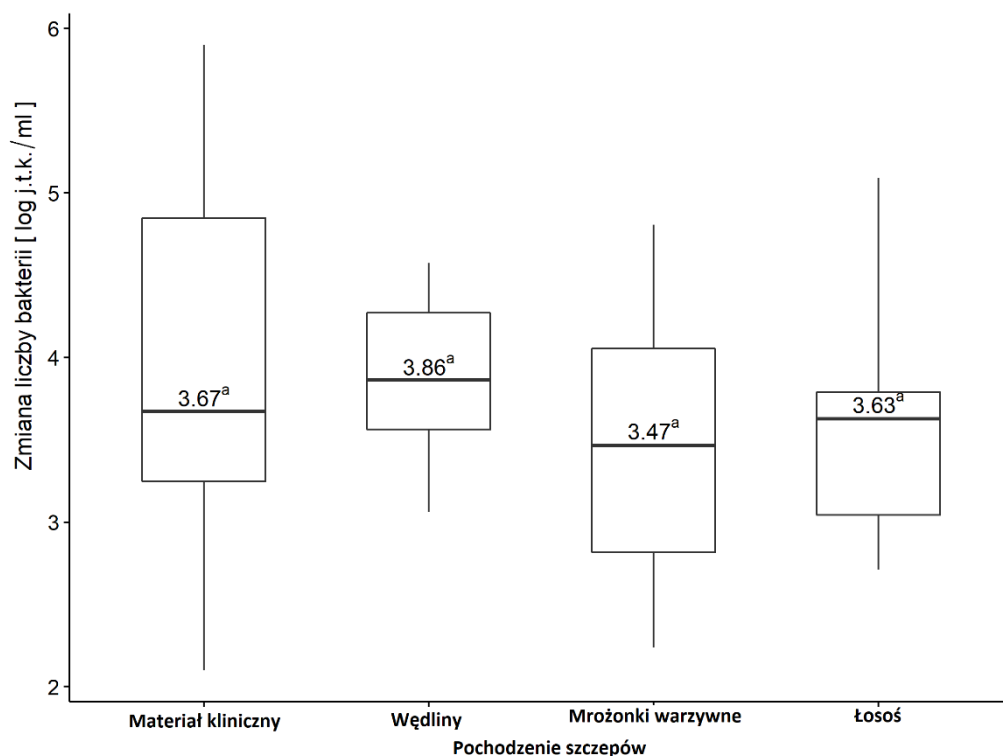
Wariant czasowy stresu [dni]	Mediana liczby komórek [log j.t.k./ml]			
	Szczepy z materiału klinicznego (n=20)	Szczepy z łososia (n=8)	Szczepy z wędlin (n=10)	Szczepy z mrożonek warzywnych (n=12)
Bez czynnika stresowego	6,97	6,64	6,37	6,77
1	7,78	7,97	7,95	7,96
3	8,41	8,27	8,30	8,40
5	9,36	9,01	8,64	8,96
10	9,60	8,95	8,83	9,03
15	10,46	9,46	8,94	8,40
30	11,02	10,19	10,13	10,18

j.t.k.-jednostka tworząca kolonie

Stres związany z działaniem niskiej temperatury nie spowodował całkowitej eliminacji żadnego z badanych szczepów. Po 24 godzinach oraz 3 i 5 dniach ekspozycji na działania temperatury 4°C wykazano wzrost liczby bakterii względem kontroli dla wszystkich badanych szczepów (tab. 13).

Na ryc. 26 przedstawiono wyniki zmiany liczby bakterii względem kontroli po ekspozycji na stres niskiej temperatury dla grup szczepów ze względu na pochodzenie. Mediana zmiany liczebności bakterii wynosiła 3,86; 3,67; 3,63 i 3,47 log. j.t.k./ml dla szczepów izolowanych odpowiednio z wędlin, materiału klinicznego, łososia i mrożonek warzywnych (ryc. 26). Nie

wykazano istotnych statystycznie zależności w tolerancji na stres niskiej temperatury w odniesieniu do pochodzenia badanych szczepów (ryc. 26).



Rycina 26. Zmiana liczebności bakterii względem kontroli po 30 dniach ekspozycji na stres niskich temperatur w zależności od pochodzenia badanych szczepów. Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25 i 75 centyl, wąsy: minimum i maksimum. a, b- wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$). j.t.k.- jednostka tworząca kolonie

4.3.5. Stres cyklicznego zamrażania i rozmrażania

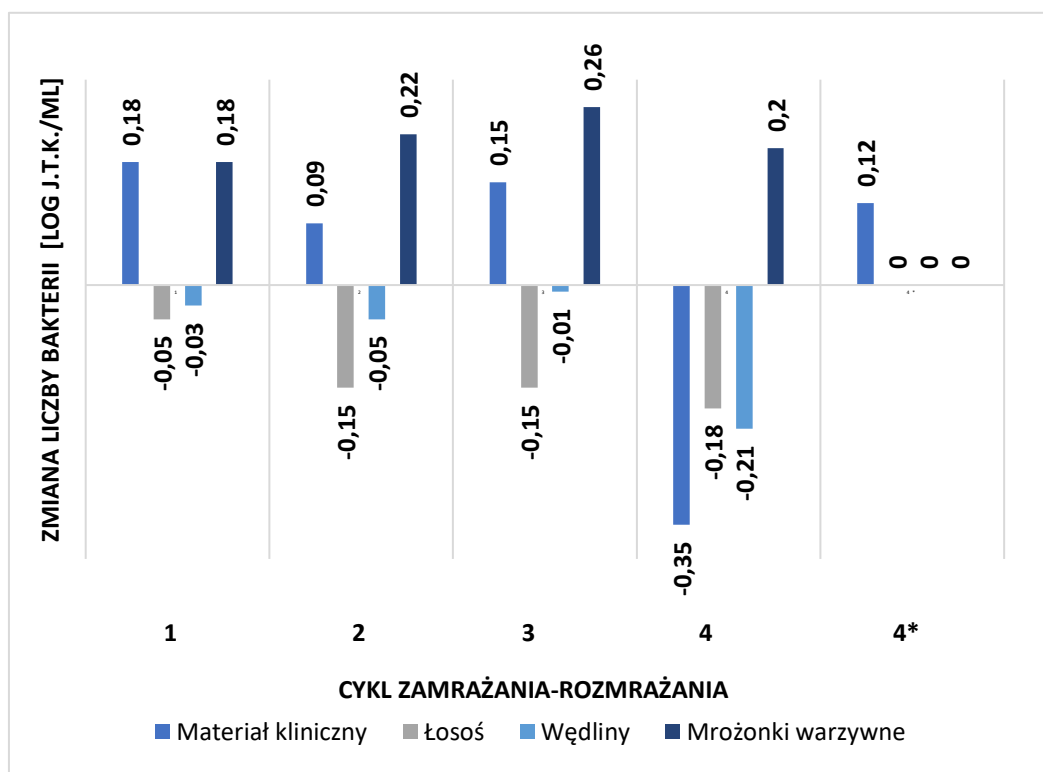
Oceniono wpływ 4 cykli zamrażania (-20°C) oraz rozmrażania na przeżywalność badanych szczepów *L. monocytogenes*. W badaniu uwzględniono wariant, w którym próbki przechowywano w zamrożeniu i rozmrożono je wraz z ostaniem rozmrażaniem próbek poddawanych cyklicznemu zamrażaniu-rozmrażaniu. W tab. 14 przedstawiono mediany liczby bakterii na każdym etapie badania z uwzględnieniem pochodzenia szczepów.

Tabela 14. Mediany liczby bakterii po ekspozycji na stres cyklicznego zamrażania i rozmrażania w zależności od pochodzenia badanych szczepów

Wariant czasowy stresu	Mediana liczby komórek [log j.t.k./ml]			
	Szczepy z materiału klinicznego (n=20)	Szczepy z łososia (n=8)	Szczepy z wędlin (n=10)	Szczepy z mrożonek warzywnych (n=12)
Bez czynnika stresowego	7,45	7,60	7,41	7,27
1 cykl	7,63	7,55	7,38	7,45
2 cykl	7,54	7,45	7,36	7,49
3 cykl	7,60	7,45	7,40	7,53
4 cykl	7,10	7,42	7,20	7,47
rozmrożenie po 4 cyklu*	7,57	7,60	7,41	7,27

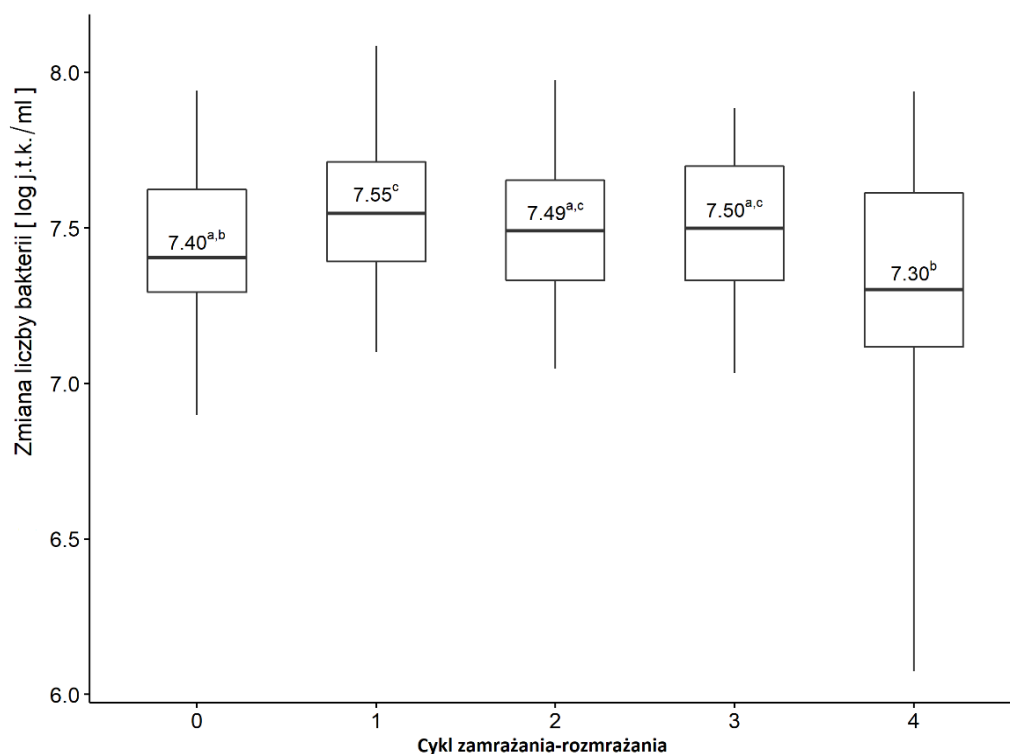
j.t.k. – jednostka tworząca kolonie, * - bez cyklicznego zamrażania-rozmrażania

Wykazano, przeżywalność badanych szczepów na każdym etapie stresu zamrażania-rozmrażania (tab. 14). Ujawniono wzrost liczby bakterii po 1., 2. i 3. cyklu dla szczepów izolowanych z materiału klinicznego oraz spadek po 4. cyklu zamrażania-rozmrażania (ryc. 27). W odniesieniu do szczepów wyosobnionych z łososia i wędlin wykazano spadek liczby bakterii względem kontroli podczas wszystkich cykli stresu (ryc. 27). Potwierdzono wzrost liczby bakterii po każdym cyklu zamrażania-rozmrażania dla szczepów izolowanych z mrożonek warzywnych. Dla badanych szczepów rozmrożonych tylko jednokrotnie, po 4. cyklu wykazano wzrost liczby bakterii szczepów izolowanych z materiału klinicznego (o 0,12 log j.t.k./ml) względem kontroli. W odniesieniu do szczepów izolowanych z łososia, wędlin i mrożonek warzywnych w tym wariancie nie stwierdzono zmiany w liczbie bakterii wobec kontroli (tab. 14, ryc. 27).



Rycina 27. Zmiana liczby bakterii [log j.t.k. (jednostka tworząca kolonie)/ml] względem kontroli podczas stresu cyklicznego zamrażania-rozmrażania. 4* - bez cyklicznego zamrażania-rozmrażania

Oceniono wpływ numeru cyklu stresu cyklicznego zamrażania-rozmrażania na zmiany w liczbie bakterii, niezależnie od pochodzenia szczepów. Na podstawie testu Wilcozona wykazano istotne statystycznie zależności pomiędzy cyklami 0 i 1 (widoczny wzrost liczby bakterii), a także między cyklem 4 a 1, 2, 3 (po 4. cyklu liczba bakterii spadła) (ryc. 28). Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności ($p = 0,074$) w liczbie bakterii pomiędzy wariantem 4 cykli zamrażania-rozmrażania a wariantem rozmrażania tylko po 4. cyklu (bez cyklicznego zamrażania i rozmrażania).

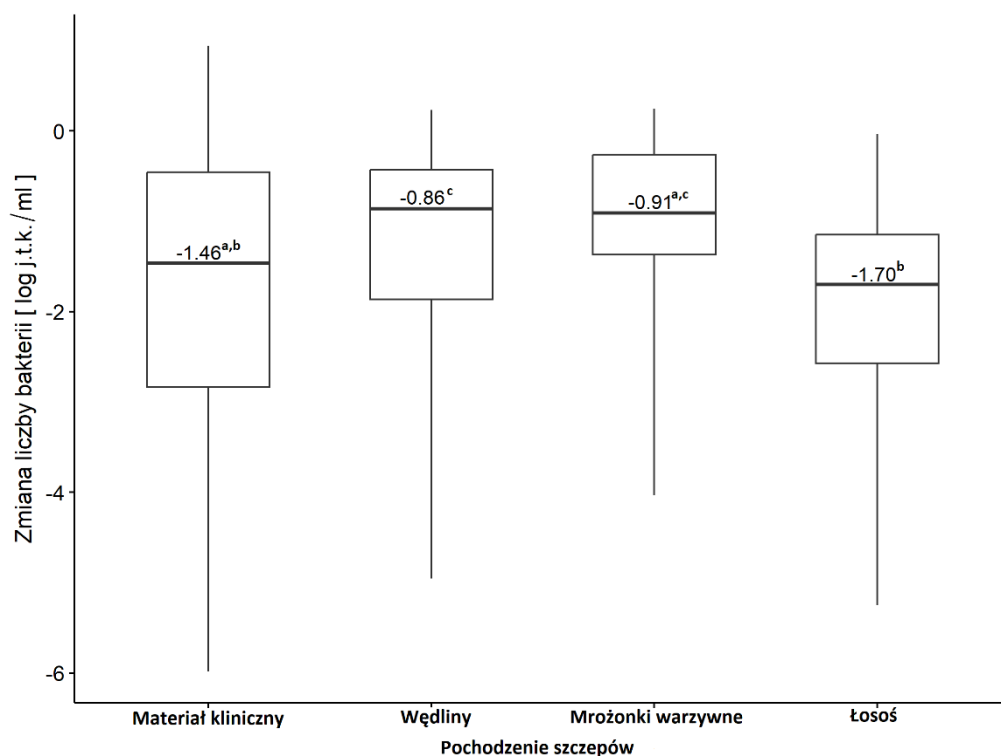


Rycina 28. Porównanie numeru cyklu zamrażania-rozmrażania na podstawie zmiany liczby bakterii. Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25 i 75 centyle, wąsy: minimum i maksimum. a, b, c-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$)

4.3.6. Stres związany z niedoborem i nadmiarem składników odżywczych

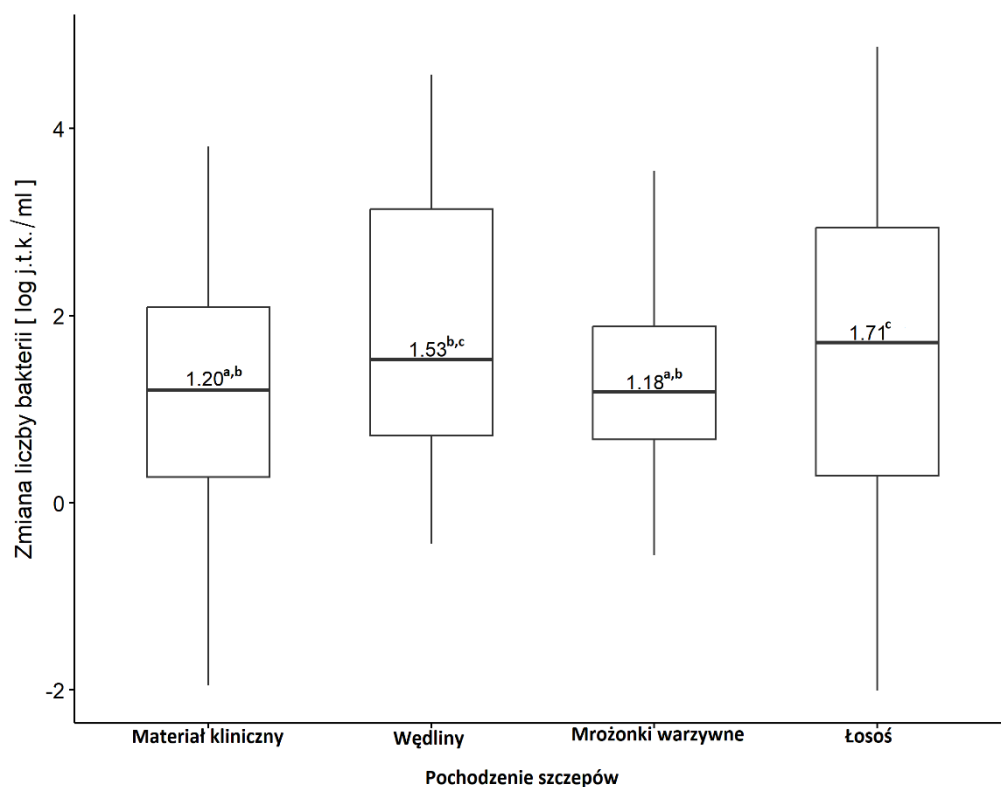
Określono, zarówno wpływ niedoboru jak i nadmiaru składników odżywczych dostępnych w bulionie na przeżywalność badanych szczepów *L. monocytogenes*.

Potwierdzono przeżywalność badanych szczepów przy każdej dostępności składników odżywczych. Wykazano, że mediana zmiany liczby bakterii (względem kontroli) w wariancie niskiej dostępności składników odżywczych wynosiła -0,86; -0,91, -1,46 i -1,70 log j.t.k./ml dla szczepów izolowanych odpowiednio z wędlin, mrożonek warzywnych, materiału klinicznego i łososia (ryc. 29). Wykazano istotne statystycznie różnice w przeżywalności badanych *L. monocytogenes* podczas stresu związanego z niedoborem składników odżywczych pomiędzy szczepami izolowanymi z wędlin a szczepami z materiału klinicznego i łososia, a także pomiędzy szczepami wyosobnionymi z łososia a z wędlin i mrożonek warzywnych (ryc. 29).



Rycina 29. Zmiana liczby bakterii względem kontroli dla wariantu niskiej dostępności składników odżywczych dla badanych szczepów ze względu na pochodzenie. Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25. i 75. centyl, wąsy: minimum i maksimum. a, b- wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$). j.t.k.- jednostka tworząca kolonie

Wykazano, że mediana zmiany liczby bakterii (względem kontroli) w wariacie wysokiej dostępności składników wynosiła 1,18; 1,20; 1,53 i 1,71 log j.t.k./ml dla szczepów izolowanych odpowiednio z mrozonek warzywnych, materiału klinicznego, wędlin i łososia (ryc. 30). Wykazano istotne statystycznie różnice w przeżywalności badanych *L. monocytogenes* podczas stresu związanego z nadmiarem składników odżywczych pomiędzy szczepami izolowanymi z łososia a wyosobnionymi z materiału klinicznego i mrozonek warzywnych (ryc. 30).



Rycina 30. Zmiana liczby bakterii względem kontroli dla wariantu wysokiej dostępności składników odżywczych dla badanych szczepów ze względu na pochodzenie. Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25. i 75. centyl, wąsy: minimum i maksimum. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$). j.t.k.-jednostka tworząca kolonie

4.3.7. Klasyfikacja szczepów względem odpowiedzi na wybrane czynniki stresowe

Badane szczepy *L. monocytogenes* sklasyfikowano według odpowiedzi na wybrane warunki stresowe. W tab. 15 przedstawiono wyniki uzyskane metodą rangowania dla wszystkich badanych szczepów ($n=50$).

