Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022 **Anna Mahdalová**

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky

Listerie jako původce zoonóz

Bakalářská práce

Anna Mahdalová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021 **Vedoucí práce: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Anna MAHDALOVÁ**
Osobní číslo:	**R19844**
Studijní program:	**B1501 Biologie**
Studijní obor:	**Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce:	**Listerie jako původce zoonóz**
Zadávající katedra:	**Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

(1) Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
(2) Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
(3) Zpracování teoretické části.
(4) Vyhodnocení dat.
(5) Konečná kompletace bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1) Votava, M. a kol. (2006) Lékařská mikrobiologie speciální. Brno, Neptun, 495 s.
2) Votava, M. a kol. (2010) Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody. Brno, Neptun, 495 s.
3) Julák, J. (2015) Úvod do lékařské bakteriologie. Praha, Karolinum, 404 s.
4) Melter, O., Malmgren, A. (2014) Principy a praktika lékařské mikrobiologie. Praha, Karolinum, 139 s.
5) Čížek, A. (1999) Praktika z veterinární bakteriologie a mykologie. Brno, Ústav mikrobiologie a imunologie FVL VFU, 93 s.
6) Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrik, E. S., Fanning, S., Hartigan, P. J. (2011) Veterinary Microbiology and Microbial Disease. West Sussex, UK, John Wiley & Sons Ltd, 928 s.

Vedoucí bakalářské práce: **MVDr. Jaroslav Bzdil, PhD.**
Státní veterinární ústav Olomouc

Datum zadání bakalářské práce: **17. června 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. července 2022**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 901
-2-

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 2. července 2021

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Anna Mahdalová

Název práce: Listerie jako původce zoonóz

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.

Rok obhajoby: 2022

Klíčová slova: *Listeria monocytogenes*, listerióza, patogenita, kultivace, identifikace

Počet stran: 52

Počet příloh: 0

Jazyk: český

ABSTRAKT

Listeria monocytogenes je všudypřítomná, vysoce odolná patogenní bakterie způsobující listeriózu. Listerióza je zoonóza, což znamená, že vyvolává onemocnění u lidí i u zvířat. Toto onemocnění má různý průběh v závislosti na imunitním systému hostitele. U zdravých jedinců může infekce proběhnou bezpříznakově nebo formou gastroenteritidy, nicméně u imunodeficientních jedinců může představovat smrtelné riziko.

Listerióza se léčí pomocí antibiotik, avšak musí být včas rozpoznána a identifikována. K identifikaci se běžně využívají kultivační metody. Pro rychlejší identifikaci se používají spíše modernější metody jako například imunochemické, molekulární genotypové nebo molekulární fenotypové.

Bibliographical identification

Author's first and surname: Anna Mahdalová

Title: Listeria as the causative agent of zoonoses

Type od thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science Palacký University Olomouc

Supervisor: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Keywords: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, pathogenicity, cultivation, identification

Number of pages: 52

Number of appendices: 0

Language: Czech

SUMMARY

Listeria monocytogenes is a ubiquitous, highly resistant pathogenic bacterium that causes listeriosis. Listeriosis is a zoonosis which means that it causes disease in both, humans and animals. Listeriosis can have various courses depending on the host's immune system. In healthy individuals, infections can occur asymptomatically or in the form of gastroenteritis. While in immunodeficient individuals, it can mean a fatal risk.

Listeriosis is treated with antibiotics, however, it must be recognized and identified on time. For its identification are commonly used cultivation methods. Nonetheless, modern methods such as immunochemical, molecular genotypic or molecular phenotypic are used for faster identification.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením MVDr. Jaroslava Bzdila, PhD. s využitím uvedených literárních zdrojů, které jsou uvedeny v závěru této práce.

V Olomouci dne ……. ……

Anna Mahdalová

Ráda bych poděkovala MVDr. Pavlu Bartákovi, Ph.D., řediteli SVÚ Jihlava za poskytnutí informací a podkladů o výskytu listerií ve veterinární sféře v České republice, vedoucímu bakalářské práce panu MVDr. Jaroslavu Bzdilovi, Ph.D. za jeho odborné a trpělivé vedení při psaní bakalářské práce, za jeho cenné rady a poskytnutí obrázků, které jsou použity v této bakalářské práci. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

OBSAH

1 ÚVOD ... 1
2 CÍLE PRÁCE ... 2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED ... 3
3.1 Taxonomie listerií ... 3
3.2 Morfologické a fyziologické vlastnosti listerií ... 3
3.3 Složení buněčné stěny ... 4
3.4 Antigenní struktura ... 5
3.5 Genetika a genom listerií ... 6
3.6 Biofilm ... 6
3.7 Kultivace listerií ... 7
3.7.1 Kultivační podmínky ... 7
3.7.1.1 Kultivační média ... 8
3.7.1.2 Chromogenní média ... 8
3.7.2 Morfologie kolonií ... 9
3.7.2.1 Krevní agar ... 9
3.7.2.2 ALOA agar ... 9
3.7.2.3 Rapid'L.mono ... 10
3.7.2.4 PALCAM agar ... 12
3.7.2.5 Oxford agar ... 12
3.8 Výskyt listerií ... 13
3.9 Patogenita listerií ... 15
3.10 Rezistence listerií k antimikrobiálním látkám ... 18
3.11 Klinický význam listerií u lidí ... 18
3.11.1 Gasteoenteritida vyvolaná listeriemi u lidí ... 19
3.11.2 Maternofetální a neonatální listerióza u lidí ... 19
3.11.2.1 Fetální listerióza ... 20
3.11.2.2 Neonatální listerióza ... 20
3.11.3 Neurolisterióza u lidí ... 20
3.11.4 Septikémie u lidí ... 21
3.12 Klinický význam listerií u zvířat ... 21
3.12.1 Neurolisterióza u zvířat ... 22
3.12.2 Septikémie u zvířat ... 22
3.13 Metody identifikace listerií ... 22
3.13.1 Norma ČSN EN ISO 11290 (560093) ... 23
3.13.2 Biochemické testy ... 24

3.13.2.1 CAMP test ... 24
3.13.2.2 Fermentace cukrů ... 26
3.13.2.3 Katalázový test ... 26
3.13.3 Identifikace pomocí komerčních souprav ... 26
3.13.4 Imunochemické metody ... 27
3.13.5 Molekulárně-genetické metody ... 28
3.13.5.1 PCR ... 28
3.13.5.2 Elektroforéza v pulsním poli (PFGE) ... 28
3.13.5.3 Ribotypizace ... 29
3.13.6 Fenotypové molekulární metody – hmotnostní spektrofotometrie MALDI-TOF 29
4 ZÁVĚR ... 31
5 LITERATURA ... 33

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ActA	Aktin indukující protein (*Actinassembly-inducing protein*)
ALOA	Agosti Ottaviani Listeria agar (selektivní agar pro rod *Listeria* dle Ottavianiho a Agostiho)
BCM	Biosynth Chromogenic medium
bp	Páry bazí (*base pairs*)
C1q	Komponenta komplementu 1q
CAMP test	Christie-Atkins-Munch-Peterson test
ČAS	Česká agentura pro standardizaci
ČSN	Česká státní norma (Česká technická norma)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid)*
dsDNA	Dvouvlákno deoxyribonukleové kyseliny (*Double stranded deoxyribonucleic acid*)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (enzymová imunoanalýza)
EN	Evropská norma (*European Standard*)
FB	Fraser bujón
G+C	Guanin + cytosin
HGF	Hepatocytární růstový faktor (*Hepatocyte growth factor*)
hly	Gen kódující listeriolysin O
Hpt	Hexóza fosfát transportér (*Hexosephosphate transporter*)
InlA	Internalin A
InlB	Internalin B
InlC	Internalin C
InlC2	Internalin C2
InlD	Internalin D
InlE	Internalin E
InlF	Internalin F
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci (*The International Organisation for Standardization*)
kb	kilobáze (*kilobase*)
kDa	kilodalton
KTJ	Kolonii tvořící jednotka
LIPI-1	Ostrov patogenity listerií (*Listeria pathogenicity island 1*)
LLO	Listeriolysin O
LRR	Proteiny bohaté na leucinové repetice (*Leucine rich repeats*)
m/z	Poměr hmotnosti a náboje

MALDI-TOF MS	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátorem *(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*)
Mb	Megabáze (*mega base*)
MOX agar	Modified Oxford Agar
mpl	Gen kódující metaloproteinázu zinku
NRL	Národní referenční laboratoř
PALCAM	Polymyxin Acriflavin Lithium-chloride Ceftazidime Esculin Mannitol (selektivní agar)
PCPL-C	Fosfatidylcholin fosfolipáza C
PCR	Polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)
PFGE	Pulzní gelová elektroforéza (*Pulsed-field Gel Electrophoresis*)
pH	Vodíkový exponent (*Potential of hydrogen*)
PIPL-C	Fosfatidylinositol fosfolipáza C
plcA	Fosfolipáza A / gen kódující fosfatidylinositol fosfolipázu C
plcB	Fosfolipáza B / gen kódující fosfatidylcholin fosfolipázu C
PrfA	Listeriolysin pozitivní regulační faktor A (*Listeriolysin positive regulatory factor A*)
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina (*ribosomal ribonucleotide acid*)
SVÚ	Státní veterinární ústav
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TOMV	Tepelně opracované masné výrobky
WHO	Světová zdravotnická organizace (*World Health Organization*)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: *Listeria monocytogenes* – Gramovo barvení, zvětšeno 1000x. Foto: J. Bzdil

Obrázek 2: Druhová specifita InlA a InlB u A – morčat a králíků, B – člověka, C – myší. Upraveno podle Cossart *et* Toledo-Araba (2008)

Obrázek 3: Schéma tvorby biofilmu. Převzato z Bursová *et al*. (2014b)

Obrázek 4: *Listeria monocytogenes* na krevním agaru. Foto: J. Bzdil

Obrázek 5: *Listeria ivanovii* na krevním agaru. Foto: J. Bzdil

Obrázek 6: *Listeria monocytogenes* na ALOA agaru. Foto: J. Bzdil

Obrázek 7: *Listeria grayi* na ALOA agaru. Foto: J. Bzdil

Obrázek 8: *Listeria monocytogenes* na Rapid'L.mono agaru. Foto: J. Bzdil

Obrázek 9: *Listeria ivanovii* na Rapid'L.mono agaru. Foto: J. Bzdil

Obrázek 10: *Listeria innocua* na Rapid'L.mono agaru. Foto: J. Bzdil

Obrázek 11: *Bacillus* spp. na Rapid'L.mono agaru. Foto: J. Bzdil

Obrázek 12: *Listeria monocytogenes* na PALCAM agaru. Převzato z Medios de Cultivo (2015)

Obrázek 13: *Listeria monocytogenes* na Oxford agaru. Převzato z Medios de Cultivo (2015)

Obrázek 14: Schematické znázornění procesu buněčné infekce *Listeria monocytogenes*. InlA – Internalin A, InlB – Internalin B, LLO – listeriolyzin O, PlcA – Fosfatidylinositol fosfolipáza C, PlcB – Fosfatidylcholin fosfolipáza C, ActA – Aktin indukující protein. Upraveno podle Pizarro-Cerdá *et al*. (2012)

Obrázek 15: Průkaz bakterií *Listeria monocytogenes* v potravinách. Převzato z Cupáková *et al*. (2010)

Obrázek 16: *Listeria monocytogenes* – dvojitý CAMP test na krevním agaru se *Staphylococcus aureus* a *Rhodococcus equi*. Foto: J. Bzdil

Obrázek 17: *Listeria ivanovii* – dvojitý CAMP test na krevním agaru se *Staphylococcus aureus* a *Rhodococcus equi*. Foto: J. Bzdil

Obrázek 18: *Listeria welshimeri* – biochemický test API-Listeria (Bio-Mérieux, Francie). Foto: J. Bzdil

Obrázek 19: Mikrotitrační destička k identifikačnímu systému Biolog (Biolog, Inc., USA). Foto: J. Bzdil

Obrázek 20: Schematický diagram pohybu pruhu DNA v PFGE, pulsně-periodická reorientace DNA na PFGE gelu. Převzato z Neoh *et al*. (2019)

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled stanovení *Listeria monocytogenes* ve stěrech po dezinfekci provedených SVÚ Jihlava v letech 2015 až 2020 (počet a %)

Tabulka 2: Přehled stanovení *Listeria monocytogenes* v masných výrobcích provedených SVÚ Jihlava v letech 2015 až 2020 (počet a %)

Tabulka 3: Faktory virulence *Listeria monocytogenes* jejich funkce a geny za ně zodpovídající. Převzato z Freitag *et al*. (2009)

Tabulka 4: Tvorba hemolýzy jednotlivých druhů rodu *Listeria* na základě CAMP testu. Převzato z Quinn *et al*. (2011)

Tabulka 5: Diferenciace druhů rodu *Listeria* na základě fermentace cukrů. Převzato z Allerberger (2003)

1 ÚVOD

Listeria byla poprvé popsána v roce 1926 Murrayem a jeho kolegy díky náhlému úmrtí šesti mladých králíků a byla pojmenována *Bacterium monocytogenes*, kvůli zvýšenému počtu cirkulujících monocytů v tělech králíků. Nezávisle na tom v roce 1927 Pierre pojmenoval bakterii *Listerella hepatolytica* na počest pana Josepha Listera, britského chirurga a průkopníka antiseptické techniky, poté co bakterii izoloval z jater několika pískomilů. Teprve v roce 1940 byl přijat název *Listeria monocytogenes*.

Listerie jsou ubikvitárně vyskytující se bakterie, běžně žijící v půdě, odpadních vodách a na vegetaci. Vyskytovat se mohou také v silážích, ve výrobních halách či nemocnicích, kde hrozí vysoké riziko nákazy listeriózou. Listeriózu u lidí způsobuje bakterie *Listeria monocytogenes*, u zvířat listeriózu navíc vyvolá také bakterie *Listeria ivanovii* a vzácně *Listeria innocua*. Listerióza nejčastěji postihuje imunodeficientní jedince, těhotné ženy, novorozence a starší jedince. U zvířat se listerióza vyskytuje nejčastěji u přežvýkavců, napadá ovšem širokou škálu zvířat včetně ryb, hlodavců, ptáků či korýšů. Hlavní vstupní branou infekce je trávicí trakt, listerióza se tak řadí mezi alimentární onemocnění, tedy onemocnění způsobené pozřením kontaminované potravy či tekutiny. V potravinách se listerie snadno množí díky vysoké odolnosti vůči nízkým teplotám a vysokému obsahu soli.

Příznaky onemocnění jsou rozmanité a různě závažné. Nejlehčí forma onemocnění je gastroenteritida často doprovázena symptomy podobnými chřipce. Listerióza může mít také vážnější průběh ve formě život ohrožující septikémie či meningitidy. Proto je důležitá včasná diagnostika a zahájení léčby antibiotiky. Bohužel kvůli nespecifickému klinickému obrazu a nízké incidenci lékaři často výskyt listeriózy nepředpokládají a nemoc tak může být pro rizikové skupiny fatální.

Touto prací bych chtěla zvýšit veřejné povědomí o listeriích a listeriózách, tedy onemocněních listeriemi způsobovaných, přinést relevantní informace o jednotlivých formách listeriózy, zamyslet se nad problematikou identifikace a diagnostiky případně navrhnout další možné kroky a řešení, jak dlouhodobě snížit výskyt listeriózy.

2 CÍLE PRÁCE

1 Shromáždění dostupných literárních zdrojů.

2 Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.

3 Zpracování teoretické části.

4 Vyhodnocení dat.

5 Konečná kompletace bakalářské práce.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Taxonomie listerií

Rod *Listeria* se řadí do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales*, čeledi *Listeriaceae* (Euzéby, 2021). Rod *Listeria* tvoří dva klády *Listeria sensu stricto* a *Listeria sensu lato*. Druhy v kládu *sensu stricto* jsou druhy *Listeria monocytogenes* (Murray *et al*., 1926), lidský patogen, *Listeria ivanovii* (Seeliger *et al*., 1984), zvířecí patogen. Další čtyři druhy, které byly izolovány ze zvířat bez příznaků onemocnění jsou *Listeria seeligeri* (Rocourt *et* Grimont, 1983), *Listeria innocua* (*ex* Seeliger *et* Schoofs, 1979), *Listeria welshimeri* (Rocourt *et* Grimont, 1983) a *Listeria marthii* (Graves *et al*., 2010).

