

Listerioza u miša - patogeneza i uloga stanične imunosti

Abram, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

1996

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:952944>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

MAJA ABRAM

**LISTERIOZA U MIŠA -
PATOGENEZA I ULOGA STANIČNE IMUNOSTI**

Doktorska disertacija

**SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA
RIJEKA**



930024972

Rijeka, 1996.

Rad je u cijelosti izrađen na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Voditelji: ***Prof. dr. Miljenko Dorić***

Prof. dr. Stipan Jonjić

Rad ima: 109 stranica

9 tablica

21 grafikon i

10 slika

U stvaranju i konačnom oblikovanju ovog rada, svojim znanjem, iskustvom, te nadasve korisnim sugestijama, spremno su mi pružili pomoć moji mentori, prof. dr. Miljenko Dorić i prof. dr. Stipan Jonjić, kojima se posebno zahvaljujem.

Na dragocjenoj tehničkoj pomoći zahvalna sam laboranticama Mirjani Topić i Zdenki Starčević, kao i ostalom osoblju Zavoda za mikrobiologiju koji su svojim zalaganjem omogućili uredno odvijanje eksperimentalnog dijela ovog istraživanja, te Sandri Abramović na pomoći pri završnoj realizaciji same disertacije.

Zahvaljujem i svojim kolegama na podršci i strpljivosti.

Mojem Davidu koji strpljivo čeka sedmi dan u tjednu

i

mojim roditeljima koji čine sve da mu čekanje ne bude preteško.

SADRŽAJ

stranica

1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME	1
2. OPĆI DIO	5
2.1. Infekcije uzrokovane intracelularnim bakterijama	6
2.2. Rod <i>Listeria</i>	8
2.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	10
2.2.2. Mikrobiološka dijagnostika	10
2.2.2.1. <i>Obogaćivanje</i>	11
2.2.3. Otpornost prema vanjskim čimbenicima	13
2.2.4. Ekologija i epidemiologija	14
2.3. Listerioza	15
2.3.1. Patogeneza	16
2.3.2. Listerioza tijekom trudnoće	18
2.3.3. Neonatalna listerioza	19
2.4. Mehanizmi obrane	20
2.4.1. Nespecifični mehanizmi	20
2.4.1.1. <i>Uloga NK stanica</i>	22
2.4.2. Specifična imunost	23
2.4.2.1. α/β <i>T stanice</i>	24
2.4.2.2. γ/δ <i>T stanice</i>	26
3. MATERIJALI I METODE	27
3.1. Pokusne životinje	28
3.2. Bakterijski soj	28
3.3. Priprema bakterijske suspenzije za inokulaciju	29
3.4. Određivanje titra <i>L.monocytogenes</i> u	
organima miša	29
3.5. Monoklonska protutijela	30
3.6. Selektivna deplecija pojedinih limfocitnih	
subpopulacija, in vivo	31
3.7. Praćenje učinka <i>L.monocytogenes</i> na plod	31
3.8. Histološki pregled	32
3.9. Statistička obrada i prikaz rezultata	32

4. REZULTATI	33
4.1. Tijek primarne listerioze u BALB/c, C57Bl/6 i $\beta_2m^{-/-}$ miševa	34
4.2. Učinak T stanične deplecije na tijek primarne listerioze u BALB/c miševa	43
4.2.1. Učinak in vivo deplecije CD4 ⁺ limfocita na klirens <i>L.monocytogenes</i>	43
4.2.2. Učinak in vivo deplecije CD8 ⁺ limfocita na klirens <i>L.monocytogenes</i>	46
4.2.3. Učinak in vivo deplecije CD4 ⁺ i CD8 ⁺ limfocita na klirens <i>L.monocytogenes</i>	49
4.3. Tijek primarne <i>L.monocytogenes</i> infekcije u C57Bl/6 miševa nakon selektivne deplecije pojedinih limfocitnih subpopulacija	51
4.3.1. Učinak in vivo deplecije CD4 ⁺ limfocita na klirens <i>L.monocytogenes</i>	51
4.3.2. Učinak in vivo deplecije CD8 ⁺ limfocita na klirens <i>L.monocytogenes</i>	54
4.3.3. Učinak in vivo deplecije NK stanica na klirens <i>L.monocytogenes</i>	57
4.4. Učinak in vivo deplecije CD4⁺, CD8⁺ ili NK stanica na tijek primarne listerioze u $\beta_2m^{-/-}$ miševa	59
4.4.1. Učinak in vivo deplecije CD8 ⁺ limfocita na klirens <i>L.monocytogenes</i>	60
4.4.2. Učinak in vivo deplecije CD4 ⁺ limfocita na klirens <i>L.monocytogenes</i>	61
4.4.3. Učinak in vivo deplecije NK stanica na klirens <i>L.monocytogenes</i>	63
4.5. Učinak infekcije s <i>L.monocytogenes</i> na tijek i ishod trudnoće u BALB/c miševa	67
4.5.1. Dužina trajanja listerioze u trudnoći	67
4.5.2. Utjecaj infekcije s <i>L.monocytogenes</i> na fetus	68
4.5.3. Patohistološke promjene na uterusu, placenti i fetusima nakon infekcije s <i>L.monocytogenes</i>	70
5. RASPRAVA	75
6. ZAKLJUČNI PREGLED	85
7. LITERATURA	89

SAŽETAK

Listeria monocytogenes je gram pozitivna, fakultativno intracelularna bakterija, tolerantna prema ekstremnim uvjetima okoline, kao što su niska i visoka temperatura, povećana koncentracija soli, promjene pH vrijednosti, konzervansi i aditivi.

L.monocytogenes je odgovorna za niz različitih bolesti u mnogih životinjskih vrsta i u ljudi, od kojih su najznačajniji meningitis, septikemija i perinatalne infekcije. Rizične skupine su imunokompromitirane i starije osobe, te trudnice i novorođenčad.

Imuni odgovor domaćina na *L.monocytogenes*, kao intracelularnu bakteriju, posredovan je prvenstveno T stanicama.

Našim smo radom željeli utvrditi kolika je i kakva uloga pojedinih subpopulacija T limfocita ($CD4^+$ i $CD8^+$), i koliki je utjecaj NK stanica na uspostavu, tijek i kontrolu primarne *L.monocytogenes* infekcije. Intravenskom injekcijom 2.5×10^4 CFU *L.monocytogenes* u lateralnu repnu venu, u osjetljivih BALB/c, te rezistentnih C57Bl/6 miševa, kao i u β_2 mikroglobulin deficijentnih miševa uspostavili smo bakterijemijsku fazu infekcije, koja se očitovala izrazitom hepatosplenomegalijom, te makroskopskom i mikroskopskom pojavom granuloma u retikuloendotelnim organima. Pratili smo tijekom infekcije, te klirens *L.monocytogenes* u jetri i slezeni nakon in vivo deplecije $CD4^+$ i/ili $CD8^+$ T limfocita ili NK stanica. Svi su sojevi miševa i nakon in vivo tretiranja anti- $CD4^+$, anti- $CD8^+$ ili kombinacijom monoklonskih

protutijela, ostali sposobni sterilno eliminirati *L.monocytogenes* iz jetre i slezene. Ipak, nedostatak T staničnih subpopulacija rezultirao je sporijim isčišćavanjem bakterije iz organa i evidentnim produženjem primarne listerioze. In vivo deplecija NK stanica, nije promijenila dužinu trajanja infekcije, ali je značajno smanjila titar *L.monocytogenes* u jetri i slezeni inficiranih C57Bl/6 i $\beta_2m^{-/-}$ miševa.

Kako trudnoća predstavlja visoki rizik za infekciju s *L.monocytogenes*, a intrauterina infekcija fetusa je jedna od najznačajnijih kliničkih slika humane listerioze, ispitali smo utjecaj ove bakterije na tijek i ishod graviditeta u BALB/c miševa. Našim smo ispitivanjem ustanovili povećanu osjetljivost gravidnih ženki ovog soja miševa na infekciju s *L.monocytogenes*. Bakterija je perzistirala dvostruko duže u organima gravidnih ženki u odnosu na negravidnu kontrolu. Prateći broj živih fetusa u ženkama inficiranim u različitim fazama graviditeta zapazili smo da je razarajući učinak *L.monocytogenes* na razvoj fetusa, bio to jače izražen što je infekcija bila stečena ranije u trudnoći.

SUMMARY

Listeria monocytogenes is a gram positive facultative intracellular bacterium tolerant to extreme conditions such as low and high temperature, high salt concentrations, changes of pH values, preservatives and additives.

L.monocytogenes is responsible for various diseases of animal species and people the most significant of which are meningitis, septicemia and perinatal infections. High risk groups include immunocompromised and elderly people, pregnant women and newborn. Immune response of the host to *L.monocytogenes* as an intracellular bacterium is mostly T cells mediated.

We tried to define the importance of particular T lymphocyte subsets (CD4⁺ and CD8⁺) and the influence of NK cells on the pathogenesis, course and control of primary *L.monocytogenes* infection. With the intravenous injection of 2.5×10^4 CFU of *L.monocytogenes* into the lateral tail vein of the susceptible BALB/c, resistant C57Bl/6 and β_2 microglobulin deficient mice, we caused the bacteriemic phase of infection which was characterized by a significant hepatosplenomegalia and macroscopic and microscopic granuloma appearance in reticuloendothelial organs. We observed the course of the infection and the clearance of *L.monocytogenes* in liver and spleen after in vivo depletion of CD4⁺ and/or CD8⁺ T lymphocytes or NK cells. All mice strains were capable of eliminating *L.monocytogenes* from the liver and spleen after in vivo treatment with anti-CD4⁺, anti-CD8⁺ or both monoclonal antibodies.

However, the lack of T cell subpopulations resulted in a slower clearance of the bacteria from the organs and an evident prolongation of primary listeriosis. In vivo depletion of NK cells, did not change the duration of the infection but significantly reduced the titer in liver and spleen of the infected C57Bl/6 and $\beta_2m^{-/-}$ mice.

Since in pregnancy there is a high risk for *L.monocytogenes* infection and the fetal infection is the most important clinical appearance of human listeriosis, we examined the influence of the bacterium on the course of pregnancy in BALB/c mice. This study showed high susceptibility of pregnant female mice to *L.monocytogenes* infection. Bacteria persisted twice longer in organs of pregnant female in comparison to the non pregnant control mice. By observing the number of live fetuses in the infected females during different stages of pregnancy we noticed that the detrimental influence of *L.monocytogenes* on fetal development was more pronounced in cases where the infection was acquired earlier.

1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

Jedna od vrlo efikasnih strategija koju neki mikroorganizmi koriste da bi izbjegli obrani domaćina, jest smještaj unutar njegovih stanica. Praktički svaka stanica može biti iskorištena u tu svrhu. Ipak, najčešće se radi o mononuklearnim fagocitima jer zadovoljavaju dva bitna zahtjeva: dugoživući su i po funkciji su fagociti te uzročnik lako ulazi u njihovu unutrašnjost. Navedene karakteristike čine mononuklearne fagocite idealnim stanicama za smještaj parazita. S druge strane, mononukleari imaju važnu ulogu u antimikrobnoj obrani organizma kao snažni izvršni čimbenici, a tu svoju biološku ulogu ne mogu iskazati u gore navedenom slučaju. U skupinu intracelularnih parazita uključeni su neki eukariotski mikroorganizmi, napose protozoa krvi, te virusi i neke bakterije. Među intracelularnim bakterijama neke su od izuzetnog javno zdravstvenog značaja kao uzročnik tuberkuloze - *Mycobacterium tuberculosis* te *Chlamydia trachomatis* izazivač bolesti koja i danas predstavlja vodeći uzrok sljepoće u svijetu. Nadalje, među intracelularne bakterije spadaju i uzročnici legionarske bolesti - *Legionella pneumophila*, psitakoze - *Chlamydia psittaci*, bruceloze - *Brucella abortus*, tularemije - *Francisella tularensis*, te niz crijevnih oboljenja kao salmoneloze - *Salmonella typhi/typhimurium*, jersinioze - *Yersinia enterocolitica*, listerioze - *Listeria monocytogenes*, itd.

Listeria monocytogenes, iako nije uzročnik bolesti koja bi predstavljala značajni javno zdravstveni problem, može nakon ulaska u organizam uzrokovati različite kliničke slike oboljenja s visokom stopom smrtnosti (1,134). *L.monocytogenes* je ubikvitarna, oportunistička gram pozitivna bakterija odgovorna za teške slike meningitisa i meningoencefalitisa, septikemije i, u

slučaju trudnica, intrauterinih infekcija fetusa koje mogu rezultirati abortusom, preranim rođenjem djeteta ili neonatalnom infekcijom (u većini slučajeva meningitisom) stečenom tijekom ili nakon poroda. Žrtve ove, rijetko manifestne, infekcije jesu imunodeficijentne, imunosuprimirane i starije osobe, ali se infekcija javlja i među posve zdravim osobama svih starosnih skupina. Iako se bolest pojavljuje najčešće sporadično, u posljednjih petnaestak godina zabilježene su i epidemije listerioze diljem svijeta (Sj. Amerika, Novi Zeland, Europa), s velikim brojem oboljelih. U većini zabilježenih epidemija je dokazana povezanost bolesti s unosom kontaminirane hrane (4,41,43) (mlijeko, sir, sirovo povrće, plodovi mora), upućujući na gastrointestinalni sustav kao najvjerojatniji i najčešći put ulaska *L.monocytogenes*, što je u skladu s nalazom ove bakterije u epitelnim stanicama tankog crijeva (47,122). Konjunktivalna, nazalna ili sluznica donjeg dijela respiratornog sustava također predstavljaju moguća mjesta ulaska ove bakterije (96,114,115).

Iz više razloga *L.monocytogenes* je jedinstvena bakterija bitno različita od ostalih koje se prenose putem hrane. Naime, dok se namirnice štite od patogenih mikroorganizama čuvanjem u hladnjaku, pasterizacijom i/ili dodavanjem soli te aditiva, *L.monocytogenes* vrlo efikasno preživljava sve navedene postupke. Upravo zbog svoje sposobnosti da tolerira ekstremne vanjske uvjete, *L.monocytogenes* predstavlja novu opasnost u prehrambenoj industriji.

L.monocytogenes je prvi put izolirana prije sedam desetljeća (107), međutim, do danas su uz nju vezane mnoge nepoznanice. Nije još uvijek potpuno razjašnjena epidemiologija niti patogeneza oboljenja, niti su sasvim jasni

imunološki mehanizmi obrane domaćina. Proteklih 30-ak godina prikupljeni su mnogobrojni podaci koji ukazuju da je imunost na *L.monocytogenes*, kao intracelularnu bakteriju, uglavnom posredovana T stanicama (90,94,99), dok B stanice imaju neznatnu ili nikakvu ulogu (90). Jasno je da su u obrani organizma tijekom primarne infekcije uzrokovane s *L.monocytogenes* uključene različite stanične populacije (7,78), koje neophodno surađuju, uz pomoć niza citokina, da bi efikasno eliminirale bakteriju iz organizma (109). Međutim, još uvijek nije potpuno jasno kolika je i kakva uloga pojedinih subpopulacija T limfocita ($CD4^+$ i $CD8^+$), niti koliki je udio NK stanica u uspostavi, tijeku i kontroli listerioze.

Neosporno je, dakle, da je odgovor domaćina na primarnu infekciju s *L.monocytogenes* izuzetno složeni proces u koji je uključen niz raznoraznih čimbenika koji, međutim, nisu do danas u cjelosti poznati. Stoga se nameće potreba da se eksperimentalnim radom detaljnije rasvijetli patogeneza ove bolesti. Ovaj rad, u kojem se prati razvojni tijek primarne listerioze u animalnom modelu nakon selektivne deplecije različitih staničnih subpopulacija trebao bi dati odgovor na neke od spomenutih nepoznanica.

Kako trudnoća predstavlja stanje visokog rizika za infekciju s *L.monocytogenes*, a jedna je od najvažnijih kliničkih slika u ljudi upravo intrauterina infekcija fetusa, ovim se radom na eksperimentalnom modelu nastojao objasniti utjecaj ove bakterije na razvoj ploda u raznim fazama graviditeta.

2.1. Infekcije

Lista intracelularnih

različito je

kriterij. Tablica

opisuje uzročnike

skupine, broj

ambijenta.

Tablica 1

BAKTERIJE

Rickettsia

Rickettsia

Rickettsia

Coxiella

Chlamydia

2. OPĆI DIO

2.1. Infekcije uzrokovane intracelularnim bakterijama

Lista intracelularnih bakterijskih infekcija, odnosno intracelularnih bakterija različito je dugačka i ovisi o autorima i o tome koliko su strogi njihovi kriteriji. Tablica 1. prikazuje obligatne intracelularne bakterije, kao i bolesti njima uzrokovane. Rikecije i klamidije su svakako osnovni predstavnici ove skupine, koju karakterizira nemogućnost preživljavanja izvan unutarstaničnog ambijenta.

Tablica 1. Obligatne intracelularne bakterije od medicinskog značaja

BAKTERIJA	BOLEST	NAJČEŠĆI PUT ULASKA
Rickettsia prowazekii	epidemični pjegavi tifus	ozlijeđena koža, sluznice
Rickettsia rickettsii	pjegava groznica Stijenjaka	krvne žile (ubod krpelja)
Rickettsia tsutsugamushi	šikarski tifus	krvne žile (ubod grinje)
Coxiella burnetii	Q groznica	pluća
Chlamydia trachomatis (određeni serovari)	urogenitalne infekcije Lymphogranuloma venereum trahom	sluznica urogenitalnog sustava oko

Mnogo je veći broj fakultativno intracelularnih bakterija. Međutim, niti jedna bakterija ne može biti uključena u ovu skupinu samo na temelju svoje sposobnosti da uđe u stanicu domaćina. Naime, i mnoge ekstracelularne bakterije, kao na primjer *Shigella spp.*, izazivaju infekciju nakon ulaska i privremenog boravka u epitelnim stanicama. Osim smještaja unutra stanice, intracelularne bakterijske infekcije karakterizira i imuni odgovor domaćina posredovan T limfocitima, te vrlo mala ili nikakva uloga humoralnog imuniteta. Mikroorganizmi koji rastu u vanstaničnom prostoru uzrokuju nakupljanje polimorfonuklearnih granulocita, odnosno gnojenje. Nasuprot tome, tkivna reakcija na intracelularne bakterije jest formiranje granuloma, koji nakon rupture omogućuju bakterijsku diseminaciju i stvaranje novih lezija u udaljenim tkivima ili organima. Obzirom da su intracelularne bakterije uspješno zadržane u spomenutim granulomima, sterilna eradikacija obično izostaje. Bolest je obično manifestirana dugom inkubacijom i kroničnim tijekom (79,80).

Naravno, idealna intracelularna bakterija koja zadovoljava sve navedene kriterija ne postoji. U tablici 2. prikazane su neke od njih koje zadovoljavaju većinu postavljenih zahtjeva.

M.tuberculosis i *M.bovis* zadovoljavaju najveći broj postavljenih kriterija. Ipak, na vrhuncu aktivne tuberkuloze, i ovi se bacili repliciraju ekstracelularno u detritusu uništenih stanica. Bolest uzrokovana s *L.monocytogenes*, ispunjava gotovo sve zahtjeve osim jednog: bolest ima akutan tijek (94). Druge bolesti uzrokovane sa *S.typhi/S.typhimurium* ili legionarska bolest uzrokovana s

L.pneumophila samo su djelomično intracelularne bakterijske infekcije, jer je značajan dio imunog odgovora posredovan protutijelima.

Tablica 2. Fakultativno intracelularne bakterije od medicinskog značaja

BAKTERIJA	BOLEST	NAJČEŠĆI PUT ULASKA
Mycobacterium tuberculosis Mycobacterium bovis	tuberkuloza	pluća
Mycobacterium leprae	guba	sluznica nazofarinksa
Salmonella typhi/paratyphi Salmonella typhimurium	tifus/paratifus salmoneloza	crijevo
Brucella spp.	bruceloza undulatorna groznica	sluznica
Legionella pneumophila	legionarska bolest	pluća
Listeria monocytogenes	listerioza	crijevo

2.2. Rod *Listeria*

Rod *Listeria* uvršten je, prema Bergey-u, u skupinu pravilnih, nesporogenih, gram pozitivnih štapića (133). Veličina im varira od 0.4-0.5 x 1.0-2.0 μm . Krajevi su im zaobljeni. Ponekad se u mikroskopskom preparatu mogu javiti i u vidu zarez, te kao pojedinačni štapići ili kraći lanci. U starijim kulturama

moгу se vidjeti i filamentozni oblici duljine 6-20 μm . Posjeduju nekoliko peritrihijalnih flagela te su pokretni, ali samo nakon uzgoja na sobnoj temperaturi od 20-25°C. Aerobi su ili fakultativni anaerobi. Optimalna temperatura rasta jest između 30 i 37°C, ali je temperaturni raspon opsežniji i kreće se između 1 i 45°C.

Na temelju DNA-DNA hibridizacije, rod *Listeria* podijeljen je u sedam vrsta: *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.innocua*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri*, *L.grayi* i *L.murray*. Međutim, podaci o DNA homologiji, govore o postojanju dvije podvrste unutar *L.ivanovii*, i to *L.ivanovii subsp. ivanovii* i *L.ivanovii subsp londoniensis*. Ove dvije podvrste mogu se razlučiti i putem biokemijskih testova, na temelju sposobnosti da fermentiraju ribozu i N-acetil-beta-manazomin (12). Nadalje, genomski srodnost između *L.grayi* i *L.murray* ponovno je vrednovana novim postupcima (DNA-DNA hibridizacijom, multilokularnom enzimnom elektroforezom, te r-RNA tipizacijom). Visoki stupanj sličnosti uočen među sojevima ovih dviju vrsta, ukazuje da bi se one trebale smatrati članovima jedinstvene vrste. Na temelju povijesnog prioriteta, vrsta treba nositi ime *L.grayi* (123).

Od svih spomenutih vrsta, samo su dvije, *Listeria monocytogenes* i rijetko *Listeria ivanovii* povezane s bolestima u ljudi i stoga važne u humanoj medicini.

2.2.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je patogena za čovjeka i velik broj životinjskih vrsta. Morfološke i opće karakteristike odgovaraju karakteristikama roda. Prilikom kultivacije na krvnom agaru, oko kolonija se uočava uska zona β -hemolize. Postoji najmanje 16 serotipova *L.monocytogenes*, koji se identificiraju serološkim grupiranjem 5 flagelarnih termolabilnih antigena i 14 somatskih termostabilnih antigena koji sadrže ugljikohidrate. Usprkos ovoj raznovrsnosti, za više od 90% oboljenja u ljudi odgovorna su samo 3 serotipa: 1/2a, 1/2b i 4b (98).

2.2.2. Mikrobiološka dijagnostika

U kliničkim uzorcima, iz normalno sterilnih sredina, *L.monocytogenes* se jednostavno izolira, na uobičajenim podlogama koje se koriste u rutinskom radu mikrobiološkog laboratorija, kao na primjer krvni agar. Nakon nasadivanja i inkubacije na 35-37°C tijekom noći, porasle kolonije su glatke, sjajne, promjera oko 0.5 do 1 mm, i okružene vrlo uskom ali jasno uočljivom zonom β -hemolize. Listerija je katalaza pozitivna i oksidaza negativna, te pokazuje piruetnu pokretljivost koja se najbolje uočava mikroskopski u "visećoj kapi" iz šesterosatne bujonske kulture uzgojene na 25°C. Važni biokemijski testovi za identifikaciju *L.monocytogenes* su brza fermentacija trehaloze i salicina, te nesposobnost da fermentira manitol.

Međutim, bakteriju je teško izolirati iz uzoraka uzetih s nesterilnih mjesta, kao fekalni uzorci, vaginalni iscjedak ili obrisici s kože i sluznica, te prehrambeni proizvodi. Napori da se izolira *L.monocytogenes* iz hrane direktnim nasadivanjem na krute hranjive podloge, uglavnom su završili neuspješno. Uz rijetke iznimke, koncentracija ovog mikroorganizma u namirnici je vrlo niska, vjerojatno manja od 10^2 bakterija po gramu namirnice. Stoga je prije postupka izolacije, neophodno uključiti postupke obogaćivanja.

2.2.2.1. Obogaćivanje

Gray i suradnici su još godine 1948. upotrijebili "obogaćivanje u hladnom" kao način da se izdvoji psihrofilna *L.monocytogenes* u biološkom materijalu (55). Ovaj je pristup i danas popularan način da se poveća koncentracija listerija dok se istovremeno suprimira rast ostalih mikroorganizama koji ne podnose temperaturu od 4°C . Osnovni nedostatak ovog postupka jest što zahtijeva produženu inkubaciju koja se izražava u tjednima ili mjesecima (generacijsko vrijeme *Listeriae spp.* na 4°C jest 15 dana). Ipak, bez obzira na nedostatke, ovaj se postupak, u izolacijskim shemama mnogih autora, koristi barem kao primarni ili prethodni, ako ne i kao jedini način obogaćivanja. Ukoliko se u postupak obogaćivanja uključe i antibiotici (najčešće nalidiksična kiselina) koji suprimiraju ili inhibiraju rast ostale mikrobne flore u uzorku, potrebno vrijeme se znatno reducira i mjeri danima. Najčešće se, ipak,

2.2.3. Otpornost prema vanjskim čimbenicima

Psihrofilne osobine *L.monocytogenes* odavno su poznate, a koriste se i danas, za izolaciju ove bakterije iz uzoraka bogatih raznolikom mikrobnom florom. *L.monocytogenes* ima sposobnost rasta u rasponu temperatura od 1°C do 45°C (133). Prosječna najniža temperatura rasta za ovu bakteriju iznosi +1.1°C (74). Sposobnost da podnosi niske temperature, svakako pospješuje preživljavanje ove bakterije u prirodi (150), doprinosi njezinoj virulenciji (7), te igra važnu ulogu u epidemiologiji listerioze (37). Osim uspješnog rasta pri niskim temperaturama, Doyle je 1987. upozorio i na mogućnost preživljavanja *L.monocytogenes* pri temperaturi pasterizacije (33,34). Svojim je eksperimentima ukazao da *L.monocytogenes* može podnijeti i preživjeti izlaganje na 72.2°C kroz 16.4 sekunde, što odgovara postupku HTST (high-temperature, short-time) pasterizacije.

Osim prema temperaturi, *L.monocytogenes* se odlikuje otpornošću prema nizu drugih vanjskih čimbenika. Na primjer, vrlo dobro podnosi različite vrijednosti pH podloge, te može rasti u izrazito kiselim (pH 4.5) kao i izrazito alkalnim (pH 9.6) uvjetima (15).

