

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Výskyt *Listeria monocytogenes* v objemných krmivech

Bakalářská práce

Veronika Kulhavá

Kvalita produkce

Ing. Hana Šubrtová Salmonová, Ph. D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 3.5.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní Ing. Haně Šubrtové Salmonové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, za předané vědomosti, trpělivosti, motivaci a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Mé poděkování patří též Ing. Tereze Kodešové za pomoc při laboratorních pracích. Na závěr bych chtěla vyjádřit velké díky mé rodině a přátelům, kteří mi byli podporou po celou dobu mého studia.

Výskyt *Listeria monocytogenes* v objemných krmivech

Souhrn

Listeria monocytogenes je fakultativně anaerobní intracelulární patogen, který je prakticky všudypřítomný. Nejčastěji se však vyskytuje v půdě, na rostlinách a v trávicím traktu zvířat. Způsobuje alimentární onemocnění zvané listerióza u různých druhů zvířat a také u člověka. Hospodářská zvířata a prostředí farem mohou být významným rezervoárem těchto bakterií. Nejčastěji dochází k infekci zvířat po pozření kontaminovaného krmiva, v podobě nekvalitně fermentované siláže. Ačkoliv se listerióza objevuje spíše sporadicky, jedná se o velice závažnou a jednu z nejsmrtelnějších bakteriálních infekcí alimentárního původu. *L. monocytogenes* způsobuje febrilní gastroenteritidu, v horších případech meningoencefalitidu, potraty, septikémii, v nejzávažnějších případech i smrt.

Proto bylo cílem bakalářské práce sledovat přítomnost *L. monocytogenes* ve vzorcích siláže a senáže. Testováno bylo celkem 20 různých vzorků (5x vojtěšková senáž, 2x vojtěšková siláž, 7x kukuřičná siláž, 6x žitná senáž). Průkaz *L. monocytogenes* by proveden kultivačně dle normy ČSN EN 11290-1/2017. Vzorky byly nejprve pomnoženy v primárním médiu, polovičním bujónu podle Frasera po dobu 24 hodin a při 30 °C. Následně bylo provedeno sekundární pomnožení ve Fraser bujónu při 30 °C po dobu 24 a 48 hodin. Současně proběhlo naočkování na selektivní půdu Chromogenic listeria agar, který byl kultivován při 37 °C po dobu 24 h a 48 hodin. Druhová identifikace byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF). U vybraných kmenů byla provedena sekvenace genu pro 16S rRNA. Kontaminace *L. monocytogenes* nebyla prokázána v žádném vzorku. Zato byl nalezen jiný zástupce z rodu *Listeria*, *Listeria innocua* se schopností produkce lecitinázy. Dále byli detekováni zástupci rodů *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lysinibacillus* a *Lactobacillus*.

Klíčová slova: *Listeria monocytogenes*, senáž, siláž, alimentární onemocnění, patogenita

Occurrence of *Listeria monocytogenes* in roughage feedstuffs

Summary

Listeria monocytogenes is facultative anaerobic intracellular pathogen occurring almost everywhere in nature. The most often these bacteria can be found in the soil, on plants and in the digestive tract of animals. *L. monocytogenes* is a causative agents of infectious and fatal disease called listeriosis. It affects various animal species, usually ruminants and also humans. Livestock and farms environment can be a significant reservoirs of these bacteria. The most infection outbreaks are due to ingestion of contaminated feed, in the form of poorly fermented silage. Although the appearance of listeriosis is sporadic, it is very serious and one of the deadliest bacterial infections of alimentary origin. *L. monocytogenes* causes febrile gastroenteritis, in worse cases meningoencephalitis, abortion, septicemia and in the most severe cases even death.

Therefore the aim of this bachelor thesis was to monitor the presence of *L. monocytogenes* in silage and haylage samples. A total of 20 various samples were tested (5x alfalfa haylage, 2x alfalfa silage, 7x corn silage, 6x rye haylage). Detection of *L. monocytogenes* was performed by cultivation method according to standard ČSN EN 11290-1/2017. Samples were firstly cultivated in half Fraser broth at 30 °C for 24 hour . Subsequently, aliquot was transferred into full Fraser broth and cultivated at 30 °C for 24 and 48 hour. One drop of bacterial suspension from both media was spread on Chromogenic listeria agar plates and incubated at 37 °C for 24 and 48 hour durations. After cultivation, bacterial isolates were taken and identified using mass spectrometry with laser desorption and ionization of the matrix using a flow-through analyzer (MALDI-TOF). 16S rRNA gene sequencing was performed on selected strains. Contamination by *L. monocytogenes* was not detected in any sample. Instead, another representative of the genus *Listeria*, *Listeria innocua* with the ability to produce lecithinase, was found. Representatives of the genera *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lysinibacillus* and *Lactobacillus* were also found.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, haylage, silage, foodborne illness, pathogenicity

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíl práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Charakteristika rodu <i>Listeria</i>	10
3.1.1	Obecná charakteristika	10
3.1.2	Taxonomie rodu <i>Listeria</i>	10
3.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	12
3.2.1	Podmínky života a růstu	13
3.2.2	Metabolismus	14
3.2.3	Výskyt	15
3.2.4	Virulence	17
3.3	Listerióza	18
3.3.1	Průběh onemocnění u lidí	19
3.3.1.1	Léčba	21
3.3.1.2	Incidence a prevalence	21
3.3.2	Průběh onemocnění u zvířat	22
3.3.2.1	Léčba	23
3.3.2.2	Přenos a incidence	23
3.1	Objemná krmiva	24
3.1.1	Konzervovaná objemná krmiva	25
3.1.2	Siláž a senáž	26
3.1.2.1	Výroba siláže	27
3.1.2.1	Druhy siláží	32
3.1.2.2	Žitná senáž	32
3.1.2.3	Vojtěšková siláž	33
3.1.2.4	Kukuřičná siláž	33
3.2	Metody stanovení a identifikace	34
3.2.1	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS)	34
3.2.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	35
4	Metodika	36
4.1	Metody	37
4.1.1	Příprava médií	37
4.1.2	Průkaz	38

4.1.3	MALDI-TOF MS.....	39
4.1.4	Identifikace pomocí PCR sekvenování genu 16S rRNA	39
4.1.4.1	Příprava lyzátu.....	39
4.1.4.2	Amplifikace genu pro 16S rRNA a příprava termocyklu.....	40
4.1.4.3	Gelová elektroforéza	40
4.1.4.4	Purifikace vzorků vybraných pro identifikaci sekvenováním	40
4.1.4.5	Sekvenování 16S rDNA.....	41
5	Výsledky.....	41
6	Diskuze.....	42
7	Závěr	46
8	Zdroje.....	47

1 Úvod

Listeria monocytogenes je grampozitivní bakterie ve tvaru krátkých tyčinek, která je nenáročná na kultivaci. Je schopna přežít a růst v prostředí, které má obsah 13-14 % NaCl a zároveň je schopna prospívat i při nízkých teplotách a pH. Vzhledem k těmto schopnostem se vyskytuje ve všech prostředích jako jsou trávicí trakt lidí a zvířat, odpadní voda, půda, kontaminované potraviny, rostliny a siláže (Logan & De Vos 2009; Shamloo et al. 2019).

Hospodářská zvířata a prostředí farem jsou významnými rezervoáry této bakterie. K infekci zvířat dochází obvykle požitím kontaminované potravy a krmiva, vzácně pak kontaktem či horizontálním přenosem z matky na plod. Zvíře pak produkuje výkaly, které obsahují *L. monocytogenes* a při hnojení pole dochází ke kontaminaci půdy nebo plodin. Nejčastěji je listerióza spojována s přežvýkavci, včetně skotu, ovcí a koz, kteří jsou krmeni silážemi a ti jsou často hostiteli *L. monocytogenes* (Hunt et al. 2012).

L. monocytogenes způsobuje onemocnění zvané „listerióza“ u zvířat a lidí. Toto onemocnění způsobuje potraty, gastroenteritidy, sepse, meningitidu, v nejhorších případech dokonce i smrt (Dortet et al. 2009). Nejvíce jsou ohroženi jedinci s oslabeným organismem. Listerie ovlivňuje ztráty v chovech, kdy míra zotavení u ovcí a koz je až 30 % a u skotu 50 % (Dhama et al. 2015). Dále je potřeba uvést že, potraviny živočišného původu pocházející z nakaženého zvířete mohou vést k následné nákaze člověka, kde i přes včasnou léčbu antibiotiky dochází ve 20-30 % k umrtí (Hunt et al. 2012; Vázquez-Boland et al. 2001).

Prevenčí proti nákaze je správná úprava potravin a jejich zpracování, zejména jedná-li se o suroviny v syrovém stavu. U krmiv je správným opatřením vyrobit kvalitní siláž, při jejíž fermentaci kleslo pH pod 4,2 a byl vyloučen kyslík (Fenlon 1985; SZPI, 2015; Queiroz et al. 2018).

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Hypotéza: Předpokládáme, že v objemných krmivech určených pro zkrmování v chovech hospodářských zvířat bude prokázána kontaminace bakterií *Listeria monocytogenes*.

Cílem bakalářské práce je testování výskytu této bakterie ve vzorcích objemných krmiv a vyhodnocení výsledků z hlediska bezpečnosti.

3 Literární rešerše

3.1 Charakteristika rodu *Listeria*

3.1.1 Obecná charakteristika

Bakterie rodu *Listeria* jsou z morfologického hlediska krátké grampozitivní tyčinky o velikosti 0,4-0,5 x 1-2 μm s rovnými stranami a zaoblenými konci. Mohou se ale také vyskytovat v téměř kokovité formě. Listérie netvoří spóry ani pouzdra. Nejčastěji se vyskytují jednotlivě nebo v krátkých řetězcích. Starší kultury mohou být gramvariabilní nebo vytvářet vláknité formy. Při teplotách nižších než 30 °C tvoří peritrichální bičíky. *Listeria monocytogenes*, a *Listeria ivanovii*, jsou příklady pohyblivých zástupců tohoto rodu (Dongyou 2006; Logan & De Vos 2009; Schardt et al. 2017).

Jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní, kataláza pozitivní a rostou i při 10% koncentraci NaCl (Logan & De Vos 2009).

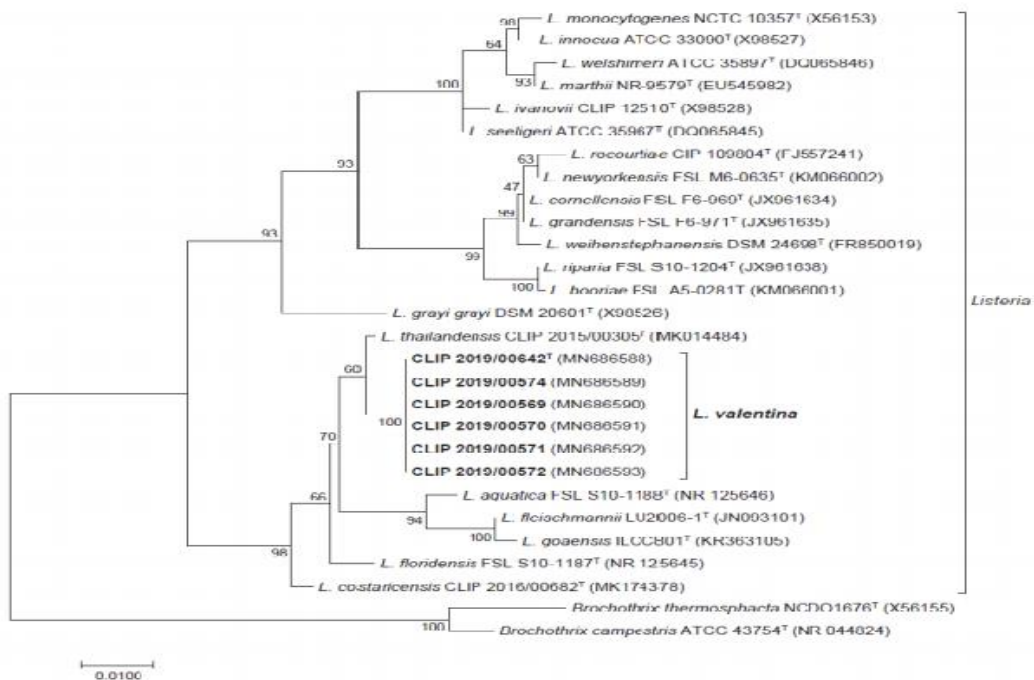
3.1.2 Taxonomie rodu *Listeria*

Rodu *Listeria* náleží do čeledi *Listeriaceae*, řádu Bacillales, třídy Bacili, kmene Firmicutes, domény Bacteria (Logan & De Vos 2009). Mnoho let bylo problematické charakterizovat příbuznost uvnitř a vně rodu. Použití technik numerické taxonomie, makromolekulární analýzy a zejména homologie DNA / DNA a 16S rRNA však přispělo k lepšímu pochopení vnitřního složení rodu a začalo objasňovat vztah rodu k jiným grampozitivním taxonům například rodu *Brochothrix* (Jones 1988), který je rovněž členem čeledi *Listeriaceae*. Tato čeleď je také příbuzná s dalšími grampozitivními bakteriemi s nízkým obsahem G+C, zejména z rodu *Bacillus*.

Oficiální objev rodu *Listeria* se datuje do roku 1924, kdy Murray, Webb a Swann izolovali *L. monocytogenes* jako etiologického původce septikemického onemocnění postihujícího králíky a morčata. Tento kmen pojmenovali *Bacterium monocytogenes*, jelikož bakterie infikovala monocyty krve. Následující rok Pirie izoloval identickou bakterii z jater několika pískomilů, známých také jako africká myš. Pirie tento druh *Listerie* nazval *Listerella hepatolytica*. Rodový název *Listerella* byl zvolen na počest Lorda Listera, průkopníka v oblasti bakteriologie. To způsobilo jistý zmatek, protože označení *Listerella* bylo dříve použito pro

skupinu Mycetozoa. V roce 1939 na Třetím mezinárodním kongresu pro mikrobiologii v New Yorku Výbor pro nomenklaturu ustanovil, že označení *Listerella* není platné, proto Pirie v roce 1940 navrhl rodové jméno *Listeria*. Označení *Listeria* bylo přijato v šestém vydání Bergey's Manual of Systematic Bacteriology a schváleno soudní komisí pro bakteriologickou nomenklaturu a taxonomii, a nyní je oficiálním názvem rodu (Magalhães et al. 2014; Vicario 2015). Další druh *L. ivanovii* byl zpočátku považován za sérovar *L. monocytogenes*. Z taxonomického hlediska se ovšem jedná o dva rozdílné druhy a na základě fenotypových charakteristik a homologie DNA byl druh *L. ivanovii* v roce 1984 oficiálně uznán (Boerlin et al. 1992). Zásadní rozdíl mezi *L. monocytogenes* a *L. ivanovii* je také ve virulenci. Zatímco *L. monocytogenes* je patogenní pro lidi i zvířata, *L. ivanovii* je patogenní pouze pro zvířata. Patogenita předchozích dvou druhů je umožněna seskupením genů virulence o velikosti 9 kb, které je také přítomno v modifikované formě v *Listeria seeligeri* (Schmid et al. 2005).

V současné době je již popsáno více než 20 druhů, které lze rozdělit na dvě základní skupiny. První skupina je *Listeria sensu stricto*, kam patří *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* a *L. marthii*. Jedná se o druhy, které jsou schopné kolonizovat trávicí trakt lidí nebo zvířat. Do druhé skupiny *Listeria sensu lato* patří *L. grayi*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae*, *L. newyorkensis*, *L. costaricensis*, *L. goaensis* a *L. thailandensis*. Jedná se o druhy, u kterých se předpokládá výskyt výhradně v prostředí, bez schopnosti kolonizovat savce. Nejnovější druh byl izolován z výkalů zdravé ovce a vody, a validně popsán v roce 2020. Pojmenován byl podle oblasti Valencie, kde byl objeven, *L. valentina* (Quereda et al. 2020). Na Obrázku 1 je vyobrazena fylogenetická podobnost jednotlivých druhů rodu *Listeria*.



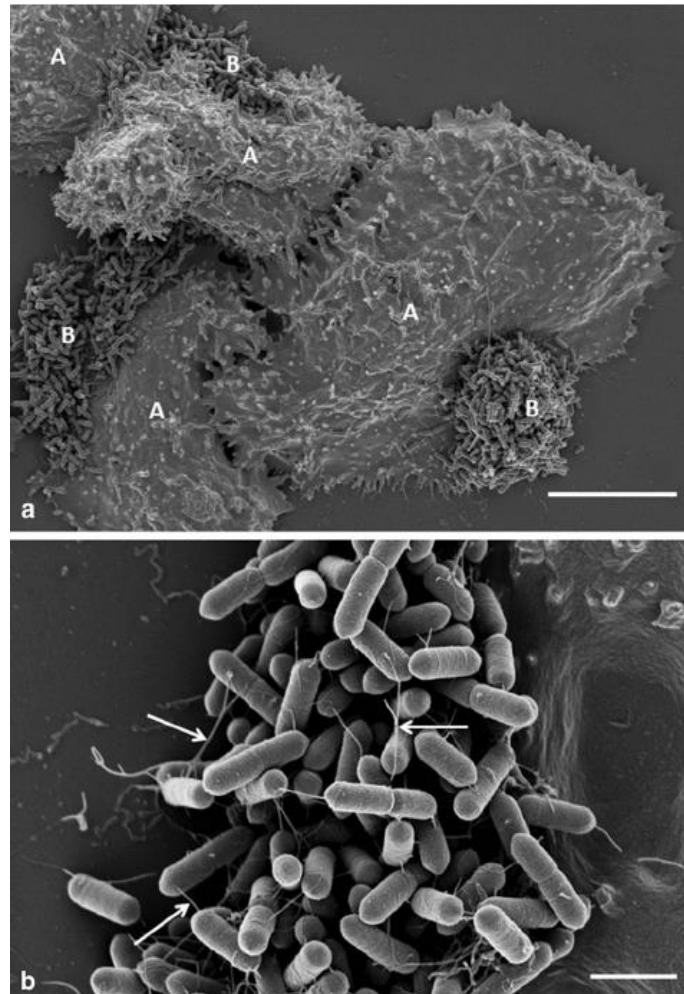
Obrázek 1: Fylogenetický strom rekonstruovaný na základě sekvencí 16S rDNA *Listeria* (Quereda et al. 2020).

3.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je anaerobní, všudypřítomná, nesporetvorná a gram pozitivní kokoidní tyčinka. Buňky jsou 0,4-0,7 µm dlouhé a 0,5-2,0 µm široké. Vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích, nebo také může tvořit řetízkovité útvary (Cupáková a kol. 2010). Pro lepší posouzení úlohy *L. monocytogenes* při onemocnění a pro nalezení potenciálních prostředků kontroly této bakterie je důležité identifikovat a kvantifikovat vliv různých environmentálních faktorů na její chování. Bakterie tohoto druhu rostou v rozmezí teplot 3 až 45 °C, optimální teplotní rozsah je ale 30-37 °C. Teploty nad 50 °C jsou pro *L. monocytogenes* smrtelné. Zmrazení může také vést ke snížení počtu buněk. S ohledem na schopnost růstu při teplotách okolo 0 °C má tato bakterie potenciál kontaminovat a pomnožit se i během skladování v chladírenských podmínkách. Tento druh se snadno rozmnožuje v aerobních i anaerobních podmínkách, ale anaerobní podmínky vedou ke snížení schopnosti množit se. Roste v rozmezí pH od 5,6 až do 9,6. *L. monocytogenes* se zdá být relativně tolerantní vůči kyselým

podmínkám. *L. monocytogenes* se stává citlivější na kyselé podmínky při vyšších teplotách (Low & Donachie 1997; Tienungoon et al. 2000; Walker et al. 1990).

Na agaru tvoří malé, hladké, mírně zploštělé a mléčně bílé kolonie. Jsou-li kolonie osvětleny šikmo procházejícím světlem, vykazují charakteristickou modrou/zelenou barvu (Henryho lampová technika) (Low & Donachie 1997). Na Obrázek je zobrazena morfologie buněk *L. monocytogenes* pomocí elektronového mikroskopu.



Obrázek 2: a, Zobrazení agregátu *Listeria monocytogenes* (B) na buňkách *Acanthamoeba castellanii* (A) pomocí elektronového mikroskopu. b, Zvětšení buňky *Listeria monocytogenes* s viditelnými bičíky (Schuppler 2014).

3.2.1 Podmínky života a růstu

Stejně jako většina bakteriálních druhů, roste *L. monocytogenes* optimálně při vodní aktivitě (a_w) 0,97, je ale schopna růstu i při a_w nižší než 0,83 (Lado & Yousef 2007; Gelbíčová a spol. 2011). Je také tolerantní k vysokému obsahu soli, roste i v přítomnosti 13-14 %

chloridu sodného. Přežití v přítomnosti soli je ovlivněno teplotou. V koncentrovaných solných roztocích je míra přežití *L. monocytogenes* vyšší při nižších teplotách (Farber et al. 1992).

L. monocytogenes je organismus nenáročný na kultivaci, přesto vyžaduje pro svůj růst několik základních živin. Nezbytných je 7 aminokyselin: leucin, izoleucin, valil, methionin, arginin, cystein a glutamin. Nezbytné jsou také vitamíny riboflavin, biotin, thiamin a kyselina thioktová (Premaratne et al. 1991). Požadavky na aminokyseliny a vitamíny jsou ale kmenově specifické. Mohou se tedy lišit v závislosti na původu organismu, a právě díky adaptační schopnosti je *L. monocytogenes* schopna přežít v široké škále podmínek (Lungu et al. 2009). Růst je stimulován přidavkem Fe^{3+} v podobě citrátu železitého. Glukóza, glycerol a glutamin jsou základními zdroji uhlíku a dusíku. Nicméně, *L. monocytogenes* dokáže využít jako zdroj uhlíku i jiné sacharidy jako: fruktóza, manóza, celobióza, trehalóza. Naopak nevhodnými substráty jsou maltóza, glycerol. Díky schopnosti metabolizovat chitin a složky buněčné stěny bakterií a mikroskopických hub, které jsou složeny z glukosaminu, N-acetylglukosaminu a kyseliny N-acetylmuramové, mohou tyto mikroorganismy sloužit jako alternativní zdroj uhlíku. Tato schopnost dává patogenu možnost přežít nebo se pomnožit i v prostředích, které svým obsahem živin růst *L. monocytogenes* samotné neumožňují. (Premaratne et al. 1991; Kathariou et al. 1991).

3.2.2 Metabolismus

L. monocytogenes je fakultativně anaerobní bakterie, což jí umožňuje růst za aerobních i přísných anaerobních podmínek, se změněným metabolismem uhlíku. Za přítomnosti kyslíku neúplně oxiduje glukózu na acetát, laktát a acetoin. V nepřítomnosti kyslíku produkuje *L. monocytogenes* laktát jako hlavní produkt, dále pak ethanol, mravenčan a oxid uhličitý (Pine et al. 1989; Wallace et al. 2017). Odlišný způsob metabolismu v závislosti na koncentraci kyslíku byl potvrzen i transkripční analýzou. Studie naznačují, že hladiny kyslíku hrají klíčovou roli v regulaci metabolismu uhlíku u *L. monocytogenes*. Není však jasné, zda a jak tyto metabolické adaptace ovlivňují patogenezí (Wallace et al. 2017).

3.2.3 Výskyt

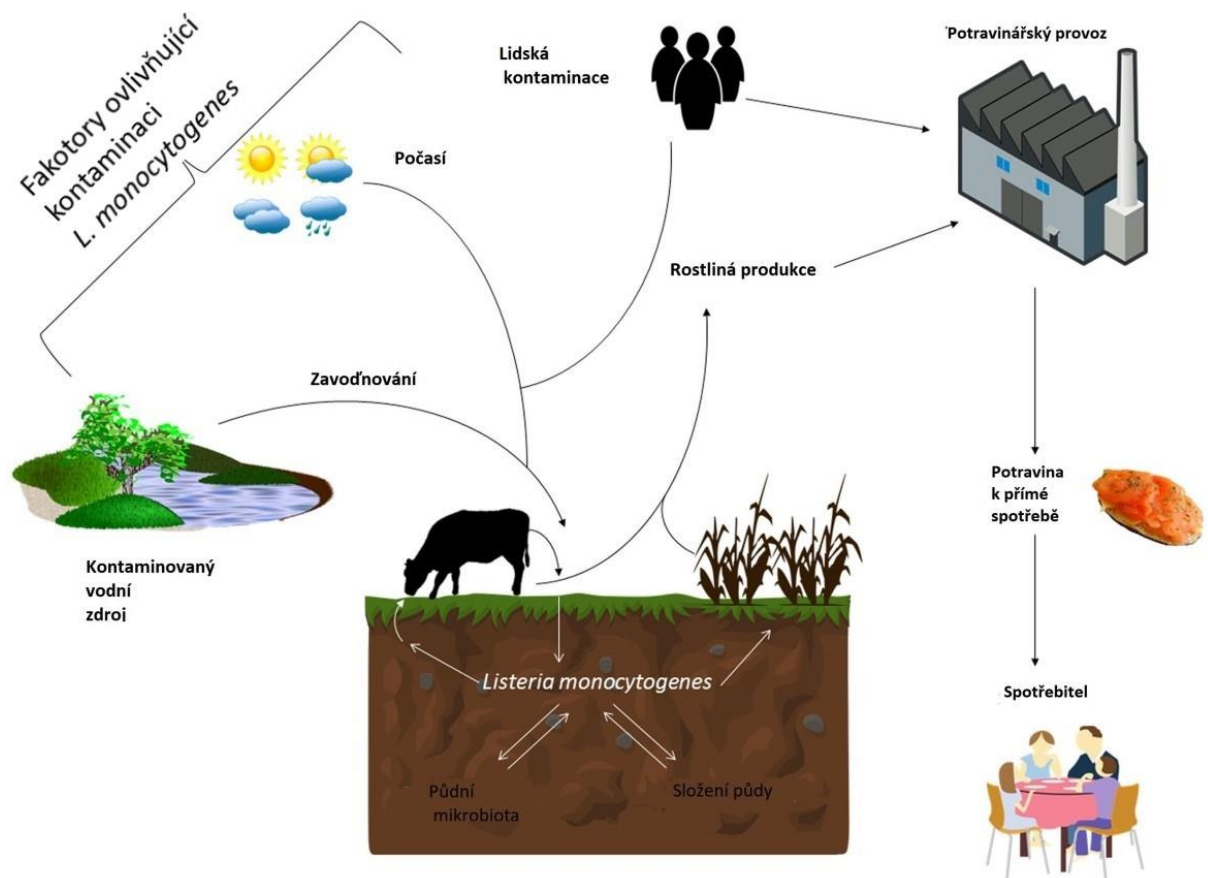
Vzhledem ke schopnosti tohoto patogenu přežít a růst v suchém, chladném prostředí s vysokým obsahem soli, je tato bakterie rozšířena v různých zdrojích. Vyskytuje se na rostlinách, v půdě a v povrchových vodách. Běžně je také nacházena v siláži, odpadních vodách, odpadech z jatek, v kravském mléce, v lidských a živočišných výkalech (Shamloo et al. 2019). Vzhledem k tomu že *L. monocytogenes* má jedinečnou schopnost přežít v různých mikroprostředích gastrointestinálního traktu a překonat nevhodné podmínky, jako je nízké pH, osmolality, nízký obsah kyslíku a žlučové soli, má ideální předpoklady pro vyvolání infekce (Gahan & Hill 2005). *L. monocytogenes* byla izolována ze skotu, ovcí, koz a drůbeže, ale často i z divokých zvířat (Shamloo et al. 2019).

V potravinách se *L. monocytogenes* objevuje převážně v mase, zelenině, rybách, zpracovaných potravinách, hotových potravinách a mléčných výrobcích (Fsihi et al. 2001). Ohniska listeriózy jsou nejčastěji spojeny se syrovými, nepasterizovanými mléky, sýry a zmrzlinou. Dále syrovou nebo zpracovanou zeleninou, syrovým nebo zpracovaným ovocem, kde se nachází přirozeně nebo v důsledku kontaminace během hnojení pole např. kejdou nebo během sklizně kontaminovanou půdou. V neposlední řadě syrovou nebo nedostatečně uzenou drůbeží, klobásami, párky, lahůdkami a syrovými nebo uzenými rybami a plody moře. *L. monocytogenes* byla také nalezena v syrovém krmivu pro domácí zvířata. Právě výživa zvířat kontaminovaným krmivem je spojena se šířením *L. monocytogenes* (FDA, US Food and Drug administration 2019; Hunt et al. 2012; Vilar et al. 2007).

Souvislost mezi spotřebou siláže a rozvojem listeriózy byla poprvé zaznamenána v roce 1922, kdy veterináři varovali před nemocí připomínající listeriózu známou na Islandu jako „votheysveiki“ neboli silážní nemoc. Tento případ byl zaznamenán po krmení mléčného skotu, ovcí a koz nesprávně fermentovanou siláží s pH vyšším než 4 (Ryser et al. 1997). V roce 1960 Gray prokázal epidemiologický vztah izolováním stejného sérotypu *Listeria* z mozku nakažené ovce a z ovesné siláže, jíž bylo stádo krmeno.

L. monocytogenes představuje významný problém v potravinářském průmyslu, a to hlavně díky její schopnosti tvořit biofilm, rezistenci vůči dezinfekčním prostředkům a antibiotikům. *L. monocytogenes* se nachází na površích v potravinářském průmyslu, zejména v chladírenských provozech. V potravinářském průmyslu nejčastěji *L. monocytogenes* přetrvává měsíce nebo dokonce roky na podlahách, strojích, výlevkách, chladících zařízeních

a v kanalizaci potravinářského průmyslu. Hlavní zdroj kontaminace potravin v průmyslových výrobnách je nedostatečné dodržení následného technologického zpracování potravin a nedodržení hygienických zásad (např. bakteriální přenos z rukou nebo rukavic pracovníka a pracovních ploch) (Rodríguez-López et al. 2018). I když jsou běžně čištěny a dezinfikovány, po kontaktu s potravinou může dojít ke křížové kontaminaci (Carpentier & Cerf 2011). Dosud existuje málo poznatků o tvorbě biofilmu a o mechanismu rezistence této bakterie na antibakteriální prostředky. Kontrola *L. monocytogenes* v potravinářském průmyslu je výzvou, která vyžaduje důkladné čištění a uplatňování sanitačních postupů, aby byl tento patogen vyloučen z potravinářského prostředí a aby byla zajištěna bezpečnost potravin (Camargo et al. 2017). Na Obrázku 3 je vyobrazen koloběh a faktory ovlivňující přenos *Listeria monocytogenes* v životním prostředí a potravinovém řetězci.



Obrázek 3: Koloběh a faktory ovlivňující přenos *Listeria monocytogenes* v životním prostředí a potravinovém řetězci (upraveno dle NicAogáin & O'Byrne 2016).

3.2.4 Virulence

L. monocytogenes je oportunitní intercelulární patogen, který se po vstupu do organismu proniká do některých druhů buněk. Mechanismus průniku je poměrně složitý a spočívá v adhezi na buňku a následné iniciaci procesu fagocytózy buňky. Fagocytózu provádějí kromě makrofágů i buňky, které obvykle nefagocytují, jako např. hepatocyty, epitelie či některé buňky centrální nervové soustavy (Jilich & Machal 2008). Pro vstup do nefagocytujících buněk je nezbytný Internalin A a Internalin B. Jedná se o speciální proteiny, které umožňují penetraci *L. monocytogenes* do nefagocytárních buněk. Internalin A se váže s E-kadherinem a stimuluje internalizaci, zatím co Internalin B se váže s Met receptory tyrokinás (Doyle 2001; Portnoy et al. 2002). Poté co je buňka pohlcena makrofágy následují dva různé děje. Internalizované bakterie jsou buď usmrceny nebo uniknout z fagocytické vakuoly a dále se množí. Vyskytují se i bakteriální buňky, kterým se uniknout z vakuoly nepodaří, ale mohou přežít v buňkách tkání. Takové formy již dále nerostou. Únik z vakuoly je umožněn pórtvorným proteinem listeriolysinem O (LLO), který těmto formám chybí. Listeriolysin tvoří v membráně fagosomu póry, aniž by poškodil nebo zabil hostitelskou buňku. Kromě LLO přispívají k úniku dvě fosfolipázy C (PLC), fosfatidylinositol specifická PLC a fosfatidylcholin preferující PLC. Ty to dvě sloučeniny jsou syntetizovány jako proenzymy metaloproteázy, která je potřebná pro budoucí rozrušení fagosomu v nové buňce viz. níže. Bakterie uniklé z fagosomu se následně množí v cytoplasmě hostitelské buňky. Po pomnožení v buňce, se bakterie přemísťují k cytoplazmatické membráně a připravují se na únik. Tuto úlohu zprostředkuje protein ActA, který stimuluje jejich pohyb. Protein polymerizuje buněčný aktin a umožňuje pohyb k buněčné membráně, vytváří strukturu zvanou listeriopod. Tento mechanismus využije bakterie nejdříve interceluárně (pohyb k membráně) a poté při pohybu z buňky do buňky, vytvoří výčnělek, který se intergruje se sousední buňkou a bakterie je následně pohlcena. Výčnělky chrání *L. monocytogenes* proti expozici protilátkám nebo jiným imunoaktivním složkám. Tento proces se odehrává ve většině případů ve střevě, kde listérie napadají především M-buňky. V nové buňce je bakterie obalena fagosomem se dvěma membránami, k jejich rozložení opět využívá fosfolipázy a metaloproteinázy. Cyklus končí uvolněním do cytosolu, kde se bakterie začne množit a celý proces se opakuje (Blažková a spol. 2005; Jilich & Machal 2008; Low & Donachie 1997; Portnoy et al. 2002).

Virulence *L. monocytogenes* je také ovlivněna vnějšími vlivy jako je pH, teplota a přítomnost železitých iontů (Doyle 2001). Za účelem přizpůsobení se nepříznivým podmínkám prostředí (vysoké nebo nízké pH, teplota, osmotické podmínky) má mnoho bakterií chaperonové proteiny, které pomáhají při správném opětovném složení proteinů nebo sestavování proteinových podjednotek a proteáz. U některých proteinů skupiny Clp (kaseinolytické proteiny), které působí jak jako chaperony, bylo zjištěno, že mají roli v patogenezi *L. monocytogenes*. ClpC-ATPase je stresový protein, který pomáhá při narušení vakuolární membrány a intracelulárního přežití bakterie. ClpC také moduluje expresi ActA proteinu a Internalinu A (Rouquette et al. 1998). Serinová proteáza ClpP je nutná pro růst ve stresových podmínkách a ovlivňuje aktivitu listeriolysinu O (Gaillot et al. 2000). Antigenní struktura je významný faktor pro patogenitu, klasifikaci a identifikaci. Tuto roli zastupuje somatický antigen O. Jedná se o látku lipopolysacharidového charakteru na povrchu vnější membrány buňky, která má za úkol buňku chránit před stresovými podmínkami (Dvořáková 2013). Dalším druhem antigenu je tzv. H antigen, což je antigen flagelární. Podle nich rozlišujeme 5 séro skupin, které jsou rozděleny podle písmen a-e, zatímco u antigenu O jsou rozlišovány čísla 1-4 (Jilich & Machal 2008; Votava 2005). Celkově lze tedy na základě antigenů listerie rozdělit do 13 sérotypů, z nichž všechny jsou schopné vyvolat onemocnění. U *L. monocytogenes* rozeznáváme sérotypy 1.2a, 1.2b, 1.2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4b a 7. V klinických izolátech ale bývají detekovány především sérotypy 1.2 b, 1.2 a, 4 b. Sérotypy 4 c, 4 b, 3 b, 1.2 a, 1.2 b jsou většinou izolovány z potravinářských výrobků bez ohledu na typy potravinových matric, jejich schopnost patogenity nebo zeměpisné oblasti. Sérotyp 4b úzce souvisí s ohnisky listeriózy (Brychta 2010; Shamloo et al. 2019).

3.3 Listeriόza

Listeriόza je onemocnění způsobené bakterií *L. monocytogenes*. Poprvé byla popsána v roce 1926 jako příčina epizootického ohniska infekce morčat a králíků. Toto onemocnění bylo dlouho považováno za zoonózu kontraktovanou orální kontaminací. Během sedmdesátých a osmdesátých let došlo v průmyslových zemích k četným ohniskům této nemoci. V roce 1981 v námořních provinciích v Kanadě byla epidemie důsledkem kontaminovaného salátu coleslaw. Toto ohnisko poprvé prokázalo, že *L. monocytogenes* je rovněž potravinový patogen. Od tohoto incidentu vzrostl zájem vědců a mediků o objasnění

epidemiologie tohoto onemocnění, za účelem ochrany spotřebitele před listeriózou. V roce 1983 bylo potvrzeno, že *L. monocytogenes* je přenášena také potravinami (Dortet et al. 2009; Swaminathan & Gerner-Smidt 2007). *L. monocytogenes* se stala modelovým organismem pro studium bakteriálního nitrobuněčného života a mocným nástrojem pro studium základních buněčných biologických procesů (Dortet et al. 2009).

Při experimentech v roce 2017 na myších bylo zjištěno, že střevní mikrobiota může ovlivnit virulenci. Mikrobiota střeva pomáhá proti rozvoji *Listerie* tím, že listérii konkuruje v soutěži o snadno přístupné živiny a také produkcí antimikrobiálně působících metabolitů. Myším, kterým byla podávána antibiotika ještě před cíleným infikováním, byla prokázána snížená schopnost eliminovat *L. monocytogenes* již ve střevě. Imunokompetentní lidé nebo zvířata mohou tolerovat *L. monocytogenes* bez rozvoje systémového onemocnění. Tyto jedinci mohou trpět gastroenteritidou a následně dojde k přirozenému vyloučení bakterie ze střeva. Některé studie uvádějí, že až 10 % lidské populace hostí *L. monocytogenes* v gastrointestinálním traktu. U zvířat to může být až 50 % (Becattini et al. 2017; Nightingale et al. 2004; Kumar & Pathak 2018).

Doba inkubace je různá, někdy se symptomy mohou objevit za 20-30 hodin po požití kontaminované potravy, ale také to mohou být týdny (obvykle 1-2) nebo měsíce (až 3). U některých jedinců nemusí být imunologicky adekvátní odpověď. V těchto případech dochází k přenosu listerie hematogenní nebo lymfatickou cestou do jater, kde se dále množí. Listerie vykazují afinitu k buňkám centrální nervové soustavy, placentálních a fetálních tkáních. U těchto tkání může dojít k jejich poškození (Jilich & Machal 2008; WHO 2018).

3.3.1 Průběh onemocnění u lidí

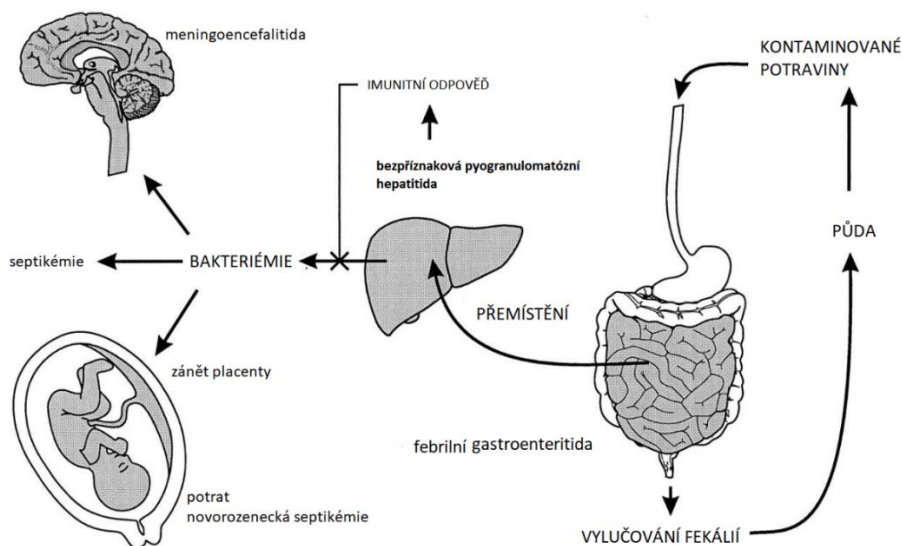
Existují dva hlavní typy listeriózy: neinvazivní a systémová invazivní forma. Nejčastěji se vyskytuje neinvazivní listerióza (febrilní listeriální gastroenteritida). Je to mírná forma onemocnění postihující hlavně jinak zdravé jedince a nevyžaduje antimikrobiální léčbu. Mezi příznaky patří průjem, horečka, bolesti hlavy a myalgie (bolest svalů). Byly rozpoznány také drobné kožní infekce, zejména postihující zemědělce nebo veterináře po zpracování hovězího masa.

Invazivní listerióza je závažnější forma onemocnění, která postihuje zejména těhotné ženy, novorozence, dospělé ve věku 65 a více let, a lidé s oslabeným imunitním systémem. Mezi příznaky patří horečka, myalgie (bolest svalů), septikémie, meningitida nebo vzácněji

rhomboencefalitida (infekce mozkového kmene). U těhotných žen může vést ke spontánnímu potratu, úmrtí plodu nebo infekci novorozence. U novorozenců narozených matkám s listeriózou se vyvíjí novorozenecká listerióza, klasifikovaná jako časná (tj. vyskytující se v prvních sedmi dnech) nebo pozdní infekce. U některých novorozenců se onemocnění projevuje jako granulomatózní infantiseptica způsobující mikroabscesy a granulomy - zejména v játrech, slezině a plicích) (Low & Donachie 1997; Seeliger & Finger 1983; Schuchat et al. 1991; McLauchlin & Low 1994; World Health Organisation 2018).

Listerióza je obvykle velmi závažné onemocnění, ve skutečnosti jedna z nejsmrtelnějších bakteriálních infekcí, která je v současnosti známa. Průměrná úmrtnost u lidí se uvádí 20 až 30 % a vyšší navzdory včasné léčbě antibiotiky (Vázquez-Boland et al. 2001).

Nejběžnějším zdrojem nákazy jsou potraviny. Pro přenos bakterie do organismu hostitele je nejprve zapotřebí proniknutí bakteriální buňky přes membránu střeva. Množení pak může nastat v různých typech buněk (viz kapitola 3.3). Nazokomiální infekce a šíření mezi lidmi jsou evidovány, ale jsou neobvyklé. Přímý kontakt se zvířaty zřejmě představuje relativně malé riziko jiné než pro členy vnímavých skupin a Světová zdravotnická organizace uvádí, že zvířata nejsou přímý zdroj lidské infekce (WHO Working group 1988). Na Obrázku 4 je popsána patofyziologie přenosu infekce z kontaminovaných potravin.



Obrázek 4: Schematické znázornění patofyziologie listeriózy (Vázquez-Boland et al. 2001).

3.3.1.1 Léčba

Léčba antibiotiky je nutná při závažných příznacích, jako je meningitida, bakterémie, infekční endokarditida nebo mozkový absces. Nicméně i přes dobrou citlivost antibiotik je účinek limitován, protože žádný z přípravků nepůsobí na listérie baktericidně. K léčbě listeriózy u dospělých osob, se používá ampicilin, v závažných případech v kombinaci s gentamycinem. Další účinná antibiotika jsou trimethoprim-sulfamethoxazol, ciprofloxacin, linezolid, kotrimoxazol, chloramfenikol. Při infekci během těhotenství, je snaha okamžitým podáním antibiotik zabránit infekci plodu nebo novorozence aplikací vankomycinu nebo erytromycinu. Léčba dětí s hnisavou meningitidou ve věku do 2 měsíců je prováděna antibiotiky cefotaximem v kombinaci s ampicilinem. Listérie mají přirozenou rezistenci vůči druhům léčiv s účinnou složkou jako je kyselina nalidixová, fosfomycin a cefalosporin (Hof 2003; Kosina a spol. 2007; WHO 2018; Bennet 1997).

Zvýšená rezistence bakterií na antibiotika je celosvětovým problémem. Zvýšení rezistence této bakterie na antibiotika jsou v souladu s obecným celosvětovým vzorcem. Mnoho patogenů vyvíjí rezistenci na nejčastěji používaná antibiotika a stále častěji se objevují zprávy o patogenech, které jsou rezistentní vůči téměř všem dostupným antibiotikům (Walsh et al. 2001).

3.3.1.2 Incidence a prevalence

Všeobecně má listerióza nízkou míru výskytu a je hlášena téměř výhradně v průmyslových zemích. Údaje z Asie, Afriky a Jižní Ameriky nejsou dostatečné pro jejich objektivní vyhodnocení, nicméně jsou evidovány lokální epidemie. Výskyt listeriózy se v různých zemích liší od 0,1 do 11,3 případů na milion obyvatel. V USA se odhaduje, že se každý rok nakazí 1 600 lidí a zemře asi 260. V Evropě je výskyt této choroby přibližně tři případy na milion obyvatel, ale v zemích jako je Německo, Estonsko, Lotyšsko, Litva, Itálie, Nizozemsko a Spojené království byla zaznamenána zvýšená míra výskytu. V Rakousku se v letech 1997 až 2007 výskyt listeriózy zdvojnásobil. Nejčastěji jsou hlášeny případy, jejichž průběh je život ohrožující, jedná-li se o jeden z klinických syndromů: mateřsko-fetální listerióza, novorozenecká listerióza, infekce krevního řečiště nebo meningoencefalitida. Případy listeriózy jsou nejčastěji spojeny se sérotypy *L. monocytogenes* 1 / 2a, 1 / 2b a 4b. (CDC Center for Disease Control and Prevention 2020; Meštovič 2018; Swaminathan & Gerner-Smidt 2007; WHO 2015).

Ačkoliv je listerióza poměrně vzácné onemocnění, je asi 20krát častější u těhotných žen než u běžné populace. Těhotné ženy představují 27 % z celkového počtu infikovaných touto bakterií. Těhotným ženám je doporučováno snížit riziko infekce dodržováním doporučených dietních pokynů (Janakiraman 2008).

Nejnovější epidemie byla zjištěna v dubnu 2020, kdy bylo potvrzeno 6 případů listeriózy v Austrálii v období mezi 10/2017 a 4/2020. Případy byly spojeny s vypuknutím listeriózy v USA, které souvisely s konzumací hub enoki (*Flammulina velutipes*) dovážené z Korejské republiky. Kontaminované houby se dostaly také do 8 států po celém světě. Celkově se nakazilo 47 osob (WHO 2020).

Onemocnění nijak nesouvisí s geografíí, pohlavím, etnicitou, socioekonomickými faktory nebo infekčními sérotypy (Allerberger & Wagner 2010).

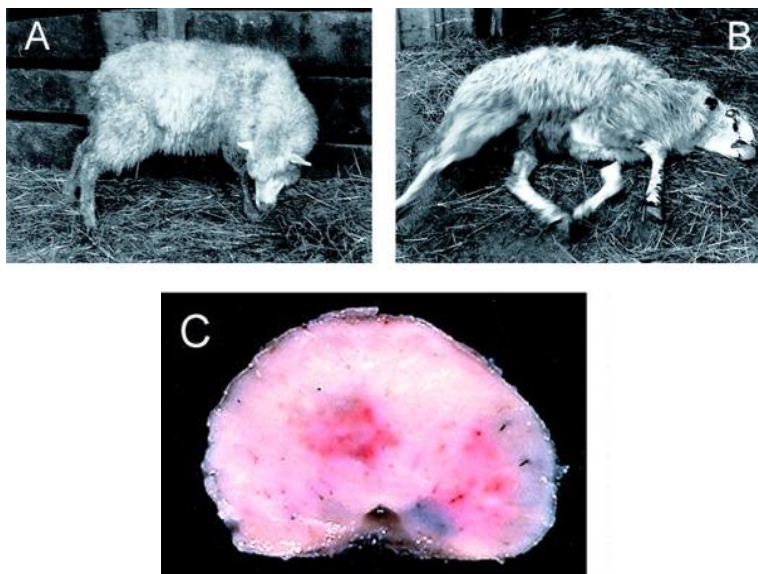
3.3.2 Průběh onemocnění u zvířat

Listeria může infikovat mnoho zvířecích druhů, včetně ovcí, koz, skotu, buvolů, koní, prasat, velbloudů, psů, hlodavců, divokých zvířat a ptáků. Nejčastěji jsou však postiženi přežvýkavci, zejména ovce. *L. monocytogenes* byla izolována z masa nebo mléka koz, ovcí, skotu, prasete, kuřat, křepelky, koroptve, pštrosa a buvolů (Dhama et al. 2015). Skot je často asymptomatickým nosičem *L. monocytogenes*, což představuje problém pro mlékárenský průmysl. Kdy se konzumací kontaminovaného krmiva *L. monocytogenes* dostává do trávicího traktu a skrze krevní řečiště do mléka (McDonald et al. 1991).

U zvířat způsobují listeriózu dva druhy *Listeria*, a to *L. monocytogenes* a *L. ivanovii*. Každý druh infikuje různé hostitele. *L. monocytogenes* infikuje lidi a přežvýkavce, zatímco u *L. ivanovii* se předpokládá, že je patogenní pouze pro přežvýkavce (Dhama et al. 2015).

U zvířat jsou dokumentovány tři různé formy listeriózy, a to septikemická encefalitická a potratová forma. Listeriíza způsobuje u zvířat encefalitidu, potraty, mastitidu, a endometriózu. Tato onemocnění se vyskytují především u přežvýkavců (Malik et al. 2002; Dhama et al. 2015). U přežvýkavců jsou také časté septikémie, páteřní myelitidy, uveitidy a gastroenteritidy (Headley et al. 2013). Encefalitická forma je známá jako „kruhová nemoc“, kvůli pohybu zvířete v kruzích jedním směrem. To je způsobeno lokalizací infekce, která se nachází v zadním mozku a vede k ataxii u postižených zvířat před smrtí. Toto onemocnění je sporadické u drůbeže, obvykle se projevuje jako septikémie nebo lokalizovaná encefalitida. Septikemické onemocnění se také občas vyskytuje u koní a prasat (Dhama et al. 2015;

Schlech III et al. 1983; Seeliger 1988). Na Obrázku 5 jsou zobrazeny některé z projevů listeriózy u zvířat.



Obrázek 5: Klinické a patologické charakteristiky listeriózy u zvířat (Vázquez-Boland et al. 2001).

(A) Neuromeningální listerióza u ovcí, (B) V dalším kroku infekčního procesu leží zvířata na zemi se zjevnými příznaky nekoordinace a paralýzy kranálního nervu (strabismus, slinění atd.), (C) Část prodloužené míchy (medulla oblongata) ovce s listeriální rombencefalitidou, vykazující jasné zánětlivé léze v mozkové tkáni.

3.3.2.1 Léčba

Efektivnost léčby ovcí s encefalitidou způsobenou *L. monocytogenes* je obecně nízká a léčebný režim ampicilinu nebo amoxicilinu s aminoglykosidy se doporučuje při vysokých dávkách antibiotik a prodloužených léčebných režimech. Infikovaná zvířata by měla být izolována od ostatních zvířat. V současné době se pravděpodobně zotaví pouze ty případy, které zůstávají ambulantní. Zotavení závisí na včasné a agresivní léčbě antibiotiky. Pokud jsou příznaky encefalitidy závažné, k smrti obvykle dochází i přes léčbu. Jiné formy listeriózy jsou léčeny pouze příležitostně, protože většina dalších příznaků listeriózy jsou klinicky rozpoznány jen zřídka (Low & Donachie 1997; Scott 1993).

3.3.2.2 Přenos a incidence

Existuje vysoký výskyt střevních přenašečů. Zdrojem infekce jsou půda a trávicí trakt asymptomatických zvířat. Infikovaná zvířata mají *L. monocytogenes* ve stolici, mléce a děložních výtocích. Nachází se také u potracených plodů a příležitostně u výtoků z nosu a

moči symptomatických zvířat. Většina infekcí u zvířat je po požití potravy, ale *Listeria* se může šířit také inhalací nebo přímým kontaktem. Byl zaznamenán také pohlavní přenos (Wesley 1999).

Listerióza je primárně zimním-jarním onemocněním výkrmu nebo chovaných přežvýkavců. Méně kyselé pH zkažené siláže zvyšuje množení *L monocytogenes*. Ohniska se mohou objevit asi 10 dní po krmení kontaminované siláže. Odstranění nebo změna siláže v přidělu často zastaví šíření listeriózy (Wesley et al. 2008).

3.1 Objemná krmiva

Krmiva pro dobytek se obecně klasifikují do dvou skupin: jaderná krmiva a objemná krmiva, včetně trávy, siláže, kořenových plodin a slámy. Jaderná krmiva jsou koncentráty s vysokou energetickou hodnotou, včetně tuku, obilných zrn a jejich vedlejších produktů (ječmen, kukuřice, oves, žito, pšenice), oleje nebo moučky s vysokým obsahem bílkovin (sója, řepka, řepka), bavlníková semena, arašídy (podzemnice olejná) a vedlejší produkty ze zpracování cukrové řepy, cukrové třtiny, zvířat a ryb (Huffman 1939; Jørgensen et al. 2007).

Objemná krmiva jsou podle Morrisona (1936) krmiva s vysokým obsahem vlákniny a tedy s nízkým obsahem celkových stravitelných živin. Národní rada pro výzkum klasifikuje objemná krmiva jako krmiva s minimálním obsahem surové vlákniny 18 % a maximálním obsahem celkových stravitelných živin 70 %. Dále se rozdělují na zelená neboli čerstvá objemná krmiva (zelená píče); seno, které má obsah suché hmoty 80 % a více; siláže a senáže, které mají obsah suché hmoty 30-50 % a více; sláma obsahující většinou zbytky rostliny po sklizni zrn (Burton 2014). Čermák et al. (2000) rozdělují objemná krmiva na suchá s obsahem sušiny nad 80 % (sláma, seno); šťavnatá, které mají obsah sušiny 20 – 50 % (zelená píče, siláže, okopaniny) a vodnatá, které mají obsah sušiny 15 %. Tato krmiva poskytují zvířatům mnoho důležitých živin, minerálních látek a vitamínů, ale slouží také pro udržení a optimalizaci účinnosti trávicího traktu některých druhů zvířat. Bachor přežvýkavců nejlépe funguje, když zvířata mají ve stravě „dlouhou, hrubou vlákninu“, která stimuluje trávení a funkci žaludku tím, že se tento hrubý materiál tře o stěny bachoru. Toto tření stimuluje svaly ve stěně bachoru, aby se stahovaly a rozšiřovaly, což způsobuje promíchání potravy v bachoru a potrava se stává dostupnější pro působení mikroorganismů. Čím více se

mikroorganismy dostanou do styku s potravou, tím kompletněji ji mohou rozložit (Parsons & Stanton 2000).

Objemná krmiva musí být nejprve přežvýkána. Při žvýkání potravy se v dutině ústní mísí potrava se slinami. Sliny přežvýkavců obsahují pufry, které pomáhají udržovat kyselost v batoru. Mikroorganismy trávící vlákninu v batoru fungují nejlépe v neutrálním až mírně kyselém prostředí. Cukry, škroby a další rychlejší metabolizované částice v krmivu mají tendenci zvyšovat kyselost batoru. Žvýkání vláknitého materiálu tedy pomáhá udržovat kyselost v batoru v rozsahu, který prospívá mikrobům trávícím vlákninu (Jarrige 1989; Pressoir et al. 2010).

Objemná krmiva jsou nezbytnou součástí krmiva pro přežvýkavce. Představují zhruba 90 % všech krmiv zkrmovaných přežvýkavcům. Kromě pastvinové trávy se skotu zkrmují různá další krmiva, ať už silážovaná nebo nesilážovaná, a to buď samostatně nebo jako součást celkové smíšené dávky. Kvalita krmných surovin je do značné míry určována během kultivace, složení ovlivňují: povětrnostní podmínky, hospodaření s půdou a doba sklizně. U sena a slámy mohou představovat riziko mykotoxiny produkované plísněmi a pro seno je, zvláště důležité botanické složení. Seno z pastvy může také obsahovat různé druhy rostlin, které mohou být pro dobytek jedovaté (Dryden 2008). Kvalita objemných krmiv je závislá také na jejich stravitelnosti (Jarrige 1989).

3.1.1 Konzervovaná objemná krmiva

Objemná krmiva podléhají změnám ihned po posečení, během zpracování a skladování. V každé fázi mají tyto procesy potenciální vliv na výživovou hodnotu krmiva a na hmotnostní ztráty. Objemná krmiva jsou zpracovávána hlavně za účelem zvýšení udržitelnosti, energetické hodnoty a stravitelnosti pro zvíře (Da Silva & Santos 2016). Většina postupů a procesů zpracování je mechanická, ale některé například tepelné zpracování je spíše fyzikálního charakteru. Další zpracování jako například delignifikace hydroxidem sodným, je chemická metoda. Působení bakterií mléčného kvašení je mikrobiologická metoda (Greenhalgh & Wainman 1972). Mezi nejpoužívanější způsoby konzervace objemných krmiv řadíme konzervaci silážováním a sušením. Ke stabilizaci dochází primárně kyselinou mléčnou, která je produktem mléčného kvašení sacharidové složky (Doležal a kol. 2012; Mašek & Novák 2011). Další konzervační technologií je horkovzdušné sušení dnes již málo používané. Od tohoto způsobu konzervace se upustilo pro vysokou energetickou

náročnost a ztráty. Uskutečňuje se omezeně v provozech, které takto vzniklý produkt používají při výrobě krmných směsí, nebo exportují do zahraničí nebo v malovýrobnách. Tato metoda je závislá na povětrnostních podmínkách (Mašek & Novák 2011). V posledních 30 letech došlo k vývoji nových silážních aditiv, které se používají k regulaci fermentačního procesu. (Hancock et al. 2017).

Jednou z hojně využívaných metod konzervace je fermentace. Jedná se o více než 3000 let starou techniku přirozeného způsobu konzervování. Již staří Římané a Egypťané skladovali píce v kretech. Kirstein v roce 1963 publikoval, že v ruinách Kartága byla nalezena sila, která ukázala že se silážovalo již 1200 let př. n.l. To ukazuje, že tento způsob konzervace krmiv sahá až ke kořenům lidské civilizace. K většímu rozmachu došlo až v druhé polovině 20. století (Tyrolová & Výborná 2010).

3.1.2 Siláž a senáž

Hlavním principem silážování je fermentace ve vodě rozpustných sacharidů za anaerobních podmínek epifitními bakteriemi mléčného kvašení, které produkují kyselinu mléčnou. Průběh fermentace je ovlivněn mnoha faktory, jako je dostupnost zkvasitelných sacharidů; bakteriální populace, která je přítomna v krmivu na začátku procesu; množství sušiny; aj. Nejčastějšími plodinami využívanými pro silážování je kukuřice, čirok, vojtěška a různé druhy trav. Po mnoho let je problematice silážování věnována značná pozornost a dochází ke zdokonalování procesu a technologií silážování za účelem zefektivnění produkce a snížení ztrát (Da Silva & Santos 2016).

Senáž je druh siláže s rozdílným obsahem sušiny. Neexistuje přesná hranice množství sušiny, která by rozlišovala senáž od siláže. Většina zdrojů, ale hovoří o senáži při množství sušiny vyšší než 50 %. Některé zdroje definují senáž jakožto siláž s obsahem sušiny vyšší než 35 %. Senáž se vyrábí tak, že se posečená píce nechá schnout déle než při výrobě siláže (Müller 2005; Otrubová 2019; Zeman a kol. 2006). Při výrobě senáže může docházet ke zhoršení průběhu fermentace a to v důsledku nedostatečného vytěsnění vzduchu (Otrubová 2019). Senáž má nižší obsah fermentačních produktů (včetně kyseliny mléčné) a vyšší pH ve srovnání se siláží s nižším obsahem sušiny. Z toho plyne, že v senáži má spíše konzervační účinek snížený obsah kyslíku v kombinaci nízkým pH. Nižší obsah fermentačních produktů v senáži může po otevření balíků snížit tzv. aerobní stabilitu a vést k rychlejšímu kažení oproti silážím s nižším pH. Pojmeme aerobní stabilitou se rozumí, že nastala stabilní fáze

fermentačního procesu. Je to doba od ukončení fermentační fáze konzervovaného krmiva do doby, kdy je silážní prostor otevřen a siláž vystavena povětrnostním podmínkám. Délka stabilní fáze se liší. Mezi faktory, které ji ovlivňují patří např. kvalita fermentace nebo roční období. Kromě toho může být aerobní stabilita ovlivněna datem sklizně píce. Příliš porézní pletivo může vést k nízké hustotě senáže a větší výměně plynu s okolním vzduchem, což umožňuje růst kvasinek (Lindberg 2013; Rad, 2009).

3.1.2.1 Výroba siláže

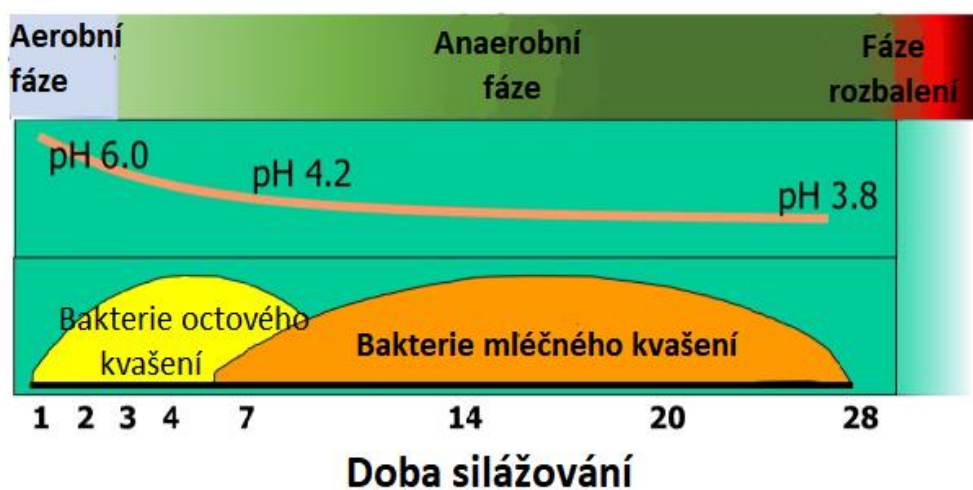
Siláž se vyrábí balením zelené píce do vzduchotěsných skladovacích nádob. Anaerobní podmínky umožňují pomnožení bakterií mléčného kvašení a produkci kyseliny octové a mléčné. Skladování může být ve vzpřímených silových věžích nebo v silážových jámách. Počáteční koncentrace vlhkosti píce by měla být mezi 50 a 70 %, v závislosti na typu siláže. Nižší úroveň vlhkosti může způsobit potíže během balení píce a vyloučení vzduchu. Příliš vysoký obsah vlhkosti způsobuje ztráty živin prosakováním a má za následek vznik nadměrně kyselé, nepoživatelné siláže. Nutriční hodnota siláže závisí na typu silážovaného krmiva a na účinnosti fermentace (Holden & Loosli 2018).

Proces silážování může být rozdělen do čtyř fází (kroků) (Merry & Davies 1999; Weinberg & Muck 1996), na Obrázku 6 jsou zobrazeny fáze silážování, hodnoty pH a mikroorganismy, které převládají v dané fázi:

- 1) Aerobní fáze: V této fázi, která trvá obvykle jen několik hodin, se atmosférický kyslík přítomný mezi rostlinnými částmi snižuje v důsledku dýchání rostlinného materiálu a aerobních a fakultativně aerobních mikroorganismů, jako jsou kvasinky a enterobakterie. Kromě toho jsou v této fázi aktivní rostlinné enzymy, jako jsou proteázy a karbohydrázy, za předpokladu, že hodnota pH je stále v normálním rozmezí pro čerstvou píci (pH 6,5 až 6,0).
- 2) Fermentační fáze: Tato fáze začíná, když je v siláži vyčerpán kyslík. Pokračuje v závislosti na vlastnostech silážované pícniny a silážovacích podmínkách po dobu několika dnů až týdnů. Pokud fermentace úspěšně pokračuje, bakterie mléčného kvašení se vyvíjí a stávají se převládající bakteriální populací. Blíže viz. kapitola Mléčné kvašení. V důsledku produkce mléčných a jiných kyselin se pH snižuje na 3,8 až 5,0. Výsledné pH by mělo být nižší než 4,2. Mělo by vzniknout cca 1,7 % kyseliny mléčné, 0,7 % kyseliny octové a množství kyseliny máselné by nemělo překročit 0,3 %

(Wilkinson, 2005). Během mléčného kvašení se uplatňují zejména laktokoky, streptokoky, leukonostokoky, pediokoky, laktobacily (Rada 2009).

- 3) Stabilní fáze: V této fázi, pokud je zabráněno vniknutí vzduchu do sila nebo jámy, dochází k relativně malému množství změn. Množství většiny mikroorganismů druhé fáze pomalu klesá. Některé mikroorganismy odolné vůči kyselinám přežívají toto období v téměř neaktivním stavu; jiné, jako je např. *Clostridium* a *Bacillus*, přežívají ve formě spor. Spory *Clostridium* představují problém po otevření sila, kdy způsobují kažení siláže produkcí kyseliny máselné. Pouze některé proteázy a karbohydrázy tolerantní vůči kyselinám a některé specializované mikroorganismy, jako je *Lactobacillus buchneri*, jsou i nadále aktivní na nízké úrovni.
- 4) Sekundární kvašení: Tato fáze začíná, jakmile je siláž vystavěna vzduchu při otevření sila. Při výkrmu je to nevyhnutelné, ale tato fáze může nastat dříve kvůli poškození krycího materiálu siláže (např. hlodavci nebo ptáky). Proces znehodnocení lze rozdělit do dvou fází. Primární stupeň znehodnocení je zhoršení kvality v důsledku degradace organických kyselin kvasinkami. To způsobí zvýšení pH, a tak je zahájeno druhé stadium kažení, které je spojeno se zvyšující se teplotou a aktivitou kontaminujících mikroorganismů, jako jsou bacily. Tato fáze také zahrnuje aktivitu mnoha dalších (fakultativních) aerobních mikroorganismů, jako jsou plísně a enterobakterie. K aerobnímu znehodnocení dochází téměř ve všech silážích, které jsou otevřeny a vystaveny vzduchu. Míra znehodnocení siláže je vysoce závislá na počtu a aktivitě kontaminujících organismů v siláži (Honig & Woolford 1980; Rada 2009).



Obrázek 6: Zobrazení procesu silážování (fermentace) ve dnech a příslušné hodnoty pH v každé fázi (Hancock et al. 2017).

3.1.2.1.1 Bakterie mléčného kvašení

Kyselina mléčná je silná organická kyselina, která inhibuje rozvoj nežádoucích mikroorganismů, jako jsou hnilobné bakterie. Potlačuje především bakterie máselného kvašení, které tvoří kyselinu máselnou a rozkládají bílkoviny. Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou mikroorganismy, jejichž dominantním primárním metabolitem je právě kyselina mléčná. Pro jejich růst je nezbytný dostatek sacharidů a snížení koncentrace kyslíku. Na základě kvasných procesů dělíme BMK, které se uplatňují při silážování (Doležal a kol. 2012; Rada 2009; Tyrolová & Výborná 2010):

- Homofermentativní bakterie
- Heterofermentativní bakterie

3.1.2.1.1.1 Homofermentativní bakterie

Při tomto kvašení vzniká z glukózy výhradně kyselina mléčná s velmi malou ztrátou sušiny a energie. Zástupci těchto bakterií jsou žádoucí mikrobiotou siláže a jsou součástí silážních inokulantů. Do této skupiny patří např. *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis*, *Pedicoccus acidilactici* (Doležal a kol. 2012; Rada 2009; Tyrolová & Výborná 2010).

3.1.2.1.1.2 Heterofermentativní bakterie

Při kvašení heterofermentativními bakteriemi mléčného kvašení vznikají ze sacharidů kyselina mléčná a octová, oxid uhličitý, ethanol a některé další látky. Zástupci této skupiny jsou v siláži méně žádoucí, vzhledem k nižší produkci kyseliny mléčné a ostatních kyselin. V poslední době je zdůrazňován pozitivní vliv kyseliny octové na aerobní stabilitu siláže, proto se používá jako vhodný inokulant *Lactobacillus buchneri*. Zástupci této skupiny jsou *L. buchneri*, *Lactobacillus brevis* a bakterie rodu *Leuconostoc* (Doležal a kol. 2012; Rada 2009; Tyrolová & Výborná 2010).

3.1.2.1.2 Faktory ovlivňující průběh silážování

Na kvalitu siláže má vliv mnoho silážně-technických faktorů, jako je odrůda, termín zavadnutí, obsah sušiny na začátku silážování (zavadnutí píce), délka řezanky, proces dusání píce; ale největší vliv mají podmínky, které ovlivňují růst bakterií mléčného kvašení, tedy rychlý a těsný uzávěr sila (Otrubová 2019; Zeman a kol. 2006). Na Obrázku 7 jsou zobrazeny faktory, které mají vliv na proces silážování.



Obrázek 7: Faktory ovlivňující průběh silážování (zeman a kol. 2006).

3.1.2.1.2.1 Termín sklizně

Pro konzervaci je nutné sklízet píci mladou, s nízkým obsahem vlákniny a ligninu. U vegetačně starších rostlin začne klesat obsah dusíkatých látek, a naopak roste obsah vlákniny. Vysoký obsah dusíkatých látek ztěžují silážování, proto by sklizeň měla probíhat v optimálním stádiu zralosti. V této fázi dochází ke kvalitativním změnám, které ovlivňují silážování (Doležal 2012; Tyrolová & Výborná 2010).

3.1.2.1.2.2 Délka a kvalita řezanky

Délka řezanky má přímý vliv na kvalitu siláží. Krátká řezanka umožňuje dobré dusání k uvolnění enzymů a živin nezbytných k produkci kyseliny mléčné, která je potřebná k rychlému snížení pH. Správným pořezáním pícní hmoty lze zesílit rozklad rostlinných buněk, který stimuluje průběh fermentačního procesu. Nesprávná délka a struktura řezanky může být v kombinaci s vyšším obsahem sušiny častou příčinou nekvalitního prokvašení a může docházet k vyšším ztrátám živin a energie (Doležal 2012).

3.1.2.1.2.3 Plnění, dusání a zakrývání

Při plnění do žlabu, je důležité žlab vyčistit a zkontrolovat technický stav, aby byla zabezpečena čistota a správný proces kvašení. Ke kontaminaci může dojít ze zbytků staré, nekvalitní siláže, která může negativně ovlivnit fermentaci. Z technologického hlediska je důležité postupovat tak, aby byl žlab co nejrychleji naplněn, důkladně udusán, kvalitně a

vzduchotěsně zakryt fólií. Všechny tyto faktory mají vliv na rychlost vytvoření anaerobních podmínek.

Dusání je technologický krok, při kterém se rozhodne o kvalitě fermentačního procesu. Při tomto procesu dochází k vytěsnění vzduchu a zabránění výměně plynů, které by měly za následek rozvoj sekundárního kvašení a nižší aerobní stabilitu.

Kvalitní a včasné zakrytí silážního prostoru významně ovlivňuje výslednou kvalitu siláže. Způsob zakrytí ovlivní, popřípadě sníží účinek silážních aditiv (Doležal 2012).

3.1.2.1.2.4 Aditiva

Silážní aditiva mají garantovat lepší kvalitu siláží s menším stupněm rozkladu bílkovin, s příznivějším obsahem a poměrem kvasných kyselin. Dále mají snížit ztráty energie vlivem rychlejší acidifikace silážované hmoty a posílit aerobní stabilitu. Podle způsobu působení rozlišujeme silážní aditiva na 3 skupiny: Inhibiční silážní aditiva (chemické konzervační prostředky), stimulační silážní aditiva (inokulanty, mikrobiálně enzymatická aditiva) a silážní aditiva s nutričním efektem (močovina, amoniak a nutriční přísady). Tyto aditiva se liší nejen chemickým složením, účinnou látkou, mechanismem účinku, ale také rychlostí snižování hodnoty pH a tvorbou fermentačních kyselin nebo inhibicí nežádoucí mikroflóry. Mezi nežádoucí mikrobiotu řadíme kvasinky, klostridie, koliformní bakterie a plísně.

Úkolem chemických aditiv je rychlé snížení pH, které inhibuje růst nežádoucích mikroorganismů a tím omezuje tvorbu nežádoucích fermentačních produktů. Chemická aditiva se používají při pozdní sklizni píce, silážování rostlinného materiálu s vyšší vlhkostí a nižším obsahem sacharidů, chemické ochraně vlhkého sena při nedostatečném zavadnutí s obsahem sušiny pod 26-28 %. Konzervační prostředky jsou aplikovány neředěné, zpravidla v tekuté formě nebo i v sypké. Předávkování aditiv má za následek inhibici činností BMK. Mezi chemické konzervační látky patří - organické kyseliny (kyselina mravenčí, kyselina propionová), směsné konzervační prostředky obsahující i soli aromatických kyselin (kyselina benzoová), louh sodný, biochemické preparáty (obsahují složku mikrobiální a chemickou), amoniak a močovina.

Biologická aditiva, též stimulační silážní aditiva mají největší uplatnění při konzervaci sacharidových a zavadlých bílkovinných píce. Mají za úkol stimulovat fermentační proces při silážování za přesně definovaných podmínek. Nelze je aplikovat při nepříznivém počasí a nízkém obsahu sušiny. Využívají se ve formě bakteriálních inokulantů nebo kombinovaně

(bakteriálně-enzymatická). Aplikace je prováděna v tekuté, práškové nebo mikrogranulové formě. Výhodou aditiv je jejich zdravotní nezávadnost a ekologičnost. Z technologického hlediska mají příznivý vliv na zrychlení fermentačního procesu, nižší uvolňování silážních šťáv, snížení ztrát sekundární fermentací, zlepšení chutnosti a stravitelnosti živin. Mezi bakterie obsažené v inokulantech, jsou zejména využívány BMK. Patří sem například *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* (Doležal a kol. 2012; Jambor 2001; Vyskočil a spol. 2011).

3.1.2.1 Druhy siláží

Silážovaná a senážovaná zelená píče je dnes populárním krmivem v Evropě, tak v Severní Americe.

Siláž můžeme dále rozdělit podle mnoha kritérií. Podle použité suroviny je v ČR nejčastější siláž kukuřičná, silážovat lze také travní a pastevní porosty, cukrovarské řízky, luskovinoobilné směsky, Bob obecný (*Vicia faba*), vojtěšku (*Medicago sativa*), jetel (*Trifolium*), Oves setý (*Avena sativa*), Žito seté (*Secale cereale*) a pařené brambory (Doležal 2012; Rada 2009). Mezi nejčastěji pěstované plodiny pro siláž v tropických oblastech patří Kukuřice setá (*Zea mays L.*), čirok (*Sorghum*), proso (*Panicum*) nebo Cukrová třtina (*Saccharum officinarum*). Severských oblastí jsou to kostřava (*Festuca*), Jílek vytrvalý (*Lolium perenne*) a vojtěška (*Medicago sativa*) (Bernardes et al. 2018). Dále se siláže mohou dělit podle obsahu sušiny silážované píče na siláže z čerstvé hmoty – obvyklý obsah sušiny 22-26 %, siláže z částečně zavadlé hmoty – sušina 26-35 % a siláže ze zavadlé píče – sušina 35-50 % (Doležal 2012).

3.1.2.2 Žitná senáž

Žitná píče (*Secale*) je jednou z nejkvalitnějších pícnin. Dobře hnojená žitná píče obsahuje více než 20 % bílkovin a přibližně 14 % sacharidů z celkově stravitelných živin. Hlavním cílem produkce žitné senáže je sklizeň pícnin v době, která poskytuje dobrou výtěžnost a kvalitu. V praxi to znamená, že ke sklizni dochází na jaře ve stadiu tzv. vlajkového listu nebo raného zavádění. Žito lze sklízet i v tzv. těstovité zralosti, ale projeví se to negativně na kvalitě a chutnosti. V době, kdy se začíná objevovat praporcový list by se měla žitná píče sklídit a měla by být balena při vlhkosti 50 až 60 %. Balení by mělo být provedeno co nejdříve po lisování (Mullenix 2014).

Žitná senáž může být skladována a balena buď jednotlivě nebo po více kusech v jednom balení. Jednotlivé balení se obvykle provádí strojním zařízením, které otáčí balíkem na otočném stole. Největší výhodou jednotlivého balení senáže je jeho potenciál minimalizovat znehodnocení a ztráty (Bagg 2013; Mullenix 2014).

3.1.2.3 Vojtěšková siláž

Jako pícnina má vojtěška (*Medicago sativa*) vysokou chutnost, vysoké množství bílkovin, dobrou zimní odolnost a dobrou odolnost vůči suchu. Vojtěška vyžaduje dobře odvodněné půdy s vysokou úrodností a pH. Silážovaná vojtěška si obvykle zachovává více živin díky sníženým ztrátám listů v porovnání se senem z vojtěšky (Broderick 1985; Nevens & Kuhlman 1936).

V porovnání s ostatními druhy siláže má vysoký obsah proteinu, vápníku, fosforu, nižší obsah celkových stravitelných živin. Jelikož vojtěška obsahuje vysoký podíl proteinu, je nutné před zahájením silážováním dodat fermentovatelné sacharidy. Sacharidy jsou většinou dodávány v podobě jiných plodin, jako je například pšenice, kukuřice nebo ječmen. Pro produkci kvalitní vojtěškové senáže je doporučeno nechat vojtěšku zavadnout na 65 % vlhkosti. Pokud vojtěška obsahuje více než 65 % vlhkosti je zapotřebí použít aditiva nebo konzervanty (Hannaway 1981).

3.1.2.4 Kukuřičná siláž

Kukuřice je snadno silážovatelné krmivo. Proces silážování kukuřice je nejvíce ovlivněn silážně-technologickými faktory, jako je stádium zralosti, odrůda, obsah sušiny, aj.) (Zeman a kol. 2006). Siláž z kukuřice (*Zea mays L.*) je hlavním zdrojem pícnin pro přežvýkavce. Jedná se o vysokoenergetické krmivo s nízkým obsahem bílkovin. Používá se jako doplňková energie pro produkci krav a telat, pro chov jalovic a dojnic, často v kombinaci s doplňkovými vysoce proteinovými krmivy, jako je vojtěška (Allen et al. 2003; Zeman a kol. 2006).

Optimální doba sklizně je, když rostlina dosáhne fyziologické zralosti. K tomu obvykle dochází 50-55 dní po vyrašení klasu. (Allen et al. 2003; Ashley 2001).

3.2 **Metody stanovení a identifikace**

Metodika pro stanovení průkazu *L. monocytogenes* je uvedena v ČSN EN ISO 11290-1 (560093) (Besse et al. 2018) a opírá se o klasické kultivační metody. Pro stanovení listérií se doporučuje současné použití 2 různých selektivních médií. První by mělo být vždy médium podle Ottavianiho a Agostiho (ALOA) nebo ALOA podobné médium jako je např. *Listeria* chromogenic agar a druhé doplňující jako PALCAM agar, Rapid´L.mono. Na těchto selektivních médiích *Listeria monocytogene* a *Listeria ivanovii* tvoří pravidelné kulaté, modré až modro/zelené kolonie. Dalším typickým znakem je tzv. halo zóna, ta vzniká aktivitou fosfolipázy, která se podílí na infekčním procesu této bakterie. Následně je nutné provést konfirmace charakteristických kolonií na neselektivním agarovém médiu a potvrzení identity vhodným morfologickými, fyziologickými a biochemickými testy. Vhodnými metodami jsou CAMP test, zkvašování cukrů, průkaz hemolýzy nebo imunochemické metody (ELISA) (Cupáková a kol. 2010).

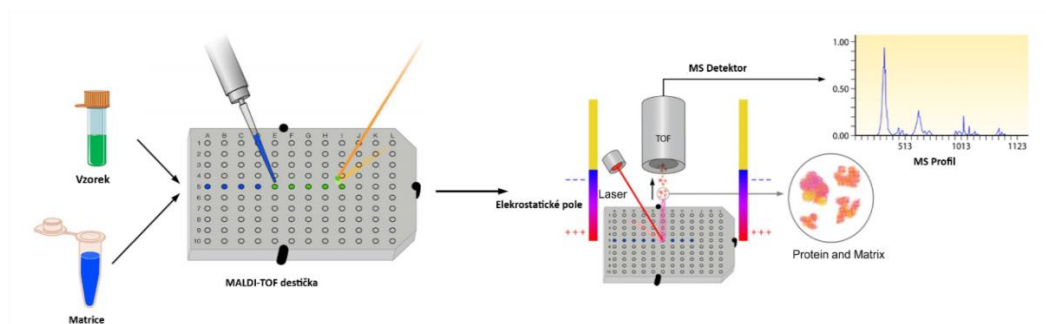
3.2.1 **Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS)**

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF) je metoda hmotnostní spektrometrie s měkkou ionizací, kdy je vzorek ionizován pomocí laseru za přítomnosti matrice (Norková a spol. 2013). Při této ionizaci nedochází ke fragmentaci molekul analytu (Murray 2010). Tato metoda má široké využití v hmotnostní spektrometrii velkých netěkavých biomolekul, konkrétně peptidů, proteinů, oligonukleotidů a oligosacharidů (Zenobi & Knochenmuss 1999). V současné době je tato metoda úspěšně využívána v klinických mikrobiologických laboratořích k rychlé a účinné identifikaci patogenních bakterií a kvasinek (Clark et al. 2013; Stein et al. 2018). Metoda identifikace mikroorganismů, zejména bakterií je založena na analýze ribozomálních proteinů (Sugawara et al. 2016). Mikroorganismy lze určit na rodové, druhové a často i kmenové úrovni, čehož se využívá při monitoringu životního prostředí, zpracování potravin, ochraně veřejného zdraví nebo při klinické diagnostice (Huong a spol. 2014).

Vzorky jsou aplikovány na destičku vyrobenou z inertního kovu (nerezová ocel) a překryty matricí. Po umístění do přístroje jsou vzorky ionizovány laserem. Matrice energii laserového pulsu absorbuje, čímž dochází k její desorpci. Po předání energie skrz matrici ke

vzorku se ionizované molekuly uvolní do plynné fáze. Nabité molekuly analytu jsou poté urychleny elektrickým polem a vstupují do hmotnostního analyzátoru doby letu (TOF), který měří dobu, za kterou ionty proletí trubicí o známe délce. Lehčí ionty letí rychleji, jejich doba letu je kratší a k detektoru dorazí dříve (Clark et al. 2013; Singhal et al. 2015). Bakterie jsou identifikovány na základě jejich typického iontového m/z profilu. Hmotnostní spektra vzorku jsou porovnávána s knihovnou referenčních spekter. Shodu či neshodu program vyhodnocuje pomocí logaritmického číselného skóre v hodnotách 0-3 (Huong a spol. 2014). V Tabulce 1 je znázorněna spolehlivost hodnocení.

Mezi nejčastěji používané matrice patří α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, 2,5-dihydroxybenzoová kyselina, 3,5-dimethoxy-4-hydroxy skořicová kyselina a 2,6-dihydroxyacetofenon (Clark et al. 2013). Na Obrázku 8 je znázorněn proces MALDI-TOF.



Obrázek 8: Proces MALDI-TOF (upraveno dle Clark et al. 2013)

Tabulka 1 : Hodnocení spolehlivosti identifikace

Barva	Rozsah skóre	Popis
	2,300-3,000	Druh byl s vysokou pravděpodobností identifikován
	2,000-2,299	Rod identifikován s jistotou, druh pravděpodobně
	1,700-1,999	Pravděpodobná identifikace rodu
	0,000-1,699	Nespolehlivá identifikace

3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Je metoda rychlého a snadného pomnožení specifického úseku DNA, založena na principu replikace. Úseky DNA, které se mají amplifikovat musí být ohraničeny na začátku a na konci tzv. primery, což jsou krátké oligonukleotidy DNA. Tato sekvence určuje místo, kde

se primery navážou na základě komplementarity bází a ohraničí tak cílovou oblast (McPherson & Moller 2006). Replikace DNA vyžaduje enzym DNA polymerázu, která dokáže začlenit volné nukleotidy ve směru 3' k 5' konci do řetězce a následně syntetizovat nová vlákna DNA. Nejčastěji se používá termostabilní DNA polymeráza bakterie tzv. Tag polymeráza. Tato polymeráza je odolná vůči vysokým teplotám, což je nezbytná vlastnost pro PCR (Chen et al. 2017; Reece et al. 2012).

Celý proces PCR probíhá v zařízení tzv. termocykler, které je zkonstruováno tak, aby dokázalo během několika sekund zvýšit nebo snížit o několik desítek stupňů Celsia. Celý proces probíhá ve třech fázích viz. níže. Výsledkem může být prakticky neomezené množství nových fragmentů, v závislosti na počtu cyklů. Metoda je velice citlivá a dokáže odhalit i jedinou molekulu DNA ve vzorku.

Fáze PCR:

1. Denaturace: Tato fáze probíhá při teplotě 94-95°C. Při této teplotě je DNA denaturována a dochází k rozdělení dvouvláknové DNA na dvě jednovláknové DNA. Výsledkem je předloha pro další krok.
2. Hybridizace: Teplota se sníží na 55-65 °C a dochází k navázání primerů, které nasedají 3'konec komplementárního vlákna a ohraničí požadovaný úsek DNA.
3. Elogance: V této fázi dochází k syntéze nového komplementárního vlákna, při teplotě 68-72 °C za pomoci Tag polymerázy.

Celý tento cyklus je obvykle opakován 30-40krát (Chen et al. 2017; Reece et al 2014).

4 Metodika

V praktické části bakalářské práce byl studován výskyt *Listeria monocytogenes* ve 20 vzorcích siláží a senáží. Seznam testovaných vzorků krmiv je uveden v Tabulce 2.

Vzorky

Tabulka 2: Seznam testovaných vzorků krmiv. U vzorků je uveden druh siláže / senáže, způsob skladování, poloha odběru a označení původu.

Vzorek	Druh vzorku	Skladování	Poloha odběru	Původ
1a	Senáž vojtěška-	na betonu	vrchní vrstva	Okres Příbram
1b	Senáž vojtěška-	na betonu	střed	Okres Příbram
2a	Siláž kukuřičná(celá)	silážní jáma	bok	Okres Příbram
2b	Siláž kukuřičná(celá)	silážní jáma	střed	Okres Příbram
3a	Senáž žito	na zemině	spodní vrstva	Okres Příbram
3b	Senáž žito	na zemině	střední vrstva	Okres Příbram
4a	Senáž vojtěška	silážní jáma	střední vrstva	Okres Příbram
4b	Senáž vojtěška	silážní jáma	bok	Okres Příbram
5a	Siláž kukuřičná	silážní jáma	střed	Okres Příbram
5b	Siláž kukuřičná	silážní jáma	bok	Okres Příbram
6a	Senáž žito	silážní jáma	střed	Okres Příbram
6b	Senáž žito	silážní jáma	bok	Okres Příbram
7a	Siláž Vojtěška	-	-	Výzkumný ústav živočišné výroby
7b	Siláž Vojtěška	-	-	Výzkumný ústav živočišné výroby
8a	Kukuřičná siláž	-	-	Výzkumný ústav živočišné výroby
8a1	Senáž žito	silážní jáma	kraj	Okres Příbram
8b	Senáž žito	silážní jáma	střed	Okres Příbram
9a	Siláž kukuřičná	silážní jáma	bok	Okres Příbram
9b	Siláž kukuřičná	silážní jáma	střed	Okres Příbram
10	Senáž vojtěška	balík s folií	-	Okres Příbram

4.1 Metody

4.1.1 Příprava médií

Pro přípravu primárního pomnožovacího média bylo do 1000 ml odváženo 54,4 gramů Half-Fraser bujónu (Oxoid) a přidán chlorid litného (3 g/l). Bujón byl následně rozvářen, aby došlo k úplnému rozpuštění všech složek média. Následně byl rozdáván po 225 ml do Erlenmayerových baněk a sterilován v tlakovém hrnci po dobu 45 minut. Po vychladnutí na pokojovou teplotu, byl ke směsi přidán suplement UVM. I v množství 1 vialka

na 500 ml média (kyselina nalidixová 10 mg, akriflavin 6 mg, Oxoid), který byl resuspendován v 2 ml fyziologického roztoku.

Příprava navážky Full-Fraser bujónu a rozpuštění probíhala stejně viz. výše. Rozpuštěný bujón byl pipetován v objemu 10 ml do vialek a následně zavíčován. Zkompletované vialky s médiem byly sterilovány v tlakovém hrnci po dobu 45 minut. Do každé vialky byl těsně před použitím přidán suplement UVM II. v množství 0,2 ml (kyselina nalidixová 10 mg/500 ml, akriflavin 12,5 mg/500 ml, Oxoid), který byl resuspendován v 5 ml fyziologického roztoku.

Na přípravu 500 ml Chromogenic listeria agar (Oxoid), bylo odváženo 69 g agaru. Následně byl sterilován v tlakovém hrnci po dobu 45 minut. Po zchlazení média, k němu byly přidány 1 vialka OCLA (ISO) selective supplement (Oxoid) a 1 vialka Brilliance listeria differential supplement (Oxoid). Suplement OCLA (ISO) selective supplement bylo potřeba resuspendovat v 2 ml fyziologického roztoku. V posledním kroku byl připravený agar rozlit do sterilních Petriho misek. Takto připravené agarové plotny byly uchovány při 4 °C.

4.1.2 Průkaz

Vzorky byly homogenizovány v mixéru a následně bylo odváženo 25 g vzorku na laboratorních vahách do Erlenmeyerovy baňky s 225 ml Half-Fraser bujón (HF). Takto zpracovaný vzorek byl umístěn do termostatu a kultivován aerobně při teplotě 30 °C ± 1 °C na 24-26 h.

Po inkubaci bylo odebráno 0,1 ml suspenze sterilní injekční stříkačkou a přeneseno do sterilních penicilínek s Full-Fraser (FF) bujónem. Zároveň byla suspenze z HF přenesena na předem připravenou agarovou plotnu s Chromogenic listeria agarem a rozetřena jednorázovou sterilní kličkou. Média pak byla kultivována při teplotě 37 °C ± 1 °C na 24 ± 2 h. Po 24 h byl zkontrolován nárůst na agaru a ponechán kultivovat dalších 24 h. Zároveň byla odebrána suspenze z Full-Fraser bujónu, opět rozetřena na Chromogenic listeria agar a stejně jako v případě Half-Fraseru kultivována při 37 °C ± 1 °C. Hodnocení nárůstu bylo rovněž prováděno po 24 a 48 hodinách.

V případě pozitivního nárůstu na agaru z HF i FF, byly kolonie popsány a převedeny do vialky s 9 ml neselektivního bujónu z mozkosrdcové infuze (BHI, Oxoid). Odebírány byly vždy dobře izolované kolonie, aby bylo zabráněno případné kontaminaci jiným kmenem. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 24 h. Následně byla mikroskopicky (Nikon Instruments

Europe B. V.) ověřena čistota kultury a čisté kmeny byly identifikovány. Z každé varianty, kde byl pozorovaný nárůst, bylo odebráno celkem 7 kolonií, 4 z nich tvořili charakteristické modro/zelené kolonie, s i bez zóny precipitace. Zbylých 3 kolonií nebylo charakteristické pro *Listeria* spp. Odebrány byly pro ověření selektivity média.

4.1.3 MALDI-TOF MS

Pro identifikaci bakterií pro MALDI-TOF byl zapotřebí 1 ml čerstvě narostlé kultury z BHI, který byl převeden do mikrocentrifugační zkumavky o objemu 1,5-2 ml a následně centrifugován při 14,5 tis. ot. /min po dobu 2 minut. Následně byl supernatant slit a pelet rozpuštěn v 0,5 ml 70% ethanolu. Směs byla znovu odstředěna za stejných podmínek, pro odstranění zbytků kultivačního média. Následně byl znovu slit supernatant, zbytek odstraněn pipetou a pelet ponechán několik minut vyschnout. K peletu bylo přidáno 15 µl 70% kyseliny mravenčí a stejné množství 100% acetonitrilu. Směs byla promíchána a opět centrifugována při 14,5 tis. ot. /min po dobu 2 minut. Vzniklý supernatant byl přenesen pipetou v objemu 1 µl na MALDI destičku a ihned po zaschnutí překryt 1 µl roztoku MALDI matrice (kyselina alfa-kyano-4-hydroxyskořicová). Destička byla vložena do přístroje MALDI-TOF hmotnostního spektrometru (Bruker Daltonik) a analyzována. Identifikace vzorku byla provedena pomocí softwaru FlexControl (verze 3.4). Každý vzorek byl nanesen ve dvou opakováních.

4.1.4 Identifikace pomocí PCR sekvenování genu 16S rRNA

Izoláty, které byly MALDI-TOF MS identifikovány jako *L. monocytogenes* byli následně identifikovány pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA.

4.1.4.1 Příprava lyzátu

Z čerstvě narostlé, mikroskopicky ověřené kultury byl asepticky odebrán 1 ml sterilní injekční stříkačkou a přenesen do mikrocentrifugační zkumavky (1,5-2 ml) a centrifugován při 14,5 tis. ot. /min po dobu 2 minut. Následně byl supernatant slit a k peletu byl přidán lyzační pufr PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems) v objemu 100 µl. V dalším kroku byl vzorek zvortexován a inkubován v termobloku při 100 °C po dobu 10 minut. Vzorek byl ponechán vychladnout na laboratorní teplotu a následně byl odstředěn za stejných podmínek. Supernatant byl pak odebrán v objemu 80 µl do nové eppendorfovi zkumavky. Takto připravený lyzáat byl použit pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR).

4.1.4.2 Amplifikace genu pro 16S rRNA a příprava termocyklieru

Pro amplifikaci 16S rDNA byly použity primery fD1 a rP2 navržené ve studii Wesburg et. al (1991). PCR byla prováděna v celkovém objemu 25 μ l, obsahující 2 μ l buněčného lyzátu, 1 μ l primeru, 12,5 μ l DreamTaq Green PCR Master Mixu (Thermo Fisher Scientific), 9,5 μ l PCR vody (Thermo Fisher Scientific). Amplifikace probíhala v termocyklieru C1000 Touch (Bio-Rad). Podmínky procesu PCR jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Podmínky procesu PCR

Počáteční denaturace	92,0 °C	5 min	35 X
Denaturace	92,0 °C	1 min	
Hybridizace	52,5 °C	90 s	
Elongace	72,0 °C	2 min	
Závěrečná elongace	72,0 °C	5 min	

4.1.4.3 Gelová elektroforéza

Pro přípravu gelu byl smíchán 1 g agarózy (Fementas) se 100 ml 1x TEA pufru (40mM tris(hydroxymethyl)aminomethan, 20mM octová kyselina, 1 mM EDTA; Fermentas). Směs pak byla rozvářena v mikrovlnné troubě po dobu 2-3 minut, do úplného rozpuštění. Následně se nechal gel zchladnout a bylo k němu přidáno 5 μ l barviva GelRed (Biotium). Vzniklý gel byl nalit do předem připravené formy s hřebínkem a nechal se ztuhnout.

Následovalo vyjmutí hřebínků a gel byl přemístěn do elektroforetické vany. Do první a poslední pozice, byl aplikován standard Mass Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) v množství 5 μ l pro ověření velikosti PCR produktu. Následně do zbylých jamek bylo pipetováno 5 μ l vzorku. Vzorky byly separovány za konstantního napětí 130 V, proudu 80 mA a po dobu 60 minut. Následně proběhla vizualizace pomocí UV transluminátoru (Bio-Rad). Vzorky s dostatečně silnými bandy, které odpovídali velikosti, a nebyla u nich zaznamenána formace nespecifických PCR produktů, byly vybrány pro identifikaci sekvenováním.

4.1.4.4 Purifikace vzorků vybraných pro identifikaci sekvenováním

K purifikaci byl použit E.Z.N.A Bacterial DNA Kit (Omega bio-tek). K 20 μ l PCR produktu bylo přidáno 100 μ l CP pufru, směs byla promíchána a napipetována do HiBind DNA kolonky, umístěné v mikrocentrifugační zkumavce. Vzorky byly centrifugovány při 14,5

tis. ot. /min po dobu 60 sekund a vzniklý supernatant slit. Do kolonky bylo následně přidáno 700 µl promývacího pufru a opět proběhla centrifugace za stejných podmínek viz. výše. Promývací proces byl opakován dvakrát. Po odstranění supernatantu, byla kolonka centrifugována další 2 minuty, aby došlo k odstranění zbytkového ethanolu. Následně byla kolonka umístěna do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky. Do kolonky bylo napipetováno 30 µl elučního pufru, kde byl ponechán 2 minuty a následně odstředěn po dobu 1 minuty. Takto připravený filtrát byl připraven pro sekvenování.

4.1.4.5 Sekvenování 16S rDNA

Vzorky byly sekvencovány Sangerovou metodou 16S rDNA externě servisem GATC společnosti Eurofins Genomics. Pět mikrolitrů PCR produktu bylo smícháno s 5 µl primeru o koncentraci 5 µM. Vzorek byl namíchán dvakrát, jednou fD1 a podruhé rP2 primerem. Získaná data byla zpracována v programu Chromas Lite a Bioedit a s použitím programu BLAST porovnána se sekvencemi publikovaných v databázi nukleotidů GenBank (Nation Center for Biotechnology Information, NCBI).

5 Výsledky

Celkem bylo hodnoceno 20 vzorků siláží a senází. Vzorky byly odebrány z různých míst siláží a skladovány různými způsoby. Celkové počty nebylo možné stanovit z důvodu častého přerůstání.

U 12 vzorků (1a, 1b 2b, 3a, 3b, 4a, 5a, 6a, 6b, 7a, 7b, 8a, 9a) nebyl pozorován žádný nárůst. Pozitivní nárůst byl, zaznamenám u 8 vzorků (2a, 4b, 5a, 5b, 8a1, 8b, 9b a 10) po kultivaci z HF. Jen u 2 vzorků (2a a 4b), byl nárůst pozitivní z FF. Tyto vzorky tvořili na agaru charakteristické modro/zelené kolonie, ale bez tzv. halo zóny. Tato zóna značí lecitinovou aktivitu. Zóna precipitace byla u obou vzorků pozorována až po uplynutí 2 týdnů v chladničce.

Ze všech agarových ploten s viditelným nárůstem, byly odebrány kolonie pro identifikaci pomocí MALDI-TOF MS. Míra spolehlivosti identifikace je hodnocena pomocí tzv. skóre. Kdy maximální spolehlivosti je dosažena při hodnotě skóre 3 a hodnota $\geq 2,0$ svědčí o spolehlivé identifikaci mikroorganismů na úrovni rodu. Výsledky identifikace jsou uvedeny v Tabulce 4. Ve vzorcích vyskytovaly bakterie rodu *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* a *Staphylococcus*. *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* a *Styphylococcus* tvořily

charakteristické modro/zelené kolonie, ale bez zóny percipitace. *Lactobacillus* tvořil mléčně bílé až hnědé kolonie. Ze vzorku 2a, bylo odebráno celkem 8 izolátů (HFV1, HFV4, HFV7, FFV3, FFV6, FFV5, FFV8, FFV2), které byly identifikovány s vysokým skórem pravděpodobné identifikace na úrovni druhu, jako *Listeria monocytogenes*.

Tabulka 4 : Seznam testovaných vzorků

Vzorek	Označení	Druh	Skóre		16S rDNA
2a	HFV1	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,21	2,02	<i>Listeria innocua</i>
	HFV4	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,12	2,10	<i>Listeria innocua</i>
	HFV7	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,15	2,06	<i>Listeria innocua</i>
	FFV3	<i>Listeria innocua/ monocytogenes</i>	2,23	2,15	<i>Listeria innocua</i>
	FFV6	<i>Listeria monocytogenes/ innocua</i>	2,33	2,33	<i>Listeria innocua</i>
	FFV5	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,48	2,31	<i>Listeria innocua</i>
	FFV8	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,49	2,44	<i>Listeria innocua</i>
	FFV2	<i>Listeria innocua/monocytogenes</i>	2,39	2,15	<i>Listeria innocua</i>
4b	HFV9	<i>Lysinibacillus fusiformis/ xylanilyticus</i>	2,13	2,02	
5b	HFV10	<i>Bacillus circulans/ spp.</i>	2,00	1,75	
	HFV11	<i>Bacillus circulans/ spp.</i>	1,96	1,70	
8a1	HFV16	<i>Enterococcus mundtii</i>	2,32	2,32	
8b	HFV15	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,48	2,45	
	HFV12	<i>Bacillus spp.</i>	1,98	1,77	
9b	HFV17	<i>Staphylococcus saprophyticus/ saprophyticus</i>	2,09	2,01	
10	HFV18	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,46	2,42	

Pro sekvenování byly vybrány kolonie ze vzorku 2a, 3 kolonie z HF a 5 kolonií z FF. U tohoto vzorku se potvrdila přítomnost rodu *Listeria*, který byl určen s vysokým skórem identifikace jako *L. monocytogenes*. Pomocí sekvenování genu 16S rDNA bylo zjištěno, že se jedná o *Listeria innocua* s lecitinázovou aktivitou. Čímž byla potvrzena spolehlivost identifikace MALDI-TOF na úroveň rodu.

6 Diskuze

Listeria monocytogenes je oportunní všudypřítomný patogen, který je skrze prostředí přenášen do krmiva a infikovaná zvířata představují riziko pro člověka skrze kontaminované produkty živočišného původu (Brychta a spol. 2010; Schmid et al. 2005). *L. monocytogenes* způsobuje onemocnění listeriózu u různých druhů zvířat i u lidí. Za následky

má encefalitidu, potraty, mastitidu, septikémii a v nejvážnějších případech může nastat i smrt (Dortet et al. 2009). Prostředí farem s hospodářskými zvířaty mohou být významným rezervoárem *L. monocytogenes*, která se nachází v půdě, krmivu (především v silážích) a jiných formách prostředí (voda, rostlinné zbytky). To může vést ke kontaminaci syrového mléka a masa. Takto kontaminované suroviny se stávají významným přenašečem *L. monocytogenes* do výrobního prostředí a technologií ve zpracovatelských závodech, což při porušení HCCP může vést v konečném důsledku k infekci člověka (Brychta a spol. 2010).

Skupina *Listeria sensu stricto*, kam patří *L. monocytogenes* obsahuje také *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, a *L. marthii*. *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*. Jedná se o druhy, které jsou schopné kolonizovat trávicí trakt lidí a zvířat, *L. monocytogenes* je schopna napadnout lidi i zvířata, zatímco *L. ivanovii* je patogenní pouze pro zvířata. Oba tyto druhy společně s *L. seeligeri* pojí společná vlastnost v podobě hemolytické aktivity, která je nezbytná pro virulenci. Zbylé druhy tuto vlastnost nemají, a nejsou považovány za patogenní (Schmid et al. 2005).

V žádném z 20 testovaných vzorků nebyla nalezena *L. monocytogenes*. Brychta a spol. (2010) uvádí ve své publikaci, že v balených silážích je hlášen 25 % častější výskyt *L. monocytogenes*, než v silážních jámách a silech, u nichž je incidence 2,5-2,9 %. Výskyt *L. monocytogenes* souvisí s větší plochou krmiva, která má kontakt se vzduchem a siláž má tudíž vyšší pH. Za další rizikové místo lze považovat povrchovou vrstvu do 15 cm v silážní jámě, zde se pH pohybovalo v hodnotách 8,3-8,6. V hlubších vrstvách siláže se *L. monocytogenes* nevyskytovala, pH hlubších vrstev bylo $\leq 4,5$.

Jediný nalezený druh rodu *L. innocua*, vykazovala velmi netypický znak pro svůj druh v podobě lecitinové aktivity. Aktivita se projevila po 2 týdnech při chladírenských teplotách. *L. innocua* je grampozitivní všudypřítomná bakterie, která je považována za nepatogenní druh, vzhledem k absenci hemolytické aktivity (Moura et al. 2019). Vzhledem k tomu že, *L. innocua* je nalézána v podobných prostředí jako *L. monocytogenes* a jsou si blízce příbuzné, tak může být *L. innocua* využívána jako nepatogenní model pro studium *L. monocytogenes*. Toho bylo využito ve studii, kterou provedl Mohan et al. (2019), kdy *L. innocua* sloužila pro studium *L. monocytogenes* v inaktivačních experimentech pro bezpečnost potravin rostlinného původu. Moreno et al. (2014) ve své studii zkoumal *L. innocua* s atypickými znaky jako je lecitinová a hemolytická aktivita. Zjistili, že vykazovala podobné fenotypové vlastnosti jako *L. monocytogenes* při kultivaci na ALOA a nebylo možné je rozlišit. Přitom výrobce půd

v běžné praxi uvádí že *L. innocua* roste na ALOA modro/zelenými koloniemi bez „halo zóny“ (Oxoid). Bližším zkoumáním amplifikace genů, zjistili, že atypické izoláty obsahovaly *inlC*, *plcA* a fragmenty genu *hly*, což jsou geny patogenních druhů listerie a umožňují virulenci. Gen *inlC*, kóduje Internalin C, který umožní penetraci *L. monocytogenes* do nefagocytárních buněk. Gen *plcA* kóduje fosfatidylinositol specifickou fosfolipázu C, která hraje klíčovou roli při úniku patogenu z vakuoly hostitelské buňky a fragment genu *hly*, kóduje LLO (listeriolysin O), jež je schopný narušit stěnu lysozomu (Blažková a spol. 2005; Wei et al. 2005). Díky PCR bylo zjištěno, že se jedná o sérotyp *L. innocua* 6a (Moura et al. 2019). Jedná se tedy o stejný sérotyp, který se v roce 2003 objevil u 62leté ženy, jejíž anamnéza zahrnovala hypertenzi, astma, dnu a osteoartritidu. V době přijetí vykazovala septický šok, extrémní slabost a horečku. Všechny provedené biochemické testy nasvědčovaly, že se jedná o *L. monocytogenes*/*L. innocua* a vzhledem k závažnosti případu, byl vzorek odeslán pro bližší zkoumání do Pasterova institutu. Izolát byl překvapivě identifikován jako *L. innocua* sérovar 6a (Perrin et al. 2003). Stejný sérovar zkoumal Moreno et al. (2014) kdy zkoumaný atypický izolát *L. innocua* se vykazoval slabou hemolýzou a jemnou zónou percipitace na ALOA. Ve studii Moura et al. (2019) je hemolytický kmen *L. innocua* popisován, jako kmen, který je schopný aktivně procházet intestinálním epitelem a následně se šířit do jater a sleziny. Zároveň dodává, že je méně virulentní než *L. monocytogenes*, a expozice člověka *L. innocua* je spíše vzácná. Tato schopnost pravděpodobně pochází od *L. monocytogenes*, s níž je úzce spjata nebo poukazuje na společného předka, ale schopnost virulence *L. innocua* se vytrácí. Hemolytická *L. innocua*, již byla popsána v normě EN ISO 11290/2017 jako potenciální patogen z potravin.

Pro prvotní identifikaci izolátů v této práci byla použita MALDI-TOF MS. Blíže byl zkoumán vzorek 2a. Celkem 8 izolátů z tohoto vzorku bylo identifikováno jako *Listeria monocytogenes* s poměrně vysokým skórem spolehlivosti, nicméně pomocí PCR metody byl tento výsledek vyvrácen. V posledních letech je snaha validace metod. Vyžadována je přesnost identifikace, nízké náklady na spotřební materiál, jednoduchost a hlavně rychlost. Jako vhodná alternativa by mohla být podle Thouvenot et al. (2018) právě MALDI-TOF MS. Ve své publikaci uvádějí, že úspěšnost identifikace *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. fleischmannii*, *L. grayi*, *L. seelingeri*, *L. weihenstephanensis* a *L. welshimeri* byla 100 %. To není v souladu s našimi výsledky. Podobný neúspěch se objevil ve studii Koudelka a spol. (2018), která se zabývala identifikací 227 vzorků *L. monocytogenes* z různých zdrojů pomocí

MALDI-TOF MS. Jejich výsledky s knihovnou Biotyper byly detekovány s 90% úspěšností. Hlavním důvodem pro neúspěšnou identifikaci může být chybná detekce kapsulárních polysacharidů nebo proteinových antigenů (např. antigen H a antigen O), kvůli efektu MALDI-TOF jež potlačuje polysacharidový signál. Bohužel se nepodařilo v literatuře dohledat, zda někdo zkoušel identifikovat pomocí MALDI-TOF MS lecitináza pozitivní kmen *L. innocua* nebo *L. innocua* sérotyp 6a.

Dle normy EN ČSN dle ISO 11290-1/2017 bakterie z rodu *Bacillus*, *Enterococcus* a *Staphylococcus* mohou narůst na selektivním agaru a vytvářet obdobné kolonie jako *L. monocytogenes*. Na použitém agaru Chromogenic Listeria Agra (ISO) (Oxoid) výrobce uvádí, že nárůst bakterií *Enterococcus* by měl být inhibován použitými složkami v médiu, což se nestalo. Chromogenní média hrají důležitou roli při mikrobiologické detekci patogenních mikroorganismů. Výzkum od Vlaemynck et al. (2001) prokázal, že chromogenní agary jako ALOA jsou spolehlivější pro detekci o 4,3 % oproti agarům PALCAM nebo Oxford, ALOA agar měl dokonce méně případů falešné negativy. Dle Stessl et al. (2009) jsou k agaru PALCAM, chromogenní média vhodným doplňkem, ale nedoporučuje se jediná aplikace kvůli specifčnosti chromogenních agarů, zejména u vzorků se složitou mikrobiotou. Jejich závěrem bylo, že konkurenční mikrobiota např. *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. může přerůst nízký počet *L. monocytogenes* a neukázat případnou pozitivitu. Cornu et al. (2002) zjistil, že *L. innocua* je schopna přerůst nebo dokonce inhibovat růst *L. monocytogenes*.

Přítomnost bakterií *Bacillus* spp. hraje důležitou roli v obilných silážích, kdy po otevření zhoršuje její kvalitu. Kukuřičná siláž je nejčastěji kontaminována během sklizně z půdy. *Bacillus* spp. představuje riziko v případě množení spor po otevření siláže. Spory mohou být přeneseny ze znečištěné kůže vemene a následně kontaminovat mléko. Při experimentu Liu et al. (2013) bylo objeveno, že špatně fermentovaná siláž s vyšším obsahem mastných kyselin (kyselina octová, kyselina propionová a kyselina máselná) má lepší aerobní stabilitu, protože toto složení lépe inhibuje rozvoj aerobních bakterií. Nicméně se nesníží dostatečně pH kyselinou mléčnou, aby byl růst inhibován *L. monocytogenes*. Peng et al. (2018) vytvořili také pokus na aerobní stabilitu siláží. Po 14 dnech aerobní expozice byly dominantní bakteriální rody *Bacillus* spp. a *Lysinibacillus* spp. Tyto dva rody mají své patogenní zástupce, ale v silážích se aplikují jako inokulanty, díky své antimikrobiální aktivitě proti *L. monocytogenes* (Gelda et al. 2019).

Primární prevencí proti nákaze listeriózou je produkce kvalitní siláže. Nekvalitní siláže, případně siláže s viditelně poškozeným obalem by neměly být zkrmovány (Fenlon 1985; Queiroz et al. 2018). Účinnou prevencí u lidí je vyhýbání se některým vysoce rizikovým potravinám a správné zacházení s potravinami. Listérie lze spolehlivě usmrtit pasterací a jinými způsoby tepelného ošetření. Není-li však dodržována správná výrobní praxe, může dojít ke kontaminaci i po zpracování. Všeobecná doporučení pro snížení rizika nákazy jsou – důkladné uvaření potravin živočišného původu, omytí syrové zeleniny, izolace syrových živočišných produktů od potravin, které nebudou tepelně upraveny, vyhýbání se konzumaci syrového mléka a potravin z něj vyrobených a rizikové skupiny by se měly vyhnout konzumaci plísňových sýrů a potravin z pultů s lahůdkami (SZPI, 2015).

7 Závěr

Kontaminace *L. monocytogenes* nebyla prokázána v žádném z 20 testovaných vzorků. Jediný nalezený zástupce rodu *Listeria spp.* byla *Listeria innocua* ve vzorku 2a kukuřičné siláže. Dále na živném médiu byl pozitivní nárůst bakterií z rodu *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lysinibacillus*, *Lactobacillus*. Všechny výše jmenované bakterie jsou bakterie epifytní mikrobioty.

Nepřítomnost této bakterie v žádném zkoumaném krmivu, ukazuje na to, že byl dodržen správný postup fermentace a jedná se o kvalitní krmivo. Kvalitní siláž, nepředstavuje zdravotní riziko pro zvířata, a zároveň se snižuje riziko následného přenosu na lidi, skrze potraviny.

8 Zdroje

- Allen, M. S., Coors, J. G., & Roth, G. W. (2003). Corn Silage. *Agronomy Monograph*, **42**, 547–608. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c12>
- Allerberger, F., & Wagner, M. (2010). Listeriosis: A resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, **16**(1), 16–23. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x>
- Ashley, R. O. (2001). Corn maturity and ensiling corn. In *Agronomy Management*. North Dakota State University, Agron.
- Bagg, J. (2013) Double Cropping Fall Rye For Extra Forage. *Field Crop News* <https://fieldcropnews.com/2013/08/double-cropping-fall-rye-for-extra-forage/>
- Becattini, S., Littmann, E. R., Carter, R. A., Kim, S. G., Morjaria, S. M., Ling, L., Gyaltsen, Y., Fontana, E., Taur, Y., Leiner, I. M., & Pamer, E. G. (2017). Commensal microbes provide first line defense against *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of experimental medicine*, **214**(7), 1973–1989. <https://doi.org/10.1084/jem.20170495>
- Bernardes, T., Daniel, J., Adesogan, A., McAllister, T., Drouin, P., Nussio, L., Huhtanen, P., Tremblay, G., Bélanger, G., & Cai, Y. (2018). Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. *Journal of Dairy Science*, **101**(5), 4001–4019. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13703>
- Besse, N., Lombard, B., Guillier, L., François, D., Romero, K., Pierru, S., Rollier, P. (2018). Validation of standard method EN Iso 11290 - Part 1 - detection of *Listeria Monocytogenes* in food. Retrieved April 02, 2021, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160518301272>
- Blažková M., Karamonová L., Fukal., Rauch P. (2005) *Listeria monovytozenes*- nebezpečný patogen a jeho detekce v potravinách. *Chemické listy* **99**, 467-473 http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_07_467-473.pdf
- Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P. A. D., Jacquet, C., & Piffaretti, J. C. (1992). *Listeria ivanovii* subsp. londoniensis subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**(1), 69–73. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-1-69>
- Broderick, G. A. (1985). Alfalfa Silage or Hay Versus Corn Silage as the Sole Forage for Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, **68**(12), 3262–3271. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81235-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81235-2)

- Brychta, J., Bulawová, H., Klimová E. (2010) Výskyt *Listeria monocytogenes* v životním prostředí hospodářských zvířat. *Veterinářství* **1**, 40-42
<https://www.svujihlava.cz/intranet/publikace/40-42-Listeria.pdf>
- Burton, L. D. (2014). *Agriscience: Fundamentals and applications*. In *Cengage Learning*.
- Camargo, A. C., Woodward, J. J., Call, D. R., & Nero, L. A. (2017). *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian scenario. *Foodborne Pathogens and Disease*, **14**(1), 623–636.
- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, **145**(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>
- CDC Center for Disease Control and Prevention. (2020). *Listeria (Listeriosis)*.
<https://www.cdc.gov/listeria/index.html>
- Čermák, B., & et al. (2000). *Základy výživy a krmení hospodářských zvířat*. ZF JU.
- Chen, J., Healey, S., Regan, P., Laksanalamai, P., & Hu, Z. (2017). PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria Ivanovii* in foods and environmental sources. Retrieved April 02, 2021, from <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.03.001>
- Clark, A. E., Kaleta E. J., Arora A., Wolk D. M. (2013). Matrix-Assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **26**:547–603.
- Cornu, M., Kalmokoff, M., & Flandrois, J. P. (2002). Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology*, **73**(2–3), 261–274. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00658-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00658-4)
- Cupáková, Š., Karpíšová R. a Necedová L. (2010). *Mikrobiologie potravin Praktická cvičení II: Metody stanovení mikroorganismů v potravinách*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-126-6
- Da Silva, T., & Santos, E. M. (2016). *Advances in Silage Production and Utilization*. BoD—Books on Demand.
- 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. <https://doi.org/10.1080/01652176.2015.1063023>
- Doležal, P. a kol (2012) Konzervace krmiv a jejich využití ve výživě zvířat. Olomouc: Patr Baštan ISBN 978-80-87091-33-3
- Dortet, L., Veiga-Chacon, E., & Cossart, P. (2009). *Listeria Monocytogenes*. *Encyclopedia of Microbiology*, 182–198. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00217-0>
- Doyle, M. E. (2001). Virulence Characteristics of *Listeria Monocytogenes*. *Food technology*, **42(4)**, 176-178.
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Virulence+Characteristics+of+Listeria+Monocytogenes#3>
- Dryden, G. M. (2008). *Animal nutrition science*. Cadi.
- Dvořáková, I. 2013. Průkaz salmonel v biologickém materiálu [bakalářská práce]. Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové.
- Farber, J. M., Coates, F., & Daley, E. (1992). Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, **15(3)**, 103–105. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1992.tb00737.x>
- FDA US Food and Drug administration. (2019). *Listeria* (Listeriosis). <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/listeria-listeriosis>
- Fenlon, D. R. (1985). Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *Journal of Applied Bacteriology*, **59(6)**, 537–543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1985.tb03357>
- Fsihi, H., Steffen, P., & Cossart, P. (2001). *Listeria*. In *Principles of Bacterial Pathogenesis*. ACADEMIC PRESS. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-304220-0.50017-0>
- Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005). Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Applied Microbiology*, **98(6)**, 1345–1353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02559.x>
- Gaillot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S., & Berche, P. (2000). The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, **35(6)**, 1286–1294. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01773.x>
- Gelda, K. S., Parreira, V. R., Lapointe, G., & Farber, J. M. (2019). Examination of the Culturable Microbiota from Low-Moisture Foods Imported into Canada for Antibacterial Activity against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **83(4)**, 686–691.

<https://doi.org/10.4315/jfp-19-489>

- Gelbíčová, T., Karpíšková, R., Denmerová k. (2011). Mléko a prostředí mlékárenské výroby: zdroje a cesty šíření *Listeria monocytogenes*. *Mlékařské listy* **22**: 12-15.
http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2011/128_s._xii-xv.pdf
- Greenhalgh, J. F. D., & Wainman, F. W. (1972). The nutritive value of processed roughages for fattening cattle and sheep. *Proceedings of the British Society of Animal Production*, **1**, 61–72.
- Gray, M. L. (1960). Isolation of *Listeria monocytogenes* from oat silage. *Science*, **132**(3441), 1767–1768. <https://doi.org/10.1126/science.132.3441.1767>
- Hancock, D., Forage, S., & Specialist, E. (2017). *Understanding and Improving Fermentation in Alfalfa and Grass Baleage*. 14–17.
- Hannaway, D. B. (1981). AlfaAlfa silage. In *Extension agronomist—forages*.
- Headley, S. A., Bodnar, L., Fritzen, J. T. T., Bronkhorst, D. E., Alfieri, A. F., Okano, W., & Alfieri, A. A. (2013). Histopathological and molecular characterization of encephalitic listeriosis in small ruminants from northern Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **44**(3), 889–896. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000300036>
- Hof, H. (2003). Therapeutic options, *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 35: 199–205.
[https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00466-2](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00466-2)
[https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00471-6](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00471-6)
- Holden, P. J., & Loosli, J. K. (2018). Feed. In *Encyclopædia Britannica*. Encyclopædia Britannica, inc.
- Honig, H., & Woolford, M. K. (1980). Changes in silage on exposure to air. In C. Thomas (Ed.), *Forage Conservation in the 80s* (BGS Occasi, pp. 76–87). UK: British Grassland Society.
- Huffman, C. F. (1939). Roughage Quality and Quantity in the Dairy Ration, A Review. *Journal of Dairy Science*, **22**(11), 889–980. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(39\)92948-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(39)92948-6)
- Hunt, K., Drummond, N., Murphy, M., Butler, F., Buckley, J., & Jordan, K. (2012). A case of bovine raw milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Irish veterinary journal*, **65**(1), 13. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-65-13>
- Huong, T. T., M. Komínková, R. Guráň, B. Ruttkay-Nedecký, P. Kopel, L. Trnková, O. Zítka, V. Adam a R. Kizek (2014). Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, **1**(2), 64-66.
http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/pdf/d-

microbial_identification_by_maldi-tof_ms.pdf

- Jambor, V. (2001) Sekundární fermentace konzervovaných krmiv. *Krmivářství* **1**, 30-31
- Janakiraman, V. (2008). Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment, and prevention. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*, **1**(4), 179–185. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19173022><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2621056>
- Jarrige, R. (1989). *Ruminant nutrition: recommended allowances and feed tables*. John Libbey Eurotext.
- Jilich, D., Machal, L. (2008). Listeriόza. *Medicína pro praxi* **5**: 299-300. <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2008/09/03.pdf>
- Jones, D. (1988). The Place of *Listeria* among Gram-positive Bacteria. *Infection*, **16**, 85–88. <https://doi.org/10.1007/BF01639727>
- Jørgensen, G. H. M., Andersen, I. L., & Bøe, K. E. (2007). Feed intake and social interactions in dairy goats-The effects of feeding space and type of roughage. *Applied Animal Behaviour Science*, **107**(3–4), 239–251. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.10.007>
- Kathariou, S. (1991) Nonhemolytic *Listeria monocytogenes* mutants that are also noninvasive for mammalian cells in culture: Evidence for coordinate regulation of virulence. *Infection and Immunity*, **58**(12), 3988-3995. DOI: 10.1128/IAI.58.12.3988-3995.1990
- Kosina P, Krausová J, Krčmářová R. (2007). Listeriové meningitidy. *Interní medicína* **1**, 19–20. <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2007/01/05.pdf>
- Koudelka, Š., Gelbíčová, T., Procházková, M., Karpíšková R. (2018): Lineage and sérotype identification of *Listeria monocytogenes* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Czech J. Food Sci.*, **36**: 452-458. <https://doi.org/10.17221/87/2018-CJFS>
- Kumar, P., & Pathak, S. (2018). *Listeria monocytogenes*: Potent Clinical Hazard. *Listeria Monocytogenes*, <https://doi.org/10.5772/intechopen.76389>
- Lado, B., Yousef A. E. (2007) *Listeria*, Listeriosis and Food Safety, Pages 157-213 in Ryser E.T., Marth E.H, editors Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors (3rd ed., chapter 6). CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Lindberg, J. E. (2013). Feedstuffs for horses. In *Equine Applied and Clinical Nutrition: Health, Welfare and Performance*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3422-0.00017-1>

- Liu, Q., Shao, T., & Zhang, J. (2013). Determination of aerobic deterioration of corn stalk silage caused by aerobic bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, **183**(3–4), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.05.012>
- Logan NA, De Vos P. (2009) *Listeria*. Pages 244-261 in De Vos P., Garitty G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Whitman W. B, editors *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed., Vol. 3: the Firmicutes). Springer, New York.
- Low, J. C., & Donachie, W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Veterinary Journal*, **153**(1), 9–29. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(97\)80005-6](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(97)80005-6)
- Lungu, B., Ricke S. C., Johnson, M. G. (2009) Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe*, 1-2, 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.08.001>
- Magalhães, R., Mena, C., Ferreira, V., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2014). Bacteria: *Listeria monocytogenes*. *Encyclopedia of Food Safety*, **1**, 450–461. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00101-3>
- Malik, S. V. S., Barbuddhe, S. B., & Chaudhari, S. P. (2002). Listeric infections in humans and animals in the Indian subcontinent: A review. *Tropical Animal Health and Production*, **34**(5), 359–381. <https://doi.org/10.1023/A:1020051807594>
- Mašek J., Novák P. (2011) Technologie sklizně a konzervace krmiv. Zemědělec <https://www.zemedelec.cz/technologie-sklizne-a-konzervace-krmiv/>
- McDonald, P., Henderson, A. R., & Heron, S. J. E. (1991). *The Biochemistry of Silage* (2nd ed.). Chalcombe Publications.
- McLauchlin, J., & Low, J. C. (1994). Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. *The Veterinary Record*, **135**(26), 615–617.
- McPherson M, Møller S. (2006). *Pcr*. Taylor & Francis Group, London. <https://doi.org/10.4324/9780203002674>
- Merry, R. J., & Davies, D. R. (1999). Propionibacteria and their role in the biological control of aerobic spoilage in silage. *Lait*, **79**(1), 149–164. <https://doi.org/10.1051/lait:1999112>
- Meštrovič, T. (2018). *Listeriosis Epidemiology*. News Medical Life Sciences. <https://www.news-medical.net/health/Listeriosis-Epidemiology.aspx>
- Mohan, V., Wibisono, R., de Hoop, L., Summers, G., & Fletcher, G. C. (2019). Identifying Suitable *Listeria innocua* Strains as Surrogates for *Listeria monocytogenes* for Horticultural Products. *Frontiers in Microbiology*, **10**,

- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02281>
- Morrison, F. B. (1936). Feeds and feeding. *A Handbook for the Student and Stockman*.
- Moura, A., Disson, O., Lavina, M., Thouvenot, P., Huang, L., Leclercq, A., Fredriksson-Ahomaa, M., Eshwar, A. K., Stephan, R., & Lecuit, M. (2019). Atypical Hemolytic *Listeria innocua* Isolates Are Virulent, albeit Less than *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, **87**(4), <https://doi.org/10.1128/iai.00758-18>
- Mullenix, K. (2014). *Ryegrass Haylage : a Growing Interest*. <https://ssl.acesag.auburn.edu/agriculture/livestock-poultry/beef/documents/RyegrassHaylageAGrowingInterest.pdf>
- Müller, C. E. (2005). Fermentation patterns of small-bale silage and haylage produced as a feed for horses. *Grass and Forage Science*, **60**(2), 109–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2005.00457.x>
- Murray PR. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* **16**, 1626–1630
- NicAogáin, K., & O’Byrne, C. P. (2016). The Role of Stress and Stress Adaptations in Determining the Fate of the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* in the Food Chain. *Frontiers in Microbiology*, **7**, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01865>
- Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., Grohn, Y. T., McDonough, P. L., & Wiedmann, M. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Applied and environment microbiology*, **70**(8), 4458-4467. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4458-4467.2004>
- Nevens, W. B., & Kuhlman, A. F. (1936). Alfalfa Silage. *Journal of Dairy Science*, **19**(9), 611–617. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(36\)93094-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(36)93094-1)
- Norková R, Dytrtová JJ, Kašička V. 2013. Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektro-migračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chemicke Listy* **107**, 949–955. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/588/588>
- Otrubová, M. (2019). *Zásady výroby senáže*. Agropress.Cz. <https://www.agropress.cz/zasady-vyroby-senaze/>
- Parsons, C. H., & Stanton, T. L. (2000). Effects of Roughage Type and Restricted Feed Intake on Digestibility and Finishing Cattle Performance. *The Professional Animal Scientist*,

- 16**(3), 182–187. [https://doi.org/https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)31690-9](https://doi.org/https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31690-9)
- Peng, K, et al. (2017). Condensed Tannins Affect Bacterial and Fungal Microbiomes and Mycotoxin Production during Ensiling and upon Aerobic Exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, **84**(5), <https://doi.org/10.1128/aem.02274-17>
- Perrin, M., Bemer, M., & Delamare, C. (2003). Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**(11), 5308–5309. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.11.5308-5309.2003>
- Pine, L., Malcolm, G. B., Brooks, J. B., & Daneshvar, M. I. (1989). Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Canadian Journal of Microbiology*, **35**(2), 245–254. <https://doi.org/10.1139/m89-037>
- Premaratne R. J., Lin W. J., Johson E. A. (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**(10), 3046-3048. doi: 10.1128/AEM.57.10.3046-3048.1991.
- Pressoir, M, et al (2010). Prevalence, risk factors and clinical implications of malnutrition in french comprehensive cancer centres. *British Journal of Cancer*, **102**(6), 966–971. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605578>
- Quereda, J. J., Leclercq A., Moura A., Valec G., Gómez-Martín Á., García-Munoz Á, Thouvenot P., Tessaud-Rita N., Bracq-Dieye H., Lecuit M. (2020). *Listeria valentina* sp. nov., isolated from water trough and the faeces of healthy sheep. *Int J Syst Evol Microbiol*. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004494>
- Queiroz, O. C. M., Ogunade, I. M., Weinberg, Z., & Adesogan, A. T. (2018). Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. *Journal of Dairy Science*, **101**(5), 4132–4142. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13901>
- Reece J. B., Taylor M. R., Simon E. J., Dickey J. L. (2012). DNA profiling. Pages 242–246 in Reece J, Campbell N, Taylor MR, Hogan KA, editors. *Campbell biology: Concepts & connections* (7th Edition). New York.
- Reece J. B., Wasserman S. A., Urry L. A., Cain M. L., Minorsky P. V., Jackson R. B. (2014). *Campbell biology*. Pearson, Boston
- Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J. J., Vázquez-Sánchez, D., & López Cabo, M. (2018). Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol. *Foods (Basel, Switzerland)*, **7**(6), 85. <https://doi.org/10.3390/foods7060085>

- Rouquette, C., De Chastellier, C., Nair, S., & Berche, P. (1998). The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Molecular Microbiology*, **27**(6), 1235–1245. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00775.x>
- Ryser, E. T., Arimi, S. M., & Donnelly, C. W. (1997). Effects of pH on distribution of *Listeria* ribotypes in corn, hay, and grass silage. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(9), 3695–3697. <https://doi.org/10.1128/aem.63.9.3695-3697.1997>
- Schlech, W. F., 3rd, Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S., & Broome, C. V. (1983). Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. *The New England journal of medicine*, **308**(4), 203–206. <https://doi.org/10.1056/NEJM198301273080407>
- Schmid, M. W., Ng, E. Y. W., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Goebel, W., Wagner, M., & Schleifer, K. H. (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and Applied Microbiology*, **28**(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.09.005>
- Schuchat, A., Swaminathan, B., & Broome, C. V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **4**(2), 169–183. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.2.169>
- Schuppler, M. (2014). How the interaction of *Listeria monocytogenes* and *Acanthamoeba* spp. affects growth and distribution of the food borne pathogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**(7), 2907–2916. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5546-5>
- Scott, P. R. (1993). A field study of ovine listerial meningo-encephalitis with particular reference to cerebrospinal fluid analysis as an aid to diagnosis and prognosis. *British Veterinary Journal*, **149**(2), 165–170. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(05\)80086-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(05)80086-7)
- Seeliger H. P. (1988). Listeriosis--history and actual developments. *Infection*, **16 Suppl 2**, S80–S84. <https://doi.org/10.1007/BF01639726>
- Seeliger, H. P. R., & Finger, H. (1983). *Listeriosis. Infectious Diseases of the Fetus and the Newborn Infant* (J. S. Remington & J. Klein (eds.)). Saunders.
- Shamloo, E., Hosseini, H., Moghadam, A. Z., Larsen, H. M., Haslberger, A., & Alebouyeh, M. (2019). Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: A review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **20**(4), 241–254.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An

- emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* **6**, 1–16. 10.3389/fmicb.2015.00791
- SZPI - Státní zemědělská a potravinářská inspekce (2015). Prevence onemocnění z potravin: Listeriόza, on-line dostupné z:
<https://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000134&docType=ART&nid=11325>
- Stein M et al. 2018. Evaluation of three MALDI-TOF mass spectrometry libraries for the identification of filamentous fungi in three clinical microbiology laboratories in Manitoba, Canada. *Mycoses* **61**, 743–753. <https://doi.org/10.1111/myc.12800>
- Stessl, B., Luf, W., Wagner, M., & Schoder, D. (2009). Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, **106**(2), 651–659. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04039.x>
- Sugawara R, Yamada S, Tu Z, Sugawara A, Suzuki K, Hoshiba T, Eisaka S, Yamaguchi A. (2016). Rapid and reliable species identification of wild mushrooms by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Analytica Chimica Acta* **934**, 163–169. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.056>.
- Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, **9**(10), 1236–1243. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.011>
- Thouvenot, P., Vales, G., Bracq-Dieye, H., Tessaud-Rita, N., Maury, M. M., Moura, A., Lecuit, M., & Leclercq, A. (2018). MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of *Listeria* species in surveillance: A prospective study. *Journal of Microbiological Methods*, **144**, 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.10.009>
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., Meekin, T. A. M. C., Ross, T., & Icrobiol, A. P. P. L. E. N. M. (2000). Growth Limits of *Listeria monocytogenes* as a Function of Temperature , pH , NaCl , and Lactic Acid. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(11), 4979–4987. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4979-4987.2000>.Updated
- Tyrolová, Y., Výborná, A. (2010) Konzervanty v silážích. Výzkumný ústav živočišné výroby Praha 10 - Uhřetěves. 10208.pdf (vuzv.cz)
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**(3), 584–640. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584->

640.2001

- Vicario, T. (2015). *Listeria Monocytogenes: Incidence, Growth Behavior and Control*. Nova Biomedical.
- Vilar, M. J., Yus, E., Sanjuán, M. L., Diéguez, F. J., & Rodríguez-Otero, J. L. (2007). Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *Journal of Dairy Science*, **90**(11), 5083–5088. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0213>
- Vlaemynck, G., Lafarge, V., & Scotter, S. (2000). Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. *Journal of Applied Microbiology*, **88**(3), 430–441. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00978.x>
- Vyskočil. I., Skládanka J., Doležal P., Havlíček Z., Sláma P. (2011). Metodika výroby experimentálních mikrosíláčích. Brno: Mendelova univerzita v Brně. 23 http://web2.mendelu.cz/pcentrum/publikace/69_metodika_pripravy_mikrosilazi.pdf
- Walker, S. J., Archer, P., & Banks, J. G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, **68**(2), 157–162. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02561.x>
- Wallace, N., Newton, E., Abrams, E., Zani, A., & Sun, Y. (2017). Metabolic determinants in *Listeria monocytogenes* anaerobic listeriolysin O production. *Archives of Microbiology*, **199**(6), 827–837. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1355-4>
- Walsh, D., Duffy, G., Sheridan, J. J., Blair, I. S., & McDowell, D. A. (2001). Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. *Journal of Applied Microbiology*, **90**(4), 517–522. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01273.x>
- Wei, Z., Zenewicz, L. A., & Goldfine, H. (2005). *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C has evolved for virulence by greatly reduced activity on GPI anchors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**(36), 12927–12931. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501725102>
- Weinberg, Z. G., & Muck, R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, **19**(1), 53–68. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00253.x>
- Wesley, I. V. (1999). Listeriosis in animals. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria: Listeriosis, and Food Safety* (2nd ed), 39–74. Marcel Decker, Inc., New York, N.Y.
- Wesley, I. V., Borucki, M., Call, D. R., Larson, D., & Schroeder-Tucker, L. (2008). Detection and

- Diagnosis of *Listeria* and Listeriosis in Animals. In M. E. Torrence & R. E. Isaacson (Eds.), *Microbial Food Safety in Animal Agriculture: Current Topics*, 1–422. <https://doi.org/10.1002/9780470752616>
- WHO Working group. (1988). Foodborne Listeriosis. *Bulletin of The World Health Organisation*, **66**(4), 421–428.
- WHO World Health Organisation. (2018). *Listeriosis*. On-line dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- WHO World Health Organisation. (2015). WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths. <https://www.who.int/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
- WHO World Health Organisation. (2020). INFOSAN Quartely Summary. On-line dostupné z: <https://www.who.int/news/item/29-07-2020-infosan-quarterly-summary-2020-2>
- Zeman, L., Doležal, P., Kopřiva, A., Mrkvicová, E., Procházková, J., Ryant, P., & Zelenka, J. (2006). *Výživa a krmení hospodářských zvířat*. Profi Press. ISBN 80-86726-17-7
- Zenobi., R., Knochenmuss, R. (1999). Ion formation in MALDI mass spektrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, **17**(5), 337–366. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2787\(1998\)17:5<337::AID-MAS2>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2787(1998)17:5<337::AID-MAS2>3.0.CO;2-S)