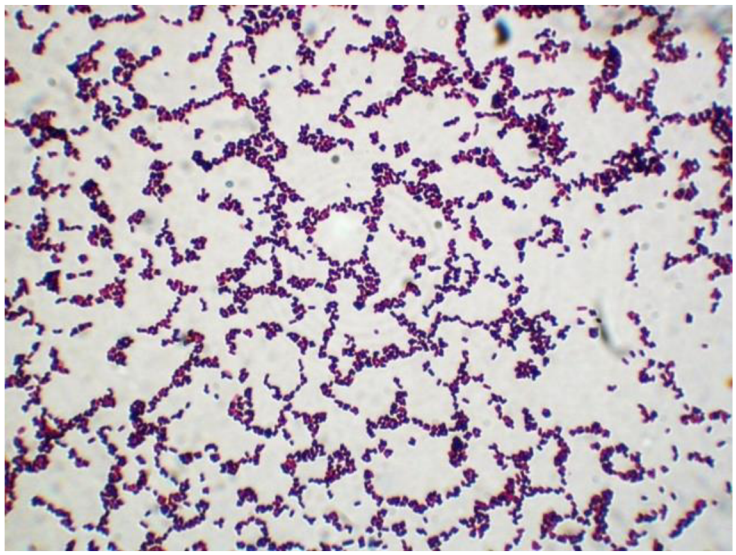
Členové kládu *sensu lato* jsou výhradně enviromentální bez schopnosti kolonizovat savčí hostitele (Schardt *et al*., 2017). Do kládu *sansu lato* se řadí dalších 22 druhů, *Listeria aquatica* (Bakker *et al*., 2014), *Listeria booriae* (Weller *et al*., 2015), *Listeria cornellensis* (Bakker *et al*., 2014), *Listeria cossartiae* (Carlin *et al*., 2021), *Listeria costaricensis* (Núñez-Montero *et al*., 2018), *Listeria denitrificans* (Prévot, 1961), *Listeria farberi* (Carlin *et al*., 2021), *Listeria fleischmannii* (Bertsch *et al*., 2013), *Listeria floridensis* (Bakker *et al*., 2014), *Listeria goaensis* (Doijad *et al*., 2018), *Listeria grandensis* (Bakker *et al*., 2014), *Listeria grayi* (Errebo Larsen *et* Seeliger, 1966), *Listeria immobilis* (Carlin *et al*., 2021), *Listeria murrayi* (Welshimer *et* Meredith, 1971), *Listeria newyorkensis* (Weller *et al*., 2015), *Listeria portnoyi* (Carlin *et al*., 2021), *Listeria riparia* (Bakker *et al*., 2014), *Listeria rocourtiae* (Leclercq *et al*., 2010), *Listeria rustica* (Carlin *et al*., 2021), *Listeria thailandensis* (Leclercq *et al*., 2019), *Listeria valentina* (Quereda *et al*., 2020), *Listeria weihenstephanensis* (Lang Halter *et al*., 2013). Celkem je tedy v současné době známo 28 druhů a šest poddruhů listerií (Euzéby, 2021).

3.2 Morfologické a fyziologické vlastnosti listerií

Listerie jsou grampozitivní aerobní nebo fakultativně anaerobní, nesporulující, pohyblivé, kokobacilární tyčinky o šířce do 0,5 µm a délce 2 µm (Quinn *et al*., 2011). Vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích, příležitostně tvoří i řetízky či palisády – viz obrázek 1 (Brychta *et al*., 2018). Všechny listerie produkují enzym katalázu, fermentují glukózu s tvorbou kyseliny, ale bez produkce plynu, hydrolyzují eskulin a jsou oxidáza negativní (Cupáková *et al*., 2008). Listerie mají jeden až čtyři bičíky, které jsou mnohonásobně delší než buňka samotná (Brychta *et al*., 2018). Bičíky jsou umístěné peritrichálně a zprostředkovávají pohyb, který je typický kroutivými pohyby s přemety a rotacemi (Ryser *et* Marth, 2007). Teplota, při které se listerie pohybují je v rozmezí 20–25 °C, při teplotě 37 °C bičíky vymizí a buňky se tak stávají nepohyblivými. Listerie jsou psychrofilní bakterie, přežívají a dělí se i v poměrně extrémních podmínkách. Rostou a dělí se v širokém rozmezí teplot od 1 °C do 45 °C. Dokážou se množit

v prostředí s pH v rozmezí od 4,3 do 9,6 (optimální hodnota pH je 7,0). Přežívají a dělí se i v přítomnosti 10 % NaCl a aktivitě vody do 0,92 (Brychta *et al*., 2018).

Listerie zvyšují svou odolnost vůči vnějšímu prostředí také tvorbou biofilmu, především vůči antimikrobiálním látkám a dezinfekčním prostředkům (Kvasničková *et al*., 2016). Účinné dezinfekční prostředky degradující biofilmy jsou enzymatickými detergenty. Pro větší účinnost je vhodné použít i další dezinfekční prostředky například kvartérní amoniové sloučeniny, povidon, jod, chlorhexidin, 7 % ethanol, glutaraldehyd a chlornan sodný (OIE, 2021).



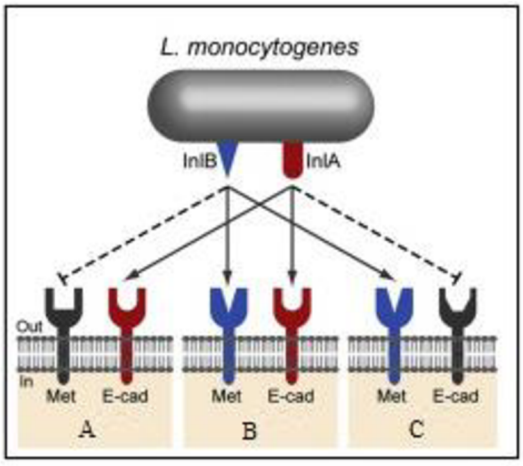
Obrázek 1: *Listeria monocytogenes* – Gramovo barvení, zvětšeno 1000x. Foto: J. Bzdil

3.3 Složení buněčné stěny

Listeria monocytogenes tvoří zvnějšku tzv. buněčnou stěnu. Buněčná stěna zajišťuje integritu buňky při vysokém vnitřním osmotickém tlaku, zároveň dává bakterii specifický tvar a chrání ji před mechanickým poškozením (Pucciarelli *et al*., 2007). Buněčná stěna je tvořena vícevrstvým zesítěným peptidoglykanem s kyselinou teichoovou, kyselinou lipoteichoovou, polyfosfáty případně sacharidy. Lineární řetězce kyseliny teichoové probíhají peptidoglykanovou vrstvou kolmo k povrchu buňky, nepodílí se na pevnosti buněčné stěny. Její funkcí je vázat kationty, které jsou hlavními povrchovými antigeny (Bursová *et al*., 2014b). Glykanová vlákna buněčné stěny se skládají z opakujícího se disacharidu kyseliny N-acetylmuramové-(1-4)-N-acetylglukosamin (MurNAc-GlcNAc) (Navarre *et* Schneewind, 1999), vytváří lineární polymer dvou pravidelně se střídajících aminocukrů (Bursová *et al*., 2014b). Tyto vazby jsou hydrolyzovány lysozymem (Bursová *et al*., 2014b). Peptidy stěny jsou zesíťovany s jinými peptidy, které jsou vždy připojeny k sousednímu glykanovému řetězci, čímž vytvářejí trojrozměrnou molekulární síť. Grampozitivní bakterie obecně dokážou imobilizovat proteiny na svém povrchu, buď kovalentním připojením proteinu k peptidoglykanu

nebo nekovalentní vazbou proteinu k peptidoglykanu nebo polymerům buněčné stěny, jako je kyselina teichoová.

Listerie na svém povrchu nesou především proteiny internaliny, díky kterým jsou schopny vstupovat do hostitelských eukaryotických buněk. V současné době známe sedm členů z rodiny internalinů (InlA, InlB, InlC, InlC2, InlD, InlE, InlF) (Navarre *et* Schneewind, 1999). Internalin A interaguje s transmembránovým adhezním proteinem E-kadherinem a zprostředkovává vstup *Listeria monocytogenes* do epiteliárních buněk střevní, hematoencefalitické a placentární bariéry hostitele (Liu, 2006; Oevermann *et al.*, 2010). Internalin B rozpoznává globulární receptor C1q-R nebo Met, aby usnadnil vstup *Listeria monocytogenes* do širšího spektra typů hostitelských buněk, jako jsou např. hepatocyty, fibroblasty a epiteloidní buňky (Liu, 2006). Proteinový komplex C1q-R je podsložkou komplexu C1 což je komponenta komplementu. C1q komplex je přítomen na povrchu efektorových buněk a je zapojený do nespecifického humorálního imunitního systému (Kishore *et* Reid, 2000). Met je receptor tyrosinkinázy, jehož přirozeným ligandem je hepatocytární růstový faktor, HGF viz obrázek 2 (Shen *et al.*, 2000). Vysoký stupeň diverzity buněčné stěny naznačuje i výskyt různých dnes známých sérotypů *Listeria monocytogenes* (Shen *et al.*, 2017).



Obrázek 2: Druhová specifita InlA a InlB u A – morčat a králíků, B – člověka, C – myší. Upraveno podle Cossart *et* Toledo-Araba (2008)

3.4 Antigenní struktura

Jednotlivé druhy listerií obsahují specifické skupinové povrchové proteiny neboli epitopy, somatické (O) a bičíkové neboli flagelární (H) antigeny. Somatických antigenů O existuje patnáct podtypů (I–XV), bičíkových antigenů H existují jen čtyři podtypy (A–D). Jednotlivé kmeny jsou určeny unikátní kombinací O a H antigenů (Liu, 2006). *Listeria monocytogenes* je rozdělena do základních 13 sérotypů (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e a 7) na základě reakcí známých antigenů O a H se specifickými antiséry (Dhama *et al.*, 2015). Existuje i vztah mezi jednotlivými sérotypy a jejich virulencí. Listeriózu člověka způsobují především sérotypy

1/2a, 1/2b a 4b (Shen *et al*., 2017). Sérotyp 4b byl zjištěn u hromadných epidemií zatímco sérotypy 1/2a, 1/2b byly prokázány u menších epidemií či solitérních onemocnění (Liu, 2006).

Listerie jsou dále děleny do čtyř evolučních linií na základě genotypizace. Linie I obsahuje sérotypy1/2b, 3b, 4ab, 4b, 4d, 4e a 7. Linie II obsahuje sérotypy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c a linie III obsahuje sérotypy 4a a 4c (Liu, 2008). Do linie IV jsou řazeny atypické sérotypy 4b (Haase *et al*., 2014).

3.5 Genetika a genom listerií

Genom *Listeria monocytogenes* je umístěn v nepravém jádře, které není odděleno jadernou membránou, nemá stálý tvar a skládá se z jednoho kovalentně uzavřeného cirkulárního chromozomu, který je dlouhý 2,9 Mb (2 944 528 bp) a kóduje 3 055 genů (Bursová *et al*., 2014b; NCBI, 2021a). Genom má průměrný obsah G+C 39 % a až 4,7 % všech genů kóduje povrchové proteiny (internalin InlA, InlB), transportní proteiny, zejména proteiny určené pro transport sacharidů dále secernované proteiny a regulátory (Buchrieser *et al*., 2003; Cossart *et* Toledo-Arana., 2008; NCBI, 2021a). Průměrný obsah proteinů je 2899 (NCBI, 2021a).

Listeria monocytogenes nese svou genetickou informaci také v extrachromozomálních mobilních genetických elementech jako jsou plazmidem nesený transpozon, mobilizovatelné a konjugativní plazmidy (Schmitz-Esser *et al*., 2021). Podle zprávy NCBI má *Listeria monocytogenes* 62 různých plazmidů v průměru o velikosti od 25 kb do 100 kb, obsah G+C se opět pohybuje do 39 % (NCBI, 2021b). Plazmid je označení pro malé kruhové molekuly dsDNA neboli extrachromozomální replikony. Replikují se autonomně a nesou přídatnou genetickou informaci, která poskytuje bakteriím možnost adaptace na měnící se podmínky prostředí (Bursová *et al*., 2014b; Schmitz-Esser *et al*., 2021). Poskytují tak výhodu pro přežití stresových podmínek jako jsou tepelný a chladový stres, oxidace, vysoká salinita, kyselost, přítomnost antimikrobiálních látek, přítomnost sanitačních prostředků či těžkých kovů (Chmielowska *et al*., 2021; Mao *et al*., 2021). Plazmidy mohou být přenášeny v rámci bakteriálního druhu i mezi druhy (Schmitz-Esser *et al*., 2021). Ze všech zatím známých a izolovaných plazmidů zvyšuje virulenci pouze jeden, který kóduje čtyři proteiny podobné internalinu (Chmielowska *et al*., 2021). Klíčové geny virulence jsou seskupeny v genomovém prvku označeném jako shluk virulence prfA nebo ostrov patogenity LIPI (Bakker *et al*., 2010).

3.6 Biofilm

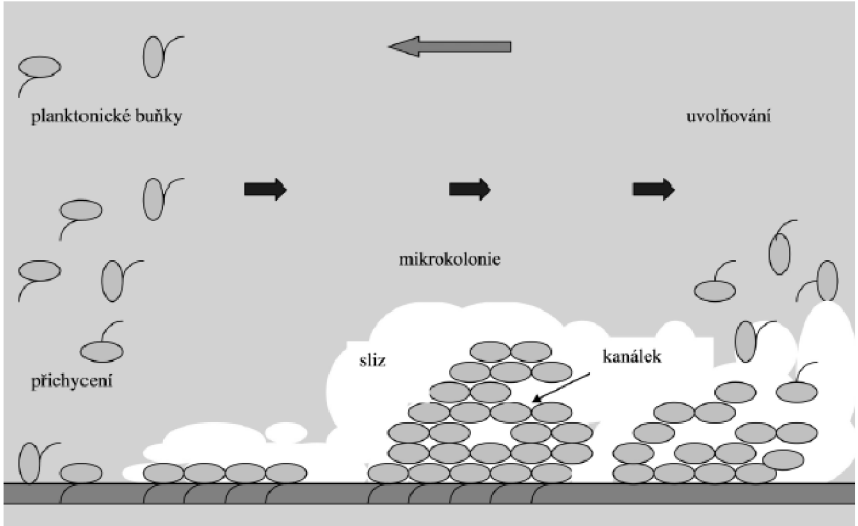
Bakterie se vyskytují ve dvou životních formách, volně v prostoru v podobě izolovaných buněk v takzvané planktonické formě nebo se seskupují a vytvářejí mikrobiální společenství označované jako biofilm, který je připojen k povrchu a vytváří slizký povlak (Smirnova *et al*., 2010; Bursová *et al*., 2014b). Tvorba biofilmu začíná adhezí planktonních bakterií pomocí bičíků a membránových proteinů na živém povrchu nebo na abiotickém inertním povrchu, například

na nerezové oceli, polystyrenu či sklu s následnou proliferací a tvorbou mikrokolonií. Ty se postupně zvětšují a spojují se (Renier *et al*., 2011; Janež *et al*., 2021). V poslední fázi vývoje biofilmu se bakterie oddělují a rozptylují do prostředí v planktonní formě, což představuje potenciální zdroj kontaminace viz obrázek 3 (Colagiorgi *et al*., 2017).

Biofilm tvoří trojrozměrnou strukturu, složenou z mezibuněčné matrix, kterou typicky tvoří polysacharidová pouzdra a exopolysacharidy (Bursová *et al*., 2014b). Biofilm, který produkuje *Listeria monocytogenes*, tvoří povrchovou strukturu, která je složena převážně z DNA a proteinových materiálů (Gaballa *et al*., 2019). Biofilm má zabudované široké prostory a kanálky, které přináší živiny a odvádí odpadní látky (Bursová *et al*., 2014b).