L.monocytogenes je i vrlo tolerantna prema povećanim koncentracijama natrijevog klorida, tako da joj ne smeta niti prisustvo 10% NaCl-a u podlozi (34,63). Što je temperatura niža, vrijeme preživljavanja u povišenim koncentracijama soli se produžuje, pa je tako opisano da bakterija može ostati živa više od 100 dana u 10.5-30% NaCl-a na 4°C (34).

Eksperimentalno je ispitan i utjecaj natrijevog nitrita, uobičajenog konzervansa, na *L.monocytogenes*. Shahamat je 1980. objavio da standardne koncentracije natrijevog nitrita, dozvoljene u hrani, ne inhibiraju rast ove bakterije, osim u interakciji s nekim drugim antimikrobnim sredstvom, kao što je natrijev klorid.

2.2.4. Ekologija i epidemiologija

L.monocytogenes je nađena u prašini, tlu, vodi, biljkama u procesu truljenja, stočnoj hrani, itd. Ona je dobro poznati uzročnik epizootija među ovcama i krupnom stokom, a može se izolirati i iz čitavog niza divljih i domaćih sisavaca, ptica uključujući i perad, riba, te insekata (3,18). *L.monocytogenes* može biti prisutna i kao član normalne mikrobne flore u gastrointestinalnom sustavu ljudi. Smatra se da oko 5-10% cjelokupne populacije predstavlja zdrave nosioce ove bakterije (41).

Mada su mnogi klinički i mikrobiološki aspekti *L.monocytogenes* dobro proučeni, znanje o epidemiologiji i patogenezi listerioze u ljudi daleko je od potpunog. Mnogi su čimbenici, uključujući incidenciju, infektivnu dozu i način prenošenja još uvijek nejasni. Do nedavno listerioza je smatrana isključivo sporadičnim i najčešće profesionalnim oboljenjem. Naše razumijevanje listerioze i prenošenja njenog uzročnika uvelike su proširile opisane epidemije ove bolesti, u kojima je dokazan put prijenosa preko hrane (65,84,127,132). Najčešće inkriminirana hrana jest mlijeko i mliječni proizvodi, napose svježi

sir (91), međutim, opisane su i epidemije listerioze putem kontaminiranog povrća (63), mesa i mesnih proizvoda (50,106) kao i riba (45).

2.3. Listerioza

U posljednje vrijeme se češće govori o infekcijama uzrokovanim s *L.monocytogenes*, kako među životinjama, tako i među ljudima (85). Godišnja incidencija listerioze u nekoliko Europskih zemalja, procjenjuje se na oko 0.2 slučaja na 100.000 stanovnika. U SAD je godišnja incidencija meningitisa, uzrokovanog listerijom, 0.7 na 100.000 (75,151). Niz epidemija uzrokovanih ovom bakterijom, a prenešenih kontaminiranom hranom, dodatno povećava interes ne samo sa stanovišta humane medicine, nego i prehrambene industrije (118,129).

Najčešći rezultat kontakta zdravog, odraslog čovjeka s *L.monocytogenes* jest prolazno, asimptomatsko kliconoštvo. Kada se, međutim, pojavi bolest, može se manifestirati različitim kliničkim sindromima. Najčešće je zahvaćen središnji živčani sustav (60% slučajeva listerioze). Predilekcijska mjesta su meninge, pa se bolest javlja u vidu meningitisa, rjeđe meningoencefalitisa (75). Oboljenje se javlja obično u kasnijoj neonatalnoj dobi (najranije tri dana nakon porodaja) i u imunosuprimiranih odraslih osoba. Tako se upravo *L.monocytogenes* spominje kao najčešći uzročnik meningitisa u transplantiranih pacijenata (137).

Drugi oblik bolesti jest sepsa s groznicom i povišenom temperaturom. Pacijenti mogu biti odrasle osobe, u većini slučajeva imunokompromitirane ili

s različitim prethodnim oboljenjima kao npr. diabetes mellitus, AIDS, carcinom i druge maligne bolesti (9,75), ili novorođenčad kada je infekcija najvjerojatnije stečena tijekom ili nakon poroda.

Fokalne infekcije uzrokovane s *L.monocytogenes* mogu biti locirane na koži kao rezultat direktnog kontakta s inficiranim životinjama. Ovakve infekcije opisane su kod osoba profesionalno vezanih uz životinje, na primjer kod veterinaru, te u laboratorijskog osoblja u kontaktu s inficiranim eksperimentalnim životinjama. Mogu biti zahvaćene i sluznice, posebno oka, a manifestiraju se kao gnojni konjunktivitis, ili rjeđe uveitis. Opisan je i listerični limfadenitis, posebno izražen u cervikalnim limfnim čvorovima. Druge žarišne infekcije uključuju artritis, osteomijelitis, peritonitis, holecistitis, i dr.

2.3.1 Patogeneza

Sposobnost invadiranja, preživljavanja i umnožavanja u stanicama domaćina, svakako je temelj patogenosti za intracelularne mikroorganizme. *L.monocytogenes* je fakultativno intracelularni parazit mnogih eukariotskih stanica uključujući epitelne stanice, fibroblaste, hepatocite i makrofage (47,56,59,143). Prema Portnoy i suradnicima infekcija s *L.monocytogenes* odvija se kroz 4 faze (121). Nakon fagocitoze, odnosno prve faze ulaska u stanicu domaćina, nazvane i internalizacijom, odmah slijedi druga faza "bijega iz vakuole" u kojoj *L.monocytogenes* svojim hemolizinima lizira membrane fagosoma i replicira se u citoplazmi. Unutar dva sata od ulaska u stanicu,

slijedi treća faza u kojoj listerija biva okružena filamentima F-aktina, koji se organiziraju oko bakterijskog tijela u vidu polarne flagele dugačke oko 5 μ m (27,143). Ovako stvoren "rep" pokreće bakteriju prema površini inficirane stanice, izbočujući je i stvarajući izdanak stijenke sličan amebnom pseudopodiju. Ovim izdankom, u kojem se nalazi *L.monocytogenes*, inficirana stanica domaćin, dotiče drugu, susjednu stanicu koja ga fagocitozom uvuče u svoju unutrašnjost. Prelazak iz stanice u stanicu, bez napuštanja citoplazme, predstavlja četvrtu fazu u razvoju infekcije, a ujedno i dodatno objašnjenje zašto humoralna imunost nema udjela u zaštiti organizma od ove infekcije (90). U novoj stanici *L.monocytogenes* ponovno razgrađuje membrane koje ju okružuju (stijenku prve inficirane stanice i fagocitnu, vakuolarnu membranu druge stanice) i proces se ponavlja (105,143). U ovoj fazi ključnu ulogu igra hemolizin, jedan od najistraženijih i najbolje poznatih faktora virulencije *L.monocytogenes*. Ovaj ekstracelularni toksin poznat je pod imenom listeriolizin O (LLO), α -listeriolizin ili hemolitički egzotoksin (Hly). Biokemijski je sličan s hemolizinima nekih drugih bakterija: streptolizinom O - *Streptococcus pyogenes*, pneumolizinom - *Streptococcus pneumonia* i perfringolizinom - *Clostridium perfringens*, te s njima pokazuje unakrsne reakcije. Da je LLO neophodan za virulenciju *L.monocytogenes*, dokazano je mnogim eksperimentima, u kojima je promijenjen gen koji kodira stvaranje LLO. LLO-negativne mutante ili sojevi ubijeni toplinom (heat-killed) pokazuju znatno smanjenu virulenciju ili su sasvim avirulentni za laboratorijske životinje (47,97). Fosfatidilinozitol specifična fosfolipaza C (PI-PLC) te lecitinaza također su poznati faktori virulencije ove bakterije. PI-PLC je ekstracelularni

produkt i to samo patogenih listerija kao što su *L.monocytogenes* i *L.ivanovii* (112). Ovaj enzim specifično cijepa spojeve koji sadrže fosfatidilinozitol, a nalaze se kao sastavni dijelovi proteina u eukariotskoj staničnoj membrani. Nedostatak PI-PLC, ili mutacije u genu koji kodira sintezu ovog proteina, dovode do smanjenja virulencije, dužeg zadržavanja listerije u fagosomu i otežanog prelaska iz stanice u stanicu (140).

2.3.2. Listerioza tijekom trudnoće

Trudnoća predstavlja predisponirajući faktor razvoju čitavog niza različitih infekcija. Od bolesti uzrokovanih intracelularnim bakterijama, najčešće se spominju *Mycobacterium tuberculosis* i *Listeria monocytogenes*.

Listerioza se može javiti u bilo koje doba trudnoće, ali najčešće nakon četvrtog mjeseca ili tijekom trećeg trimestra (148). Pacijentica se obično javlja s povišenom temperaturom i bolovima u križima, što podsjeća na infekcije urinarnog sustava, influencu ili nejasno febrilno oboljenje. Laboratorijski i mikrobiološki testovi obično su negativni. Jedini put ka postavljanju pravilne etiološke dijagnoze jest pozitivna hemokultura. Kako se to obično ne učini, slučajevi često prolaze neopaženo. Listerioza majke može biti povezana s pobačajem krajem trećeg trimestra trudnoće, s prijevremenim porodom ili mrtvorodenim djetetom (40). Listerioza trudnice ne mora se bezuvjetno prenijeti na fetus, što potvrđuju opisani slučajevi kada je samo jedno dijete od blizanaca rođeno inficirano. U literaturi se navode čak i septični oblici

listerioze majke u prvom trimestru, nakon čega je rođeno zdravo donešeno dijete (68).

2.3.3. Neonatalna listerioza

Transplacentarni prijelaz *L.monocytogenes* dovodi do infekcije ploda in utero. Javlja se bolest, granulomatosis infantiseptica, koju karakteriziraju diseminirani granulomi. Ove fetalne lezije variraju u veličini, od makroskopski vidljivih do mikroskopskih čvorića. Nadeni su u placenti, slezeni, jetri, nadbubrežnim žlijezdama, plućima, mozgu, gastrointestinalnom sustavu i koži fetusa (141). Bolest izuzetno podsjeća na eksperimentalnu listeriozu, nakon što se laboratorijskim životinjama *L.monocytogenes* injicira u visokim dozama bilo intravenski bilo intraperitonealno. Klinički simptomi neonatalne listerioze uključuju respiratorni distres sindrom, osip, gnojni konjunktivitis, pneumoniju, povraćanje, grčeve, šok, hematološke poremećaje, te hiper ili hipotermiju. Za smrt neonatusa od kongenitalne listerioze najčešće su odgovorni poremećaji disanja.

L.monocytogenes može se u ovakvim slučajevima izolirati iz likvora, mekonijuma, želučanog soka, krvi i kože novorođenčeta, ali se rezultati kulture obično dobivaju prekasno da bi mogli utjecati na ishod same infekcije. Rana dijagnoza i pravilna, efikasna antibiotska terapija, od presudnog su značenja za preživljavanje inficiranog neonatusa. Međutim, zbog

rijetke pojave neonatalne listerioze, zbog nespecifične slike bolesti u majke kao i u djeteta, dijagnoza kasni, i stopa smrtnosti kreće se oko 36%.

2.4. Mehanizmi obrane

Fakultativne intracelularne bakterije duguju svoju patogenost, barem jednim dijelom, sposobnosti da prežive, opstanu i rastu unutar makrofaga domaćina (90,102). Stoga, opće je prihvaćeno da imunost posredovana stanicama pruža efikasnu zaštitu protiv tih mikroorganizama. Naime, oslobađanjem limfokina od strane T limfocita aktivira baktericidne mehanizma makrofaga i onemogućuje rast bakterija u njihovoj unutrašnjosti (87,95,111). No, bez obzira na važnost i ulogu stanične imunosti, sasvim je jasno da najraniju fazu infekcije, prva dva do tri dana, kontroliraju nespecifične obrambene snage domaćina, napose sposobnost fagocitoze i ubijanja mikroorganizama od strane makrofaga i polimorfonuklearnih leukocita (26,94). Dodatni nespecifični, izvršni tip stanica koje mogu funkcionirati kao prve crte obrane u infekciji izazvanoj intracelularnim parazitima jesu NK (natural killer) stanice (152).

2.4.1. Nespecifični mehanizmi

Mnogim je radovima dokumentirana uloga neutrofila u obrani od brojnih ekstracelularnih piogenih bakterija. Međutim, malo je informacija o ulozi ovih

stanica u borbi protiv intracelularnih mikroorganizama. Ipak, intraperitonealna inokulacija mikobakterija ili listerija u laboratorijskih miševa dovodi do infiltracije velikog broja neutrofila, ali važnost te neutrofilije nije bila sasvim jasna (3,4). Posredno, njihova je važnost dokazana in vitro, u kulturi gdje su infiltrirajući neutrofili pokazali sposobnost ubijanja listerija i oslobodenja derivata kisika i enzima s antilisteričnom aktivnošću (2,92). Conlan i North (23) su histološki objasnili ulogu neutrofila u ranoj fazi obrane. Naime, u modelu mišje listerioze najraniju obrambenu ulogu igraju Kupfferove stanice, koje odstrane 90% intravenskog inokuluma unutar 15 minuta, te tijekom daljnjih 6 do 7 sati u jetri inaktiviraju više od 95% injiciranog uzorka. Iako vrlo efikasan, ovaj je mehanizam sam po sebi nedostatan, jer bakterije koje prežive razaranje vrlo brzo napreduju, te inficiraju i započinju rasti unutar susjednih hepatocita. Tada pomoć pružaju neutrofili koji se akumuliraju u infektivnim žarištima tijekom prvih 24 sata od infekcije, uzrokuju lizu inficiranih hepatocita, oslobadaju *L.monocytogenes* u ekstracelularni prostor omogućujući ingestiju sebi samima ili makrofagima (23). Ova strategija rane neutrofilima - posredovane obrane uočena je i tijekom infekcije nekim drugim intracelularnim bakterijama (24) a služi održavanju onog stupnja infekcije koji će kasnije stečenim specifičnim mehanizmima imunosti lakše biti savladan.

U ovom kontekstu, a znajući da enterociti predstavljaju vrlo prijemčivu staničnu populaciju prema *L.monocytogenes* (47,105) i da je upravo gastrointestinalni trakt prirodni put ulaska ove bakterije, važna su i zapažanja Racza (122), koji je objavio razaranje listerijom inficiranih enterocita u

područjima neutrofilne akumulacije in vivo, u zamoraca nakon peroralnog unošenja *L.monocytogenes*.

Nakon niza posrednih dokaza, Rogers i Unuanne su 1993. godine u pokusima in vivo, potvrdili važnost neutrofila u ranoj fazi obrane protiv *L.monocytogenes* (124).

Oni su deplecijom neutrofila in vivo, monoklonskim protutijelima, izazvali pogoršanje bolesti s velikim brojem uginulih životinja, što je evidentni dokaz uključenosti i značaja ovih stanica u obrani domaćina protiv ove intracelularne bakterije.

2.4.1.1. Uloga NK stanica

Natural killer (NK) stanice predstavljaju subpopulaciju limfocita (oko 15%) koja se razlikuje od T i B stanica po svojoj morfologiji, fenotipskim odlikama te funkcionalnom sposobnošću da spontano ubiju, unište tumorske ili virusom inficirane stanice (72,113). Morfološki, NK stanice pripadaju subpopulaciji velikih granuliranih limfocita (LGL - large granular lymphocyte) (142); fenotipski izražavaju svoje karakteristične površinske biljege CD3⁻ NKH1⁺ CD16⁺ (89); a funkcionalno mogu djelovati kao efektorne, izvršne stanice prirodnih imunoloških mehanizama za koje se smatra da predstavljaju osnovu imunog odgovora domaćina prema tumorima i infektivnim agensima. NK stanice u svojoj funkciji nisu ograničene niti uvjetovane antigenima glavnog sustava tkivne srodnosti (MHC - major histocompatibility complex), te su u

stanju uništiti različite stanice, humanih solidnih tumora, leukemične i virusom inficirane ciljane stanice s neprepoznatljivom MHC ekspresijom.

Poremećena ili nedostatna prirodna imunost, mjerena in vitro NK aktivnošću, i/ili depresija apsolutnog broja cirkulirajućih NK stanica, povezana su s razvojem i napredovanjem malignih oboljenja (69,145), s akutnim i kroničnim virusnim infekcijama uključujući AIDS (10,119,149), sa sindromom stanja kroničnog umora (CFS - chronic fatigue syndrom) i psihijatrijskim depresijama (17,38), te s određenim autoimunim bolestima (67,100). Neki eksperimentalni radovi govore o ulozi NK stanica u infekcijama uzrokovanim drugim mikroorganizmima, osim virusa. Hatcher i Solomon upućuju na važnost NK stanica u parazitarnim infekcijama uzrokovanih tkivnim protozoima: *Trypanosoma cruzi* i *Plasmodium berghei* (61,139). Više autora objavilo je svoja zapažanja o uključenosti NK stanica u obranu od gljivičnih infekcija (64,71,108). Međutim, iako NK stanice imaju važnu funkciju u odgovoru domaćina na niz mikroorganizama, njihova zaštitna uloga tijekom bakterijskih infekcija nedovoljno je poznata. Objavljeni su, naime, oprečni rezultati koji govore o pozitivnim (7,35,48) ali i negativnim učincima NK stanica na domaćina (131,138,142).

2.4.2. Specifična imunost

Odgovor na infekcije uzrokovane intracelularnim parazitima posredovan je prvenstveno mehanizmima stanične imunosti. T limfociti su se specijalizirali u

prepoznavanju peptida, tj. prepravljenih antigena, na površinama inficiranih stanica putem svojih staničnih receptora a u sklopu molekula klase I i II glavnog sustava tkivne srodnosti (MHC - major histocompatibility complex).

Ovisno o tipu heterodimeričnog, antigen-specifičnog površinskog receptora, T limfociti se dijele u 2 osnovne skupine (1). Ubjedljiva većina perifernih T stanica, u čovjeka i miša, izražava površni stanični receptor sastavljen od α i β lanaca (3), dok daleko manja, funkcionalno vrlo nedefinirana, skupina posjeduje kombinaciju γ i δ lanaca (2,4). Antibakterijska imunost posredovana T stanicama, uglavnom se pripisuje α/β T limfocitima, primarno zbog njihove brojnosti i opsežnog znanja o ovoj staničnoj populaciji. U posljednje vrijeme, više je autora ukazalo na vjerojatno važnu ulogu $TCR\gamma\delta^+$ T stanice u obrani organizma od različitih infekcija (7,9,10,12).

2.4.2.1. α/β T stanice

Zrele α/β T stanice također nose i CD4 (L3T4) ili CD8 (Lyt-2) molekule, te se prema tome raščlanjuju u 2 subpopulacije: $CD8^+$ - citoksične/supresorske (Tc/s) T limfocite, koji prepoznaju antigene peptide u kontekstu molekula I razreda (MHC-I) tkivne srodnosti i $CD4^+$ - pomoćničke (Th) T limfocite, koji prepoznaju antigene u kontekstu II razreda (MHC-II) tkivne srodnosti. $CD4^+$ stanice dodatno se dijele u dvije funkcionalno udaljene skupine: T pomoćničke stanice tipa 1 (Th1), koje produciraju IFN- γ i IL-2 i T pomoćničke stanice tipa 2 (Th2), koje luče IL-4 i IL-5 (26).

Intracelularne bakterije primarno zaostaju u endosomnim odjeljcima makrofaga i stoga omogućuju obrazac prepoznavanja uz pomoć molekula MHC-II. Ipak, neke intracelularne bakterije imaju sposobnost invadiranja i u neprofesionalne fagocite, od kojih neki ne izražavaju molekule MHC-II razreda. Zbog toga CD4⁺ limfociti ne mogu prepoznati ove inficirane stanice i bakterije ostaju dobro i dugo skrivene, što se svakako odražava i na tijek takve infekcije.

Pošto su molekule MHC-I razreda izražene na gotovo svim stanicama, CD8⁺ T limfociti imaju značajnu ulogu obrane u cijelom organizmu. To je od posebne važnosti za one intracelularne bakterije koje se kriju u MHC-II negativnim stanicama domaćina. Međutim, mehanizam koji prethodi MHC-I ovisnom prepoznavanju bakterijskih antigena, još je nejasan. Najveći dio informacija, do sada, prikupljen je upravo na modelu eksperimentalne listerioze. Kao što je poznato *L.monocytogenes* napušta endosom i ulazi u citoplazmu inficirane stanice (27). Kada se jednom nađe u citoplazmi, njeni antigeni uključuju obrazac MHC-I ovisnog prepoznavanja, aktivirajući CD8⁺ T limfocite. (28,32,33) Iako ova situacija objašnjava istaknutu ulogu CD8⁺ T stanica tijekom listerioze, nije sasvim razjašnjeno na koji su način uključene u obrani domaćina od infekcija uzrokovanih onim intracelularnim bakterijama koje zaostaju unutar fagosoma, kao *M.bovis* i *S.typhimurium* (34,35).

2.4.2.2 γ/δ T stanice

Limfociti označeni γ/δ T staničnim receptorom (TCR - T cell receptor), prisutni su u daleko manjem broju u perifernom limfoidnom tkivu nego oni označeni α/β biljegom. γ/δ TCR uočava se na svega 1-3% zrelih timocita, te na 1-5% od ukupnog broja T limfocita u normalnoj perifernoj krvi (15). Ove stanice obično izražavaju $CD3^+CD4^-CD8^-$ ili $CD3^+CD4^+CD8^+$ fenotip. Stanice su pronađene u različitim anatomskim područjima, kao što je koža (1), crijeva (2,3) i reproduktivni organi. Precizna uloga γ/δ T limfocita u obrani organizma još uvijek nije razjašnjena. Dokazano je da mogu producirati neke limfokine, uključujući interferon- γ (IFN- γ), faktor tumorske nekroze- α (TNF- α), i u nekim slučajevima interleukin-2 (IL-2), kao i da se njihov broj povećava u perifernoj krvi i na mjestima upalnog odgovora tijekom nekih infekcija. Na primjer TCR γ/δ^+ stanice nađene su u povećanom broju za vrijeme akutne infekcije uzrokovane Epstein-Barr-ovim virusom (7), u zglobnoj tekućini pacijenata s juvenilnim reumatoidnim artritismom (9), u infekcijama uzrokovanim mikobakterijama i listerijama (10,11).

3.1. P...

U. rad...

cofin...

U. rad...

vezik...

prema

genom

prom...

količin...

T. lin...

Statist...

uzg...

hran...

Slov...

3. MATERIJALI I METODE

3.2

1.

2.

3.

4.

3.1. Pokusne životinje

U radu su korištena 3 različita soja laboratorijskih miševa: BALB/c (H-2d), C57Bl/6 (H-2b), te transgenični miševi sa nedostatkom beta-2 mikroglobulina ($\beta_2m^{-/-}$ - H-2b). Soj BALB/c poznat je kao genetski osjetljiv, a C57Bl/6 rezistentan na infekciju uzrokovanu *L.monocytogenes*. Ova razlika u osjetljivosti prema *L.monocytogenes* kontrolirana je jednim dominantnim, uz H₂ nevezanim genom nazvanim Lr (listeria resistance) (21,156). Soj $\beta_2m^{-/-}$ (C57Bl/6 soj s "promijenjenim" genom za β_2 mikroglobulin) miševa izražava vrlo malu količinu molekula I razreda MHC i stoga mu nedostaje subpopulacija CD8⁺ T limfocita (82,158).

Starost svih korištenih životinja kretala se od 5 do 9 tjedana. Miševi su uzgojeni u uzgojnoj koloniji u vivariju Medicinskog fakulteta u Rijeci, a hranjeni su hranom za miševe, koje proizvodi Biotehnički fakultet Domžale, Slovenija.

3.2. Bakterijski soj

U radu je korištena *Listeria monocytogenes* EGD soj, dobivena iz Klinike za infektivne bolesti u Leidenu, Nizozemska. Virulentnost soja održavana je povremenom pasažom kroz BALB/c miševe, te uzgojem iz homogenizata slezene inficirane životinje.

3.3. Priprema bakterijske suspenzije za inokulaciju

Bakterijska suspenzija pripremana je, nakon uzgaja na krvnom agaru na 37°C kroz 24 sata, u tripton bujonu. Inkubacijom bujona na 37°C kroz 4 sata, *L.monocytogenes* dovedena je u fazu logaritamskog rasta i tada je suspenzija razdijeljena u alikvote od po 1 ml u Ependorf kontejnere, te smrznuta do upotrebe. Prije injiciranja, epruveta je uz rotaciju inkubirana na 37°C tijekom 2 sata. Približan broj bakterija određivan je spektrofotometrijski uz valnu duljinu 540 nm, neposredno prije inokulacije, a u isto vrijeme je serijskim desetorostrukim razrijeđenjima i nasadivanjima na krvni agar određivan i točan broj živih bakterija u suspenziji. Doza inokuluma iznosila je $2,5 \times 10^4$ CFU *L.monocytogenes* u 0,2 ml sterilne fiziološke otopine, a injicirana je pokusnim životinjama intravenski (i.v.) u lateralnu repnu venu.

3.4. Određivanje titra *L.monocytogenes* u organima miša

Miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom. Jetra i slezena, te po potrebi i drugi organi, aseptično su odstranjeni. Svaki je organ propasiran kroz čeličnu mrežicu u 5 ml sterilne fiziološke otopine. Nakon centrifugiranja na 3000 okretaja kroz 5 minuta, supernatant je odstranjen, a talog resuspendiran u 5 ml sterilne destilirane vode i ostavljen 15 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice su isprane u fiziološkoj otopini, resuspendirane u 5 ml tripton bujona

(osnovno razrjeđenje), te dalje desetorostruko razrjeđene. Iz osnovnog kao i iz svakog slijedećeg razrjeđenja $6 \times 10 \mu\text{l}$ nakapano je na krvni agar. Nasadne ploče, kao i osnovno razrjeđenje homogeniziranog organa, inkubirane su na 37°C kroz 24 sata. Sljedeći dan očitao je broj poraslih kolonija. Ukoliko nije bilo porasta nasadivano je osnovno razrjeđenje, da bi se utvrdilo prisustvo bakterije.

3.5. Monoklonska protutijela

Monoklonska protutijela korištena u svrhu deplecije pojedinih staničnih populacija, dijelom su dobivena sa Zavoda za fiziologiju i imunologiju, a dijelom proizvedena u Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci iz uzgojnih hibridomskih linija: YTS 191.1.2. (štakorsko IgG2b protutijelo na mišju CD4 molekulu), YTS 169.4.2. (štakorsko IgG2b protutijelo na mišju CD8 molekulu), te PK-136 (mišje protutijelo na mišju NK-1 molekulu). Monoklonska protutijela su djelomično pročišćena dvostrukom precipitacijom imunoglobulina na zasićenoj otopini amonij sulfata (50%-tna otopina), a zatim ekstenzivno dijalizirana kroz dijalizacijsku membranu (propusnost 18000 D) u PBS-u. Koncentracija protutijela određivana je radijalnom imunodifuzijom (RID, Serotec, Oxford, England) ili enzimatskim imunoabsorbentnim testom (ELISA). Pročišćena protutijela alikvotirana su i pohranjena na -30°C . Protutijela su injicirana intraperitonealno u koncentraciji od 0.2 do 1 mg po životinji.