Tabela 15. Klasyfikacja badanych szczepów na podstawie metody rangowania

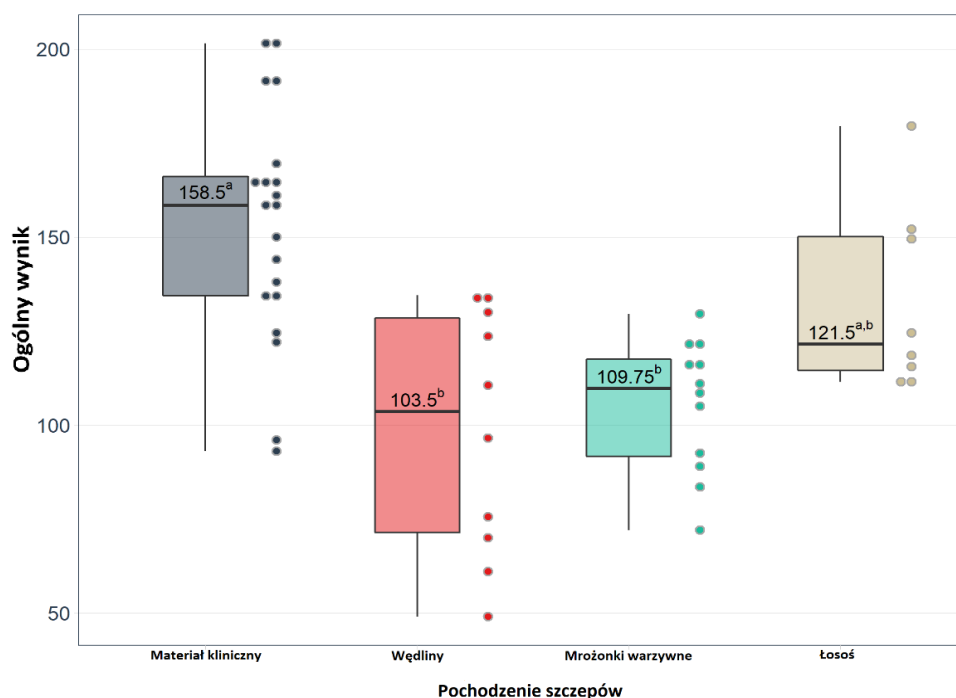
Numer szczepu	Wariant stresu / punkty					Wynik
	Wysoki dostęp składników odżywczych	Niski dostęp składników odżywczych	Stres osmotyczny	Zakres pH	Stres cieplny	
55K	49	42	45	18,5	47	201,5
58K	50	45	45	18,5	43	201,5
56K	42	15	45	44,5	46	192,5
38K	46	46	21	33,5	44	190,5
17Ł	41	7	50	44,5	37	179,5
49K	32	50	21	33,5	33	169,5
37K	27	16	39,5	33,5	49	165
50K	29	21,5	49	33,5	31,5	164,5
57K	33	34	45	2	50	164
30K	45	28	21	48	19	161
54K	36,5	23,5	21	33,5	45	159,5
32K	38	17	21	33,5	48	157,5
15Ł	31	35,5	21	44,5	20	152
15K	47	8,5	21	33,5	40	150
28Ł	26	26,5	39,5	33,5	24	149,5
29K	43	19	21	48	13	144
8K	22	5	21	48	42	138
18K	36,5	18	21	50	9	134,5
459W	11,5	25	48	18,5	31,5	134,5
34K	48	8,5	21	33,5	23	134
461W	21	40	39,5	18,5	14	133
481W	11,5	41	3	33,5	41	130
113M	6	49	3	33,5	38	129,5
16K	34	20	21	33,5	16	124,5
1Ł	40	2	21	33,5	28	124,5
463W	17,5	21,5	21	33,5	30	123,5
243M	15	31	21	44,5	11	122,5
52K	30	29	21	8	34	122
131M	9,5	43	39,5	18,5	10	120,5
14Ł	44	23,5	21	8	22	118,5
297M	2	48	45	18,5	3	116,5
20Ł	23	44	3	18,5	27	115,5
268M	3	37	21	18,5	36	115,5
22Ł	24	12	3	33,5	39	111,5
5Ł	39	6	21	33,5	12	111,5
314M	1	32	39,5	33,5	5	111
482W	7	47	3	18,5	35	110,5
307M	5	26,5	39,5	33,5	4	108,5
138M	13	35,5	21	18,5	17	105
458W	14	14	21	18,5	29	96,5
53K	28	13	21	8	26	96
23K	35	11	21	8	18	93
155M	8	30	21	18,5	15	92,5
163M	19	33	21	8	8	89
153M	9,5	38	21	8	7	83,5
469W	17,5	4	21	8	25	75,5
132M	4	39	21	2	6	72
470W	25	1	21	2	21	70
473W	20	10	21	8	2	61
472W	16	3	21	8	1	49

K-materiał kliniczny, Ł-łosoś, W-wędliny, M-mrożonki warzywne

Najwyższą, sumaryczną notę w klasyfikacji uzyskały cztery szczepy izolowane z materiału klinicznego: 55K, 58K, 56K, 38K oraz jeden szczep wyosobniony z łosia (17Ł) (tab. 15). Szczepy 55K i 38K zostały wyhodowane z płynu mózgowo-rdzeniowego, natomiast 58K i 56K z krwi.

Wśród najbardziej wrażliwych na warunki stresowe (5 ostatnich miejsc w klasyfikacji [z najniższą sumaryczną punktacją]) były cztery szczepy izolowane z wędlin oraz jeden z mrożonek warzywnych. Szczepy te sklasyfikowano w kolejności: 469W, 132M, 470W, 473W, 472W (tab. 15).

Średni wynik przeprowadzonej klasyfikacji wynosił 158,5; 121,5, 109,75 oraz 103,5 punktów (na 250 możliwych punktów) odpowiednio dla szczepów izolowanych z materiału klinicznego, łosia, mrożonek warzywnych i wędlin (ryc. 31). Najwyższą tolerancję na warunki stresowe uwzględnione w klasyfikacji wykazały szczepy kliniczne, natomiast najbardziej wrażliwe były szczepy wyosobnione z wędlin. Wykazano istotne statystycznie różnice w ogólnej punktacji pomiędzy szczepami izolowanymi z materiału klinicznego a szczepami wyosobnionymi z wędlin i mrożonek warzywnych (ryc. 31).



Rycina 31. Ogólny wynik klasyfikacji dla każdej grupy szczepów. Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25 i 75 centyl, wąsy: minimum i maksimum z rozkładem danych w postaci kropek. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$)

4.4. Wpływ czynników stresowych na wybrane cechy fenotypowe i ekspresję wybranych genów trzech badanych szczepów *Listeria monocytogenes*

Na podstawie klasyfikacji opisanej w punkcie 4.3.7., do dalszych badań wybrano szczep 55K z najwyższą sumaryczną liczbą punktów (wyższa liczba punktów za stres cieplny) oraz 472W z najniższą liczbą punktów. W badaniu uwzględniono szczep wzorcowy *L. monocytogenes* ATCC 19111.

Ocenie poddawano wpływ następujących stresów: cieplnego, niskiej temperatury, mrożenia, kwasowego, zasadowego oraz osmotycznego na wybrane cechy fenotypowe (MIC antybiotyków, zdolność do tworzenia biofilmu, zdolność do ruchu) oraz poziom ekspresji genów *sigB* i *agrA*. Uwzględnione w badaniu warunki stresowe wybrano na podstawie analizy wyników uzyskanych w pierwszym etapie badań.

4.4.1. Zdolność tworzenia biofilmu po ekspozycji na czynniki stresowe

Wykazano, że szczep 55K, charakteryzujący się umiarkowaną zdolnością tworzenia biofilmu (wariant kontrolny) tworzył silny biofilm po ekspozycji na niską temperaturę oraz słaby biofilm w odpowiedzi na stres mrożenia (tab. 16).

Tabela 16. Zdolność tworzenia biofilmu przez szczep 55K w wariacie kontrolnym oraz po ekspozycji na czynniki stresowe

Wariant stresu	Średnia absorbancja	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]	Klasyfikacja szczepu ze względu na tworzony biofilm*
Bez czynnika stresowego	0,213	0,009	4,44	Umiarkowany
Cieplny	0,163	0,020	12,42	Umiarkowany
Niskiej temperatury	0,311	0,015	4,92	Silny
Mrożenia	0,106	0,003	2,87	Słaby
Osmotyczny	0,162	0,002	1,52	Umiarkowany
Kwasowy	0,137	0,001	0,40	Umiarkowany
Zasadowy	0,128	0,008	6,10	Umiarkowany

*kolor zielony-spadek w stosunku do wariantu podstawowego, kolor czerwony-wzrost w stosunku do wariantu podstawowego, kolor biały-bez zmian

Szczep 472W określono jako umiarkowanie tworzący biofilmu (bez działania czynników stresowych). Zmianę w sile tworzenia biofilmu stwierdzono po ekspozycji na stres niskiej temperatury, osmotyczny, zasadowy i mrożenia (tab. 17).

Tabela 17. Zdolność tworzenia biofilmu przez szczep 472W w wariacie kontrolnym oraz po ekspozycji na czynniki stresowe

Wariant stresu	Średnia absorbancja	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]	Klasyfikacja szczepu ze względu na tworzony biofilm*
Bez czynnika stresowego	0,183	0,014	7,88	Umiarkowany
Ciepły	0,280	0,008	2,78	Umiarkowany
Niskiej temperatury	0,342	0,014	4,02	Silny
Mrożenia	0,324	0,011	3,53	Silny
Osmotyczny	0,368	0,026	6,98	Silny
Kwasowy	0,240	0,047	19,70	Umiarkowany
Zasadowy	0,336	0,004	1,13	Silny

*kolor czerwony-wzrost w stosunku do wariantu podstawowego, kolor biały-bez zmian

Szczep wzorcowy ATCC 19111 w wariacie kontrolnym charakteryzował się słabą zdolnością tworzenia biofilmu. Po ekspozycji na stres ciepły, osmotyczny, kwasowy i zasadowy stwierdzono zwiększoną zdolność tworzenia biofilmu i szczep ten sklasyfikowano jako umiarkowanie tworzący biofilm (tab. 18).

Tabela 18. Zdolność tworzenia biofilmu przez szczep ATCC 19111 w wariacie kontrolnym oraz po ekspozycji na czynniki stresowe

Wariant stresu	Średnia absorbancja	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]	Klasyfikacja szczepu ze względu na tworzony biofilm*
Bez czynnika stresowego	0,067	0,003	4,82	Słaby
Ciepły	0,180	0,014	7,93	Umiarkowany
Niskiej temperatury	0,075	0,003	3,37	Słaby
Mrożenia	0,110	0,000	0,00	Słaby
Osmotyczny	0,164	0,010	5,88	Umiarkowany
Kwasowy	0,138	0,001	0,42	Umiarkowany
Zasadowy	0,121	0,008	6,45	Umiarkowany

*kolor czerwony-wzrost w stosunku do wariantu podstawowego, kolor biały-bez zmian

Każdy z uwzględnionych wariantów stresowych wpłynął na zmiany w zdolności tworzenia biofilmu przez badane szczepy *L. monocytogenes*. Zmiany te były zróżnicowane w zależności od badanego szczepu.

4.4.2. Zdolność do ruchu

Wykazano, że badane szczepy 55K, 472W i ATCC 1911, zarówno w wariancie kontrolnym (bez czynnika stresowego), jak i po ekspozycji na wszystkie badane warunki stresowe, wykazywały zdolność do ruchu.

4.4.3. Zmiany wartości minimalnego stężenia hamującego antybiotyków po ekspozycji na czynniki stresowe

Szczep 55K określono jako wrażliwy na 5 badanych antybiotyków, zarówno w wariancie kontrolnym, jak po ekspozycji na czynniki stresowe. Stres cieplny, zasadowy i mrożenia obniżył MIC penicyliny, z wartości 0,19 do 0,125 µg/ml. Wartość MIC ampicyliny uległa obniżeniu, z 0,19 do 0,125 µg/ml po ekspozycji na stres cieplny, osmotyczny i mrożenia. Stres kwasowy, zasadowy, osmotyczny i mrożenia wpłynęły na wzrost MIC meropenemu (z 0,064 do 0,094 µg/ml), a stres cieplny obniżał tę wartość do 0,047 µg/ml. Stwierdzono spadek MIC erytromycyny (z 0,25 do 0,125 µg/ml) i trimetoprimu-sulfametoksazolu (z 0,32 do 0,23 µg/ml) w odpowiedzi odpowiednio na stres cieplny oraz osmotyczny. Z kolei stres zasadowy i kwasowy podwyższyły wartości MIC odpowiednio erytromycyny (do 0,5 µg/ml) i trimetoprimu-sulfametoksazolu (do 0,047 µg/ml) (tab. 19).

Tabela 19. Zmiany wartości minimalnego stężenia hamującego antybiotyków w wariancie kontrolnym oraz po działaniu czynników stresowych dla szczepu 55K

Wariant stresu	Antybiotyk [µg/ml]				
	P	AM	MEM	E	STX
Bez czynnika stresowego	0,19	0,19	0,064	0,25	0,032
Cieplny	0,125	0,125	0,047	0,125	0,023
Mrożenia	0,125	0,125	0,094	0,25	0,032
Osmotyczny	0,19	0,125	0,094	0,25	0,023
Kwasowy	0,19	0,19	0,094	0,25	0,047
Zasadowy	0,125	0,19	0,094	0,50	0,032

P-penicylina, AMP-ampicylina, MEM-meropenem, E-erytromycyna, STX-trimetoprim-sulfametoksazol, kolor zielony-spadek w stosunku do wariantu kontrolnego, kolor czerwony-wzrost w stosunku do wariantu kontrolnego, kolor biały-bez zmian

Wykazano, że w przypadku szczepu 472W stres cieplny obniżył MIC penicyliny z wartości 0,19 do 0,125 µg/ml. Natomiast, stres cieplny i mrożenia wpłynęły na spadek MIC ampicyliny (z 0,125 do 0,094 µg/ml), podczas gdy stres kwasowy, zasadowy i osmotyczny zwiększał tę wartość (do 0,19 µg/ml). Pod wpływem stresu kwasowego i zasadowego wzrosła wartość MIC erytromycyny (z 0,64 do 0,94 µg/ml) oraz meropenemu (z 0,38 do 0,50 µg/ml). Natomiast ekspozycja na stres cieplny obniżyła wartości MIC erytromycyny (do 0,19 µg/ml) i meropenemu (do 0,047 µg/ml). Stres osmotyczny przyczynił się do zwiększenia MIC erytromycyny, do wartości 0,50 µg/ml. U badanego szczepu stwierdzono obniżenie wartości MIC trimetoprimu-sulfametoksazolu po ekspozycji na wszystkie badane warianty stresowe (tab. 20).

Tabela 20. Zmiany wartości minimalnego stężenia hamującego antybiotyków w wariacie kontrolnym oraz po działaniu czynników stresowych dla szczepu 472W

Wariant stresu	Antybiotyk [µg/ml]				
	P	AM	MEM	E	STX
Bez czynnika stresowego	0,19	0,125	0,064	0,38	0,023
Cieplny	0,125	0,094	0,047	0,19	0,016
Mrożenia	0,19	0,094	0,064	0,38	0,012
Osmotyczny	0,19	0,19	0,064	0,50	0,012
Kwasowy	0,19	0,19	0,094	0,50	0,012
Zasadowy	0,19	0,19	0,094	0,50	0,012

P-penicylina, AMP-ampicylina, MEM-meropenem, E-erytromycyna, STX-trimetoprim-sulfametoksazol, kolor zielony-spadek w stosunku do wariantu kontrolnego, kolor czerwony-wzrost w stosunku do wariantu kontrolnego, kolor biały-bez zmian

Wykazano, że stres cieplny obniżył wartości MIC wszystkich badanych antybiotyków, zarówno u szczepu klinicznego (55K), jak i u szczepu izolowanego z wędlin (472W) (tab. 19, 20).

U szczepu *L. monocytogenes* ATCC 19111 zaobserwowano wzrost wartości MIC penicyliny (z 0,47 do 0,64 µg/ml) po ekspozycji na stres zasadowy. Natomiast, stres cieplny i osmotyczny wpłynęły na obniżenie MIC ampicyliny z 0,47 do 0,32 µg/ml. Z kolei, niskie pH (stres kwasowy) obniżyło MIC meropenemu (z 0,32 do 0,23 µg/ml), podczas gdy ekspozycja na stres kwasowy, zasadowy i mrożenia podwyższyła MIC erytromycyny (z 0,125 do 0,25 µg/ml). W przypadku trimetoprimu-sulfametoksazolu, stres osmotyczny, kwasowy

i zasadowy powodował wzrost wartości MIC (z 0,23 do 0,32 µg/ml), podczas gdy stres cieplny powodował spadek do wartości 0,16 µg/ml (tab. 21).

Tabela 21. Zmiany wartości minimalnego stężenia hamującego antybiotyków w wariancie kontrolnym oraz po działaniu czynników stresowych dla szczepu ATCC 19111

Wariant stresu	Antybiotyk [µg/ml]				
	P	AM	MEM	E	SXT
Bez czynnika stresowego	0,047	0,047	0,032	0,125	0,023
Cieplny	0,047	0,032	0,032	0,125	0,016
Mrożenia	0,047	0,047	0,032	0,25	0,023
Osmotyczny	0,047	0,032	0,032	0,19	0,032
Kwasowy	0,047	0,047	0,023	0,25	0,032
Zasadowy	0,064	0,047	0,032	0,25	0,032

P-penicylina, AMP-ampicylina, MEM-meropenem, E-erytromycyna, STX-trimetoprim-sulfametoksazol, kolor zielony-spadek w stosunku do wariantu kontrolnego, kolor czerwony-wzrost w stosunku do wariantu kontrolnego, kolor biały-bez zmian

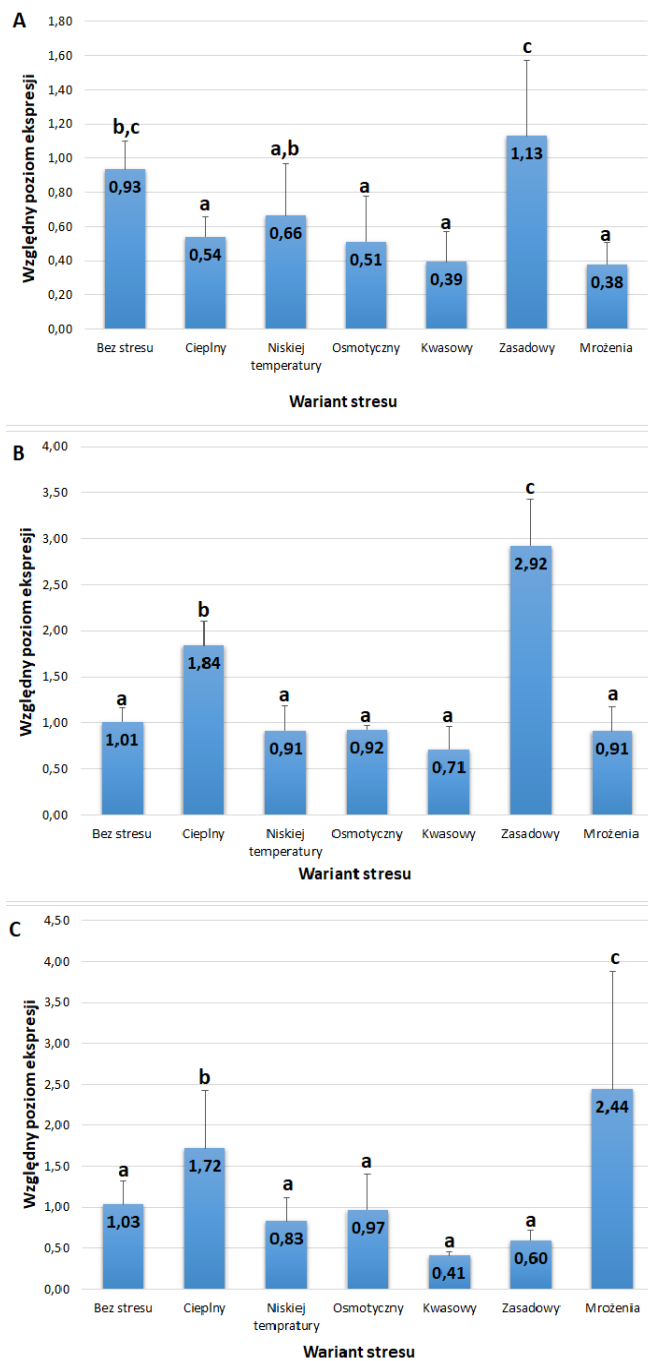
Wykazano, że warunki stresowe wpływają na zmiany wartości MIC antybiotyków, zarówno wzrost, jak i obniżenie (zależne od szczepu i czynnika stresowego). Zmiany te nie wpłynęły jednak na wrażliwość danego szczepu na antybiotyki.

4.4.4. Wpływ czynników stresowych na poziom ekspresji genów

Oceniono względny poziom ekspresji genów *sigB* i *agrA* względem genu metabolizmu podstawowego - *gap* dla trzech szczepów, w wariancie kontrolnym (bez czynnika stresowego) oraz po ekspozycji na badane warunki stresowe.

