

DOI 10.7251/VETJSR2101078B

UDK 616.981.23:579.86

Прегледни научни рад

ЕКОЛОГИЈА *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Снежана БУЛАЈИЋ, Тијана ЛЕДИНА, Јасна ЂОРЂЕВИЋ*

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Београд, Република Србија

*Коресподентни аутор: Јасна Ђорђевић, jasna.djordjevic@vet.bg.ac.rs

Сажетак

Критеријуми безбедности хране за *Listeria monocytogenes* у категорији хране спремне за конзумирање примењују се још од 2006. године. На подручју Европске Уније у 2019. години бележи се 2.621 потврђен случај инвазивне листериозе људи, уз високу стопу mortalитета (17,6%).

Шире разумевање екологије *Listeria monocytogenes* је од пресудне важности за успешну контролу овог узрочника у континууму ланца хране.

У раду су представљена нова сазнања о резервоарима/изворима контаминације, дистрибуцији, динамици и путевима трансмисије, преживљавању и перзистенцији *Listeria monocytogenes*, како у природном хабитату, тако и у фармском, односно процесном окружењу.

Кључне речи: *Listeria monocytogenes*, екологија, зоонозе

УВОД

Listeria monocytogenes преживљава у различитим хабитатима (природни – земљиште, површинске воде, трулежна вегетација; окружење фарме и процесно окружење), али се препознаје и као узрочник инфекција људи и животиња. Према најновијем Извештају о зоонозама (EFSA, 2021), на подручју Европске Уније у 2019. години, бележи се 2.621 потврђен случај инвазивне листериозе људи, уз високу стопу mortalитета (17,6%). Од посебног је значаја чињеница да се из контаминираних хране изолују хипервирулентни сојеви *Listeria monocytogenes*.

Убиквитарна природа овог опортунистичког патогена као и присуство многобројних ниша раста у производном окружењу могу успоставити перзистентне, тзв. „in-house“ сојеве *Listeria monocytogenes*, када током и након производње долази до контаминације хране. Како се *Listeria monocytogenes* инактивише режимима термичке обраде примењивим у производњи хране спремне за конзумирање, највећи значај има накнадна, тзв. постпроцесна контаминација. У контроли овог вида контаминације, примењују се различити приступи: строга и доследна примена мера добре хигијенске и добре произвођачке праксе, стандардне радне процедуре санитације, технологија асептичног паковања, тзв. „постлетални“ третмани током фазе паковања или реформулација састава производа на начин да матрикс хране не подржава раст *Listeria monocytogenes*, и/или додаток антимикробног агенса. Ипак, за успешну контролу овог узрочника у континууму

ланца хране, потпуније разумевање екологије *Listeria monocytogenes* је од пресудне важности. Примена новијих молекуларних метода субтипизације, које се заснивају на секвенционисању генома, омогућава састављање целине, пружајући објективне податке о дистрибуцији *Listeria* spp. као и преживљавању и перзистенцији *Listeria monocytogenes* у различитим екосистемима, изворима контаминације, динамици и путевима трансмисије.

Dr Jekyll и Mr Hyde особеност („personality“) *Listeria monocytogenes*

Gray и сар. (2006), двоструки живот *Listeria monocytogenes*, сликовито описују као *Dr Jekyll* и *Mr Hyde* особеност („personality“). *Listeria monocytogenes* сапрофитира у земљишту и трулежној вегетацији (*Dr Jekyll*), док у свом другом животу, као интрацелуларна патогена бактерија може проузроковати озбиљне инфекције људи и многих врста животиња (*Mr Hyde*). Трансформација из једне у другу фазу посредована је сложеним путевима регулације, који модулирају експресију фактора вируленције као одговор на промене у непосредном окружењу *Listeria monocytogenes*. Мало се зна о мирној егзистенцији *Listeria monocytogenes*. Секвенционисање генома указује на многе продукте гена који омогућавају искориштавање различитих извора угљеника, укључујући и шећере биљака. Приступ изворима храњивих материја олакшава експресија флагела као и покретљивост на температурама испод 30°C (репресија ове активности при 37°C). Робусна природа *Listeria monocytogenes* осликава се и у способности преживљавања у неповољним условима средине (ниска температура, високи осмоларитет, повећана концентрација NaCl).

Могуће је да егзистирање *Listeria monocytogenes* изван ћелија домаћина сисара не подразумева искључиво и потпуно миран и спокојан „сеоски“ живот, већ сталну територијалну битку са другим једноћелијским и вишећелијским организмима, који „вребају“ у околини. Иако се *Listeria monocytogenes* уобичајено изолује из извора у околини, бактерија пажљиво одржава велики арсенал гена чији продукти омогућавају преживљавање унутар ћелије домаћина сисара. Одржавање ових гена у организму убиквитарне нарави, сугерише могућност да улога ових гена није искључиво инвазија и опстанак унутар ћелија сисара, већ и могућа интеракција са другим еукариотским организмима у околини, који би могли послужити као примарни резервоар *Listeria monocytogenes*. До сада, такав резервоар није идентификован, мада постоји размишљање да протозое (*Acanthamoeba* spp.) могу представљати везу између екологије и патологије *Listeria monocytogenes* (Schuppler, 2014). *Acanthamoeba* spp. се дуги низ година, проучавају као модел еукариотске ћелије. Хране се мањим органским честицама, бактеријама, гљивицама, алгата, па чак и другим протозоама. Сматрају се главним конзументима бактерија, одговорним за редукцију (и до 60%) укупне популације бактерија у земљишту и другим природним екосистемима. Услед сличности са макрофагима, слободно живуће амебе, разматрају се као потенцијални резервоар *Listeria monocytogenes*, где би, сликовито говорећи, листеријама послужиле као полигон за обуку у разradi патогености (интрацелуларно преживљавање и пролиферација). Међутим,