3.6. Selektivna deplecija pojedinih limfocitnih populacija in vivo

Deplecija pojedinih populacija ($CD4^+$, $CD8^+$, kombinacija $CD4^+$ i $CD8^+$, NK) stanica izvodena je metodom po Cobboldu (22). Sa deplecijom limfocitnih subpopulacija započeto je primjenom odgovarajućih monoklonskih protutijela dan prije infekcije miševa. Postupak intraperitonealnog injiciranja monoklonskih protutijela ponavljan je svakog petog dana do kraja eksperimenta.

Učinkovitost deplecije provjerena je metodom direktne i indirektno imunofluorescencije na protočnom citometru (FACScan, Becton-Dickinson) (73).

3.7. Praćenje učinka *L.monocytogenes* na plod

Da bi mogli pratiti utjecaj *L.monocytogenes* na razvoj fetusa, ženke BALB/c miševa podijeljene su u tri skupine. Prva skupina bila je inficirana listerijom dva dana prije fertilizacije, druga između drugog i sedmog dana, a treća između jedanaestog i šesnaestog dana trudnoće. Prvi dan trudnoće određivan je na temelju nalaska vaginalnog čepa.

Trudne ženke iz svih spomenutih skupina, kao i trudne neinficirane ženke, žrtvovane su između sedamnaestog i devetnaestog dana trudnoće. Određivan je broj živih fetusa (na temelju pokreta ekstremiteta, pulsacije), makroskopske

promijene i prisustvo *L.monocytogenes* u organima gravidnih i kontrolnih životinja.

3.8. Histološki pregled

Dijelovi tkiva makroskopski promijenjenih organa (jetra, slezena, uterus, resorbirani fetalni ostaci, placenta), podvrgnuti su tehničkoj obradi, da bi se dobili histološki preparati. Tkivo je fiksirano 10% formalinom, proveden je parafinski postupak, te su nakon toga na kliznom mikrotomu rezani odresci debljine 6 μ m, i bojeni standardnim hemalaun-eozinskim bojenjem (136).

3.9. Statistička obrada i prikaz podataka

Razlike u vrijednostima titra *L.monocytogenes* u jetri i slezeni uspoređivane su Mann-Whitney-ovim- U testom. Rezultati su prikazani grafički i tabelarno. Svaka pojedinačna točka predstavlja medijanu vrijednost dobivenu testiranjem tri do pet životinja (organa) po skupini, izraženu u log₁₀ CFU po organu. U tablicama su prikazane i najniže i najviše vrijednosti pojedinih titrova *L.monocytogenes*, koje su izostavljene iz grafikona radi bolje preglednosti. Dužina trajanja infekcije testirana je Student-ovim *t*-testom. Sve statistički značajne razlike na razini su od 5%.

4.1.

Ispit

da

Zivot

listo

zrtv

drug

mit

prosv

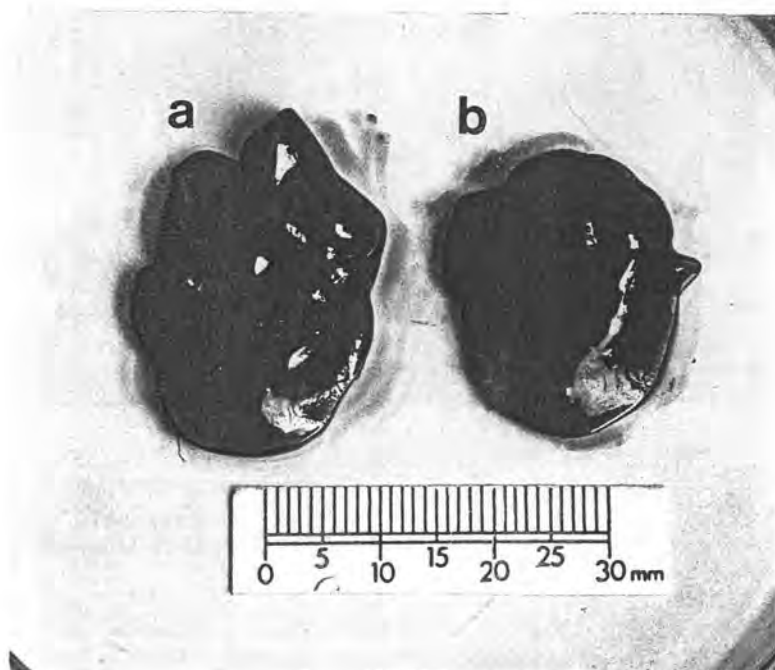
Slav

4. REZULTATI

4.1. Tijek primarne listerioze u BALB/c, C57Bl/6 i $\beta_2m^{-/-}$ miševa

Ispitana je sposobnost genetički čistih sojeva C57Bl/6, BALB/c i $\beta_2m^{-/-}$ miševa, da savladaju primarnu infekciju uzrokovanu s *L.monocytogenes*. Sve su životinje injicirane intravenski s 2.5×10^4 CFU listerije. Praćen je tijek listerioze, to jest dužina trajanja infekcije, te titar listerija u jetri i slezeni žrtvovanih životinja. Organi su pregledani i makroskopski te histološki. Već drugi dan nakon početka eksperimentalne listerioze, u svih ispitanih sojeva miševa, mogle su se uočiti promjene na jetri u vidu izražene hepatomegalije i promjene boje (slika 1).

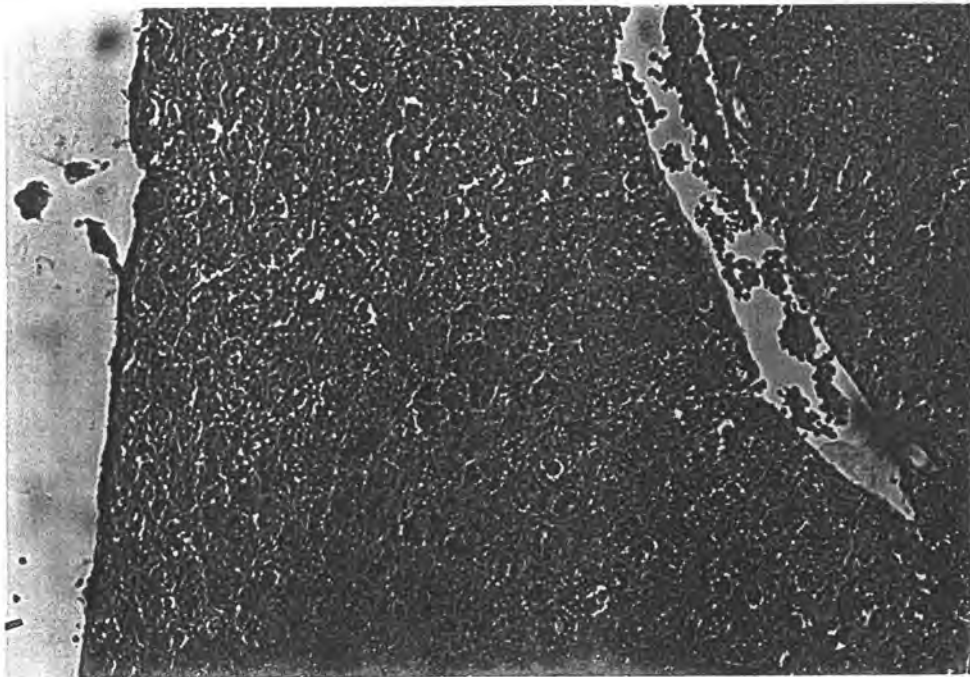
Slika 1. Makroskopski izgled jetre BALB/c miševa



Dva dana nakon infekcije s *L.monocytogenes* jetra (a) je makroskopski povećana, održane arhitektonike, ali blijeda (svjetlosmeđe boje) i mekše konzistencije u odnosu na kontrolu (b).

U histološkom preparatu jetre tijekom drugog i trećeg dana infekcije, uočavaju se žarišta upalnog infiltrata (slika 2.), koja postepeno nekrotiziraju. Nekrotična žarišta jasno su vidljiva u mikroskopskom preparatu (slike 3A. i 3B.), ali i makroskopski u vidu bijelo-žućkastih čvorića koji prosijavaju na površini inficiranog organa.

Slika 2. Histološki preparat iz jetre BALB/c miševa nakon infekcije s *L.monocytogenes* (povećanje 100x)

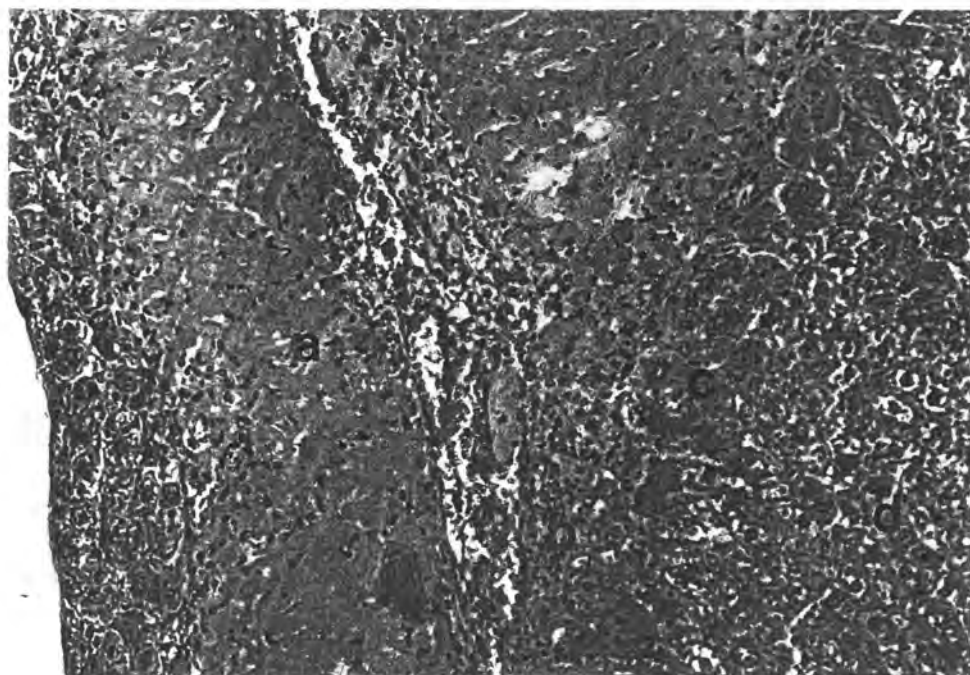


Dva dana nakon infekcije s *L.monocytogenes* u tkivu jetre, među gredicama očuvanih hepatocita, uočava se žarište upalnog infiltrata. Nakupina neutrofila označena je strelicama.

Slike 3A. i 3B. Histološki preparat iz jetre BALB/c miševa nakon infekcije s *L.monocytogenes* (povećanje A=100x, B=400x)



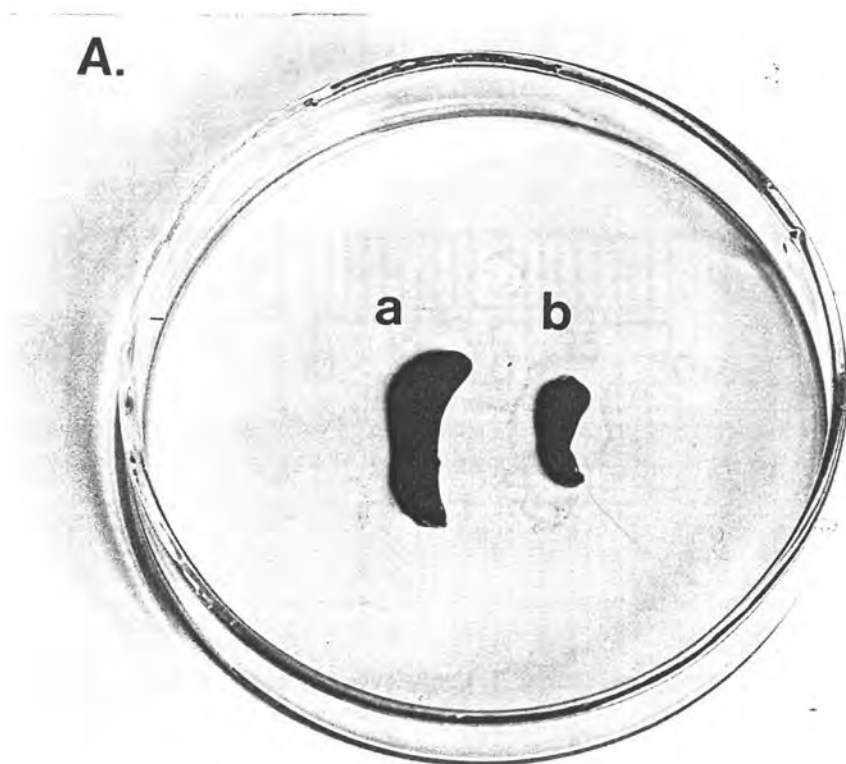
Pet dana nakon infekcije s *L.monocytogenes* u tkivu jetre uočava se žarište nekroze (a) okruženo infiltratom neutrofila (b).



Na većem povećanju uočava se nekrotično žarište (a) okruženo bedemom neutrofila (b). Na granici prema zdravom tkivu jetre (d), vide se obrisi nabubrenih hepatocita s grubozrnatom citoplazmom (c) izrazito obojenom eozinom.

Listerioza slezene se očitovala izrazitim povećanjem, tamnijom bojom i čvršćom konzistencijom ovog organa. Navedene makroskopske promjene prikazane su slikama 4A. i 4B.

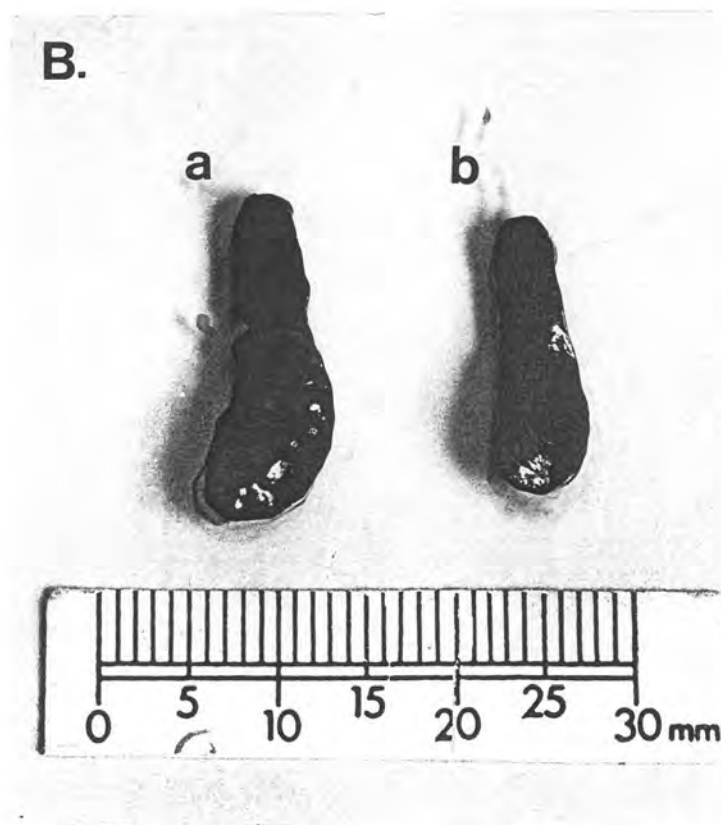
Slika 4A. Makroskopski izgled slezene BALB/c miševa nakon infekcije s *L.monocytogenes*



Dva dana nakon injiciranja *L.monocytogenes*, slezena inficirane životinje (a) izrazito je povećana u odnosu na kontrolu (b).

Slika 4B. Makroskopski izgled slezene BALB/c miševa nakon infekcije s

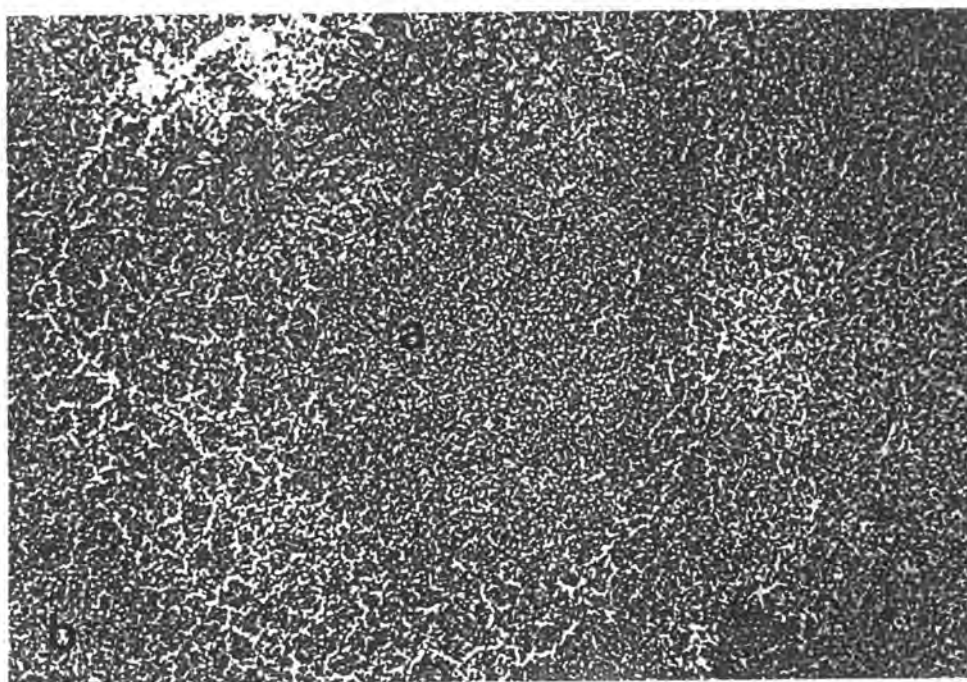
L.monocytogenes



Uz splenomegaliju slezena inficirane životinje (a) znatno je tamnija (tamnoljubičasta do crna) naspram kontrolnog (b) organa.

Mikroskopskim pregledom histoloških preparata, od trećeg dana infekcije u tkivu slezene mogu se uočiti apscesi kao što je i vidljivo na slici 5.

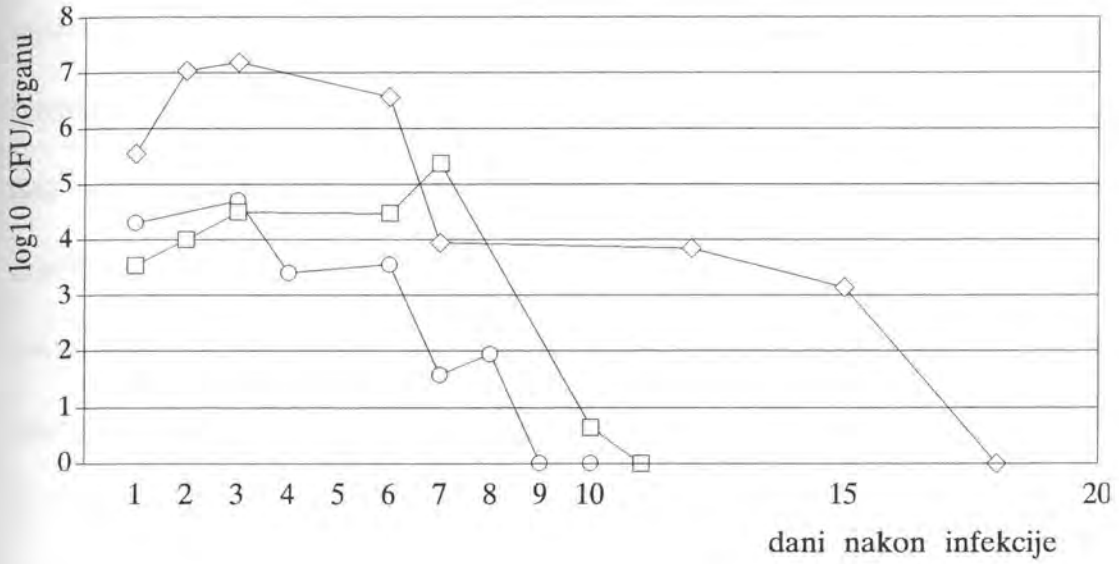
Slika 5. Histološki preparat iz slezene BALB/c miša nakon infekcije s *L.monocytogenes* (povećanje 100x)



U tkivu slezene vidi se veće područje apscesa (a) s nekrotičnim detritusom u centru. Na periferiji uočava se održano tkivo slezene (b).

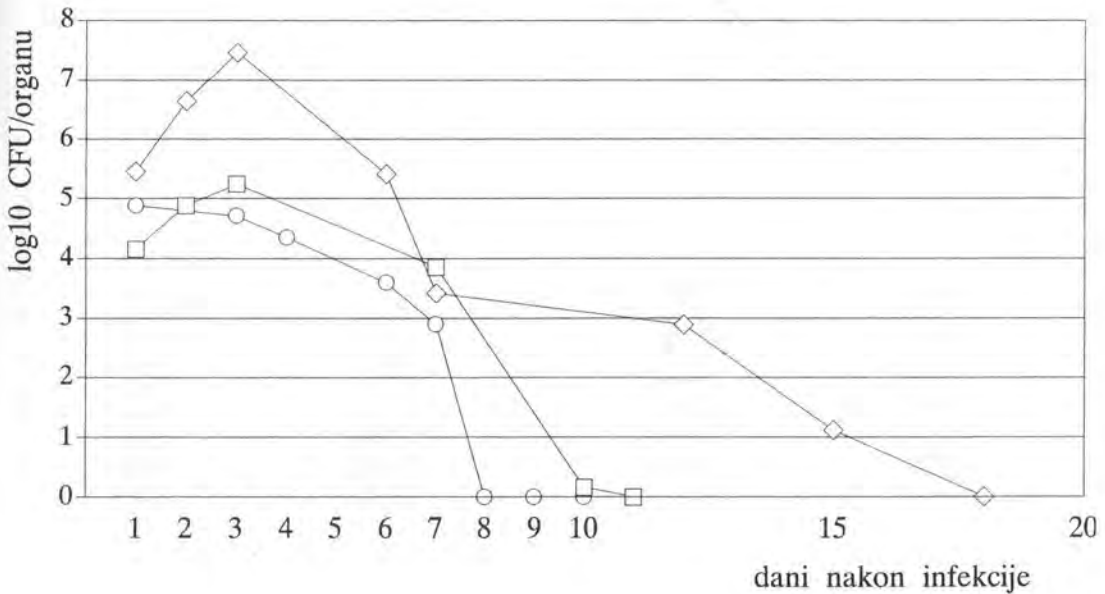
Tijek infekcije, odnosno brzina iščišćavanja *L.monocytogenes* iz jetre i slezene ispitivanih sojeva laboratorijskih miševa, prikazani su grafikonima 1. i 2.

Grafikon 1. Krivulja rasta *L.monocytogenes* u jetri ispitivanih sojeva miševa



Legenda: CFU listerija određivanih u jetri BALB/c (o), C57Bl/6 (□) i β₂m^{-/-} (◇) miševa

Grafikon 2. Krivulja rasta *L.monocytogenes* u slezeni ispitivanih sojeva

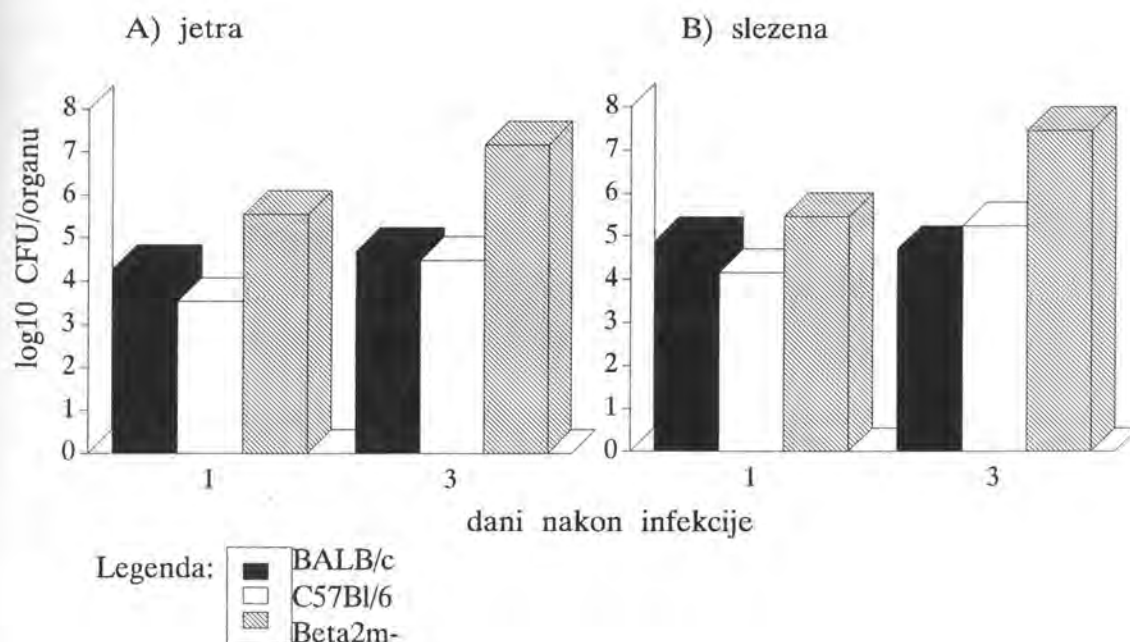


Legenda: CFU listerija određivanih u slezeni BALB/c (o), C57Bl/6 (□) i β₂m^{-/-} (◇) miševa

Primarna infekcija s *L.monocytogenes* najkraće traje u BALB/c životinja, najkraće u odnosu na ostale sojeve. Naime, devetog dana nakon injiciranja ne može se više izolirati *L.monocytogenes* niti iz jetre, niti iz slezene ovih životinja. Primarna listerioza traje podjednako dugo i u C57Bl/6 miševa. Svega dan kasnije nego u BALB/c miševa, dolazi do završetka infekcije i u organima ovoga soja. U $\beta_2m^{-/-}$ životinja infekcija je produžena do osamnaestog dana, kada je, unatoč genetskom nedostatku $CD8^+$ limfocita, listerija sterilno isčišćena iz jetre i slezene.