4.4.4.1. Poziom ekspresji genu *sigB*

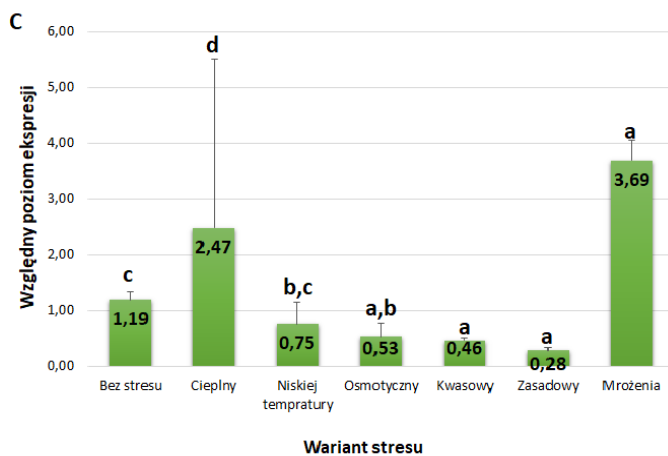
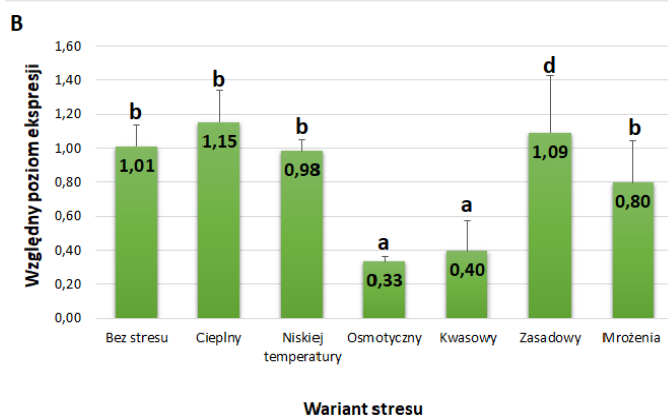
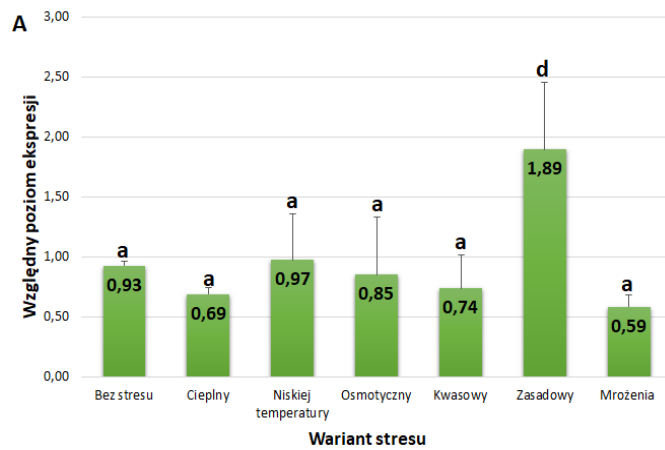
Wykazano istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji *sigB* w odpowiedzi na stres zasadowy (do wartości 1,13) dla szczepu 55K (ryc. 32A). Natomiast, dla szczepu 472W stwierdzono, że ekspozycja na stres cieplny i zasadowy spowodowała statystycznie istotny wzrost ekspresji genu *sigB*, odpowiednio do wartości 1,84 i 2,92 (ryc. 32B). Dla szczepu wzorcowego ATCC 19111 udokumentowano istotny statystycznie wzrost ekspresji genu *sigB* po ekspozycji na stres cieplny i mrożenia (ryc. 32C).



Rycina 32. Względny poziom ekspresji genu *sigB* szczepu A. 55K, B. 472W, C. ATCC 19111. a, b -wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$)

4.4.4.2. Poziom ekspresji genu *agrA*

Po ekspozycji na stres zasadowy ujawniono istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji genu *agrA* (do wartości 1,89) dla szczepu 55K (ryc. 33A) oraz 472W (do wartości 1,09) (ryc. 33B). Istotny wzrost poziomu ekspresji *agrA* dla szczepu wzorcowego notowano po ekspozycji na stres ciepły (ryc. 33C).



Rycina 33. Względny poziom ekspresji genu *agrA* szczepu A. 55K, B. 472W, C. ATCC 19111. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$)

5. Dyskusja

Pałeczki *L. monocytogenes* są czynnikiem etiologicznym listeriozy, która jest szczególnie niebezpieczna dla osób z grup podwyższonego ryzyka. Ze względu na zdolność adaptacji do zmiennych i niekorzystnych warunków bakterie te obecne są w wielu środowiskach. Stąd, źródłem *L. monocytogenes* mogą być, m.in. produkty spożywcze. W 2021 r. potwierdzono, że listerioza była 5. co do częstości występowania na terenie Unii Europejskiej chorobą związaną ze spożyciem zanieczyszczonej żywności, a śmiertelność wynosiła 13,7% [35]. Wysokie wskaźniki śmiertelności w przypadku listeriozy czynią zasadnym stałe monitorowanie *L. monocytogenes*, zwłaszcza w sektorze spożywczym. Powszechnie wiadomo, iż pałeczki *L. monocytogenes* cechuje duża oporność na stres środowiskowy. Znacząca część mechanizmów tej oporności jest bardzo dobrze poznana. Dotychczasowe badania dotyczące odpowiedzi na warunki stresowe u *L. monocytogenes* prowadzone były jednak na niewielkiej liczbie szczepów. Stąd w niniejszej rozprawie oceniono wpływ wybranych czynników stresowych w populacji 50 szczepów pochodzących z różnych źródeł, w tym z materiału klinicznego oraz żywności (łosoś, wędliny i mrożonki warzywne). Każdy z badanych izolatów w środowisku, z którego został wyosobniony miał kontakt z różnymi warunkami stresowymi, co pozwoliło na zróżnicowanie badanej populacji.

W pierwszym etapie badań, szczepy poddano wstępnej charakterystyce, która obejmowała określenie przynależności do grup serologicznych, wykrywanie obecności 10 genów kodujących wybrane czynniki wirulencji oraz ocenę antybiotykowrażliwości. Przypadki listeriozy najczęściej związane są z serotypami 4b, 1/2b i 1/2c, przy czym serotyp 4b jest odpowiedzialny za 50,0% z nich [30]. Natomiast serotyp 1/2a jest charakterystyczny dla izolatów z żywności i środowiska pozaszpitalnego [21]. W badaniu własnym wykazano, że większość szczepów (31; 62,0%) reprezentowało serogrupę 1/2a-3a (w tym 14 szczepów wyhodowanych z materiału klinicznego). Drugą co do liczebności była serogrupa 4b-4d-4e, potwierdzona u 14 (28,0%) szczepów (w tym 7

szczepów izolowanych z mrozonek warzywnych i czterech z materiału klinicznego). Podobne wyniki wśród szczepów *L. monocytogenes* izolowanych z serów rzemieślniczych na terenie Polski wykazali Pysz-Łuski i wsp. [219]. Badacze potwierdzili obecność grupy serologicznej 1/2a-3a i 4b-4d-4e odpowiednio u 46,9 i 31,2% badanych szczepów [219]. Kérouanton i wsp. [220] również wykazali wśród 90,6% szczepów (izolowanych z produktów spożywczych) serotyp 1/2a. W badaniu własnym cztery szczepy wyosobnione z materiału klinicznego reprezentowały serogrupę 4b-4d-4e. W dotychczasowych badaniach [221,222] potwierdzano, że najczęściej izolowanym serotypem wśród szczepów wyhodowanych z materiału klinicznego był serotyp 4b-4c-4d. W badaniu własnym jedynie trzy szczepy reprezentowały serogrupę 1/2b-3b. Odmienne wyniki uzyskali Zhang i wsp. [223], gdyż wśród badanych przez nich szczepów z żywności detalicznej dominował serotyp 1/2b, 3b (41,0%), natomiast serotyp 1/2a, 3a potwierdzili jedynie u dwóch szczepów (1,2%). Przynależność do grupy serologicznej jest zróżnicowana w zależności od regionu geograficznego.

W niniejszej rozprawie doktorskiej oceniono częstość występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji: białka powierzchniowego ActA (*actA*), białka FbpA (*fbpA*), listeriolizyny O (*hly*), adhezyny (*iap*), internaliny A i B (*inlA*, *inlB*), metaloproteazy (*mpl*), fosfolipaz (*plcA*, *plcB*) oraz plejotropowego regulatora wirulencji (*prfA*). Wśród badanych szczepów, u 30 (60,0%) wykryto wszystkie 10 genów uwzględnionych w badaniu. Obecność LIPI-1 została potwierdzona u 38 (76,0%) badanych szczepów. Ze względu na istotną funkcję LIPI-1, ta wyspa patogenności jest identyfikowana wśród większości szczepów *L. monocytogenes*, co potwierdzają liczne badania wśród szczepów izolowanych z różnych źródeł, w tym z materiału klinicznego, żywności, czy ze środowiska [224-227]. W niniejszym badaniu wykazano brak genu *fbpA* u 15 (30,0%) szczepów i genu *mpl* u 12 (24,0%) szczepów. Obecność genu *fbpA* u wszystkich badanych szczepów izolowanych z ryb i środowiska przetwórstwa rybnego na terenie Polski potwierdzili Zakrzewski i wsp. [228]. Das i wsp. [229] oraz Montero i wsp. [230] potwierdzili również obecność genu

mpl u wszystkich badanych szczepów. Białko FbpA (zaangażowane w wiązanie fibronektyny, przyleganie i wnikanie do komórek gospodarza) oraz Mpl (bierze udział w aktywacji fosfolipazy B oraz w ucieczce *L. monocytogenes* z wakuoli) związane są z cyklem życiowym *L. monocytogenes*.

W ostatnich latach notowany jest wzrost oporności na antybiotyki również wśród *L. monocytogenes* [132]. Nieracjonalne stosowane antybiotyków w dawkach subinhibicyjnych, zostało zidentyfikowane jako główna przyczyna znacznego wzrostu oporności bakterii na antybiotyki [231]. W badaniu własnym, 92,0% szczepów było wrażliwych na 5 uwzględnionych w badaniu antybiotyków, tj. penicylinę, ampicylinę, meropenem, erytromycynę oraz trimetoprim-sulfametoksazol. Kawacka i wsp. [232] również wykazali wrażliwość na 9 antybiotyków, w tym na penicylinę i erytromycynę wśród izolatów z surowego i przetworzonego mięsa oraz ze środowiska produkcji żywności. W badaniu własnym, oporność na penicylinę wykazano wśród trzech szczepów wyosobnionych z materiału klinicznego, a na erytromycynę u jednego szczepu izolowanego z łososia. Obaidat i wsp. [233] opisali oporność na penicylinę u wszystkich badanych szczepów *L. monocytogenes* izolowanych z żywności w Indiach i Jemenie. Wysoki odsetek (71,4%) szczepów opornych na penicylinę wśród szczepów klinicznych wykazali również Abdollahzadeh i wsp. [234]. Z kolei, Runga i wsp. [235] stwierdzili dwa izolaty *L. monocytogenes* z zakładów przetwórstwa trzody chlewnej i surowej szynki odporne na erytromycynę. Ponieważ większość przypadków listeriozy wymaga hospitalizacji i antybiotykoterapii, niezmiernie ważna jest ocena i monitorowanie antybiooporności oraz właściwe stosowanie antybiotyków.

Stale poszukiwane są nowe metody kontroli mikrobiologicznej żywności. Mają one być skuteczne, bezpieczne dla konsumenta i środowiska oraz nie mogą wpływać na właściwości organoleptyczne produktów spożywczych. Obiecującym podejściem jest biokontrola z zastosowaniem bakteriofagów, czyli wirusów bakteryjnych, które są bezpieczne dla ludzi i zwierząt oraz nie wpływają na zmiany organoleptyczne żywności. Kontrola

patogenów z zastosowaniem fagów litycznych obejmuje wiele etapów, od produkcji żywności (uwzględniając powierzchnie) po eliminację bakterii z produktów spożywczych [236,237]. Stąd też, w niniejszej rozprawie, zbadano wartość MIC i MBC bakteriofaga P100 w preparacie PhageGuard L na badane szczepy *L. monocytogenes*. W badaniu własnym stężeniem bakteriofaga hamującym wzrost największej liczby (22; 44,0%) szczepów było 5×10^8 PFU/ml. Z kolei, Reinhard i wsp. [238] wykazali, że preparat ten o stężeniu 2×10^7 PFU/ml (czas: 3 godziny) zredukował populację *L. monocytogenes* o 2,19, 1,50 i 1,75 \log_{10} j.t.k./cm² odpowiednio na powierzchni stali nierdzewnej, poliuretanowej taśmie termoplastycznej i podłodze z żywicy epoksydowej. Ponadto Reinhard i wsp. [238] stwierdzili, że wyższe stężenia bakteriofaga (10^8 PFU/cm²) oraz dłuższy czas kontaktu (3 godziny) wpływały na wyższą skuteczność preparatu. PhageGuard L (roztwór roboczy 10^9 PFU/ml) zbadali również Truchado i wsp. [239]. Badawcze wykazali maksymalną redukcję *L. monocytogenes*, o około 3,5 log, na świeżo ściętej cykorii po trzech dniach eksperymentu. Przedstawione wyniki wskazują, że preparat PhageGuard L mógłby skutecznie ograniczać obecność i liczebność *L. monocytogenes* na produktach spożywczych oraz powierzchniach mających kontakt z żywnością. Jednakże wymagane są dalsze badania nad bezpieczeństwem i skutecznością bakteriofagów jako metody eliminacji bakterii.

Powszechna obecność *L. monocytogenes* w środowisku produkcji żywności wiąże się z ich zdolnościami adaptacyjnymi. Reakcja bakterii na warunki stresowe jest jednym z największych wyzwań w zwalczaniu drobnoustrojów w środowisku, zarówno szpitalnym jak i przemyśle spożywczym [240]. Dotychczas udokumentowano odpowiedź *L. monocytogenes* na wiele czynników stresowych, obejmujących, m.in., stres cieplny oraz niskich temperatur, osmotyczny, kwasowy czy zasadowy [156, 169,241-243]. Dużym ograniczeniem dotychczasowych badań była jednak liczba badanych izolatów. W niniejszym badaniu oceniono wpływ czynników stresowych związanych z przetwarzaniem żywności wśród 50 szczepów *L. monocytogenes* wyosobnionych z różnych źródeł.

Jednym z czynników, który oceniano był stres osmotyczny. Stężenie NaCl w produktach spożywczych jest zmienne, np. w wędzarniach rybnych stosuje się 3,0% NaCl [147]. *L. monocytogenes* może tolerować stres osmotyczny i rosnąć w wysokich stężeniach NaCl, od 10,0% [151] do 12,0% [244]. W niniejszym badaniu wszystkie uwzględnione szczepy (n=50) wykazywały wzrost w stężeniu od 0,0% do 6,0% NaCl. Najniższym stężeniem, przy którym stwierdzono zahamowanie wzrostu 5 (10,0%) szczepów było 7,0% NaCl. Najwyższą tolerancję na stres osmotyczny ujawnił szczep izolowany z łososia (17ł), który wzrastał w stężeniu 15,0% NaCl. Zwiększona oporność na stres osmotyczny może być związana z wcześniejszym kontaktem ze stresorem lub lepszym przystosowaniem genetycznym szczepu. Magalhães i wsp. [245] zaobserwowali, że szczepy przetrwałe (wyizolowane z przetwórstwa sera) lepiej przystosowały się do wzrostu w 2,5, 4,0 i 8,0% NaCl niż szczepy izolowane sporadycznie. Z kolei, Liu i wsp. [246] zidentyfikowali szczepy, które przeżywały w 7 M (40,0% w/v) nasyconym NaCl (20 godzin). Istotny wpływ na zwiększoną tolerancję stężenia soli może mieć temperatura [243,244,247,248]. Shahamat i wsp. [249] wykazali, że *L. monocytogenes* wzrastały w bulionie tryptozowym z dodatkiem nasion soi zawierającym 25,5% (wag./obj.) NaCl przez 4 dni w temperaturze 37°C, a obniżenie temperatury do 22°C wydłużyło czas przeżycia do 24 dni i do 132 dni w temperaturze 4°C. W badaniu własnym, eksperyment przeprowadzono w temperaturze 37°C i nie zaobserwowano istotnych różnic w oporności na stres osmotyczny pomiędzy szczepami o różnym pochodzeniu i serogrupie. Podobnie Hingston i wsp. [250] nie stwierdzili istotnych różnic między tempem wzrostu różnych serotypów w 6,0% NaCl. Reakcja *L. monocytogenes* na wysokie stężenia NaCl jest zróżnicowana i może zależeć od czasu ekspozycji, wcześniejszego kontaktu ze stresorem, dostępności osmoprotektantów w środowisku, temperatury czy cech indywidualnych szczepu. Należy podkreślić, że ekspozycja *L. monocytogenes* na stres osmotyczny może przyczynić się do ochrony krzyżowej przed innymi stresami, takimi jak cieplny czy kwasowy [251].

Kolejnym czynnikiem stresowym z którym pałeczki *L. monocytogenes* mogą mieć kontakt jest zmienny odczyn środowiska, od kwasowego po zasadowe [168]. W niniejszym badaniu oceniono szeroki zakres pH (od 3,0 do 10,0) na wzrost badanych szczepów. Wykazano, że pH 5,0 i 9,0 uniemożliwiły wzrost odpowiednio 24 (48,0%) i 26 (52,0%) badanych szczepów. Wielu badaczy [169,252,253] potwierdziło hamujący wpływ niskiego pH i kwasów organicznych na wzrost *L. monocytogenes*. Phan-Than i wsp. [254] wykazali, że pH 4,0 hamowało wzrost szczepu *L. monocytogenes* LO28, a pH 3,5 - szczepu wzorcowego EGD. Co istotne, wykazano, że wcześniejsza ekspozycja na niskie pH przez kilka godzin zwiększała zdolność przystosowania się do kolejnych niższych wartości pH [254-258]. Z kolei, Metselaara i wsp. [259] wysunęli wniosek, że mechanizmy odpowiedzialne za zwiększoną kwasooporność są najprawdopodobniej związane z wcześniejszą ekspozycją na silny stres kwasowy. Dodatkowo, wykazano [255,258], że bakterie lepiej tolerują kwaśne pH w pożywkach bogatych niż w minimalnych ze względu na możliwość wystąpienia osmoprotektantów. W badaniach własnych zastosowano bulion Mueller Hinton, który zaliczany jest do podłoży wzbogaconych. Wykazano, że słabe kwasy organiczne są bardziej niekorzystne dla *L. monocytogenes* niż mocne kwasy nieorganiczne takie jak HCl [254]. W niniejszym badaniu do zmiany pH bulionu zastosowano HCl oraz NaOH. W badaniu własnym, nie wykazano istotnych statystycznie różnic w odpowiedzi na zmianę odczynu środowiska bulionu pomiędzy grupami szczepów (ze względu na pochodzenie). Odmienne wyniki przedstawili Dykres i Moorhead [260], którzy wykazali korelację pomiędzy wpływem stresu kwasowego a pochodzeniem szczepów. Badacze potwierdzili niższe wartości liczby bakterii (log j.t.k.) po dwugodzinnej ekspozycji dla szczepów wyizolowanych z mięsa. Natomiast, Vialette i wsp. [261] stwierdzili, że szczepy kliniczne wykazywały wyższą tolerancję na stres kwasowy niż szczepy środowiskowe. Odmienne wyniki przedstawili także Komora i wsp. [262], którzy wykazali statystycznie niższe liczby bakterii po stresie kwasowym wśród szczepów klinicznych niż z żywności. Natomiast Barbosa i wsp. [263] oraz Ramalheira i wsp. [264] oceniali przeżywalność *L. monocytogenes* podczas pasażu przez symulowany przewód pokarmowy.

Zaobserwowali, że izolaty kliniczne charakteryzowała wyższa oporność na badane warunki niż izolaty z żywności [263,264]. Z kolei, Lundén i wsp. [265] stwierdzili, że szczepy przetrwałe wykazywały wyższą tolerancję na warunki stresu kwasowego niż szczepy izolowane sporadycznie. W badaniu własnym wykazano, że trzy szczepy, w tym dwa izolowane z łososia (15ł i 17ł) i jeden wyisobniony z materiału klinicznego (18K) charakteryzowały się wzrostem przy pH 3,0. Pałeczki *L. monocytogenes* mogą mieć również kontakt ze stresem zasadowym w środowisku przetwarzania żywności. Roztwory o wyższym pH stosuje się w detergentach do usuwania zwęglonych osadów, oleju lub tłuszczu, gdyż ułatwiają denaturację białek i zmydlanie tłuszczów. W badaniu własnym wykazano, że 18 (36,0%) szczepów, w tym 12 pochodzących z materiału klinicznego namnażało się przy pH 10,0. Taormina i Beuchat [266] udokumentowali przeżywalność *L. monocytogenes* przez 6 dni w bulionie tryptozofosforanowym przy pH 9,0, 10,0 i 11,0 w temperaturze 4°C lub 21°C. Z kolei, Giotis i wsp. [267] stwierdzili, że narażenie na stres alkaliczny wpłynęło na zmiany morfologiczne komórek *L. monocytogenes*. Na zdolność do przeżycia i wzrostu przy różnym pH ma wpływ wiele czynników, w tym indywidualne cechy szczepu. Wcześniejsza ekspozycja na warunki nieoptymalnego pH może być kluczowa dla wyższej tolerancji na zmienny odczyn środowiska.