резултати многих студија показују да *Listeria monocytogenes* не преживљава унутар фагозома *Acanthamoeba* spp. и тиме ове протозое не могу имати улогу резервоара *Listeria monocytogenes*. Парадокс се састоји у томе да иако *Listeria monocytogenes* не преживљава дигестију од стране *Acanthamoeba* spp., ипак, раст у ко-култури ова два ентитета, промовише раст листерија. Претпоставка је да *Listeria monocytogenes* има способност да искористи метаболите секретоване од стране *Acanthamoeba* spp. Имајући у виду могући синергистички ефекат, уз чињеницу да се амебе изолују из краставаца, купуса, зелене салате, целера, шаргарепе, ротквице, печурки, карфиола и спанаћа, те да се богата заједница протозоа (амебе, цилијата и флагелата) утврђује у процесном окружењу (погони за прераду меса) (Vaerewijck и сар., 2008), али и у домаћинствима (фрижидери) (Vaerewijck и сар., 2010), јасно је да оваква врста интеракције може имати значајне импликације по безбедност хране и здравље људи.

Експресија оних гена *Listeria monocytogenes* који су одговорни за механизам патогенезе (инвазија, преживљавање и репликација унутар ћелије домаћина, укључујући макрофаге и непрофесионалне фагоците) регулисани су од стране транскрипционог активатора, познатог под именом позитивни регулаторни фактор А (PrfA) (Milohanic и сар., 2003). Сојеви *Listeria monocytogenes*, којима недостаје функционални PrfA, у животињским моделима показују ослабљену вируленцију (атенуираност). Познато је да PrfA егзистира у високо и нискоактивираним стањима, и прелазак из једног у друго стање, што одговара активацији, односно репресији транскрипције, условљен је сигнаlima из околине. Раст у богатом храњивом медијуму, или у медијуму обогаћеном брзо доступним угљеним хидратима (глукоза, фруктоза, целобиозе – уобичајени угљени хидрат биљака), инхибише транскрипцију PrfA – зависних гена вируленције. Супротно овоме, фосфорилисани шећери, присутни у цитосолу ћелија сисара, као и низак садржај гвожђа, подржавају раст *Listeria monocytogenes*, без инхибиције експресије фактора вируленције.

Ван организма домаћина сисара (еукариотске ћелије), *Listeria monocytogenes*, одржава личност *Dr Jekyll* репресијом продукције и активности PrfA кроз одговарајуће транскрипционе, посттранскрипционе и посттранслационе механизме. У тренутку када бактерија бива ингестирана од стране домаћина сисара, повишена температура и изложеност ниским рН вредностима (желудачни сок), стимулише повећану производњу протеина одговора на стрес, интерналина и PrfA, што условљава транзицију ка личности *Mr Hyde* (вирулентни стадијум). У цревима, интерналин А посредује у приљубљивању на и инвазији епителних ћелија. Ниска концентрација гвожђа и угљених хидрата у вакуоли фагозома условљава репресију продукције интерналина, али промовише PrfA зависну активацију промотора одговорних за производњу цитолизина листериолизина, који доводе до лизе фагоцитне вакуоле и преласка листерија у цитосол ћелије. У цитосолу се и завршава потпуна трансформација *Dr Jekyll* у *Mr Hyde* личност, где висок ниво активног PrfA протеина омогућава транскрипцију одговарајућих промотора, што у

крајњем исходу има за резултат производњу ActA протеина и фосфолипазе, односно интрацелуларну покретљивост и ширење листерија на околне ћелије.

Генетичка популациона структура *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes насељава различите еколошке нише (природни хабитат, фармско окружење, животиње, храна, људи), и преживљава кроз дужи временски период у неповољним условима средине. Из ових разлога, веома је тешко утврдити изворе контаминације и пратити путеве трансмисије, те епидемиологија многих случајева листериозе људи остаје неразјашњена. На срећу, развој и примена молекуларних метода субтипизације омогућује генерисање великог броја података, чијом анализом и правилном интерпретацијом, добијамо потпунију слику о екологији *Listeria monocytogenes*. Методе које се уобичајено користе у типизацији изолата *Listeria monocytogenes* подразумевају риботипизацију и електрофорезу у пулсирајућем пољу (енгл. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Код ових метода, применом рестрикционих ендонуклеаза врши се дигестија бактеријске ДНК и генеришу фрагменти одговарајуће величине (енгл. *DNA fragment size-based subtyping methods*). Међутим, и поред постојања софтвера за анализу података, ове методе је веома тешко стандардизовати. Поред тога, мада се користе за анализу кластера, генерално не пружају информације о примарним генетичким карактеристикама (нуклеотидна секвенца) изолата, те примена ових метода није оправдана у сврху филогенетских анализа. Код ДНК метода заснованих на секвенционисању (енгл. *DNA sequencing-based methods*), потпуна или делимична нуклеотидна секвенца је одређена за један (енгл. *single locus approach*) или више бактеријских гена или хромозомалних регија. Применом ових метода добијају се објективни подаци који се могу искористити за утврђивање еволутивне сродности (филогенија). Од ових метода, најчешће се примењује метода секвенционисања више локуса (енгл. *Multi Locus Sequence Typing - MLST*), као и мултилокус ензимска електрофореза (енгл. *Multilocus Enzyme Electrophoresis - MLEE*). У новије време, секвенционисање читавог генома (енгл. *Whole Genome Sequencing - WGS*), посебно секвенционисање више локуса унутар оног дела генома кога деле сви сојеви једне врсте и који није подложен мутацијама (енгл. *core genome MLST - cgMLST*), са великим успехом се примењује у епидемиолошкој типизацији *Listeria monocytogenes*.