Tvorba biofilmu je pro bakterie v mnoha ohledech výhodná. Bakterie v biofilmu jsou odolnější vůči vnějším faktorům, například proti vysychání, účinku antibiotik a dezinfekčních látek (Bursová *et al*., 2014b). Zároveň si bakterie v biofilmu vyměňují signální molekuly, živiny a dochází k horizontálnímu přenosu genů (Smirnova *et al*., 2010).

Kvůli možné křížové nákaze a zvýšené odolnosti vůči antibiotikům a dezinfekcím je třeba dbát zvýšené pozornosti v lékařské oblasti (kloubní náhrady, intravenózní katetry atd.), potravinářství (povrchy výrobních zařízení, potrubí, ventily atd.), ale také v přírodě, kde mohou biofilmy negativně ovlivňovat kvalitu vody (Smirnova *et al*., 2010; Bursová *et al*., 2014b).



Obrázek 3: Schéma tvorby biofilmu. Převzato z Bursová *et al*. (2014b)

3.7 Kultivace listerií

3.7.1 Kultivační podmínky

Kultivačně je *Listeria* spp. nenáročná, kultivace se provádí na běžných kultivačních médiích, například na krevním, tryptózovém agaru (Jadhav *et al*., 2015) čokoládovém agaru nebo živném agaru s přídavkem ovčí krve (Donovan, 2015).

Při kultivaci a diagnostice se využívá schopnost listerií žít a množit se v extrémních podmínkách (Votava *et al.*, 2006). Listerie se dělí, rostou a přežívají v širokém rozmezí teplot od 1 °C do 45 °C, při vysoké koncentraci solí i v širokém rozpětí pH od 4,3 do 9,6. Nejrychlejší růst nastává při teplotách 30 °C až 37 °C (Brychta *et al.*, 2018; Kolářová *et al.*, 2020).

3.7.1.1 Kultivační média

Dříve se k izolaci listerií z klinických vzorků využívala izolace při 4 °C po delší dobu na agarové plotně. Kultivace probíhala zpravidla do té doby, než se vytvořily viditelné kolonie. Tento typ izolace je časově náročný, trvá až několik týdnů a neumožňuje izolaci poškozených buněk, které ve stresových podmínkách nepřežijí a nenarostou. Proto v dnešní době předchází kultivaci na pevné půdě pomnožení v obohaceném médiu. Buňky listerií rostou pomalu a mohou být přerůstány rychlejšími konkurenty, z toho důvodu se do obohaceného média a selektivních agarů přidávají bakteriostatické látky jako akriflavin, kyselina nalidixová, chlorid lithný nebo polymyxin, které inhibují růst konkurenční mikroflóry (Gasanov *et al.*, 2005; Cupáková *et al.*, 2010).

Základem izolačních půd je tryptózový agar obohacený o různé selektivní složky (Čížek, 1999). Selektivní půdy jako Oxford, PALCALM a MOX, zakládají identifikaci listerií na eskulinové reakci založené na β-D-glukosidázové aktivitě (Gasanov *et al.*, 2005). Listerie eskulin štěpí na eskuletin, který s citrátem železitoamonným vytváří hnědočerný barevný komplex (Cupáková *et al.*, 2010). Na agaru jsou kolonie listerií černé s černou zónou v okolním médiu. I přes přítomnost inhibičních činidel mohou na selektivních půdách růst i jiné organismy s podobným vzhledem kolonií, například *Enterococcus* spp. a *Bacillus* spp., které také využívají eskulin. K přesné identifikaci listerií jsou však nutné další testy (Gasanov *et al.*, 2005).

3.7.1.2 Chromogenní média

Komerční média umožňují rychlou identifikaci bakteriálních enzymů pomocí chromogenních substrátů, které jsou inkorporovány do plotnových médií. Chromogenní média jsou jednoduchá, efektivní, snadno interpretovatelná a vysoce citlivá. Díky specifické barevné změně je možná přímá identifikace původce.

Fosfatidylinositol fosfolipáza C (PIPL-C) je enzym, který produkuje pouze *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii*. Aktivita enzymu PIPL-C je měřena pomocí chromogenních médií. Chromogenní agary pro detekci *Listeria monocytogenes* jsou Rapid'L.mono® agar (BioRad, Marnes de la Coquette, Francie), BCM® chromogenní agar (Biosynth International, Naperville, USA), CHROMagar® Listeria test (Mast Diagnostics, Reinfeld, Německo) a ALOA agar (Biolife, Milan, Itálie), na kterých PIPL-C pozitivní bakterie vytvářejí modré kolonie. Žádný z těchto testů nerozlišuje mezi *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii* (Gasanov *et al.*, 2005).

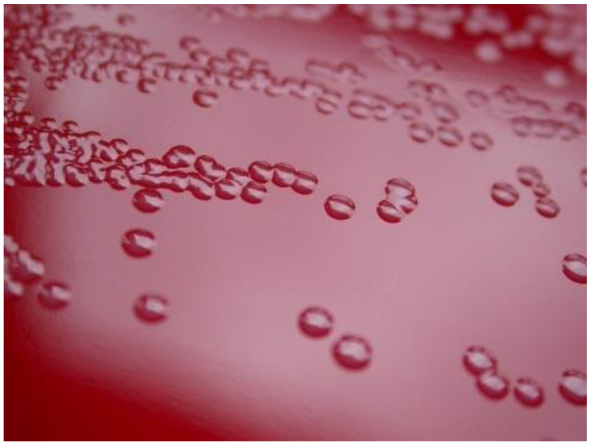
3.7.2 Morfologie kolonií

Listeria monocytogenes tvoří pravidelné malé až středně velké (1–3 mm) okrouhlé kolonie, které mají různou barvu podle média, na kterém rostou (Brychta, 2018).

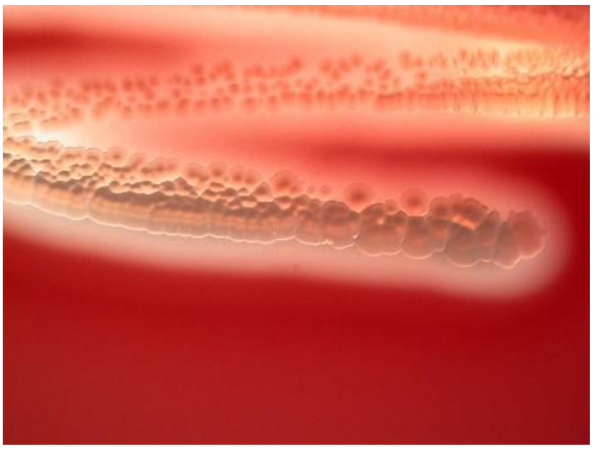
3.7.2.1 Krevní agar

Po 24 hodinách inkubace jsou kolonie malé, hladké a průhledné (Quinn *et al*., 2011). *Listeria monocytogenes* vytváří drobné a šedavé kolonie – viz obrázek 4 (Jančová *et* Škapová, 2007), s úzkou zónu β-hemolýzy, kterou lze zaznamenat až po odsunutí kolonie stranou (Donovan, 2015).

Listeria ivanovii tvoří šedavé kolonie s širokou zónou hemolýzy – viz obrázek 5 (Jančová *et* Škapová, 2007). Ostatní druhy listerií jsou nehemolytické (Donovan, 2015).



Obrázek 4: Listeria monocytogenes na krevním agaru. Foto: J. Bzdil

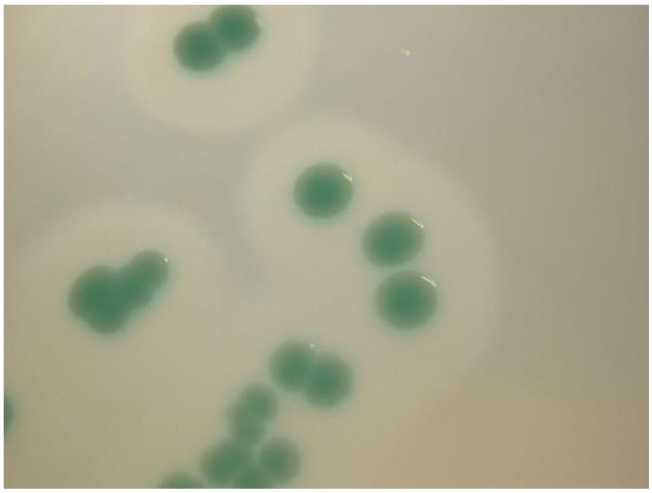


Obrázek 5: *Listeria ivanovii* na krevním agaru. Foto: J. Bzdil

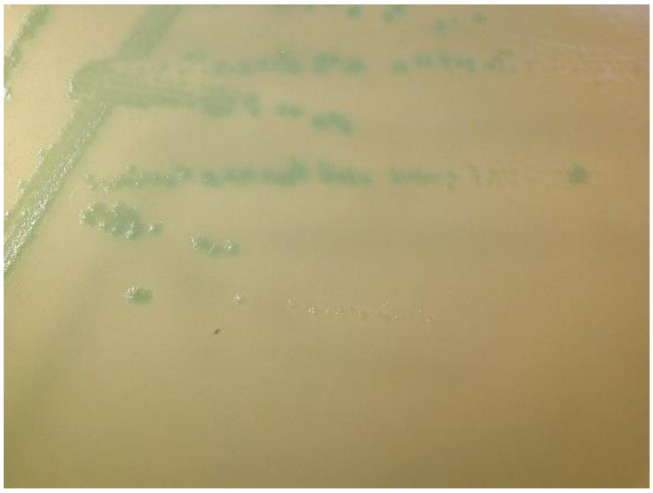
3.7.2.2 ALOA agar

Morfologie kolonií *Listeria monocytogenes* po 24 hodinách inkubace je dána aktivitou enzymu fosfatidylinositol fosfolipázy C, vytváří výraznou, neprůhlednou, kruhovou zónu precipitace v agaru okolo kolonií. Díky aktivitě enzymu galaktosidázy mají kolonie modrozelenou barvu – viz obrázek 6 (Cupáková *et al*., 2010).

Listeria ivanovii roste pomaleji, zóna precipitace, kterou vytváří je viditelná až po 48 hodinách (Cupáková *et al.*, 2010). Ostatní listerie nevytváří zónu precipitace – viz obrázek 7 (BioMérieux, 2022).



Obrázek 6: *Listeria monocytogenes* na ALOA agaru. Foto: J. Bzdil



Obrázek 7: *Listeria grayi* na ALOA agaru. Foto: J. Bzdil

3.7.2.3 Rapid'L.mono

Půda je intenzivně červená a *Listeria monocytogenes* na ní roste po 24 hodinách v malých až středně velkých koloniích, které jsou pravidelné a hladké, jsou modré barvy bez změn barvy média viz obrázek 8 (Tylšová *et* Bursová, 2015). Modrá barva kolonií je způsobena aktivitou fosfolipázy C, díky její aktivitě vzniká tmavomodrý chromofor a xylóza, na jejíž štěpení reaguje acidobazický indikátor fenolová červeň. *Listeria monocytogenes* má fosfolipázu pozitivní a xylózu negativní (Cupáková *et al.*, 2010).

Listeria ivanovii roste v modrozelených koloniích se žlutou okolní zónou – viz obrázek 9, fosfolipáza C i xylóza pozitivní (Bio-Rad, 2022).

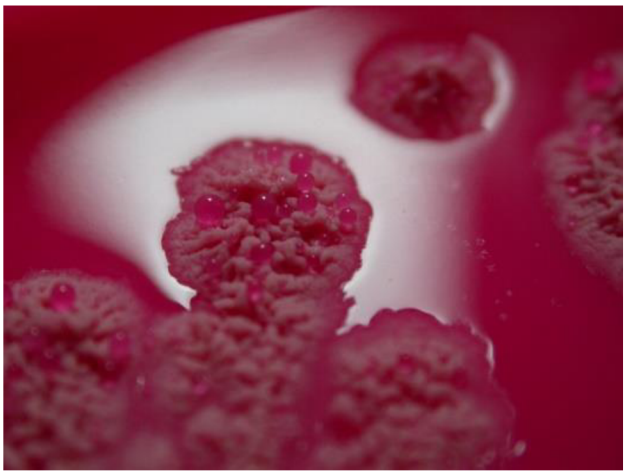
Listeria innocua tvoří bílé kolonie viz obrázek 10, *Listeria welshimeri* tvoří kolonie bílé někdy se žlutým okolím, fosfolipáza C je negativní, xylóza pozitivní (Cupáková *et al*., 2010).

Médium je vysoce specifické a inhibuje růst jiných bakterií a kvasinek (Bio-Rad, 2022). Ze zkušenosti rutinních mikrobiologů ovšem vyplývá, že inhibice není stoprocentní a může docházet k růstu jiných bakterií například *Bacillus* spp. – viz obrázek 11.

Obrázek 8: *Listeria monocytogenes* na Rapid'L.mono agaru. Foto: J. Bzdil

Obrázek 9: *Listeria ivanovii* na Rapid'L.mono agaru. Foto: J. Bzdil

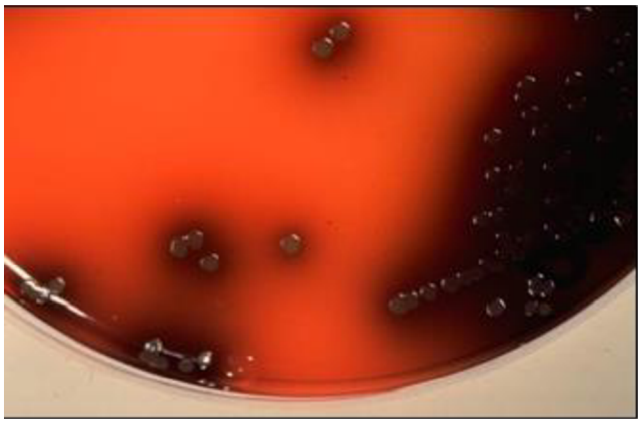
Obrázek 10*: Listeria innocua* na Rapid'L.mono agaru. Foto: J. Bzdil



Obrázek 11: *Bacillus* spp. na Rapid'L.mono agaru. Foto: J. Bzdil

3.7.2.4 PALCAM agar

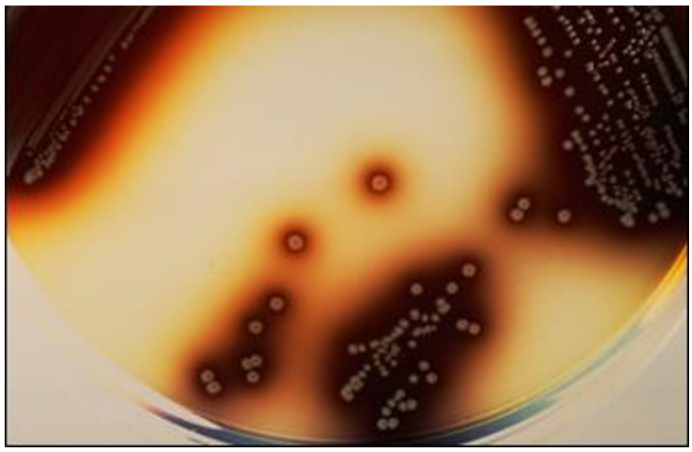
Kolonie *Listeria monocytogenes* po 24 hodinách inkubace tvoří drobné okrouhlé šedozelené nebo olivově zelené kolonie o průměru 1,5–2 mm. Kolonie mají mnohdy propadlý černý střed a jsou obklopeny hnědočernou až černou kruhovou zónou, způsobenou hydrolýzou eskulinu – viz obrázek 12 (Cupáková *et al*., 2010). *Listeria innocua* tvoří drobnější našedlé kolonie bez propadlého středu (Tylšová *et* Bursová, 2015).



Obrázek 12: *Listeria monocytogenes* na PALCAM agaru. Převzato z Medios de Cultivo (2015)

3.7.2.5 Oxford agar

Médium obsahuje selektivní inhibiční složky a systém indikátorů eskulinu a dvojmocného železa pro izolaci nebo diferenciaci *Listeria monocytogenes*. Kolonie *Listeria monocytogenes* se po 24 hodinách kultivace při 35 °C jeví jako 1mm šedé až černé kolonie s výraznou černou zónou okolo kolonií způsobenou hydrolýzou eskulinu – viz obrázek 13. Po 48 hodinách jsou kolonie 2 mm velké, lesklé a mají propadlý střed (Allerberger, 2003; Donovan, 2015; Oxoid Limited ©., 2022).