Obróbka termiczna to znana i powszechnie stosowana metoda eliminacji drobnoustrojów. Pałeczki *L. monocytogenes* wykazują zdolność do wzrostu w szerokim zakresie temperatur, od 0°C do 45°C [268]. W badaniu własnym oceniono wpływ temperatur: 55, 60, 65 i 70°C w czterech punktach czasowych: 2, 15, 30 i 60 minut. Najniższa temperatura hamująca przeżywalność *L. monocytogenes* wynosiła 60°C w czasie ekspozycji 60 minut. Szczepy izolowane z materiału klinicznego charakteryzowały się wyższą tolerancją na stres cieplny. Pięć badanych szczepów *L. monocytogenes*, w tym cztery izolowane z materiału klinicznego i jeden wyisobniony z łososia, przeżywało 60-minutową ekspozycję na temperaturę 70°C. Brak różnic w przeżywalności po ekspozycji na stres cieplny (58°C) pomiędzy różnymi ze względu na pochodzenie szczepami *L. monocytogenes* wykazali Komora i wsp.

[262]. Hingston i wsp. [250] także nie stwierdzili wyraźnych trendów w odpowiedzi na warunki stresu cieplnego związanych z pochodzeniem izolatów (z żywności w porównaniu z izolatami klinicznymi). Z kolei Shen i wsp. [269] wykazali, że subletalny stres cieplny w temperaturze 48°C przez 60 lub 90 minut zwiększył opóźnienie fazy lag *L. monocytogenes* w bulionie tryptonowo-sojowym uzupełnionym 0,6% ekstraktem drożdżowym w temperaturze pokojowej w porównaniu z niestresowanymi komórkami kontrolnymi. Dodatkowo, badacze stwierdzili, że szczepy serotypu 1/2a charakteryzowały się stosunkowo niską tolerancją na wysokie temperatury [269]. Wpływ czynników na oporność *L. monocytogenes* na stres cieplny różni się w zależności od szczepu, fazy wzrostu, warunków badania, wcześniejszych stresów środowiskowych z którymi szczep mógł mieć kontakt w miejscu, z którego został wyizolowany [270].

Stosowanie niskich temperatur przechowywania ma na celu zahamowanie namnażania bakterii. Zdolność *L. monocytogenes* do wzrostu w warunkach chłodniczych sprzyja występowaniu tych drobnoustrojów w produktach RTE. Wiele badań dokumentowało reakcję *L. monocytogenes* na stres niskich temperatur [271-273]. Niniejsze badanie wykazało przeżywalność wszystkich szczepów *L. monocytogenes* w temperaturze 4°C, w każdym wariantcie czasowym. Vasseur i wsp. [243] stwierdzili, że stres niskich temperatur nie wpłynął na tempo wzrostu badanych szczepów. W badaniu własnym, po 24 godzinach oraz 3. i 5. dobach badania wykazano wzrost liczby bakterii względem kontroli dla wszystkich badanych szczepów. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w tolerancji na stres niskiej temperatury pomiędzy szczepami izolowanymi z różnych źródeł. Arguedas-Villa i wsp. [274] również nie wykazali korelacji pomiędzy reakcją na stres niskiej temperatury a serotypem czy linią genetyczną. Niskie temperatury powodują zmniejszenie tempa metabolizmu i wychwyty związków krioprotekcyjnych [152]. Zatem wzrost *L. monocytogenes* w niskich temperaturach nie jest zahamowany, a ulega spowolnieniu.

Z punktu widzenia konsumenta istotnym, uwzględnionym w badaniu czynnikiem stresowym było cykliczne zamrażanie i rozmrażanie. Zamrażanie żywności to proces, który wydłuża okres jej przydatności do spożycia [275]. Dotychczasowe wyniki badań przedstawiły przeżywalność *L. monocytogenes* w warunkach mrożenia. Miladi i wsp. [276] wykazali redukcję (o 3,69 log) komórek *L. monocytogenes* przechowywanych w temperaturze -20°C przez 10 miesięcy. Ben Slama i wsp. [277] także odnotowali spadek przeżywalności o 2,04, 2,52 i 2,59 log₁₀ j.t.k./g dla trzech szczepów *L. monocytogenes* po 6. miesiącach zamrożenia (-20°C) na plastrach sera. W niniejszej pracy oceniono wpływ cyklicznego zamrażania i rozmrażania. Wykazano przeżywalność badanych szczepów na każdym etapie stresu. Ujawniono, że liczba bakterii po 1. cyklu zamrażania była istotnie statystycznie wyższa niż w grupie kontrolnej (niepoddanej zamrażaniu). Natomiast, po 4. cyklu, wykazano istotny statystycznie spadek liczby bakterii ze wszystkich grup. Z kolei, Simpson Beauchamp i wsp. [278] udokumentowali, że rozmrażanie miało niewielki wpływ na populacje *L. monocytogenes* (< 0,5 log j.t.k./cm). Azizoglu i wsp. [279] wykazali znaczącą kriotolerancję komórek *L. monocytogenes* hodowanych w temperaturze 37°C (przed zamrożeniem), ze spadkiem < 1 logarytmu po 18 cyklach zamrażania-rozmrażania. Tolerancja na zamrażanie i rozmrażanie była znacznie zmniejszona, gdy hodowlę prowadzono w temperaturze 4 lub 25°C (2 do > 4 log) [279]. W badaniach własnych, hodowlę bakterii przed poddaniem zamrożeniu prowadzono w 37°C. Z kolei, El-Kest i wsp. [275] wykazali, że podczas przechowywania w temperaturze -20°C, mniejsze uszkodzenia komórek *L. monocytogenes* zostały wykazane w TSB niż soli fizjologicznej. W badaniu własnym zastosowanie miał również TSB, co w pewnym stopniu mogło wpłynąć na ochronę komórek w zamrożeniu. Ze względu na niewielką liczbę danych dotyczących wpływu zamrażania-rozmrażania na *L. monocytogenes* wskazane są dalsze badania, zwłaszcza że notowane były przypadki listeriozy, w których źródłem *L. monocytogenes* były lody [280], czy mrożone warzywa [120].

Następnym badanym czynnikiem stresowym był zróżnicowany dostęp składników odżywczych w podłożu hodowlanym. W niniejszej pracy, wykazano

przeżywalność badanych szczepów przy niedoborze substancji odżywczych. Stwierdzono różnice w odpowiedzi na ten wariant stresu pomiędzy szczepami izolowanymi z różnych źródeł. Zatem niska dostępność substancji pokarmowych (np. po procedurach sanityzacji) nie ogranicza wzrostu *L. monocytogenes*. Przedstawiono kilka badań [180,192,260] dotyczących mechanizmów przeżywalności w warunkach niedoboru glukozy. Bakterie, które przeżyły, charakteryzowało zmniejszenie wielkości komórek i zwiększona oporność krzyżowa przed stresami środowiskowymi [179,180]. Jednak mechanizmy kontrolujące SSR u *L. monocytogenes* podczas niedoboru wieloskładnikowego nadal nie są w pełni poznane. Wysoka dostępność składników odżywczych w środowisku była szerzej badana w odniesieniu do początkowego przylegania do powierzchni stałych podczas tworzenia biofilmu. W badaniu własnym, wysoka zawartość składników odżywczych promowała wzrost wszystkich badanych szczepów. Mai i wsp. [281] wykazali, że wysoka dostępność substancji pokarmowych sprzyjała adhezji komórek *L. monocytogenes* do powierzchni. Jednakże wpływ nadmiaru składników odżywczych na tempo wzrostu *L. monocytogenes* nie został dotychczas opisany.

Na podstawie odpowiedzi na wybrane czynniki stresowe, badane szczepy sklasyfikowano według przyjętej uprzednio metody rangowania. Najbardziej wrażliwe na stres były szczepy izolowane z wędlin. Cztery szczepy wyhodowane z materiału klinicznego i jeden wyisobniony z łososia charakteryzowały się najwyższą opornością na badane stresory. Wśród szczepów z materiału klinicznego, dwa zostały izolowane z krwi (58K i 56K) oraz dwa z płynu mózgowo-rdzeniowego (55K i 38K), co może wskazywać na ich wysoki potencjał wirulencji. Wysoka zdolność adaptacji do niesprzyjających warunków stresowych może również zwiększać wirulencję drobnoustrojów [282]. Monitorowanie odpowiedzi na czynniki stresowe wśród szczepów *L. monocytogenes* jest istotne z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego, aby ograniczyć liczbę ognisk epidemicznych związanych ze skażoną żywnością. Informacje takie pozwolą na projektowanie efektywniejszych strategii eliminacji *L. monocytogenes* [283].

Kolejnym aspektem badanym w niniejszej rozprawie, był wpływ czynników stresowych na zmiany cech fenotypowych (zdolność tworzenia biofilmu, zmiany wartości MIC antybiotyków, zdolność ruchu) i poziom ekspresji genów *sigB* i *agrA*.

Kluczowym czynnikiem pomagającym bakteriom przetrwać w niesprzyjających warunkach środowiskowych jest tworzenie biofilmu [284]. Wykazano [145,146], że na zdolność tworzenia biofilmu wpływa wiele czynników, w tym temperatura, czas, rodzaj powierzchni, pochodzenie szczepów oraz dostępność składników odżywczych. Bonsaglia i wsp. [285] wykazali, że większość szczepów *L. monocytogenes* izolowanych ze środowiska zakładów produkcji żywności charakteryzowała się zdolnością do tworzenia biofilmu na powierzchni stali nierdzewnej oraz szła. W niniejszym badaniu wykazano, że wszystkie szczepy tworzyły biofilm na powierzchni polistyrenowej na różnym poziomie, tj. szczep 55K oraz 472W zaklasyfikowano jako umiarkowanie tworzące biofilm, a ATCC 19111 jako słabo tworzący biofilm. Z kolei, Di Ciccio i wsp. [143] wykazali, że wśród badanej populacji *L. monocytogenes* zdolność do tworzenia biofilmu posiadało 58,0%, 38,5% i 3,5% z intensywnością odpowiednio słabą, umiarkowaną i silną. Badacze nie stwierdzili różnic w sile tworzenia biofilmu w zależności od źródła izolacji [143]. Natomiast, Barbosa i wsp. [286] udokumentowali, że szczepy z umiarkowaną zdolnością tworzenia biofilmu występowały częściej wśród izolatów z żywności niż z materiału klinicznego. W niniejszej pracy oceniono wpływ czynników stresowych na zmiany w zdolności tworzenia biofilmu. Szczep 472W określono jako silnie tworzący biofilm po ekspozycji na większość czynników stresowych, tj. niskiej temperatury, osmotyczny, zasadowy i mrożenia. Szczep wzorcowy (słabo tworzący biofilm) wytworzył umiarkowany biofilm po ekspozycji stres cieplny, osmotyczny, kwasowy i zasadowy. Z kolei szczep kliniczny, umiarkowanie tworzący biofilm, określono jako silnie i słabo tworzący biofilm odpowiednio po stresie niskiej temperatury i mrożenia. Odmienne wyniki uzyskali, Ben Slama i wsp. [277] oraz Miladi i wsp. [276], którzy wykazali, że ekspozycja na stres mrożenia zwiększyła zdolność do tworzenia biofilmu wśród

szczepów *L. monocytogenes*. Udokumentowano, że stres związany z nagłym spadkiem temperatury zwiększa adhezję *L. monocytogenes* do powierzchni abiotycznych [276,277,287]. Co potwierdza badanie Melian i wsp. [288], którzy wykazali, że szczep *L. monocytogenes* (serotyp 4b) wyizolowany z materiału klinicznego tworzył najsilniejszy biofilm w temperaturze 10°C. Natomiast Barbosa i wsp. [286] stwierdzili, że ekspozycja na warunki subletalnego stresu kwasowego (szczep *L. monocytogenes* 1592/2) zmniejszała zdolność tworzenia biofilmu w temperaturze 37°C, a stres osmotyczny nie miał wpływu na tę cechę [286]. Wyniki przedstawionych badań i własnych wskazują, że stres środowiskowy wpływa w zróżnicowany sposób na zdolność tworzenia biofilmu. Efekt ten wydaje się zależeć od konkretnego stresora i indywidualnych cech danego szczepu. Z uwagi na to, że biofilmy stanowią poważne zagrożenie w środowisku przetwórstwa spożywczego, istotne jest zbadanie mechanizmu tworzenia biofilmu przez *L. monocytogenes* w warunkach stresu środowiskowego.

Oceniono zdolność do ruchu badanych szczepów *L. monocytogenes* po ekspozycji na czynniki stresowe. Wszystkie szczepy wykazywały zdolność ruchu przed i po działaniu wybranych stresorów. Lemon i wsp. [289] wykazali, że ruch za pośrednictwem rzęsek ma kluczowe znaczenie dla adhezji *L. monocytogenes* i tworzenia biofilmu na powierzchniach abiotycznych. Kragh i wsp. [290] również stwierdzili, że przeżycie szczepów *L. monocytogenes* w środowisku przetwórstwa żywności może być zależne od ich zdolności do ruchu. Z kolei, Cordero i wsp. [291] wykazali, że szczepy *L. monocytogenes* o niższym stopniu ruchliwości były lepiej przystosowane do niskich temperatur (wyższe tempo wzrostu) niż szczepy o wyższej ruchliwości.

Aktualnie znaczącym problemem na całym świecie jest występowanie wieloantybiotykoopornych szczepów *L. monocytogenes*, co prowadzi do trudności terapeutycznych [224]. Oporność na antybiotyki wśród *L. monocytogenes* jest zróżnicowana w zależności od kontynentu [292]. W niniejszej rozprawie oceniono zmiany wartości MIC wybranych antybiotyków po ekspozycji na czynniki stresowe. W wariancie kontrolnym (bez czynnika

stresowego) badane szczepy *L. monocytogenes* były wrażliwe na wszystkie uwzględnione antybiotyki. Ekspozycja na stres zwiększała lub zmniejszała wartości MIC wybranych antybiotyków. Zmiany te nie powodowały jednak zaklasyfikowania szczepów jako opornych. Al-Nabulsi i wsp. [139] wykazali zmiany wartości MIC antybiotyków po ekspozycji na czynniki stresowe. Badacze stwierdzili wzrost MIC ampicyliny, tetracykliny, doksycykliny i wankomycyny po ekspozycji na 6,0 i 12,0% NaCl, pH 5,0 i niską temperaturę [139]. Również Alonso-Hernando i wsp. [293] udokumentowali wzrost oporności na wybrane antybiotyki (cefalotynę, streptomycynę, chloramfenikol) po zmianie pH środowiska z zastosowaniem podchlorynu sodu. Al-Nabulsi i wsp. [139] wykazali tendencję do wzrostu oporności na antybiotyki wraz ze spadkiem pH. Natomiast Faezi-Ghasemi i Kazemi [201] stwierdzili, że *L. monocytogenes* narażone na pH 5,0 lub stres osmotyczny (7,0% NaCl) były bardziej wrażliwe na penicylinę, ampicylinę, gentamycynę, tetracyklinę, ryfampicynę, chloramfenikol i trimetoprim-sulfametoksazol. W badaniu własnym wpływ stresu osmotycznego i kwasowego na wartości MIC był zróżnicowany w zależności od szczepu i antybiotyku. W niniejszej rozprawie wzrost MIC antybiotyków najczęściej obserwowano dla szczepu wzorcowego i 472W. Odmienne wyniki uzyskali Al-Nabulsi i wsp. [139], którzy wykazali wyższą oporność dla szczepu izolowanego z mięsa i nabiału niż dla szczepu wzorcowego. Dodatkowo w niniejszej pracy, stres cieplny obniżył wartość MIC wszystkich badanych antybiotyków dla szczepu wyosobnionego z materiału klinicznego oraz wędlin. Zmiany wartości MIC antybiotyków mogą wynikać z indukcji białek szoku stresowego, redukcji miejsc wiązania antybiotyku w ścianie komórkowej, ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę i działania pompy effluksowej [53]. Wpływ czynników stresowych na antybiotykowrażliwość *L. monocytogenes* jest zróżnicowany i zależy od szczepu.

Jeden z mechanizmów wspierających przetrwanie warunków stresowych u *L. monocytogenes* opiera się na σ^B [294]. Wielu badaczy [295-297] opisało nadekspresję genu *sigB* po ekspozycji, m.in., na stres kwasowy,

osmotyczny i niskiej temperatury. W badaniu własnym wykazano zwiększony poziom ekspresji genu *sigB* w stresie zasadowym (szczonep 55K i 472W) i cieplnym (szczonep 472W) oraz spadek w odpowiedzi na stres cieplny, osmotyczny, kwasowy i mrozenia (szczonep 55K). Argudes-Villa i wsp. [274] wykazali statystycznie istotne różnice w ekspresji *sigB* pomiędzy szczonepem tolerującym zimno i wrażliwym na zimno. Z kolei, Lee i wsp. [298] przedstawili wyniki dotyczące znaczącej roli σ^B w tworzeniu biofilmu w warunkach stresowych (6,0% NaCl, niska temperatura i niedobór składników odżywczych). Badacze wykazali, że dziki szczonep *L. monocytogenes* i mutant $\Delta sigB$ tworzą bardzo słaby biofilm w warunkach stresowych (9,0% NaCl, 15°C) [289]. Zasadniczą rolę w pierwszym etapie tworzenia biofilmu odgrywa system agr [299]. Melian i wsp. [288] wykazali nadekspresję genu *agrA* wśród wszystkich badanych szczonepów w strukturze biofilmu w porównaniu z komórkami planktonowymi. Gandra i wsp. [300] stwierdzili podwyższony poziom ekspresji *agrA* wśród szczonepów zdolnych do tworzenia biofilmu. W badaniu własnym wykazano zwiększony poziom ekspresji genu *agrA* w stresie zasadowym (szczonep 55K) oraz spadek po ekspozycji na stres osmotyczny (szczonepy 472W i ATCC 19111), kwasowy (szczonepy 472W, ATCC 19111) i zasadowy (ATCC 19111). Niemniej jednak nie stwierdzono związku między zdolnością tworzenia biofilmu a ekspresją *sigB* i *agrA* po ekspozycji na stres. Może to wskazywać, że inne geny były odpowiedzialne za obserwowane zmiany w sile tworzenia biofilmu. Ekspresja genów może różnić się w zależności od warunków środowiskowych, grupy serologicznej, stanu fizjologicznego oraz cech indywidualnych szczonepu [301].

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy pozwoliły ocenić wpływ czynników stresowych na wzrost i przeżywalność badanych szczonepów *L. monocytogenes* oraz zmiany cech fenotypowych i poziom ekspresji genów *sigB* i *agrA*. Oceniono czynniki, które są powszechne w zakładach przetwórstwa spożywczego, tj. wysoka (procesy dezynfekcji i sterylizacji) i niska temperatura (przechowywanie produktów w chłodniach), niskie pH (owoce), zasolenie (przemysł ryb wędzonych), czy niedobór składników odżywczych.

Ekspozycja pałeczek *L. monocytogenes* na czynniki stresowe skutkowała zróżnicowaną przeżywalnością i była zależna od szczepu. Co istotne, wykazano, że zmianie ulegają cechy fenotypowe i poziom ekspresji genów *sigB* i *agrA* w odpowiedzi na czynniki stresowe. Zmiany te są jednak zależne od szczepu. Znajomość odpowiedzi na warunki stresowe pozwoli planować efektywniejsze procedury działań przeciwdrobnoustrojowych w obszarach przemysłu spożywczego, budynków ochrony zdrowia, czy użyteczności publicznej. Niniejsze badania mogą stanowić częściowe wyjaśnienie hipotezy o oporności na czynniki stresowe w powstawaniu szczepów przetrwałych *L. monocytogenes*. Natomiast wykazane zmiany w cechach fenotypowych i poziomie ekspresji genów mogą wskazywać na wzrost wybranych aspektów wirulencji *L. monocytogenes*, a tym samym późniejsze trudności terapeutyczne, zwłaszcza w przypadku szczepów wieloantybiotykoopornych.