Молекуларна анализа великог броја изолата из различитих извора и географских подручја током последњих 90 година потврђује генетичку хетерогеност врсте *Listeria monocytogenes* и наглашава клоналну структуру популације. Садашња класификација подразумева четири главне филогенетске линије (лозе) (I-IV) (енгл. *lineages*), више од 14 серотипова (Rodriguez и сар., 2021) и четири PCR серогрупе (мултиплекс ланчана реакција полимеразе за амплификацију 4 специфична маркер гена; добра корелација са серотиповима *Listeria monocytogenes*: 1/2a-3a; 1/2b-3b-7; 1/2c-3c и 4b-3b-7). Свака од линија подразумева специфичне серотипове. Линија I садржи серотипове 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e и 7, линија II серотипове 1/2a, 1/2c, 3a и 3c, линија III серотипове 4b, 1/2a, 4a и 4c и линија IV серотипове 4a и 4c. Серотипови

линије III и IV ретко се изолују и углавном се доказују код преживара. Већина изолата који се доказују у случајевима листериозе људи чини кластер унутар линије I (серотипови 1/2b, 3b, 4b) и линије II (серотипови 1/2a, 1/2c, 3a), уз јасну доминацију серотипова 4b (највећи број клиничких изолата), 1/2a (највећи број изолата пореклом из процесног окружења) и 1/2b. Ради се о генетички сродним сојевима, односно специфичним клоналним групама, глобално дистрибуисаним, који се, према једном систему номенклатуре, представљају као епидемијски клонови. Епидемијски клонови (енгл. *Epidemic Clones - ECs*) се дефинишу као група генетички сродних изолата имплицираних у случајевима било једне засебне епидемије или географски и временски неповезаних случајева епидемија листериозе, а воде порекло од заједничког претка (Cantinelli i sar., 2013). До сада је идентификовано 11 епидемијских клонова (ECI – ECXI) (Filipello i sar., 2017) Други систем номенклатуре представља клоналне комплексе (енгл. *Clonal Complex - CC*), на основу примене MLST типизације. Ова метода генотипизације се заснива на разликама нуклеотидних следова (секвенци) седам конститутивно експримисаних гена (енгл. *housekeeping gene*), који кодирају ензиме одговорне за различите видове интермедијарног метаболизма бактерије. „*Housekeeping*“ гени се споро мењају те добијени резултати имају већи значај у популационој генетици него у епидемиологији. У случају када се за секвенционисање бирају гени који нису „*housekeeping*“, MLST се примењује и у епидемиолошкој типизацији. Оваквим приступом у типизацији, сваком препознатом алелу у pubMLST бази података додељује се алелни број, те на основу комбинације седам алелних бројева, база препознаје један тип нуклетидног следа, који се означава као секвенциони тип (енгл. *Sequence Type - ST*). Овом методологијом сојеви се класификују на секвенционе типове (јединствена асоцијација алела из седам *housekeeping* гена), односно на клоналне комплексе, који подразумевају групу два или више независних изолата, који деле исте алеле на пет или више генских локуса (кластери секвенционих типова), а воде порекло од истог изходног претка. Типови секвенци (ST) постављају се у одговарајући клонални комплекс аналитичким програмом BURST (енгл. *Based Upon Related Sequence Types*). BURST анализа најприје одређује групе повезаних генотипова у популацији, представљених у pubMLST бази података те покушава препознати утемељитељски генотип, тј. ST сваке групе. Алгоритам потом предвиђа потомке утемељитељског генотипа, приказујући резултат у облику радијалног дијаграма с предвиђеним утемељитељем у средишту круга. Дефиниција групе полази од претпоставке да је сваки ST подударан с другим ST у групи у односу пет и више локуса.

Резултати студија показују да клинички изолати и изолати *Listeria monocytogenes* пореклом из хране представљају засебне, мада често преклапајуће популације (Gray и сар., 2004). Разлике између ове две популације се првенствено испољавају у потенцијалу вируленције. Протеин интерналин А, кодиран од стране гена *inlA*, представља значајан фактор вируленције *Listeria monocytogenes*, одговоран за инвазију интестиналних епителних ћелија. Интересантно запажање је чињеница да се код изолата *Listeria monocytogenes* утврђују мутације, које за последицу имају

синтезу скраћене форме овог протеина (превремена терминација елонгације аминокиселинског ланца услед превременог убацивања терминационог стоп кодона у след нуклеотида структуралног гена), тзв. „окрњени“ протеин (енгл. *truncated protein*). Изолати *Listeria monocytogenes*, који носе ове мутације, карактеришу се ослабљеном вируленцијом и уобичајено се доказују код серотипова линије II, 1/2a, 1/2c, што представља и могуће објашњење зашто се исти серотипови далеко мање изолују у клиничким случајевима хумане листериозе. Мада се серотипови 1/2a и 1/2c чешће изолују из хране, погрешно би било закључити да су, конзумацијом контаминираних хране, људи искључиво изложени субпопулацији атенуираних листерија. Наиме, из матрикса хране се изолују и вирулентни сојеви, укључујући и епидемијске, хипервирулентне клонове.

Применом молекуларних метода субтипизације идентификују се хипервирулентни MLST клонови *Listeria monocytogenes* са високом клиничком фреквенцијом (CC1, CC2, CC4 и CC6) (Maury и сар., 2016). Изолати *Listeria monocytogenes* који припадају CC1 комплексу у високој преваленцији се утврђују у случајевима ромбоенцефалитиса код преживара (Dreyer и сар., 2016), док анализа узорака фецеса говеда и оваца показује преваленцију 46 серотипа (CC1 комплекс) (Esteban и сар., 2009). Приказани резултати показују не само високу вируленцију овог клона у односу на говеда, већ добро аргументују чињеницу да говеда могу послужити као значајан резервоар хипервирулентних клонова *Listeria monocytogenes* и путем фецеса расејавати исте у окружењу фарме. Супротно овоме, CC9 и CC121 пореклом су из хране, хиповирулентног су карактера, и изазивају инфекције углавном код високо имунокомпромитоване субпопулације људи, што се барем делимично објашњава мутацијама које за крајњи исход имају синтезу нефункционалног протеина интерналина А. Поред тога, утврђено је да CC121 перзистира у објектима за производњу хране (Ortiz и сар., 2016).