U sva tri soja laboratorijskih miševa može se uočiti postepeni porast titra bakterija od prvog do trećeg dana infekcije, kada dostiže maksimalne vrijednosti. Grafikonom 3. zorno su prikazani ovi rezultati.

Grafikon 3. Titar *L.monocytogenes* u prvom i trećem danu infekcije u A)jetri i B)slezenu BALB/c miševa



Vidi se da je tijekom inicijalne faze infekcije u jetri, titar listerije bio najniži u C57Bl/6 miševa, a tek neznatno viši u BALB/c životinja. Dok taj fenomen uočavamo u jetri kroz cijelo trodnevno razdoblje, u slezeni se već drugog dana broj CFU *L.monocytogenes* izoliran iz C57Bl/6 izjednačava s onim dobivenim u BALB/c miševa, da bi treći dan pokazivao čak i nešto više vrijednosti.

Tablica 3. Vrijednosti titra izolirane *L.monocytogenes* iz organa ispitanih sojeva miševa

Dani nakon infekcije	BALB/c		C57Bl/6		$\beta_2m^{-/-}$	
	jetra	slezena	jetra	slezena	jetra	slezena
1	4.306* 3.03-5.96**	4.89 4.35-5.62	3.482 3.4-3.82	4.193 4-4.28	5.489 5.45-5.67	5.452 5.3-5.74
3	4.709 3.62-6.32	4.703 4.45-5.02	4.584 4-4.75	5.18 5.15-5.43	7.144 7.12-7.32	7.53 7.23-7.61
6	3.553 0-4.22	3.588 3.2-4.23	4.362 4.32-4.82	3.29 3.12-3.7	6.48 6.1-6.99	5.38 5.15-5.68
7	1.582 0-2.52	2.89 1.92-3.1	5.51 4.96-5.55	3.96 3.5-4.03	4 3.7-4.01	3.4 3.35-3.52

* medijane vrijednosti titra *L.monocytogenes* izražene u \log_{10} CFU po organu

** raspon najnižih i najviših vrijednosti titra *L.monocytogenes* izražene u \log_{10} CFU po organu

Razlika titra *L.monocytogenes* u slezeni i jetri $\beta_2m^{-/}$ miševa više su za 0.5 odnosno 2 \log_{10} CFU prvog, te 1.5 odnosno 3 \log_{10} CFU trećeg dana od injiciranja, u odnosu na one dobivene u C57Bl/6 i BALB/c sojeva. Točne medijane vrijednosti titra, kao i minimalne i maksimalne vrijednosti, dobivene prvog i trećeg, te šestog i sedmog dana, prikazane su u tablici 3., za svaki obrađeni organ i za svaki soj laboratorijskih miševa. Naglašene su upravo vrijednosti u prvom i trećem danu, jer karakteriziraju incijalnu fazu infekcije, kada u obrani organizma sudjeluju prvenstveno nespecifični mehanizmi imunosti, te šesti i sedmi dan od injiciranja, koje karakterizira mobilizacija specifičnih imunskih mehanizama i, najčešće, postupno opadanje titra *L.monocytogenes* u jetri i slezeni svih ispitanih miševa.

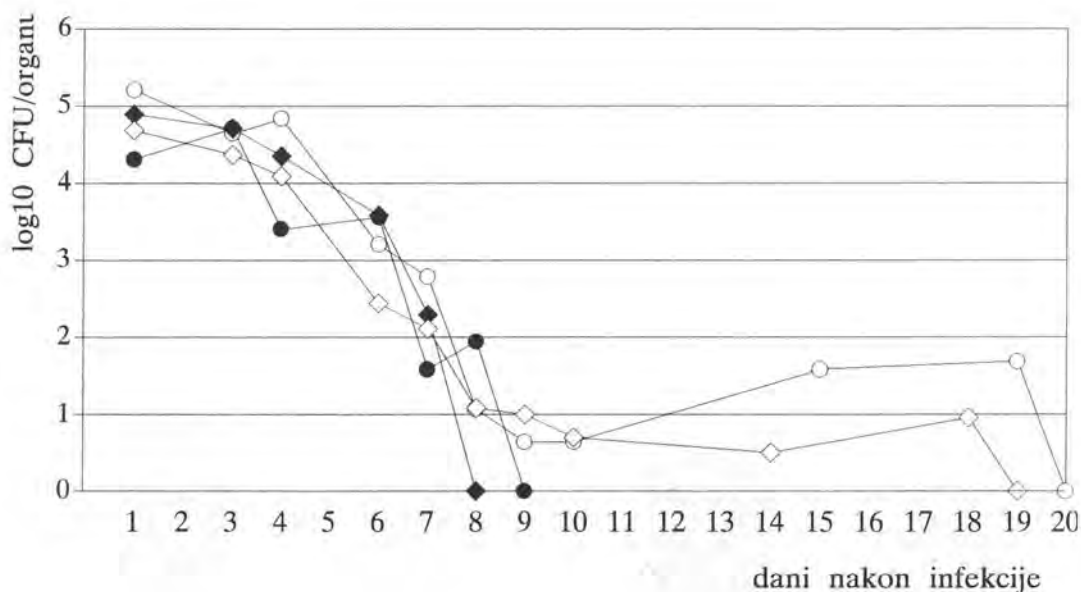
4.2. Učinak T stanične deplecije na tijek primarne listerioze u BALB/c miševa

4.2.1. Učinak in vivo deplecije CD4⁺ limfocita na klirens *L.monocytogenes*

CD4⁺ deficijentni BALB/c miševi bili su sposobni sterilno isčistiti *L.monocytogenes* iz jetre i slezene, kao što se vidi u grafikonu 4. Ipak, dužina infekcije je statistički značajno produljena u oba organa ($P < 0.05$) u odnosu prema kontrolnoj skupini. Naime, dok kod normalnih životinja, osmog odnosno devetog dana od početka pokusa nije više bilo moguće izolirati listerije niti iz jetre niti slezene, u CD4⁺ deficijentnih životinja, kultivacijom

homogenata organa dobivali smo porast karakterističnih kolonija *L.monocytogenes* do devetnaestog odnosno dvadesetog dana po injiciranju bakterije.

Grafikon 4. Tijek primarne listerioze u BALB/c miševa nakon in vivo deplecije CD4⁺ T stanica

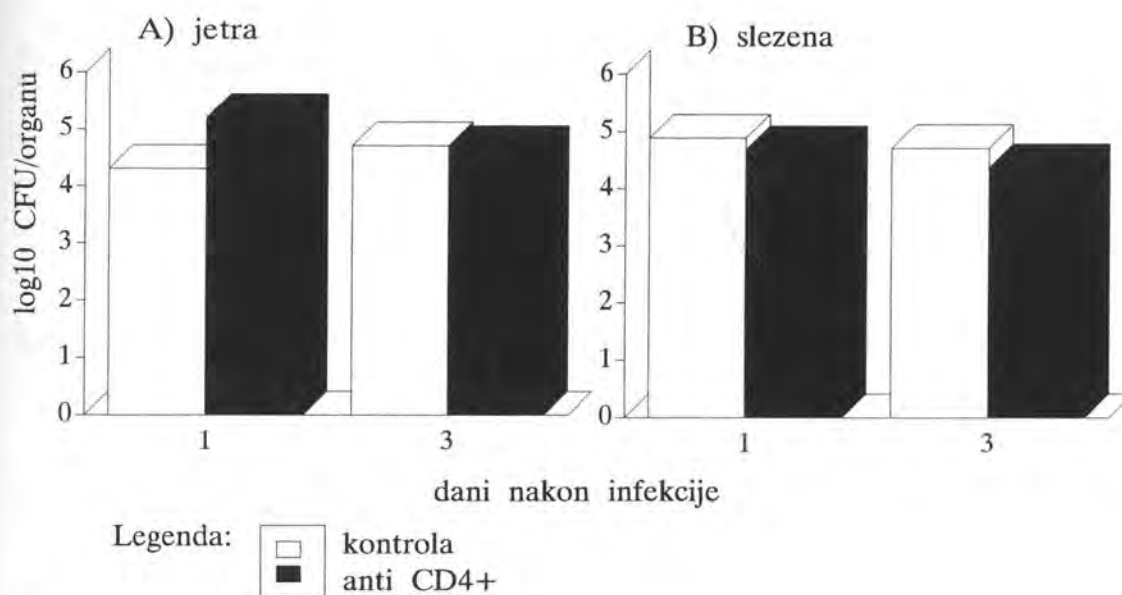


Legenda: CFU listerije određivanih u jetri kontrolnih (●) i CD4⁺ depletiranih (○) životinja, te slezeni kontrolnih (◆) i CD4⁺ depletiranih (◇) životinja

Razlike titra u inicijalnoj fazi infekcije prikazane su na grafikonu 5., a apsolutne vrijednosti predočene su tabelarno (tablica 4.). Dok je u jetri titar *L.monocytogenes* viši u depletiranih životinja, u slezeni je prisutna sasvim

obrnuta slika. I prvog i trećeg dana infekta manji je broj bakterija izoliran iz slezene miševa tretiranih anti CD4⁺ monoklonskim protutijelima, nego iz kontrolnih životinja. Ovakav je odnos prisutan sve do sedmog dana infekcije, kada u kontrolnih životinja titar naglo opada, dok niske vrijednosti titra perzistiraju u depletiranih životinja do devetnaestog dana.

Grafikon 5. Vrijednosti titra *L.monocytogenes* izolirane iz A) jetre i B) slezene kontrolnih i CD4⁺ depletiranih BALB/c miševa



Tablica 4. Vrijednosti titra *L.monocytogenes* dobivenih iz organa kontrolnih i CD4⁺ depletiranih BALB/c miševa

Dani nakon infekcije	kontrola		anti CD4 ⁺	
	jetra	slezena	jetra	slezena
1	4.306* 3.03-5.96**	4.89 4.35-5.62	5.22 4.-7	4.685 4.3-5.77
3	4.709 3.62-6.32	4.703 4.45-5.02	4.641 4.18-4.85	4.366 4.07-4.48
6	3.553 0-4.22	3.588 3.2-4.23	3.201 0-3.78	2.445 0-3.34
7	1.582 0-2.52	2.89 1.92-3.1	2.783 0-6.12	2.115 1.92-2.4

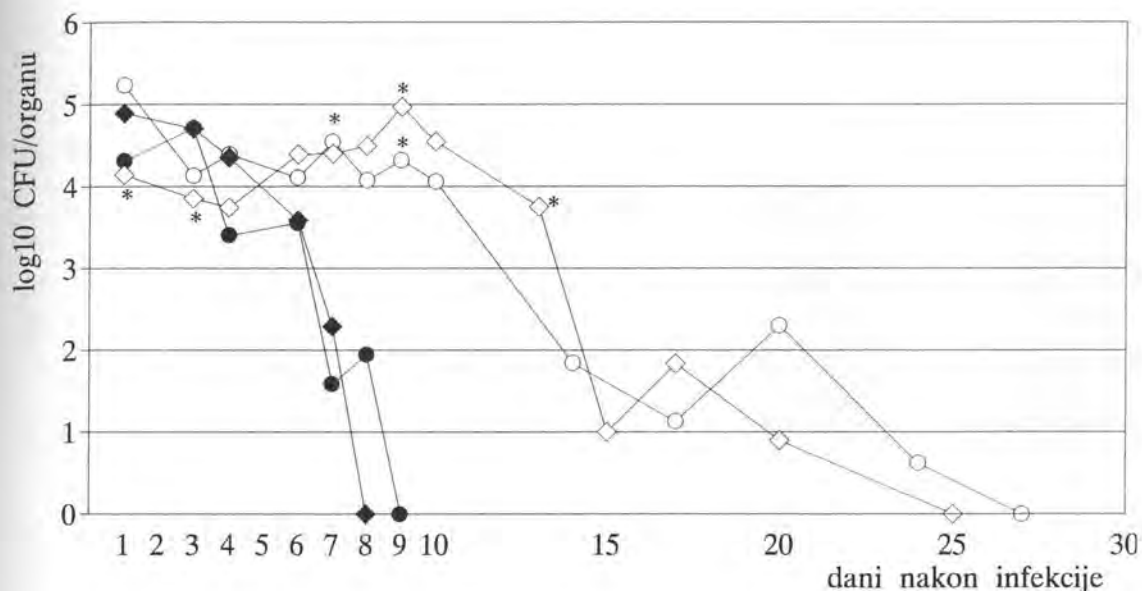
* medijane vrijednosti titra *L.monocytogenes* izražene u log₁₀ CFU po organu

** raspon najnižih i najviših vrijednosti titra *L.monocytogenes* izražene u log₁₀ CFU po organu

4.2.2. Učinak in vivo deplecije CD8⁺ limfocita na klirens *L.monocytogenes*

Iz grafikona 6. jasno je vidljivo, da niti deplecija CD8⁺ limfocita ne sprečava BALB/c miševe da u potpunosti eliminiraju *L.monocytogenes* iz jetre i slezene.

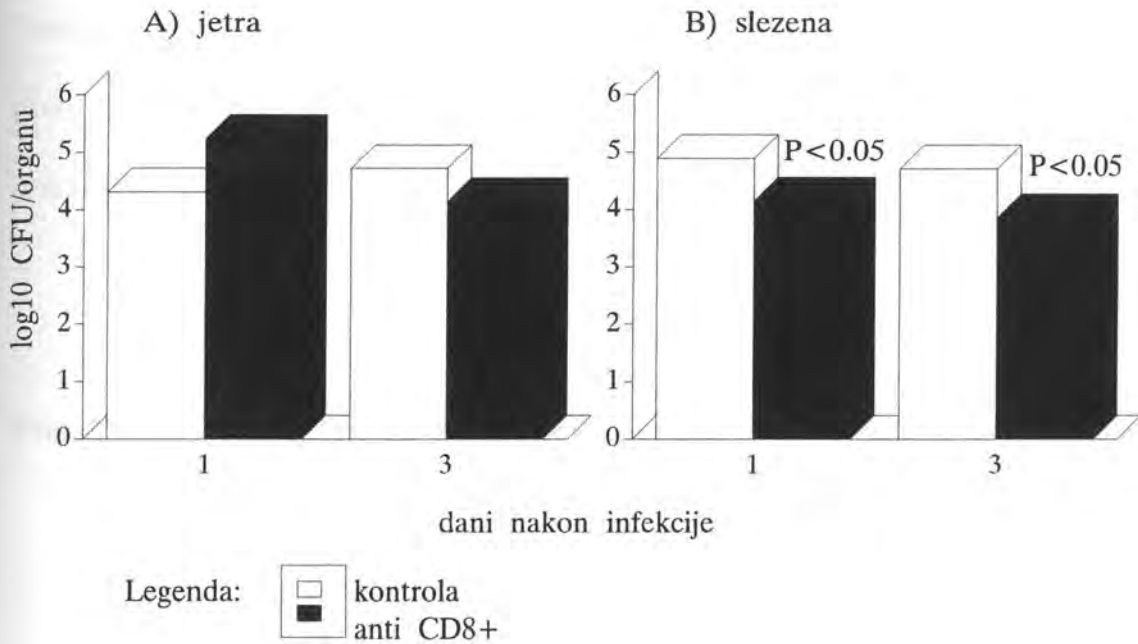
Grafikon 6. Tijek primarne listerioze u BALB/c miševa nakon selektivne delecije CD8⁺ limfocita



Legenda: CFU listerije određivanih u jetri kontrolnih (●) i CD8⁺ depletiranih (○) životinja, te slezeni kontrolnih (♦) i CD8⁺ depletiranih (◇) životinja.
* statistički značajna razlika (P<0,05)

Međutim, u nedostatku CD8⁺ T stanica, infekcija traje značajno dulje, i to 25 dana u slezeni, odnosno 27 dana u jetri, naspram 8 do 9 dana u kontrolnoj skupini životinja. U prvom danu nakon injiciranja, što je stupcima prikazano u grafikonu 7., niži je titar *L.monocytogenes* u slezeni anti CD8⁺ tretiranih životinja. Isto se uočava i treći dan od početka infekcije kada je razlika i statistički značajna (p<0.05).

Grafikon. 7. Titar *L.monocytogenes* u A) jetri i B) slezeni kontrolnih i anti CD8⁺ tretiranih BALB/c miševa



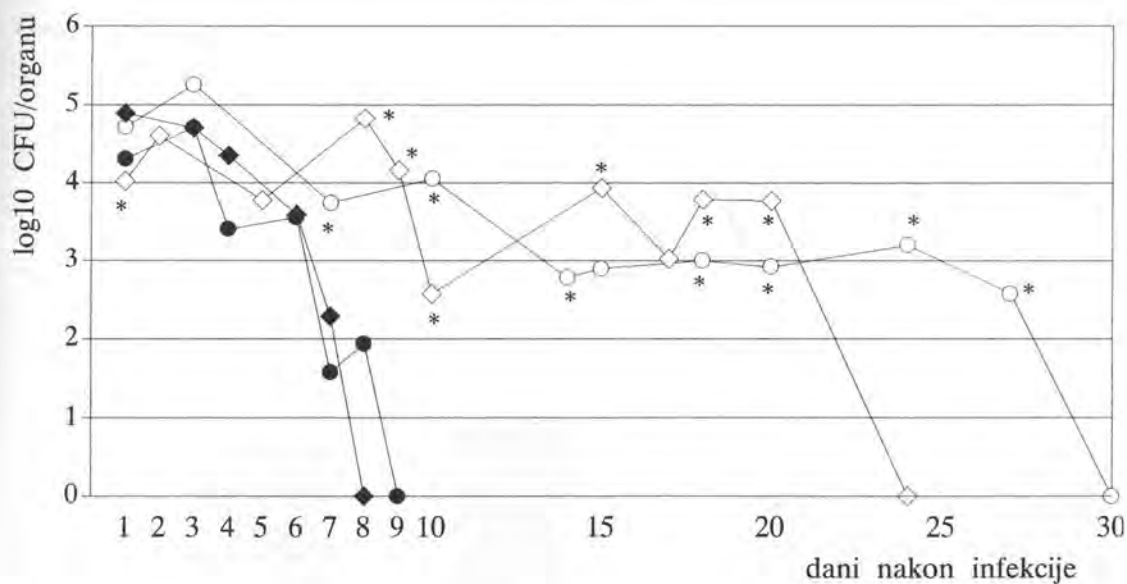
Prvog dana nakon inficiranja, u jetri je titar bakterija viši u depletiranih miševa, da bi se trećeg dana odnos promijenio. Od šestog do petnaestog dana nakon infekcije u organima tretiranih životinja perzistira visok broj *L.monocytogenes*. Tijekom ovog razdoblja broj bakterija kretao se od 4 do 5 log₁₀ CFU po organu. Petnaestog dana titar značajno pada i do završetka infekta iznosi u prosjeku 1.5 log₁₀ CFU listerije po organu.

4.2.3. Učinak in vivo deplecije CD4⁺ i CD8⁺ limfocita

na klirens *L.monocytogenes*

Trajanje listerioze nakon intraperitonealnog davanja kombinacije monoklonskih protutijela uz posljedičnu depleciju i CD4⁺ i CD8⁺ T staničnih subpopulacija, prikazano je na grafikonu 8.

Grafikon 8. Tijek primarne listerioze u BALB/c miševa nakon kombinirane deplecije CD4⁺ i CD8⁺ T limfocitnih subpopulacija

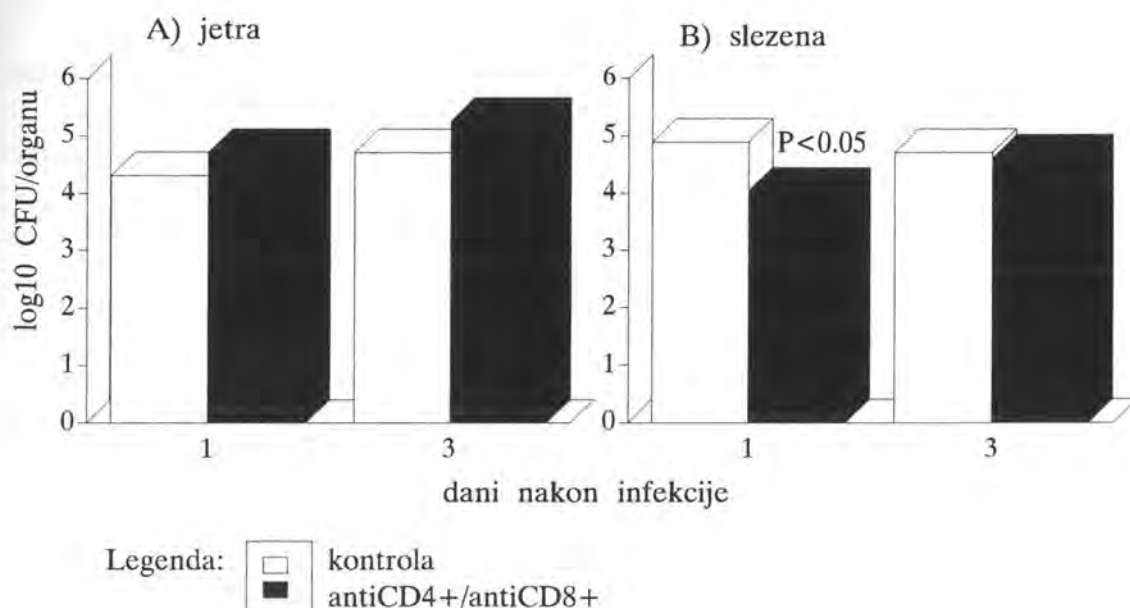


Legenda: CFU listerije određivanih u jetri kontrolnih (●) i CD4⁺/CD8⁺ depletiranih (○) životinja, te slezeni kontrolnih (◆) i CD4⁺/CD8⁺ depletiranih (◇) životinja.
* statistički značajna razlika (P<0,05)

Nedostatak obiju subpopulacija T limfocita još više produžuje trajanje primarne infekcije uzrokovane s *L.monocytogenes*, nego u prethodno opisanih, selektivno, CD4⁺ ili CD8⁺, depletiranih skupina. U slezeni BALB/c miševa bez CD4⁺ i CD8⁺ limfocita, listerioza traje 24, a u jetri čak 30 dana. Istovremeno, tijekom cijelog razdoblja u organima tretiranih životinja perzistira visok titar listerija (od 3 do 4 log₁₀ CFU), koji naglo opada tek pri kraju infekcije. Ipak i ovakav drastični nedostatak T limfocita, ne onemogućava sterilno isčišćavanje bakterija iz spomenutih organa domaćina.

Inicijalna faza infekcije slična je onoj u skupini miševa in vivo depletiranih samo od CD8⁺ stanica, što se može vidjeti iz grafikona 9.

Grafikon 9. Titar *L.monocytogenes* u A) jetri i B) slezeni BALB/c miševa tretiranih kombinacijom monoklonskih protutijela



Titar *L.monocytogenes* statistički je značajno niži u slezeni CD4⁺ i CD8⁺ depletiranih miševa nego u kontrolnih BALB/c miševa. U jetri nije prisutan ovaj fenomen.

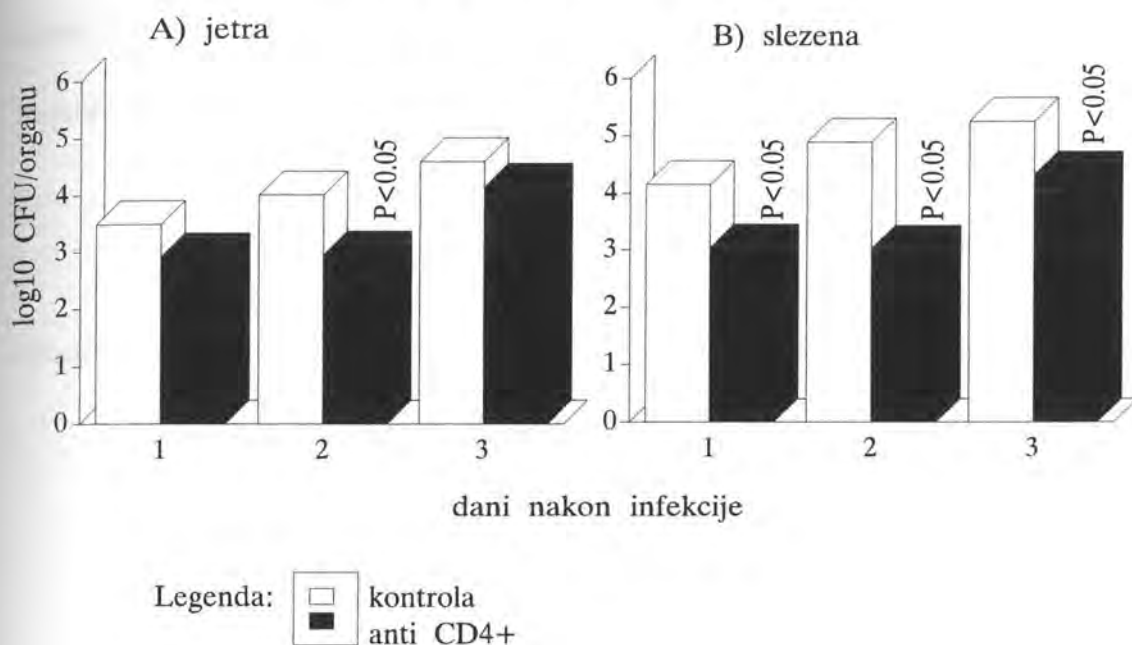
4.3. Tijek primarne *L.monocytogenes* infekcije u C57Bl/6 miševa nakon selektivne deplecije CD4⁺, CD8⁺ ili NK stanica

4.3.1. Učinak in vivo deplecije CD4⁺ limfocita na klirens *L.monocytogenes*

Kada smo C57Bl/6 miševima injicirali anti CD4⁺ monoklonska protutijela, uočen je značajno niži titar *L.monocytogenes* u ovih depletiranih životinja u početnoj fazi infekcije.

Kao što se vidi iz grafikona 10., titar bakterija u jetri i slezeni CD4⁺ depletiranih životinja pokazuje porast od prvog do trećeg dana infekcije, ali je u svakom slučaju cijelo vrijeme niži nego u kontrolnoj skupini. Razlika je statistički značajna drugog i trećeg dana. Medijane, minimalne i maksimalne vrijednosti titra prikazane su na tablici 5.