6. WNIOSKI

- 1) Adaptacja do czynników stresowych jest cechą indywidualną danego szczepu *L. monocytogenes* i nie wykazano wyraźnego związku pomiędzy reakcją na stres a pochodzeniem szczepów.
- 2) Wykazano istotne statystycznie różnice w liczbie szczepów reprezentujących różne profile genów wirulencji a ich pochodzeniem, natomiast różnic takich nie stwierdzono w odniesieniu do liczby szczepów reprezentujących daną grupę serologiczną czy profil wrażliwości na antybiotyki w zależności od źródła izolacji badanych *L. monocytogenes*.
- 3) Niska dostępność substancji pokarmowych nie ograniczała wzrostu badanych szczepów *L. monocytogenes*. Nadmiar składników odżywczych promował wzrost badanych bakterii.
- 4) Szczepy izolowane z materiału klinicznego wykazały wyższą tolerancję na warunki stresowe. Może to wskazywać na występowanie u nich dodatkowych mechanizmów adaptacyjnych o zróżnicowanym podłożu genetycznym.
- 5) Brak związku między zdolnością tworzenia biofilmu a ekspresją *sigB* i *agrA* po ekspozycji na warunki stresowe może wskazywać na udział dodatkowych czynników genetycznych w formowaniu biofilmu przez badane bakterie.
- 6) Stres środowiskowy może zmieniać zdolność bakterii do tworzenia biofilmu oraz ich wrażliwość na antybiotyki (cechy fenotypowe). Odpowiedź na stres jest jednak cechą zależną od szczepu *L. monocytogenes* i danego czynnika stresowego oraz jego nasilenia.

7. STRESZCZENIE

Listeria monocytogenes to Gram-dodatnie, niewytwarzające przetrwalników pałeczki. Bakterie te wykazują zdolność adaptacji do niekorzystnych warunków. W środowisku przetwarzania żywności *L. monocytogenes* są narażone na różne czynniki stresowe. Stres ten może być letalny, powodując nieodwracalne uszkodzenie komórki lub subletalny, tj. umożliwiający przeżycie.

Celem niniejszej rozprawy była ocena wpływu czynników stresowych na zmiany cech fenotypowych i genotypowych szczepów *L. monocytogenes*.

Badaniem objęto odpowiednio po 20 izolatów z materiału klinicznego, łososia, wędlin i mrożonek warzywnych. Ocena stopnia podobieństwa genetycznego wykazała 50 różnych genetycznie szczepów. Stwierdzono, że 62,0% szczepów reprezentowało grupę serologiczną 1/2a-3a, a 60,0% miało 10 genów wirulencji (*fbpA*, *plcA*, *hlyA*, *plcB*, *inlB*, *actA*, *iap*, *inlA*, *mpl*, *prfA*). Większość (46; 92,0%) szczepów była wrażliwa na uwzględnione w badaniu antybiotyki.

W kolejnym etapie, badane szczepy poddano działaniu wybranych stresów: osmotycznego, kwasowego i zasadowego, wysokich i niskiej temperatury, cyklicznego zamrażania i rozmrażania (4 cykle) oraz wysokiej i niskiej dostępności składników odżywczych. Mediana stężenia NaCl hamującego wzrost dla szczepów ze wszystkich grup ze względu na pochodzenie wynosiła 8,0%. Mediana wartości hamowania wzrostu dla pH < 7,0 wynosiła 5,0; 4,5; 4,0 i 3,5 dla szczepów izolowanych odpowiednio z wędlin, materiału klinicznego, mrożonek warzywnych i łososia. Mediana wartości hamowania wzrostu dla pH > 7,0 wynosiła 11,0 dla szczepów klinicznych oraz 9,0 dla szczepów wyosobnionych z wędlin, mrożonek warzywnych i łososia. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w odpowiedzi na stres osmotyczny, kwasowy i zasadowy w zależności od pochodzenia szczepów. Pięć szczepów przeżyło 60-minutową ekspozycję na temperaturę 70°C. Wykazano, że badane szczepy przeżyły wszystkie etapy eksperymentu stresu niskiej temperatury. Podczas stresu zamrażania-rozmrażania liczba bakterii wzrosła po pierwszym

cyklu. Nie stwierdzono istotnych różnic w liczebności bakterii pomiędzy wariantem 4 cykli zamrażania-rozmrażania a wariantem rozmrażania tylko po 4. cyklu. Wykazano przeżywalność badanych szczepów przy zmiennej dostępności składników odżywczych, zarówno nadmiarze jak i niedoborze. Największą oporność na czynniki stresowe wykazały szczepy izolowane z materiału klinicznego. Najniższą tolerancję na stresory stwierdzono wśród szczepów wyisobnionych z wędlin i mrożonek warzywnych.

Dalsze doświadczenia prowadzono na dwóch szczepach oraz szczepie wzorcowym *L. monocytogenes* ATCC 19111. Oceniono wpływ wybranych stresów: cieplnego i niskiej temperatury, osmotycznego, kwasowego, zasadowego i mrożenia na cechy fenotypowe: minimalnego stężenia hamującego (ang. minimum inhibitory concentration, MIC) antybiotyków, zdolność do ruchu i zdolność tworzenia biofilmu oraz poziom ekspresji genów *sigB*, *agrA* względem genu *gap*. Wykazano zmiany w wartościach MIC uwzględnionych w badaniu antybiotyków, zmiany te były zależne od szczepu i czynnika stresowego. Szczep 472W tworzył silny biofilm po ekspozycji na większość czynników stresowych, z wyjątkiem stresu cieplnego i kwasowego. Szczep 55K, tworzył silny biofilm po ekspozycji na stres niskiej temperatury. Wykazano zwiększony poziom ekspresji genu *sigB* w stresie zasadowym (szczepy 55K i 472W) i cieplnym (szczep 472W). Z kolei, zwiększony poziom ekspresji genu *agrA* notowano w stresie zasadowym (szczep 55K). Niemniej jednak nie stwierdzono związku między zdolnością tworzenia biofilmu a ekspresją *sigB* i *agrA* po ekspozycji na stres.

Pałeczki *L. monocytogenes* są narażone na wiele różnych czynników stresowych w przemyśle spożywczym i w środowisku. Wykazano, że reakcja zarówno na warunki subletalne, jak i letalne była zróżnicowana i zależna od szczepu. Dane dotyczące odpowiedzi na warunki stresowe mogą być pomocne w uwzględnianiu prawidłowych procedur dezynfekcji w przemyśle spożywczym, budynkach opieki zdrowotnej i użyteczności publicznej.

Słowa kluczowe: *Listeria monocytogenes*, środowiskowe czynniki stresowe, biofilm, antybiooporność, ekspresja genów

8. SUMMARY

Listeria monocytogenes are Gram-positive, relatively anaerobic, non-spore-forming rods. These bacteria show the ability to adapt to adverse conditions. In the food processing environment, *L. monocytogenes* are exposed to various stress factors. This stress can be lethal, causing irreversible damage to the cell, or sublethal, i.e., allowing survival.

The purpose of this dissertation was to evaluate the effects of stress factors on changes in pheno- and genotypic characteristics of *L. monocytogenes* strains.

Twenty isolates each from clinical material, salmon, cured meats and frozen vegetables, respectively, were studied. It has been distinguished fifty genetically different strains of *L. monocytogenes*. Sixty-two % of the strains represented serogroup 1/2a-3a, and 60.0% had ten virulence genes (*fbpA*, *plcA*, *hlyA*, *plcB*, *inlB*, *actA*, *iap*, *inlA*, *mpl*, *prfA*). The majority (46; 92.0%) of the strains were susceptible to the tested antibiotics.

In the next step, the tested strains were subjected to selected stresses: osmotic, acidic and alkaline, high and low temperature, cyclic freezing and defrosting (4 cycles), high and low nutrient availability. The median growth-inhibiting concentration of NaCl for strains from all groups by origin was 8.0%. The median growth inhibitory value for pH < 7.0 was 5.0, 4.5, 4.0 and 3.5 for strains isolated from cold cuts, clinical material, frozen foods salmon, respectively. The median growth inhibitory value for pH > 7.0 was 11.0 for clinical strains and 9.0 for strains isolated from cold cuts, frozen vegetables and salmon. There were no statistically significant differences in the response to osmotic, acid and alkaline stress depending on the origin of the strains. Five strains survived a 60-minute exposure to 70°C. All strains survived all stages of the cold stress experiment. During the freezing-defrosting cycle the bacteria number increased after the first cycle. There were no significant differences in the bacteria number between the variant of 4 cycles of freezing-defrosting and the variant of defrosting after the fourth cycle. The survival of the tested strains was demonstrated under varying nutrient availability, both excess and

deficiency. The greatest resistance to stress factors was shown by strains isolated from clinical material. The least tolerant were strains isolated from cold cuts and frozen foods.

Further experiments were conducted on two strains and the reference strain *L. monocytogenes* ATCC 19111. The effect of selected stresses: heat, cold, osmotic, acid, alkali, frozen on phenotypic features: MIC (minimum inhibitory concentration) of antibiotics, motility and ability to form a biofilm and expression level of *sigB*, *agrA* genes has been assessed. Variations in the MIC values of the antibiotics included in the study were demonstrated, and these variations were strain and stress factor dependent. Strain 472W formed a strong biofilm after exposure to most stress factors, with the exception of heat and acid stress. Strain 55K, formed a strong biofilm after exposure to low temperature stress. Increased levels of *sigB* gene expression were found in acid stress (strains 55K and 472W) and heat stress (strain 472W). In contrast, increased levels of *agrA* gene expression were recorded under alkali stress (strain 55K). Nonetheless, there was no link between the biofilm formation ability and *sigB* and *agrA* expression after exposure to stress.

L. monocytogenes are exposed to many different stress factors in the food industry and in the environment. It has been shown that the response to both sublethal and lethal conditions varies and depends on strain. Knowledge about the stress response of *L. monocytogenes* will allow the planning of appropriate disinfection strategies to reduce the spread of these pathogens in healthcare buildings, public buildings, and food processing environments.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, environmental stress factors, biofilm, antibiotic resistance, gene expression

9. PIŚMIENICTWO

- [1] Muskalska B.K., Szymczak, B. Postępy badań nad bakteriami rodzaju *Listeria*. Post. Mikrobiol. 2015;54(2): 123-132.
- [2] Nightingale K.K., Windham, K., Wiedmann, M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. J Bacteriol. 2005;187(16): 5537-5551.
- [3] Skowron K., Wiktorczyk N., Grudlewska K., Wałęcka-Zacharska E., Paluszak Z., Kruszewski S., Gospodarek-Komkowska E. Phenotypic and genotypic evaluation of *Listeria monocytogenes* strains isolated from fish and fish processing plants. Ann Microbiol. 2019;69: 469-482.
- [4] Liu Y., Sun W., Sun T., Gorris L.G.M., Wang X., Liu B., Dong Q. The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in China: A systematic literature review and novel meta-analysis approach. Int J Food Microbiol. 2020;312: 108358.
- [5] Al S., Disli H.B., Hizlisoy H., Ertas Onmaz N., Yildirim Y., Gonulalan Z. Prevalence and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from wastewater of cattle slaughterhouses in Turkey. J Appl Microbiol. 2022;132(2): 1518-1525.
- [6] Cavalcanti A.A.C., Limeira C.H., de Siqueira I.N., de Lima A.C., de Medeiros F.J.C., de Souza J.G., i wsp. The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in Brazil: a systematic literature review and meta-analysis. Res. Vet. Sci. 2022;145: 169-176.
- [7] Tahir R., Rabbani M., Ahmad A., Tipu M.Y., Chaudhary M.H., Jayarao B.M. Study on occurrence of *Listeria monocytogenes* in soil of Punjab Province and its associated risk factors. The J. Anim. Plant Sci. 2022;32(1): 45-51.
- [8] European Food Safety Authority (EFSA). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. EFSA J. 2018;16(1): 5134.
- [9] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). ECDC Strategic Framework for the Integration of Molecular and Genomic Typing into European Surveillance and Multi-country Outbreak Investigations: 2019-2021. Stockholm: ECDC. 2019.
- [10] *Listeria* Outbreaks, 2023, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>, data wejścia 02.01.2023.
- [11] Gahan C.G., Hill C. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. J Appl Microbiol. 2005;98(6): 1345-1353.
- [12] Murray E.G.D., Webb R.A., 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. 1926;29: 407-439.
- [13] Pirie J.H.H. A new disease in veld rodents, Tiger River disease. Publ S Afr Inst Med Res. 1927;3: 163-186.

- [14] Camejo A., Carvalho F., Reis O., Leitão E., Sousa S., Cabanes D. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* 2011;2(5): 379-394.
- [15] Baza taksonomiczna LPSN, 2023, <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Listeria>, data wejścia 15.04.2023.
- [16] Guillet C., Join-Lambert O., Le Monnier A., Leclercq A., Mechaï F., Mamzer-Bruneel M.F., i wsp. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(1): 136-138.
- [17] Farber J.M., Peterkin P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 1991;55(3): 476-511.
- [18] Kamp D.H., Higgins D. Protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathogens* 2011;(7): e1002153.
- [19] Bigot A., Pagniez H., Botton E., Fréhel C., Dubail I., Jacquet C., Charbit A., Raynaud C. Role of FliF and FliP of *Listeria monocytogenes* in flagellar assembly and pathogenicity. *Infect Immun.* 2005;73(9): 5530-5539.
- [20] Gasanov U., Hughes D., Hansbro M.P. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005;(29): 851-875.
- [21] Orsi R.H., den Bakker H.C., Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 2011;301: 79-96.
- [22] Seeliger H.P.R., Höhnke K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiol.* 1979;13: 31-49.
- [23] Allerberger F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;35(3): 183-189.
- [24] Seeliger H.P., Langer B.: Serological analysis of the genus *Listeria*. Its values and limitations. *Int. J. Food Microbiol.* 1989;8: 245-248.
- [25] Ward T.J., Ducey T.F., Usgaard T., Dunn K.A., Bielawski J. P. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008;74: 7629-7642.
- [26] Roberts A., Nightingale K., Jeffers G., Fortes E., Kongo J.M., Wiedmann M. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology* 2006;152: 685-693.
- [27] Feng Y., Yao H., Chen S., Sun X., Yin Y., Jiao X. Rapid detection of hypervirulent serovar 4h *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. *Front. Microbiol.* 2020;11 :1309.
- [28] Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42: 3819-3822.
- [29] Chen Y., Zhang W., Knabel S.J. Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45: 835-846.

- [30] Liu D., Lawrence M.L., Wiedmann M., Gorski L., Mandrell R.E., Ainsworth A.J., Austin F.W. *Listeria monocytogenes* subgroups IIIA, IIIB, and IIIC delineate genetically distinct populations with varied pathogenic potential. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11): 4229-4233.
- [31] Gandhi M., Chikindas L.M. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 2007;113: 1-15.
- [32] Wiktorczyk-Kapischke N., Skowron K., Grudlewska-Buda K., Wałęcka-Zacharska E., Korkus J., Gospodarek-Komkowska E. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to the stress factors in the food processing environment. *Front Microbiol.* 2021;12: 710085.
- [33] O'Byrne C.P., Karatzas K.A. The role of sigmaB (σ^B) in the stress adaptations of *Listeria monocytogenes*: overlaps between stress adaptation and virulence. *Adv. Appl. Microbiol.* 2008;65: 115-140.
- [34] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Panel. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *EFSA J.* 2013;11(1): 3025.
- [35] EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J.* 2022;20(12): 7666.
- [36] Tilney L.G., Portnoy D.A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* 1989;109: 1597-608.
- [37] Phelps C.C., Vadia S., Arnett E., Tan Y., Zhang X., Pathak-Sharma S., i wsp. Relative roles of listeriolysin O, InlA, and InlB in *Listeria monocytogenes* uptake by host cells. *Infect Immun.* 2018;86(10): e00555-18.
- [38] Bonazzi M., Lecuit M., Cossart P. *Listeria monocytogenes* Internalin and E-cadherin: from bench to bedside. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4): a003087.
- [39] Pizarro-Cerdá J., Cossart P. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *J Pathol.* 2006;208: 215-223.
- [40] Sabet C., Lecuit M., Canames D., Cossart P., Bierne H. LPXTG Protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infect Immun.* 2005;73(10): 6912-6922.
- [41] Lecuit M., Dramsi S., Gottardi C., Fedor-Chaikin M., Gumbiner B., Cossart, P. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* 1999;18: 3956-3963.
- [42] Lecuit M., Vandormael-Pournin S., Lefort J., Huerre M., Gounon P., Dupuy C., i wsp. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 2001;292: 1722-1725.
- [43] Ireton K. Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. *Cell Microbiol.* 2007;9(6): 1365-1375.

- [44] Wuenscher D.M., Kohler S., Bubert A., Gerike U., Goebel W. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and Its gene Product, p60, has bacteriolytic activity. *J Bacteriol.* 1993;175(11): 3491-3501.
- [45] Southwick F.S., Purich D.L. Intracellular pathogenesis of listeriosis. *N Engl J Med.* 1996;21,334(12): 770-776.
- [46] Freitag N., Port G., Miner M. *Listeria monocytogenes* — from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7: 623-628.
- [47] Ireton K., Mortuza R., Gyanwali G.C., Gianfelice A., Hussain M. Role of internalin proteins in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 2021;116(6): 1407-1419.
- [48] Harvey P.C., Faber J.E. Studies on the *Listerella* Group: I. biochemical and hemolytic reactions. *J. Bacteriol.* 1941;42: 677-687.
- [49] Gaillard J.L., Berche P., Sansonetti P. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 1986;52: 50-55.
- [50] Geoffroy C., Gaillard J.L., Alouf J.E., Berche P. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 1987;55: 1641-1646.
- [51] Cossart P., Vicente M.F., Mengaud J., Baquero F., Perez-Diaz J. C., Berche P. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun.* 1989;57(11): 3629-3636.
- [52] Arnett E., Vadia S., Nackerman C.C., Oghumu S., Satoskar A.R., McLeish K.R., i wsp. The pore-forming toxin listeriolysin O is degraded by neutrophil metalloproteinase-8 and fails to mediate *Listeria monocytogenes* intracellular survival in neutrophils. *J Immunol.* 2014;192(1): 234-244.
- [53] Heuck A.P., Moe P.C., Johnson B.B. The cholesterol-dependent cytolysin family of gram-positive bacterial toxins. *Subcell. Biochem.* 2012;51: 551-577.
- [54] Schuerch D.W., Wilson-Kubalek E.M., Tweten R.K. Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(35): 12537-12542.
- [55] Dunstone M.A., Tweten R.K. Packing a punch: the mechanism of pore formation by cholesterol dependent cytolysins and membrane attack complex/perforin-like proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2012;22: 342-349.
- [56] Chen C., Nguyen B.N., Mitchell G., Margolis S.R., Ma D., Portnoy D.A. The listeriolysin O PEST-like sequence Co-opts AP-2-mediated endocytosis to prevent plasma membrane damage during *Listeria* infection. *Cell Host Microbe.* 2018;23(6): 786-795.e5.
- [57] Lam J.G.T., Vadia S., Pathak-Sharma S., McLaughlin E., Zhang X., Swanson J., i wsp. Host cell perforation by listeriolysin O (LLO) activates a Ca²⁺-dependent cPKC/Rac1/Arp2/3 signaling pathway that promotes *Listeria monocytogenes* internalization independently of membrane resealing. *Mol Biol Cell.* 2018;29(3): 270-284.

- [58] Maury M.M., Chenal-Francisque V., Bracq-Dieye H., Han L., Leclercq A., Vales G., i wsp. Spontaneous loss of virulence in natural populations of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 2017;85: e00541-17.
- [59] Kawacka I., Olejnik-Schmidt A., Schmidt M. Nonhemolytic *Listeria monocytogenes*—prevalence rate, reasons underlying atypical phenotype, and methods for accurate hemolysis assessment. *Microorganisms* 2022;10: 483.
- [60] Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., i wsp. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev.* 2001a;14(3): 584-640.
- [61] Vázquez-Boland J.A., Domínguez-Bernal G., González-Zorn B., Kreft J., Goebel, W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect.* 2001b;3: 571-584.
- [62] Alberti-Segui C., Goeden K.R., Higgins D.E. Differential function of *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and phospholipases C in vacuolar dissolution following cell-to-cell spread. *Cell Microbiol.* 2007;9(1): 179-195.
- [63] Quereda J.J., Cossart P., Pizarro-Cerdá J. Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins in virulence. [w]: Stiles B., Alape-Girón A., Dubreuil J., Mandal M. [red.]. *Microbial Toxins. Toxinology.* Springer, Dordrecht. 2018, ss. 297-316.
- [64] Goldfine H., Knob C. Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Infect Immun.* 1992;60(10): 4059-4067.
- [65] Bitar A.P., Cao M., Marquis H. The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is activated by intramolecular autocatalysis. *J Bacteriol.* 2008;190(1): 107-111.
- [66] Alvarez D.E., Agaisse H. The metalloprotease Mpl supports *Listeria monocytogenes* dissemination through resolution of membrane protrusions into vacuoles. *Infect Immun.* 2016;84(6): 1806-1814.
- [67] Py F.B., Lipinski M.M., Yuan J. Autophagy limits *Listeria monocytogenes* intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy* 2007;3(2): 117-125.
- [68] Bakardjiev A.I., Stacy B.A., Portnoy D.A. Growth of *Listeria monocytogenes* in the guinea pig placenta and role of cell-to-cell spread in fetal infection. *J Infect Dis.* 2005;191: 1889-1897.
- [69] Le Monnier A., Autret N., Join-Lambert O., Jaubert F., Charbit A., Berche P., i wsp. ActA is required for crossing of the fetoplacental barrier by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 2007;75: 950-957.
- [70] Drevets D.A., Jelinek T.A., Freitag N.E. *Listeria monocytogenes*-infected phagocytes can initiate central nervous system infection in mice. *Infect Immun.* 2001;69: 1344-1350.
- [71] Join-Lambert O.F., Ezine S., Le Monnier A., Jaubert F., Okabe M., Berche P., i wsp. *Listeria monocytogenes*-infected bone marrow myeloid cells promote bacterial invasion of the central nervous system. *Cell Microbiol.* 2005;7: 167-180.