Obrázek 13: *Listeria monocytogenes* na Oxford agaru. Převzato z Medios de Cultivo (2015)

3.8 Výskyt listerií

Listerie jsou ubikvitárně tedy všudypřítomně rozšířeny v přírodě po celém světě (Julák, 2015). Běžně se nacházejí v půdě, na vegetaci a v odpadních vodách. Listerie se mohou nacházet také na čerstvých i mražených potravinách, jako je zelenina, ovoce, drůbež, čerstvé zpracované maso, měkké sýry, zmrzliny či salátové dressingy (Jemmi *et* Stephan, 2006). Z hlediska patogeneze má význam sledovat výskyt listerií v potravinářském průmyslu, v silážích a u domácích zvířat, především u ovcí, koz, skotu (Julák, 2015). Protože jsou listerie schopny přecházet do masa, případně do mléka, mohou způsobit nákazu u lidí (Votava *et al*., 2010). U většiny lidí probíhá listeriová infekce bezpříznakově ovšem u rizikových skupin hrozí vážné onemocnění. Mezi rizikové skupiny patří zejména imunodeficientní pacienti, nemocní s rakovinou, diabetem, lidé s onemocněním ledvin, lidé, kteří užívají glukokotrikoidy nebo anacida, pacienti s hypoaciditou žaludeční šťávy, starší osoby, novorozenci a těhotné ženy (Jančová *et* Škapová, 2007). V historii byly listerie izolovány z půd, siláží, podzemních vod, odpadních vod, z vegetace a z továren na výrobu jídla, kde listerie využívá své schopnosti odolávat vysoké koncentraci solí, nízkým teplotám a kolísání pH (Freitag *et al*., 2009).

Světová zdravotní organizace WHO zařazuje mezi rizikové potraviny z hlediska možné kontaminace listeriemi potraviny s dlouhou dobou trvanlivosti v chladničce a dále potraviny, které se konzumují bez další tepelné úpravy jako vaření, které by jinak *Listerii monocytogenes* zabilo. V minulosti byly zdrojem nákazy tyto potraviny, hotové masné výrobky, jako párky, masové paštiky, uzený losos, fermentované klobásy ze syrového masa, mléčné výrobky, jako měkké sýry a zmrzliny dále hotové saláty, zelenina a ovoce (WHO, 2022).

Na Státním veterinárním ústavu (SVÚ) v Jihlavě, kde sídlí Národní referenční laboratoř (NRL) pro *Listeria monocytogenes*, sledují výskyt *Listeria monocytogenes* v potravinách a stěrech po dezinfekci. Z potravin se vyšetřují drůbeží masné výrobky podporující růst listerií, které jsou tepelně opracované (TOMV), červené masné výrobky TOMV, které podporují růst listerií, do kterých spadá hovězí, skopové, telecí a jehněčí maso. Dále se vyšetřují masné výrobky

nepodporující růst (fermentované), masné polotovary, syrové mléko, zrající a měkké nezrající sýry, lahůdky, sladkovodní a mořské ryby a zelenina. V letech 2015 až 2020 byl prokázán výskyt *Listeria monocytogenes* ve všech typech výše zmíněných potravin kromě zeleniny.

V rámci vyšetření na průkaz *Listeria monocytogenes* ze stěrů po dezinfekci bývá ročně vyšetřeno v průměru okolo patnácti set vzorků viz tabulka 1. Nevyhovující počet vzorků se meziročně pohybuje okolo jednoho až dvou nálezů s výjimkou v roce 2016, kdy bylo nalezeno 17 pozitivních stěrů (tj. 1,1 %). Nález z roku 2017 se jeví jako ojedinělý a nelze z něj vyvozovat žádné obecně platné závěry.

Tabulka 1: Přehled stanovení *Listeria monocytogenes* ve stěrech po dezinfekci provedených SVÚ Jihlava v letech 2015 až 2020 (počty a %)

Rok	Počet vzorků vyšetřených na průkaz *Listeria monocytogenes*		
	vyšetřeno	nevyhovující	%
2015	1497	2	0,13
2016	1525	17	1,11
2017	1626	0	0,00
2018	1429	2	0,14
2019	1708	0	0,00
2020	1385	1	0,07

V rámci vyšetření na průkaz *Listeria monocytogenes* u drůbežích masných výrobků podporujících růst, tepelně opracovaných, bývá ročně vyšetřeno v průměru okolo 270 vzorků, z toho bývají průměrně 4 vzorky pozitivní (tj. v průměru 1,4 % pozitivních nálezů). V roce 2016 došlo k navýšení pozitivních nálezů na 12 (viz tabulka 2), což může mít souvislost s vyšším nálezem pozitivních stěrů po dezinfekci.

U červených masných výrobků podporující růst, tepelně opracovaných, bývá ročně vyšetřeno v průměru okolo 4 900 vzorků, z toho bývá v průměru 60 pozitivních (tj. v průměru 1,2 % pozitivních nálezů). Počet vyšetřených vzorků a pozitivních nálezů je meziročně stálý a nedochází k výrazným odchylkám (viz tabulka 2).

U fermentovaných masných výrobků nepodporující růst bývá ročně vyšetřeno v průměru 90 vzorků, z toho bývají 3 pozitivní (tj. v průměru 3,3 % pozitivních nálezů).

Z údajů v tabulce 2 vyplývá, že počty vyšetřených masných výrobků podporujících růst *Listeria monocytogenes* mezi lety 2015 až 2020 jsou v podstatě srovnatelné bez výrazných výkyvů. Počty pozitivních nálezů mezi lety 2015 až 2020 jsou u červených masných výrobků podporující růst (TOMV) stálé bez výrazných odlišností. U drůbežích masných výrobků podporující růst (TOMV) došlo v roce 2016 k náhlému vzestupu, nicméně v následujících letech počet pozitivních nálezů spíše klesal. K výraznému navýšení pozitivních nálezů v roce 2016 a 2017 došlo také u fermentovaných masných výrobků nepodporující růst.

Tyto údaje mohou být značně zkresleny v důsledku malých počtů odebíraných a vyšetřovaných vzorků ve vztahu k počtu registrovaných výrobců.

Tabulka 2: Přehled stanovení *Listeria monocytogenes* v masných výrobcích provedených SVÚ Jihlava v letech 2015 až 2020 (počet a %)

Rok	Masné výrobky podporující růst – drůbeží (TOMV)			Masné výrobky podporující růst – červené (TOMV)			Masné výrobky nepodporující růst (fermentované)		
	vyšetřeno	pozitivní	%	vyšetřeno	pozitivní	%	vyšetřeno	pozitivní	%
2015	285	2	0,7	5187	50	0,96	113	2	1,77
2016	275	12	4,36	4862	64	1,32	82	6	7,32
2017	220	1	0,45	5280	66	1,25	95	7	7,37
2018	310	5	1,61	4822	52	1,08	75	1	1,33
2019	266	3	1,12	4896	68	1,39	95	3	3,16
2020	285	1	0,35	4339	58	1,34	75	0	0,00

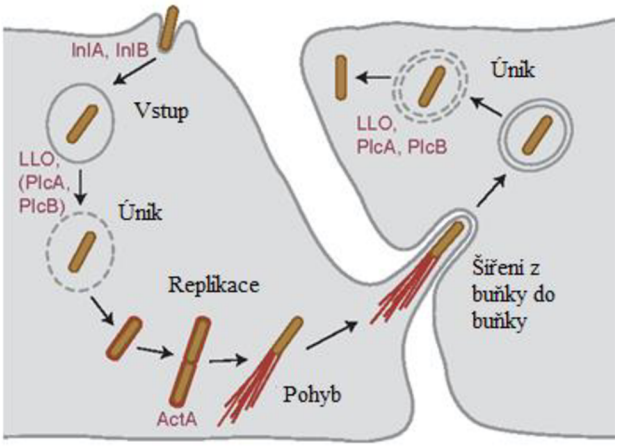
Výše uvedené informace počtu vyšetřených a pozitivních vzorků mi byly poskytnuty v podobě Zpráv o činnost NRL za jednotlivé roky 2015 až 2020 SVÚ Jihlava (Zpráva o činnosti NRL za rok 2015, 2016; Zpráva o činnosti NRL za rok 2016, 2017; Zpráva o činnosti NRL za rok 2017, 2018; Zpráva o činnosti NRL za rok 2018, 2019; Zpráva o činnosti NRL za rok 2019, 2020; Zpráva o činnosti NRL za rok 2020, 2021)

3.9 Patogenita listerií

Listeria monocytogenes je fakultativně intracelulární bakterie se schopností žít v eukaryotních buňkách (Rogalla *et* Bomar, 2021). Po požití jsou bakterie absorbované v epiteliích střeva nebo Peyerových placích (Votava *et al*., 2006). Listerie tak prochází střevní bariérou a vstupují do mezenterických lymfatických uzlin ze kterých se šíří pomocí krevního řečiště až do cílových orgánů, jako jsou játra, slezina, mozek a placenta. U imunodeficientních pacientů může bakterie prostoupit hematoencefalickou bariérou nebo u těhotných žen fetoplacentární bariérou a způsobit i fetální meningitidu, sepsi, předčasný porod až potrat (Radoshevich *et* Cossart, 2018). Bakterie mohou přijít do kontaktu s makrofágy, makrofág pomocí receptorů rozpozná kyselinu lipoteichoovou grampozitivní buněčné stěny listerie a zahájí

fagocytózu. Bakterie přežívá díky úniku z fagozomu před jeho dozráním na fagolysozom do cytoplazmy, pomocí působení listeriolyzinu (LLO) a fosfolipáz (Quinn *et al*., 2011). Listerie, jak již bylo několikrát zmíněno, mají schopnost vsoupit také do nefagocytujících buněk, jako jsou epiteliální buňky, prostřednictvím receptorově zprostředkované endocytózy pomocí proteinů internalin A a internalin B (InlA, InlB) (Radoshevich *et* Cossart, 2018). Internalin A se zabezpečuje bakteriální adhezi a invazi do epitelií prostřednictvím specifické interakce s receptory buněčné membrány hostitelské buňky, E-kadherinem a Met (Votava *et al*., 2006). Internalin B nese místo bohaté na leucin (LRR), pomocí něhož se váže na receptor hepatocytárního růstového faktoru (HGF) buněčné membrány hostitelské buňky a tím indukuje pohlcení bakteriální buňky (Votava *et al*., 2006). Listerie následně uniká z internalizační vakuoly pomocí působení extracelulárního, pórotvorného hemolytického listeriolysinu O (LLO), fosfolipázy A (PlcA) a fosfolipázy B (PlcB) (Radoshevich *et* Cossart, 2018). Jakmile je listerie volně v cytosolu začne se replikovat pomocí živin, které jsou získány od hostitele. Listerie využívá hostitelský hexózafosfátový cukr, který je získáván prostřednictvím bakteriálního přenašeče hexózafosfátu, Hpt (Freitag *et al*., 2009). Doba duplikace buňky (generační interval) je asi jedna hodina. Jednotlivé bakterie následně začnou polymerizovat aktin pomocí povrchově ukotveného faktoru virulence, proteinu ActA (Radoshevich *et* Cossart, 2018). Listerie se díky ActA intracelulárně šíří z jedné buňky do druhé, čímž šíří infekci bez kontaktu s extracelulárním prostředím a unikají tak imunitnímu systému (Kocks *et al*., 1992). Po vstupu bakterie do sousední buňky vylučuje listerie opět LLO, fosfatidylinositol fosfolipázu C (PIPL-C) a fosfatidylcholin fosfolipázu C (PCPL-C), aby unikla z dvoumembránové sekundární vakuoly, která se vytvořila jako výsledek šíření z buňky do buňky (Freitag *et al*., 2009). Výše popsaný proces buněčné infekce *Listerií monocytogenes* je znázorněn na obrázku 14.

Hlavním regulátorem faktorů virulence *Listeria monocytogenes*, které se uplatňují při působení bakterií uvnitř buňky je proteinový shluk virulence PrfA. PrfA protein reguluje svou vlastní expresi pozitivně i negativně (Votava *et al*., 2006). PrfA následně řídí i ostrov patogenity Listeria (LIPI-1), ze kterého jsou exprimovány LLO, PlcA, PlcB, ActA a metaloproteináza zinku (Mpl) (Radoshevich *et* Cossart, 2018). V tabulce číslo 3 jsou shrnuty nejdůležitější faktory virulence *Listeria monocytogenes*, jejich funkce a geny, které za ně zodpovídají.



Obrázek 14: Schematické znázornění procesu buněčné infekce *Listeria monocytogenes*. InlA – Internalin A, InlB – Internalin B, LLO – listeriolyzin O, PlcA – Fosfatidylinositol fosfolipáza C, PlcB – Fosfatidylcholin fosfolipáza C, ActA – Aktin indukující protein. Upraveno podle Pizarro-Cerdá *et al*. (2012)

Tabulka 3: Faktory virulence *Listeria monocytogenes* jejich funkce a geny za ně zodpovídající. Převzato z Freitag *et al*. (2009)

Gen	Proteinový produkt	Funkce
hly	Listeriolysin O (LLO)	Lýze fagozomů, uvolnění bakterií do cytosolu
plcA	Fosfatidylinositol fosfolipáza C (PIPL-C)	
plcB	Fosfatidylcholin fosfolipáza C (PCPL-C)	
mpl	Mpl	Metaloproteináza zinku, zpracovává PCPL-C na zralou formu
actA	Aktin indukující protein (ActA)	Stimuluje intracelulární mobilitu bakterií na bázi aktinu
hpt	Hexóza fosfát transportér (Hpt)	Intracelulární růst
inlA	Internalin A	Adheze a invaze do hostitelské buňky interakcí s E-kadherinem
inlB	Internalin B	Invaze do hostitelské buňky pomocí vazby na receptor pro hepatocytový růstový faktor
inlC	Internalin C	Bakteriální virulence
prfA	Pozitivní regulační faktor	Regulátor faktorů virulence

3.10 Rezistence listerií k antimikrobiálním látkám

Listerie jsou obvykle citlivé k většině antibiotik kromě fosfomycinu (Moreno *et al*., 2014), kyseliny fusidové (Baquero *et al*., 2020) a cefalosporinů všech generací, ke kterým je *Listeria monocytogenes* přirozeně, tedy primárně rezistentní (Jančová *et* Škapová, 2007). Účinná léčba listeriózy závisí na včasném podání vhodných antibiotik. Standardní léčba zahrnuje aplikaci vysokých dávek beta-laktamových antibiotik (ampicilin nebo amoxicilin) samostatně nebo v kombinaci s gentamicinem. V případě intolerance k beta-laktamům se podává sulfamethoxazol (Moreno *et al*., 2014).

Ve světě je stále větší problém se sekundární rezistencí tedy rezistencí získanou. Na rozdíl od jiných lidských patogenů je *Listeria monocytogenes* stále vysoce citlivá k antibiotikům používaných po desetiletí k léčbě lidí i zvířat. I když je *Listeria monocytogenes* v přírodě široce rozšířena a může získat geny pro rezistenci k antibiotikům z plazmidů a konjugovaných transpozonů jiných organismů, má uzavřený genom s omezenou komunitní interakcí. Listerie navíc tvoří malé populace ve specifických nikách. Tyto podmínky jsou překážkou pro získání genů antibiotické rezistence, výrazně snižují možnost koexistence s potencionálními dárci genů rezistence k antibiotikům. Listeria tak spolu například s *Brucella melitensis*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia trachomatis* a *Mycoplasma pneumoniae* patří mezi patogeny, které si za posledních 50 let udržely v podstatě stabilní profil citlivosti k antibiotickým látkám (Baquero *et al*., 2020).

3.11 Klinický význam listerií u lidí

Jak již bylo dříve řečeno, infekce způsobená bakterií *Listeria monocytogenes* se nazývá listerióza (Donovan, 2015). U normálních zdravých jedinců probíhá onemocnění bezpříznakově nebo jako mírné horečnaté onemocnění připomínající chřipku (Quinn *et al*., 2011) s možným průjmem a zvracením (Votava *et al*., 2010).