Grafikon 10. Titar *L.monocytogenes* iz A) jetre i B) slezene C57Bl/6 miševa nakon deplecije CD4⁺ limfocita



Tablica 5. Vrijednosti titra *L.monocytogenes* dobiveni iz organa kontrolne i CD4⁺ depletirane skupine miševa C57Bl/6 soja

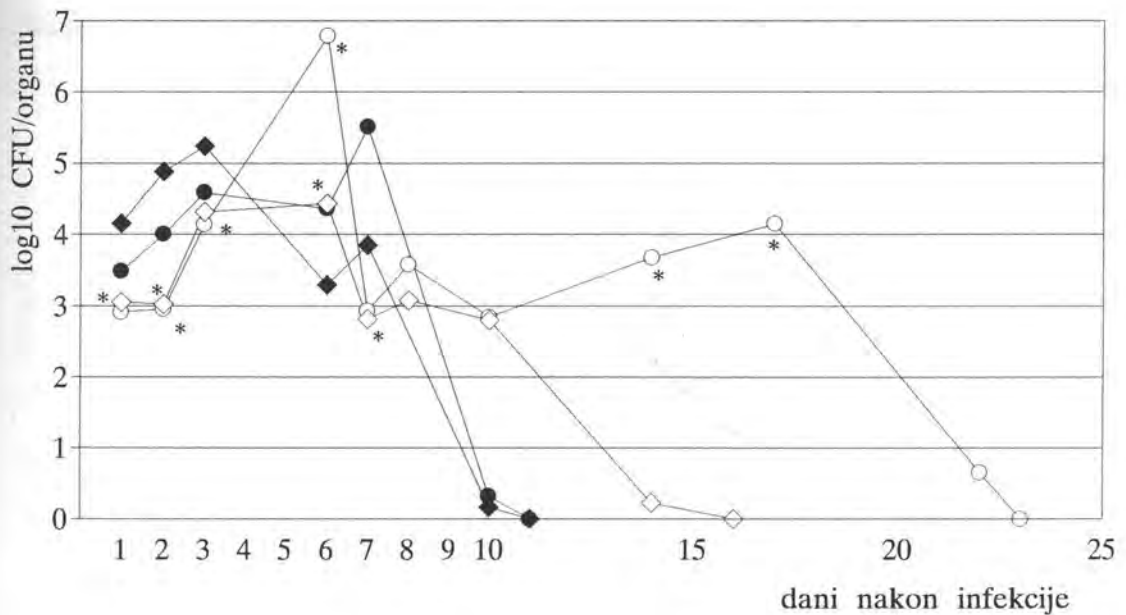
Dani nakon infekcije	kontrola		anti CD4 ⁺	
	jetra	slezena	jetra	slezena
1	3.482* 3.4-3.82**	4.193 4-4.28	2.912 0-4.43	2.984 1.92-4.3
2	4 3.92-4.07	4.902 4.73-5	2.95 2.75-3	3 2.98-3.15
3	4.584 4-4.75	5.18 5.15-5.43	4.138 3.88-4.68	4.307 3.92-4.72
6	4.362 4.32-4.82	3.29 3.12-3.7	6.788 4.92-7.2	3.92 3.34-6.55
7	5.51 4.96-5.55	3.96 3.5-4.03	2.93 0-4.34	2.88 2.22-3.22

* medijane vrijednosti titra *L.monocytogenes* izražene u log₁₀ CFU po organu

** raspon najnižih i najviših vrijednosti titra *L.monocytogenes* izražene u log₁₀ CFU po organu

Sam tijekom primarne listerioze u kontrolnih i CD4⁺ depletiranih C57Bl/6 miševa prikazan je grafikonom 11. Ovako tretirani C57Bl/6 miševi također su sposobni sterilno eliminirati *L.monocytogenes* iz svojeg organizma, ali uz duže trajanje infekcije (17 dana u slezeni i 23 dana u jetri).

Grafikon 11. Tijek primarne listerioze u C57Bl/6 miševa nakon selektivne deplecije CD4⁺ T limfocita

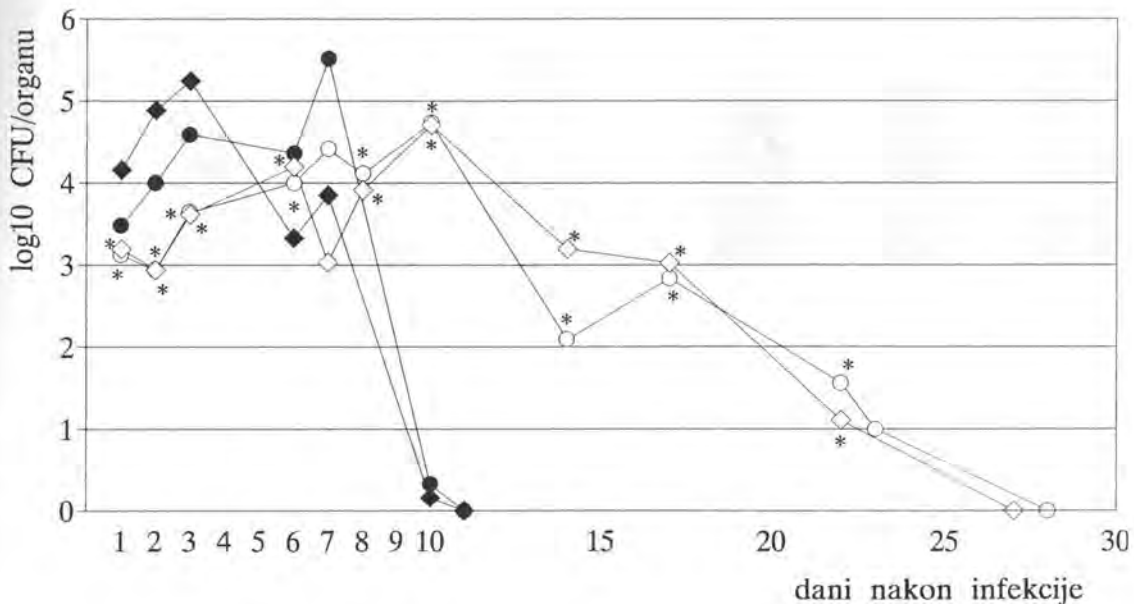


Legenda: CFU listerije određivanih u jetri kontrolnih (●) i CD4⁺ depletiranih (○) životinja, te slezeni kontrolnih (◆) i CD4⁺ depletiranih (◇) životinja.
* statistički značajna razlika (P<0,05)

4.3.2. Učinak in vivo deplecije CD8⁺ limfocita na klirens *L.monocytogenes*

U CD8⁺ depletiranih C57Bl/6 miševa zapazili smo statistički značajno produljeno vrijeme trajanja infekcije ($P < 0.05$). Kao što se vidi iz grafikona 12., u skupini životinja bez CD8⁺ T limfocita, sve bakterije su odstranjene iz jetre dvadeset osam, a iz slezene dvadeset sedam dana nakon intravenske inokulacije. Za razliku od depletiranih, kontrolne životinje uspješno su eliminirale listerije iz jetre i slezene nakon deset odnosno jedanaest dana.

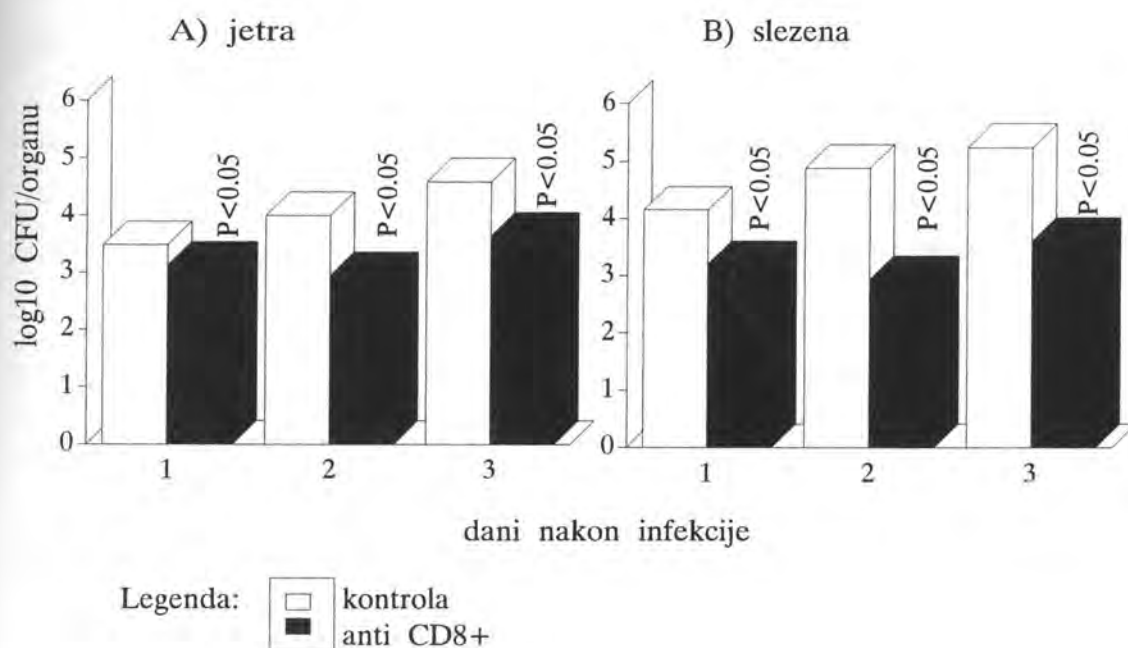
Grafikon. 12. Tijek primarne listerioze u kontrolne i CD8⁺ depletirane skupine C57Bl/6 miševa



Legenda: CFU listerije određivanih u jetri kontrolnih (●) i CD8⁺ depletiranih (○) životinja, te slezeni kontrolnih (◆) i CD8⁺ depletiranih (◇) životinja.
* statistički značajna razlika ($P < 0,05$)

Zanimljivo je da, bez obzira što se organizam CD8⁺ depletiranih životinja duže borio s infekcijom, u inicijalnoj fazi je ova obrana efikasnija. Naime, kao što je uočljivo na grafikonu 13., broj (CFU) bakterija, bio je značajno niži u oba organa prva tri dana bolesti. (P<0.05)

Grafikon 13. Razlike titra *L.monocytogenes* izolirane u inicijalnoj fazi infekcije iz A) jetre i B) slezene kontrolnih i CD8⁺ depletiranih C57Bl/6 miševa



U tablici 6. brojčano su potvrđeni gornji navodi. Dapače, ovaj se odnos ne mijenja niti šestog, odnosno sedmog dana.

Tablica 6. Titar *L.monocytogenes* u organima kontrolnih i CD8⁺ depletiranih C57Bl/6 životinja

Dani nakon infekcije	kontrola		anti CD8 ⁺	
	jetra	slezena	jetra	slezena
1	3.482* 3.4-3.82**	4.193 4-4.28	3.121 2.99-3.5	2.98 2.79-3
2	4 3.92-4.07	4.902 4.73-5	2.939 2.52-3.59	3.712 2.92-4.12
3	4.584 4-4.75	5.18 5.15-5.43	3.36 3.2-3.58	4.198 4.12-4.26
6	4.362 4.32-4.82	3.29 3.12-3.7	4.308 2.82-6.66	3.28 0-4.74
7	5.51 4.96-5.55	3.96 3.5-4.03	4.11 3.82-5.34	3.83 3.51-4.48

* medijane vrijednosti titra *L.monocytogenes* izražene u log₁₀ CFU po organu

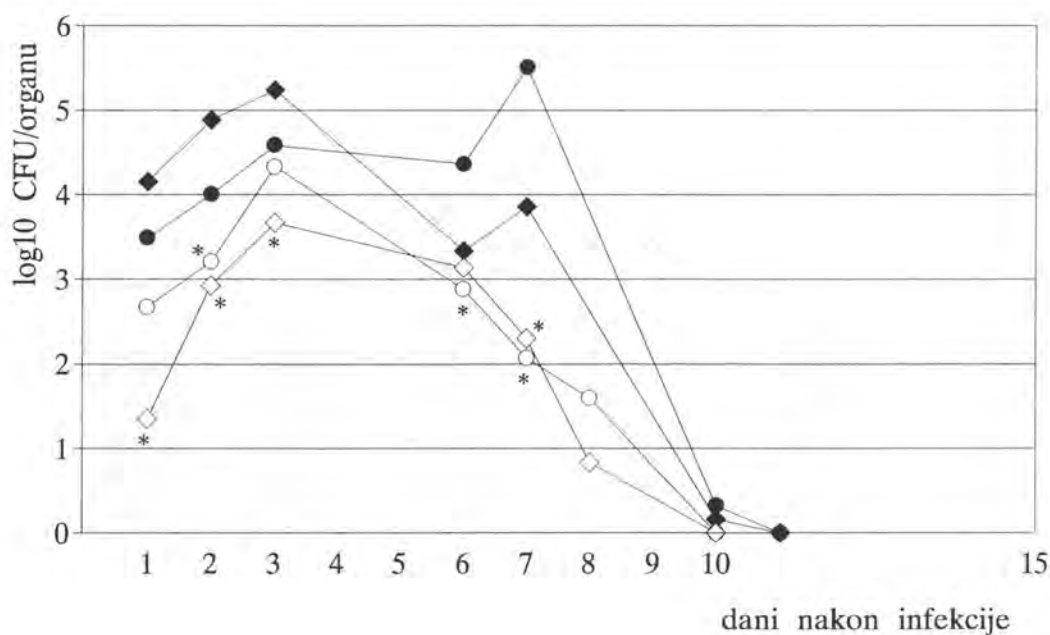
** raspon najnižih i najviših vrijednosti titra *L.monocytogenes* izražene u log₁₀ CFU po organu

Mobilizacijom specifičnih mehanizama obrane, netretirane životinje najkasnije jedanaestog dana sasvim rješavaju infekciju, dok se u depletiranih životinja ona nastavlja još najmanje dva tjedna (grafikon 12.).

4.3.3. Učinak in vivo deplecije NK stanica na klirens *L.monocytogenes*

Pošto je neosporna uloga nespecifičnih obrambenih mehanizama u početku svake infekcije, zanimalo nas je da li će selektivna deplecija NK stanica, bitno utjecati na tijek primarne listerioze. Rezultati su prikazani u grafikonu 14.

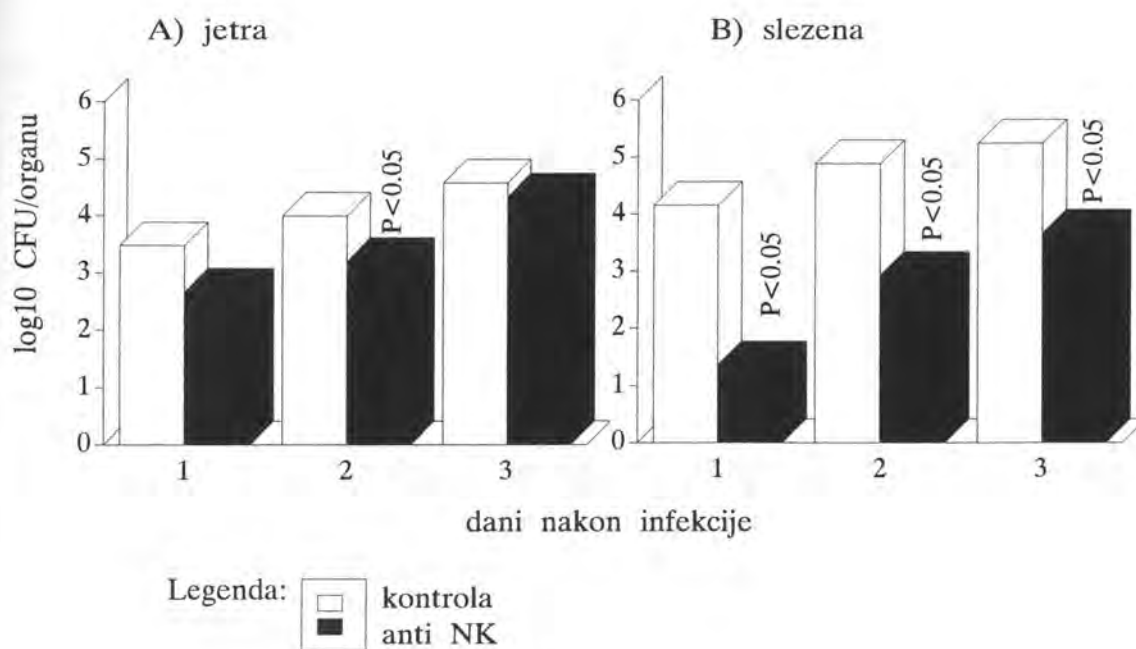
Grafikon 14. Tijek primarne listerioze u C57Bl/6 miševa nakon selektivne deplecije NK stanica



Legenda: CFU listerije određivanih u jetri kontrolnih (●) i NK depletiranih (○) životinja, te slezeni kontrolnih (◆) i NK depletiranih (◇) životinja.
* statistički značajna razlika (P<0,05)

Na prvi pogled se uočava da infekcija traje podjednako dugo u kontrolnoj i NK depletiranoj skupine C57Bl/6 miševa. Dapače, ako se promatraju dobivene vrijednosti titra bakterije, čini se da NK stanice zapravo imaju negativan utjecaj na odstranjivanje mikroorganizama. Naime, iz organa životinja kojima su in vivo depletirane NK stanice, izoliran je niži titar listerija u početnoj fazi infekcije, kao i šestog odnosno sedmog dana. Spomenuti rezultati prikazani su sljedećim grafikonom i tablicom.

Grafikon. 15. Titar *L.monocytogenes* u A) jetri i B) slezeni C57Bl/6 miševa nakon in vivo deplecije NK stanica



Tablica 7. Titar *L.monocytogenes* izoliran iz organa C57Bl/6 miševa nakon in vivo deplecije NK stanica

Dani nakon infekcije	kontrola		anti NK	
	jetra	slezena	jetra	slezena
1	3.482* 3.4-3.82**	4.193 4-4.28	3.27 0-3.52	2.198 0-2.31
2	4 3.92-4.07	4.902 4.73-5	3.12 2.68-3.97	2.95 2.75-3
3	4.584 4-4.75	5.18 5.15-5.43	4.37 4.1-4.54	3.62 3.58-3.82
6	4.362 4.32-4.82	3.29 3.12-3.7	2.96 2.62-3.06	3.2 3-3.27
7	5.51 4.96-5.55	3.96 3.5-4.03	2.07 1.92-2.22	2.22 2.22-2.55

* medijane vrijednosti titra *L.monocytogenes* izražene u log₁₀ CFU po organu

** raspon najnižih i najviših vrijednosti titra *L.monocytogenes* izražene u log₁₀ CFU po organu

4.4. Učinak in vivo deplecije CD4⁺, CD8⁺ ili NK stanica na tijek primarne listerioze u $\beta_2m^{-/-}$ miševa

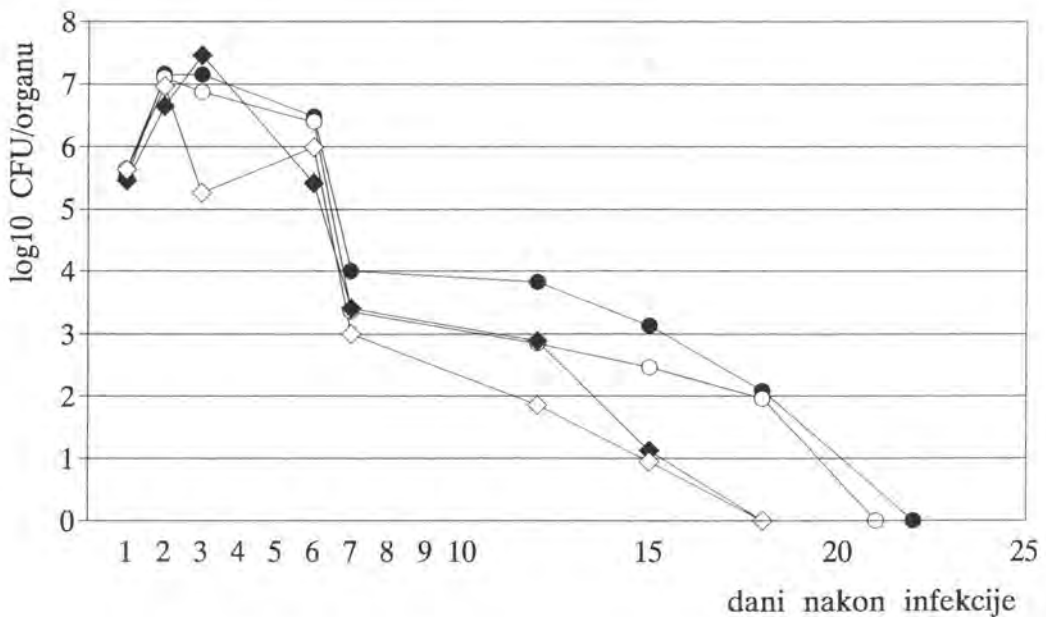
β_2 microglobulin deficijentne životinje izražavaju vrlo male količine molekula I razreda MHC-a i stoga im, kao posljedica, nedostaju CD8⁺ T stanice. Ovi

miševi predstavljaju model za proučavanje imunog odgovora domaćina u odsustvu ove limfocitne subpopulacije. Mi smo ispitali tijek primarne *L.monocytogenes* infekcije u ovom soju miševa nakon in vivo tretiranja s anti CD4⁺, anti CD8⁺ ili anti NK monoklonskim protutijelima.

4.4.1. Učinak in vivo deplecije CD8⁺ limfocita na klirens *L.monocytogenes*

Da bi eliminirali eventualno preostale CD8⁺ limfocite, tretirali smo $\beta_2m^{-/-}$ miševe intraperitonealnim injekcijama anti CD8⁺ monoklonskim protutijelima, dan prije početka infekcije, te svaki peti dan do kraja pokusa.

Grafikon 16. Tijek primarne listerioze u $\beta_2m^{-/-}$ miševa nakon in vivo deplecije CD8⁺ T stanica



Legenda: CFU listerije određivanih u jetri kontrolnih (●) i CD8⁺ depletiranih (○) životinja, te slezeni kontrolnih (◆) i CD8⁺ depletiranih (◇) životinja.

Iz grafikona 16., vidljivo je da zapravo nema bitne razlike u tijeku primarne listerioze, kao ni značajnijih razlika u titru *L.monocytogenes* izolirane iz jetri i slezena, između kontrolnih, genetski deficijentnih i dodatno CD8⁺ depletiranih životinja. Ovime je potvrđen nedostatak CD8⁺ subpopulacije limfocita u $\beta_2m^{-/-}$ miševa. Međutim, kao što je i prikazano u grafikonu 16., $\beta_2m^{-/-}$ životinje su unatoč urođenom manjku, pa čak i dodatne deplecije eventualno preostalih CD8⁺ T stanica, sposobne sterilno riješiti primarnu *L.monocytogenes* infekciju jetre i slezene.

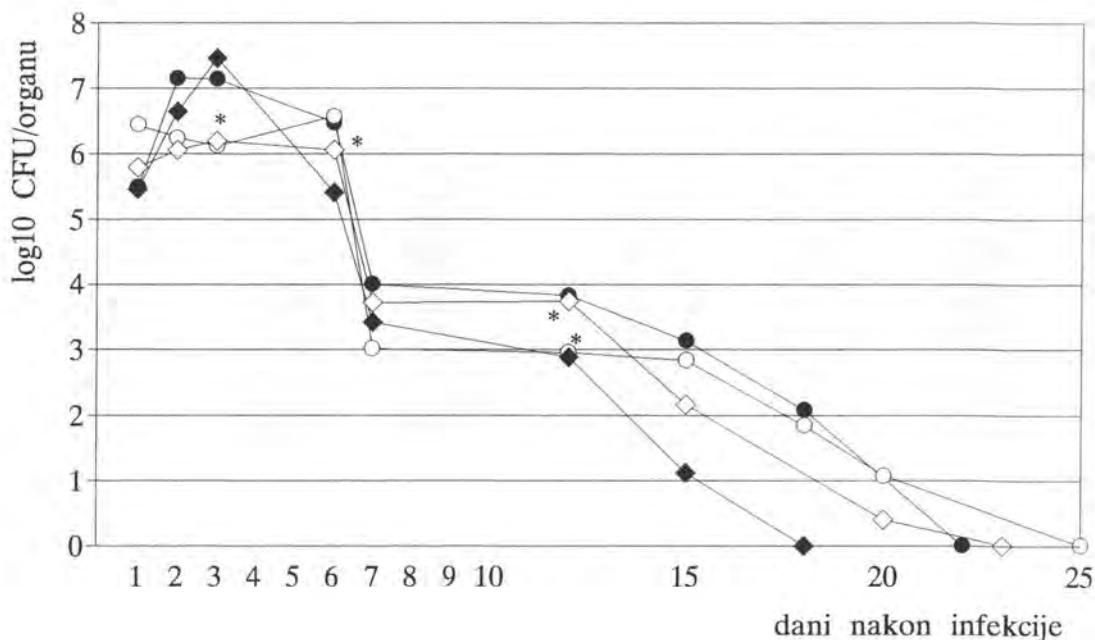
4.4.2. Učinak in vivo deplecije CD4⁺ limfocita na klirens *L.monocytogenes*

$\beta_2m^{-/-}$ miševe tretirali smo anti CD4⁺ monoklonskim protutijelima i tako zapravo dobili skupinu insuficijentnih životinja glede obiju glavnih T limfocitnih subpopulacija. Rezultate koje smo dobili praćenjem razvojnog tijeka eksperimentalne listerioze u ove skupine prikazani su grafikonom 17. Kod $\beta_2m^{-/-}$ životinja bez CD4⁺ limfocitne subpopulacije, primarna infekcija trajala je četiri dana duže u slezeni i tri dana u jetri, u odnosu na kontrolu. Međutim, i u ove eksperimentalne skupine životinja nije izostala sterilna eliminacija *L.monocytogenes* iz organizma.

Zanimljivo je da se u organima ovih miševa kojima su, uz urođeni nedostatak CD8⁺, uklonjene i CD4⁺ stanice, nalazi manji broj CFU *L.monocytogenes*, u početnoj fazi infekcije.

Grafikon 17.