- [72] den Bakker H.C., Cummings C.A., Ferreira V., Vatta P., Orsi R.H., Degoricija L., i wsp. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics* 2010;11: 688.
- [73] Dussurget O. New insights into determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008;270: 1-38.
- [74] Vázquez-Boland J.A., Kocks C., Dramsi S., Ohayon H., Geoffroy C., Mengaud J., i wsp. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 1992;60: 219-230.
- [75] Mengaud J., Geoffroy C., Cossart P. Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect. Immun.* 1991;59: 1043-1049.
- [76] Freitag N.E., Rong L., Portnoy D.A. Regulation of the *prfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 1993;61: 2537-2544.
- [77] Mandin P., Fsihi H., Dussurget O., Vergassola M., Milohanic E., Toledo-Arana A., i wsp. VirR, a response regulator critical for *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol Microbiol.* 2005;57(5): 1367-1380.
- [78] Cossart P. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(49): 19484-19491.
- [79] McGann P., Wiedmann M., Boor K. The alternative sigma factor σ^B and the virulence gene regulator PrfA both regulate transcription of *Listeria monocytogenes* internalin. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(9): 2919-2930.
- [80] Port C.G., Freitag E.N. Identification of novel *Listeria monocytogenes* secreted virulence factors following mutational activation of the central virulence regulator, PrfA. *Infect Immun.* 2007;75(12): 5886-5897.
- [81] Ollinger J., Bowen B., Wiedmann M., Boor K.J., Bergholz T.M. *Listeria monocytogenes* σ^B modulates PrfA mediated virulence factor expression. *Infect Immun.* 2009;75(5): 2113-2124.
- [82] Mueller J.K., Freitag E.N. Pleiotropic enhancement of bacterial pathogenesis resulting from the constitutive activation of the *Listeria monocytogenes* regulatory factor PrfA. *Infect Immun.* 2005;73(4): 1917-1926.
- [83] Lemon P.K., Freitag E.N., Kolter R. The virulence regulator PrfA promotes biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol.* 2010;192(15): 3969-3976.
- [84] Loh E., Dussurget O., Gripenland J., Vaitkevicius K., Tiensuu T., Mandin P., i wsp. A trans acting Riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 2009;139(4): 770-779.
- [85] Xayarath B., Freitag N.E. Optimizing the balance between host and environmental survival skills: lessons learned from *Listeria monocytogenes*. *Future Microbiol.* 2012;7(7): 839-852.

- [86] Johansson J., Freitag N.E. Regulation of *Listeria monocytogenes* virulence. *Microbiol Spectr.* 2019;7(4).
- [87] Cotter P.D., Draper L.A., Lawton E.M., Daly K.M., Groeger D.S., Casey P.G., i wsp. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.* 2008;4: e1000144.
- [88] Quereda J.J., Dussurget O., Nahori M.A., Ghoulane A., Volant S., Dillies M.A., i wsp. Bacteriocin from epidemic *Listeria* strains alters the host intestinal microbiota to favor infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016;113: 5706–5711.
- [89] Meza-Torres J., Lelek M., Quereda J.J., Sachse M., Manina G., Ershov D., i wsp. Listeriolysin S: A bacteriocin from *Listeria monocytogenes* that induces membrane permeabilization in a contact-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci.* 2021;118(40): e2108155118.
- [90] Mohammadzadeh R., Azadegan A., Kalani B.S. Listeriolysin S may inhibit the anti-listerial properties of *Lactobacillus plantarum*. *Microb Pathog.* 2019;137: 103744.
- [91] Maury M.M., Tsai Y.H., Charlier C., Touchon M., Chenal-Francisque V., Leclercq A., i wsp. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.* 2016;48: 308-313.
- [92] Wang Y., Luo L., Li Q., Wang H., Wang Y., Sun H., i wsp. Genomic dissection of the most prevalent *Listeria monocytogenes* clone, sequence type ST87, in China. *BMC Genomics* 2019;20: 1014.
- [93] Gilmour M.W., Graham M., Van Domselaar G., Tyler S., Kent H., Trout-Yakel K.M., i wsp. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics* 2010;11: 1-15.
- [94] Lee S., Rakic-Martinez M., Graves L.M., Ward T.J., Siletzky R.M., Kathariou S. Genetic determinants for cadmium and arsenic resistance among *Listeria monocytogenes* serotype 4b isolates from sporadic human listeriosis patients. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(7): 2471-2476.
- [95] Kuenne C., Billion A., Mraheil M.A., Strittmatter A., Daniel R., Goesmann A., i wsp. Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pangenome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. *BMC Genomics* 2013;14: 47.
- [96] Lee S., Ward T.J., Jima D.D., Parsons C., Kathariou S. The arsenic resistance-associated *Listeria* Genomic Island LGI2 exhibits sequence and integration site diversity and a propensity for three *Listeria monocytogenes* clones with enhanced virulence. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(21): e01189-17.
- [97] Parsons C., Lee S., Jayeola V., Kathariou S. Novel cadmium resistance determinant in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83: e02580-16.

- [98] Palma F., Brauge T., Radomski N., Mallet L., Felten A., Mistou M.Y., i wsp. Dynamics of mobile genetic elements of *Listeria monocytogenes* persisting in ready-to-eat seafood processing plants in France. *BMC Genomics* 2020;21: 130.
- [99] Begley M., Sleator R.D., Gahan C.G.M., Hill C. Contribution of three bile-associated loci, *bsh*, *pva*, and *btlB*, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 2005;73: 894–904.
- [100] Cotter P.D., Ryan S., Gahan C.G., Hill C. Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71: 2832-2839.
- [101] Ryan S., Begley M., Gahan C.G.M., Hill C. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environ. Microbiol.* 2009;11: 432–445.
- [102] Begley M., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. Glutamate decarboxylase-mediated nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76: 6541-6546.
- [103] Harter E., Wagner E. M., Zaiser A., Halecker S., Wagner M., Rychli K. Stress survival islet 2, predominantly present in *Listeria monocytogenes* strains of Sequence Type 121, is involved in the alkaline and oxidative stress responses. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(16): e00827-17.
- [104] Listeriosis, 2018, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>, data wejścia 12.01.2023.
- [105] Barlik M., Seremak-Mrozkiwicz A., Drews, K. Listerioza w ciąży-opis przypadku. *Ginekologia Polska* 2014;85: 309-313.
- [106] Allerberger F., Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect.* 2010;(16): 16-23.
- [107] Lamont F.R., Sobel J., Mazaki-Tovi S., Kusanovic J.P., Vaisbuch E, Kim S.K., Uldbjerg N., Romero R. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *J Perinat Med.* 2011;39(3): 227-236.
- [108] Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Instytut Badawczy. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2022 roku, http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2022/Ch_2022_Wstepne_dane.pdf, data wejścia 07.06.2023.
- [109] Beckers H.J., Soentoro P.S.S., Delfgou-van Asch E.H.M. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. *Int. J. Food Microbiol.* 1987;4: 249–256.
- [110] Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Update: multistate outbreak of listeriosis—United States, 1998–1999. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 1999;47: 1117.

- [111] Timeline of events: multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado, 2011, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/timeline.html>, data wejścia 12.01.2023.
- [112] Multistate outbreak of listeriosis linked to imported frescolina marte brand ricotta salata cheese (Final Update); Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA, 2012, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/index.html>, data wejścia 12.01.2023.
- [113] Multistate outbreak of listeriosis linked to soft cheeses distributed by Karoun Dairies, Inc. (Final Update), 2015, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheeses-09-15/index.html>, data wejścia 12.01.2023.
- [114] Multistate outbreak of listeriosis linked to commercially produced, prepackaged caramel apples made From Bidart Bros. Apples (Final Update); Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA, 2015, 2015, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html>, data wejścia 12.01.2023.
- [115] Multistate outbreak of listeriosis linked to packaged salads produced at springfield, Ohio Dole Processing Facility (Final Update); Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA, 2016, 2016, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>, data wejścia 12.01.2023.
- [116] Multistate outbreak of listeriosis linked to soft raw milk cheese made by Vulto Creamery (Final Update); Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA, 2017, 2017, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheese-03-17/index.html>, data wejścia 12.01.2023.
- [117] Outbreak of *Listeria* infections linked to enoki mushrooms, 2020, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/enoki-mushrooms-03-20/index.html>, data wejścia 12.01.2023.
- [118] Outbreak of *Listeria* infections linked to deli meats, 2021, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/delimeat-10-20/index.html>, data wejścia 12.01.2023.
- [119] *Listeria* outbreak linked to Queso Fresco made by El Abuelito Cheese Inc., 2021, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/hispanic-soft-cheese-02-21/index.html>, data wejścia 12.01.2023.
- [120] Epidemiological update: multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6 infections, 2018, <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-multi-country-outbreak-listeria-monocytogenes-serogroup-ivb>, data wejścia 12.01.2023.
- [121] Rapid outbreak assessment: Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 6 infections linked to ready-to-eat meat products, 2019,

- <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-outbreak-assessment-multi-country-outbreak-listeria-monocytogenes-sequence>, data wejścia 12.01.2023.
- [122] Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to consumption of salmon products, 2018, <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/multi-country-outbreak-listeria-monocytogenes-infections-linked-consumption-salmon>, data wejścia 12.01.2023.
- [123] Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products, 2019, <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/multi-country-outbreak-listeria-monocytogenes-fish-products>, data wejścia 12.01.2023.
- [124] Listeriosis-Spain, 2019, <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2019-DON256>, data wejścia 12.01.2023.
- [125] Listeriosis-Australia, 2018, <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/09-april-2018-listeriosis-australia-en>, data wejścia 12.01.2023.
- [126] Smith A.M., Tau N.P., Smouse S.L., Allam M., Ismail A., Ramalwa N.R., i wsp. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017-2018: laboratory activities and experiences associated with whole-genome sequencing analysis of isolates. *Foodborne Pathog. Dis.* 2019;16:524–530.
- [127] Espaze E.P., Reynaud A.E. Antibiotic susceptibilities of *Listeria*: in vitro studies. *Infection.* 1988;16 Suppl2: 160-164.
- [128] Temple M.E., Nahata M.C. Treatment of listeriosis. *Ann. Pharmacother.* 2000;34: 656-661.
- [129] Hof H. An update on the medical management of listeriosis. *Expert Opin. Pharmacother.* 2004;5: 1727-1735.
- [130] Benes J., Viechova J., Kabelkova M., Horova B. Listerial endocarditis in a penicillin-allergic woman successfully treated with a combination of 4 drugs. *Scand. J. Infect. Dis.* 2002;34: 383-384.
- [131] Jones E.M., MacGowan A.P. Antimicrobial chemotherapy of human infection due to *Listeria monocytogenes* *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995;14: 165-175.
- [132] Threlfall E.J., Skinner J.A., McLauchlin J. Antimicrobial resistance in *Listeria monocytogenes* from humans and food in the UK, 1967-96. *Clin Microbiol Infect.* 1998;4(7): 410-412.
- [133] Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr.* 2016;4(2).
- [134] Morvan A., Moubareck C., Leclercq A., Hervé-Bazin M. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54: 2728-2731.

- [135] Bertrand S., Ceysens P.J., Yde M., Dierick K., Boyen F., Vanderpas J., Vanhoof R., Mattheus W. Diversity of *Listeria monocytogenes* strains of clinical and food chain origins in Belgium between 1985 and 2014. PLoS One. 2016;11: e0164283.
- [136] Aureli P., Ferrini A.M., Mannoni V., Hodzic S., Wedell-Weergaard C., Oliva B. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. Int J Food Microbiol 2003;83: 325-330.
- [137] Olaimat A.N., Al-Holy M.A., Shahbaz H.M., Al-Nabulsi A.A., Abu Ghoush M.H., Osaili T.M., Ayyash M.M., Holley R.A. Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from food products: a comprehensive review. Compr Rev Food Sci F 2018;17: 1277-1292.
- [138] Vicente M.F., Baquero F., Perez-Diaz J.C. Conjugative acquisition and expression of antibiotic resistance determinants in *Listeria* spp. J Antimicrob Chemother 1988;21: 309-318.
- [139] Al-Nabulsi A.A., Osaili T.M., Shaker R.R., Olaimat A.N., Jaradat Z.W., Zain Elabedeen N.A., Holley R.A. Effects of osmotic pressure, acid, or cold stresses on antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol. 2015;46: 154-160.
- [140] Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection. Science 1999;284: 1318-1322.
- [141] Ibusquiza P.S., Herrera J.J.R., Cabo M.L. Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol. 2011;28: 418-425.
- [142] Papaioannou E., Giaouris E.D., Berillis P., Boziaris I.S. Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. Int. J. Food Microbiol. 2018;267: 9-19.
- [143] Di Ciccio P., Rubiola S., Panebianco F., Lomonaco S., Allard M., Bianchi D.M., i wsp. Biofilm formation and genomic features of *Listeria monocytogenes* strains isolated from meat and dairy industries located in Piedmont (Italy). Int J Food Microbiol. 2022;378: 109784.
- [144] Pan Y., Breidt F., Kathariou S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. App Environ Microbiol. 2006;72(12): 7711-7717.
- [145] Cherifi T., Jacques M., Quessy S., Fravalo P. Impact of nutrient restriction on the structure of *Listeria monocytogenes* biofilm grown in a microfluidic system. Front. Microbiol. 2017;8.
- [146] Govaert M., Smet C., Baka M., Janssens T., Impe J.V. Influence of incubation conditions on the formation of model biofilms by *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on abiotic surfaces. J. Appl. Microbiol. 2018;125: 1890-1900.

- [147] Chang Y., Gu W., Fischer N., McLandsborough L. Identification of genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation by mariner-based transposon mutagenesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012;93: 2051-2062.
- [148] Zetzmann M., Sanchez-Kopper A., Waidmann M.S., Blombach B., Riedel C.U. Identification of the agr peptide of *Listeria monocytogenes*. *Front. Microbiol.* 2016;7: 989.
- [149] Desmond E. Reducing salt: a challenge for the meat industry. *Meat Sci.* 2006;74: 188-196.
- [150] Sleator R.D., Hill C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 2002;26: 49-71.
- [151] Chihib N.-E., da Silva M.R., Delattre G., Laroche M., Federighi M. Different cellular fatty acid pattern behaviours of two strains of *Listeria monocytogenes* Scott A and CNL 895807 under different temperature and salinity conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003;218: 155-160.
- [152] Bucur F.I., Grigore-Gurgu L., Crauwels P., Riedel C.U., Nicolau A.I. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. *Front. Microbiol.* 2018;9: 2700.
- [153] Chan Y.C., Raengpradub S., Boor K.J., Wiedmann M. Microarray-based characterization of the *Listeria monocytogenes* cold regulon in log- and stationary-phase cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73: 6484-6498.
- [154] Mendum M.L., Smith L.T. Characterization of glycine betaine porter I from *Listeria monocytogenes* and its roles in salt and chill tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68: 813-819.
- [155] Fraser K.R., Harvie D., Coote P.J., O'Byrne C.P. Identification and characterization of an ATP binding cassette L-Carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000;66: 4696-4704.
- [156] Duché O., Trémoulet F., Glaser P., Labadie, J. Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68: 1491-1498.
- [157] Burall L.S., Laksanalamai P., Datta A.R. *Listeria monocytogenes* mutants with altered growth phenotypes at refrigeration temperature and high salt concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012;78: 1265-1272.
- [158] Nair S., Milohanic E., Berche P. ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 2000;68: 7061-7068.
- [159] Van der Veen S., Hain T., Wouters J.A., Hossain H., de Vos W.M., Abee T., i wsp. The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response. *Microbiology.* 2007;153: 3593-3607.
- [160] Kocaman N., Sarimehmetoğlu B. Stress responses of *Listeria monocytogenes*. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2016;63: 421-427.

- [161] Lianou A., Sofos J.N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *J. Food Prot.* 2007;70: 2172-2198.
- [162] Schmid B., Klumpp J., Raimann E., Loessner M.J., Stephan R., Tasara T. Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75: 1621-1627.
- [163] Lee J.H., Jeong K.W., Kim Y.M. Purification and structural characterization of cold shock protein from *Listeria monocytogenes*. *Bull. Kor. Chem. Soc.* 2012;33: 2508-2512.
- [164] Barria C., Malecki M., Arraiano C.M. Bacterial adaptation to cold. *Microbiology* 2013;159: 2437-2443.
- [165] Angelidis A.S., Smith G M. Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69: 1013-1022.
- [166] Becker L.A., Evans S.N., Hutkins R.W., Benson A.K. Role of σ^B in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J. Bacteriol.* 2000;182: 7083-7087.
- [167] Ryan S., Hill C., Gahan C.G. Acid stress responses in *Listeria monocytogenes*. *Adv. Appl. Microbiol.* 2008;65: 67-91.
- [168] Begley M., Gahan C.G., Hill C. Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68: 6005-6012.
- [169] Koutsoumanis K.P., Kendall P.A., Sofos J.N. Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69: 7514-7516.
- [170] Melo J., Andrew P.W., Faleiro M.L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: the role of stress responses. *Food Res. Int.* 2015;67: 75-90.
- [171] Werbrouck H., Vermeulen A., Van Coillie E., Messens W., Herman L., Devlieghere F., *i* wsp. Influence of acid stress on survival, expression of virulence genes and invasion capacity into Caco-2 cells of *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* 2009;134: 140-146.
- [172] Soares C.A., Knuckley B. Mechanistic studies of the agmatine deiminase from *Listeria monocytogenes*. *Biochem. J.* 2016;473: 1553-1561.
- [173] Matereke L.T., Okoh A.I. *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: a review. *Pathogens* 2020;9: 528.
- [174] Smith J.L., Liu Y., Paoli G.C. How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions? *Can. J. Microbiol.* 2013;59: 141-152.
- [175] Soni K.A., Nannapaneni R., Tasara T. The contribution of transcriptomic and proteomic analysis in elucidating stress adaptation responses of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* 2011;8: 842-852.