Listerie aktivují imunitu zprostředkovanou T-lymfocyty, které pod vlivem cytokinů přitahují makrofágy produkující zánětlivé granulomy. Právě T-lymfocyty poskytují získanou rezistenci vůči infekci způsobené Listerií (Madjunkov *et al*., 2017). Proto u osob s jakýmkoliv defektem imunity a také u starších osob představuje listerióza závažné, invazivní onemocnění (Julák, 2015).

Hlavní tři invazivní formy se projevují jako septikémie, infekce centrálního nervového systému neboli neurolisterióza (bakteriémie s meningitidou) a infekce matky a plodu (materno-neonatální infekce). Nemateřské invazivní formy infekce jsou hlášeny především u starších pacientů a u osob s oslabenou imunitou. Listerióza má mortalitu >30 % navzdory adekvátní antibiotické terapii. Jedná se o alimentární onemocnění primárně přenášené kontaminovanými potravinami. Vzhledem ke své všudypřítomné povaze běžně kontaminuje

syrové produkty a prostřednictvím křížové kontaminace i další potraviny. Všechny lidské bytosti jsou tak běžně vystaveny působení listerií. Navzdory tomu je listerióza poměrně vzácným onemocněním (Swaminathan *et* Gerner-Smidt, 2007; Morgand *et al.*, 2018).

Infekce se může přenášet také mezi lidmi, zejména z těhotné matky na nenarozené dítě (WHO, 2022). Dělníky na jatkách či veterináře postihuje především kožní forma listeriózy, která se projevuje jako ekzematózní kožní infekce (Swaminathan *et* Gerner-Smidt, 2007). Velice vzácné formy kožní či oční infekce jsou způsobeny přímou expozicí (Votava *et al.*, 2006). Další možné formy infekce, které *Listeria monocytogenes* může vyvolat jsou močové infekce a infekce ran (Votava *et al.*, 2010), byl popsán také přenos sexuálním stykem (Hamplová *et al.*, 2019).

Výskyt listeriózy je obtížné stanovit, protože symptomy mohou být zaměněny za onemocnění podobné chřipce nebo gastroenteritidě a nejsou tak získány vhodné kultury, pomocí kterých by byla listerie prokázána (Bortolussi, 2008). Incidence invazivní formy onemocnění je v rozsahu 0,1 až 10 případů na 1 milion obyvatel za rok v závislosti na zemích a regionech světa (WHO, 2022). Průměrná inkubační doba listeriózy se výrazně liší podle klinické formy onemocnění. U případů listeriózy spojené s těhotenstvím je průměrná inkubační doba 27,5 dne. U neurolisteriózy je průměrná inkubační doba 9 dní, u případů bakteriémie 2 dny a u gastroenteritidy jen 24 hodin (Goulet *et al.*, 2013).

Obecně onemocnění způsobuje požití velkého množství kontaminovaných potravin tedy inokula/infekční dávky *Listeria monocytogenes* (Aureli *et al.*, 2000). U vnímavé populace je to 0,1 až 10 milionů KTJ, zatímco u zdravého jedince je to 10 až 100 milionů KTJ (Angelo *et al.*, 2017).

3.11.1 Gasteoenteritida vyvolaná listeriemi u lidí

Jedná se o mírnou, neinvazivní formu onemocnění postihující převážně jinak zdravé jedince. Příznaky, kterými se může infekce projevit jsou vodnatý průjem, zvracení, horečka, bolest hlavy, svalů a břicha. Inkubační doba je zpravidla krátká, v řádech desítek hodin (WHO, 2022). Příznaky obvykle bez léčby vymizí do 2 až 3 dnů od nástupu (Donovan, 2015).

3.11.2 Maternofetální a neonatální listerióza u lidí

Těhotné ženy mají asi dvacetkrát větší pravděpodobnost onemocnění listeriózou než ostatní zdraví jedinci (WHO, 2022). Zvýšené riziko je v souvislosti se suprimovanou buněčně zprostředkovanou imunitou a placentárním tropismem *Listeria monocytogenes* (Tropismus = vyšší tendence pronikat do určitých tkání). Zhruba třetina infikovaných těhotných žen je bez příznaků. U zbytku se objevují nespecifické mírné příznaky podobné chřipce, jako mírná horečka, bolesti zad, hlavy, svalů, průjem a zvracení. V případě včasné diagnostiky a včasnému zahájení amtimikrobiální léčby se vyléčí matka i kojenec (Swaminathan *et* Gerner-Smidt, 2007). Kvůli nespecifickému klinickému obrazu je diagnostika listeriózy velice obtížná (Madjunkov *et al.*, 2017).

Infekce novorozenců dělíme na dva případy. První případ, kdy byla infekce získána transplacentárně již v děloze, fetální listerióza. V druhém případě je infekce získána při porodu nebo těsně po něm, neonatální listerióza (Votava *et al.*, 2006).

3.11.2.1 Fetální listerióza

Gestační věk na počátku infekce je klíčovým pro přežití plodu. Fetální infekce v prvním trimestru těhotenství mají špatnou prognózu se zhruba 65% rizikem potratu (Madjunkov *et al.*, 2017). Pokud se infekce objeví později ve druhém nebo třetím trimestru těhotenství vyvíjí se u plodu celková infekce za vzniku prenatálního *granulomatosis infantiseptica*, kdy se v mnoha orgánech plodu (játra, mozek, ledviny, plíce a gastrointestinální trakt) tvoří granulomy (Votava *et al.*, 2010). V takovýchto případech dochází v 26 % případů k potratu plodu, narození mrtvého jedince nebo ke smrti jedince krátce po porodu (Julák, 2015; Madjunkov *et al.*, 2017). S postupujícím gestačním věkem roste procento živě narozených dětí (Desai *et* Smith, 2017).

3.11.2.2 Neonatální listerióza

Onemocnění matky je mírné, narozdíl od onemocnění novorozence, které bývá velice závažné a může být až smrtelné. Při neonatální infekci dochází k vertikálnímu přenosu bakterie z matky na novorozence pozřením infikované plodové vody během intrauterinního života, transplacenrárně z mateřského oběhu nebo může plod získat infekci během průchodu kontaminovaným porodním kanálem či kontaktem s kontaminovaným vnějším prostředím.

Při rozvoji symptomů u novorozence v době od 1. – 6. dne od narození mluvíme o časném začátku neonatální listeriózy (Madjunkov *et al.*, 2017). Mezi časté klinické příznaky patří sepse, respirační tíseň, pneumonie a meningitida se závažnými neurologickými a vývojovými následky (Votava *et al.*, 2006).

U rozvoje symptomů u novorozence v době 7. – 28. dne od narození mluvíme o pozdním nástupu neonatální listeriózy. Pozdní typ se rozvíjí u donošených jedinců narozených bezpříznakovým matkám. K infekci dochází při průchodu novorozence porodními cestami nebo jako nozokomiální infekce. Mezi příznaky patří opět sepse a meningitida, někdy doprovázené horečkou, kolitidou a průjmem, které mají za následek zpomalení fyzického růstu, mentální retardaci a slepotu (Hoelzer *et al.*, 2012; Madjunkov *et al.*, 2017).

3.11.3 Neurolisterióza u lidí

Listeria monocytogenes má tropismus nejen k placentě těhotných žen, ale také k centrálnímu nervovému systému (CNS) u imunodeficientních jedinců (Patas *et al.*, 2020). U pacientů se projevuje jako meningitida (infekce mozkových blan), meningoencefalitida (infekce mozkových blan a mozku), rombencefalitida (encefalitida mozkového kmene a mozečku) nebo cerebritida s možným následkem tvorby mozkového abscesu. Meningoencefalitida postihuje především novorozence, osoby starší 60 let a imunosuprimované jedince (Artola *et* Herrejón, 2010). Primární příznaky mohou být velice rozmanité od horečky,

bolesti hlavy, nevolnosti, zmatenosti až po fulminantní kóma (Hoelzer *et al.*, 2012). Kvůli mírným časným projevu dochází k opožděné diagnostice, až u 40 % pacientů. Komplikace může způsobit encefalitida, která se projevuje třesem, poruchou koordinace pohybů (ataxie), obrnou pravé nebo levé části těla (hemiplegií), hluchotou nebo záchvaty (Artola *et* Herrejón, 2010). Encefalitida vzniká při vstupu *Listeria monocytogenes* do mozkového parenchymu, následně může docházet ke vzniku abscesů, které se projevují kognitivní dysfunkcí a ztrátou vědomí (Hoelzer *et al.*, 2012). Rombencefalitida postihuje mozeček a mozkový kmen, který se skládá z prodloužené míchy, Varolova mostu a středního mozku. V první fázi, která trvá přibližně 4 dny, se projevuje horečka, bolest hlavy, nevolnost a zvracení. Následuje náhlý nástup obrny hlavových nervů způsobující hemiparézu nebo hemisenzorické defekty až poruchy vědomí (Clauss *et* Lorber, 2008; Artola *et* Herrejón, 2010).

Úmrtnost je vysoká, u meningitidy a meningoencefalitidy 15–27 % u mozkových abscesů až 59 % (Hoelzer *et al.*, 2012). U přeživších se vyskytují závažné následky (Lorber, 1997).

3.11.4 Septikémie u lidí

Septikémie je závažný akutní následek vyvolaný listeriovou nákazou (Schaefer *et al.*, 2022). Sepse je komplexní porucha, život ohrožující orgánová dysfunkce vyplývající z dysregulované reakce hostitele na infekci, spojená s vysokým rizikem úmrtí (Cecconi *et al.*, 2018). Bakteriémie (přítomnost bakterií v krvi), která může způsobit septikémii až sepsi, se nejčastěji vyskytuje u osob starších 75 let (Lepe, 2020). Septikémie se vyskytuje u 21–43 % případů nákazy listeriózou (Hoelzer *et al.*, 2012). Klinicky se projevuje jako akutní horečnaté onemocnění, často doprovázené bolestí svalů, kloubů, zad a hlavy (Lorber, 1997). Tyto stavy mohou být komplikovány respirační tísní a multiorgánovým selháním (Hoelzer *et al.*, 2012).

3.12 Klinický význam listerií u zvířat

Listerióza je zoonóza, to znamená, že listerie dokáže vyvolat onemocnění u zvířat a následně i u lidí v důsledku přímého kontaktu nebo požření kontaminované potravy (SZÚ, 2016). Listerie do organismu může vstoupit také prostřednictvím trhlin v dutině ústní nebo nosní sliznici ve chvíli, kdy je sliznice poškozena například prořezávající se mi nebo vypadlými zuby. Listerie proniká přes zubní dřeň a následně migruje hlavovými nervy do mozku, kde vyvolává neurolisteriózu (Quinn *et al.*, 2011).

Listeria monocytogenes napadá širokou škálu zvířat jako kozy, skot, ovce, ptáky, hlodavce, ryby a korýše (Sobarzo, 2016). *Listeria monocytogenes* byla izolována také z alpak, jelenů, sobů, antilop, vodních buvolů a losů (Hoelzer *et al.*, 2012). Celkem byla *Listeria monocytogenes* izolována z více než 40 druhů domácích i volně žijících zvířat (Quinn *et al.*, 2011). I když *Listeria monocytogenes* napadá širokou škálu živočišných druhů, jedná se onemocnění primárně přežvýkavců, u kterých se projevuje jako encefalitida, septikémie, endoftalmitida (zánět

nitroočních struktur) nebo formou potratů u březích samic (Quinn *et al.*, 2011; Hoelzer *et al.*, 2012). Ve vzácných případech může *Listeria monocytogenes* vyvolat u skotu mastitidu (zánět mléčných žláz) (Oevermann *et al.*, 2010). Listeriózu u ovcí a skotu může vyvolat také *Listeria ivanovii*, která je nepatogenní pro člověka a jiné živočišné druhy (Hoelzer *et al.*, 2012). *Listeria innocua* vzácně vyvolává u ovcí meningoencefalitidu (Quinn *et al.*, 2011).

I když jsou listerie všudypřítomné, bývají ohniska listeriózy v Evropských zemích u přežvýkavců sezónní s největší incidencí v zimě a brzy na jaře, v důsledku konzumace kontaminovaného krmiva ze siláží (Quinn *et al.*, 2011; Hoelzer *et al.*, 2012). U přežvýkavců dochází často ke kolonizaci střev a stávají se asymptomatickými střevními přenašeči listerií (Oevermann *et al.*, 2010).

3.12.1 Neurolisterióza u zvířat

Projevuje se ve formě encefalitidy a má dlouhou inkubační dobu, v rozmezí od jednoho do sedmi týdnů (Oevermann *et al.*, 2010). U ovcí se projevuje také jako nemoc kroužení s klinickými projevy jako je otupělost, záklon hlavy (opistotonus) a typické kroužení hlavou. Jednostranná paralýza obličeje má za následek slinění a pokles víčka, ucha a rtů (Quinn *et al.*, 2011). Neurolisterióza se může projevit také prostřednictvím potíží se žvýkáním, nedovřením čelistí a problémů s polykáním (Oevermann *et al.*, 2010). Jeden až tři dny po projevu klinických příznaků si malí přežvýkavci, ovce a kozy, v terminálním stádiu lehnou a následně hynou v důsledku respiračního selhání. U skotu je doba trvání nemoci delší, trvá asi 1–2 týdny (Oevermann *et al.*, 2010; Quinn *et al.*, 2011). Mezi vhodné vzorky pro laboratorní průkaz listeriózy patří mozkomíšní mok, tkáň prodloužené míchy nebo Varolova mostu zvířete s klinickými příznaky (Quinn *et al.*, 2011).

3.12.2 Septikémie u zvířat

Septikemická listerióza má krátkou inkubační dobu v rozmezí od dvou do tří dnů. Nejčastěji se vyskytuje u čerstvě narozených mláďat, ale může se objevit také u březích samic (Quinn *et al.*, 2011). Charakteristické příznaky jsou multifokální nekróza jater, sleziny, případně dalších orgánů jako ledviny a plíce (Hoelzer *et al.*, 2012). Mezi vhodné vzorky pro laboratorní průkaz listeriózy patří vzorek jater, sleziny nebo krve (Quinn *et al.*, 2011).

3.13 Metody identifikace listerií

Identifikace *Listeria monocytogenes* je extrémně důležitá pro prevenci a kontrolu onemocnění. Testovány jsou vzorky z potravin, životního prostředí a klinické vzorky. Identifikace se provádí pomocí klasických, konvenčních, kultivačních metod na jejichž základě je založena například metoda Mezinárodní organizace pro standardy ČSN EN ISO 11290. Jedná se ovšem o zdlouhavé metody trvající 5 až 8 dní a nemusí být vhodné pro testování všech vzorků. Proto došlo k rozvoji rychlejších metod, mezi které patří moderní kultivační techniky, metody

molekulárně genetické a techniky imunochemické (Blažková *et al.*, 2005; Gasanov *et al.*, 2005). Moderní metody identifikace listerií jsou rychlejší a spolehlivější ve srovnání s metodami konvenčními, jsou ale poměrně drahé a pracovně náročné (Jadhav *et al.*, 2015).

Mezi vhodné klinické vzorky patří vzorky získané z normálně sterilních míst, jako je krev (hemokultura), mozkomíšní mok, amniová tekutina nebo placenta. Pro průkaz listerií se používají také gynekologické materiály, stolice a materiály získané biopsií (Allerberger, 2003; Votava *et al.*, 2006).

3.13.1 Norma ČSN EN ISO 11290 (560093)

ISO je mezinárodní organizace pro normalizaci, která vyvíjí a vydává mezinárodní normy. ČSN je zkratka českých technických norem, tvorbu a vydávání zajišťuje Česká agentura pro standardizaci (ČAS). Zkratka EN označuje Evropskou normu.

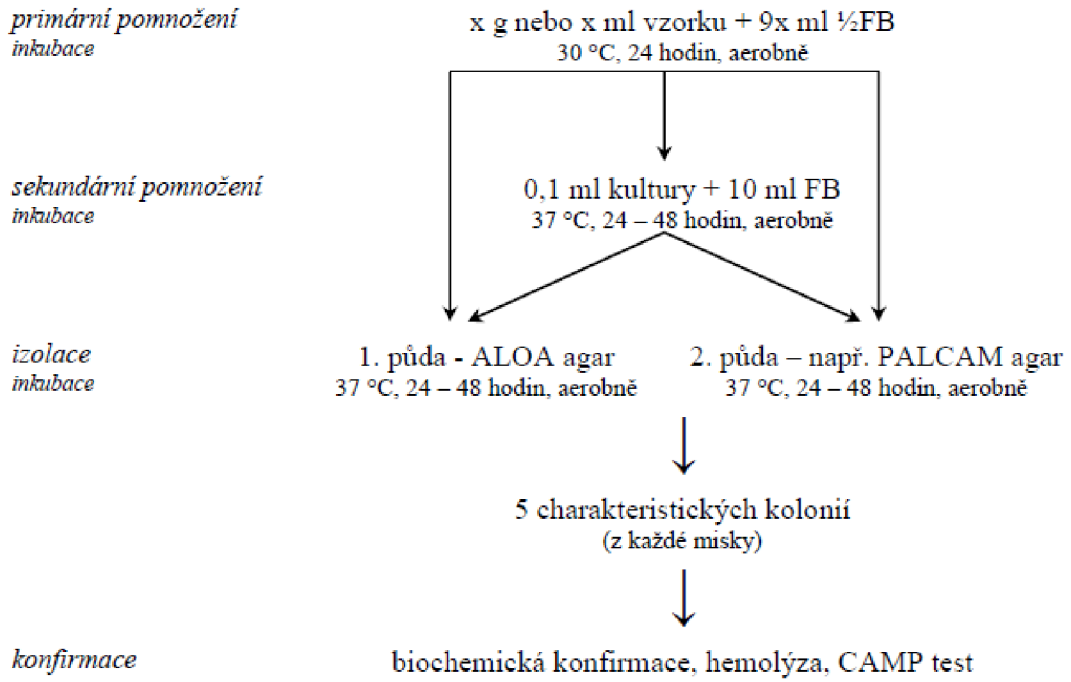
Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* a *Listeria* spp. – Část 1: Metoda průkazu. Část 2: Metoda stanovení počtu. Tato norma byla vydána 1. 12. 2017 a nabyla platnosti 1. 1. 2018.

Metoda se využívá pro stanovení *Listeria monocytogenes* a *Listeria* spp. v produktech určených k lidské spotřebě, krmení pro zvířata a pro vzorky životního prostředí v oblasti výroby potravin a zpracování potravin.

Zahrnuje čtyři po sobě následující kroky, primární pomnožení, sekundární pomnožení, izolaci a konfirmaci viz obrázek 15. Kvůli možné přítomnosti listerií v malém počtu případně subletálně poškozených buněk se provádí dvoustupňové pomnožení v selektivní půdě s poloviční koncentrací inhibičních složek a následně v selektivní půdě s celým obsahem inhibičních složek.

Zkoušený vzorek se inokuluje do tekutého selektivního média pro primární pomnožení do polovičního Fraserova bujónu (½ FB médium), kde se vzorek obohacuje po dobu 24 hodin, aerobně při 30 °C. Získaná kultura se přeočkuje do tekuté selektivní půdy pro sekundární pomnožení do celého Fraserova bujónu (FB médium), kde se vzorek inkubuje po dobu 24 až 48 hodin aerobně při 37 °C. Fraser bujon obsahuje selektivní látky akriflavin a kyselinu nalidixovou, chlorid lithný, železité ionty a eskulin, který umožňuje detekci aktivity β-D-glukosidázy listerií. Listerie hydrolyzují eskulin na eskuletin, který reaguje s železitými ionty a vede ke zčernání média. Z primárního i sekundárního pomnožení se provádí vyočkování na dvě pevné selektivní půdy, vždy na agar pro listerie podle Ottavianiho a Agostiho (ALOA agar) a kteroukoli jinou selektivní půdu například PALCAM, Oxford nebo MOX. Inokulované misky se inkubují dnem vzhůru 24–48 hodin, aerobně při 37 °C. Z vybraných suspektních kolonií se provádí konfirmace. Výsledkem vyšetření je průkaz přítomnosti nebo absence *Listeria monocytogenes* v navážce vyšetřovaného vzorku (Gasanov *et al.*, 2005; Cupáková *et al.*, 2010). Konfirmace *Listeria monocytogenes* se provádí vhodnými morfologickými, fyziologickými

a biochemickými testy například pomocí průkazu hemolýzy, využívání cukrů, CAMP test, Gramova barvení, API listeria testu atd. (Blažková *et al.*, 2005).



Obrázek 15: Průkaz bakterií *Listeria monocytogenes* v potravinách. Převzato z Cupáková *et al.* (2010)

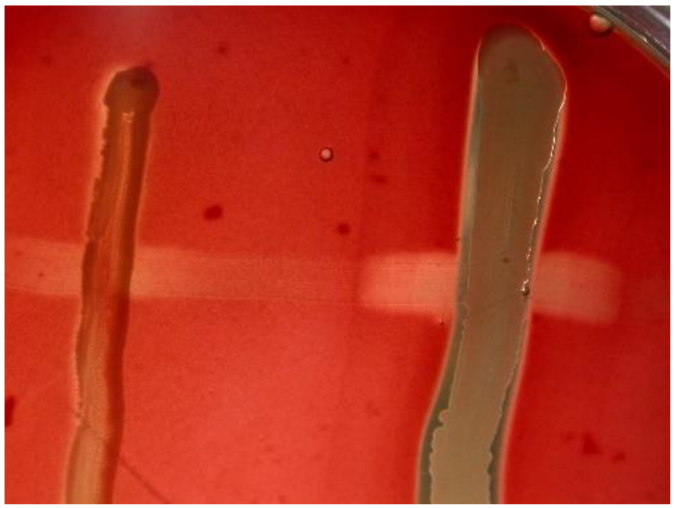
3.13.2 Biochemické testy

Biochemické testy jsou založeny na detekci metabolických enzymů. Obecný princip je následující, bakterie má k dispozici substrát a po určitém čase zjišťujeme, zda došlo ke změně substrátu na produkt. Reakce je pozitivní v případě, že bakterie má příslušný enzym, který je schopný katalyzovat danou reakci. Produkce metabolitů je hodnocena buď dichotomicky nebo pomocí numerické identifikace. Mezi biochemické testy patří například test na katalázu, fermentace cukrů a CAMP test (Votava *et al.*, 2010; Melter *et* Malmgren, 2014).

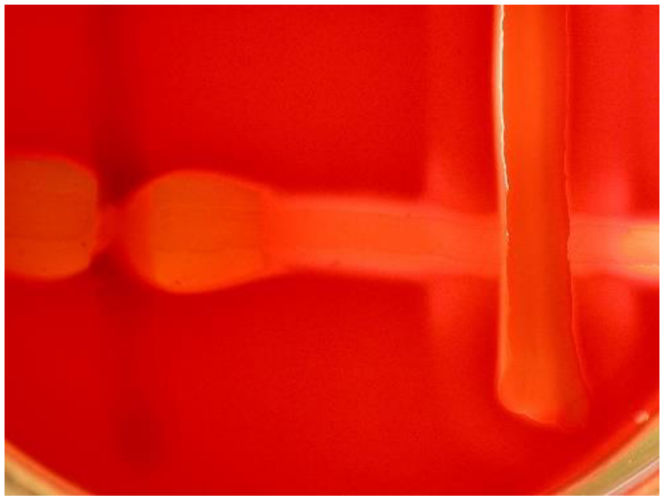
3.13.2.1 CAMP test

Název testu je složen z počátečních písmen jmen autorek (Christie, Atkins, Munch-Petersen). CAMP test je založen na výskytu hemolýzy a slouží k odlišení hemolytických druhů *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* a *Listeria seeligeri*. Test se provádí na Petriho misce s krevním agarem, na kterém je vyočkován paralelně α-hemolytický *Staphylococcus aureus* nebo *Staphylococcus intermedius*, jenž produkují β-hemolysin a *Rhodococcus equi*. Neznámý testovaný kmen je naočkovaný křížem, v pravém úhlu, mezi těmito dvěma pruhy, aniž by se dotýkaly. Mezi *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* dochází v místě překřížení k interakci hemolyzinů a jejich synergii, což se projeví úplným projasněním ve tvaru takzvaných "motýlích křídel" nebo "mašliček" (viz obrázek 16). Hemolýza *Listeria ivanovii*

je zesílená v blízkosti *Rhodococcus equi* – viz obrázek 17 (Gasanov *et al.*, 2005; Julák, 2015). Tvorba hemolýzy při CAMP testu u vybraných druhů listerií je shrnut v tabulce číslo 4.



Obrázek 16: *Listeria monocytogenes* – dvojitý CAMP test na krevním agaru se *Staphylococcus aureus* a *Rhodococcus equi*. Foto: J. Bzdil



Obrázek 17: *Listeria ivanovii* – dvojitý CAMP test na krevním agaru se *Staphylococcus aureus* a *Rhodococcus equi*. Foto: J. Bzdil

Tabulka 4: Tvorba hemolýzy jednotlivých druhů rodu *Listeria* na základě CAMP testu. Převzato z Quinn *et al.* (2011)

	CAMP test	
	S. aureus	*R. equi*
L. monocytogenes	+	–
L. ivanovii	–	+
L. seeligeri	+	–

Legenda: + pozitivní reakce, – negativní reakce

3.13.2.2 Fermentace cukrů

Fermentace cukrů u vybraných druhů listerií je shrnut v tabulce číslo 5.

Tabulka 5: Diferenciace druhů rodu *Listeria* na základě fermentace cukrů. Převzato z Allerberger (2003)

	D-manitol	L-ramnoza	D-xyloza	Alfa-methyl-D-manosid
L. monocytogenes	–	+	–	+
L. ivanovii	–	–	+	–
L. innocua	–	V	–	–
L. seeligeri	–	–	+	–
L. welshimeri	–	V	+	+
L. grayi	+	V	–	+

Legenda: + pozitivní; – negativní; V variabilní výsledek

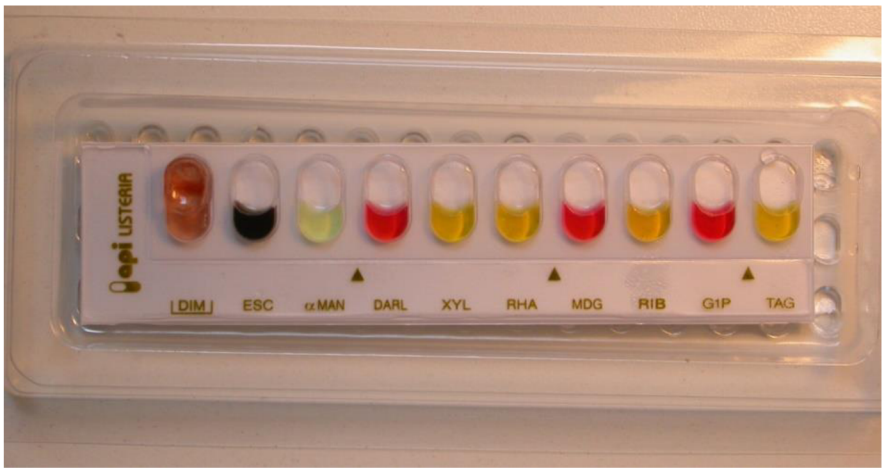
3.13.2.3 Katalázový test

Principem je průkaz enzymu katalázy, ten štěpí peroxid vodíku na vodu a kyslík. Na podložní sklíčko s kapkou 3% roztoku peroxidu vodíku se rozmíchá bakteriální kolonie. V případě pozitivity dojde k bouřlivému vývoji bublinek (Votava *et al.*, 2010).

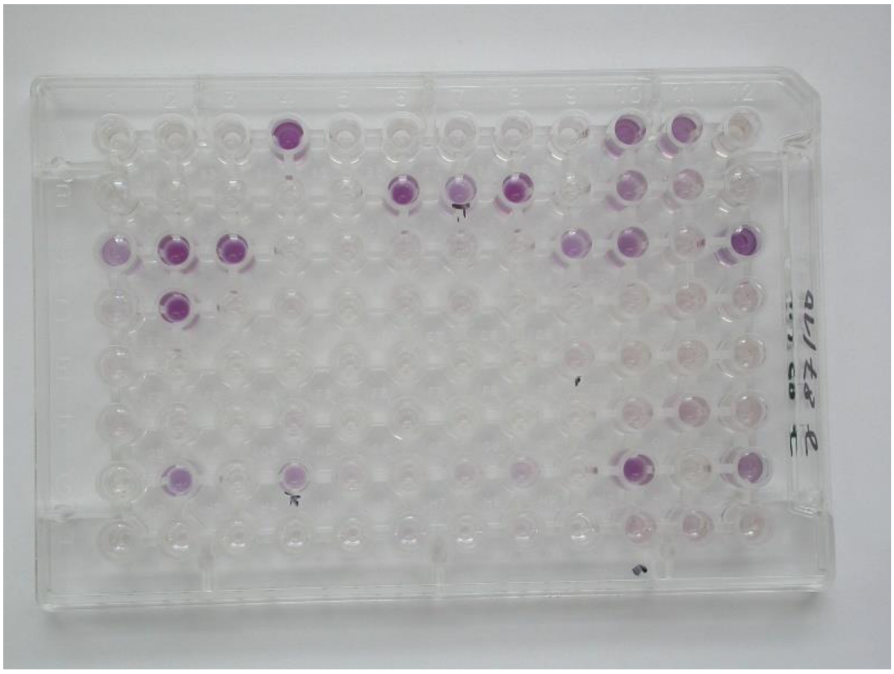
3.13.3 Identifikace pomocí komerčních souprav

Komerční identifikační soupravy jsou široce používané především kvůli rychlým a spolehlivým výsledkům. Komerční testovací proužky API Listeria (Bio-Merieux, Marcy-Etoile, Francie) a Micro-ID™ (Remel, USA) byly rozsáhle validovány a nyní jsou začleněny do standardních metodických postupů (Gasanov *et al.*, 2005). API Listeria komerční kit je soubor biochemických testů na standardizovaných a miniaturizovaných proužcích dodávané v deseti mikrozkumavkách (viz obrázek 18). V každé mikrozkumavce je dehydratovaný chromogenní substrát. Po 18 až 24 hodinách po naočkování bakteriální kultury se provádí vyhodnocení pomocí porovnání barev v jednotlivých mikrozkumavkách s interpretační tabulkou nebo identifikačním softwarem. Ke změně barvy dochází enzymovou reakcí nebo fermentací sacharidů, které jsou charakteristické pro jednotlivé druhy listerií (Blažková *et al.*, 2005).

K rychlé a přesné identifikaci či charakterizaci se využívá také empirický identifikační systém Biolog. Identifikační systém Biolog rozpozná více než 2 900 druhů bakterií, kvasinek a hub. Identifikace je založena na charakterizaci metabolitů vytvořených v 96-ti jamkové mikrotitrační destičce (viz obrázek 19). V případě přítomnosti enzymu schopného metabolizovat daný substrát, dochází ke změně barvy jamky. Každý mikroorganismus je charakterizován speciálním kódem, na jehož základě je identifikován. Po inkubaci je mikrodestička je vložena do čtecího systému, kde *reader* odečte absorbanci. Jednotlivé výstupy jsou porovnány s rozsáhlou databází (Bursová *et al.*, 2014a; Biolog ©, 2021).



Obrázek 18: *Listeria welshimeri* – biochemický test API-Listeria (Bio-Mérieux, Francie). Foto: J. Bzdil



Obrázek 19: Mikrotitrační destička k identifikačnímu systému Biolog (Biolog, Inc., USA). Foto: J. Bzdil

3.13.4 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na interakci protilátky s antigenem. Pro stanovení listerií se využívají polyklonální, monoklonální i rekombinantní protilátky vytvořené proti charakteristickým antigenním strukturám listerií. Největšími přednostmi imunochemických metod jsou přesnost, citlivost, specificita, rychlé stanovení (do 30 hodin od přijetí vzorku), jednoduchost provedení a možnost vyšetření velkého množství vzorků najednou. Další výhodou je poměrně nízká cena a pracovní nenáročnost. Mezi nejhojněji využívanou imunochemickou analýzu patří ELISA z anglického Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Blažková *et al.*, 2005; Gasanov *et al.*, 2005).

3.13.5 Molekulárně-genetické metody

3.13.5.1 PCR

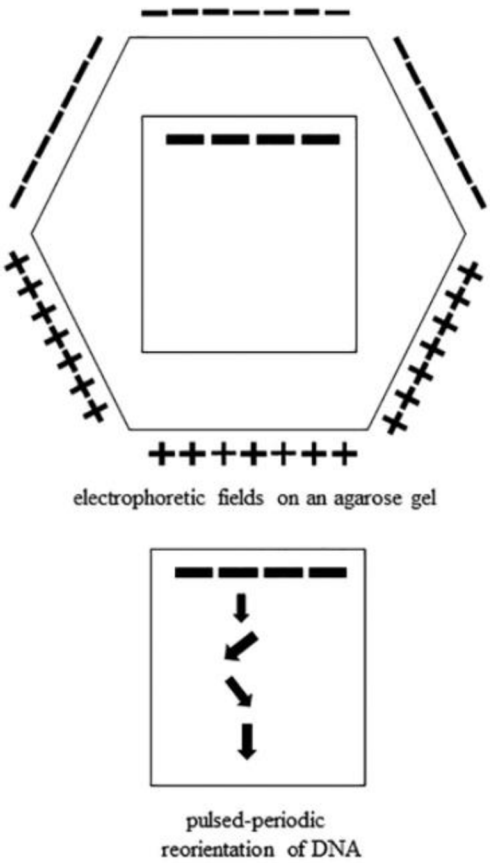
Využívá se k detekci nejběžnějších specifických genů přítomných u *Listeria monocytogenes* a k charakterizaci jejich kmenů. Nejčastěji se zaměřuje na geny hly, inlA, inlB, plcA, plcB, 16S a 23S rRNA (Matle *et al*., 2020). Přítomnost nebo absence různých genů může být ukazatelem, zda je nebo není daný kmen virulentní (Leong *et al*., 2016). Hlavní výhody PCR je rychlost výsledků a jednoduchost provedení. Nevýhodou PCR je nemožnost rozlišení mezi živými a mrtvými buňkami. Pozitivní vzorek proto nemusí nutně znamenat, že je bakterie živá a v požadované koncentraci, aby znamenala riziko pro veřejné zdraví (Matle *et al*., 2020).

PCR je založena na opakujících se cyklech tří reakcí. První je denaturace pomocí tepla, dvoušroubovice se rozvolní na jednotlivá izolovaná vlákna. V druhém kroku, po ochlazení, nasedají na specifické místa vlákna DNA primery na základě komplementarity. Třetím krokem je za přítomnosti *Taq* polymerázy a volných deoxyribonukleotidtrifosfátů syntéza nových vláken, vznikají tak nové kopie DNA (PCR produkt). Amplifikovanou DNA (PCR produkt) je možné prokázat například elektoforézou (Votava *et al*., 2010).

3.13.5.2 Elektroforéza v pulsním poli (PFGE)

Využívá se pro subtypizaci *Listeria monocytogenes* pomocí dělení dlouhých úseků molekul DNA (větších než 15 kb ale menších než 5 Mb). Jedná se o poměrně drahou metodu, která trvá obvykle 2 až 3 dny a vyžaduje vyškolený personál. Nabízí ovšem možnost sdílení získaných dat mezi laboratořemi díky vysoké rozlišovací schopnosti a reprodukovatelnosti. V současné době je stále považována za "zlatý standard" pro typizaci bakterií. Princip separace DNA pomocí PFGE je založena na střídání elektrického pole mezi dvěma páry elektrod umístěných pravoúhle, případně třemi páry elektrod sestavených do šestiúhelníku a schopnosti molekul DNA se přeorientovat do nového směru působení elektrického pole – viz obrázek 20 (Leong *et al*., 2016; Lopez-Canovas *et al*., 2019; Matle *et al*., 2020).

Jednotlivé kroky PFGE jsou lýze buněk za účelem získání genomové DNA, imobilizace DNA jejím zachycením v agarové vrstvě, restrikční štěpení DNA specifickými enzymy a migrace DNA gelovou elektroforézou s pulzním polem po dlouhou dobu, obvykle 21 hodin. Výsledkem jsou získané pulzotypy, které lze analyzovat pomocí softwaru. Tímto způsobem je možné identifikovat stejný kmen nalezený v různých oblastech a pomocí toho určit pravděpodobnou cestu a zdroj kontaminace (Leong *et al*., 2016; Lopez-Canovas *et al*., 2019; Matle *et al*., 2020).



Obrázek 20: Schematický diagram pohybu pruhu DNA v PFGE, pulsně-periodická reorientace DNA na PFGE gelu. Převzato z Neoh *et al*. (2019)

3.13.5.3 Ribotypizace

Ribotypizace slouží k identifikaci a typizaci bakterií na úrovni kmene a je založena na variacích v ribozomálních genech a jejich proteinech. Ribotypizace izolátů druhů *Listeria* zahrnuje štěpení celkové genomové DNA restrikčními enzymy a následnou hybridizací fragmentů DNA pomocí radioaktivně značené sondy ribozomálního operonu. Po autoradiografii jsou vizualizovány pruhy obsahující část ribozomálního operonu. Pruhy se využívají k třídění izolátů listerií do ribotypů a ke stanovení příbuznosti (Gasanov *et al*., 2005; Matloob *et* Griffiths, 2014).

3.13.6 Fenotypové molekulární metody – hmotnostní spektrofotometrie MALDI-TOF

MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) srovnává hmotnostní spektra biomolekul, především proteinů, vyšetřovaného izolátu s hmotnostním spektrem mikroorganismů v databázi. V první fázi hmotnostní spektrometr ionizuje biomolekuly nanesené na kovové destičce pomocí laseru. Ionizované molekuly jsou separovány na základě jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). Následně se měří čas letu ve vakuové trubici pomocí analyzátoru doby letu. Vytváří se hmotnostní spektrum,

které je následně srovnáváno s hmotnostními spektry mikroorganismů v databázi (Melter *et* Malmgren, 2014).

Jedná se o jednoduchou, citlivou, rychlou a ekonomickou techniku pro charakteristiku bakterií na úrovni druhu či kmene. Metoda je založena na analýze celobuněčných proteomech mikrobů v hmotnostním rozsahu od 2 do 20 kDa. Získaný profil obsahuje především ribozomální a další provozní proteiny (Jadhav *et al*., 2015). Tato metoda má široké uplatnění, v mikrobiologii slouží k identifikaci a typizaci kmenů, k epidemiologickým studiím a k detekci bioterorismu. MALDI TOF se využívá také k detekci mikroorganismů přítomných ve vodě a v potravinách a k detekci rezistence na antibiotika. Jediným omezením této metody je velikost databáze pro srovnání vzorku, identifikace je možná pouze pokud spektrální databáze obsahuje informace o specifických genech, jako je prokaryotická16S rRNA. Velikost databází se ovšem neustále zvětšuje a aktualizuje (Singhal *et al*., 2015).

4 ZÁVĚR

V této bakalářské práci se podařilo zpracovat problematiku mikroorganismů z rodu *Listeria* a nemoci jimi způsobených formou review. Podrobně byla popsána morfologie, fyziologie a diagnostika původce a rovněž formy, průběh, diagnostika a léčba listerióz. Práce akcentovala především druh *Listeria monocytogenes* což je zoonotický patogen způsobující u lidí a zvířat onemocnění nazývané listerióza.

Shrneme-li základní informace, které tato práce přináší, pak původce *Listeria monocytogenes* lze charakterizovat jako všudypřítomného, běžně se vyskytujícího se v životním prostředí. Listerie napadá zvířata a skrze zvířecí produkty či potraviny z nich vyrobené může přecházet také na člověka. V jaké míře propukne infekce závisí na imunitním systému hostitele. U zdravých jedinců probíhá onemocnění bezpříznakově nebo ve formě gastroenteritidy. U jedinců s defektem imunity, novorozenců, těhotných žen a starších jedinců může listerióza představovat závažné onemocnění ve formě meningitidy, encefalitidy či septikémie. Při těchto formách infekce využívá *Listeria monocytogenes* svých schopností vstoupit do hostitelské buňky a žít intracelulárně, čímž uniká imunitnímu systému hostitele. Pokud není listerióza včasně diagnostikována a není zahájena antibiotická léčba, může mít onemocnění fatální následky.

Kultivačně je *Listeria* spp. nenáročná, roste na běžných kultivačních médiích jako je krevní agar či tryptózový agar. Pro snazší a rychlejší identifikaci listerií byla vyvinuta chromogenní média, na jejichž základě dokážou zkušení rutinní mikrobiologové rozlišit i jednotlivé druhy listerií. Pro identifikaci listerií v potravinách, životním prostředí ale i klinických vzorcích se čím dál častěji využívají rychlejší moderní metody, jako například ELISA, PCR, MALDI-TOF či nejrůznější komerční soupravy pro rychlou diagnostiku na imunologické bázi.

Do budoucna je, dle mého názoru, jedním z řešení snížení výskytu listerióz rychlost, efektivnost a také finanční dostupnost identifikačních metod. Spolu s lepší dostupností a efektivností identifikačních metod by mohl vzrůst také počet vyšetřených vzorků ve všech sledovaných sférách, v potravinářství, ve zdravotnictví, ve veterinární sféře ale také u vzorků z životního prostředí. V současnosti je počet odebraných a vyšetřených vzorků potravin v nepoměru s registrovanými výrobci. Mezi další kroky vedoucí ke snížení výskytu listerióz je informovat a vzdělávat širokou veřejnost a především rizikové skupiny lidí o prevenci, případně jakým druhům potravin se vyhýbat. V neposlední řadě je důležité, aby také lékaři, kteří nemají specializované vzdělání v klinické mikrobiologii, nezapomínali na méně častou, avšak stále rostoucí potřebu diagnostiky listerióz.

I když je *Listeria monocytogenes* všudypřítomná a u určitých skupin obyvatelstva může způsobovat vážná onemocnění, není žádoucí propadat panice a mít přehnané obavy. Prvním krokem, jak se vyhnout listeriovým infekcím je starat se o své fyzické, ale i duševní zdraví a dodržovat preventivní protiepidemická opatření.

Cíle vytyčené u úvodu této bakalářské práce byly splněny i přesto, že nebylo možné z epidemiologických důvodů zúčastnit se aktivně stáží na pracovištích, která diagnostiku listerií provádějí, nashromáždit vlastní data a provést vlastní analýzy a syntézy informací.

5 LITERATURA

Allerberger F., (2003): Listeria: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 35(3), 183-189.

Angelo K. M., Conrad A. R., Saupe A., Dragoo H., West N., Sorenson A., Barnes A., Doyle M., Beal J., Jackson K. A., Stroika S., Tarr C., Kucerova Z., Lance S., Gould L. H., Wise M., Jackson B. R., (2017): Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014-2015. Epidemiology and Infection, 145(5), 848-856.

Artola B. S., Herrejón E. P., (2010): Infecciones por Listeria, Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, 10(50), 3368-3372.

Aureli P., Fiorucci G. C., Caroli D., Biol D., MArchiaro G., Novara O., Leone L., Salmaso S., (2000): An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Corn Contaminated by *Listeria monocytogenes*, The New England Journal of Medicine, 342(17), 1236-1241.

Bakker H. C., Bundrant B. N., Fortes E. D., Orsi R. H., Wiedmann M., (2010): A Population Genetics-Based and Phylogenetic Approach to Understanding the Evolution of Virulence in the Genus Listeria, Applied and Environmental Microbiology, 76(18), 6085-6100.

Bakker H. C., Warchocki S., Wright E. M., Allred A. F., Ahlstrom C., Manuel C. S., Stasiewicz M. J., Burrell A., Roof S., Strawn L. K., Fortes E., Nightingale K. K., Kephart D., Weidmann M., (2014): *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64:1882-1889.

Baquero F., Lanza V. F., Duval M., Coque T. M., (2020): Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. Molecular Microbiology, 113(3), 570-579.

Bertsch D., Rau J., Eugster M. R., Haug M. C., Lawson P. A., Lacroix C., Meile L., (2013): *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63:526-532.

Blažková M., Karamonová L., Fukal L., Rauch P., (2005): *Listeria monocytogenes:* nebezpečný patogen a jeho detekce v potravinách. Chemické listy, 99(7), 467-473.

Bortolussi R., (2008): Listeriosis: a primer. Canadian Medical Association Journal, 179(8), 795-797.

Brychta J., (2018): Výskyt *Listeria monocytogenes* v potravinách a riziko onemocnění pro člověka. Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny. ISBN 978-80-88019-31-2

Buchrieser C., Rusniok C., The Listeria Consortium, Kunst F., Cossart P., Glaser P., (2003): Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 35(3), 207–213.

Bursová Š., Dušková M., Necidová L., Karpíšková R., Myšková P., (2014a): *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 80 s, ISBN 978-80-7305-676-6

Bursová Š., Necidová L., Dušková M., (2014b): Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody. Obecná mikrobiologie. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 114 s, ISBN 978-80-7305-742-8

Carlin C. R., Liao J., Weller D., Guo X., Orsi R., Wiedmann M., (2021): *Listeria cossartiae* sp. nov., *Listeria immobilis* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov. and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 71(5), 4795.

Cecconi M., Evans L., Levy M., Rhodes A., (2018): Sepsis and septic shock, The Lancet, 392(10141), 75-87.

Clauss H. E., Lorber B., (2008): Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*, Current Infectious Disease Reports, 10(4), 300-306.

Colagiorgi A., Bruini I., Di Ciccio P. A., Zanardi E., Ghidini S., Ianieri A., (2017): *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. Pathogens, 6(3), 41.

Cossart P., Toledo-Arana A., (2008): *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. Microbes and Infection, 10(9), 1041-1050.

Cupáková Š., Karpíšková R., Necidová L., (2010): Mikrobiologie potravin – praktická cvičení II. Metody stanovení mikroorganismů v potravinách. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 108 s, ISBN 978-80-7305-126-6

Čížek A., (1999): Praktika z veterinární bakteriologie a mykologie. Ústav mikrobiologie a imunologie FVL. Brno: VFU, 93 s.

Desai R. W., Smith M. A., (2017): Pregnancy-related listeriosis, Birth defects research, 109(5), 324-335.

Dhama K., Karthik K., Tiwari R., Shabbir M. Z., Barbuddhe S., Malik S. V. S., Singh R. K., (2015): Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. Veterinary Quarterly, 35(4), 211-235.

Doijad S. P., Poharkar K. V., Kale S. B., Kerkar S., Kalorey D. R., Kurkure N. V., Rawool D. B., Malik S. V. S., Ahmad R. Y, Hudel M., Chaudhari S. P., Abt B., Overmann J., Weigel M., Hain T., Barbuddhe S. B., Chakraborty T., (2018): *Listeria goaensis* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 68(10), 3285-3291.

Donovan S., (2015): Listeriosis: a Rare but Deadly Disease, Clinical Microbiology Newsletter, 37(17), 135-140.

Errebo Larsen H., Seeliger H. P. R., (1966): A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. n. *Proceedings of the Third International Symposium on Listeriosis* July 13-16, Bilthoven, 1966. Rijks Instituut voor de Volksgezondheit, Utrecht.

Freitag N. E., Port G. C., Miner M. D., (2009): *Listeria monocytogenes* – from saprophyte to intracellular pathogen, Nature Reviews Microbiology, 7(9), 623-628.

Gaballa A., Guariglia-Oropeza V., Wiedmann M., Boor K. J. (2019): Cross talk between SigB and PrfA in *Listeria monocytogenes* facilitates transitions between extra-and intracellular environments. Microbiology and Molecular Biology Reviews, *83*(4), e00034-19.

Gasanov U., Hughes D., Hansbro P. M., (2005): Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiology Reviews, 295), 851-875.

Goulet V., King L. A., Vaillant V., Valk H., (2013): What is the incubation period for listeriosis?, BMC Infectious Disease, 13(1), 1-7.

Graves L. M., Helsel L. O., Steigerwalt A. G., Morey R. E., Daneshvar M. I., Roof S. E., Orsi R. H., Fortes E. D., Milillo S. R., den Bakker H. C., Wiedmann M., Swaminathan B., Sauders B. D., (2010): *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60(6), 1280-1288.

Haase J. K., Didelot X., Lecuit M., Korkeala H., L. monocytogenes MLST Study Group, Achtman M., (2014): The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: A large-scale Multilocus Sequence Typing study. Environmental Microbiology, 16(2), 405-416.

Hamplová L., Göpfertová D., Pazdiora P., Dohnal K., Janovská D., (2019): Mikrobiologie, Imunologie, Epidemiologie, Hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol, Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 268 s, ISBN 978-80-7553-729-4

Hoelzer K., Pouillot R., Dennis S., (2012): Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned, Veterinary Research, 43(1), 1-27.

Chmielowska C., Korsak D., Chapkauskaitse E., Decewicz P., Lasek R., Szuplewska M., Bartosik D., (2021): Plasmidome of *Listeria* spp. - The repA-Family Buisness. Intrernational Journal of Molecular Sciences, 22(19), 10320.

Jadhav S., Gulati V., Fox E. M., Karpe A., Beale D. J., Sevior D., Bhave M., Palombo E. A., (2015): Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. International Journal of Food Microbiology, 202, 1-9.

Jančová J., Škapová T., (2007): *Listeria monocytogenes* – Původce listeriózy. Zpravodaj Centra MPI: Oddělení bakteriologie ZÚ Ostrava. 2007, 3, 2-7.

Janež N., Škrlj B., Sterniša M., Klančnik A., Sabotič, J. (2021): The role of the *Listeria monocytogenes* surfactome in biofilm formation. Microbial Biotechnology, *14*(4), 1269-1281.

Jemmi T., Stephan R., (2006): *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. Scientific and Technical Review, 25(2), 571-80, PMID: 17094698

Julák J., (2015): Úvod do lékařské bakteriologie. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 404 s, ISBN 978-80-246-3210-0

Kishore U., Reid K. B., (2000): C1q: structure, function, and receptors, Immunopharmacology, 49(1-2), 159-170.

Kocks C., Gouin E., Tabouret M., Berche P., Ohayon H., Cossart P., (1992): *L. monocytogenes*-induces actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. Cell, 68(3), 521-531.

Kolářová L., Adámková V., Dolejská M., Dřevínek P., Haber J., Hamal P., Hrabák J., Hubáček P., Kletenská B., Mallátová N., Nyč O., Petanová J., Posová H., Stejskal F., Stříž I., Šimečková E., Urbášková P., (2020): Obecná klinická mikrobiologie, Praha: Galén, 441 s, ISBN 978-80-7492-477-4

Kvasničková E., Paldrychová M., Maťátková O., Masák J., (2016): Medicinální aspekty mikrobiálních biofilmů. Chemické listy, 110(7), 485-490.

Lang Halter E., Neuhaus K., Scherer S., (2013): *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant Lemna trisulca taken from a freshwater pond. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63:641-647.

Leclercq A., Clermont D., Bizet C., Grimont P. A. D., Le Fleche-Mateos A., Roche S. M., Buchrieser C., Cadet-Daniel V., Le Monnier A., Lecuit M., Allerberger F., (2010): *Listeria rocourtiae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60(9), 2210-2214.

Leclercq A., Moura A., Vales G., Tessaud-Rita N., Aguilhon C., Lecuit M., (2019): *Listeria thailandensis* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 69(1),74-81.

Leong D., Alvarez-Ordóñez A., Jooste P., Jordan, K., (2016): *Listeria monocytogenes* in food: Control by monitoring the food processing environment. African Journal of Microbiology Research, 10(1), 1-14.

Lepe J. A., (2020): Current aspects of listeriosis, Medicina Clínica (English Edition), 154(11), 453-458.

Liu D., (2006): Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an inportant foodborne pathogen, Journal of Medical Microbiology, 55(6), 645-659.

Liu D., (2008): Handbook of *Listeria monocytogenes*, Boca Raton: Taylor and Francis, 552 s, ISBN 9781420051407

Lopez-Canovas L., Benitez M. B. M., Isidron J. A. H., Soto E. F., (2019): Pulsed field gel electrophoresis: past, present, and future. Analytical Biochemistry, 573, 17-29.

Lorber B., (1997): Listeriosis, Clinical Infectious Diseases, 24(1), 1-11.

Madjunkov M., Chaudhy S., Ito S., (2017): Listeriosis during pregnancy, Archives of Gynecology and Obstetrics, 296(2), 143-152.

Mao P., Wang Y., Gan L., Sun H., Wang Y., Li L., Ji S., Song Z., Jiang H., Ye C., (2021): Function and distribution of the conjugative plasmid pLM1686 in foodborne *Listeria monocytogenes* in China. International Journal of Food Microbiology, 352, 109261.

Matle I., Mbatha K. R., Madoroba E. (2020): A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, *87*(1), 1-20.

Matloob M., Griffiths M., (2014): Ribotyping and automated ribotyping of *Listeria monocytogenes*. In: Jordan K., Fox E. M., Wagner M., eds. *Listeria monocytogenes*. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols) (s. 85-93). New York: Humana Press. ISBN 978-1-4939-0702-1.

Melter O., Malmgren A., (2014): Principy a praktika lékařské mikrobiologie. Praha: Nakladatelství Karolinum, 139 s, ISBN 978-80-246-2414-3

Moreno L. Z., Paixao R., Gobbi D. D. S., Raimundo D. C., Ferreira T. P., Moreno A. M., Hofer E., Reis C. M. F., Matte G. R., Matte M. H., (2014): Characterization of antibiotic resistance in Listeria spp. izolated from slaughterhouse environments, pork and human infections. The Journal of Infection in Developing Countries, 8(4), 416-223.

Morgand M., Leclercq A., Maury M. M., Bracq-Dieae H., Thouvenot P., Vales G., Lecuit M., Charlier C., (2018): *Listeria monocytogenes*-associated respiratory infections: a study of 38 consecutice cases. Clinical Microbiology and Infection. 24(12), 1339.e1-1339.e5.

Murray E. G. D., Webb R. A., Swann H. B. R., (1926): A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). The Journal of Pathology and Bacteriology, 29(4), 407–439.

Navarre W. W., Schneewind O., (1999): Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63(1), 174-229.

Neoh H. M., Tan X. E., Sapri H. F., Tan T. L., (2019): Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. Infection, Genetics and Evolution, 74, 103935.

Núñez-Montero K., Leclercq A., Moura A., Vales G., Peraza J., Pizarro-Cerdá J., Lecuit M., (2018): *Listeria costaricensis* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 68(3), 844-850.

Oevermann A., Zurbriggen A., Vandevelde M., (2010): Rhombencephalitis Caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise?. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2010, 1-22.

Patas K., Mavridis T., Psarra K., Papadopoulos V. E., Mandilara G., Tsirogianni A., Vassilopoulou S., Chatzipanagiotou S., (2020): Neurolisteriosis in a previously asymptomatic patient with serum IgM deficiency: a case report, BMC Neurology, 20(1), 1-6.

Pizarro-Cerdá J., Kühbacher A., Cossart P., (2012): Entry of Listeria monocytogenes in mammalian epithelial cells: an updated view. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2(11), a01009.

Prévot, A. R., (1961): Traité se Systématique Bactérienne, vol 2. Dunod.Paris 511-512

Pucciarelli M. G., Bierne H., Portillo F. G., (2007): The Cell Wall of *Listeria monocytogenes* and its Role in Pathogenicity. In: Goldfine H., Shen H., *Listeria monocytogenes*: Pathogenesis and Host Response (pp. 81-110). Springer, Boston, MA. ISBN 978-0-387-49373-2

Quereda J. J., Leclercq A., Moura A., Vales G., Gomez-Martin A., Garcia-Munoz A., Thouvenot P., Tessaud-Rita N., Bracq-Dieye H., Lecuit M., (2020): *Listeria valentina* sp. nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(11), 5868-5879.

Quinn P. J., Markey B. K., Leonard F. C., Hartigan P., Fanning S., Fitzpatrick E., I. (2011): Listeria species. In: Veterinary Microbiology and Microbial Dvotavaisease, pp 217-221, ISBN: 978-1-4051-15823-7, West Sussex, UK, John Wiley *et* Sons. Ltd, 928 s.

Radoshevich L., Cosart P., (2018): *Listeria monocytogenes:* towards a complete picture of its physiology and patogenesis. Nature Reviews Microbiology 16(1), 32-46.

Renier S., Hébraud M., Desvaux M., (2011): Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. Environmental Microbiology, 13(4), 835-850.

Rocourt J., Grimont P. A. D., (1983): Notes: Listeria welshimeri sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 33(4), 866-869.

Ryser E. T., Marth E. H., (2007): *Listeria*, listeriosis, and Food Safety. Boca Raton: CRC Press. Food science and technology (Taylor and Francis), 896 s., ISBN 978-1-4200-1518-8

Seeliger H. P. R., Rocourt J., Schrettenbrunner A., Grimont P. A. D., Jones D., (1984): *Listeria ivanovii* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 34(3),336-337.

Seeliger H. P. R., (1981): Apathogene Listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger *et* Schoofs, 1977). Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie, 249(4), 487-493.

Shen Y., Boulos S., Sumrall E., Gerber B., Julian-Rodero A., Eugster M. R., Fieseler L., Nyström L., Ebert M. O., Loessner M. J., (2017): Structural and functional diversity in Listeria cell wall teichoic acids. Journal of Biological Chemistry, 292(43), 17832-17844.

Shen Y., Naujokas M., Park M., Ireton K., (2000): InlB-dependent internalization of Listeria is mediated by the Met receptor tyrosine kinase, Cell, 103(3), 501-510.

Schaefer K., Austhof E., Boyd K., Armstrong A., Hoffman S., Pogreba-Brown K., (2022): Septicemia Due to *Listeria monocytogenes* Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis, Foodborne Pathogens and Disease, 19(2), 104-114.

Schardt J., Jones G., Müller-Herbst S., Schauer K., D'Orazio S. E. F., Fuchs T. M., (2017): Comparison between *Listeria sensu stricto* and *Listeria sensu lato* strains identifies novel determinants involved in infection. Scientific Reports 7(1), 1-14.

Schmitz-Esser S., Anast J. M., Cortes B. W., (2021): A Large-Scale Sequencing-Based Survey of Plasmids in *Listeria monocytogenes* Reveals Global Disemination of Plasmids. Frontiers in Microbiology, 12, 510.

Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K., Virdi J. S., (2015): MALDI-TOF mass spectrofotometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology, 6, 791.

Smirnova T. A., Didenko L. V., Azizbekyan R. R., Romanova Y. M., (2010): Structural and functional characteristics of bacterial biofilms. Microbiology, 79(4), 413-423.

Sobarzo O, B., (2016): Identificación por PCR de Listeria monocytogenes, *L. innocua* y *L. ivanovii* aisladas de Apio (*Apium graveolens*) expedido en Ciudad Obregón, Sonora (Doctoral dissertation)

Swaminathan B., Gerner-Smidt P., (2007): The epidemiology of human listeriosis, Microbes and Infection, 9(10), 1236-1243.

Tylšová P., Bursová Š., (2015): Mikrobiologický atlas. Ukázky růstu vybraných původců alimentárních onemocnění, Fakulta Veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie mléka, Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 18 s.

Votava M., Černohorská L., Heroldová M., Holá V., Mejzlíková L., Ondrovčík P., Růžička F., Dvořáčková M., Woznicová V., Zahradníček O., (2006): Lékařská mikrobiologie speciální, Brno: Neptun, 495 s., ISBN 80-902896-6-5

Votava M., Růžička F., Woznicová V., Černochová L., Dvořáčková M., Dvořáková Heroldová M., Holá V., Zahradníček O., (2010): Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody, Brno: Neptun, 495 s, ISBN 978-80-86850-04-7

Weller D., Andrus A., Wiedmann M., den Bakker H. C., (2015): *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65:286-292.

Welshimer H. J., Meredith A. L., (1971): *Listeria murrayi* sp. n.: nitrate-reducing mannitol fermenting Listeria. International Journal of Systematic Bacteriology, 21(1), 3-7.

Zpráva o činnosti NRL za rok 2015: Národní referenční laboratoř pro *Listeria monocytogenes*, 2016. Jihlava.

Zpráva o činnosti NRL za rok 2016: Národní referenční laboratoř pro *Listeria monocytogenes*, 2017. Jihlava.

Zpráva o činnosti NRL za rok 2017: Národní referenční laboratoř pro *Listeria monocytogenes*, 2018. Jihlava.

Zpráva o činnosti NRL za rok 2018: Národní referenční laboratoř pro *Listeria monocytogenes*, 2019. Jihlava.

Zpráva o činnosti NRL za rok 2019: Národní referenční laboratoř pro *Listeria monocytogenes*, 2020. Jihlava.

Zpráva o činnosti NRL za rok 2020: Národní referenční laboratoř pro *Listeria monocytogenes*, 2021. Jihlava.

Online:

Biolog ©, 2021 – Microbial Identification [online] [navštíveno 23. 4. 2022] Dostupné z https://www.biolog.com/products-portfolio-overview/microbial-identification/

BioMérieux © SA, 2022 - ALOA® AGAR [online] [navštíveno 10. 2. 2022] Dostupné z https://biomerieuxdirect.com/industry/Bacteriology/Culture/Prepared-plate-media/PPM-Chromogenic/AES-Chromogenic-Media/ALOA%26reg%3B-AGAR-%28120-x-90MM-Plates%29/p/AEB520079

Bio-Rad Laboratories, Inc., © 2022: RAPID'*L.mono* Medium [online] [navštíveno 10. 2. 2022] Dostupné z https://www.bio-rad.com/en-cz/product/rapidl-mono-medium?ID=35bad7d6-36ac-4044-b859-d5febbda101a

Cupáková, Š., Necidová, L., Karpíšková, R.: Bakteriální původci alimentárních onemocnění-*Listeria monocytogenes* [online] VFU Brno, © 2008, [navštíveno 5. 11. 2021] Dostupné z https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/

Euzéby J. P. List of Procaryotic Names with Standing in Nomenclature – Genus Listeria. [online] [navštíveno 5. 11. 2021] Dostupné z https://lpsn.dsmz.de/genus/listeria

Medios de Cultivo: LISTERIA PALCAM AGAR (BASE) [online], 2015. [cit. 2022-04-28] Dostupné z: https://www.medioscultivo.com/listeria-palcam-agar-base/

Medios de Cultivo: LISTERIA OXFORD AGAR (BASE) [online], 2015. [cit. 2022-04-28] Dostupné z: https://www.medioscultivo.com/listeria-oxford-agar-base/

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Listeria monocytogenes, (2021a) [online] [navštíveno 10. 11. 2021] Dostupné z https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid1639[orgn]

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Listeria monocytogenes: Plasmids, (2021b) [online] [navštíveno 17. 11. 2021] Dostupné z https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/plasmids/159/

Oxoid Limited ©, 2022, Listeria Selective Agar (Oxford formulation) [online] [navštíveno 10. 2. 2022] Dostupné z http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0856&c=UK&lang=EN

Rogalla D., Bomar P. A., (2021): *Listeria monocytogenes* [Updated 2021 July 10]. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. [Online] [Navštíveno 28. 2. 2022] PMID: 30521259, NBK534838, Dostupné z https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534838/

Státní zdravotní ústav (SZÚ), Zoonózy (nemoci zvířat přenosné na člověka), 2016 [online] [navštíveno 17. 2. 2022] Dostupné z http://www.szu.cz/tema/prevence/antropozoonozy

World Health Organization (WHO), (2022): Listeriosis [online] [navštíveno 9. 2. 2022] Dostupné z https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis

World organisation for animal health (OIE): *Listeria monocytogenes* (Infection with) [online] [navštíveno 5. 11. 2021] Dostupné z https://www.oie.int/en/document/listeria-monocytogenes-infection-with/