Tijek primarne listerioze u $\beta_2m^{-/-}$ miševa nakon in vivo deplecije $CD4^+$ T limfocita

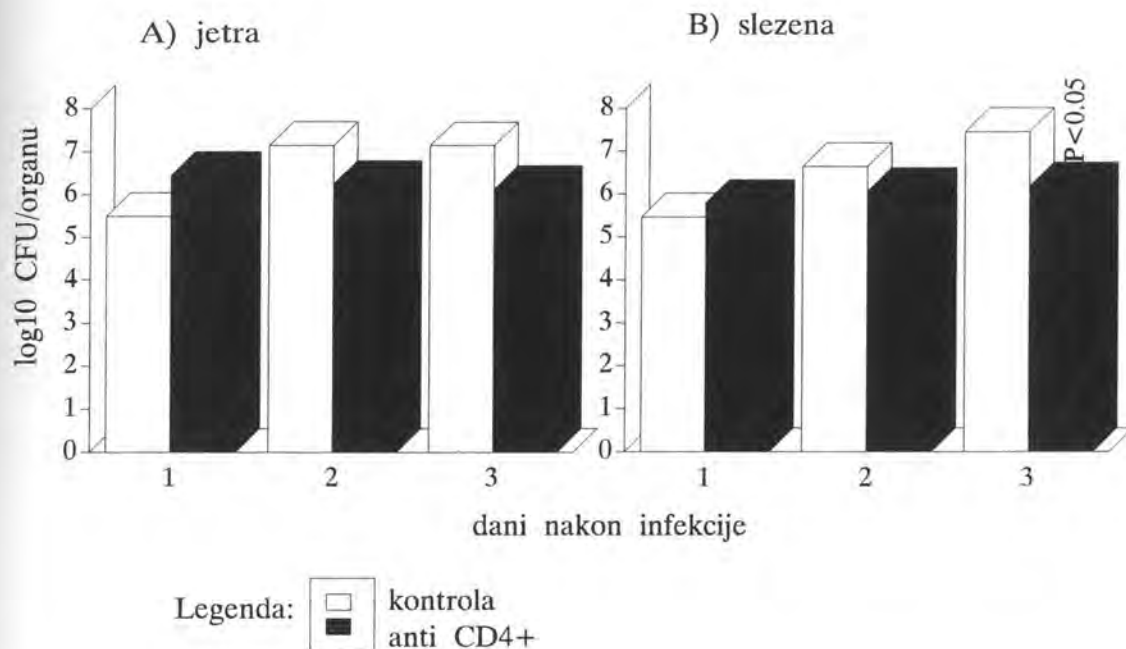


Legenda: CFU listerije određivanih u jetri kontrolnih (●) i $CD4^+$ depletiranih (○) životinja, te slezeni kontrolnih (◆) i $CD4^+$ depletiranih (◇) životinja.
 * statistički značajna razlika ($P < 0,05$)

Kako se vidi iz grafikona 18., drugog i trećeg dana infekcije, titar listerija u jetri i slezeni depletiranih, niži je od onog u organima kontrolnih miševa. Razlika je statistički značajna, trećeg dana u slezeni.

Grafikon 18.

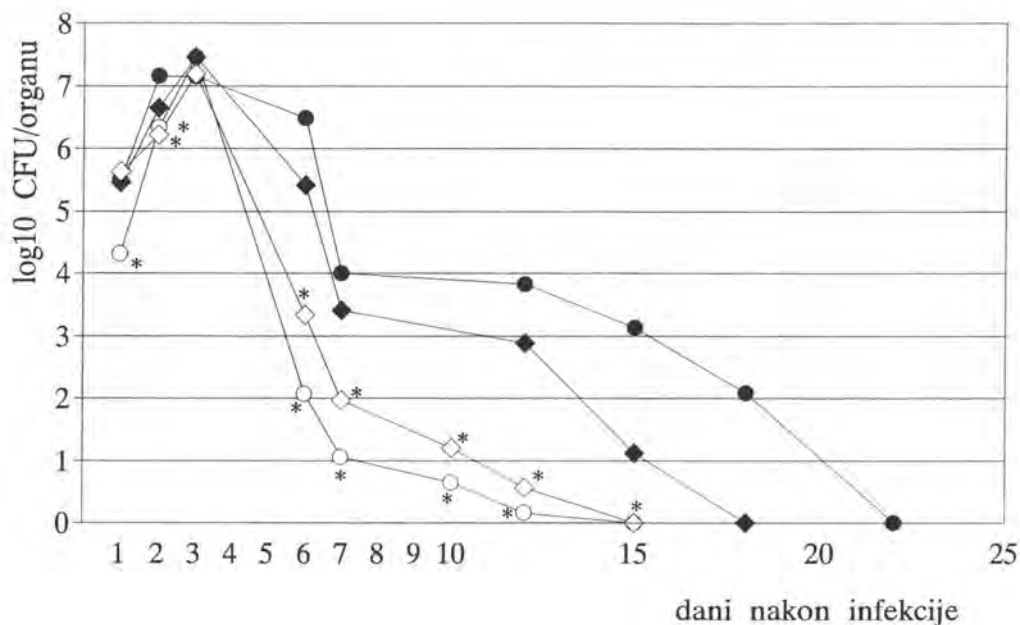
Titar *L.monocytogenes* iz A) jetre i B) slezene $\beta_2m^{-/-}$ miševa nakon delecije $CD4^+$ limfocita



4.4.3. Učinak in vivo delecije NK stanica na klirens *L.monocytogenes*

Grafikonom 19. prikazan je tijek primarne listerioze u $\beta_2m^{-/-}$ miševa, nakon in vivo delecije NK stanica. Odgovor životinja bez NK stanica, na eksperimentalnu infekciju s *L.monocytogenes*, efikasniji je i brži. Kao što je i predočeno, primarna listerioza završava tri do sedam dana prije u NK depletiranih u odnosu na kontrolnu skupinu životinja.

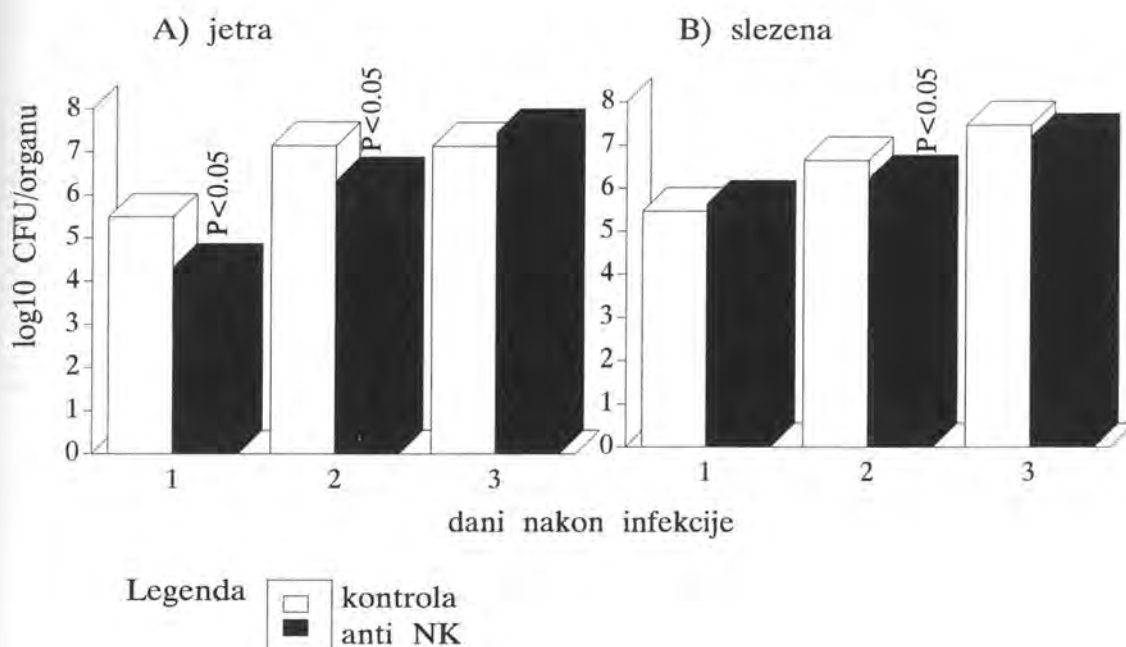
Grafikon 19. Tijek primarne listerioze u $\beta_2m^{-/-}$ miševa nakon in vivo deplecije NK stanica



Legenda: CFU listerije određivanih u jetri kontrolnih (●) i NK depletiranih (○) životinja, te slezeni kontrolnih (◆) i NK depletiranih (◇) životinja.
 * statistički značajna razlika ($P < 0,05$)

Osim znatnog skraćenja infekcije, nedostatak NK stanica dovodi do značajnog smanjenja titra *L.monocytogenes*, kako u početnoj, tako i kasnijoj fazi infekcije. Posebno smo pratili broj bakterija u tijeku prva tri dana infekcije kada bi NK stanice, kao efektori nespecifične imunosti, trebali biti od izuzetne važnosti. Rezultati su prikazani na grafikonu 20.

Grafikon 20. Titar *L.monocytogenes* u A) jetri i B) slezeni $\beta_2m^{-/-}$ miševa nakon in vivo deplecije NK stanica



Prva dva dana infekcije, u jetri NK depletiranih $\beta_2m^{-/-}$ miševa, izoliran je znatno niži broj listerija (razlika je statistički značajna oba dana). U slezeni se isti fenomen zapaža samo drugog dana. Trećeg dana vrijednosti titra listerije podjednaki su u oba organa. Točne apsolutne vrijednosti broja CFU u ovoj pokusnoj skupini prikazane su u tablici 8.

Tablica 8. Titar *L.monocytogenes* u organima kontrolnih i NK depletiranih $\beta_2m^{-/-}$ životinja

Dani nakon infekcije	kontrola		anti NK	
	jetra	slezena	jetra	slezena
1	5.5* 5.4-5.7**	5.4 5.3-5.7	4.3 4.1-4.5	5.7 5.3-5.9
2	7.2 6.8-7.2	6.7 6.1-6.99	6.4 6-6.6	6.3 5.9-6.4
3	7.1 7.1-7.3	7.5 7.2-7.6	7.4 7-7.95	7.2 6.8-7.4
6	6.5 6.1-6.99	5.4 5.1-5.77	2.5 0-2.8	3.35 3-3.6
7	4 3.7-4	3.4 3.3-3.5	1.04 0-2.1	2.2 0-3.2

* medijane vrijednosti titra *L.monocytogenes* izražene u log₁₀ CFU po organu

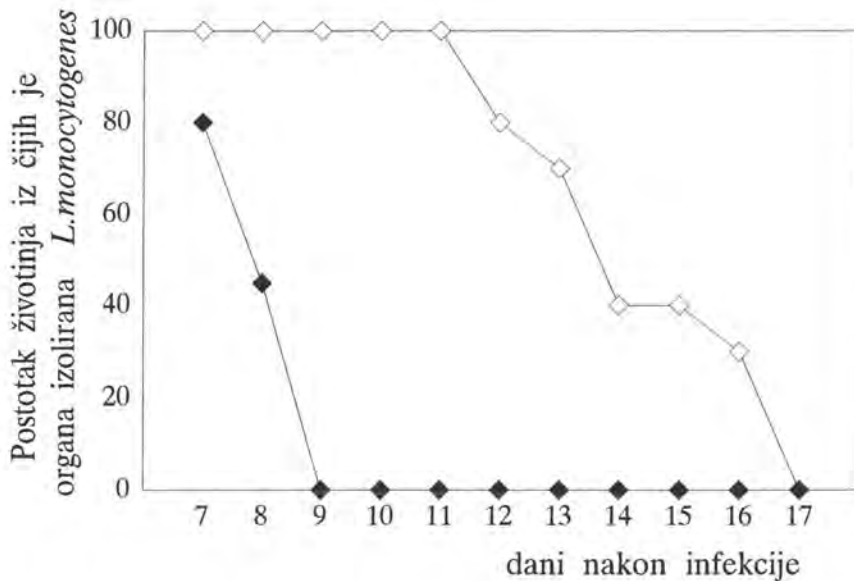
** raspon najnižih i najviših vrijednosti titra *L.monocytogenes* izražene u log₁₀ CFU po organu

4.5. Učinak *L.monocytogenes* infekcije na tijek i ishod trudnoće u BALB/c miševa

4.5.1. Dužina trajanja listerioze u trudnoći

Kada su gravidne ženke BALB/c miševa inficirane s *L.monocytogenes*, zapaženo je značajno produženje infekcije u usporedbi s negravidnim ženkama istog soja.

Grafikon 21. Trajanje listerioze u gravidnih i negravidnih BALB/c ženki



Legenda: Pozitivan nalaz na listeriju u jetri negravidnih (◆) i gravidnih (◇) mišica.

Sve su životinje inficirane istovremeno, intravenskom injekcijom s 2.5×10^4 *L.monocytogenes*. Dnevno je žrtvovano po deset gravidnih i deset negravidnih ženki, da bi se utvrdilo prisustvo listerija u njihovim jetrama. Iz grafikona 21. može se uočiti da je primarna listerioza u kontrolnoj (negravidnoj) skupine završila nakon devet dana. Nasuprot tome, u skupini gravidnih životinja, jedanaestog dana još je uvijek bilo moguće izolirati karakteristične kolonije *L.monocytogenes* iz jetrenog tkiva svih (100%) žrtvovanih ženki. Dvanaestog dana nakon početka eksperimentalne infekcije, listerija se mogla izolirati iz 89%, petnaestog dana iz 40% i šesnaestog dana iz 30% gravidnih životinja. Primarna listerioza okončana je sedamnaestog dana nakon injiciranja bakterija, što je gotovo dvostruko duže nego u skupine negravidnih ženki.

4.5.2. Utjecaj *L.monocytogenes* infekcije na fetus

L.monocytogenes injicirana je ženkama BALB/c miševa u različitim razdobljima graviditeta, te je ispitan njen utjecaj na razvoj fetusa. Sve su inficirane ženke žrtvovane sedamnaestog dana trudnoće i određivan je broj živih fetusa. Rezultati su prikazani u tablici 9.

Tablica 9. Utjecaj *L.monocytogenes* infekcije na fetalni razvoj tijekom različitih perioda graviditeta

DAN KADA SU ŽENKE INFICIRANE		
Dva dana prije oplodnje	2.-7. dan graviditeta	11.-16. dan graviditeta
1*	0*	8*
6	5	4
0	0	6
0	6	7
0	0	7
0	0	7
3	5	8
0	0	5
3	2	4
0	0	2
0	6	3
0	6	0
7	7	4
0	0	4
2	0	5
1.46**	2.46**	4.93**
5.80***		

* broj živih fetusa po inficiranoj gravidnoj ženki

** prosječni broj živih fetusa po inficiranoj gravidnoj ženki

*** prosječni broj živih fetusa po neinficiranoj (kontrolnoj) gravidnoj ženki

Svega šest od petnaest ženki, koje su primile injekciju *L.monocytogenes*, dva dana prije fertilizacije, nosile su žive fetuse sedamnaestog dana trudnoće (prosječno 1.46 fetusa po inficiranoj životinji). Razlika u broju fetusa statistički je značajna u usporedbi s kontrolnom skupinom, neinficiranih

gravidnih ženki istog soja. Slični rezultati, iako ne toliko naglašeni, dobiveni su nakon infekcije životinja na samom početku trudnoće. Prosječan broj živih fetusa u miševa koji su dobili *L.monocytogenes* između drugog i sedmog dana trudnoće, bio je značajno niži ($P < 0.05$) nego u kontrolne skupine (prosjek od 2.46 fetusa po inficiranoj, prema prosjeku od 5.8 fetusa po neinficiranoj gravidnoj ženki). Ukoliko su životinje bile inficirane između jedanaestog i šesnaestog dana trudnoće, razlika u broju živih fetusa (prosjek od 4.93 fetusa po inficiranoj ženki) nije bio značajno niži u usporedbi s kontrolnom skupinom. Međutim, ovaj je broj statistički značajno viši u odnosu na druge dvije eksperimentalne skupine, tj. u odnosu na skupinu inficiranih prije oplodnje i skupinu miševa inficiranih u prvom tjednu graviditeta ($P < 0.05$).

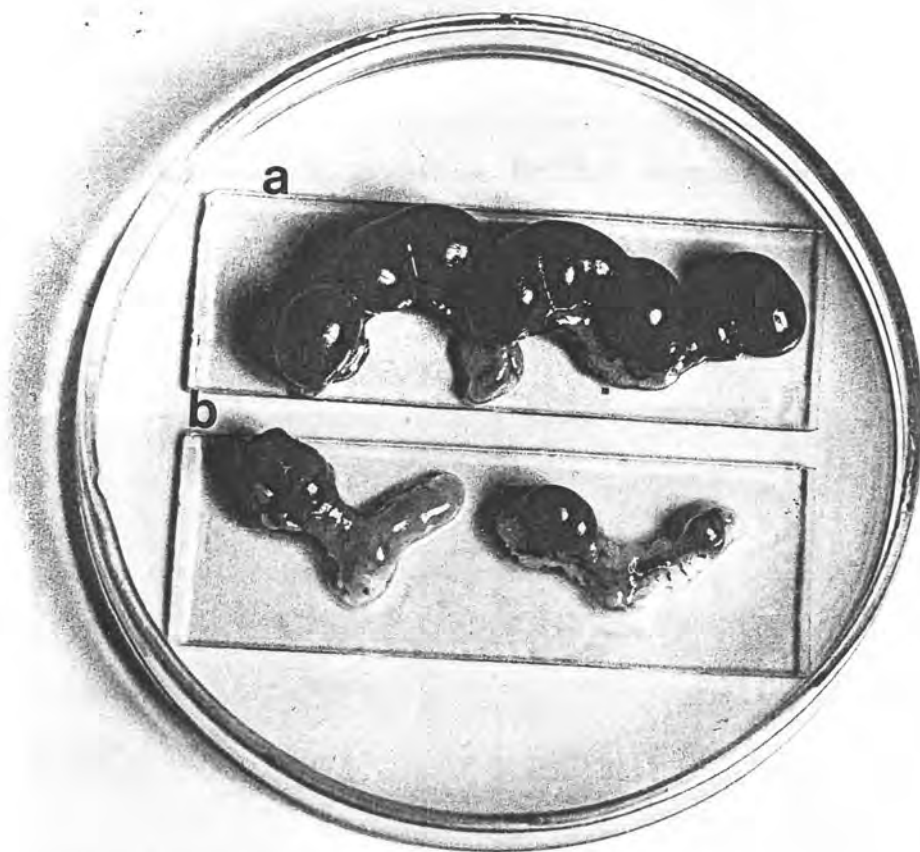
4.5.3. Patohistološke promjene na uterusu, placenti i fetusima nakon infekcije s *L.monocytogenes*

Devetog dana graviditeta ženkama BALB/c miševa i.v. je injicirana *L.monocytogenes*. Pet dana nakon početka infekcije i 14. dana trudnoće, životinje su žrtvovane. Pratili smo makroskopske promjene uterusa i mikroskopske promjene u posteljici i resorbiranim plodovima.

Uterus inficiranih ženki sadržavao je manji broj plodova (slika 6.) koji su, većinom bili slabije razvijeni u odnosu na kontrolu ili u resorpciji (bez pulsacija krvnih žila i bez pokreta ekstremiteta).

Slika 6. Promjene na uterusu BALB/c miševa nakon infekcije s

L.monocytogenes

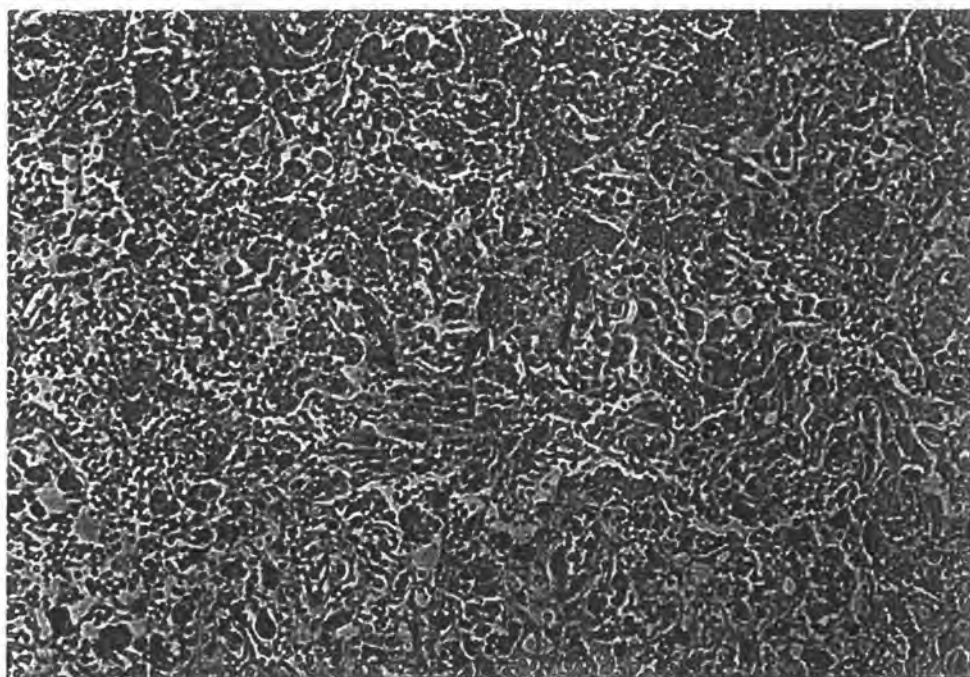


Životinje su i.v. inficirane s *L.monocytogenes* u devetom danu, a žrtvovane su 14. dana graviditeta. U uterusu inficiranih ženki (b) prisutan je znatno smanjen broj plodova, koji su manji i nerazvijeni u odnosu na kontrolu (a)

Izdvojene posteljice bile su tamnije obojene nego u kontrolnih životinja tijekom normalne trudnoće. Tamnoljubičasta boja prisutna je zbog izražene hiperemije što se i potvrdilo u histološkom preparatu (slika 7.) Istovremeno

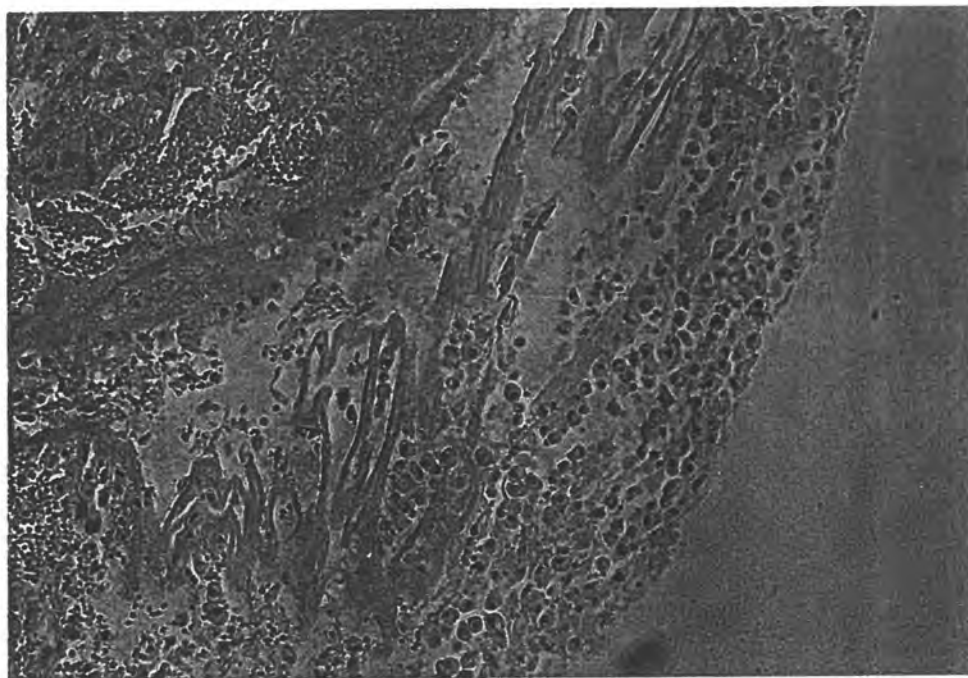
petog dana infekcije mikroskopskim pretraživanjima preparata placente uočili smo opsežna razaranja u decidui basalis (slika 8.), te žarišta upalnog infiltrata (slika 9.).

Slika 7. Histološki preparat posteljice BALB/c miša nakon infekcije s *L.monocytogenes* (povećanje 100x)



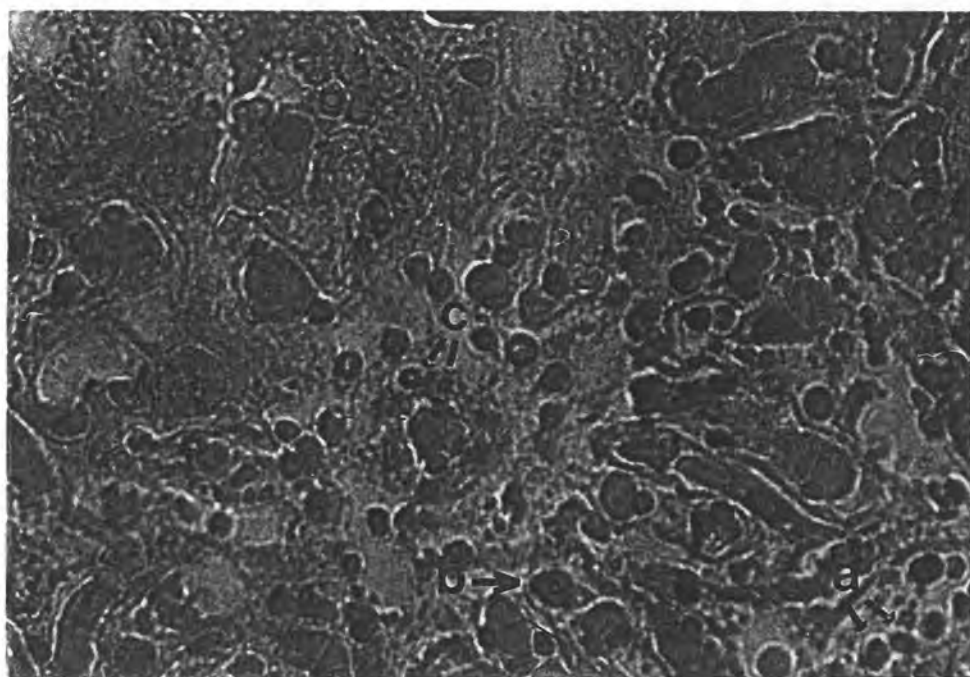
Životinja je inficirana i.v. s *L.monocytogenes* u devetom danu, a žrtvovana 14. dana trudnoće. U tkivu posteljice izražena je hiperemija krvnih kapilara (a) u resicama.