- [176] Giotis E.S., Muthaiyan A., Natesan S., Wilkinson B.J., Blair I.S., McDowell D.A. Transcriptome analysis of alkali shock and alkali adaptation in *Listeria monocytogenes* 10403S. *Foodborne Pathog. Dis.* 210;7: 1147-1157.
- [177] Giotis E.S., Muthaiyan A., Blair I.S., Wilkinson B.J., McDowell D.A. Genomic and proteomic analysis of the Alkali-Tolerance Response (AITR) in *Listeria monocytogenes* 10403S. *BMC Microbiol.* 2008;8: 102.
- [178] Tapia N.C., Dorey A.L., Gahan C.G.M., den Besten H.M.W., O'Byrne C.P., Abee T. Different carbon sources result in differential activation of sigma B and stress resistance in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 2020;320: 108504.
- [179] Watson S.P., Clements M.O., Foster S.J. Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1998;180: 1750-1758.
- [180] Herbert K.C., Foster S. Starvation survival in *Listeria monocytogenes*: characterization of the response and the role of known and novel components. *Microbiology* 2001;147: 2275-2284.
- [181] Gahan C.G.M., Hill C. *Listeria monocytogenes*: Survival and adaptation in the gastrointestinal tract. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2014;4: 9.
- [182] Abeysundara P.D.A., Nannapaneni R., Soni K.A., Sharma C.S., Mahmoud B. Induction and stability of oxidative stress adaptation in *Listeria monocytogenes* EGD (Bug600) and F1057 in sublethal concentrations of H₂O₂ and NaOH. *Int. J. Food Microbiol.* 2016;238: 288-294.
- [183] Skandamis P.N., Yoon Y., Stopforth J.D., Kendall P.A., Sofos J.N. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* 2008;25: 294-303.
- [184] Faleiro M.L., Andrew P.W., Power, D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 2003;84: 207-216.
- [185] Orsi R.H., Chaturongakul S., Oliver H.F., Ponnala L., Gaballa A., Wiedmann M. Alternative factors regulate overlapping as well as distinct stress response and metabolic functions in *Listeria monocytogenes* under stationary phase stress condition. *Pathogens* 2021;10: 411.
- [186] Lungu B., Ricke S.C., Johnson M.G. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions. *Anaerobe* 2009;15: 7-17.
- [187] Becker L.A., Cetin M.S., Hutkins R.W., Benson A.K. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigmaB from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J Bacteriol.* 1998;180(17): 4547-4554.
- [188] Utratna M., Cosgrave E., Baustian C, Ceredig R., O'Byrne C. Development and optimization of an EGFP-based reporter for measuring the general stress response in *Listeria monocytogenes*. *Bioeng Bugs.* 2012;3(2): 93-103.
- [189] Wemekamp-Kamphuis H.H., Wouters J.A., de Leeuw P.P., Hain T., Chakraborty T., Abee T. Identification of sigma factor sigma B-controlled genes and their impact on acid stress,

- high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(6): 3457-3466.
- [190] Wiedmann M., Arvik T.J., Hurley R.J., Boor K.J. General stress transcription factor sigmaB and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol.* 1998;180(14): 3650-3656.
- [191] Liu S., Graham J.E., Bigelow L., Morse P.D., Wilkinson B.J. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(4): 1697-1705.
- [192] Ferreira A., O'Byrne C.P., Boor K.J. Role of sigma(B) in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(10): 4454-4457.
- [193] NicAogain K., O'Byrne C.P. The role of stress and stress adaptations in determining the fate of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* in the food chain. *Front. Microbiol.* 2016;7: 1865.
- [194] Gaballa A., Guariglia-Oropeza V., Wiedmann M., Boor K.J. Cross talk between SigB and PrfA in *Listeria monocytogenes* facilitates transitions between extra- and intracellular environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2019;83: e00034-e00019.
- [195] Vivant A.L., Garmyn D., Gal L., Hartmann A., Piveteau P. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil requires AgrA-mediated regulation. *Appl Environ Microbiol.* 2016;81: 5073-5084.
- [196] Garmyn D., Augagneur Y., Gal L., Vivant A.L., Piveteau P. *Listeria monocytogenes* differential transcriptome analysis reveals temperature-dependent Agr regulation and suggests overlaps with other regulons. *PLoS One.* 2012;7: e43154.
- [197] Bergholz T.M., Bowen B., Wiedmann M., Boor K.J. *Listeria monocytogenes* shows temperature-dependent and independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection against other stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012;78: 2602-2612.
- [198] Alvarez-Ordóñez A., Broussolle V., Colin P., Nguyen-The C., Prieto M. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 2015;213: 99-109.
- [199] Lou Y., Yousef A.E. Adaptation to sub-lethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63: 1252-1255.
- [200] Ferreira A., Sue D., O'Byrne C.P., Boor K.J. Role of *Listeria monocytogenes* σ^B in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69: 2692-2698.

- [201] Faezi-Ghasemi M., Kazemi S. Effect of sub-lethal environmental stresses on the cell survival and antibacterial susceptibility of *Listeria monocytogenes* PTCC1297. *Zahedan J. Res. Med. Sci.* 2015;17: 1-6.
- [202] PNL04 (2013). Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes*.
- [203] Walecka-Zacharska E., Kosek-Paszowska K., Bania J., Karpíšková R., Stefaniak T. Salt stress-induced invasiveness of major *Listeria monocytogenes* serotypes. *Lett Appl Microbiol.* 2013;56(3): 216-221.
- [204] Suo B., He Y., Tu S.-I., Shi X. A multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes* in meat products. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(6).
- [205] Franciosa G., Maugliani A., Floridi F., Aureli P. Molecular and experimental virulence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from cases with invasive listeriosis and febrile gastroenteritis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;43: 431-439.
- [206] Rawool D.B., Malik S.V.S., Barbuddhe S.B., Shakuntala I., Aurora R.A. A multiplex PCR for detection of virulence associated genes in *Listeria monocytogenes*. *Ital J Food Saf.* 2007;9: 56-62.
- [207] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zones diameters. Version 12.0, 2022, <http://www.eucast.org>, data wejścia 23.03.2022.
- [208] Vipra A., Desai S.N., Junjappa R.P., Roy P., Poonacha N., Ravinder P., Sriram B., Padmanabhan S. Determining the minimum inhibitory concentration of bacteriophages: potential Aadvantages. *Adv Microbiol.* 2013;3: 181-190.
- [209] R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020, <https://www.R-project.org/>, data wejścia 10.09.2022.
- [210] Robinson T.P., Ocio M.J., Kaloti A., Mackey B.M. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 1998;44(1-2): 83-92.
- [211] Francois K., Devlieghere F., Standaert A.R., Geeraerd A.H., Van Impe J.F., Debevere J. Effect of environmental parameters (temperature, pH and a_w) on the individual cell lag phase and generation time of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2006;108(3): 326-335.
- [212] Stepanović S., Cirković I., Ranin L., Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol.* 2004;38(5): 428-432.
- [213] Breakpoints tables for interpretation of MICs and zones diameters. Version 13.0, 2023, <http://www.eucast.org>, data wejścia 02.02.2023.

- [214] Knudsen G.M., Olsen J.E., Dons L. Characterization of DegU, a response regulator in *Listeria monocytogenes*, involved in regulation of motility and contributes to virulence. FEMS Microbiol Lett. 2004;240(2): 171-179.
- [215] Wałęcka E., Molenda J., Karpíšková R., Bania J. Effect of osmotic stress and culture density on invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. Int J Food Microbiol. 2011;144(3): 440-445.
- [216] Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research 2001;29(9): e45.
- [217] Pieta L., Garcia F.B., Riboldi G.P., de Oliveira L.A., Frazzon A.P.G., Frazzon J. Transcriptional analysis of genes related to biofilm formation, stress-response, and virulence in *Listeria monocytogenes* strains grown at different temperatures. Ann Microbiol. 2014;64: 1707-1714.
- [218] McDougal L.K., Steward C.D., Killgore G.E., Chaitram J.M., McAllister S.K., Tenover F.C. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J Clin Microbiol 2003;41: 5113-5120.
- [219] Pyz-Łukasik R., Paszkiewicz W., Kiełbus M., Ziomek M., Gondek M., Domaradzki P., Michalak K., Pietras-Ożga D. Genetic diversity and potential virulence of *Listeria monocytogenes* isolates originating from polish artisanal cheeses. Foods 2022;11(18): 2805.
- [220] Kérouanton A., Marault M., Petit L., Grout J., Dao T.T., Brisabois A. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. J Microbiol Meth. 2010;80(2): 134-137.
- [221] Pászti J., Király J., Füzi M. Serogrouping and pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from cases of human infection in Hungary 2004-2012 molecular typing of *Listeria monocytogenes* in Hungary. Acta Microbiol Immunol Hung. 2014;61: 71-78.
- [222] Bueno V.F., Banerjee P., Banada P.P., Jose de Mesquita A., Lemes-Marques E.G., Bhunia A.K. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates of food and human origins from Brazil using molecular typing procedures and in vitro cell culture assays. Int J Environ Health Res. 2010;20: 43-59.
- [223] Zhang Y., Yeh E., Hall G., Cripe J., Bhagwat A.A., Meng J. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. Int J Food Microbiol. 2007;113(1): 47-53.
- [224] Anwar T.M., Pan H., Chai W., Ed-Dra A., Fang W., Li Y., Yue M. Genetic diversity, virulence factors, and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* from food, livestock, and clinical samples between 2002 and 2019 in China. Int J Food Microbiol. 2022;366: 109572.

- [225] Baba H., Kanamori H., Kakuta R., Sakurai H., Oshima K., Aoyagi T., i wsp. Genomic characteristics of *Listeria monocytogenes* causing invasive listeriosis in Japan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2021;99(3): 115233.
- [226] Cardenas-Alvarez M.X., Zeng H., Webb B.T., Mani R., Muñoz M., Bergholz T.M. Comparative Genomics of *Listeria monocytogenes* Isolates from Ruminant Listeriosis Cases in the Midwest United States. *Microbiol Spectr.* 2022;31: e0157922.
- [227] Gorski L., Cooley M.B., Oryang D., Carychao D., Nguyen K., Luo Y., i wsp. Prevalence and clonal diversity of over 1,200 *Listeria monocytogenes* isolates collected from public access waters near produce production areas on the Central California Coast during 2011 to 2016. *Appl Environ Microbiol.* 2022;88(8): e0035722.
- [228] Zakrzewski A.J., Kurpas M., Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W., Fraqueza M.J. A Comprehensive virulence and resistance characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from fish and the fish industry environment. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24: 3581.
- [229] Das S., Lalitha KV., Thampuran N., Surendran P.L. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from tropical seafood of Kerala, India. *Ann Microbiol.* 2013;63: 1093-1098.
- [230] Montero D., Boderó M., Riveros G., Lapierre L., Gaggero A., Vidal R.M., Vidal M. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Front Microbiol.* 2015;6: 384.
- [231] Rodríguez-Melcón C., Alonso-Calleja C., García-Fernández C., Carballo J., Capita R. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for twelve antimicrobials (biocides and antibiotics) in eight strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology.* 2022;11: 46.
- [232] Kawacka I., Pietrzak B., Schmidt M., Olejnik-Schmidt A. *Listeria monocytogenes* isolates from meat products and processing environment in Poland are sensitive to commonly used antibiotics, with rare cases of reduced sensitivity to ciprofloxacin. *Life* 2023;13: 821.
- [233] Obaidat M.M., Bani Salman A.E., Lafi S.Q., Al-Abboodi A.R. Characterization of *Listeria monocytogenes* from three countries and antibiotic resistance differences among countries and *Listeria monocytogenes* serogroups. *Lett App Microbiol.* 2015;60(6): 609-614.
- [234] Abdollahzadeh E., Ojagh S.M., Hosseini H., Ghaemi E.A., Irajian G., Naghizadeh Heidarlo M. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood and humans in Iran. *Microb Pathog.* 2016;100: 70-74.
- [235] Rugna G., Carra E., Bergamini F., Franzini G., Faccini S., Gattuso A., i wsp. Distribution, virulence, genotypic characteristics and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated over one-year monitoring from two pig slaughterhouses and processing plants and their fresh hams. *Int. J. Food Microbiol.* 2021;336: 108912.

- [236] Moye Z.D., Woolston J., Sulakvelidze, A. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses*, 2018;10: 205.
- [237] Wójcicki M., Błażej S., Gientka I., Brzezicka K. The concept of using bacteriophages to improve the microbiological quality of minimally-processed foods. *Acta Scientarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2019;18: 373-383.
- [238] Reinhard R.G., Kalinowski R.M., Bodnaruk P.W., Eifert J.D., Boyer R.R., Duncan S.E, Hartford Baily R. Fate of *Listeria* on various food contact and noncontact surfaces when treated with bacteriophage. *J Food Saf.* 2020;40.
- [239] Truchado P., Elsser-Gravesen A., Gil M.I., Allende A. Post-process treatments are effective strategies to reduce *Listeria monocytogenes* on the surface of leafy greens: A pilot study. *Int J Food Microbiol.* 2020;313: 108390.
- [240] Archer D.L. Preservation microbiology and safety: evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. *Trends Food Sci Technol.* 1996;7: 91-95.
- [241] Hill C., Cotter P.D., Sleator R.D., Gahan C.G.M. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *Int Dairy J.* 2002;12: 273-283.
- [242] Lin Y.D., Chou C.C. Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses. *Food Microbiol.* 2004;21: 605-610.
- [243] Vasseur C., Baverel L., Hebraud M., Labadie J. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol.* 1999;86: 469-476.
- [244] Cole M.B., Jones M.V., Holyoak C. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol.* 1990;69: 63-72.
- [245] Magalhães R., Ferreira V., Brandao T.R., Palencia R.C., Almeida G., Teixeira P. Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: a focus on growth kinetics under different temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. *Food Microbiol.* 2016;57: 103-108.
- [246] Liu D., Lawrence M.L., Ainsworth A.J., Austin F.W. Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;243(2): 373-378.
- [247] Patchett R.A., Kelly A.F., Kroll R.G. Effect of sodium chloride on the intracellular solute pools of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58(12): 3959-3963.
- [248] Hudson J.A. Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. *Lett in App Microbiol.* 1992;14: 178-180.
- [249] Shahamat M., Seaman A., Woodbine M. Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene. I. Abt. Originale A.* 1980;246: 506-511.

- [250] Hingston P., Chen J., Dhillon B.K., Laing C., Bertelli C., Gannon V., i wsp. Genotypes associated with *Listeria monocytogenes* isolates displaying impaired or enhanced tolerances to cold, salt, acid, or desiccation stress. *Front Microbiol.* 2017;8: 369.
- [251] Skandamis P.N., Yoon Y., Stopforth J.D., Kendall P.A., Sofos J.N. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* 2008;25: 294-303.
- [252] Conner D.E., Scott V.N., Bernard D.T. Growth, inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *J Food Protect.* 1999;55: 652-655.
- [253] Ita P.S., Hutkins R.W. Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric and hydrochloric acids. *J Food Protect.* 1991;54: 15-19.
- [254] Phan-Thanh L., Mahouin F., Aligé S. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2000;55(1-3): 121-126.
- [255] Kroll R.G., Patchett R.A. Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Lett in Appl Microbiol.* 1992;14:2 24-227.
- [256] Gahan C.G.M., O'Driscoll B., Hill C. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Appl and Environ Microbiol.* 1996;62: 3128-3132.
- [257] Faleiro M.L., Andrew P.W., Power D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int J Food Microbiol.* 2003;84(2): 207-216.
- [258] Phan-Thanh L. Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. *J Gen Appl Microbiol.* 1998;44(3): 183-191.
- [259] Metselaar K.I., den Besten H.M., Abee T., Moezelaar R., Zwietering M.H. Isolation and quantification of highly acid resistant variants of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2013;166(3): 508-514.
- [260] Dykes G.A., Moorhead S.M. Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *Int J Food Microbiol.* 2000;56(2-3): 161-166.
- [261] Vialette M., Pinon A., Chasseignaux E., Lange M. Growths kinetics comparison of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment. *Int J Food Microbiol.* 2003;82(2): 121-131.
- [262] Komora N., Bruschi C., Magalhães R., Ferreira V., Teixeira P. Survival of *Listeria monocytogenes* with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses. *Int J Food Microbiol.* 2017;245: 79-87.
- [263] Barbosa J., Borges S., Magalhães R., Ferreira V., Santos I., Silva J., Almeida G., Gibbs P., Teixeira P. Behaviour of *Listeria monocytogenes* isolates through gastrointestinal tract passage simulation, before and after two sub-lethal stresses. *Food Microbiol.* 2012;30: 24-28.

- [264] Ramalheira R., Almeida M., Azeredo J., Brandão T.R.S., Almeida G., Silva J., Teixeira P. Survival of clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes* through simulated gastrointestinal tract conditions. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7: 121-128.
- [265] Lundén J., Tolvanen R., Korkeala H. Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. *Lett Appl Microbiol.* 2008;46(2): 276-280.
- [266] Taormina P.J., Beuchat L.R. Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(6): 2555-2563.
- [267] Giotis E.S., Blair I.S., McDowell D.A. Morphological changes in *Listeria monocytogenes* subjected to sublethal alkaline stress. *Int J Food Microbiol.* 2007;120(3): 250-258.
- [268] Arioli S., Montanari C., Magnani M., Tabanelli G., Patrignani F., Lanciotti R., i wsp. Modelling of *Listeria monocytogenes* Scott A after a mild heat treatment in the presence of thymol and carvacrol: effects on culturability and viability. *J. Food Eng.* 2019;240: 73-82.
- [269] Shen Q., Jangam P.M., Soni K.A., Nannapaneni R., Schilling W., Silva J.L. Low, medium, and high heat tolerant strains of *Listeria monocytogenes* and increased heat stress resistance after exposure to sublethal heat. *J Food Prot.* 2014;77(8): 1298-1307.
- [270] Doyle M.E., Mazzotta A.S., Wang T., Wiseman D.W., Scott V.N. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 2001;64: 410-429.
- [271] Begot C., Lebert I., Lebert A. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Int J Food Microbiol.* 1997;14: 403-412.
- [272] Lianou A., Stopforth J.D., Yoon Y., Wiedmann M., Sofos J.N. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *J Food Prot.* 2006;69: 2640-2647.
- [273] Nufer U., Stephan R., Tasara T. Growth characteristics of *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri* and *Listeria innocua* strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4 and 7 degrees C. *Food Microbiol.* 2007;24: 444-451.
- [274] Arguedas-Villa C., Stephan R., Tasara T. Evaluation of cold growth and related gene transcription responses associated with *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Food Microbiol.* 2010;27(5): 653-660.
- [275] El-Kest S.E., Marth E.H. Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: a review. *J Food Prot.* 1992;55: 639-648.
- [276] Miladi H., Chaieb K., Bakhrouf A., Elmnasser N., Ammar E. Freezing effects on survival of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cold fresh-salmon. *Ann Microbiol.* 2008;58(3): 471-476.

- [277] Ben Slama R., Miladi H., Chaieb K., Bakhrouf A. Survival of *Listeria monocytogenes* cells and the effect of extended frozen storage (-20°C) on the expression of its virulence gene. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;170(5): 1174-1183.
- [278] Simpson-Beauchamp C., Belk K.E., Smith G.C., Sofos J.N., Scanga J.A., Byelashov O.A., Geornaras I., Kendall P.A. Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing, thawing and home storage of frankfurters. *Food Microbiol.* 2010;27: 144-149.
- [279] Azizoglu R.O., Osborne J., Wilson S., Kathariou S. Role of growth temperature in freeze-thaw tolerance of *Listeria* spp.. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(16): 5315-5320.
- [280] *Listeria* Outbreak Linked to Ice Cream, 2022, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/monocytogenes-06-22/index.html>, data wejścia 12.05.2023.
- [281] Mai T.L., Conner D.E. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Int J Food Microbiol.* 2007;120(3): 282-286.
- [282] Roche S.M., Gracieux P., Milohanic E., Albert I., Virlogeux-Payant I., Témoin S., i wsp. Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71: 6039-6048.
- [283] Desai A.N., Anyoha A., Madoff L.C., Lassmann B. Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: a review of ProMED reports from 1996 to 2018. *Int J Infect Dis.* 2019;84: 48-53.
- [284] Mohan V., Cruz C.D., van Vliet A.H.M., Pitman A.R., Visnovsky S.B., Rivas L., i wsp. Genomic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from seafood, horticulture and factory environments in New Zealand. *Int. J. Food Microbiol.* 2021;347.
- [285] Bonsaglia E.C.R., Silva N.C.C., Fernandes Júnior A., Araújo Júnior J.P., Tsunemi M.H., Rall V.L.M. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control* 2014;35: 386-391.
- [286] Barbosa J., Borges S., Camilo R., Magalhães R., Ferreira V., Santos I., i wsp. Biofilm formation among clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int J Microbiol.* 2013;524975.
- [287] Tasara T., Stephan R. Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: A review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *J Food Prot.* 2006; 69(6): 1473-1484.
- [288] Melian C., Bentencourt E., Castellano P., Ploper D., Vignolo G., Mendoza L.M. Biofilm genes expression of *Listeria monocytogenes* exposed to *Latilactobacillus curvatus* bacteriocins at 10°C. *Int J Food Microbiol.* 2022; 370: 109648.
- [289] Lemon K.P., Higgins D.E., Kolter R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol.* 2007;189: 4418-4424.

- [290] Kragh M.L., Muchaamba F., Tasara T., Truelstrup Hansen L. Cold-shock proteins affect desiccation tolerance, biofilm formation and motility in *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2020;329: 108662.
- [291] Cordero N., Maza F., Navea-Perez H., Aravena A., Marquez-Fontt B., Navarrete P., i wsp. Different transcriptional responses from slow and fast growth rate strains of *Listeria monocytogenes* adapted to low temperature. *Front. Microbiol.* 2016;7: 1-9.
- [292] Bouymajane A., Rhazi Filali F., Oulghazi S., Lafkih N., Ed-Dra A., Aboukacem A., i wsp. Occurrence, antimicrobial resistance, serotyping and virulence genes of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. *Heliyon* 2021;7: e06169.
- [293] Alonso-Hernando A., Capita R., Prieto M., Alonso-Calleja C. Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* 2009;20: 1108-1111.
- [294] Werbroeck H., Vermeulen A., Van Coillie E., Messens W., Herman L., Devlieghere F., Uyttendaele M. Influence of acid stress on survival, expression of virulence genes and invasion capacity into Caco-2 cells of *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Int J Food Microbiol.* 2009;134(1-2): 140-146.
- [295] Mataragas M., Rovetto F., Bellio A., Alessandria V., Rantsiou K., Decastelli L., Coccolin L. Differential gene expression profiling of *Listeria monocytogenes* in Cacciatore and Felino salami to reveal potential stress resistance biomarkers. *Food Microbiol.* 2015; 46: 408-417.
- [296] Cabrita P., Trigo M.J., Ferreira R.B., Brito L. Differences in the expression of cold stress-related genes and in the swarming motility among persistent and sporadic strains of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog Dis.* 2015;12(7): 576-584.
- [297] Alía A., Rodríguez A., Andrade M.J., Gómez F.M., Córdoba J.J. Combined effect of temperature, water activity and salt content on the growth and gene expression of *Listeria monocytogenes* in a dry-cured ham model system. *Meat Sci.* 2019;155: 16-19.
- [298] Lee Y.J., Wang C. Links between S-adenosylmethionine and Agr-based *quorum sensing* for biofilm development in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Microbiologyopen* 2020;1-12.
- [299] Rieu A., Weidmann S., Garmyn D., Piveteau P., Guzzo J. Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(19): 6125-6133.
- [300] Gandra T.K.V., Volcan D., Kroning I.S., Marini N., de Oliveira A.C., Bastos C.P., da Silva W.P. Expression levels of the *agr* locus and *prfA* gene during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel and polystyrene during 8 to 48 h of incubation 10 to 37°C. *Int J Food Microbiol.* 2019;300: 1-7.
- [301] Toliopoulos C., Giaouris E. Marked inter-strain heterogeneity in the differential expression of some key stress response and virulence-related genes between planktonic and biofilm cells in *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2023; 390: 110136.