Веома интересантно истраживање спровели су Maury и сар. (2019). Аутори су тражили везу између појединих клонова (CC) *Listeria monocytogenes* и одређене категорије хране. Резултати ове студије су показали да су хипервирулентни клонови (CC1, CC4 и CC6) повезани са производима од млека, док се хиповирулентни клонови (CC9 и CC121) изолују из производа од меса и у већој преваленцији показују резистенцију на стрес и толеранцију на бензалконијум-хлорид. Уочена разлика у дистрибуцији клонова у односу на категорију хране указује на разлике у модалитету контаминације (млеко vs месо), као и на различитост нише (адаптација клонова на различите услове средине). Месо је иницијално физиолошки стерилно, те се контаминација производа од меса са *Listeria monocytogenes* дешава током прераде и складиштења. Контаминација млека се дешава пре (примарна контаминација) и/или током muže (секундарна контаминација). Ова хипотеза је подржана запажањем да клонови CC9 и CC121 представљају најмање заступљене клонове у производима од сировог млека, док у пастеризованом млеку представљају други (CC9), односно седми (CC121) најчешће заступљени клон. Хипервирулентни клонови боље колонизују лумен интестинума и инвадирају ткива домаћина, што указују да су исти клонови адаптирани на

организам домаћина. Супротно овоме, хиповирулентни клонови су адаптирани на процесно окружење где могу и перзистирати кроз дужи период на основу веће резистенције на стрес и толеранције на бензалконијум-хлорид, али и способности стварања биофилма при сублеталним концентрацијама бензалконијум-хлорида. Поред хипер и хиповирулентних клонова, из матрикса хране изолују се и тзв. интермедијарни клонови (СС2 и СС6), који су у транзицији од стадијума адаптације на домаћина ка сапрофитској форми живота, губитком фактора вируленције, а усвајањем гена који су одговорни за толеранцију на дефицијенсе. Поред тога, код хиповирулентних клонова утврђује се већа преваленција гена укључених у процесе репликације, рекомбинације и поправке генетичких оштећења, што указује на могућу већу изложеност ових клонова генотоксичним условима. С друге стране, већа преваленција гена укључених у процесе биогенезе ћелијског зида и мембране код хипервирулентних клонова *Listeria monocytogenes* указује на могућу селекцију оних гена који су задужени за интеракцију са домаћином.

***Listeria monocytogenes* у природним хабитатима**

Још од времена пионирског рада Welshimer (1960), постоји сагласност научне заједнице да земљиште представља нишу од прворазредног значаја у преносу *Listeria monocytogenes* на биљке и животиње. Земљиште је састављено од органске материје, минерала, корена биљака и комплексне биоте, укључујући микроорганизме, вирусе, мезофауну и макрофауну. Сви ови фактори су међусобно повезани и у сталној интеракцији, те земљиште представља сложена средину у динамичном еквилибријуму. Из овог разлога, дешифровање оних фактора који условљавају преваленцију *Listeria monocytogenes* у земљишту је веома тешко. Састав земљишта, присутне микробне заједнице и макрофауна, расположивост слободне воде, и, према истраживањима новијег датума (Locatelli и сар., 2013; McLaughlin и сар., 2011) посебно рН вредност земљишта, интринзични су фактори који одређују судбину *Listeria monocytogenes* у земљишту. Пољопривредна пракса (силирање контаминираних усева, рециклирање органског ђубрива без претходно примењених процедура санитације), метеоролошке прилике, близина површинских вода, фарми млечних крава, саобраћајница и урбаних средина, представљају екстринзичне факторе. Пластичност генома *Listeria monocytogenes*, са широким репертоаром гена који кодирају транспортне и регулаторне протеине, што указује на огромну способност адаптације и перзистенције овог узрочника, додатни је фактор одговоран за хабитацију *Listeria monocytogenes* у земљишту. Велики део гена (26%), који кодирају транспортне протеине, усмерен је на транспорт угљених хидрата путем фосфоенлапируват зависних фосфотрансферних система. Тиме је омогућено искориштавање различитих извора угљеника, што представља предност и већу компетитивност у условима селективног притиска који се неминовно успоставља у овако густо насељеним екосистемима. Дивље животиње, укључујући сисаре и птице, могу се сматрати потенцијалним зоонотским резервоаром *Listeria monocytogenes* и имају улогу у трансферу овог микроорганизма на земљиште. Земљиште обрађених поља и пашњака може послужити као вектор *Listeria*

monocytogenes на култивисане усеве и фармске животиње, посебно говеда и мале преживаре, који тада служе као значајан резервоар листерија.

Мада резултати спроведених испитивања указују на генералну заступљеност *Listeria monocytogenes* у узорцима земљишта, ниво контаминације је низак (Locatelli и сар., 2013; Dowe и сар., 1997).

Убиквитарна природа *Listeria monocytogenes* и *Listeria* spp., као и чињеница да се површински водотокови користе за испуштање отпадних вода из канализације, за последицу имају присуство ових микроорганизама у многим површинским водама, укључујући језера, реке и потоке. До данас, епидемиолошки подаци не потврђују директну инфекцију људи путем контаминиране воде, услед ниског нивоа контаминације, мада контаминиране површинске воде имају улогу у расејавању листерија на шира географска подручја.

Природна средина може послужити као извор, мада не неопходно и као резервоар сојева *Listeria monocytogenes*. Haydon и сар. (2002) дефинишу резервоар инфекције као једну или више епидемиолошки повезаних популација или средина у којима се патогени микроорганизам перманентно одржава и одакле се инфекција „прелива“ на циљну популацију. Иако изгледа могуће да природна средина, пре свега земљиште, представља резервоар за одређене субтипове *Listeria monocytogenes* који проузрокују инфекције животиња, остаје неразјашњено да ли преживари представљају праву „target“ популацију или се листерије могу несметано одржавати у екосистему без потребе да проузрокују инфекције животиња. Наиме, према једној од хипотеза, *Listeria monocytogenes* може бити „случајни“ патоген људи и фармских животиња (тзв. „dead-end“ домаћини), што, у том случају, нема посебног значаја за преживљавање ове врсте микроорганизама. Према истом сценарију, преживљавање *Listeria monocytogenes* у природним срединама, укључило би могуће, до сада, неидентификоване домаћине (протозое, ниже вертебрате), а егзистенција у овим домаћинима би била од критичне важности за еволуциони успех ове бактеријске врсте.

***Listeria monocytogenes* у силажи**

Резултати бројних студија потврђују повезаност између исхране силажом и случајева листериозе говеда и оваца. У силажи доброг квалитета, припремљеној од траве, кукуруза, житарица од целог зрна и легуминоза, успостављају се анаеробни услови који промовишу раст и размножавање аутохтоно присутних или инокулисаних бактерија млечне киселине (БМК). Оптимални услови раста омогућавају да се у току 48 часова оствари број БМК од 10^9 CFU/g. Метаболичка активност БМК преводи биљне шећере у млечну киселину, што за последицу има пад рН вредности (рН вредност добро конзервисане силаже износи <4,5). Кисели услови средине инхибишу раст микроорганизама квара и *Listeria* spp. За квалитет силирања и саме силаже од пресудног је значаја да се силирање спроведе при оптималном садржају суве материје у биљци. Оптималан садржај суве материје у маси за силирање је изнад 40% код легуминоза, око 30% код силирања у силосу и око 40% у балама. Силажа с високим садржајем суве материје има више рН

вредности, али нижи садржај слободне воде у таквој силажи инхибише раст листерија. Травна силажа у хладнијим, влажним климатским подручјима, има нижи садржај шећера и већи садржај воде, што може успорити процес ферментације, те је таква силажа подложнија расту листерија. Резултати испитивања Dijkstra (1971) показују да *Listeria monocytogenes* може преживети четири до шест година у природно контаминисаној силажи.

Listeria monocytogenes се уобичајено утврђује у балираној силажи услед високе рН вредности и аеробних цепова, насталих као последица оштећења пластичног омота или недовољног броја слојева омотача (Nucera и сар., 2016). Како би се предупредио ризик ове врсте, потребно је користити висококвалитетне полиетиленске растезљиве фолије, повећати број слојева омотача, али и проверити рН вредност пре употребе у сврху контроле контаминације ($\leq 4-4,5$). У студији Pauly и Tham (2003), *Listeria monocytogenes* није утврђена у узорцима нетретиране силаже након 90 дана складиштења, чак и при рН вредности 4,9 и више. Резултати ове студије указују да време складиштења може бити један од значајних фактора за редукцију броја *Listeria monocytogenes* и у комбинацији са оптималном ферментацијом представља ефикасну меру у контроли раста *Listeria monocytogenes*. У контроли раста *Listeria monocytogenes* у силажи успешно се примењује и додатак мравље киселине, бактерија млечне киселине, односно бактериоцина, продукованих од стране *Streptococcus bovis* HC5 и *Pediococcus acidilactis* (Mantovani и Russell, 2003).

***Listeria monocytogenes* на фармама и у фармском окружењу**

Прекомеран број животиња у зимском периоду, током кога бораве у затвореним објектима, поспешује ширење *Listeria monocytogenes* међу животињама, али и контаминацију површина, укључујући хранилице, корита за воду и пољопривредно земљиште, где се као органско ђубриво користи стајњак. Успостављање заштитних зона дуж површинских водотокова у непосредном окружењу фарме, унутар саме фарме, као и тампон зона око фарме, показало се као ефикасна мера у смањењу контаминације.

Вода је идентификована као значајан извор контаминације *Listeria monocytogenes* на фармама музних крава. *Listeria monocytogenes* је утврђена у цевима и коритима за воду (штала), појилицама, али и каналима за наводњавање. Напајајући се контаминисаном водом, краве постају вектори расејавања листерија на фарми и у непосредном окружењу фарме и тиме се циклус сталних бактеријских инфекција наставља.

Како је земљиште контаминирано са *Listeria monocytogenes*, не изненађују чињеница да радне чизме фармера, ветеринара или посетиоца фарме могу имати улогу у расејавању бактерија (Schoder и сар., 2013).

Као материјал за простирку животиња користи се сено, пиљевина, свежи и рециклирани песак, калцијум карбонат, а у новије време и рециклирани стајњак. Имајући у виду екскрецију *Listeria monocytogenes* путем фецеса, у условима нередовног изђубравања, очекивана је висока преваленција *Listeria monocytogenes* у

узорцима простирке (Bradley и сар., 2018), иако се ова контаминација нужно не мора односити на налаз *Listeria monocytogenes* у млеку.

Описано је постојање перзистентних ниша *Listeria monocytogenes* на површинама унутар фарме (подови, површине за храњење, површине танкова за воду), што додатно повећава оралну изложеност животиња овој бактерији (Castro и сар., 2018). Недовољна осветљеност измузишта, што онемогућава правилно спровођење чишћења и дезинфекције, способност *Listeria monocytogenes* да на различитим површинама, укључујући пластичне, гумене и површине од нерђајућег челика, посебно на хранилицама, које су иначе склоне хабању, али и на опреми за мужу, ствара биофилм, додатно усложњава ситуацију на фарми, и пружа могућност успостављања многоструких извора контаминације.

У опсежној студији Latoige и сар. (2009), сојеви *Listeria monocytogenes* изоловани из збирног млека, филтера у систему млековода, опреме за мужу, фецеса крава, али и из узорака простирке, стајаће воде, птица, измета птица, измета дивљих животиња, инсеката, изложени су молекуларној субтипизацији у циљу утврђивања потенцијалних извора контаминације збирног млека. Резултати испитивања указују да је присуство *Listeria monocytogenes* у млеку иницијално условљено фекалном контаминацијом или контаминацијом из околине вимена, али се потом одређени, специфични сојеви издвајају и перманентно успостављају у одговарајућим нишама система за мужу у форми биофилма, када је могућа стална и понављана контаминација збирног млека.

Nightingale и сар. (2004) претпостављају следећи могући сценарио трансмисије *Listeria monocytogenes* на фарми музних крава: иницијална контаминација усева и земљишта путем водотокова, дивљих животиња, птица и кориштењем стајњака за ђубрење култивисаних површина. Мада фармске животиње могу бити директно изложене *Listeria monocytogenes* из земљишта и усева током паше, у овом случају, ради се о ниском нивоу контаминације, недовољном да изазове инфекцију. С друге стране, силажа лошег квалитета, неадекватно конзервисана (pH >5,05,5), и при том контаминисана, омогућава размножавање *Listeria monocytogenes* до високог броја и сасвим вероватно представља уобичајени пут инфекције фармских животиња. У истој студији, значајно већа преваленција *Listeria monocytogenes* се утврђује у узорцима фецеса музних крава у поређењу са узорцима земљишта, воде (фармско окружење) и хране за животиње. Аутори, сходно добијеним резултатима, закључују да говеда, као домаћини, амплификују *Listeria monocytogenes* ингестирану кроз контаминисану силажу, и на тај начин представљају критични фактор у одржавању контаминације високог нивоа на фарми. Расејавањем *Listeria monocytogenes* путем фецеса клинички оболелих животиња и/или асимптоматских клицоноша, долази до контаминације непосредног окружења животиња и циклус фекално-оралне трансмисије се наставља.

Мужа и контаминација сировог млека

Примарна контаминације млека подразумева субклинички маститис, где се као узрочни агенс идентификује *Listeria monocytogenes*. Мада је преваленција листериозног маститиса ниска, и тиме овај пут контаминације млека од мањег значаја, испитивање Рарић и сар. (2019) показује супротно. Резултати спроведене студије указују да се субклинички маститис не може занемарити као извор контаминације сировог млека са *Listeria monocytogenes*, тим више што је применом молекуларних метода субтипизације утврђено да ови изолати припадају хипервирулентним клоновима СС2 и СС4. Са изузетком ове студије, већина аутора се слаже да је контаминација млека са *Listeria monocytogenes* углавном резултат секундарне контаминације (контаминација површине вимена фекалним материјалом или из околине), односно резултат стварања биофилма у линији система за мужу.

Listeria monocytogenes је утврђена у танковима за збирно млеко и у млекоматима са преваленцијом од 0,5% и при нивоу контаминације <10 CFU/ml (Dalzini и сар., 2016). Иако је преваленција и концентрација *Listeria monocytogenes* ниска, присуство ове бактерије у сировом млеку се ипак сматра ризиком по здравље људи, посебно уколико је сирово млеко намењено за прераду у производе без спровођења термичке обраде. Контаминација млека у танку за збирно млеко служи као извор контаминације за осталу количину млека, која током муже доспева у танк.

Филтери који се постављају у линији за мужу значајан су индикатор контаминације млека са *Listeria monocytogenes*. Лоша хигијена муже повећава количину грубе нечистоће на филтерима, што фаворизује задржавање *Listeria monocytogenes* у слоју нечистоће, те се филтери сматрају далеко осетљивијим индикаторима присуства бактерије у систему муже (збирно млеко), него сами узорци млека (Giacometti и сар., 2012). „Screening“ филтера представља добар метод за утврђивање проблема у хигијени и санитацији и то не само на нивоу муже већ и у непосредном окружењу животиња. У студији Castro и сар. (2018) *Listeria monocytogenes* је у већој преваленцији утврђена у узорцима филтера него у узорцима збирног млека, што указује да низак ниво контаминације у узорцима збирног млека пролази незапажено, док се број листерија концентрише и детектује на нивоу филтера. Иако „screening“ филтера повећава вероватноћу детекције *Listeria monocytogenes* на нивоу фарме, ипак није добар индикатор присуства *Listeria monocytogenes* у збирном млеку.

Listeria monocytogenes у процесном окружењу

Сматра се да је присуство *Listeria monocytogenes* у процесном окружењу примарни фактор одговоран са накнадну, тзв. постпроцесну контаминацију током производње хране. Утврђено је да *Listeria monocytogenes* перзистира годинама или чак деценијама у производним погонима (Ferreira и сар., 2014). У ширем смислу, перзистенција се дефинише као преживљавање (обично без раста) патогених микроорганизама кроз дужи временски период било у матриксу хране, било у једноставном дефинисаном матриксу (земљиште, вода, површине од нерђајућег

челика), али и у комплексним природним срединама или пак срединама генерисаним активношћу човека (производни погони). У практичним условима, перзистенција представља понављану изолацију кроз дужи временски период, а у различитим временским интервалима. одређених сојева *Listeria monocytogenes*, за које се применом фенотипских и генетичких метода утврди да припадају идентичним субтипovima. Оно што није јасно дефинисано јесте захтевана фреквенција понављаних изолација, како би се права перзистенција разликовала од случајно очекиване изолације. Поред тога, метода субтипизације, са ограниченом моћи дискриминације, не мора се показати ефикасном у одређивању перзистенције истог субтипа кроз понављано узорковање. Исто тако, велики изазов представља разликовање праве перзистенције од понављаног поновног увођења одређених субтипова *Listeria monocytogenes* у производно окружење, што није неочекивано услед многоструких извора и путева контаминације. Изолација истог субтипа кроз понављано узорковање у производном погону, који користи контролисану и микробиолошки исправну сировину, примењује принципе хигијенског дизајна и добре произвођачке праксе, успоставља ригорозне мере чишћења и дезинфекције, врло вероватно указује на праву перзистенцију. Супротно овоме, у погонима у којима се не поштују наведене мере, понављана изолација истог субтипа, поготово у ситуацији када се за субтипизацију користе методе ограничене моћи дискриминације, може указивати на перзистенцију, али и на поновно и понављано увођење *Listeria monocytogenes* из непосредног окружења производне линије. У основи перзистенције одређених субтипова *Listeria monocytogenes* стоји способност стварања биофилма, физиолошка толеранција на средства за санитацију или баријере које се успостављају током процеса производње и прераде хране, односно појава посебне субпопулације тзв. перзистер ћелија. Биофилм се састоји од ћелија и екстрацелуларног полимерног материјала, који штити ћелије од стреса и поспешује интеракције између ћелија у односу на хранљиве материје, токсичне метаболите и генетички материјал, што за крајњи исход има побољшано преживљавање и раст бактеријских ћелија. Мада резултати многих студија указују да изолати *Listeria monocytogenes*, у зависности од соја, типа површине и температуре, показују способност стварања биофилма у производном погону, Ferreira и сар. (2014) закључују да јасан доказ о стварању биофилма изостаје. Могуће је да *Listeria monocytogenes* опстаје као део биофилма формираног од стране више врста бактерија. Један од могућих механизма перзистенције *Listeria monocytogenes* јесте и толеранција на средства за дезинфекцију погона. Међутим, док поједине студије потврђују да су перзистентни сојеви мање осетљиви на дезинфицијенсе, друге студије не проналазе ову врсту корелације.

Дормантна природа перзистер ћелија побољшава способност преживљавања *Listeria monocytogenes* у условима стреса. Успостављање перзистер субпопулације *Listeria monocytogenes* представља стратегију дугорочног преживљавања листерија у неповољним условима средине, а транзиција у ово стање је праћена променом морфологије ћелије – прелазак из бацила у коке. Knudsen и сар. (2013) извештавају да велики број сојева *Listeria monocytogenes*, изолованих из клиничких случајева и

епидемија листериозе, као одговор на примењене антибиотике, показује бифазичну популацију, карактеристичну за популације са перзистер субпопулацијом. Исти аутори истичу могућност да субпопулација перзистер ћелије омогућује заштиту *Listeria monocytogenes* током чишћења и дезинфекције у производним погонима.

Резултати испитивања Magalhaes и сар. (2016) показали су да се сојеви *Listeria monocytogenes*, учестало изоловани током четворогодишњег периода из погона за производњу сирева, у условима повишене концентрације NaCl и умерене киселости, карактеришу краћом lag фазом и бржом стопом раста, у односу на сојева који се спорадично изолују. Разлика у осетљивости ове две групе изолата *Listeria monocytogenes*, у односу на средства за санитацију, није уочена.

ЗАКЉУЧАК

Listeria monocytogenes је убиквитарна бактерија са способношћу колонизације многих ниша, али и узрочни агенс озбиљних инфекција људи и животиња. Фарме музних крава се препознају као значајан резервоар *Listeria monocytogenes*, чак и оних генотипова који се препознају као узрочни агенс у епидемијама листериозе људи. Екологија *Listeria monocytogenes* у фармском окружењу је веома сложена и, упркос напорима научне заједнице, недовољно разјашњена. Примена нових метода молекуларне субтипизације (секвенционе методе) пружа могућност утврђивања извора контаминације и праћење путева трансмисије *Listeria monocytogenes*, како би се смањио тзв. контаминациони притисак (енгл. „contamination pressure“) на нивоу фарме и успоставиле ефикасне контролне мере.

Захвалница

Рад је подржан средствима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Уговор број 451-03-9/2021-14/200143).

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

ЛИТЕРАТУРА

- Bradley A. J., Leach K. A., Green M. J., Gibbons J., Ohnstad I. C., Black D. H., Payne B., Prout V. E., Breen J. E. (2018): The impact of dairy cows' bedding material and its microbial content on the quality and safety of milk - a cross sectional study of UK farms. *International Journal of Food Microbiology*, 23(269): 36-45.
- Cantinelli T., Chenal-Francisque V., Diancourt L., Frezal L., Leclercq A., Wirth T. (2013): "Epidemic clones" of *Listeria monocytogenes* are widespread and ancient clonal groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 51:3770-3779.
- Castro H, Jaakkonen A, Hakkinen M, Korkeala H, Lindstrom M. (2018): Occurrence, Persistence, and Contamination Routes of *Listeria monocytogenes* Genotypes on Three Finnish Dairy Cattle Farms: a Longitudinal Study. *Applied Environmental Microbiology*, 84(4): e02000-17.

- Dalzini E., Bernini V., Bertasi B., Daminelli P., Losio M.-N., Varisco G. (2016): Survey of prevalence and seasonal variability of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk from Northern Italy. *Food Control*, 60:466-470.
- Dijkstra R. G. (1971): Investigations on the survival times of *Listeria* bacteria in suspensions of brain tissue, silage and faeces and in milk. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 216:92-95.
- Dowe M. J., Jackson E. D., Mori J. G., Bell C. R. (1997): *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. *Journal of Food Protection*, 60(10):1201-1207.
- Dreyer M., Aguilar-Bultet L., Rupp S., Guldimann C., Stephan R., Schock A., Otter A., Schüpbach G., Brisse S., Lecuit M., Frey K., Oevermann A. (2016): *Listeria monocytogenes* sequence type 1 is predominant in ruminant rhombencephalitis. *Scientific Reports*, 6:36419.
- EFSA. (2021): The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(2):e06406.
- Esteban J. I., Oporto B., Aduriz G., Juste R. A., Hurtado A. (2009): Fecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Veterinary Research*, 5(2).
- Ferreira V., Wiedmann M., Teixeira P., Stasiewicz M. J. (2014): *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*, 77(1):150-170.
- Filipello V., Gallina S., Amato E., Losio M. N., Pontello M., Decastelli L. (2017): Diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* within the Gorgonzola PDO production chain and comparison with clinical isolates from the same area. *International Journal of Food Microbiology*, 245:73-78.
- Giacometti F., Serraino A., Finazzi G., Daminelli P., Losio M. N., Arrigoni N., Piva S., Florio D., Riu R., Zanoni R. G. (2012): Sale of Raw Milk in Northern Italy: Food Safety Implications and Comparison of Different Analytical Methodologies for Detection of Foodborne Pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(4):293-297.
- Gray M. J., Freitag E. N., Kathryn J. Boor K. J. (2006): How the Bacterial Pathogen *Listeria Monocytogenes* Mediates the Switch from Environmental Dr. Jekyll to Pathogenic Mr. Hyde. *Infection and immunity*, 2505-2512.
- Gray M. J., Zadoks R. N., Fortes E. D., Dogan B., Cai S., Chen Y., Scott V. N., Gombas D. E., Boor K. J., Wiedmann M. (2004): Food and human isolates of *Listeria monocytogenes* form distinct but overlapping populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:5833-5841.
-

-
- Haydon D. T., S. Cleaveland L. H. Taylor, Laurenson M. K. (2002): Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases*, 8:1468-1473.
- Knudsen G. M., Ng Y., Gram L. (2013): Survival of bactericidal antibiotic treatment by a persister subpopulation of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23):7390-7397.
- Latorre A. A., Van Kessel J. A S., Karns J. S., Zurakowski M. J., Pradhan A. K., Zadoks R. N., Boor K. J., Schukken Y. H. (2009): Molecular Ecology of *Listeria monocytogenes*: Evidence for a Reservoir in Milking Equipment on a Dairy Farm. *Applied Environmental Microbiology*, 75(5):1315-1323.
- Locatelli A., Spor A., Jolivet C., Piveteau P., Hartmann A. (2013): Biotic and abiotic soil properties influence survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *PLoS ONE*, 8:e75969.
- Magalhaes R., Ferreira V., Brandao T. R. S., Palencia R. C., Almeida G., Teixeira P. (2016): 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 Microbiology*, 57:103-108.
- Mantovani H. C., Russell J. B. (2003): Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. *International Journal of Food Microbiology*, 89(1):77-83.
- Maury M. M., Bracq-Dieye H., Huang L., Vales G., Lavina M., Thouvenot P., Disson O., Leclercq A., Brisse S., Lecuit M. (2019): Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones'adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nature Communications*, 10(1):2488.
- Maury M. M., Tsai Y.-H., Charlier C., Touchon M., Chenal-Francois V., Leclercq A., Criscuolo A., Gaultier C., Roussel S., Brisabois A., Disson O., Rocha E. P. C., Brisse S., Lecuit M. (2016): Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature Genetics*, 48(3):308-313.
- McLaughlin H. P., Casey P. G., Cotter J., Gahan C. G. M., Hill C. (2011): Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Archives of Microbiology*, 193:775-785.
- Milohanic E., Glaser P., Coppe'e J. Y., Frangeul L., Vega Y., Va'zquez-Boland J. A., Kunst F., Cossart P., Buchrieser C. (2003): Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Molecular Microbiology*, 47:1613-1625.
- Nightingale K. K., Schukken Y. H., Nightingale C. R., Fortes E. D., Ho A. J., Her Z., Grohn Y. T., McDonough P. L., Weidmann, M. (2004): Ecology and Transmission
-

of *Listeria monocytogenes* infecting Ruminants and in the Farm Environment. *Applied Environmental Microbiology*, 70(8):4458-67.

- Nucera D. M., Grassi M. A., Morra P., Piano S., Tabacco E., Borreani G. (2016): Detection, identification, and typing of *Listeria* species from baled silages fed to dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(8):6121-6133.
- Ortiz S., Lopez-Alonso V., Rodriguez P., Martinez-Suarez J. V. (2016): The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate iberian pork processing plants: evidence from comparative genome analysis. *Applied Environmental Microbiology*, 82(1):308-317.
- Papić B, Golob M, Kušar D, Pate M, Zdovc I. (2019): Source tracking on a dairy farm reveals a high occurrence of subclinical mastitis due to hypervirulent *Listeria monocytogenes* clonal complexes. *Journal of Applied Microbiology*, 127(5):1349-1361.
- Pauly T. M., Tham W. A. (2003): Survival of *Listeria monocytogenes* in Wilted and Additive-Treated Grass Silage. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44:73-86.
- Rodriguez C., Taminiau B., García-Fuentes E., Daube G., Korsak N. (2021): *Listeria monocytogenes* dissemination in farming and primary production: Sources, shedding and control measures. *Food Control*, 120:107540.
- Schoder D., Melzner D., Schmalwieser A., Zangana A., Winter P., Wagner M. (2011): Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. *Journal of Food Protection*, 74(6):919-924.
- Schuppler M. (2014): How the interaction of *Listeria monocytogenes* and *Acanthamoeba* spp. affects growth and distribution of the food borne pathogen, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:2907-2916.
- Vaerewijck M. J., Sabbe K., Bare J., Houf K. (2008): Microscopic and molecular studies of the diversity of free-living protozoa in meatcutting plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:5741-5749.
- Vaerewijck M. J., Sabbe K., Van Hende J., Bare J., Houf K. (2010): Sampling strategy, occurrence and diversity of free-living protozoa in domestic refrigerators. *Journal of Applied Microbiology*, 109:1566-1578.
- Welshimer H. J. (1960): Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *Journal of Bacteriology*, 80:316-320.

Рад примљен: 24.09.2021.
Рад прихваћен: 19.10.2021.