Slika 8. Histološki preparat posteljice BALB/c miša nakon infekcije s *L.monocytogenes* (povećanje 100x)



Pet dana nakon infekcije s *L.monocytogenes* u tkivu posteljice (14. dan graviditeta), decidua basalis infiltrirana je neutrofilnim granulocitima i mononuklearima

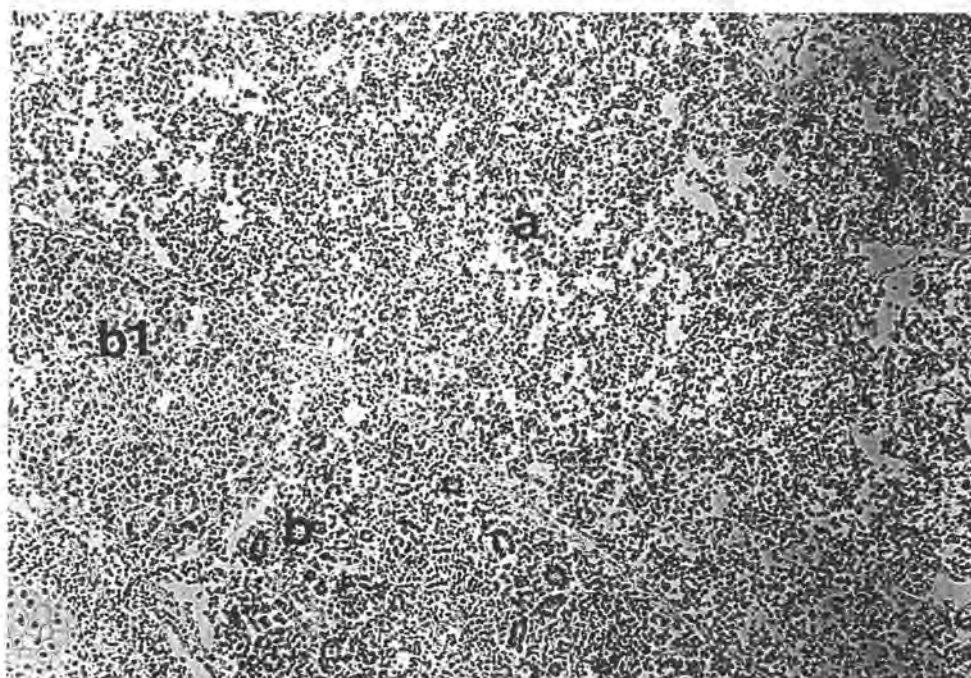
Slika 9. Histološki preparat posteljice BALB/c miša nakon infekcije s *L.monocytogenes* (povećanje 400x)



Petog dana infekcije s *L.monocytogenes* (14. dan graviditeta) u tkivu posteljice mogu se uočiti upalni infiltrati neutrofila (a), rijetkih plazma stanica (b) i limfocita (c).

I tkiva fetusa u resorpciji, također su opsežno infiltrirana neutrofilnim granulocitima, a prisutna su i nekrotična žarišta kao što je vidljivo iz slike 10.

Slika 10. Histološki preparat iz tkiva fetusa u resorpciji (povećanje 100x)



Prikazano je tkivo jetre i desnog bubrega. U parenhimu jetre (a) vidi se gusti difuzni infiltrat neutrofilnih granulocita koji se širi u tkivo bubrega (b). U dijelu bubrežnog tkiva (b1) vidi se žarište nekroze s održanim obrisima bubrežnih stanica.

5. RASPRAVA

Intracelularni parazitizam jedan je od vrlo učinkovitih čimbenika patogenosti, kojeg iskazuju virusi, neki eukariotski mikroorganizmi i neke bakterije. *Listeria monocytogenes* jest gram pozitivna, fakultativno intracelularna, oportunistička bakterija, odgovorna za široki spektar kliničkih slika u ljudi, od kojih su najznačajniji meningitis ili meningo-encefalitis, septicemija, i u slučaju trudnica, intra-uterina infekcija ploda koja može rezultirati pobačajem, prijevremenim porodom ili neonatalnom infekcijom, stečenom tijekom ili nakon poroda. Iako su imunodeficijentne i imunosuprimirane osobe posebno osjetljive, listerioza se može javiti i u, naizgled, sasvim zdravih ljudi svih dobnih skupina. Incidencija bolesti izazvanih s *L.monocytogenes* jest niska, ali nikako zanemarljiva. Na primjer, godine 1987. u Francuskoj je prijavljeno 687 oboljelih (54), dok je 1992. u SAD godišnja incidencija iznosila 7.4 slučaja na milijun stanovnika (130). Većina slučajeva javlja se sporadično, međutim, tijekom posljednjeg desetljeća zabilježene su i značajne epidemije u Sjevernoj Americi, Europi i Novom Zelandu (84). U većine ovih epidemija, utvrđen je početak infekcije nakon konzumiranja kontaminirane hrane (svježi sir, mlijeko, sirovo povrće, plodovi mora), upućujući na gastrointestinalni sustav kao najvjerojatniji prirodni put ulaska *L.monocytogenes*. Konjunktivalna, nazalna ili respiratorna sluznica, drugi su mogući putevi prirodnog ili umjetnog, eksperimentalnog ulaska u organizam (134). Mnogi su autori ispitivali virulenciju *L.monocytogenes* za laboratorijske i domaće životinje, koristeći različite puteve ulaska, uključujući intravensko, intraperitonealno, intracerebralno injiciranje, aplikaciju putem respiratornog ili gastrointestinalnog sustava. U tim radovima korišteni su miševi, zamorci, hrčci, primati, pileći embrio, zečevi i neke

domaće životinje (20,76,117,153). Oralni put ulaska, iako u prirodi najprisutniji, rijetko se upotrebljava za kvantitativno određivanje titra *L.monocytogenes*. Ovakav način inokulacije zahtijeva visoku dozu, nepouzdan je i nesiguran. Intravenski put inokulacije simulira bakterijemiju fazu infekcije, zaobilazi lokalne mehanizme obrane, te se prema iskustvu mnogih autora, a i našem, pokazao najefikasnijim.

Općenito je prihvaćeno, da su među malim laboratorijskim životinjama, miševi osjetljiva vrsta za bakterije roda *Listeria*. Model mišje listerioze, nakon intravenske aplikacije, je stoga često korišten za izučavanje stanicama posredovane imunosti, koja se smatra presudnom u odgovoru domaćina na infekcije izazvane intracelularnim bakterijama.

U našem radu, također je korišten model mišje listerioze. Intravenskom injekcijom 2.5×10^4 *L.monocytogenes* u lateralnu repnu venu, inficirani su C57Bl/6, BALB/c i $\beta_2m^{-/-}$ sojevi miševa. Praćen je tijekom primarne listerioze i titar bakterija u jetri i slezeni ovih životinja, u kontrolnoj, netretiranoj skupini, kao i nakon in vivo deplecije pojedinih limfocitnih subpopulacija.

Poznato je, da nakon ulaska u organizam domaćina listerija biva zadržana u organima bogatim elementima retikulo-endotelnog sustava. U jetri i slezeni infekcija perzistira najduže. Stoga smo i mi pratili utjecaj *L.monocytogenes* na tijek bolesti upravo u tim organima. Nakon intravenske injekcije, u jetri su opisane tri jasno odjeljene faze bolesti (101). U prvoj, dolazi do ingestije oko 90% bakterija od strane Kupfferovih stanica, te inaktivacije, odnosno uništenja listerija unutar 6 sati. Tijekom sljedećih dva do tri dana, preostale bakterije, koje nisu odstranjene djelovanjem Kupfferovih stanica, bogato se i brzo

razmnožavaju, i inficiraju susjedne hepatocite, unatoč izraženoj žarišnoj akumulaciji, prvo neutrofila, a kasnije i mononuklearnih fagocita (24,96). Neutrofili nakon 24-satnog nakupljanja u infektivnim žarištima, razaraju inficirane hepatocite, oslobađajući *L.monocytogenes* u ekstracelularni prostor, omogućavajući tako ingestiju bakterija sebi samima i makrofagima (23). U završnoj fazi infekcije, dolazi do aktivacije mehanizama specifične stanične imunosti i do sterilne eliminacije *L.monocytogenes* u preživjelih životinja.

Listerioza jetre, u svih ispitivanih sojeva miševa, makroskopski se očitovala izrazitom hepatomegalijom, uočljivom već drugog i trećeg, pa sve do šestog dana infekcije. Istovremeno na površini organa bi se počela pojavljivati žarišta žućkaste boje, da bi petog, šestog dana cijela jetra bila znatno bljeda od one u kontrolne skupine. Histološki, granulome u početku karakteriziraju regresivne promjene epitela jetre i okoline, a na to se nadovezuje milijarna nekroza.

Listerioza slezene očitovala se izraženom splenomegalijom od drugog, posebno trećeg, do šestog dana infekcije. Na površini su prosijavala žućkasta žarišta, koja su histološki zahvaćala i crvenu i bijelu pulpu. Iste su promjene made u svih ispitanih sojeva. Hof i Hefner smatraju da se *L.monocytogenes* razmnožava prvenstveno u slezeni, te da je stoga broj bakterija veći upravo u tom organu (66). Za razliku od spomenutog, Audurier i suradnici, su objavili da je broj živih listerija po organu niži u slezeni nego u jetri, ali ako se izražava po jedinici težine, vrijednosti titra se izjednačavaju ili postaju više u slezeni (5). Isti autori preporučuju da se upravo makroskopske promjene, kao i titar listerija u slezeni, koriste za kvalitativni test patogenosti bakterija ovog

roda. U našim pokusima, titar *L.monocytogenes* u slezeni C57Bl/6, kao i BALB/c miševa bio je u pravilu viši u odnosu na jetru, iako razlike nisu statistički značajne. Dužina trajanja i sam tijekom infekcije bili su podjednaki u oba ispitivana organa.

U našim smo eksperimentima koristili više sojeva miševa zbog poznate činjenice da se pojedini sojevi razlikuju u svojoj osjetljivosti prema *L.monocytogenes*. Ovo je svojstvo kontrolirano jednim dominantnim genom izvan H2 sustava, nazvanim *Lr* (listeria resistance) genom (20,21). *Lr* gen djeluje prvenstveno na ranu, nespecifičnu fazu anti-listerijskog odgovora, što rezultira značajno nižim brojem *L.monocytogenes* u jetri i slezeni rezistentnih u odnosu na osjetljive sojeve, već prvi dan nakon infekcije (20). Prema našim iskustvima, EGD soj *L.monocytogenes*, bio je vrlo patogen za oba, C57Bl/6 i BALB/c, soja miševa. Ipak, 72 sata nakon infekcije izoliran je manji broj listerija iz jetre C57Bl/6 miševa. U slezeni je manji broj zabilježen samo prvog dana, da bi se tijekom drugog i trećeg dana izjednačio s brojem CFU izoliranih iz slezene BALB/c miševa. Vjerojatno se ovi rezultati mogu objasniti veličinom inokulirane doze. To je u skladu s radovima Goossensa koji je objavio da nema značajne razlike u kontroli rasta *L.monocytogenes* u slezeni rezistentnih C57Bl/6 i osjetljivih CBA ili A/J miševa, nakon doze od 1.2×10^4 , 8.7×10^4 ni 9×10^5 CFU. Genetska rezistencija, izraženija je i značajnija kada se vrijednosti inokuluma kreću od 10^7 i više CFU (52,53). Isti autor navodi da je rana efikasna kontrola bakterijskog rasta u jetri rezistentnih miševa u vezi s bržom ekspresijom specifičnog imunog odgovora u ovom organu nego u osjetljivog soja. Naši rezultati, nisu u potpunom suglasju s

rezultatima spomenutih autora. Naime, titar CFU u jetri i slezeni, niži je kao što je i dužina same infekcije kraća, u BALB/c miševa, iako razlika nije statistički značajna.

Tijek primarne listerioze ispitali smo i u β_2 mikroglobulin deficijentnim životinjama. Ovi transgenični miševi ne izražavaju molekule I razreda MHC i stoga im nedostaju $CD8^+$ T stanice (157,158). Brojni eksperimenti pokazali su da upravo ova limfocitna subpopulacija ima izuzetno važnu ulogu u zaštiti domaćina od *L.monocytogenes*. Unatoč nedostatku $CD8^+$ stanica, $\beta_2m^{-/}$ životinje bile su sposobne sterilno eliminirati *L.monocytogenes*, i to podjednakom brzinom i efikasnošću iz jetre i slezene. Ipak, tijekom primarne listerioze bio je gotovo dvostruko duži u odnosu na BALB/c i C57Bl/6 sojeve miševa.

Kako se u literaturi navodi da $\beta_2m^{-/}$ životinje ipak posjeduju vrlo male količine $CD8^+$ T stanica (86), dodatno smo ih tretirali anti- $CD8^+$ monoklonskim protutijelima i ponovili eksperiment. Rezultati su bili gotovo identični prethodnima, što je dokaz izrazite $CD8^+$ deficijencije u ovog soja.

Ispitali smo i sposobnost BALB/c, odnosno C57Bl/6 miševa da riješe primarnu listeriozu, nakon in vivo deplecije $CD8^+$ limfocita. I u ovom slučaju rezultati su pokazali da $CD8^+$ stanice nisu neophodne za sterilni završetak infekcije. Ipak, i u jetri i slezeni, dužina infekcije je statistički značajno produžena u odnosu na kontrolnu skupinu.

Rezultati dobiveni nakon in vivo deplecije $CD4^+$ limfocita, pokazali su da niti ove stanice ne igraju presudnu ulogu u kontroli i rješavanju primarne *L.monocytogenes* infekcije. Dapače, prema našim podacima, a sudeći po

kraćem trajanju infekcije u jetri i slezeni miševa bez CD4⁺ u odnosu na one bez CD8⁺ stanica, uloga CD4⁺ limfocita u obrani organizma od listerioze manje je značajna od one CD8⁺ stanica. Nedostatak CD4⁺ subpopulacije, značajnije je utjecala samo na tijek primarne listerioze u $\beta_2m^{-/-}$ životinja, što je i razumljivo, obzirom da su te životinje nakon in vivo tretiranja s anti-CD4⁺ monoklonskim protutijelima, a zbog genetskog nedostatka CD8⁺ limfocita, zapravo bile dvostruko depletirane. Slične rezultate dobili smo i u BALB/c miševa, tretiranih kombinacijom CD4⁺ i CD8⁺ monoklonskih protutijela. Odsustvo obje T limfocitne subpopulacije, značajno je odložilo završetak primarne *L.monocytogenes* infekcije u promatranim organima. Visoki titar bakterija (3 do 4 log₁₀ CFU) perzistirao je u slezeni 20, a u jetri 27 dana od početka infekcije, da bi u sljedeća dva do tri dana došlo do naglog opadanja broja živih listerija i, napokon sterilnog ičšićavanja *L.monocytogenes*. Može se stoga zaključiti da se kontrola infekcije i sterilna eliminacija *L.monocytogenes* iz jetre i slezene može odvijati u odsustvu CD4⁺, CD8⁺ ili obje T stanične subpopulacije, te da ovi limfociti nisu prijeko potrebni da bi se organizam domaćina efikasno obranio od primarne listerioze. Dobiveni se podaci uglavnom slažu s rezultatima drugih autora koji su radili slične pokuse (125), kao i s rezultatima ranijih studija s atimičnim "nude" (19,39,110) ili SCID miševima (6). Iz svega proizlazi da se infekcija s *L.monocytogenes* može savladati Thy-1⁺CD4⁻CD8⁻ stanicama, koje zaostaju u domaćinu nakon deplecije CD4⁺ i CD8⁺ T stanica. Postoji, dakle mogućnost da je imunost prema listeriozi eventualno posredovana Thy-1⁺CD4⁻CD8⁻ α/β ili γ/δ T limfocitima, Thy-1⁺NK stanicama, ili svim nabrojenim tipovima stanica. Dunn

i North svojim eksperimentima podržavaju ovu mogućnost. Naime rezultati njihovih citofluorometrijskih analiza pokazali su da je većina Thy-1⁺CD4⁻CD8⁻ stanica, koje su zaostale nakon kombinirane CD4⁺/CD8⁺ deplecije bila CD3⁺. Dodatno, najveći dio ovih stanica nije prihvatio boju za α/β T stanični receptor, upućujući na njihovo posjedovanje γ/δ lanca (36). U prilog ovoj tezi govori i činjenica da atimični "nude" miševi, za koje se zna da su sposobni kontrolirati, iako ne uvijek i potpuno riješiti *L.monocytogenes* infekciju (60,125) posjeduju γ/δ T stanice (46,155).

Imunološki odgovor na infekciju uzrokovanu intracelularnim bakterijama, pa tako i *L.monocytogenes*, ima bifazni karakter. Prva faza odvija se tijekom prva tri dana od početka infekcije, a kontrolirana je nespecifičnim aktivnostima domaćina, prvenstveno fagocitozom i uništavanjem mikroorganizama od strane makrofaga i polimorfonukleara (26,94). Dodatni stanični tip koji može djelovati na prvoj crti obrane, prije mobiliziranja T limfocita, jesu NK stanice. Opseg u kojem su NK stanice uključene u prirodnu otpornost domaćina ili u oporavak od listerioze nije još uvijek sasvim razjašnjen. Postoje neizravni dokazi na temelju kojih se može govoriti o važnosti ovih stanica tijekom primarne *L.monocytogenes* infekcije (8,81,116). Da bi odredili ulogu i učesće NK stanica u primarnoj listeriozi, depletirali smo miševe koristeći anti-NK monoklonsko protutijelo. Dobiveni rezultati bili su neočekivani. Naime, nije bilo statistički značajne razlike, između in vivo depletiranih i kontrolnih miševa, u sposobnosti da iščiste *L.monocytogenes* iz svojih organa. Dapače, titar bakterija izoliran iz jetre i slezene, C57Bl/6 kao i $\beta_2m^{-/-}$ miševa, nakon in vivo NK deplecije bio je značajno niži, ne samo

prva tri dana, nego tijekom cijele infekcije. Anti-NK tretman učinio je životinje "rezistentnijima" na primarnu infekciju uzrokovanu s *L.monocytogenes*. Ovi rezultati govore u prilog negativnoj ulozi NK stanica u listeriozi, što je teško objasniti obzirom na činjenicu da su ove stanice osnovni izvor IFN- γ u ranoj fazi infekcije (7,142). Naime, dolazi do povećane proliferacije listerija nakon administracije monoklonskih anti-IFN- γ protutijela (14) i suprotno, unaprijedjenjem zaštite i obrane domaćina aplikacijom rIFN- γ u vrijeme infekcije (88). Teško je zasada reći kojim se mehanizmom ostvaruje navedeni učinak opisan nakon deplecije NK stanica.

Trudnoća se također spominje kao stanje povećanog rizika za razvoj ove infekcije. *L.monocytogenes* povezuje se s učestalim abortusima, prijevremenim rođenjem djeteta, intrauterinom smrću ploda, ali do danas nije poznato da li do ovakvih nalaza dolazi zbog izravnog djelovanja na plod ili zbog učinka listerije na placentu. Našim rezultatima, utvrdili smo da trudnoća izrazito povećava osjetljivost domaćina na infekciju ovom bakterijom. U gravidnih ženki BALB/c miševa, listerija je perzistirala u jetri gotovo dvostruko duže nego u istom organu kontrolne, negravidne skupine. Dužina infekcije u gravidnih, može se usporediti s onom u skupini CD4⁺ depletiranih životinja. Svakako ne smatramo samo CD4⁺ T limfocite odgovornima za ovaj fenomen, pošto je poznato da tijekom graviditeta u ljudi i eksperimentalnih životinja, dolazi do niza poremećaja, celularnih i humoralnih imunih funkcija (146). Nakon prolaska kroz placentarnu barijeru, *L.monocytogenes* utječe na razvoj fetusa. U literaturi postoje podaci vezani uglavnom za posljednje tromjesečje trudnoće. Našim smo istraživanjima pokazali da je razarajući učinak

L.monocytogenes na fetalni razvoj veći, ukoliko je infekcija stečena ranije u trudnoći. Dapače, ako je ženka bila inficirana prije oplodnje, broj živih fetusa po inficiranoj gravidnoj ženki bio je apsolutno najniži, u odnosu na sve ostale eksperimentalne skupine. Ovako izraženu osjetljivost fetusa nije jednostavno objasniti, jer uteroplacentarna infekcija uključuje, ne samo djelovanje patogena, nego i imuni odgovor majke, nezreli imunološki sustav fetusa i eventualno odgovor majke na semialogenične fetalne antigene.

6. ZAKLJUČNI PREGLED

U radu je praćen tijek primarne listerioze, kao i titar *Listeria monocytogenes* u jetri i slezeni u animalnom modelu (BALB/c, C57Bl/6 i $\beta_2m^{-/-}$ miševi) uz depleciju različitih staničnih subpopulacija, pomoću specifičnih monoklonskih protutijela.

1. Intravenskom injekcijom *L. monocytogenes*, u svih ispitivanih sojeva miševa, uzrokovan je septički oblik listerioze (bakterijemijska faza), karakteriziran izrazitom hepatosplenomegalijom, te makroskopskom i mikroskopskom pojavom granuloma u retikuloendotelnim organima.
2. Svi su korišteni sojevi miševa, bez obzira na genetsku predispoziciju, bili sposobni sterilno eliminirati *L.monocytogenes* iz svoje jetre i slezene. Između osjetljivih BALB/c i rezistentnih C57Bl/6 miševa nije bilo statistički značajne razlike niti u dužini trajanja, ni broju CFU *L.monocytogenes* izoliranih iz jetre i slezene. U $\beta_2m^{-/-}$ životinja infekcija je bila značajno produžena u oba organa, u odnosu na ostala dva soja.
3. Nedostatak $CD4^+$ T limfocita, nakon in vivo deplecije, nije spriječio sterilno isčišćavanje *L.monocytogenes* iz testiranih organa. Doduše, infekcija je bila produžena u svih eksperimentalnih skupina, u odnosu na kontrolu, a posebno izraženo produženje zapaženo je u $\beta_2m^{-/-}$ miševa. Titar *L.monocytogenes* u prva tri dana bio je niži u depletiranih miševa. Razlika je bila posebno naglašena u slezeni C57Bl/6 soja.

4. In vivo deplecija CD8⁺ značajno je produžila trajanje primarne listerioze u BALB/c i C57Bl/6 miševa. U dodatno CD8⁺ depletirane skupine $\beta_2m^{-/-}$ miševa, dobiveni su isti rezultati kao i kod kontrole. Titar izolirane *L.monocytogenes* bio je, u pravilu, niži u CD8⁺ depletiranih životinja. Razlika je bila statistički značajna u slezeni BALB/c, te u oba organa C57Bl/6 miševa.

5. Nakon što smo BALB/c miševe tretirali kombinacijom anti-CD4⁺ i anti-CD8⁺ protutijela, zapazili smo statistički značajno produljenje primarne listerioze. U tretiranih životinja, perzistirao je visoki titar *L.monocytogenes*, i to u slezeni do 20., a u jetri do 27. dana od početka infekcije. Unatoč nedostatku obje limfocitne subpopulacije, 24. dana u slezeni i 30. dana u jetri, nije više bilo moguće izolirati *L.monocytogenes*.

6. In vivo deplecija NK stanica, u C57Bl/6 i $\beta_2m^{-/-}$ miševa, nije promijenila tijek, niti utjecala na dužinu infekcije, ali je statistički značajno smanjila titar *L.monocytogenes* u oba organa tretiranih životinja.

7. Trudnoća povećava osjetljivost domaćina na infekciju s *L.monocytogenes*. U gravidnih ženki BALB/c miševa, listerija je perzistirala u jetri gotovo dvostruko duže, nego u istom organu, kontrolne, negravidne skupine.

8. Prateći broj živih fetusa u ženkama BALB/c miševa inficiranih u različitim periodima graviditeta, pokazali smo da je razarajući učinak *L.monocytogenes* na fetalni razvoj veći što je infekcija stečena ranije u trudnoći. Dapače, ako je ženka bila inficirana prije oplodnje, broj živih fetusa po inficiranoj gravidnoj ženki, bio je apsolutno najniži od svih eksperimentalnih skupina.

7. LITERATURA

1. **Albritton, W.L., Cochi, S.L., Feeley, J.C.** 1984. Overview of neonatal listeriosis. *Clin. Invest. Med.* 4:311-314.
2. **Alford, C.E., Amaral, E., Campbell, P.A.** 1990. Listericidal activity of human neutrophil cathepsin. *G.J. Gen. Microbiol.* 136:997-1000.
3. **Appelberg, R., Silva, M.T.** 1989. T-cell dependent chronic neutrophilia during mycobacterial infections. *Clin. Exp. Immun.* 78:478-481.
4. **Appelberg, R.** 1992. Mycobacterial infection primes T cells and macrophages for enhanced recruitment of neutrophils. *J. Leukocyte. Biol.* 51:472-476.
5. **Audurier, A., Pardon, P., Marly, J., Lantier, F.** 1980. Experimental infection of mice with *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 131B:47-57
6. **Bancroft, G.J., Bosma, M.J., Bosma G.C., Unanue, E.R.** 1986. Regulation of macrophage Ia expression in mice with severe combined immunodeficiency: induction of Ia expression by a T cell independent mechanisms. *J. Immunol.* 137:4-9
7. **Bancroft, G.J., Schreiber, R.D., Unanue, E.R.** 1991. Natural immunity: as T-cell-independent pathway of macrophage activation defined in scid mouse. *Immun. Rev.* 124:5-10
8. **Bennett, M., Baker, E.E.** 1977. Marrow-dependent cell function in early stages of infection with *Listeria monocytogenes*. *Cell Immunol.*33:203-210
9. **Berenger, J., J., Solera, M.D., Diaz, et al.** 1991. Listeriosis in patients with human immunodeficiency virus. *Rev. Infect. Dis.* 13:115-119

10. **Biron, C.A., Welsh, R.M.** 1982. Activation and role of natural killer cells in virus infections. *Med. Microbiol. Immunol.* 170:155-172.
11. **Bluestone, J.A., Pardoll, D.M., Sharrow, S.O., Fowlkes, B.J.** 1987. Characterization of murine thymocytes with CD3-associated T-cell receptor structures. *Nature* 326:82-83
12. **Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Jaquet, C., Piffaretti, J.C.** 1992. *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:69-73
13. **Brunt, L.M., Portnoy, D.A., Unanue, E.R.** 1990. Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8⁺ Tcells requires secretion of hemolysin and intracellular growth. *J. Immunol.* 145:3540-3546
14. **Buchmeier, N.A., Schreiber, R.D.** 1985. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7404-7409
15. **Buchnan, R.L., H.G., Stahl, R.C., Whiting.** 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52:844-851
16. **Buchnan, R.L., Phillips, J.G.** 1990. Response surface model for predicting the effects of temperature pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 53:370-376

17. **Caligiuri, M., Murray, C., Buchwald, D. et. al.** 1987. Phenotypic and functional deficiency of natural killer cells in patients with chronic fatigue syndrome. *J. Immunol.* 139:3306-3313.
18. **Carpenter, S.L., Harrison, M.A.** 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* on processed poultry. *J. Food Sci.* 54:556-557
19. **Cheers, C., Walker, R.** 1975. Activated macrophages in congenitally athymic "nude" mice in lethally irradiated mice. *J.Immunol.*115:844-847
20. **Cheers, C., McKenzie I.F.C.** 1978. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: genetics of listeriosis. *Infect. Immun.* 19:755-762
21. **Cheers, C., McKenzie, I.F.C., Pavlov, H., Waid, C., York, J.** 1978. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: course of listeriosis in resistant and susceptible mice. *Infect. Immun.* 3:763-770
22. **Cobbold, S.P., Jayasurya, A., Nash, A., Prospero, Z.D., Waldman, H.** 1984. Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature* 312:548-550
23. **Conlan, J.W., North, R.J.** 1991. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defuse strategy against a facultative intracellular bacterium. *J. Exp. Med.* 174:741-744.
24. **Conlan, J.W., North, R.J.** 1992. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *L.monocytogenes*, *F.tularensis* and *S.typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect. Imm.* 60:5164-

25. **Conner, D.E., Brackett, R.E., Beuchat, L.R.** 1986. Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:59-63
26. **Czuprynski, C.J., Henson, P.M., Campbell, P.A.** 1984. Killing of *L.monocytogenes* by inflammatory neutrophils and mononuclear phagocytes from immune and nonimmune mice. *J. Leuk. Biol.* 35:193-208.
27. **Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A., Southwick, F.S.** 1990. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6068-6072
28. **Datta, A.R., Wentz, B.A., Russel, J.** 1990. Cloning of the listeriolysin o gene and development of specific gene probes for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3874-3877
29. **DeLibero, G., Flesch, I., Kaufman, S.H.E.** 1988. Mycobacteria reactive Lyt2+ T cell lines. *Eur. J. Immunol.* 18:59-66
30. **DeMaria, A., Malnati, M., Moretta, A., et al.** 1987. CD3⁺4⁺5⁻WT31⁻ (T-cell receptor γ/δ^+) and other unusual phenotypes are frequently detected among spontaneously interleukin-2 responsive T-lymphocytes present in the joint fluid in juvenile rheumatoid arthritis. A clonal analysis. *Eur. J. Immunol.* 17:1815-1819
31. **DePaoli, P., Gennari, D., Martelli, R., Cavarzerani, R., Comoretto, R., Santini, G.** 1990. γ/δ T cell-receptor-bearing lymphocytes during Epstein-Barr virus infection. *J. Infect. Dis.* 161:1013-1016

32. **Doyle, M.P., Schoeni, J.L.** 1986. Selective enrichment procedure for isolation of *L.monocytogenes* from fecal and biologic specimens. Appl. Environ. Microbiol. 51:1127-1132
33. **Doyle, M.P., Glass, K.A., Beery, J.T., Garcia, G.A., Pollard, D.J., Schultz, R.D.** 1987. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. Appl. Environ. Microbiol. 53:1433-1435
34. **Doyle, M.P.** 1988. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. Food Technol. 4:169-171
35. **Dunn, P.L., North, R.J.** 1991. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. Infect. Imm. 59:2892
36. **Dunn, P.L., North, R.J.** 1991. Resolution of primary murine listeriosis and acquired resistance to lethal secondary infection can be mediated predominantly by Thy-1⁺CD4⁻CD8⁻ cells. J. Infect. Dis. 164:869-877
37. **Durst, J.** 1975. The role of temperature factors in the epidemiology of listeriosis. Zentralbl. Bakteriol. Hyg., Abt. I. Orig A 233:72-745.
38. **Eby, M., Grufferman, S., Whiteside, T.L., Heberman, R.B.** 1988. Natural killer cell activity as a marker of immune dysfunction in the chronic fatigue syndrome. nat. Immun. Cell Growth Regul. 7:48
39. **Emmerling, P., Finger, H., Hof., H.** 1977. Cell-mediated resistance to infection with *Listeria monocytogenes* in nude mice. Infect. Immun. 15:382-395

40. **Fakhoury, G.W.** 1986. Complications of listeriosis during pregnancy and neonatal period. *J. Obstet. Gynaec.* 7:124-125
41. **Farber, J.M., Peterkin, P.I.** 1991. *L.monocytogenes*, a food borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55:476-511.
42. **Ferrini, S., Bottino, C., Biassoni, R., et al.** 1987. Characterization of CD3⁺CD4⁻CD8⁻ clones expressing the putative T cell receptor gene product. Analysis of the activation pathways leading to interleukin production and triggering of the lytic machinery. *J. Exp. Med.* 166:277-289
43. **Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikatytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V., Reingold, A.L.** 1985. Pasterized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 312:404-407.
44. **Flynn, J.L., Weiss, W.R., Norris, K.A., Seifert, H.S., Kumar, S., So, M.** 1990. Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a Sak antigen delivery system. *Mol. Microbil.* 4:2111-2118
45. **Fuchs, R.S., Surendran, P.K.** 1989. Incidence of Listeria in tropical fish and fishery products. *Letters Appl. Microbiol.* 9:49-51
46. **Fujihashi, K., Kiyono, H., Aicher, W.K., et al.** 1989. immunoregulatory function of CD3⁺,CD4⁻ and CD8⁻ T cells. $\gamma\delta$ T cell receptor-positive T cells from nude mice abrogate oral tolerance. *J. Immunol* 143:3415-3422
47. **Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., Sansonetti, P.** 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of

- L.monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line CaCo-2. Infect. Imm. 11:2822-2829.
48. **Garcia-Penarrubia, P., Koster, F.T., Kelley, R.O., McDowell, T.D., Bankurst, A.D.** 1989. Antibacterial activity of human natural killer cells. J. Exp. Med. 169:99-104
49. **Gellin, B.G., Broome, C.V.** 1989. Listeriosis. JAMA 261:1313-1320
50. **Glass, K.A., Doyle, M.P.** 1989. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. Appl. Environ. Microbiol. 55:1565-1569
51. **Goodman, T., Lefrancois, L.** 1988. Expression of the $\gamma\delta$ -T cell receptor on intestinal CD8⁺ intraepithelial lymphocytes. Nature 336:479-451
52. **Goossens, P.L., Marchal, G., Milon, G.** 1988. Early influx of *Listeria*-reactive T lymphocytes in liver of mice genetically resistant to listeriosis. J. Immunol. 141:2451-2455
53. **Goossens, P.L., Jouin, H., Milon, G.** 1991. Dynamics of lymphocytes and inflammatory cells recruited in liver during murine listeriosis. J. Immunol. 147:3514-3520
54. **Goulet, V., Le Magny, F., Ribiere, I., Espaze, E.P.** 1989. La listeriose en France en 1987: étude rétrospective à partir d'un échantillon d'hôpitaux publics. Bulletin Epidemiol. Hebdomad. 12:45-46
55. **Gray, M.L., Stafsetk, H.I., Thorp, T. Jr., Shool, L.B., Riley, W.F.Jr.** 1942. A new technique for isolating *Listeriae* from bovine brain. J. Bacteriol 55:471-473

56. **Gregory, S.H., Barczynski, L.K., Wing, E.J.** 1992. Effector function of hepatocytes and Kupffer cells in the resolution of systemic bacterial infection. *J. Leukocyte Biol.* 52:421-424
57. **Harty, L.M., Portnoy, D.A., Unanue, E.R.** 1990. Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8⁺ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular growth. *J. Immunol* 145:3540-3546
58. **Harty, J.T., Bevan, M.J.** 1995. Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the clearance of IFN γ . *Immunity* 3:109-117
59. **Havell, E.A.** 1986. Synthesis and secretion of interferon by murine fibroblast in response to intracellular *L. monocytogenes*. *Infect. Immun.* 54:787-792
60. **Havell, E.A.** 1986. Purification and further characterization of an anti-murine interferon- γ monoclonal neutralizing antibody. *J. Interferon Res.* 64:489-497
61. **Hatcher, F.M., Kuhn, R.E.** 1982. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science* 218:295-296
62. **Hayes, P.S., Geeley, J.C., Graves, L.M., Ajello, G.W., Fleming, D.W.** 1986. Isolation of *L.monocytogenes* from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:438-
63. **Heisick, J.E., Wagner, D.E., Nieman, M.L., Peeler, J.T.** 1989. *Listeria* spp. found on fresh market produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1925-1927
64. **Hidore, M.R., Murphy, J.W.** 1986. Correlation of natural killer cell activity and clearance of *Cryptococcus neoformans* from mice after



106. **Morris, I.J., Ribeiro, C.D.** 1991. The occurrence of *Listeria* species in pâté: the Cardiff experience 1989. *Epidemiol. Infect.* 107:111-117
107. **Murray, E.G.D., Webb, R.E., Swann, M.B.R.** 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J. Pathol. Bacteriol.* 29:407-439.
108. **Murphy, J.W., McDaniel, D.O.** 1982. In vitro reactivity of natural killer cells against *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 128:1577-1583.
109. **Nakane, A., Minagwa, T., Kohanawa, M., Chen, Y.U., Sato, J., Moriyama, M., Tsuruoka, N.** 1989. Interactions between endogenous gamma interferon and tumor necrosis factor in host resistance against primary and secondary *L.monocytogenes* infections. *Infect. Immun.* 57:3331-3337.
110. **Newborg, M.F., North, R.J.** 1980. The mechanisms of T cell independent anti-*Listeria* resistance in nude mice. *J. Immunol.* 124:571-576
111. **North, R.J.** 1973. Cellular mediators of anti-*Listeria* immunity as an enlarged population of short-lived replicating T-cells. *J. Exp. Med.* 138:342-355.
112. **Notermans, S.H.W., Dufrenne, J., Leimeister-Wächter, M., Domann, E., Chakraborty, T.** 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:266-2670

98. **McLauchlin, J.** 1987. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *J. Appl. Bacteriol.* 63:1-11
99. **Mielke, M., Ehlers, S., Hahn, H.** 1988. The role of T-cell-subpopulations in cell mediated immunity to facultative intracellular bacteria. *Infection* 16(suppl 2):123-127.
100. **Miller, E.B., Hiserodt, J.C., Hunt, L.E., Steen, U.D., Medsger T.A.Jr.** 1988. Reduced natural killer activity in patients with systemic sclerosis. *Arteritis Rheum.* 31:1515-1523.
101. **Mitsuyama, M., Takeya, K., Nomoto, K., Shimotori, S.** 1978. Three phases of phagocyte contribution to resistance against *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Microbiol.* 106:165-171
102. **Monlder J.W.** 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol. Rev.* 49:298-337.
103. **Moretta, L., Ciccone, E., Ferrini, S., et al.** 1991. Molecular and cellular analysis of human T lymphocytes expressing $\gamma\delta$ T-cell receptor. *Immunol Rev.* 120:117-135
104. **Mosmann, T.R., Coffman, R.L.** 1989. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145-173
105. **Mournies J., Ryter, A., Coqnis-Rondon, M., Sansonetti, P.** 1990. Intracellular and cell-to-cell spread of *L.monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocyte like cell like CaCO-2. *Infect. Imm.* 58:1048.

90. **Lefford, M.J., Warner, S., Amell, L.** 1979. *Listeria pneumonitis*: influence of route immunization on resistance to airborne infection. *Infect. Imm.* 25:672-679.
91. **Linnan, M.J., L., Mascola, X.D., Lou, V., Goulet, et al.** 1988. Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese. *N. Engl. J. Med.* 319:823-828
92. **Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J.** 1992. Poly's lamenti the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol. Today* 13:169-176.
93. **Lovett, J., Francis, D.W., Hunt, J.M.** 1987. *L.monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence and pathogenicity. *J. Food Protect.* 50:188-192
94. **Mackness, G.B.** 1962. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* 116:381-385.
95. **Mackness G.B.** 1969. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. *J. Exp. Med.* 129:973-992.
96. **Mandell, T.E., Cheers, C.** 1980. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. *Infect. Imm.* 30:851-861
97. **Marshall, N.E., Ziegler, H.K.** 1991. Role of bacterial hemolysin production in induction of macrophage ia expression during infection with *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 147:2324-2332

82. **Koller, B., Marrack, P., Kappler, J.W., Smithies, O.** 1991. Normal development of mice deficient in β_2M , MHC Class I proteins, and CD8⁺ T cells. *Science* 248:1227-1230
83. **Konig, F., Stingl, S., Yokoyama, W.M., Yamada, H., et al.** 1987. Identification of T3-associated $\gamma\delta$ T cell receptor on Thy1⁺ epidermal cell line. *Science* 236:834-837
84. **Kvenberg, J.E.** 1988. Outbreaks of listeriosis/*Listeria* contaminated foods. *Micro. Sci.* 5:355-358
85. **Lamont, R.J., Postletwaite, R., MacGowan, A.P.** 1988. *Listeria monocytogenes* and its role in human infection. *J. Infect.* 17:7-28
86. **Lamousé-Smith, Clements, V.K., Ostrand-Rosenberg, S.** 1993. β_2M -/- knockout mice contain low levels of CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte that mediate specific tumor rejection. *J. Immunol.* 151:6283-6290
87. **Lane, F.C., Unanne, E.R.** 1972. Requirements of thymus (T) lymphocyte for resistance to listeriosis. *J. Exp. Med.* 135:1104-1113
88. **Langermans, J.A.M., Van der Hulst, M.E.B., Nibbering, P.H., van der Meide, P.H., van Furth, R.** 1992. Intravenous injection of interferon-gamma inhibits the proliferation of *Listeria monocytogenes* in the liver but not the spleen and peritoneal cavity. *Immunology* 77:354-359
89. **Lanies, L.L., Le, A.M., Phillips, J.H., Warner, H.L., Babcock, G.F.** 1983. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Len-7 (HNK-1) and Len-11 (NK-15) antigens. *J. Immunol.* 131:1789-1796.

74. **Juntilla, J.R., Niemela, S.I., Hiru, J.** 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *J. Appl. Bacteriol.* 65:321-327
75. **Jurado, R.L., Farley, M.M., Pereira, E., et al.** 1993. Increased risk of meningitis and bacteriemia due to *L.monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 14:815-821
76. **Kauffer, D.A., Silverman, S.J., Roessler, W.G., Drawdy, J.F.** 1963. Virulence of *Listeria monocytogenes* for experimental animals. *J. Infect. Dis.* 112:167-180
77. **Kaufmann, S.H.E.** 1988. CD8⁺ T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol. Today* 9:168-174
78. **Kaufmann, S.H.E.** 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Ann. Rev. Immunol.* 1. 1:129
79. **Kaufmann, S.H.E.** 1993. Immunity to intracellular bacteria. *U Fundamental Immunology*, 3rd edition, Willim E. Paul, Raven Press, Ltd., New York, 1251-1286
80. **Kaufmann, S.H.E.** 1995. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Imm. Today* 16:338-342
81. **Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.** 1975. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells: specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 5:112-117

- adoptive transfer of splenic nylon wool non-adherent cells. *Infect. Immun.* 51:547-555.
65. **Ho, J.L., Shands, K.N., Friedland, G., Eckind, P., Fraser, W.** 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch. Intern. Med.* 146:520-524
 66. **Hof, H., Hefner, P.** 1988. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. *Infection* 16:Suppl 2:S141-144
 67. **Hoffman, T.** 1980. Natural killer function in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 23:30-35.
 68. **Hume, O.S., Facog, M.P.H.** 1976. Maternal *Listeria monocytogenes* septicemia with sparing of the fetus. *Obstet. Gynaec.* 48:33-34
 69. **Introna, M., Mantovani, A.** 1983. Natural killer cells in human solid tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 2:337.
 70. **Jenkins, E.M., Njoku-Obi, A.N., Adams, E.A.** 1964. Purification of the soluble hemolysin of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 88:418-421
 71. **Jimenez, B.E., Murphy, J.W.** 1984. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides braziliensis*. Yeast phase. *Infect. Imm.* 46:552-558
 72. **Jondal, M.** 1987. The human NK cells: A short overview and a hypothesis on NK recognition. *Clin. Exp. Immunol.* 70:255-262.
 73. **Jonjić, S., Mutter, W., Weiland, F., Reddehase, M.J., Koszinowski, U.H.** 1989. Site-restricted persistent cytomegalovirus after selective long-term depletion of CD4-positive T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 169:1199-1212

113. **Ortaldo, J.R., Herberman, R.B.** 1984. Heterogeneity of natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2:359-394.
114. **Osebold, J.W., Inouye, T.** 1954.a Pathogenesis of *L.monocytogenes* infections in natural hosts. I. Rabbit studies. *J. Infect. Dis.* 95:52-66.
115. **Osebold, J.W., Inouye, T.** 1954.b Pathogenesis of *L.monocytogenes* infections in natural hosts. II Sheep studies. *J. Infect. Dis.* 95:67-78.
116. **Patel, P.J.** 1981. Aging and cellular defense mechanisms: age related changes in resistance of mice to *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 32:557-562
117. **Patocka, F., Mencikova, E., Seeliger, H.P.R., Jirasek, A.** 1979. Neutrotropic activity of a strain *Listeria innocua* in suckling mice. *Zbl. Bakt., I. Abt.Orig. A.* 243:490-498
118. **Pinner, R.W., Reingold, A.L., Broome, C.V.** 1992. Role of foods in sporadic listeriosis. I. Case-control study of dietary risk factors. The *Listeria Study Group.* *JAMA* 267:2041-2045
119. **Plaeger-Marshall, S., Spine, C.A., Giorgi, J.V., Mitsuyasu, R., Wolfe, P., Gottlieb, M., Beall, G.** 1987. Alterations in cytotoxic and phenotypic subsets of natural killer cells in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *J. Clin. Immunol.* 7:16-23.
120. **Portnoy, D.A., Jacks, P.S., Hiuricks, D.J.** 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J Exp. Med.* 167:1459-1471

121. **Portnoy, D.A., Chakraborty, T., Goebel, N., Cossart, P.** 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* 60:1263-1267
122. **Racz, P., Tenner, K., Mero E.** 1972. Experimental *Listeria* enteritis I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. *Lab. Invest.* 26:694-700.
123. **Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C., Piffaretti, J.C.** 1992. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:171-174
124. **Rogers, H.W., Unanne, E.R.** 1993. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *L.monocytogenes* in mice. *Infect. Imm.* 61:5090-5096.
125. **Sasaki, T., Mieno, M., Usono, H., et al.** 1990. Roles of CD4⁺ and CD8⁺ cells, and the effect of administration of recombinant murine interferon γ in listerial infection. *J. Exp. Med.* 171:1141-1154
126. **Schaffner, A., Douglas, H., Davis, C.E.** 1983. Models of T-cell deficiency in listeriosis: the effects of cortisone and cyclosporine A on normal and nude BALB/c mice. *J. Immunol.* 131:450-453
127. **Schlech, W.F., Cavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldene, E.V., Wort, A.J. Hightower, A.W., Johnson S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., Broome, C.V.** 1983. Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* 308:203-206.

128. **Schlech, W.F. III** 1988. Virulence characteristics of *L.monocytogenes*. Food Technol. April, 176-179.
129. **Schuchat, A., Swaminathan, B., Broome, C.V.** 1991. Epidemiology of human listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 4:169-183
130. **Schuchat, A., Deaver, K.A., Wenger, J.D., Plikaytis, B.O., et al, and the Listeria Study Group.** 1992. Role of foods in sporadic listeriosis. I. Case-control study of dietary risk factors. JAMA 267:2041-2045
131. **Schultheis, R.J., Kearus, R.J.** 1990. In vivo administration of anti-asialo-GM1 antibody enhance splenic clearance of *Listeria monocytogenes*. Nat. Immun. Cell Growth Regul. 9:376-381
132. **Schwartz, B., Hexter, D., Broome, C.V., Hightower, A.V., et al.** 1989. Investigation of an outbreak of listeriosis: new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. J. Infect. Dis. 159:680-685
133. **Seeliger, H.P.R., Jones, D.** 1986. Genus *Listeria*. U Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2. ed. Sneath, P.H.A., N.S., Mair, M.E., Sharpe, J.G., Holt, 1235-1245, Baltimore:Williams and Willkins Co.
134. **Seeliger, H.P.R.** 1988. Listeriosis - history and actual developments. Infection 16:580-584.
135. **Shahamat, M., Seaman, A., Woodbine, M.** 1980. Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. Zentralbl. Bakteriol. Hyg. I. Abt. Orig. A. 246:506-508
136. **Sheehan, D.C., Hrapchak, B.B.** 1973. Theory and practice of histotechnology. 4 edition. The CV Mosby Company Saint Louis. 1973.

137. **Skogberg, K., Syrjanen, J., Janhola, M., et al.** 1992. Clinical presentation and outcome of listeriosis in patients with and without immunosuppressive therapy. *Clin. Infect. Dis.* 14:815-821
138. **Smith, R.A., Brzezicki, M.J., Griggs, N., Makrer, S.** 1989. The role of natural killer cells in experimental murine salmonellosis. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 8:331.
139. **Solomon, J.B., Forbes, M.G., Solomon, G.** 1985. A possible role of natural killer cells in providing protection against *Plasmodium berghei* in early stages of infection. *Immunol. Lett.* 9:349-352.
140. **Sun, A.N., Camilli, A., Portnoy, D.A.** 1990. Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 58:3770-3778
141. **Svare, J., Andersen, L.F., Langhott-Roos., J., et al.** 1991. Maternal-fetal listeriosis: 2 case reports. *Gynecol. Obstet. Invest.* 31:179-181
142. **Teixeira, H.C., Kaufmann, S.H.E.** 1994. Role of NK1.1⁺ cells in experimental listeriosis. *J. Immunol.* 152:1873-1882.
143. **Tilney, L.T., Portnoy, D.A.** 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Biol.* 109:1597-1608
144. **Timonen, T., Ortaldo, J.R., Herberman, R.B.** 1981. Characteristic of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer cells. *J. Exp. med.* 153:569-582.
145. **Trinchieri, G., Perussia, B.** 1984. Human natural killer cells: Biologic and pathologic aspects. *lab. Invest.* 50:489-513.

146. **Van Zon Adriaan, A.J.C., Eling, J., Wijnand, M.C.** 1980. Depressed maternal immunity in pregnant mice. *Infect. Immun.* 28:630-632
147. **Vincey, J., MacDonald, T.T., Spencer, J.** 1990. Gamma/delta T cells in the gut epithelium. *Gut* 31:841-844
148. **Weinberg, E.D.** 1984. Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. *Rev. Infect. Dis.* 6:814-831
149. **Welsh, R.M.** 1986. Regulation of virus infections by natural killer cells. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 5:169-199.
150. **Welshimer, H.J., Donker-Voet, J.** 1971. *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* 21:516-519
151. **Wenger, J.D., Hightower, A.W., Facklan, R.R. et al.** 1990. Bacterial meningitis in the United States, 1986: Report of a multistate surveillance study. *J. Infect. Dis.* 162:1316-1323
152. **Whiteside, T.L., Herberman, R.B.** 1989. The role of natural killer cells in human disease. *Clin. Imm. Immunopathol.* 53:1-23.
153. **Wood, L.V., Woodbine, M.** 1979. Low temperature of *Listeria monocytogenes* in the avian embryo. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* A243:74-81
154. **Yamamoto, S., Russ, F., Teixeira, H.C., Conradt, P., Kaufman, S.H.E.** 1993. *Listeria monocytogenes*-induced gamma interferon secretion by intestinal intraepithelial $\gamma\delta$ lymphocytes
155. **Yoshiaki, Y., Reis, M.D., Mak, T.W.** 1986. Athymic mice express a high level of functional γ -chain but greatly reduced levels of α - and β -chain T cell receptor messages. *Nature* 324:482-484

156. **Young, A.M., Cheers, C.** 1986. Colony-forming cells and colony stimulating activity during listeriosis in genetically resistant or susceptible mice. *Cell. Immunol.* 97:227-237
157. **Zijlstra, M., Li, E., Sajjadi, F., Subramani, S., Jaenisch, R.** 1989. Germ-line transmission of a disrupted β_2 -microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature (London)* 342:435-438
158. **Zijlstra, M., Bix, M., Simister, N.E., Loring, J.M., Raulet, D.H., Jaenisch, R.** 1990. β_2 -microglobulin deficient mice lack CD4⁺8⁺ cytolytic T cells. *Nature (London)* 344:742-746

BIJEČIŠNA KNJIZNICA
RIJEKA

ŽIVOTOPIS

Rodena sam 2. prosinca 1960. godine u Rijeci, gdje sam završila osnovno i srednje obrazovanje. Upisala sam studij opće medicine pri Medicinskom fakultetu u Rijeci 1979. godine, a diplomirala sam 7. ožujka 1985.

Pripravnički staž obavila sam u Domu zdravlja Rijeka. Završni stručni ispit sam položila 26. lipnja 1986.

Od 1. lipnja 1986. godine u stalnom sam radnom odnosu, kao doktor medicine, akasnije kao asistent, na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Dekret za sepcijalizaciju iz Medicinske mikrobiologije s paraziltologijom, odobrio mi je Republički komitet za zdravstvo i socijalnu zaštitu 26. prosinca 1986. U prosincu 1989. položila sam specijalistički ispit.

Nakon završenog poslijediplomskog studija iz Kliničke patofiziologije, smjer Turistička, pomorska i tropska medicina, godine 1991. obranila sam magistarski rad pod naslovom: "Utjecaj beta-laktamskih antibiotika na mehanizme specifične i nespecifične otpornosti."

U lipnju 1994. godine prihvaćena mi je tema doktorske disertacije pod naslovom: "Listerioza u miša - patogeneza i uloga stanične imunosti".

I. AUTOF

Ime i prezime	MAJA ABRAM
Datum i mjesto rođenja	2. PROSINCA 1960. Rijeka
Ime i naziv fakulteta, odnosno organizacije za postdiplomski studij i datum završene nastave i III stupnja	Medicinski fakultet u Rijeci, 1985. Medicinski fakultet u Rijeci 1992.
Posljednje zaposlenje	Asistent Medicinski fakultet u Rijeci

II. PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

LISTERIOZA U MISA - PATOGENEZA I ULOGA STANIČNE IMUNOSTI

Naslov rada	
Broj stranica, slika, tabela, bibliografskih podataka	104 str. 9 tab., 21 graf., 10 fotografija
Mjesto i mjesto gdje je disertacija izrađena	Medicinski fakultet u Rijeci
Naučna disciplina	Medicina
Mentori	Prof. dr. sc. Miljenko Dorić Prof. dr. sc. Stipan Jonjić
Fakultet na kojem je disertacija obranjena	Medicinski fakultet u Rijeci

III. OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme	2. svibnja 1994.
Datum predaje rada	12. veljače 1996.
Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen	16. travnja 1996.
Članovi povjerenstva koje je disertaciju ocijenilo	prof. dr. sc. Miro Marević, prof. dr. sc. Živojini Žagar, prof. dr. sc. Miljenko Dorić, prof. dr. sc. Stipan Jonjić
Datum obrane disertacije	3. svibnja 1996.
Članovi povjerenstva pred kojim je disertacija obranjena	I s t i
Datum promocije	