10. SPIS RYCIN

- Rycina 1. Etapy cyklu życiowego *L. monocytogenes* (uwzględniono czynniki wirulencji związane z każdym etapem). Pierwszy etap obejmuje adhezję (Lap, FbpA, InlJ, Ami) oraz internalizację (InlA, InlB). Kolejne etapy to inwazja (Iap), liza wakuoli (LLO, PlcA, PlcB, Mpl), namnażanie wewnątrzkomórkowe (Hpt) i ruch wewnątrzkomórkowy (ActA, P60 (Iap), InlC). *L. monocytogenes* przedostaje się do sąsiedniej komórki w formie wtórnej wakuoli, która ulega lizie, a cykl życiowy inicjowany jest od nowa. Lap-ang. *Listeria* adhesion protein, FbpA-białko wiążące fibronektynę, Inl-interanlina, Ami-ang. autolysin amidase, LLO-listeriolizyna O, PlcA-fosfolipaza A, PlcB-fosfolipaza B, Mpl-metaloproteaza, ActA-białko powierzchniowe ActA, Hpt-białko transportera fosforanu heksozy (ang. hexose phosphate transporter protein (rycina własna, na podstawie [45–47]) 18
- Rycina 2. Organizacja *Listeria* Pathogenicity Island 1. Kierunek transkrypcji jest wskazany przez odpowiednie strzałki (rycina własna, na podstawie [60,61]) 21
- Rycina 3. Regulacja ekspresji genu *prfA* i aktywności białka PrfA. A. kontrola transkrypcji *prfA* (trzy promotory genu *prfA*: P_{plcA} pozytywnie kieruje ekspresją *prfA* poprzez wiązanie się z „PrfA box”. P_{prfAP1} i P_{prfAP2} kontrolują reakcje monocistronowe. Promotor P_{prfAP1} ma nieulegający translacji region 5'UTR, który działa jako czujnik temperatury), B. potranskrypcyjna kontrola *prfA* (w temperaturze 30°C w regionie zawierającym sekwencję Shine-Dalgarno tworzy się stabilna struktura przestrzenna, określana jako „spinka do włosów”. W 37°C, struktura ta ulega destabilizacji, co umożliwi przyłączenie rybosomu i syntezę białka PrfA), C. kontrola potranslacyjna PrfA (przyłączenie cząsteczki kofaktora (glutationu) do białka PrfA) (rycina własna, na podstawie [83–86]) 22
- Rycina 4. Mechanizmy odpowiedzi na stres osmotyczny u *L. monocytogenes* oparte na transporcie kompatybilnych substancji rozpuszczonych. Karnityna jest transportowana przez system OpuCABCD, podczas gdy glicynobetaina może być gromadzona zarówno przez system GbuB, jak i BetL. Niska dostępność składników pokarmowych prowadzi do biosyntezy aminokwasów i kwasów tłuszczowych, co wpływa na adaptacyjne modyfikacje ściany komórkowej. Kdp (ang. transcriptional response regulator) to system wychwytu potasu 30

- w warunkach zmiennej osmolarności (rycina własna, na podstawie [32])
- Rycina 5. Mechanizmy odpowiedzi na stres cieplny u *L. monocytogenes*. A. Obecność w cytoplazmie niesfałdowanych białek uniemożliwia ich interakcje z HrcA (ang. heat-inducible transcription repressor). Białko GroE działa jako wewnątrzkomórkowe białko opiekuńcze. Po denaturacji pod wpływem stresu cieplnego, nieprawidłowo sfałdowany HrcA nie jest w stanie związać się z docelowym DNA. W konsekwencji polimeraza RNA- σ^{32} wiąże się z docelowymi promotorami, umożliwiając transkrypcję genów szoku cieplnego klasy I. B. Podobnie, CtsR (ang. negative transcription regulator) ulega zmianom konformacyjnym wywołanym stresem cieplnym, które uniemożliwiają jego interakcję z docelowymi promotorami. Związanie polimerazy RNA- σ^{32} z promotorami genów *clp* indukuje transkrypcję *clpC* i *clpP*. Po autofosforylacji zależnej od temperatury, McsB, wspomagany przez McsA, kieruje CtsR do degradacji przez proteazę ClpC i ClpP. Niska dostępność składników pokarmowych prowadzi do biosyntezy aminokwasów i kwasów tłuszczowych, co wpływa na adaptacyjne modyfikacje ściany komórkowej (rycina własna, na podstawie [32,152])
- Rycina 6. Mechanizmy odpowiedzi na stres niskich temperatur u *L. monocytogenes*. Csp (ang. cold shock protein) wiąże się do jednoniciowego kwasu nukleinowego poprzez motyw rybonukleoproteiny: RNP1 i RNP2, stabilizując w ten sposób konformację kwasu nukleinowego i zapobiegając jego degradacji. Udział w stresie niskich temperatur mają również białka Cap (ang. cold acclimatization protein), substancje kompatybilne transportowane za pośrednictwem OpuC i Gbu do komórki, a także modyfikacje ściany komórkowej (rycina własna, na podstawie [32])
- Rycina 7. Systemy odpowiedzi na stres kwasowy u *L. monocytogenes*. GAD (ang. glutamate decarboxylase activity) przekształca zewnętrzny glutaminian w kwas gamma-aminomasłowy (GABA), co powoduje wzrost pH. Następnie GABA jest wymieniany na glutaminian poprzez antyporter GadT1 lub GadT2, co przyczynia się do alkalizowania środowiska i przywracania homeostazy pH. Natomiast system ADI (ang. putative arginine deiminase) przetwarza importowaną ze środowiska zewnętrznego argininę w ornitynę, CO₂, amoniak i ATP. W procesie tym biorą udział trzy enzymy: ADI, karbamoiltransferaza i kinaza karbaminianowa.

	Powstający jako produkt uboczny amoniak reaguje z protonami wewnątrzkomórkowymi, wytwarzając NH_4^+ , co prowadzi do wzrostu pH cytoplazmy i ochrony komórki przed kwaśnym środowiskiem. $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPaza}$ generuje gradient protonów, wypływ H^+ przywraca homeostazę (rycina własna, na podstawie [32])	
Rycina 8.	Schemat metodyki oceny wpływu stresu osmotycznego, kwasowego i zasadowego na wzrost badanych szczepów (n=50) <i>L. monocytogenes</i> . MHB-bulion Mueller Hinton	49
Rycina 9.	Schemat metodyki oceny wpływu stresu cieplnego na przeżywalność badanych szczepów (n=50) <i>L. monocytogenes</i> . PBS-zbuforowany roztwór soli fizjologicznej	51
Rycina 10.	Schemat metodyki oceny wpływu stresu niskiej temperatury na przeżywalność badanych szczepów (n=50) <i>L. monocytogenes</i> . TSB-bulion tryptozowo-sojowy, PBS-zbuforowany roztwór soli fizjologicznej, CAB-podłoże Columbia Agar	51
Rycina 11.	Schemat metodyki oceny wpływu stresu cyklicznego zamrażania i rozmrażania na przeżywalność badanych szczepów (n=50) <i>L. monocytogenes</i> . TSB-bulion tryptozowo-sojowy, PBS-zbuforowany roztwór soli fizjologicznej, CAB-podłoże Columbia Agar	52
Rycina 12.	Schemat metodyki oceny wpływu stresu związanego z niedoborem i nadmiarem składników odżywczych na przeżywalność badanych szczepów (n=50) <i>L. monocytogenes</i> . PBS-zbuforowany roztwór soli fizjologicznej, BHI-bulion mózgowo-sercowy, CAB-podłoże columbia agar	53
Rycina 13.	Dendrogram podobieństwa genetycznego badanych izolatów (n=80) w oparciu o wyniki uzyskane z zastosowaniem metody PFGE z wykorzystaniem grupowania hierarchicznego techniką UPGMA. K-materiał kliniczny, Ł-łosoś, M-mrożonki warzywne, W-wędliny	63
Rycina 14.	Przynależność do grup serologicznych w zależności od pochodzenia badanych szczepów (n=50) <i>L. monocytogenes</i>	65
Rycina 15.	Liczba szczepów reprezentujących dany profil genów wirulencji a przynależność do grupy serologicznej. Profil I-obecność 10 uwzględnionych w badaniu genów kodujących czynniki wirulencji, Profil II-brak genu <i>mpl</i> , przy obecności pozostałych wirulencji, Profil III-brak genu <i>fbpA</i> , przy obecności pozostałych genów wirulencji; Profil IV-brak genu <i>mpl</i> i <i>fbpA</i> , przy obecności pozostałych genów wirulencji	69

Rycina 16.	Przynależność do grupy serologicznej w zależności od pochodzenia wśród szczepów (n=38) u których wykazano obecność LIPI-1 (ang. <i>Listeria Pathogenicity Island 1</i>)	70
Rycina 17.	Przynależność do grupy serologicznej badanych szczepów (n=50) w zależności od profilu antybiotykowrażliwości. Profil A-wrażliwość na wszystkie badane antybiotyki, Profil B-oporność na penicylinę, przy wrażliwości na cztery pozostałe antybiotyki, Profil C-oporność na erytromycynę, przy wrażliwości na cztery pozostałe antybiotyki	71
Rycina 18.	Wartość minimalnego stężenia hamującego (ang. minimum inhibitory concentration, MIC) bakteriofaga w preparacie PhageGuard L w zależności od przynależności do grupy serologicznej i pochodzenia badanych szczepów (n=50) <i>L. monocytogenes</i> . PFU-plaque forming unit (jednostka tworząca łyśinkę)	73
Rycina 19.	Wartość NaCl hamująca wzrost badanych szczepów w zależności od pochodzenia (uwzględniono tylko stężenia hamujące wzrost)	75
Rycina 20.	Porównanie grup szczepów (ze względu na pochodzenie) w odpowiedzi na stres osmotyczny. Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25. i 75. centyl, wąsy rozciągają się do najmniejszej/największej wartości nie dalej niż mediana \pm 1,5-krotność przedziału międzykwartylowego. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie (p \leq 0,05). K-materiał kliniczny, Ł-łosoś, W-wędliny, M-mrożonki warzywne	76
Rycina 21.	Porównanie grup szczepów na podstawie pH<7, które hamowało wzrost (stres kwasowy). Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25 i 75 centyl, wąsy: minimum i maksimum. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie (p \leq 0,05)	77
Rycina 22.	Liczba szczepów, u których wykazano zahamowanie w zależności od wartości pH. A. wartości w wariancie pH<7,0, B. wartości w wariancie pH>7,0	78
Rycina 23.	Porównanie grup szczepów na podstawie pH>7, które hamowało wzrost (stres zasadowy). Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25 i 75 centyl, wąsy: minimum i maksimum. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie (p \leq 0,05)	79
Rycina 24.	Zakres pH, w którym wykazano wzrost badanych szczepów (n=50) <i>L. monocytogenes</i> . K-materiał kliniczny, W-wędliny, M-mrożonki warzywne, Ł-łosoś	80
Rycina 25.	Liczba szczepów niewykazujących wzrostu po ekspozycji na stres cieplny. Na rycinie przedstawiono tylko warianty badania, które zahamowały wzrost wśród badanych szczepów	82

Rycina 26.	Zmiana liczebności bakterii względem kontroli po 30 dniach ekspozycji na stres niskich temperatur w zależności od pochodzenia badanych szczepów. Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25 i 75 centyl, wąsy: minimum i maksimum. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$). j.t.k.-jednostka tworząca kolonie	84
Rycina 27.	Zmiana liczby bakterii [\log j.t.k. (jednostka tworząca kolonie)/ml] względem kontroli podczas stresu cyklicznego zamrażania-rozmrażania. 4* - bez cyklicznego zamrażania-rozmrażania	86
Rycina 28.	Porównanie numeru cyklu zamrażania-rozmrażania na podstawie zmiany liczby bakterii. Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25 i 75 centyle, wąsy: minimum i maksimum. a, b, c-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$)	87
Rycina 29.	Zmiana liczby bakterii względem kontroli dla wariantu niskiej dostępności składników odżywczych dla badanych szczepów ze względu na pochodzenie. Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25. i 75. centyl, wąsy: minimum i maksimum. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$). j.t.k.-jednostka tworząca kolonie	88
Rycina 30.	Zmiana liczby bakterii względem kontroli dla wariantu wysokiej dostępności składników odżywczych dla badanych szczepów ze względu na pochodzenie. Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25. i 75. centyl, wąsy: minimum i maksimum. a, b-oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$). j.t.k.-jednostka tworząca kolonie	89
Rycina 31.	Ogólny wynik klasyfikacji dla każdej grupy szczepów. Wykres pudełkowy: środek: mediana, granice pudełka: 25 i 75 centyl, wąsy: minimum i maksimum) z rozkładem danych w postaci kropek. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$)	91
Rycina 32.	Względny poziom ekspresji genu <i>sigB</i> szczepu A. 55K, B. 472W, C. ATCC 19111. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$)	97
Rycina 33.	Względny poziom ekspresji genu <i>agrA</i> szczepu A. 55K, B. 472W, C. ATCC 19111. a, b-wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$)	98

11. SPIS FOTOGRAFII

- Fotografia 1. Elektroforegram produktów amplifikacji reakcji multipleks PCR zastosowanej do określenia przynależności do grup serologicznych badanych szczepów *L. monocytogenes*. Ścieżka 1: marker wielkości (100-2500 pz), ścieżka 2: kontrola dodatnia 1/2a-3a, ścieżka 3: kontrola dodatnia 1/2b-3b, ścieżka 4: kontrola dodatnia 1/2c-3c, ścieżka 5: kontrola dodatnia 4b-4d-4e, ścieżki 6-17: badane szczepy *L. monocytogenes*, ścieżka 18: kontrola ujemna [fotografia własna] 64
- Fotografia 2. Elektroforegram produktów amplifikacji reakcji multipleks I, obejmującej geny: *fbpA* (435 pz), *plcA* (278 pz), *hly* (101 pz). Ścieżka 1: marker wielkości (100-1000 pz), ścieżka 2: kontrola dodatnia szczep IW41, ścieżki 3-5: badane szczepy *L. monocytogenes* [fotografia własna] 66
- Fotografia 3. Elektroforegram produktów amplifikacji reakcji multipleks II, obejmującej geny: *plcB* (794 pz), *inlB* (302 pz), *actA* (231 pz), *iap* (131 pz). Ścieżka 1: marker wielkości (100-1000 pz); ścieżka 2: kontrola dodatnia szczep IW41, ścieżki 3-5: badane szczepy *L. monocytogenes* [fotografia własna] 66
- Fotografia 4. Elektroforegram produktów amplifikacji reakcji multipleks III, obejmującej geny: *inlA* (2341 pz), *mpl* (1458 pz), *prfA* (706 pz). Ścieżka 1: marker wielkości (100-3000 pz), ścieżka 2: kontrola dodania szczep IW41, ścieżki 3-5: badane szczepy *L. monocytogenes* [fotografia własna] 67

12. SPIS TABEL

Tabela 1.	Serotypy <i>L. monocytogenes</i> w oparciu o podtyp antygeny O i H (na podstawie [21–26])	16
Tabela 2.	Najważniejsze epidemie listeriozy na świecie związane z żywnością	25
Tabela 3.	Pochodzenie badanych izolatów (n=80)	41
Tabela 4.	Sekwencje starterów (na podstawie [28]) oraz wielkość produktów wykorzystywanych w celu oceny przynależności do grup serologicznych	44
Tabela 5.	Sekwencje starterów oraz warunki amplifikacji trzech reakcji multipleks PCR określających obecność genów kodujących uwzględnione w badaniu czynniki wirulencji	46
Tabela 6.	Sekwencje starterów wykorzystane w reakcji Real-Time qPCR	60
Tabela 7.	Klastry wyodrębnione w oparciu o technikę PFGE z wykorzystaniem grupowania hierarchicznego techniką UPGMA z przyjętym punktem odcięcia 80,0%	62
Tabela 8.	Profile genów wirulencji wśród badanych szczepów (n=50) <i>L. monocytogenes</i>	68
Tabela 9.	Profile wrażliwości na antybiotyki wśród badanych szczepów (n=50) <i>L. monocytogenes</i>	71
Tabela 10.	Minimalne stężenie hamujące bakteriofaga w preparacie PhageGuard L wobec badanych szczepów (n=50) <i>L. monocytogenes</i>	72
Tabela 11.	Minimalne stężenie bakteriobójcze bakteriofaga w preparacie PhageGuard L wobec badanych (n=50) szczepów <i>L. monocytogenes</i>	74
Tabela 12.	Mediana liczby komórek po ekspozycji na stres cieplny w zależności od pochodzenia badanych szczepów	81
Tabela 13.	Mediana liczby komórek po ekspozycji na stres niskiej temperatury w zależności od pochodzenia szczepów <i>L. monocytogenes</i>	83
Tabela 14.	Mediany liczby bakterii po ekspozycji na stres cyklicznego zamrażania i rozmrażania w zależności od pochodzenia badanych szczepów	85
Tabela 15.	Klasyfikacja badanych szczepów na podstawie metody rangowania	90
Tabela 16.	Zdolność tworzenia biofilmu przez szczep 55K w wariancie kontrolnym oraz po ekspozycji na czynniki stresowe	92
Tabela 17.	Zdolność tworzenia biofilmu przez szczep 472W w wariancie kontrolnym oraz po ekspozycji na czynniki stresowe	93
Tabela 18.	Zdolność tworzenia biofilmu przez szczep ATCC 19111 w wariancie kontrolnym oraz po ekspozycji na czynniki stresowe	93

Tabela 19.	Zmiany wartości minimalnego stężenia hamującego antybiotyków w wariancie kontrolnym oraz po działaniu czynników stresowych dla szczepu 55K	94
Tabela 20.	Zmiany wartości minimalnego stężenia hamującego antybiotyków w wariancie kontrolnym oraz po działaniu czynników stresowych dla szczepu 472W	95
Tabela 21.	Zmiany wartości minimalnego stężenia hamującego antybiotyków w wariancie kontrolnym oraz po działaniu czynników stresowych dla szczepu ATCC 19111	96

Zgoda Komisji Bioetycznej

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy

KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 27/2019

Bydgoszcz, 29.01.2019 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **29.01.2019 r.** przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

prof. dr hab. n. med. Eugenia Gospodarek-Komkowska

Katedra i Zakład Mikrobiologii

Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie

- **prof. dr hab. n. med. Eugenia Gospodarek-Komkowska, dr inż. Krzysztof Skowron, mgr Natalia Wiktorczyk,**

w sprawie badania:

„Wpływ czynników stresowych na wybrane cechy fenotypowe i genotypowe badanych szczepów *Listeria monocytogenes*.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła:

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem uzyskania zgody osób badanych na wykorzystanie materiału biologicznego do celów naukowych, a w przypadku braku takiej zgody, analizowania jedynie materiału zanonimizowanego tj. pozbawionego danych personalnych (zgodnie z RODO).

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (29.01.2019 r.) do końca 2019 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

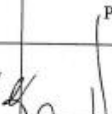
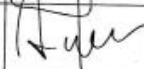
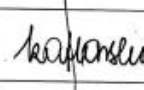
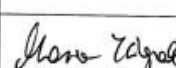
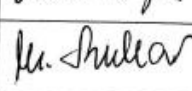

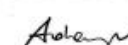
Otrzymuje:

prof. dr hab. n. med. Eugenia Gospodarek-Komkowska

Katedra i Zakład Mikrobiologii

Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 29.01.2019 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Zygas	Z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Dr hab. n. med. Maria Kłopocka		
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamezyk		
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska		