

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Optimalizace podmínek PCR pro druhovou identifikaci  
listerií z potravin**

**Diplomová práce**

**Bc. Andrea Rosová**

**Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.**

**Konzultant práce: Ing. Tereza Kodešová**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Optimalizace podmínek PCR pro druhovou identifikaci listerií z potravin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 4.4. 2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Tereze Kodešové za ochotu, věnovaný čas a pomoc v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mým nejbližším za podporu nejen při psaní diplomové práce, ale i v průběhu celého studia.

# Optimalizace podmínek PCR pro druhovou identifikaci listerií z potravin

## Souhrn

Potraviny jsou znehodnocovány celou řadou mikroorganismů. Některé mohou být patogenní a způsobovat alimentární onemocnění. Příkladem jsou patogenní bakterie odolné vůči extrémním podmínkám prostředí. Tyto organismy jsou schopny přežít v podobě biofilmů v potravinářských podnicích. V nich ulpívají na zařízeních a následně může dojít ke kontaminaci produktů. Mezi alimentární patogeny patří i *L. monocytogenes*. Jedná se o grampozitivní, nesporulující, tyčinkovitou bakterii, která může být původcem alimentárního onemocnění listerióza. Listerie jsou hojně rozšířeny v přírodě, v potravinách pak zejména v mléce, mase, zrajících sýrech, zelenině, rybách, vejcích a produktech určených k přímé spotřebě. *L. monocytogenes* přežívá v extrémních podmínkách prostředí, včetně širokého rozsahu pH (4,6-9,5) a obsahu soli (10 %). Listerie je psychrotrofní a roste v širokém teplotním rozmezí (1-45 °C).

Cílem práce bylo nalezení vhodných primerů a optimalizace PCR podmínek pro spolehlivou identifikaci druhů listerií, zejména *L. monocytogenes*, vyskytujících se ve vzorcích potravin. V první fázi byla optimalizována PCR pro druhově specifické primery pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6) a pro *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R). Tyto primery byly aplikovatelné pro podmínky naší laboratoře. V další fázi bylo zkoumáno, zda je možné použít rodově specifické primery (LIS-F, LIS-R) v multiplexu s druhově specifickými primery pro *L. monocytogenes* a pro *L. innocua*. Dále bylo zavedeno použití primerů specifických pro sérotypy 1/2a, 3a, 1/2c, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R) pro podmínky naší laboratoře. Byl optimalizován průběh dělení specifických PCR produktů v elektroforéze. V poslední fázi byly zavedeny primery (inlC-F, inlC-R; lmo2821-F, lmo2821-R) pro určení patogenního potenciálu listerií.

Nalezené primery mohou být použity pro druhovou identifikaci listerií, identifikaci sérotypů listerií a pro určení jejich patogenního potenciálu. Celkem byla DNA izolována ze 118 kmenů. Z toho 21 kmenů bylo referenčních, 97 kmenů bylo neznámých. Z celkového počtu neznámých kmenů bylo 84 kmenů identifikováno jako *L. monocytogenes* a vykazovaly patogenní potenciál. Tři kmeny byly identifikovány jako *L. innocua*. Zbývajících 8 kmenů se s použitím uvedených primerů nepodařilo identifikovat. 28 kmenů *L. monocytogenes* bylo identifikováno jako příslušící do fylogenetické skupiny II, jednalo se tedy o sérotyp 1/2a nebo 3a. 21 kmenů příslušelo do fylogenetické skupiny I.2 (sérotyp 1/2c nebo 3c), 18 kmenů patřilo do skupiny II.1 (sérotyp 4b, 4d nebo 4e) a dalších 20 kmenů do skupiny II.2 (sérotyp 1/2b, 3b nebo 7).

Podařilo se zavést a optimalizovat PCR metody pro identifikaci a charakterizaci listerií. Bakterie rodu *Listeria* byly izolovány např. z: salám Vysočina, tatarák, feferonky se sýrem naložené v oleji, mleté maso, vege burger, salát holandský, hermelínový salát. Většina izolátů měla patogenní potenciál. Výsledky poukazují na nezbytnost důsledných kontrol mikrobiologické bezpečnosti potravin.

**Klíčová slova:** *Listeria* sp., taxonomické zařazení, PCR, optimalizace, potraviny

# PCR optimization for species-specific identification of food-born listeria

## Summary

Food is degraded by a variety of microorganisms. Some of them are pathogenic and cause foodborne illness. Pathogenic bacteria are resistant to extreme environmental conditions. These organisms are able to survive as a biofilms on surface in food processing plants and contaminate many products. *L. monocytogenes* is one of the alimentary pathogens. It is a gram-positive, non-spore-forming, rod shaped bacterium and may cause alimentary listeriosis. Listeria is abundant in nature, in food especially in milk, meat, ripened cheese, vegetables, fish, eggs and ready-to-eat food. *Listeria monocytogenes* survives in extreme environment conditions including a wide range of pH (4,6-9,5) and high content of salt (10 %). The bacterium is psychrotrophic growing at a wide temperature range (1-45 °C).

The aim of this thesis was to find suitable primers and optimize PCR conditions for reliable identification of listeria species, especially *L. monocytogenes*, occurring in food samples. PCR was optimized for species-specific primers for *L. monocytogenes* (LL5, LL6) and for *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R). In the next phase, it was investigated whether it is possible to use genus-specific primers (LIS-F, LIS-R) in multiplex with species-specific primers for *L. monocytogenes* and for *L. innocua*. In the next phase, were used primers specific for serotypes 1/2a, 3a, 1/2c, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), serotypes 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), serotypes 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), serotypes 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R) for the conditions of our laboratory. Furthermore, the separation condition in electrophoresis was optimized. In the last phase, primers (inlC-F, inlC-R; lmo2821-F, lmo2821-R) were introduced to determine the pathogenic potential of listeria under the conditions of our laboratory.

Tested primers can be used for species identification of listeria, identification of listeria serotypes and to determine their pathogenic potential. In total, DNA was isolated from 118 strains. Of these, 21 strains were reference, 97 strains were unknown. Of the total number of unknown strains were 84 strains identified as *L. monocytogenes* and showed pathogenic potential. Three strains were identified as *L. innocua*. The rest of the strains were not identified by used primers. 28 strains of *L. monocytogenes* belonged to phylogenetic group II, i.e. they were serotype 1/2a or 3a. 21 strains belonged to phylogenetic group I.2 (serotype 1/2c or 3c), 18 strains belonged to group II.1 (serotype 4b, 4d or 4e) and another 20 strains to group II.2 (serotype 1/2b, 3b) or 7).

PCR methods for listeria identification and characterization have been established and optimized. Bacteria of the genus *Listeria* have been isolated, for example, from: Vysočina salami, tartare, hot peppers with cheese marinated in oil, minced meat, vege burger, Dutch salad, camembert salad. The most of isolates had pathogenic potential. The results point to the need for rigorous microbiological food safety controls.

**Keywords:** *Listeria* sp., taxonomic classification, PCR, optimization, food

# Obsah

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 Úvod .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>                                 | <b>9</b>  |
| <b>3 Literární rešerše.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>3.1 Rod <i>Listeria</i>.....</b>  | <b>10</b> |
| 3.1.1 Klasifikace rodu.....  | 10        |
| 3.1.2 Sérotypy.....  | 11        |
| 3.1.3 Charakteristika rodu.....  | 12        |
| 3.1.4 <i>Listeria monocytogenes</i> .....                                    | 12        |
| <b>3.2 Listerióza.....</b>   | <b>13</b> |
| 3.2.1 Rizikové skupiny .....   | 15        |
| 3.2.2 Klinické příznaky.....   | 16        |
| 3.2.3 Faktory virulence .....  | 18        |
| 3.2.4 Léčba.....   | 19        |
| 3.2.5 Prevence v domácnosti .....  | 20        |
| <b>3.3 Výskyt <i>L. monocytogenes</i> v potravinářských zařízeních .....</b> | <b>21</b> |
| 3.3.1 Výskyt v potravinách.....  | 22        |
| <b>3.4 Metody stanovení <i>L. monocytogenes</i> v potravinách.....</b>       | <b>24</b> |
| 3.4.1 Klasické kultivační metody .....                                       | 24        |
| 3.4.2 Chromogenní kultivační metody .....                                    | 24        |
| 3.4.3 Imunochemické metody.....  | 26        |
| 3.4.4 Molekulárně-genetické metody .....                                     | 27        |
| <b>3.5 Detekce <i>L. monocytogenes</i> pomocí PCR.....</b>                   | <b>29</b> |
| <b>4 Metodika .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>4.1 Izolace kmenů listerií.....</b>                                       | <b>31</b> |
| <b>4.2 Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>4.3 Izolace DNA .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>4.4 Druhová identifikace listerií pomocí PCR.....</b>                     | <b>33</b> |
| 4.4.1 Složení reakční směsi .....  | 34        |
| 4.4.2 Teplotní profil.....   | 35        |
| 4.4.3 Detekce PCR produktů .....   | 37        |
| <b>4.5 Identifikace sérotypů <i>L. monocytogenes</i> pomocí PCR.....</b>     | <b>38</b> |
| 4.5.1 Teplotní profil.....   | 39        |
| 4.5.2 Detekce PCR produktů .....   | 39        |
| <b>4.6 Určení patogenního potenciálu pomocí PCR.....</b>                     | <b>40</b> |
| 4.6.1 Teplotní profil.....   | 41        |
| 4.6.2 Detekce PCR produktů .....   | 41        |
| <b>5 Výsledky.....</b>   | <b>42</b> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>5.1</b> | <b>Druhá identifikace listerií pomocí PCR .....</b>                   | <b>42</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Identifikace sérotypů <i>L. monocytogenes</i> pomocí PCR .....</b> | <b>47</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Určení patogenního potenciálu pomocí PCR.....</b>                  | <b>48</b> |
| <b>6</b>   | <b>Diskuze .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>7</b>   | <b>Závěr.....</b>   | <b>55</b> |
| <b>8</b>   | <b>Literatura.....</b>  | <b>56</b> |
| <b>9</b>   | <b>Samostatné přílohy .....</b>                                       | <b>I</b>  |

# 1 Úvod

Mikroorganismy jsou všudypřítomné, vyskytují se tedy i na potravinách. V potravinách mohou mít mikroorganismy pozitivní i negativní efekt. Mezi negativní mikroorganismy patří jednoznačně patogeny. Jako patogen je definován mikroorganismus, který přímou interací (infekcí) s jiným organismem, většinou vícebuněčným, vyvolá onemocnění u tohoto organismu. V potravinách se vyskytují tzv. alimentární patogeny způsobující alimentární onemocnění. Příkladem těchto mikroorganismů jsou patogenní bakterie, které jsou velmi odolné vůči extrémním podmínkám prostředí. V podobě biofilmů jsou tyto mikroorganismy schopny přežívat v potravinářských podnicích, kde může následně docházet ke kontaminaci produktů. Mezi alimentární patogeny patří i *L. monocytogenes*, která způsobuje nepříliš časté, ale velmi vážné onemocnění zvané listerióza.



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Hypotéza: Budou nalezeny dostatečně specifické PCR primery a optimalizovány podmínky pro spolehlivou druhovou identifikaci listerií izolovaných ze vzorků potravin.

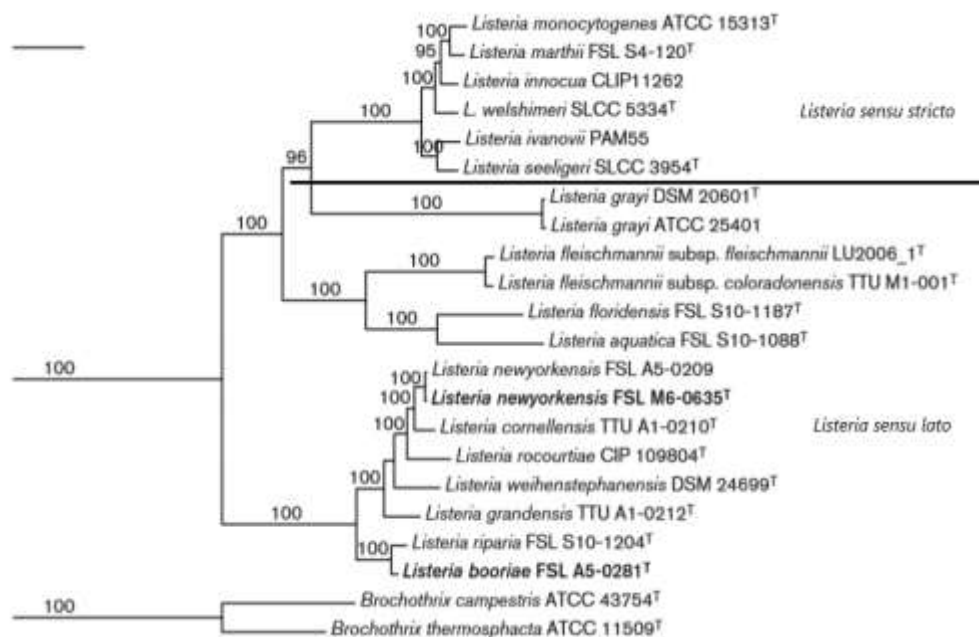
Cíle práce: Cílem práce je nalezení vhodných primerů a optimalizace PCR podmínek pro spolehlivou identifikaci druhů listerií, zejména *L. monocytogenes*, vyskytujících se ve vzorcích potravin.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Rod *Listeria*

#### 3.1.1 Klasifikace rodu

Rod *Listeria* se v současné době skládá ze 17 druhů. Můžeme ho rozdělit na dvě skupiny. První skupina se nazývá „*Listeria sensu stricto*“ (v přesném smyslu slova). Na základě genetické příbuznosti a stejných fenotypových vlastnostech byly do této skupiny zařazeny druhy *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. marthii*, *L. innocua* a *L. welshimeri*. Tyto druhy se vyskytují v gastrointestinálním traktu zvířat, ve stolici a v potravinách živočišného původu. *L. monocytogenes* je spolu s *L. ivanovii* patogenní druh. *L. monocytogenes* infikuje především člověka. *L. ivanovii* způsobuje často listeriózu u přežvýkavců, u člověka málokdy. Všechny ostatní jsou považovány za nepatogenní. Druhou skupinou je „*Listeria sensu lato*“ (v širším smyslu slova). Do této skupiny byly zařazeny druhy lišící se fylogeneticky od druhů „*Listeria sensu stricto*“. Navenek vykazují jiné vlastnosti, z tohoto důvodu byla vytvořena tato samostatná skupina. Do skupiny řadíme *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. grayi*, *L. riparia*, *L. gradensis*, *L. rocourtiae*, *L. booriae*, *L. newyorkensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmanni* a *L. cornellensis* (Schardt et al. 2017). Na obrázku č. 1 je znázorněn fylogenetický strom rodu *Listeria*, který byl sestavený na základě analýzy genu pro 16S rRNA. Listerie se rozdělily do dvou větví na základě podobnosti v sekvencích analyzovaného genu. Můžeme zde vidět větev zahrnující druhy listerií, u nichž byly potvrzeny fenotypové podobnosti a patří do skupiny „*Listeria sensu stricto*“. Z obrázku je patrné, že ostatní druhy patřící do skupiny „*Listeria sensu lato*“, vykazují oproti první větvi fenotypové rozdíly. Z tohoto důvodu nejsou jejich větve ucelené v jednu větev a jsou viditelně odděleny od větve skupiny „*Listeria sensu stricto*“.



Obrázek č. 1: Fylogenetický strom rodu *Listeria* sestavený na základě analýzy genu pro 16S rRNA (Weller et al. 2015).

### 3.1.2 Sérotypy

Stejně jako u ostatních patogenů je zařazení na úroveň druhu nedostatečné. Z toho důvodu jsou kmeny tříděny podle sérotypů, kdy jsou analyzovány reakce antigenů se specifickými antiséry. Antigeny jsou cizí molekuly, které jsou rozeznávány imunitním systémem organismu. Podle antigenů je imunitní systém schopen rozlišovat struktury tělu vlastní i cizí. Antigeny se od sebe mohou lišit velikostí i chemickým složením. Obvykle se jedná o polysacharidy či proteiny. Mezi nejběžnější antigeny patří virové částice, buněčné stěny, fimbrie, bičíky. Při sérologické identifikaci listerií se prokazuje přítomnost somatických O (tělních) a flagelárních H (bičíkových) antigenů na základě jejich reakce se specifickými antiséry. Díky prokázaným antigenům můžeme *L. monocytogenes* zařadit do příslušných sérotypových skupin, kterých je celkem 13. Konkrétně se jedná o sérotypy 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab, 7 (Bhunia 2018).

S rozvojem nových metod dochází k dalšímu upřesňování genotypu a fenotypu bakterií a následné nové kategorizaci. Na základě ribotypizace byly bakterie rodu *Listeria* rozděleny do 3 linií. Jednotlivé linie se liší patogenním potenciálem. Do linie I jsou řazeny sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, 7, které mají nejvyšší patogenní potenciál a jsou nejčastější příčinou onemocnění vyvolaných bakterií *L. monocytogenes*. Linie II má střední patogenní potenciál. Sérotypy 1/2a, 1/2c, 3c, 3a, patřící do této linie, vyvolávají listeriózy sporadicky. Nalézáme je především v kontaminovaných potravinách. Linie III má nízké patogenní riziko a jen zřídka způsobuje infekci člověka. Zahrnuje sérotypy 4a a 4c, které vyvolávají onemocnění zvířat (Nadon et al. 2001; Borucki & Call 2003; Gelbíčková & Karpíšková 2011). Do linie IV jsou zařazovány sérotypy 4a, 4b a 4c. V některých studiích byla používána různá označení pro jednotlivé linie. Linie I byla označována jako linie II a naopak (Orsi et al. 2011). Sérotypy linie I a linie II byly dále na základě obsahu či absence genů (*lmo0737*, *lmo1118*, *orf2819*, *orf2110*) rozděleny do čtyř fylogenetických skupin viz. tabulka č. 1. Geny *lmo0737*, *lmo1118* kódují neznámé proteiny. Gen *orf2819* kóduje transkripční regulátor a gen *orf2110* kóduje secernovaný protein (Doumith et al. 2004; Yadav et al. 2010).

Tabulka č. 1: Rozdělení sérotypů do fylogenetických skupin (Doumith et al. 2004).

| Název genu                      | Skupina | Sérotypy    | Velikost PCR produktu (bp) |
|---------------------------------|---------|-------------|----------------------------|
| <i>lmo0737</i>                  | I.1     | 1/2a, 3a    | 691                        |
| <i>lmo1118</i> , <i>lmo0737</i> | I.2     | 1/2c, 3c    | 906 + 691                  |
| <i>orf2110</i> , <i>orf2819</i> | II.1    | 4b, 4d, 4e  | 597 + 471                  |
| <i>orf2819</i>                  | II.2    | 1/2b, 3b, 7 | 471                        |

### 3.1.3 Charakteristika rodu

Rod *Listeria* jsou grampozitivní pravidelné tyčinky o velikosti 0,4-0,5 x 1-3  $\mu\text{m}$ . V závislosti na podmínkách kultivace se vyskytují samostatně, ve dvojicích nebo tvoří dlouhé řetězky. Listerie nevytvářejí spory. Některé druhy mají bičík, díky němuž se mohou pohybovat. Pohyblivost je ovlivněna teplotou. Při teplotě nad 25 °C se pohyblivost snižuje a při teplotě těla (37 °C) bičíky zcela vymizí (Bhunia 2018).

Bakterie rodu *Listeria* patří mezi fakultativní anaeroby. Jsou schopny růst za nízkých hladin kyslíku a za podmínek vysokého obsahu oxidu uhličitého (Gandhi & Chikindas 2007; Lungu et al. 2009). Tolerance vůči soli, teplotě, pH, nízkým koncentracím kyslíku a aktivita vody ( $a_w$ ) se mění mezi kmeny (Gandhi & Chikindas 2007).

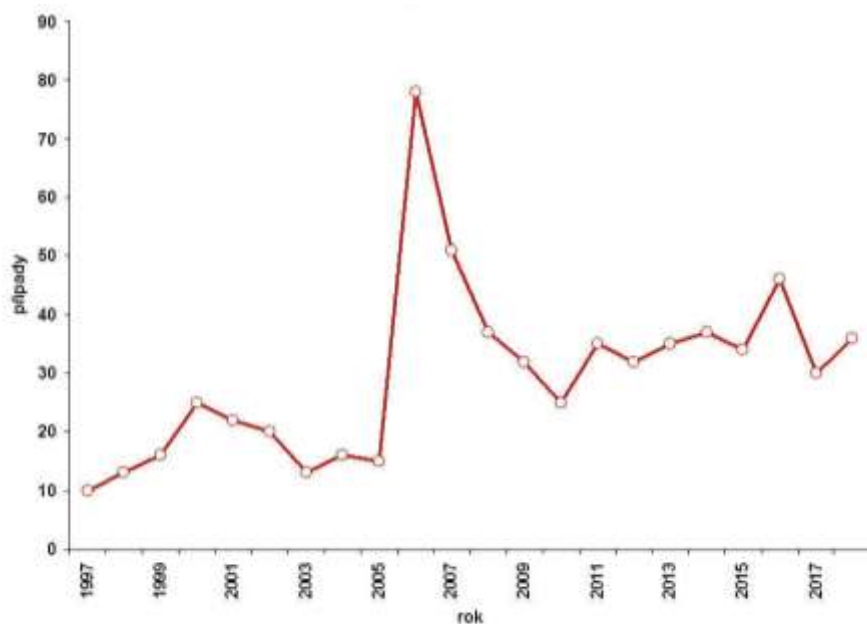
### 3.1.4 *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* je hojně rozšířená v přírodě. Nalézáme ji v půdě, v různých vegetacích, hnilým rostlinném materiálu, výkalech, silážích a vodě. Může se vyskytovat jako saprofyt, živí se tedy rozkládáním odumřelé organické hmoty. Bakterie může zvolit parazitický způsob života. V tomto případě využívá hostitele jako vhodné prostředí pro život a jako zdroj výživy (Schardt et al. 2017).

Optimální teplota pro růst *L. monocytogenes* je v rozmezí 30 a 37 °C. Bakterie je známá jako psychrotrofní, to znamená, že je schopna zpomaleného růstu i při chladírenských teplotách, tj. pod 7 °C (Carpentier & Cerf 2011). Na druhé straně je patogen schopen množit se při teplotách dosahujících až 45 °C (Saltijeral et al. 1999). Toleruje široký rozsah pH, může růst v prostředí s pH mezi 4,6-9,5 (Carpentier & Cerf 2011). Tolerance na pH je také spojena s aktivitou vody ( $a_w$ ). Při  $a_w$  menší než 0,92 tato bakterie neroste (Nolan et al. 1992). *L. monocytogenes* roste i v koncentraci soli do 10% (Ferreira et al. 2014). Listerie patří mezi kataláza pozitivní a oxidáza negativní organismy (Bhunia 2018). Svými vlastnostmi a schopnostmi přežít různé podmínky prostředí, a díky prokázané patogenitě, představuje *L. monocytogenes* organismus, který může být pro člověka velmi nebezpečný (Schardt et al. 2017).

### 3.2 Listeri3za

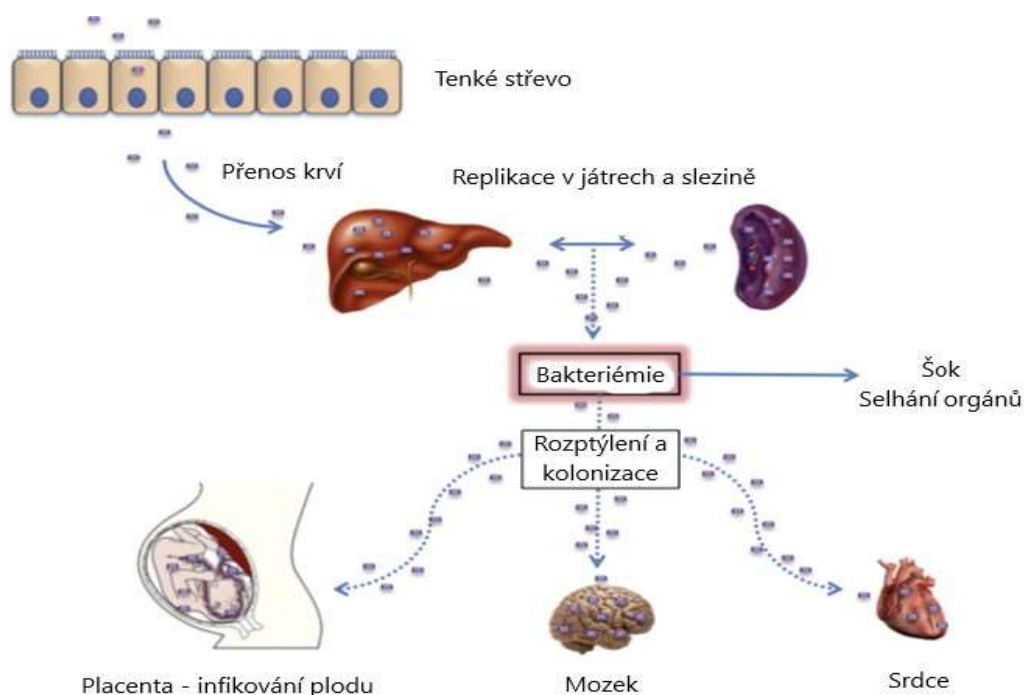
Listeri3za je infekční onemocněn3 způsoben3 patogenn3 bakter3 *Listeria monocytogenes*. Pat3 mezi zoon3zy (infekční onemocněn3 zv3rat p3enosn3 na 3lov3ka). K vyvol3n3 infekce doch3z3 nej3ast3ji po poz3en3 kontaminovan3 potrav3. Bakterie se p3emno33 v tr3vic3m traktu a dojde k rozvoji onemocněn3 (Bortolussi 2008). Listeri3za nen3 a3 tak 3ast3 aliment3rn3 onemocněn3 v Evropsk3 unii, ale m33e m3t velmi z3va3n3 p33b33h a u 30 % pacient3 kon33 smrt3. Zejm3na se jedn3 o pacient3 z rizikov3ch skupin (lid3 s oslabenou imunitou, mal3 d3ti nebo naopak seniory). P3esto3e listeri3za nen3 p3ili33 3ast3 onemocněn3, zauj3m3 v EU prvn3 m3sto z hlediska 3mrtnosti na aliment3rn3 onemocněn3 (EFSA & ECDC 2018). V roce 2016 bylo v EU hl33eno 2506 p33pad3, z nich3 zem3elo 247 jedinc3. V roce 2018 po3et p33pad3 3inil 2544 z toho 229 3mrt3. V roce 2019 bylo nahl33eno 2621 p33pad3 a zem3elo 303 pacient3 (ECDC 2019). V 3esk3 republice p3edstavuje listeri3za v porovn3n3 s ostatn3mi infekcemi pom3rn3 m3lo 3ast3 onemocněn3. Ro3n3e je hl33eno p33 des3etek p33pad3 viz. obr3zek 3. 2. Z obr3zku je patrn3, 3e v p33b33hu let do3lo k n3kolika viditeln3m v3kyv3m v po3tu p33pad3 listeri3zy. V roce 2006 bylo nahl33eno 78 p33pad3, z nich3 zem3elo 12 pacient3. V roce 2007 po3et p33pad3 3inil 51 z toho 8 3mrt3. V roce 2016 bylo zaznamen3no 46 p33pad3, z nich3 11 pacient3 zem3elo. V 3esk3 republice um3r3 na listeri3zu ro3n3e jednotky jedinc3 (ECDC 2019).



Obr3zek 3. 2: P33pady onemocněn3 listeri3zou v 3R v letech 1997-2018 (SZ3).

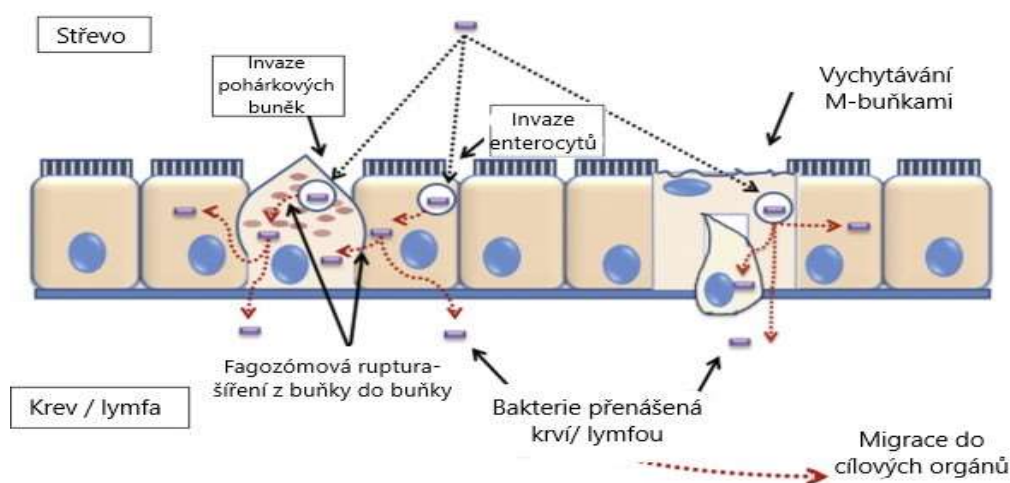
Listerie se vyskytují v zelenině, mléku, zrajících sýrech, mase, rybách, paštikách, vejcích a produktech určených k přímé spotřebě, jako jsou uzeniny a lahůdky (Bortolussi 2008). Velmi zřídka může být infekce přenášena přímo z infikovaných zvířat na člověka. Dále může dojít k přenosu z matky na dítě v děloze nebo během průchodu infikovaným porodním kanálem. Existují také zprávy o přenosu v nemocničním prostředí ze zdravotnického personálu na pacienty (Allerberger & Wagner 2010).

Na obrázku č. 3 je schéma znázorňující proces infekce v živém organismu. K rozvoji listeriózy dochází za předpokladu, že jedinec pozře potravu kontaminovanou *L. monocytogenes* nebo bakterií samotnou. Následně listerie překoná střevní bariéru hostitele a dále proniká do těla. Infekční dávka pro zdravého člověka činí  $10^6$  buněk, u rizikových osob může činit pouze 1000 bakteriálních buněk (Brychta J 2018). Listerie se z trávicího traktu dostávají do lymfatického systému a do krevního řečiště. Stav, kdy jsou bakterie přítomny v krvi, se nazývá bakteriémie. Bakteriémie může vyvolat šok a způsobit orgánové selhání. Z krve mohou listerie napadnout jakýkoliv orgán a rozvinout lokální infekci. Nejčastěji napadenými orgány jsou játra a slezina. Při průchodu přes placentu může dojít k infikování plodu, jak již bylo zmíněno výše. V některých případech se listerie dostává přes hematoencefalickou bariéru a napadá mozek. Bakterie může napadnout i srdce (Cossart & Lebreton 2014).



Obrázek č. 3: Proces infekce v živém organismu (McMullen & Freitag 2014).

Na obrázku č. 4 je znázorněn mechanismus translokace *L. monocytogenes* přes střevní bariéru. Epitel vystylající tenké střevo je jednovrstevný cylindrický. V epitelu se nachází několik typů buněk. Nejvíce jsou zastoupeny enterocyty, jejichž hlavní funkcí je vstřebávání látek z obsahu tenkého střeva. Mezi enterocyty jsou pohárkové buňky, které vylučují mucin tvořící ochrannou vrstvu na povrchu střeva. Listerie jsou schopny navázat se pomocí povrchových proteinů na enterocyty či pohárkové buňky. V epitelu se také nacházejí M-buňky, které jsou součástí imunitního systému. Jejich úkolem je vycíhat patogeny. Pokud M-buňky a další buňky imunitního systému (lymfocyty, makrofágy) nezachytí listerie, dostávají se tyto bakterie do krve a lymfy. Následně jsou tyto bakterie přeneseny do cílových orgánů (McMullen & Freitag 2014).



Obrázek č.4: Mechanismus translokace *L. monocytogenes* přes střevní epitel (Lecuit & Cossart 2001).

### 3.2.1 Rizikové skupiny

*L. monocytogenes* většinou způsobuje u zdravých jedinců neinvazivní formu listeriózy v podobě gastroenteritidy (zánět trávicího traktu, postihující žaludek i tenké střevo). Odborná pomoc v tomto případě většinou není potřeba, infekce za pár dní odezní. Pokud bakterie překoná střevní bariéru, může způsobit závažnější systémové onemocnění. Toto je velmi pravděpodobné u jedinců z rizikových skupin.

Podle věku rozlišujeme 3 hlavní rizikové skupiny. Novorozenci, těhotné ženy a senioři (nad 60 let). Dalšími rizikovými jedinci jsou osoby s oslabenou imunitou. Konkrétně jsou to pacienti s nádorovým onemocněním, jedinci nakažení žloutenkou nebo virem HIV. Listerióza může též postihnout osoby podstupující dlouhodobě léčbu antacidy (léčiva snižující kyselost žaludečního obsahu) nebo imunosupresivy (látky potlačující funkci imunitního systému) (Brychta J 2018).

## 3.2.2 Klinické příznaky

### 3.2.2.1 Gastroenteritida

*L. monocytogenes* může způsobit u zdravých osob febrilní gastroenteritidu. Listerie se vyskytují pouze v buňkách epitelu tenkého střeva, nikam dál se nešíří. Nemoc se obvykle objevuje 24 hodin po požití kontaminované potravy, většinou trvá 2 dny. Mezi běžné příznaky patří nevolnost, horečka, bolest hlavy, vodnatý průjem, bolest kloubů a svalů. Většinou není třeba zahájit léčbu, infekce postupně odezní sama (Lorber 2005).

### 3.2.2.2 Infekce v těhotenství a novorozenecká infekce

Během těhotenství je imunita zprostředkovaná T-buňkami mírně narušena. Z tohoto důvodu jsou těhotné ženy náchylné k rozvoji listeriální infekce. Ačkoliv se onemocnění může objevit ve všech stádiích těhotenství, nejčastěji je pozorováno během třetího trimestru. Velmi často se nemoc v těhotenství projevuje jako bakteriémie (přítomnost bakterií v krvi). Mezi běžné projevy nemoci patří bolest hlavy, horečka, malátnost, myalgie (bolest svalstva), artralgie (bolest kloubů). Gastrointestinální příznaky, jako je bolest břicha a průjem, jsou méně časté. U žen nakažených listeriózou jsou běžné předčasné porody. Často dochází ke spontánním potratům nebo je nutné podstoupit terapeutický potrat plodu.

Pokud listerie překoná placentární bariéru, dochází k infikování plodu *in utero*. Tato listeriální infekce vede k narození mrtvých jedinců nebo k novorozeneckým úmrtím. Při infikování novorozence v děloze, dochází k novorozenecké listerióze časného nástupu. Onemocnění se projeví při narození nebo krátce poté, obvykle během prvního týdne života. Primárním klinickým obrazem je těžká sepse s multiorgánovým postižením. Míra úmrtnosti narozených dětí se blíží 20 %. Pokud k míře úmrtí během prvního týdne života přiřadíme i frekvenci potratů a mrtvě narozených, zvýší se celková úmrtnost na více jak 50 %.

Listerióza pozdního nástupu má typické rysy novorozenecké meningitidy. V tomto případě není zcela známo, zda dochází k infikování novorozence při průchodu porodními cestami matky nebo z nemocničního prostředí. Vyskytuje se 7-20 dní po porodu. Kojenci s tímto typem listeriózy vykazují nechutenství a podrážděnost. Úmrtnost spojená s pozdním nástupem nemoci je méně než 10 %. Může docházet k pozdějšímu neurologickému poškození, jako u jiných forem novorozenecké bakteriální meningitidy (Schlech 2000; Doganay 2003).



### 3.2.2.3 Infekce CNS

Klinickými syndromy způsobenými listeriami v CNS jsou meningitida (zánět mozkových blan), meningoencefalitida (zánět mozku a mozkových blan) a tvorba abscesů. Meningitida je nejčastěji rozpoznávanou listeriální infekcí. *L. monocytogenes* je pátým nejčastějším původcem této nemoci. Další bakterie způsobující meningitidu jsou například *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae*. Ze začátku jsou příznaky meningitidy podobné chřipkovému onemocnění. Pacient trpí vysokými horečkami, zvracením, bolestmi hlavy, kloubů a zad. Hlavním příznakem, díky němuž můžeme rozpoznat meningitidu, je svalová ztuhlost šířící se z krční páteře. Dalšími příznaky mohou být záchvaty, špatná koordinace pohybu nebo třes. Listerie může napadnout samotný mozek. Pokud k tomu dojde, tak hovoříme o tzv. encefalitidě (zánět v mozku). Při kombinaci meningitidy a encefalitidy se setkáváme s onemocněním zvaným meningoencefalitida (Bartt 2000).

### 3.2.2.4 Endokarditida

Infekční endokarditida je zánět vnitřního povrchu srdce neboli endokardu, postihuje zejména srdeční chlopuň. Toto onemocnění je vzácné, ale velmi závažné. Často vede k dysfunkci chlopně a srdečnímu selhání. Listeriální endokarditida je pozorována přibližně u 8 % infikovaných dospělých jedinců. Míra úmrtnosti činí téměř 50 % (Doganay 2003).

### 3.2.3 Faktory virulence

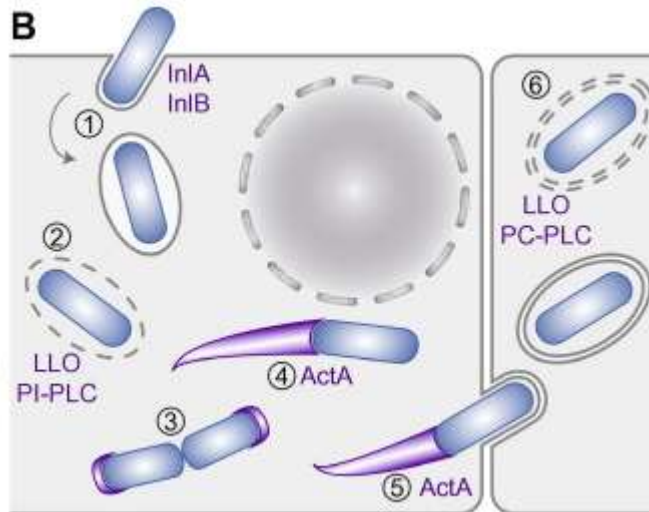
Při vstupu do hostitelské buňky, pohybu a rozšíření do dalších buněk pomáhají listeriím virulentní faktory. Tyto faktory zahájí infekci a ovlivní její následný průběh. Jak již bylo několikrát zmíněno, *L. monocytogenes* se dostává nejčastěji do trávicího traktu hostitele kontaminovanou potravou. Bakterie musí odolávat vlivu proteolytických enzymů hostitele, kyselému žaludečnímu prostředí a žlučovým solím (Sleator et al. 2003).

Pokud *L. monocytogenes* odolá kyselému žaludečnímu prostředí a vlivu proteolytických enzymů, dostává se do střeva, kde může adherovat k hostitelským buňkám epitelu a dostává se z jejich povrchu do nitra. Do nitra buňky proniká za pomoci povrchových proteinů zvaných internaliny. Nejvýznamnější jsou Internalin A (InlA) a Internalin B (InlB). Internaliny představují virulentní faktory, které zajišťují rozpoznání buněčných receptorů hostitele. Pomáhají při vstupu patogenu do hostitelských buněk. Hlavní rolí InlA je jeho interakce s transmembránovým proteinem E-kadherinem, za účelem zprostředkování vstupu bakterie do epiteliálních buněk. InlB usnadňuje vstup do širšího spektra typů hostitelských buněk, včetně fibroblastů, hepatocytů a epiteliálních buněk. Po interakci Internalinu s receptorem je *L. monocytogenes* obklopena cytoplazmatickou membránou buňky a uzavřena do nově vzniklé vakuoly zvané fagozom (Liu 2006).

K úniku listerie z fagozomu je zapotřebí faktor virulence, kterým je listeriolysin O (LLO), toxin produkovaný bakterií *L. monocytogenes*. Tento toxin vytváří póry a ve spolupráci s fosfatidylinositol-fosfolipázou C (PI-PLC) a fosfatidylcholin-fosfolipázou C (PC-PLC) zprostředkovává únik bakterie. *L. monocytogenes* se uvolní do cytosolu, kde dochází k jejímu růstu a množení. K pohybu bakterie je potřeba povrchový protein, ActA (Actin-assembly inducing protein). Tento protein zajišťuje polymeraci buněčného aktinu, to vede ke vzniku kometového ocasu, který umožňuje intracelulární motilitu a šíření bakterie z buňky do buňky. Listerie jsou pohlceny sousedními buňkami, což vede k tvorbě zdvojených membránových vakuol. Opuštění těchto vakuol napomáhá již zmiňovaný listeriolysin O a fosfatidylcholin-fosfolipáza C. Úspěšné překonání zdvojené membrány vakuoly signalizuje začátek nového infekčního cyklu.

Výše zmiňované faktory virulence jsou řízeny geny. Regulace exprese těchto genů je zajištěna pozitivním regulačním faktorem A (PrfA). Signál, který indukuje aktivaci PrfA není známý. Byly izolovány kmeny *L. monocytogenes*, které obsahují mutace v genu *PrfA*, což má za následek konstitutivní aktivaci PrfA (Bruno Jr & Freitag 2010). Pozitivní regulační faktor je velmi důležitý řídicí mechanismus, který zodpovídá za celý proces infekce buňky. Bez něj by bakterie nebyla schopna šířit se z buňky do buňky, adherovat k cytoplazmatické membráně dalších buněk, uniknout z fagozomu a replikovat se v cytosolu (Vázquez-Boland et al. 2001).

Průběh šíření listerií v hostiteli je znázorněn na obrázku č. 5. Bakterie vstupuje do hostitelské buňky pomocí interakce InlA a InlB s příslušnými receptory. Pomocí LLO a PI-PLC listerie uniká z fagozomu. *L. monocytogenes* se může replikovat v cytosolu. Protein ActA stimuluje polymeraci buněčného aktinu, vzniká kometový ocas, umožňující intracelulární motilitu a šíření bakterií z buňky do buňky. Překonání zdvojené membrány vakuoly zprostředkováno působením LLO a PC-PLC.



Obrázek č. 5: Intracelulární životní cyklus *Listeria monocytogenes* (Cossart & Lebreton 2014).

### 3.2.4 Léčba

Listerióza se léčí pomocí antibiotik. Nejčastěji užívanými antibiotiky jsou penicilin a ampicilin. Při léčbě ampicilinem se přidává gentamycin, a to zejména při bakteriémii, endokarditidě a meningitidě. *L. monocytogenes* je citlivá i k dalším antibiotikům. Patří mezi ně vankomycin, erytromycin, tetracykliny nebo aminoglykosidy. V případě, že je pacient alergický na penicilin může mu být podán trimethoprim-sulfamethoxazol v kombinaci s amoxicilinem. (Fernández Guerrero et al. 2012; Donovan 2015; McNeill et al. 2017).

Bez ohledu na to, jaké antibiotikum je při léčbě listeriózy zvoleno, rozhodujícím faktorem je jeho dávkování. Při bakteriémii, endokarditidě a meningitidě se podává ampicilin v dávce 6 g/den s možným přídavkem gentamycinu. Větší dávky ampicilinu jsou třeba v případech jako je mozkový absces, kdy dávka činí 14 g/den. Délka trvání léčby se liší dle různého typu listeriální infekce. V případě bakteriémie léčba trvá 14 dní. Endokarditida se léčí 6 týdnů, meningitida 21 dní a mozkový absces 4 – 6 týdnů (Janakiraman 2008).

### 3.2.5 Prevence v domácnosti

Proti listerióze neexistuje žádné očkování. Lze pouze doporučit preventivní opatření. Většina spotřebitelů nemá dostatečné informace o tomto onemocnění. V rámci prevence je zapotřebí, aby spotřebitelé znali základní informace a preventivní opatření.

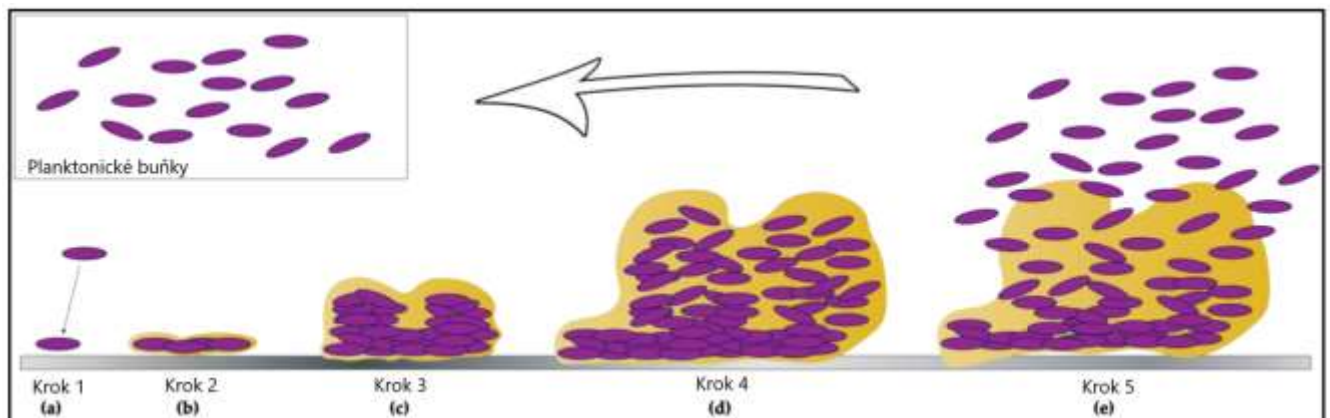
Dostatečnou prevencí proti listerióze je dodržování základních požadavků osobní hygieny a bezpečné manipulace s potravinami. Důležité je udržování čistoty, zahrnující mytí rukou před přípravou pokrmů, mezi jednotlivými činnostmi a po ukončení práce. Dále je třeba udržovat čistotu pracovních ploch a povrchů v kuchyni, a to především řádným oplachováním vodou a dezinfekčním prostředkem. Dalším krokem, pro úspěšnou prevenci, je zabránění tzv. křížové kontaminaci. Křížová kontaminace je činnost, při které dochází k přenosu škodlivých mikroorganismů, jako je *L. monocytogenes*, z „nečistých“ potravin např. ze syrového masa, z pracovních ploch, z náčiní nebo rukou na potraviny určené k přímé spotřebě, případně pokrmy.

Potraviny by měly být co nejrychleji zchlazovány a zmrazovány. Studené pokrmy je třeba udržovat při teplotě do 4 °C. Na druhé straně je také velmi důležitá důkladná tepelná úprava pokrmů. Zmíněnými doporučeními by se měli řídit především jedinci z rizikových skupin. Tito jedinci by se měli vyvarovat konzumaci rizikových potravin. Například těhotné ženy by neměly jíst měkké zrající sýry (SZPI 2015).

### 3.3 Výskyt *L. monocytogenes* v potravinářských zařízeních

Listerie se mohou vyskytovat v prostředí potravinářských podniků, a to především díky jejich schopnosti tolerovat široký rozsah pH a růst při nízkých teplotách. Listerie se udržují v potravinářských podnicích a provozovnách mimo jiné i proto, že jsou schopny vytvářet biofilmy. Biofilm může být široce definován jako společenství různých druhů mikroorganismů ulpívajících na povrchu (O'Toole et al. 2000). Biofilmy jako takové se mohou tvořit na široké škále povrchů, příkladem jsou vodovodní potrubí, zdravotnická zařízení, průmyslová zařízení a zařízení pro zpracování potravin. Biofilmy vznikají na zdrsňelém povrchu. Na mechanicky narušených površích se usazují organické nečistoty, na kterých rostou bakterie a tvoří biofilm. Obecně lze říci, že se biofilmy vytváří v místech, které se špatně čistí, příkladem jsou různé spoje a ohyby u potravinářských zařízení (Donlan 2002).

Bakteriální buňky v rámci biofilmu jsou zabudované do matrice extracelulárních polymerních látek, které samy produkují. Extracelulární matrice je tvořena proteiny, exopolysacharidy a extracelulární DNA, tyto látky tvoří obalovou vrstvu nazývanou matrix. Extracelulární polymerní látky jsou odpovědné za adhezenci k povrchům, komunikaci v biofilmu, soudržnost a odolnost vůči odstranění. Potenciální zdroj kontaminace představuje oddělení mikrobiálních buněk od biofilmu a jejich následné rozptýlení do prostředí (Colagiorgi et al. 2017). Na obrázku č. 6 je schematické znázornění fází vývoje biofilmu.



Obrázek č. 6: Fáze vývoje biofilmu (Colagiorgi et al. 2017).

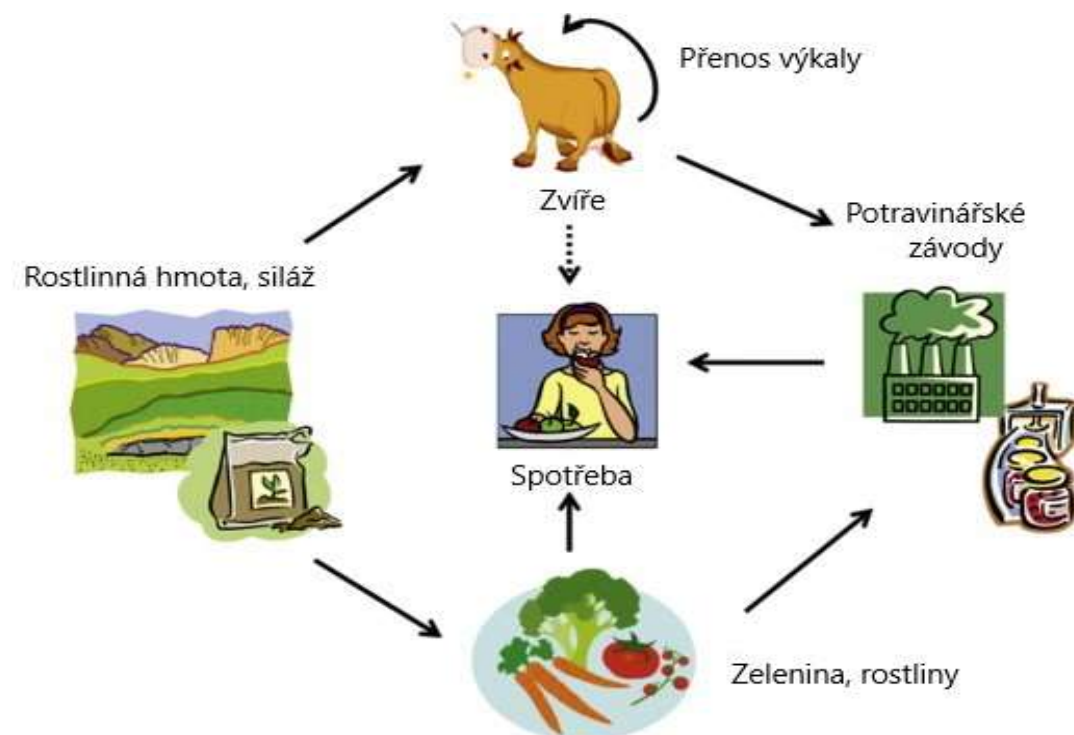
(a) Bakteriální buňky adheřují na povrch. (b) Adherované buňky vytvoří jednu vrstvu. Podmíní se spuštění genu pro tvorbu extracelulárních polymerů. Vytvoří se extracelulární matrice. (c) Buňky pokračují v růstu a vytváří vícevrstvé mikrokolonie. (d) Buňky jsou nevratně připojeny k povrchu a uloženy v matrici, biofilm je zralý. (e) V poslední fázi jsou buňky schopné oddělit se od biofilmu a uvolnit se do prostředí v podobě tzv. planktonických buněk a kolonizovat jiná místa.

V potravinářských podnicích se biofilmy vyskytují především v místech, kde dochází k manipulaci nebo zpracování potravin. Příkladem jsou dopravní pásy a různá zařízení z nerezové oceli (Lee Wong 1998). Přílnutí k povrchům je z hlediska přežití a růstu mikroorganismů v potravinářském průmyslu velmi důležité. Mikroorganismy, které vytvářejí biofilmy jsou chráněny před čištěním a dezinfekcí, proto je obtížná jejich eliminace. Biofilmy se odstraňují obtížněji než jednotlivé buňky *L. monocytogenes*, protože jsou odolnější vůči dezinfekci. Vyšší odolnost je zprostředkována již zmiňovanou ochrannou vrstvou, matrix. Přestože jsou provozovny pravidelně sanitovány, mohou se v nich listerie udržet měsíce až roky (Møretro & Langsrud 2004).

Tvorba biofilmů ve zpracovatelských a výrobních zařízeních potravin je velice znepokojivá, protože může dojít k přenosu bakterií z kontaminovaných přístrojů a povrchů na potravinářské výrobky. Pokud se dostanou kontaminované plochy do styku s potravinami, hrozí kontaminace těchto potravin a následné zvýšení rizika nakažení listeriózou. *L. monocytogenes* je běžně izolována zejména v zařízeních pro zpracovávání mléka, masa a masných výrobků (Pritchard et al. 1995; Midelet & Carpentier 2002).

### 3.3.1 Výskyt v potravinách

*L. monocytogenes* se často nachází v různých surovinách a potravinách. Vyskytuje se především v mléce, sýrech, mase, paštikách, rybách, vejcích, zelenině a dalších produktech. Tyto potraviny se souhrně nazývají rizikové potraviny (Bortolussi 2008).



Obrázek č. 7: Šíření *L. monocytogenes* v prostředí (McMullen & Freitag 2014).

Obrázek č. 7 znázorňuje šíření patogenu v prostředí. *L. monocytogenes* se nachází v rostlinném materiálu, půdě, výkalech nebo silážích. Právě výkaly a siláže mohou představovat zdroj infekce pro zvířata. Produkty zvířat (maso, mléko) se přímo dostávají ke spotřebitelům, případně jsou dále zpracovávány v potravinářských závodech. V potravinářských podnicích může také dojít ke kontaminaci produktů následně určených ke spotřebě. Stejně tomu je i v případě zeleniny a ostatních produktů patřících mezi rizikové potraviny (McMullen & Freitag 2014).

Z masných výrobků je touto bakterií nejčastěji kontaminováno syrové maso hovězí či vepřové, mleté maso a paštiky. Ryby a mořské plody patří též mezi potraviny, ve kterých se *L. monocytogenes* může vyskytovat, konkrétním příkladem je uzený losos. Dalšími potravinami jsou zeleninové saláty, syrová krájená zelenina a lahůdkářské výrobky (Coillie et al. 2004; Kramarenko et al. 2013; Jami et al. 2014). Listerie se vyskytují v syrovém mléce a sýrech, které mají vhodné podmínky pro jejich růst a množení. Mezi takové sýry patří především sýry vyrobené z nepasterovaného mléka, měkké zrající sýry (Hermelín, Camembert, De Brie), čerstvé (tvarohové) sýry (Mozzarella, Cottage) a sýry zrající pod mazem (Olomoucké tvarůžky, Romadur) (Marth & Steele 2001; Coelho et al. 2014; Schvartzman et al. 2014; Gérard et al. 2018). K nejrizikovějším potravinám patří obecně potraviny s vysokým stupněm opracování a potraviny určené k přímé spotřebě, které jsou po dlouhou dobu skladovány při chladírenských teplotách, což může vést k nárůstu bakterie až do infekční dávky. Tak jako pro ostatní patogenní bakterie v potravinách, i v případě listerií je nejdůležitější prevence (Coillie et al. 2004; Kramarenko et al. 2013; Jami et al. 2014).

### 3.4 Metody stanovení *L. monocytogenes* v potravinách

*L. monocytogenes* se v potravinách stanovují pomocí klasických kultivačních metod, a to metodou průkazu dle normy ČSN EN ISO 11290-1. Tyto metody jsou však časově náročné, získání výsledků může trvat 5-8 dní. Včasné odhalení listerií v potravinách je velmi důležité. Z tohoto důvodu byly v posledních letech vyvíjeny a zkoumány nové, rychlejší metody pro stanovení listerií v potravinách. Dle principu stanovení lze rozdělit metody na kultivační metody, metody imunochemické a metody molekulárně-genetické.

#### 3.4.1 Klasické kultivační metody

Listerie je možné kultivačně stanovit na mnoha různých selektivních půdách. Jako ISO standard se používá ČSN EN ISO 11290-1 -Horizontální metoda průkazu *L. monocytogenes*. Metoda průkazu listerií zahrnuje několik kroků. V prvním kroce jsou mikroorganismy, které jsou přítomny ve vzorku, pomnožovány v tekutém selektivním médiu Fraser s poloviční koncentrací inhibičních složek (antibiotik) tzv. poloviční bujón podle Frasiera. Vzorek je inkubován při 30 °C po dobu 24 hodin. Při tomto pomnožení je částečně inhibován růst doprovodné mikroflóry. Následuje sekundární pomnožení, kdy se přeočkuje 0,1 ml vzorku získané kultury do 10 ml tekuté selektivní půdy (bujón podle Frasiera) s plnou koncentrací inhibičních složek. Inokulovaný bujón se kultivuje při teplotě 35 °C nebo 37 °C po dobu 48 hodin. Takto získaná pomnožená kultura je vždy naočkována na dvě tuhá selektivně-diagnostická agarová média, ALOA agar (agar podle Ottavianiho a Agostiho) a Oxford či PALCAM agar. Následně probíhá kultivace při 30 °C, 35 °C nebo 37 °C po dobu 24 hodin (resp. 48 hodin). Po kultivaci se zjišťuje přítomnost charakteristických kolonií *L. monocytogenes*, jež jsou různé barvy v závislosti na použitém tuhém médiu. Na ALOA agaru narůstají modrozelené kolonie, u některých druhů listerií se kolem kolonií tvoří neprůhledná „halo“ zóna. Na PALCAM agaru narůstají šedozelené kolonie s tmavě hnědou až černou „halo“ zónou. Každá z vybraných kolonií je očkována na povrch neselektivního tuhého média TSYEA (agar s tryptonem, sójovým peptonem a kvasničním extraktem). Následuje kultivace při teplotě 35 °C nebo 37 °C po dobu 18 až 24 hodin. Identita je potvrzována pomocí vhodných morfologických, fyziologických, biologických a molekulárně-genetických testů (Blažková et al. 2005; Barre et al. 2016).

#### 3.4.2 Chromogenní kultivační metody

Moderní kultivační metody jsou využívány k potvrzení jednotlivých druhů listerií na základě jejich biochemických vlastností. Metody jsou založeny na průkazu charakteristického enzymu, který způsobuje přeměnu substrátu. Tato přeměna je přímo či nepřímo doprovázena změnou zabarvení média. Substráty jsou obsaženy v tekutých kultivačních médiích (API *Listeria* test) nebo jsou součástí speciálních tuhých médií (Rapid L. mono testy, ALOA a COMPASS L. mono agar) (Blažková et al. 2005).



#### 3.4.2.1 API *Listeria* test

Pomocí API *Listeria* testu lze rozlišit všechny druhy listerií na základě jejich biochemických vlastností. Identifikační souprava obsahuje 10 mikrozkušavek obsahujících dehydratovaný chromogenní substrát pro testování enzymových reakcí nebo fermentace sacharidů charakteristických pro jednotlivé druhy listerií. Nejčastěji se tento test užívá k diferenciaci druhů *L. monocytogenes* a *L. innocua*. Testy sledují přítomnost či nepřítomnost enzymu arylamidázy (DIM test). Dále je sledována přítomnost dalších enzymů (mannosidáza glukosidáza) nebo fermentace sacharidů (D-xylóza, D-arabitol, ribóza, D-tagatóza, rhamnóza).

Při tomto testu je očkovaná čistá bakteriální kultura, která je získána po kultivaci na selektivních půdách. Následná kultivace probíhá při teplotě 37 °C po dobu 18–24 hodin. Vyhodnocování se provádí vizuálně, porovnáváním barev v jednotlivých mikrozkušavkách s interpretační tabulkou, jež je k testu přiložena nebo identifikačním softwarem (Allerberger 2003; Blažková et al. 2005).

#### 3.4.2.2 RAPID L. mono test

Rapid L. mono je selektivní chromogenní agarové médium, které umožňuje specifickou identifikaci listerií během 24-48 hodin. Metoda je založena na specifickém průkazu aktivity fosfolipázy a na schopnosti využívat xylózu. Enzym fosfolipáza hydrolyzuje fosfatidylinositol, což se projevuje modrým zbarvením kolonií. Schopnost využívat xylózu se projevuje vytvořením žluté „halo“ zóny okolo kolonií. *L. monocytogenes* není schopna využívat xylózu a vykazuje fosfolipázovou aktivitu, proto jsou její kolonie modré bez žluté „halo“ zóny. *L. ivanovii* mají modrozelené kolonie se žlutou „halo“ zónou, díky jejich současné fosfolipázové aktivitě a schopnosti využívat xylózu. Kolonie ostatních druhů rodu *Listeria* mají bílou barvu (Allerberger 2003; Blažková et al. 2005).

#### 3.4.2.3 ALOA a COMPASS L. mono Agar

ALOA a COMPASS L. mono Agar jsou diagnostická chromogenní média určená pro identifikaci *L. monocytogenes* a izolaci bakterií rodu *Listeria*. Tato chromogenní média jsou založena na průkazu aktivity  $\beta$ -glukosidázy, která je obsažena v buňkách všech druhů rodu *Listeria*.  $\beta$ -glukosidáza štěpí chromogen 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glukopyranosid (X- $\beta$ -glukosid), což způsobuje modré až modrozelené zbarvení kolonií. Některé druhy listerií (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*) tvoří kolem kolonií neprůhlednou (žlutou) „halo“ zónu působením fosfolipázy C, která hydrolyzuje fosfatidylinositol. Obě média mají inhibiční systém znemožňující v prvních 24 hodinách inkubace růst jiných bakterií. Kultivace probíhá při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin, narostlé kolonie mohou být určeny jako *L. monocytogenes*. Pokud během 24 hodin nenarostou typické kolonie, kultivace pokračuje dalších 12–24 hodin, kdy tvoří kolonie také *L. ivanovii*. Pokud kolonie narostou je nutné rozlišit tyto dva druhy listerií pomocí L.Monodisk testu. V něm se *L. ivanovii* projeví na rozdíl od *L. monocytogenes* žlutým zbarvením (Leclercq 2004; Blažková et al. 2005).

### 3.4.3 Imunochemické metody

Principem imunochemických metod je interakce mezi protilátkou a antigenem. Při těchto metodách jsou používány protilátky (polyklonální, monoklonální, rekombinantní) vytvořené proti antigením strukturám charakteristickým pouze pro bakterie rodu *Listeria*. Pomocí běžných kultivačních metod je nutné před vlastní imunodetekcí bakterie namnožit. Výhodami těchto metod jsou rychlost, jednoduchost provedení, detekce bakterií v komplexní matici, specifita, možnost stanovení velkého počtu vzorků současně. Díky relativně nízké ceně a nenáročnosti na laboratorní vybavení jsou imunochemické metody velmi rozšířené. Nevýhodou těchto metod je náročná příprava specifických protilátek, které mají vysokou afinitu k danému analytu. Kvalita těchto specifických protilátek ovlivňuje detekci. Mezi imunochemické metody patří enzymová imunoanalýza (ELISA), imunochromatografická technika na membráně (Blažková et al. 2005; Demnerová 2012).

#### 3.4.3.1 ELISA

Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA) představuje jednu z nejčastěji využívaných imunochemických metod pro detekci bakterií. Při této metodě je protilátka imobilizována na pevný nosič, následně je přidán vzorek obsahující bakterie. Dochází k interakci mikroorganismů s navázanou protilátkou. Nenavázané složky jsou odstraněny a následuje aplikace druhé protilátky, která je značená enzymem. Konečná detekce je uskutečněna enzymovou reakcí, při níž je bezbarvý substrát přeměněn na barevný produkt (Blažková et al. 2005; Gasanov et al. 2005; Demnerová 2012).

#### 3.4.3.2 Imunochromatografické testy

Imunochromatografické testy se také nazývají LFIA (Laterální průtokové imunochromatografické testy). Výhodami těchto metod je, že jsou velmi rychlé, jednoduché a nenáročné na přístrojové vybavení. Nevýhodou této metody při detekci *L. monocytogenes* je, že je potřeba určitý počet bakteriálních buněk pro získání správného výsledku. Z tohoto důvodu je potřeba obohacování vzorku pro zvýšení počtu bakteriálních buněk na detekovatelnou úroveň. Při tomto kroku dochází také k snížení obsahu ostatní mikroflóry a odstranění inhibitorů. LFIA se skládá z nitrocelulózkové membrány, tří podložek: 1) podložka, na kterou je aplikován vrozek, 2) podložka s konjugátem barevné částice s navázaným imunoreaktantem, 3) absorpční podložka, která napomáhá vztlínání vzorku.

Princip detekce LFIA spočívá v pohybu kapalného vzorku nitrocelulózkovou membránou. Na membráně je testovací linka (tzv. detekční zóna) a kontrolní linka. Na počátku membrány je nanesen testovaný vzorek. Dostává se do kontaktu s barevným konjugátem s navázanou protilátkou, rozpustí ho a společně s ním vztlínají membránou. Pokud je ve vzorku přítomen antigen, dojde ke specifické interakci s protilátkami a vytváří se imunokomplex. Ten pomocí kapilárních sil migruje porézní vrstvou nitrocelulózkové membrány až k testovací zóně. V oblasti testovací zóny interaguje imunokomplex se specifickými protilátkami, které jsou

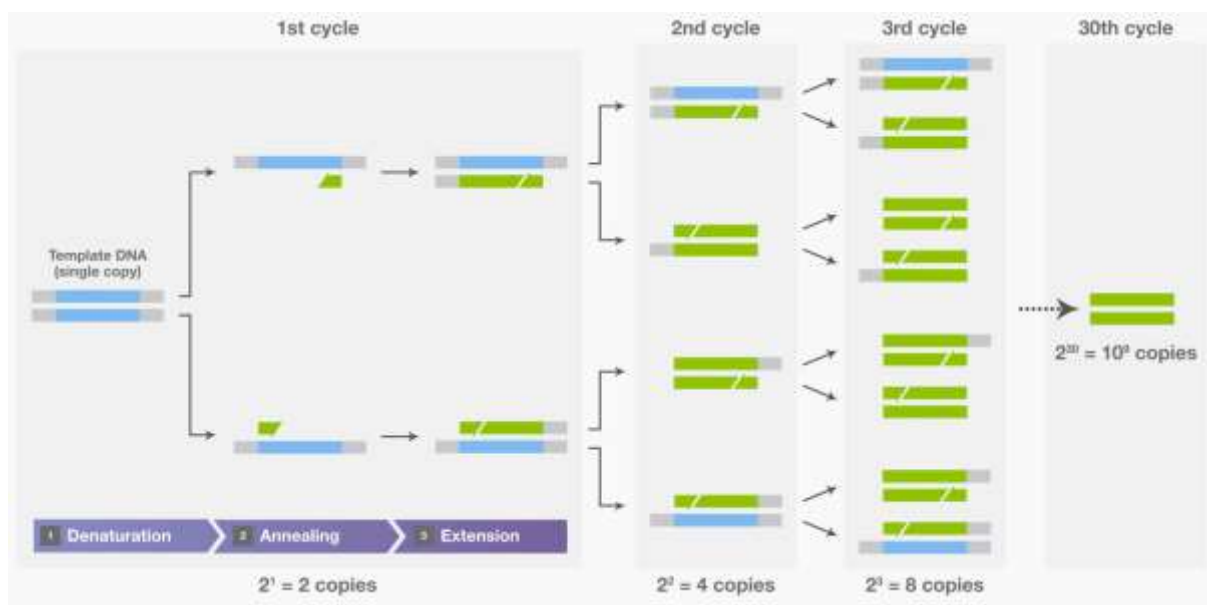
imobilizovány na membráně. Interakce se projeví vznikem barevné linky v testovací oblasti. Ke kontrole funkčnosti testu slouží tzv. kontrolní zóna. Přebytek konjugátu se dostává k této zóně a váže se na ni. Zbarvení kontrolní linky potvrzuje správný průběh detekce (Blažková et al. 2005; Göselová et al. 2014; Fogaça et al. 2021).

### 3.4.4 Molekulárně-genetické metody

Molekulárně-genetické metody patří mezi moderní metody pro stanovení mikroorganismů. Tyto metody umožňují určit mikroorganismus na základě jeho genetické informace. V případě stanovování čistých bakteriálních kultur, jsou metody vysoce citlivé, ale při stanovení v složitějších maticích (v některých potravinách) se citlivost snižuje. Z tohoto důvodu je mnohdy nezbytné mikroorganismy před vlastní analýzou separovat. K nejvýznamnějším molekulárně-genetickým metodám patří polymerázová řetězová reakce (PCR) (Blažková et al. 2005).

#### 3.4.4.1 PCR

Principem polymerázové řetězové reakce (PCR) je opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA polymerázy. Amplifikace DNA probíhá ve třech po sobě jdoucích fázích (denaturace, annealing, elongace). Tento cyklus se obvykle opakuje 25-35 x. Výsledkem je velké množství kopií původní sekvence DNA viz. obrázek č. 8. Do reakce se také zařazuje úvodní denaturace, závěrečná extenze a chlazení (Blažková et al. 2005; Gasanov et al. 2005).



Obrázek č. 8: Tři kroky PCR – opakování cyklu (Thermo Fisher Scientific).

Primery jsou krátké oligonukleotidy DNA, které ohraničují na začátku a na konci úseky DNA, jež mají být amplifikovány. Primery musí být komplementární k templátové DNA. Specifické primery jsou navrženy tak, aby umožňovaly amplifikovat pouze takový úsek DNA, který je vysoce specifický pro detekovaný organismus. Primery jsou navrhovány na základě znalosti sekvence genomové DNA a jejího porovnání s DNA ostatních mikroorganismů. Pro detekci nasynthetizovaného DNA fragmentu se nejčastěji používá elektroforéza v agarosovém gelu (Singh et al. 2014).

Nejdůležitější fází PCR reakce je annealing (nasednutí primerů). Při annealingu dochází k poklesu teploty, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa denaturované DNA. Aby primery nasedaly specificky na DNA, musí být zvolena vhodná teplota annealingu. Tato teplota závisí zejména na délce primerů a počtu GC párů v sekvenci. Čím větší délka primerů a vyšší obsah GC párů, tím je teplota nasedání vyšší. Teplotu annealingu ( $T_a$ ) lze vypočítat pomocí vzorce  $T_a = 2\text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{AT} + 4\text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{GC} - 5\text{ }^\circ\text{C}$ , kde AT představuje počet AT párů v sekvenci a GC počet párů GC v sekvenci. Vzorec lze také vyjádřit jako  $T_a = T_m - 5\text{ }^\circ\text{C}$ , kde  $T_m$  označuje teplotu tání primeru. Obsah GC párů v sekvenci primeru ovlivňuje jeho teplotu tání z důvodu přítomnosti tří vodíkových můstků ve vazbě GC. Dvojice primerů musí mít stejnou délku a počet GC párů by měl být v obou primerech srovnatelný, aby výsledná teplota byla vyhovující pro specifické nasedání obou primerů. Při nevhodně zvolené teplotě annealingu (příliš nízká teplota) může docházet k tomu, že jeden nebo oba primery nasednou na sekvence, k nimž nejsou dostatečně komplementární. Dochází k částečnému nasedání primerů či k nesprávnému párování bází. To vede k vytvoření nespécifických produktů, které jsou nežádoucí. Naopak příliš vysoká teplota může snížit účinnost reakce. Zabraňuje primerům nasednout na DNA, a kvůli tomu se vytvoří malé množství specifického produktu (Malhotra et al. 1998; Ishii & Fukui 2001; Borah 2011; Singh et al. 2014).

#### 3.4.4.2 Multiplexní PCR

Multiplexní PCR je varianta polymerázové řetězové reakce, kdy je možné přidat do reakční směsi několik párů primerů, které rozpoznávají několik rozdílných sekvencí DNA, díky čemuž je možné detekovat několik genů současně. Z důvodu použití více primerů najednou je nutné pečlivě dbát na reakční podmínky. Velmi důležitá je správná koncentrace všech složek reakční směsi a vhodně zvolené teplotní podmínky. Nejdůležitější je vhodně optimalizovat teploty nasedání primerů, aby fungovaly správně v rámci jedné reakce. Velikosti amplikonu by měly být dostatečně odlišné, aby při vizualizaci gelovou elektroforézou vytvořily dostatečně odlišné produkty s různou délkou a mobilitou (Markoulatos et al. 2002; Law et al. 2015).

### 3.5 Detekce *L. monocytogenes* pomocí PCR

Prevalence výskytu *L. monocytogenes* v potravinách je poměrně vysoká, proto je důležité optimalizovat co nejpřesnější, nejrychlejší a nejlevnější metody identifikace těchto bakterií. V několika studiích byla pomocí metody PCR zkoumána druhová identifikace listerií, identifikace jejich sérotypů a určení jejich patogenního potenciálu.

Ve studii od Liu et al.(2003b) byly vybrány čtyři geny *L. innocua* (*lin0464*, *lin0864*, *lin1451*, *lin0455*), jež by mohly vykazovat potenciál pro druhově specifickou identifikaci *L. innocua*. Od těchto genů byly odvozeny primery. Bylo zjištěno, že pouze primery odvozené od genu *lin0464* rozpoznají všechny kmeny *L. innocua*. Tuto skutečnost potvrzovala detekce PCR produktů o velikosti 749 bp u všech testovaných kmenů *L. innocua*, zatímco při použití primerů odvozených od ostatních genů se produkty u všech kmenů netvořily.

Ve studii od Das et al. (2010) byla testována funkčnost primeru LL5 a LL6 (odvozeny od genu listeriolysin O) pro identifikaci druhu *L. monocytogenes* a primery *lin0464-F* a *lin0464-R* (odvozeny od genu *lin0464*) pro identifikaci *L. innocua*. Taktéž bylo zjišťováno, zda je možné tyto primery použít v multiplexu. Při fázi annealingu byla testována nejvhodnější teplota pro nasednutí primerů v rozmezí 53-60 °C. Nejvíce specifických produktů PCR reakce bylo stanoveno při teplotě annealingu 55 °C. Přítomnost *L. monocytogenes* potvrzoval vznik produktů o velikosti 267 bp, *L. innocua* byla prokázána vznikem produktů o velikosti 749 bp. Ve studii bylo potvrzeno, že je možné použít multiplexní PCR pro diferenciaci těchto dvou druhů listerií.

Mezi další vhodné primery navržené pro identifikaci listerií patří podle studie od Somer & Kashi (2003) rodově specifické primery LIS F, LIS R a druhově specifické primery MONO5F, MONO7-F. Primery LIS F a LIS R (odvozeny z 16S rRNA) jsou rodově specifické a použitelné pro identifikaci. Přítomnost bakterií tohoto rodu je potvrzena vznikem produktů o velikosti 400 bp. Primery MONO5-F a MONO7-F (odvozeny z 16S rRNA) jsou navrženy pro identifikaci *L. monocytogenes*. Vytvořené produkty mají velikost 287 bp.

Ve studii od Doumith (2004) byla testována diference hlavních sérotypů *L. monocytogenes* pomocí multiplexní PCR. Pro identifikaci jednotlivých sérotypů byly navrženy primery. Primery lmo0737-F, lmo0737-R (odvozeny od genu *lmo0737*) sloužily k identifikaci sérotypů 1/2a, 1/2c, 3a, 3c. Velikost produktu 691 bp. Pomocí primerů lmo1118 F a lmo1118-R (odvozeny od genu *lmo1118*) byly identifikovány sérotypy 1/2c, 3c, kdy velikost produktu je při použití této dvojice primerů 906 bp. Primery ORF 2819-F, ORF2819-R (odvozeny od genu *orf 2819*) sloužily k identifikaci sérotypů 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e s velikostí produktu 471 bp. Posledními navrženými primery byly ORF2110-F a ORF 2110-R (odvozeny od genu *orf 2110*), pomocí nichž byly identifikovány sérotypy 4b, 4d, 4e s velikostí produktu 597 bp. V této studii bylo zjištěno, že pomocí takto navržené multiplexní PCR není možné od sebe rozlišit jednotlivé sérotypy. Důvodem je vytvoření produktů o stejné velikosti u některých sérotypů. Nicméně sérotypy 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d a 7 se vyskytují v potravinách velmi vzácně a jen zřídka se podílejí na vyvolání listeriózy. Hlavními sérotypy, jež se vyskytují v izolátech z potravin a způsobují listeriózu jsou 1/2a, 1/2b, 1/2c a 4b, které touto metodou identifikovat lze. Současně lze jednotlivé sérotypy spolehlivě rozdělit do 4 skupin a přiřadit je do příslušných linií viz. tabulka č. 1 str. 11. Do skupiny I.1 patří sérotypy o velikosti produktu 691 bp (1/2a, 3a). Do skupiny I.2 se řadí sérotypy o velikosti výsledného produktu 906 + 691 bp (1/2c, 3c). Do skupiny II.1 se řadí sérotypy o velikosti produktu 597 + 471 bp (4b, 4d, 4e) a do skupiny II.2 jsou řazeny sérotypy 1/2b, 3b, 7, velikost produktu 471 bp. Sérotypy skupin I.1 a I.2 patří do linie I (resp. II) a sérotypy ze skupin II.1 a II.2 do linie II (resp. I).

Kmeny *L. monocytogenes* vykazují značně kolísavý patogenní potenciál. Některé kmeny mají patogenní potenciál a mohou způsobovat onemocnění případně úmrtí. Oproti tomu jsou i kmeny, jež jsou avirulentní a relativně neškodné. Ve studii od Liu et al. (2003a) byly nalezeny geny, které byly přítomny pouze ve virulentních kmenech *L. monocytogenes*. Na základě sekvencí těchto genů byly navrženy PCR primery pro jejich selektivní detekci. Jedním z genů, které spolehlivě určovaly patogenní potenciál byl gen *lmo2821* někdy označovaný jako *inlJ*, kódující protein internalin J, který se účastní invaze listerií do buňky.

Ve studii od Liu et al. (2007) bylo zjišťováno, zda je možné současně určit druhovou identitu a patogenní potenciál *L. monocytogenes*. Byla zkoumána možnost použití primerů pro identifikaci *L. monocytogenes* (*inlA*-F, *inlA*-R) v multiplexu s primery (*inlC*-F, *inlC*-R, *inlJ*-F, *inlJ*-R) odvozenými od genů virulence. Při použití *inlA* primerů byla druhová identita *L. monocytogenes* potvrzena vznikem PCR produktu o velikosti 800 bp. Patogenní potenciál těchto kmenů byl potvrzen vznikem produktů o velikosti 517 bp nebo 238 bp při použití primerů *inlC*-F, *inlC*-R a *inlJ*-F, *inlJ*-R v multiplexu. Výsledky této studie potvrzují, že kombinace *inlA*, *inlC* a *inlJ* primerů v multiplexu umožňuje rychlé a současné potvrzení druhové identity *L. monocytogenes* a její patogenní potenciál. Primery *inlA*-F a *inlA*-R jsou odvozeny od genu *inlA*, který kóduje druhově specifický povrchový protein internalin A, který hraje zásadní roli při vstupu *L. monocytogenes* do hostitelských buněk. Primery *inlC*-F, *inlC*-R, *inlJ*-F, *inlJ*-R jsou odvozeny od genů *inlC* a *lmo2821* (*inlJ*), které kódují proteiny internaliny, které představují virulentní faktory.

Praktická část diplomové práce vychází z výše uvedených studií.

## 4 Metodika

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo nalezení vhodných primerů a optimalizace PCR podmínek pro spolehlivou identifikaci druhů listerií, zejména *L. monocytogenes*, vyskytujících se ve vzorcích potravin. Optimalizací PCR podmínek se rozumí určení správných koncentrací komponentů PCR reakce, úprava teplot a počtu cyklů v PCR programu, tak aby při reakci vznikal zcela specifický produkt. Používané primery a teplotní podmínky byly převzaty z článků (Liu et al. 2003a, 2003b, 2007; Somer & Kashi 2003; Doumith et al. 2004; Das et al. 2010). Pro identifikace izolátů byly využity různé dvojice primerů za účelem výběru nejvhodnější varianty z hlediska jednoduchosti použití a přípravy, časové nenáročnosti a zejména spolehlivosti. Jako referenční kmeny *L. monocytogenes* byly použity osekvenované kmeny 6, 26, 29, 41, 42, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 107, 108 a sbírkový kmen *L. monocytogenes* ATCC 7644. Jako referenční kmeny *L. innocua* byly použity osekvenované kmeny 8, 109, 110, 111, 112 a sbírkový kmen *L. innocua* 6515.

První fází byla příprava čistých kultur, ze kterých byla následně izolována DNA. Dále byly pomocí PCR identifikovány druhy listerií. U kultur, které byly identifikovány jako *L. monocytogenes* byly následně pomocí PCR stanoveny sérotypy a patogenní potenciál jednotlivých kmenů.

### 4.1 Izolace kmenů listerií

Celkem bylo analyzováno 251 vzorků potravin živočišného a rostlinného původu. Stanovení listerií probíhalo metodou průkazu dle normy ČSN EN ISO 11290-1. Po inkubaci na selektivním médiu byly izolovány kolonie charakteristické pro *L. monocytogenes*, převedeny do bujónu z mozkosrdcové infúze (BHI – Brain heart infusion) a kultivovány (37 °C, 24 hodin). Čistota kultur byla stanovena pod mikroskopem. Získané kmeny byly nejdříve identifikovány pomocí MALDI-TOF (Salmonová et al. 2018). Tato identifikace probíhala na úrovni rodu, kdy bylo zjištěno, zda jsou ve vzorcích přítomny listerie či nikoliv. Následně u kmenů, které byly identifikovány jako rod *Listeria* byla izolována DNA. Celkem byla DNA izolována ze 118 kmenů.

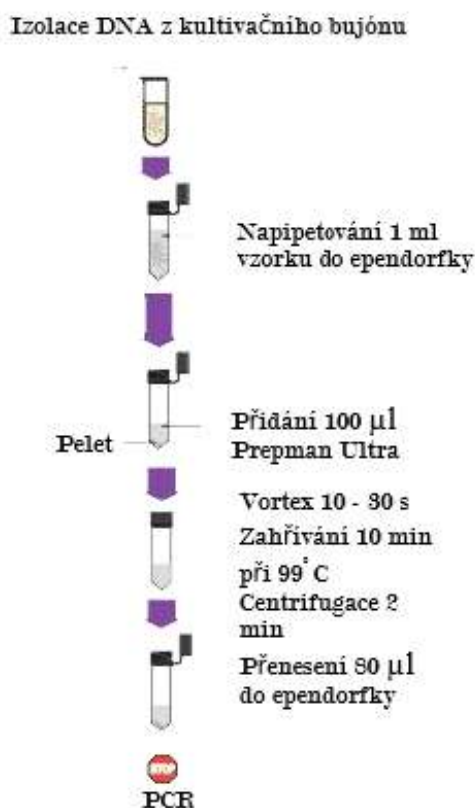
### 4.2 Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS

Do sterilní mikrozkušavky byl převeden 1 ml čisté narostlé kultury. Vzorek byl centrifugován při rychlosti 14 500 otáček/min po dobu 2 minut. Supernatant byl odstraněn pomocí pipety a k peletu bylo přidáno 0,5 ml 70% etanolu. Poté byl pelet v etanolu pomocí pipety resuspendován (promíchán) a následně znovu centrifugován při stejných otáčkách po stejnou dobu. Supernatant byl znovu odstraněn pipetou. K peletu bylo přidáno 10 µl 70% kyseliny mravenčí a 10 µl 100% acetonitrilu. Po přidání každé složky byla směs důkladně resuspendována pipetou a následně i zvortexována. Po promíchání byl vzorek opět centrifugován při 14 500 otáčkách/min po dobu 2 minut. 1 µl supernatantu byl nanesen ve dvou opakováních na čistou MALDI destičku, na které se nechal při pokojové teplotě uschnout. Ihned po zaschnutí supernatantu byly jednotlivé vzorky překryty 1 µl MALDI matrice ( $\alpha$ -kyano-4-hydroxycinnamová kyselina). Připravená destička byla vložena do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF MS.

### 4.3 Izolace DNA

Pro izolaci DNA bylo použito preparační činidlo PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific).

Do sterilní mikrozkušavky o objemu 2 ml byl napipetován 1 ml čerstvě narostlé kultury. Vzorek byl centrifugován při rychlosti 14 500 otáček/min po dobu 2 minut. Došlo k oddělení supernatantu a peletu. Supernatant byl pomocí pipety odstraněn. K peletu bylo přidáno 100  $\mu$ l činidla PrepMan Ultra. Vzorek byl zvortexován po dobu 10-30 vteřin. V termostatu (ThermoStat plus, Eppendorf) byl vzorek zahříván 10 minut při teplotě 99 °C, čímž bylo dosaženo popraskání buněk a uvolnění DNA do roztoku. Následovalo zchlazení vzorku na pokojovou teplotu po dobu 2 minut. Byla zopakována centrifugace vzorku při rychlosti 14 500 otáček/ min po dobu 2 minut. Do sterilní eppendorfky bylo přeneseno 80  $\mu$ l vzniklého supernatantu. Takto byla získána DNA, která byla používána v dalších částech experimentu. Celý postup izolace DNA schématicky znázorňuje obrázek č. 9.



Obrázek č. 9: Schéma izolace DNA (Thermo Fisher Scientific)



#### 4.4 Druhová identifikace listerií pomocí PCR

Všechny PCR reakce probíhaly v termocykleru C 1000 Touch (BIO-RAD) v celkovém objemu amplifikační směsi 25 µl. Pro identifikace bakterií rodu *Listeria* byly zvoleny primery LIS F a LIS R (Somer & Kashi 2003). Pro identifikaci druhů listerií byly použity primery LL5 a LL6 pro *Listeria monocytogenes* (Das et al. 2010) a pro *Listeria innocua* byly použity primery lin0464F a lin0464R (Liu et al. 2003b). Dalšími druhově specifickými primery pro *Listeria monocytogenes* byly zvoleny MONO 5-F a MONO 7-F (Somer & Kashi 2003) a inlA-F a inlA-R (Liu et al. 2007). V našich pokusech bylo zjišťováno, jaké primery jsou nejvíce specifické pro druh listerií. V tabulce č. 2 jsou podrobněji popsány použité primery. Funkčnost těchto primerů byla ověřována na vybraných kmenech pomocí sekvenace 16S rRNA (Salmonová et al. 2018).

Tabulka č. 2: Přehled použitých primerů při identifikaci listerií

| Název primeru | Určeno pro                                  | Sekvence primeru 5' - 3' | Velikost produktu (bp) | Citace               |
|---------------|---|--------------------------|------------------------|----------------------|
| LL5           | <i>L. monocytogenes</i>                     | AACCTATCCAGGTGCTC        | 267                    | (Das et al. 2010)    |
| LL6           | <i>L. monocytogenes</i>                     | CTGTAAGCCATTTCGTC        |                        |                      |
| lin0464F      | <i>L. innocua</i>                           | CGCATTTATCGCCAAACTC      | 749                    | (Liu et al. 2003b)   |
| lin0464R      | <i>L. innocua</i>                           | TCGTGACATAGACGCGATTG     |                        |                      |
| LIS F         | <i>Listeria</i> sp.                         | AGCTTGCTCTTCCAAAGT       | 400                    |                      |
| LIS R         | <i>Listeria</i> sp.                         | AAGCAGTTACTCTTATCCT      |                        |                      |
| MONO5-F       | <i>L. monocytogenes</i><br>sérotyp 4a       | GCTAATACCGAATGATAAGA     | 287                    | (Somer & Kashi 2003) |
| MONO7-F       | <i>L. monocytogenes</i><br>ostatní sérotypy | GGCTAATACCGAATGATGAA     |                        |                      |
| inlA- F       | <i>L. monocytogenes</i>                     | ACGAGTAACGGGACAAATGC     | 800                    | (Liu et al. 2007)    |
| inlA- R       | <i>L. monocytogenes</i>                     | CCCGACAGTGGTGCTAGATT     |                        |                      |

#### 4.4.1 Složení reakční směsi

V našich experimentech byl použit komerčně vyráběný master mix DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), který obsahuje všechny potřebné komponenty pro PCR reakci (DNA polymerázy, pufr, MgCl<sub>2</sub> a dNTP).

Jednotlivé primery byly získány od firmy Eurofins Scientific a připraveny podle instrukcí. Poslední složkou reakční směsi byla izolovaná DNA. Specifické primery pro druhy listerií byly optimalizovány samostatně. Následně pro rychlejší identifikaci byl použit multiplex viz. tabulka č. 3. U všech pokusů byl použit základní poměr komponentů, a to konkrétně 12,5 µl master mixu, 1 µl každého primeru a doplnění PCR vody (Thermo Fisher Scientific) do objemu 23 µl. K takto smíchanému mixu byly přidány 2 µl DNA. DNA byla nejprve zvortexována, stočena a poté napipetována. Tabulka č. 3 přibližuje jednotlivé reakční směsi, jež byly použity pro identifikaci druhu listerií.

Tabulka č. 3: Použité reakční směsi

| Mix   | Reakční směs |           |      |          |      | Citace   |
|-------|--------------|-----------|------|----------|------|--|
|       | Master mix   | Primery   |      | PCR voda | DNA  |  |
|       | (µl)         | název     | (µl) | (µl)     | (µl) |  |
| Mix 1 | 12,5         | LL5       | 1    | 8,5      | 2    | (Das et al. 2010)  |
|       |              | LL6       | 1    |          |      |  |
| Mix 2 | 12,5         | lin0464F  | 1    | 8,5      | 2    | (Liu et al. 2003b)   |
|       |              | lin0464R  | 1    |          |      |  |
| Mix 3 | 12,5         | LL5       | 1    | 6,5      | 2    | (Liu et al. 2003b;<br>Das et al. 2010)                           |
|       |              | LL6       | 1    |          |      |  |
|       |              | lin0464F  | 1    |          |      |  |
|       |              | lin0464R  | 1    |          |      |  |
| Mix 4 | 12,5         | LL5       | 1    | 4,5      | 2    | (Liu et al. 2003b;<br>Somer & Kashi<br>2003; Das et al.<br>2010) |
|       |              | LL6       | 1    |          |      |  |
|       |              | lin0464-F | 1    |          |      |  |
|       |              | lin0464-R | 1    |          |      |  |
|       |              | LIS-F     | 1    |          |      |  |
| LIS-R | 1            |           |      |          |      |  |
| Mix 5 | 12,5         | MONO5-F   | 1    | 8,5      | 2    | (Somer & Kashi<br>2003)  |
|       |              | MONO7-F   | 1    |          |      |  |
| Mix 6 | 12,5         | MONO5-F   | 1    | 6,5      | 2    | (Somer & Kashi<br>2003)  |
|       |              | MONO7-F   | 1    |          |      |  |
|       |              | LIS-F     | 1    |          |      |  |
|       |              | LIS-R     | 1    |          |      |  |

#### 4.4.2 Teplotní profil

V našich prvních pokusech byla testována funkčnost druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6) a pro *L. innocua* (lin0464F, lin0464R), jež byly nejprve testovány každá dvojice zvlášť a následně v podobě multiplexu (tabulka č.3) Byl testován teplotní profil uvedený v tabulce č. 4. První fáze tzv. úvodní denaturace probíhala při 95 °C po dobu 3 minut. V druhé fázi probíhala denaturace při 94 °C po dobu 45 sekund. Při fázi annealingu byla testována nejvhodnější teplota pro nasednutí primerů v rozmezí 53-60 °C. Pomocí teplotního gradientu po 2 °C byla optimalizována teplota této fáze, která probíhala 45 sekund. Elongace probíhala při 72 °C dobu 45 sekund. Tento proces měl 29 cyklů. V poslední fázi tzv. závěrečná extenze při 72 °C po dobu 5 minut a následné chlazení po při 10 °C (Das et al. 2010).

Tabulka č. 4: Teplotní profil při testování funkčnosti primeru LL5, LL6, lin0464F, lin0464R (Das et al. 2010).

| Fáze              | Počet opakování | Teplota (°C) | Čas   |
|-------------------|-----------------|--------------|-------|
| Úvodní denaturace | 1x              | 95           | 3 min |
| Denaturace        | 29x             | 94           | 45 s  |
| Annealing         |                 | 53/55/57/60  | 45 s  |
| Elongace          |                 | 72           | 45 s  |
| Závěrečná extenze | 1x              | 72           | 5 min |
| Chlazení          | 1x              | 10           | ∞     |

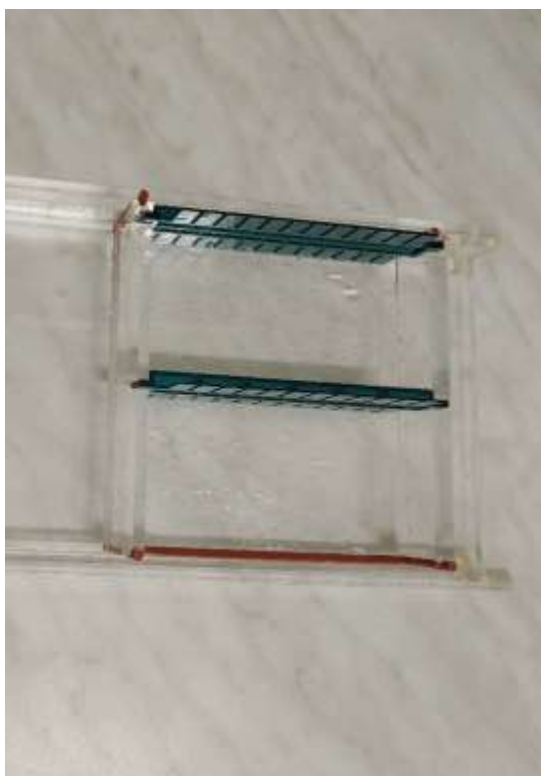
V dalších pokusech byly použity druhově specifické primery pro *L. monocytogenes* (MONO5-F, MONO7-F) a rodově specifické primery (LIS F, LIS R). Nejprve byl vyzkoušen teplotní profil z předchozích pokusů (Das et al. 2010), bylo ovšem zjištěno, že tyto primery vyžadují jiné teplotní podmínky. Z tohoto důvodu byl vyzkoušen teplotní profil z původního článku viz. tabulka č. 5. Úvodní denaturace probíhala při 95 °C po dobu 5 minut. Denaturace při 95 °C po dobu 45 sekund, annealing při 58 °C po dobu 45 sekund, elongace při 72 °C po dobu 45 sekund. Cyklus byl opakován 25 x. Závěrečná extenze probíhala při 72 °C po dobu 7 minut a chlazení při 10 °C (Sommer & Kashi 2003).

Tabulka č. 5: Teplotní profil při testování funkčnosti primeru MONO5-F, MONO7-F, LIS F, LIS R (Somer & Kashi 2003).

| Fáze              | Počet opakování | Teplota (°C) | Čas   |
|-------------------|-----------------|--------------|-------|
| Úvodní denaturace | 1x              | 95           | 5 min |
| Denaturace        | 25x             | 95           | 45 s  |
| Annealing         |                 | 58           | 45 s  |
| Elongace          |                 | 72           | 45 s  |
| Závěrečná extenze | 1x              | 72           | 7 min |
| Chlazení          | 1x              | 12           | ∞     |

#### 4.4.3 Detekce PCR produktů

Při identifikaci druhu listerií byly DNA fragmenty vzniklé PCR reakcí detekovány pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu. Pro přípravu gelu byl do 300 ml Erlenmeyerovy baňky naváženo 1 g agarózy, který byl zalit 100 ml připraveného pufru. Pro přípravu pufru bylo napipetováno 15 ml Pufr-D-TAE (SERVA) a zředěno 985 ml deionizované vody ošetřené UV zářením. Vzniklá směs v Erlenmeyerově baňce byla za občasného míchání rozpouštěna v mikrovlnné troubě po dobu 3 minut. Následně bylo k roztoku přidáno 5  $\mu$ l Gel red (Millipore) vizualizačního činidla. Roztok byl nalit do elektroforetické vaničky s dvěma hřebínky, které v gelu zanechaly jamky pro dávkování amplifikovaných vzorků viz. obrázek č. 10.



Obrázek č. 10: Elektroforetická vanička

Po ztuhnutí gelu byly PCR produkty nanášeny do jednotlivých jamek v objemu 5  $\mu$ l. Jako standard byl použit GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder nebo GeneRuler DNA Ladder mix (Thermo Fisher Scientific), který byl nanášen v objemu 2,5  $\mu$ l.

Elektroforéza proběhla za stálého napětí 110 V po dobu 35 minut. Délka migrace DNA byla závislá na velikosti separovaných fragmentů. Separace probíhala, dokud molekuly nedoputovaly do 2/3 až 3/4 gelu. Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen na UV vizualizér (Biorad Universe Hood II Gel Doc Systém). Specifické PCR produkty byly vizualizovány pomocí UV světla. Pomocí programu Quality one (BIO-RAD) byl výsledek zdokumentován a uložen.

## 4.5 Identifikace sérotypů *L. monocytogenes* pomocí PCR

Při identifikaci sérotypů *L. monocytogenes* byly zvoleny primery specifické pro sérotypy 1/2a, 3a, 1/2c, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R) (Doumith et al. 2004). V našich pokusech bylo zjišťováno, zda je možné pomocí těchto primerů identifikovat sérotypy *L. monocytogenes*. Zvolené primery byly specifické pro jednotlivé linie sérotypů *L. monocytogenes*. V tabulce č. 6 jsou popsány primery a jejich specifčnost při určování sérotypů.

Tabulka č. 6: Přehled použitých primerů při identifikaci sérotypů listerií (Doumith et al. 2004).

| Název primeru | Sérotyp <i>L. monocytogenes</i> | Sekvence primeru 5' - 3' | Velikost produktu (bp) |
|---------------|---------------------------------|--------------------------|------------------------|
| lmo0737-F     | 1/2 a, 3a                       | AGGGCTTCAAGGACTTACCC     | 691                    |
| lmo0737-R     |                                 | ACGATTTCTGCTTGCCATTC     |                        |
| lmo1118-F     | 1/2c, 3c                        | AGGGGTCTTAAATCCTGGAA     | 906                    |
| lmo1118-R     |                                 | CGGCTTGTTTCGGCATACTTA    |                        |
| ORF2819-F     | 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e            | AGCAAAATGCCAAACTCGT      | 471                    |
| ORF2819-R     |                                 | CATCACTAAAGCCTCCCATTG    |                        |
| ORF2110-F     | 4b, 4d, 4e                      | AGTGGACAATTGATTGGTGAA    | 597                    |
| ORF2110-R     |                                 | CATCCATCCCTTACTTTGGAC    |                        |

Jako u předchozích pokusů byl použit základní poměr komponentů, konkrétně 12,5 µl master mixu, 1 µl každého primeru a doplnění PCR vody (Thermo Fisher Scientific) do objemu 23 µl. Následně byly k takto smíchanému mixu přidány 2 µl DNA. Při identifikaci sérotypů listerií byl používán Mix obsahující všechny námi testované primery, tedy lmo0737-F, lmo0737-R, lmo1118-F, lmo1118-R, ORF2819-F, ORF2819-R, ORF2110-F, ORF2110-R. Postup přípravy vzorků pro PCR reakci byl totožný s předchozími pokusy.

### 4.5.1 Teplotní profil

Při identifikaci sérotypů byla v našich laboratorních podmínkách zavedena a ověřena metoda podle Doumith et al. (2004). V tabulce č. 7 je shrnut použitý teplotní profil. Úvodní denaturace probíhala při 95 °C po dobu 3 minut. V druhé fázi probíhala denaturace při 94 °C po dobu 24 sekund, annealing při 53 °C po dobu 69 sekund a elongace při 72 °C po dobu 69 sekund. Proces měl 35 cyklů. Závěrečná extenze probíhala při 72 °C po dobu 7 minut a následné chlazení při 12 °C.

Tabulka č. 7: Teplotní profil při identifikaci sérotypů listerií (Doumith et al. 2004).

| Fáze              | Počet opakování | Teplota (°C) | Čas   |
|-------------------|-----------------|--------------|-------|
| Úvodní denaturace | 1x              | 94           | 3 min |
| Denaturace        | 35x             | 94           | 24 s  |
| Annealing         |                 | 53           | 69 s  |
| Elongace          |                 | 72           | 69 s  |
| Závěrečná extenze | 1x              | 72           | 7 min |
| Chlazení          | 1x              | 12           | ∞     |

### 4.5.2 Detekce PCR produktů

DNA fragmenty vzniklé PCR reakcí byly separovány pomocí elektroforézy v 1 % agarózovém gelu a vizualizovány UV světlem pomocí UV vizualizéru. Příprava gelu byla totožná jako v pokusech zmiňovaných výše. Jako standard byl použit GeneRuler DNA Ladder mix nebo GeneRuler 1kb Plus v objemu 2,5 µl. Elektroforéza proběhla za stálého napětí 110 V po dobu 60 minut a 130 V po dobu 60 minut.

Fragmenty DNA byly také detekovány v 1,5 % agarózovém gelu, kdy elektroforéza probíhala při 80 V po dobu 90 minut. V průběhu experimentů byl také místo původního vizualizačního činidla použit SYBR (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific). Pro tvorbu jamek byly použity široké i tenké hřebínky.

## 4.6 Určení patogenního potenciálu pomocí PCR

Na základě studií od (Liu et al. 2003a, 2007) bylo zkoušeno, zda mají naše vyizolované listerie patogenní potenciál. V prvních pokusech byla na několika vzorcích ověřována funkčnost druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (inlA-F, inlA-R) a primerů určených pro detekci genů virulence (inlC-F, inlC-R) (Liu et al. 2007) při jejich odděleném použití. Následně byly tyto primery použity v multiplexu a bylo ověřováno, zda budou primery fungovat při společném použití. Dalšími primery specifickými pro detekci genů virulence byly lmo2821-F, lmo2821-R (Liu et al. 2003a), pomocí kterých byl zjišťován patogenní potenciál u všech našich vzorků. V tabulce č. 8 jsou podrobněji popsány použité primery.

Tabulka č. 8: Přehled použitých primerů při testování patogenního potenciálu listerií

| Název primeru | Určeno pro                              | Sekvence primeru 5' - 3' | Velikost produktu (bp) | Citace             |
|---------------|---|--------------------------|------------------------|--------------------|
| inlA-F        | Identifikace<br><i>L. monocytogenes</i> | ACGAGTAACGGGACAAATGC     | 800                    | (Liu et al. 2007)  |
| inlA-R        |   | CCCGACAGTGGTGCTAGATT     |                        |                    |
| inlC-F        | geny virulence                          | AATCCCACAGGACACAACC      | 517                    |                    |
| inlC-R        |   | CGGGAATGCAATTTTTCACTA    |                        |                    |
| lmo2821-F     |   | TGTAACCCCGCTTACACAGTT    | 611                    | (Liu et al. 2003a) |
| lmo2821-R     |   | TTACGGCTGGATTGTCTGTG     |                        |                    |



#### 4.6.1 Teplotní profil

Teplotní podmínky pro PCR byly použity podle Liu et al. (2003a). Úvodní denaturace probíhala při 94 °C po dobu 2 minut. Denaturace při 94 °C po dobu 20 sekund, annealing při 60 °C po dobu 20 sekund a elongace při 72 °C po dobu 45 sekund. Proces měl 25 cyklů. Závěrečná extenze probíhala při 72 °C po dobu 2 minut a následné chlazení při 12 °C. V níže uvedené tabulce č. 9 je shrnut použitý teplotní profil.

Tabulka č. 9: Teplotní profil při testování patogenního potenciálu listerií (Liu et al. 2003a).

| Fáze              | Počet opakování | Teplota (°C) | Čas   |
|-------------------|-----------------|--------------|-------|
| Úvodní denaturace | 1x              | 94           | 2 min |
| Denaturace        | 25x             | 94           | 20 s  |
| Annealing         |                 | 60           | 20 s  |
| Elongace          |                 | 72           | 45 s  |
| Závěrečná extenze | 1x              | 72           | 2 min |
| Chlazení          | 1x              | 12           | ∞     |

#### 4.6.2 Detekce PCR produktů

Stejně jako u předešlých pokusů byly DNA fragmenty detekovány pomocí elektroforézy v 1 % agarózovém gelu. Bylo přidáno vizualizační činidlo Gel red v objemu 5 µl. Jako standard byl použit GeneRuler Mix v objemu 2,5 µl. V pokusech, v nichž byla současně zkoumána identifikace i virulence elektroforéza probíhala za stálého napětí 110 V po dobu 60 minut. Při použití primeru lmo2821-F a lmo2821-R elektroforéza probíhala při 110 V po dobu 35 minut.

## 5 Výsledky

Cílem této diplomové práce bylo nalezení vhodných primerů a optimalizace PCR podmínek pro spolehlivou identifikaci druhů listerií, zejména *L. monocytogenes*, vyskytujících se ve vzorcích potravin. Pro výše zmíněný experiment bylo vybráno 118 kmenů, z nichž byla izolována DNA. Pro kontrolu funkčnosti vybraných primerů byly některé kmeny sekvenovány pomocí 16S rRNA.

Dále byly v experimentální části této diplomové práce identifikovány sérotypy listerií pomocí PCR metody a byl určován jejich patogenní potenciál.

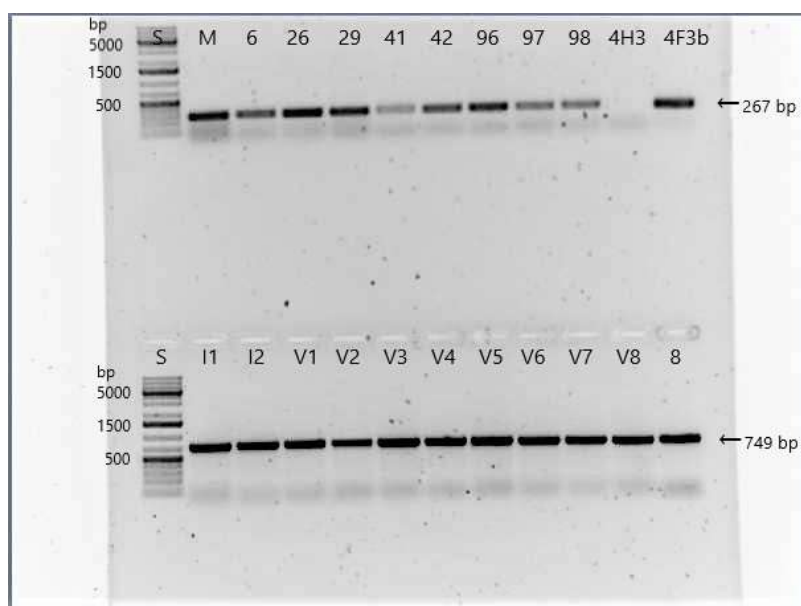
### 5.1 Druhovú identifikace listerií pomocí PCR

Byla optimalizována PCR pro druhově specifické primery pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6) a pro *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R). Byl optimalizován teplotní profil pro správný průběh PCR reakce. Pomocí teplotního gradientu po 2 °C byla optimalizována teplota fáze annealingu. Nejvhodnější teplota pro nasednutí primerů při použití obou párů primerů byla stanovena na 55 °C. Při 55 °C vznikaly specifické produkty (bandy) pouze u druhu *L. monocytogenes* při použití primerů LL5 a LL6 nebo *L. innocua* při použití dvojice lin0464-F a lin0464-R. Při použití negativní kontroly produkty nevznikaly. Následně jsme tento teplotní profil použili pro identifikaci neznámých kmenů. V tabulce č. 10 je uvedený výsledný použitý teplotní profil.

Tabulka č. 10: Výsledný teplotní profil při testování funkčnosti druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6) a pro *L. innocua* (lin0464F, lin0464R)

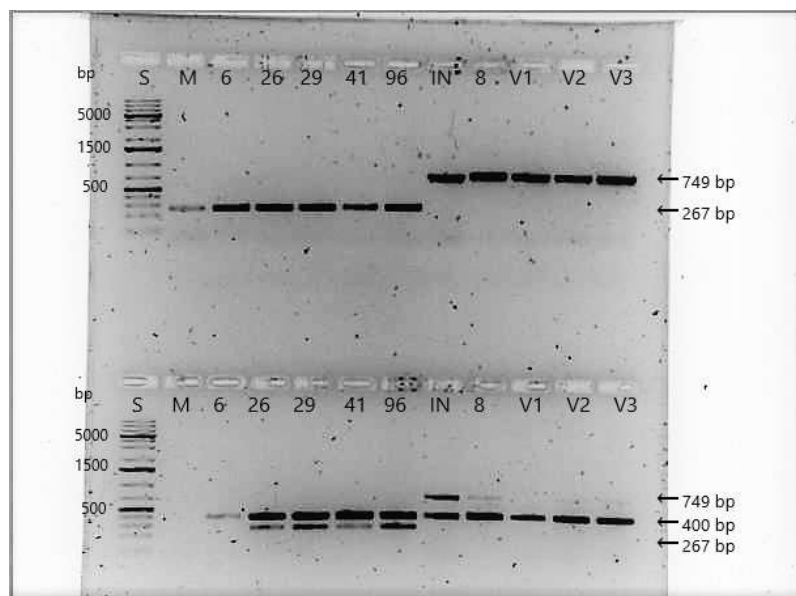
| Fáze              | Počet opakování | Teplota (°C) | Čas   |
|-------------------|-----------------|--------------|-------|
| Úvodní denaturace | 1x              | 95           | 3 min |
| Denaturace        | 29x             | 94           | 45 s  |
| Annealing         |                 | 55           | 45 s  |
| Elongace          |                 | 72           | 45 s  |
| Závěrečná extenze | 1x              | 72           | 5 min |
| Chlazení          | 1x              | 10           | ∞     |

Příklad výsledného elektroforeogramu je na obrázku č. 11. Pomocí druhově specifických primerů LL5 a LL6 byla druhová příslušnost k *L. monocytogenes* potvrzena u referenčních kmenů: *L. monocytogenes* ATCC 7644, 6, 26, 29, 41, 42, 96, 97, 98, vznikl očekávaný produkt o velikosti 267 bp. Dále bylo s použitím této dvojice primerů identifikováno jako *L. monocytogenes* dalších 50 kmenů izolovaných z potravin. Pomocí druhově specifických primerů lin0464-F a lin0464-R byla druhová příslušnost k *L. innocua* potvrzena u referenčních kmenů: *L. innocua* 6515, 8, 109, 110, 111, 112, vznikl specifický produkt o velikosti 749 bp. Dále bylo identifikováno dalších 10 kmenů.



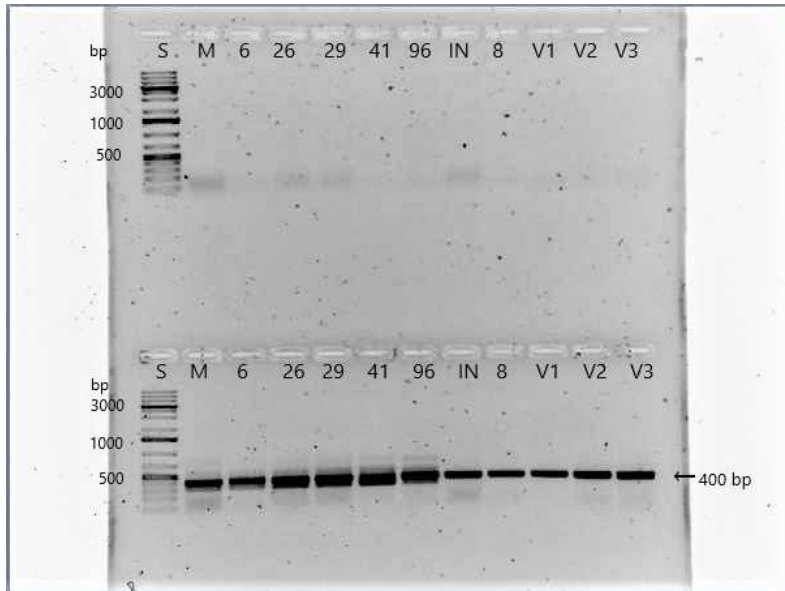
Obrázek č.11: Vizualizace produktů PCR při použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6): M= *L. monocytogenes* ATCC 7644, 6, 26, 29, 41, 42, 96, 97, 98, 4H3, 4F3 a při použití druhově specifických primerů pro *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R): I1, I2, V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, 8); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.

V další fázi byly použity druhově specifické primery v multiplexu, tedy v jedné PCR reakci. Na obrázku č. 12 je patrné, že i při použití v multiplexu byly získány produkty o očekávané velikosti. V další fázi byl do multiplexu přidán pár primerů rodově specifický (LIS-F, LIS-R). U některých kmenů použití druhově a rodově specifických primerů v multiplexu fungovalo, u některých ne. Byly získány produkty pro rod *Listeria*, ale druhově specifické produkty nebyly u všech kmenů dobře viditelné.



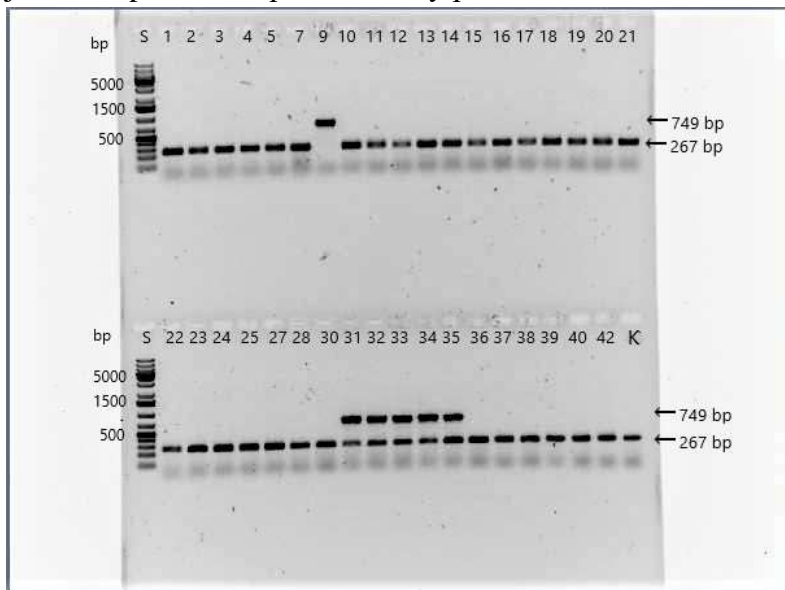
Obrázek č. 12: Vizualizace produktů PCR. Horní část obrázku: při použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6) a pro *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R). Dolní část obrázku: při použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6) a pro *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R) a při použití rodově specifických primerů pro *Listeria* (LIS-F, LIS-R); DNA izolována z kmenů *L. monocytogenes*: M= *L. monocytogenes* ATCC 7644, 6, 26, 29, 41, 96, DNA izolována z kmenů *L. innocua*: IN= *L. innocua* 6515, 8, V1, V2, V3; standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

Dalšími druhově specifickými primery pro *L. monocytogenes* byly zvoleny MONO5-F a MONO7-F. Bylo zjištěno, že ani při použití různých annealingových teplot nevzniká požadovaný produkt. Při použití těchto primerů v multiplexu s rodově specifickými primery LIS-F a LIS-R vznikaly rodově specifické produkty, ale druhově specifické produkty nevznikaly, viz. obrázek č. 13



Obrázek č. 13: Vizualizace produktů PCR. Horní část obrázku: při použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (MONO5-F, MONO7-F). Dolní část obrázku: při použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (MONO5-F, MONO7-F) a při použití rodově specifického páru primerů pro *Listeria* (LIS-F, LIS-R); DNA izolována z kmenů *L. monocytogenes*: M= *L. monocytogenes* ATCC 7644, 6, 26, 29, 41, 96, DNA izolována z kmenů *L. innocua*: IN= *L. innocua* 6515, 8, V1, V2, V3; standard: GeneRuler DNA Ladder mix

Z výše získaných výsledků bylo zjištěno, že pro spolehlivou druhovou identifikaci listerií, vyskytujících se ve vzorcích potravin, je nejvhodnější použít druhově specifické primery pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6) a druhově specifické primery pro *L. innocua* (lin0464F, lin0464R) v multiplexu. Následně byla tato kombinace primerů použita při identifikaci dalších neznámých kmenů. Vznikly produkty o očekávané velikosti. Z celkového počtu neznámých kmenů bylo 84 kmenů identifikováno jako *L. monocytogenes* a 3 kmeny jako *L. innocua*. U 5 kmenů vznikly bandy specifické pro oba druhy. U 3 kmenů nevznikly žádné produkty. Příklad výsledného elektroforeogramu je na obrázku č. 14. Ostatní elektroforeogramy jsou k dispozici v kapitole Přílohy pod označením Příloha 1, 2.



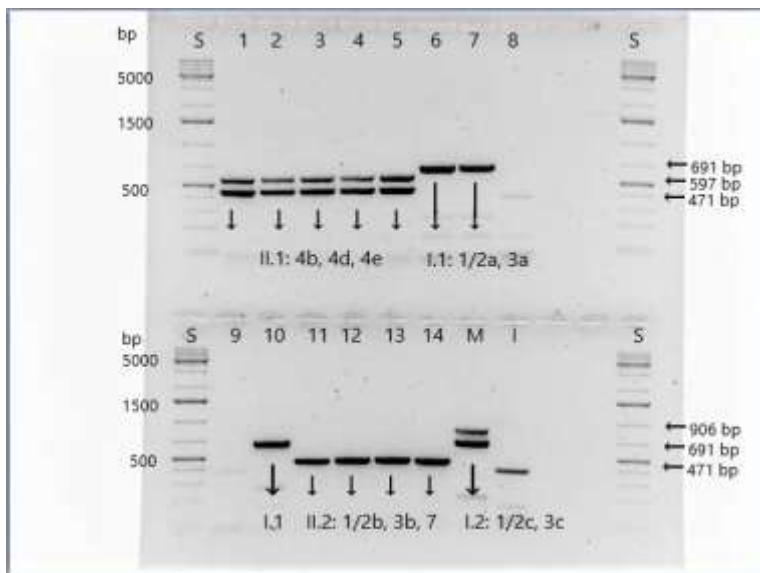
Obrázek č.15: Vizualizace produktů PCR při použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6); produkt o velikosti 267 bp) a pro *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R; produkt o velikosti 749 bp); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

## 5.2 Identifikace sérotypů *L. monocytogenes* pomocí PCR

Byla testována možnost použití primerů pro identifikaci sérotypů listerií v podmínkách naší laboratoře. Při rozlišení jednotlivých sérotypů byly použity primery specifické pro sérotypy 1/2a, 3a, 1/2c, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R, produkt o velikosti 691 a 906 bp), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R, produkt o velikosti 906 bp), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R, produkt o velikosti 471 bp), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R, produkt o velikosti 597 bp). Nejprve detekce proběhla pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu při 110 V po dobu 60 minut. Jako standard byl použit standard GeneRuler DNA Ladder mix. Při dělení v těchto podmínkách bylo patrné, že během PCR vznikaly produkty (viz. Příloha 3). Jejich dělení ovšem neprobíhalo optimálním způsobem, proto bylo potřeba optimalizovat průběh dělení v elektroforetickém gelu.

V přílohách jsou uvedeny elektroforeogramy při použití 130 V po dobu 60 minut (Příloha 4) a 130 V po dobu 45 minut (Příloha 5), kde je patrné, že nedocházelo k optimálnímu dělení produktů. Nejvhodnější bylo použití elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu při 80 V po dobu 90 minut. Jako standard byl použit GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder. Při těchto podmínkách došlo k optimálnímu dělení produktů, což je vidět na obrázku č. 16. Vznikaly produkty o očekávané velikosti. Tyto podmínky elektroforézy byly použity při rozlišení sérotypů u dalších kmenů, viz. Příloha 6, 7, 8, 9, 10.

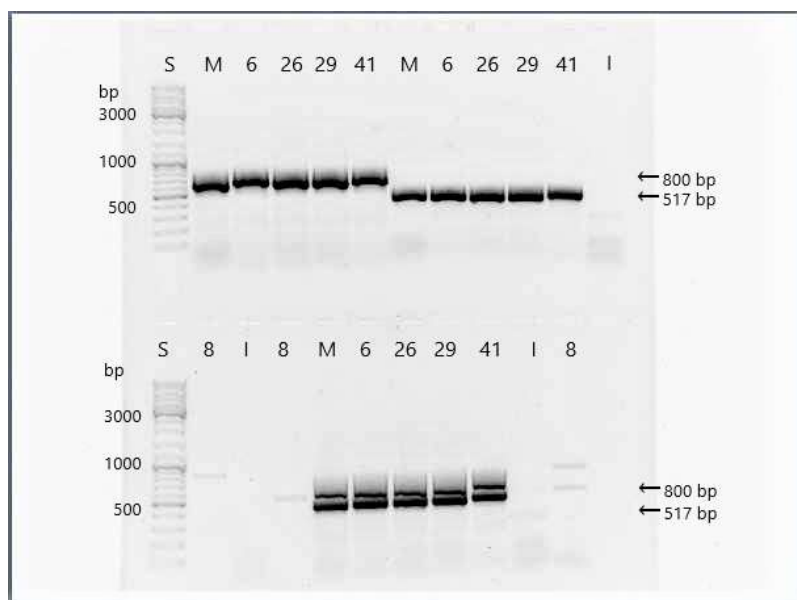
Celkově bylo identifikováno 28 kmenů *L. monocytogenes* příslušících do fylogenetické skupiny II, jednalo se tedy o sérotyp 1/2a nebo 3a. 21 kmenů příslušelo do fylogenetické skupiny I.2 (sérotyp 1/2c nebo 3c), 18 kmenů patřilo do skupiny II.1 (sérotyp 4b, 4d nebo 4e) a dalších 20 kmenů do skupiny II.2 (sérotyp 1/2b, 3b nebo 7).



Obrázek č. 16: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro sérotypy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

### 5.3 Určení patogenního potenciálu pomocí PCR

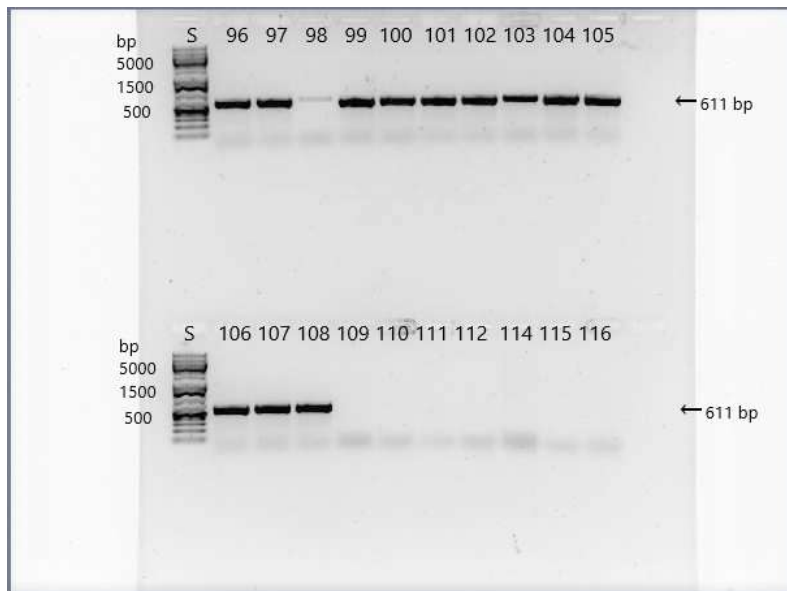
Byla testována možnost použití primerů pro určení patogenního potenciálu listerií v podmínkách naší laboratoře. Bylo zjištěno, že vznikají produkty o očekávané velikosti, jak při odděleném použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (inlA-F, inlA-R) a primerů specifických pro detekci genů virulence (inlC-F, inlC-R), tak při jejich použití v multiplexu, viz. obrázek č. 17.



Obrázek č. 17: Vizualizace produktů PCR. Horní část obrázku: při odděleném použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (inlA-F, inlA-R) a primerů specifických pro detekci genů virulence (inlC-F, inlC-R). Dolní část obrázku: při použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (inlA-F, inlA-R) a primerů specifických pro detekci genů virulence (inlC-F, inlC-R) v multiplexu; DNA izolována z kmenů *L. monocytogenes*: M= *L. monocytogenes* ATCC 7644, 6, 26, 29, 41, 96, DNA izolována z kmenů *L. innocua*: IN= *L. innocua* 6515, 8; standard: GeneRuler DNA Ladder mix



Dále byly při určování patogenního potenciálu neznámých kmenů listerií použity primery specifické pro detekci genů virulence (lmo2821-F, lmo2821-R). Vznikaly produkty o očekávané velikosti (611 bp) u kmenů s patogenním potenciálem. 84 kmenů mělo faktory virulence. 3 neznámé kmeny neměly patogenní potenciál. Příklad elektroforeogramu je na obrázku č. 18. Další elektroforeogramy jsou uvedeny v kapitole Přílohy pod označením Příloha 11, 12, 13



Obrázek č. 18: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro detekci genů virulence (lmo2821-F, lmo2821-R; produkt o velikosti 611 bp); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

V tabulce č. 11 je znázorněn souhrnný přehled získaných výsledků.

Tabulka č. 11: Souhrnný přehled získaných výsledků

|  | Počet kmenů |
|--|-------------|
| Celkově izolováno  | 118         |
| Referenční kmeny   | 21          |
| Neznámé kmeny  | 97          |
| Identifikováno jako <i>L. monocytogenes</i>                                | 84          |
| Identifikováno jako <i>L. innocua</i>                                      | 3           |
| Produkty specifické pro <i>L. monocytogenes</i><br>i pro <i>L. innocua</i> | 5           |
| Neidentifikováno   | 3           |
| Fylogenetická skupina I.1 (sérotyp 1/2a<br>nebo 3a)                        | 28          |
| Fylogenetická skupina I.2 (sérotyp 1/2c<br>nebo 3c)                        | 21          |
| Fylogenetická skupina II.1 (sérotyp 4b, 4d<br>nebo 4e)                     | 18          |
| Fylogenetická skupina II.2 (sérotyp 1/2b,<br>3b nebo 7)                    | 20          |
| Faktory virulence  | 84          |
| Bez faktorů virulence  | 3           |

Celkem byla DNA izolována ze 118 kmenů. Z toho 21 kmenů bylo referenčních, 97 kmenů bylo neznámých. 84 kmenů bylo identifikováno jako *L. monocytogenes* a vykazovaly patogenní potenciál. 3 kmeny byly identifikovány jako *L. innocua*. U 5 kmenů vznikly bandy specifické pro oba druhy. U 3 kmenů nevznikly žádné produkty. 28 kmenů *L. monocytogenes* bylo identifikováno jako příslušící do fylogenetické skupiny II, jednalo se tedy o sérotyp 1/2a nebo 3a. 21 kmenů příslušelo do fylogenetické skupiny I.2 (sérotyp 1/2c nebo 3c), 18 kmenů patřilo do skupiny II.1 (sérotyp 4b, 4d nebo 4e) a dalších 20 kmenů do skupiny II.2 (sérotyp 1/2b, 3b nebo 7).

Potraviny, v nichž byly kmeny identifikovány jako rod *Listeria*, a následně u nich byla izolována DNA, jsou například: Spišské párky, salám Vysočina, tatarák, feferonky se sýrem naložené v oleji, mleté maso, čajovka, vege burger, vege mleté maso, cibuláček, drůbeží klobása s chedarem a jalapeños, Bukovánek sýrový, salát holandský, hermelínový salát.

## 6 Diskuze

Listerie jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterie ve tvaru pravidelných tyčinek. Tyto bakterie jsou odolné vůči extrémním podmínkám prostředí. Jsou schopny zpomaleného růstu při chladírenských teplotách, tj. pod 7 °C, tolerují široký rozsah pH a koncentraci soli kolem 10 %. Tyto organismy jsou schopny přežít v podobě biofilmů v potravinářských podnicích, kde ulpívají na zařízeních, následně může dojít ke kontaminaci produktů. Mezi úzce příbuzné druhy patří *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* a *L. grayi*. *L. monocytogenes* je pro člověka patogenní. Způsobuje nepříliš časté, ale velmi vážné onemocnění zvané listerióza. Z tohoto důvodu je velmi důležité mít zavedené spolehlivé metody jejich detekce, identifikace a stanovení patogenního potenciálu. Hlavní zdrojem nákazy bývá kontaminovaná potrava. Mezi potraviny, v nichž se listerie nejčastěji vyskytují patří například syrové maso vepřové či hovězí, mleté maso, paštiky, mléko, sýry, syrová krájená zelenina, lahůdkářské výrobky. K nejrizikovějším potravinám obecně patří potraviny s vysokým stupněm opracování a potraviny určené k přímé spotřebě (Gandhi & Chikindas 2007; Carpentier & Cerf 2011; Schardt et al. 2017; Bhunia 2018).

Cílem této práce bylo nalezení vhodných primerů a optimalizace PCR podmínek pro spolehlivou identifikaci druhů listerií vyskytujících se v potravinách. V první fázi bylo důležité optimalizovat podmínky PCR pro rodově a druhově specifické primery. Nejprve byla optimalizována PCR pro druhově specifické primery pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6) a pro *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R). Dále bylo testováno, zda je možné tyto primery použít v multiplexu. Ukázalo se, že tyto primery navržené autory (Liu et al. 2003b; Das et al. 2010) jsou aplikovatelné pro podmínky naší laboratoře. Stejně jako ve studii od (Das et al. 2010) bylo potvrzeno, že je možné použít multiplexní PCR pro diferenciaci *L. monocytogenes* a *L. innocua*.

V další fázi byly rodově specifické primery (LIS-F, LIS-R) navržené (Sommer & Kashi 2003) přidány do multiplexu druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6) a pro *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R). Bylo testováno, zda kombinace těchto primerů v multiplexu bude vhodná pro současnou spolehlivou rodovou a druhovou identifikaci. Ukázalo se, že u některých kmenů použití těchto rodově a druhově specifických primerů v multiplexu fungovalo, u některých ne. U kmenů, u nichž se nepodařilo identifikovat o jaký rod a druh se jedná, mohlo dojít k tomu, že DNA byla degradovaná nebo jí bylo ve vzorku málo. Z tohoto důvodu by bylo vhodné pokus zopakovat a optimalizovat podmínky, například zvýšit koncentraci DNA. Předpokládá se, že zvýšením koncentrace DNA by reakce proběhla optimálněji a vznikaly by čitelné specifické produkty.

Dalšími druhově specifickými primery pro *L. monocytogenes* byly zvoleny MONO5-F a MONO7-F. Při použití této dvojice bylo zjištěno, že ani při použití různých annealingových teplot nevzniká požadovaný produkt. Nepodařilo se nalézt vhodný teplotní profil pro optimální průběh PCR reakce v podmínkách naší laboratoře. V tomto případě nedošlo ke shodě s výsledky autorů (Somer & Kashi 2003), kteří navrhli tuto dvojici primerů pro identifikaci listerií. Pravděpodobně při námi zvoleným teplotním profilu PCR reakce nedošlo při fázi annealingu ke správnému nasednutí primerů.

Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že v podmínkách naší laboratoře je pro spolehlivou druhovou identifikaci listerií nejvhodnější použít druhově specifické primery pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6) a druhově specifické primery pro *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R) v multiplexu. Tato kombinace primerů byla následně použita při identifikaci dalších neznámých kmenů. Vznikaly produkty o očekávané velikosti. Použití této dvojice primerů se jeví jako vhodné pro spolehlivou druhovou identifikaci. Přestože se tato kombinace primerů ukázala jako vhodná pro druhovou identifikaci, u některých kmenů vznikaly produkty specifické pro oba druhy. Pravděpodobně mohlo jít o směsnou kulturu a testovaný vzorek byl kontaminován. Důvodem této možné kontaminace je to, že je velmi obtížné tyto kultury rozizolovat. Tyto dva druhy jsou úzce příbuzné a přísluší k stejnému rodu. Na základě genetické příbuznosti a stejných fenotypových vlastnostech jsou tyto dva druhy řazeny do stejné skupiny tzv. „*Listeria sensu stricto*“. *L. monocytogenes* a *L. innocua* mají stejné kultivační podmínky. V takovémto případě je problematické následné rozlišení. Z tohoto důvodu je nutné dané kmeny přečistit a zopakovat jejich identifikaci.

V laboratoři katedry Mikrobiologie, výživy a dietetiky byly některé kmeny identifikovány pomocí metody MALDI-TOF MS. Metoda MALDI-TOF MS se stala standardním nástrojem pro spolehlivou a rychlou identifikaci mikroorganismů v různých klinických a potravinářských laboratořích (Ojima-Kato et al. 2016). Bylo zjištěno, že tato metoda nemá u rodu *Listeria* dostatečnou rozlišovací schopnost pro spolehlivou identifikaci na úroveň druhu. Některé kmeny byly původně pomocí MALDI-TOF MS identifikovány jako *L. monocytogenes*, avšak analýza DNA pomocí druhově specifických primerů ukázala, že se jedná o druh *L. innocua* a naopak. U některých kmenů se ukázalo, že se jedná o jiné druhy. Metoda MALDI-TOF MS je v případě identifikace druhů bakterií z rodu *Listeria* užitečná pro předběžnou identifikaci na rodovou úroveň. Druhová identifikace listerií metodou MALDI-TOF MS není stoprocentní. Z tohoto důvodu je zapotřebí, pro přesnou a spolehlivou identifikaci druhů bakterií z rodu *Listeria*, ověřit získané výsledky pomocí jiných metod. V našich pokusech byly získané výsledky metodou MALDI-TOF MS ověřovány metodou PCR a následně byly výsledky porovnávány. U druhů bakterií, které jsou úzce příbuzné jako bakterie rodu *Listeria*, je důležité zavedení přístupu použití více identifikačních postupů, tzv. polyfázický přístup. Použití pouze jedné metody nemusí vždy poskytovat spolehlivé výsledky a identifikace poté nemusí být přesná. Pro spolehlivou identifikaci je potřeba použít více postupů. Kromě PCR metody je možné zavedení například sérologické typizace, sekvenace 16S rRNA. Metoda identifikace kultur pomocí PCR, kdy bylo dosaženo až stoprocentní spolehlivosti identifikace pomocí druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6) a pro *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R), byla vyhodnocena jako spolehlivější než MALDI-TOF MS. Zároveň je tato metoda levnější a rychlejší než biochemické testy a sekvenace 16S rRNA.

V další fázi bylo úkolem zavést použití primerů specifických pro sérotypy 1/2a, 3a, 1/2c, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R) pro podmínky naší laboratoře. Byly optimalizovány podmínky pro PCR při použití těchto primerů, můžeme je tedy použít pro identifikaci sérotypů listerií. Ukázalo se, že primery navržené autory (Doumith et al. 2004) jsou aplikovatelné pro podmínky naší laboratoře. Také byl optimalizován průběh dělení v elektroforéze. Stanovení podmínek detekce pomocí elektroforézy není vždy jednoduché. V případě, že je očekáván pouze jeden produkt, stanovení podmínek není obtížné. Nedochozí k dělení produktů, očekávaný produkt pouze vznikne či nikoliv. Problém může nastat, když je očekáván vznik více produktů. Tyto produkty mohou mít podobnou velikost a jejich oddělení není jednoduché. V tomto případě je potřeba optimalizovat podmínky dělení. Například změnit koncentraci agarózového gelu. Koncentrace gelu závisí na typu fragmentů DNA, které se separují. Bylo zjištěno, že při identifikaci sérotypů je vhodnější pro oddělení daných produktů změnit koncentraci agarózového gelu 1% na agarózový gel 1,5%. Pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů se do jedné jamky nanáší tzv. velikostní marker (standard) o definované velikosti jednotlivých fragmentů. Zvolit vhodný standard je pro odhad velikosti vzniklých produktů důležité. Pro vizualizaci separovaných fragmentů DNA je potřeba zvolit vhodné vizualizační činidlo. V našich pokusech bylo zjištěno, že pro detekci sérotypů pomocí elektroforézy je lepší použít místo běžně používaného vizualizačního činidla GelRed barvivo SYBR Green. Při použití tohoto vizualizačního činidla byly produkty více kompaktní a dobře čitelné. V neposlední řadě je třeba nastavit vhodné napětí a dobu, po kterou bude k oddělování docházet. Bylo zjištěno, že spuštění elektroforézy při 80 V po dobu 90 minut je pro tuto identifikaci nejvhodnější. Pomocí takto navržené multiplexní PCR není možné od sebe rozlišit jednotlivé sérotypy. Lze je ale spolehlivě rozdělit do čtyř fylogenetických skupin a přiřadit je do příslušných linií. Pomocí výše zmíněných primerů pro identifikaci sérotypů bylo identifikováno 28 kmenů *L. monocytogenes* příslušících do fylogenetické skupiny II. Může se jednat o sérotyp 1/2a nebo 3a. Vzhledem k tomu, že v potravinách se sérotyp 3a vyskytuje velmi vzácně, naopak sérotyp 1/2a patří mezi hlavní sérotypy, jež se vyskytují v izolátech potravin, předpokládáme, že u těchto identifikovaných kmenů se jedná o sérotyp 1/2a. Dále bylo identifikováno 21 kmenů příslušících do fylogenetické skupiny I.2, do níž jsou řazeny sérotypy 1/2c a 3c. Sérotyp 3c se stejně jako sérotyp 3a v potravinách vyskytuje vzácně a sérotyp 1/2c často. Z tohoto důvodu se předpokládá, že se jedná o sérotyp 1/2c. 18 kmenů patřilo do skupiny II.1, do níž patří sérotypy 4b, 4d a 4e. V potravinách se sérotypy 4d a 4e vyskytují zřídka, kdežto sérotyp 4b patří mezi hlavní sérotypy vyskytující se v izolátech potravin. Na základě toho je předpokládáno, že u námi identifikovaných kmenů se jedná o sérotyp 4b. Bylo identifikováno dalších 20 kmenů příslušících do skupiny II.2, do níž patří sérotypy 1/2b, 3b a 7. Sérotypy 3b a 7 se v potravinách vyskytují vzácně, předpokládáme tedy, že se jedná o sérotyp 1/2b. Sérotypy 1/2b a 4b jsou řazeny do linie II (resp. I), která má nejvyšší patogenní potenciál a bývají nejčastější příčinou onemocnění vyvolaných bakterií *L. monocytogenes*. Sérotypy 1/2a a 1/2c přísluší do linie I (resp. II), mají střední patogenní potenciál a vyskytují se především v kontaminovaných potravinách.

Dále byly zavedeny primery pro určení patogenního potenciálu listerií v podmínkách naší laboratoře. Ukázalo se, že primery navržené (Liu et al. 2007) jsou aplikovatelné pro podmínky naší laboratoře. Byla potvrzena možnost současného použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (inlA-F, inlA-R) a primerů určených pro detekci genů virulence (inlC-F, inlC-R) v multiplexu pro současné potvrzení druhové identity *L. monocytogenes* a jejího patogenního potenciálu. Dále bylo potvrzeno, že je možné při určování patogenního potenciálu neznámých kmenů listerií, v podmínkách naší laboratoře, použít primery (lmo2821-F, lmo2821-R) navržené autory (Liu et al. 2003a). V našich pokusech 84 kmenů z 97 neznámých kmenů bylo identifikováno jako *L. monocytogenes* a vykazovaly patogenní potenciál. Kmeny listerií s patogenním potenciálem byly izolovány z různých potravin. Například: Spišské páry, salám Vysočina, tatarák, feferonky se sýrem naložené v oleji, mleté maso, čajovka, vege burger, vege mleté maso, cibuláček, drůbeží klobása s chedarem a jalapeños, Bukovánek sýrový, salát holandský, hermelínový salát. Ke kontaminaci těchto potravin mohlo dojít v potravinářských podnicích či na prodejnách, kde se výrobky dávkuje například, dle požadavků zákazníka do menších balení. Vzhledem k tomu, že listerie mohou způsobovat vážné onemocnění, je zapotřebí, aby byly v potravinářských provozech dodržovány zásady, kterými jsou například: prověřování a revize postupů založených na principech HACCP stanovených pro výrobu potravin z hlediska výskytu *L. monocytogenes*; ověřování, zda výrobky, které představují riziko výskytu *L. monocytogenes* pro veřejné zdraví, odpovídají předepsaným mikrobiologickým kritériím; vyloučení možnosti sekundární kontaminace hotových výrobků. K výrobě zejména rizikových potravin, by měly být používány suroviny od prověřených dodavatelů. V neposlední řadě je velmi důležité důsledné dodržování osobní hygieny zaměstnanců. Spotřebitelé by měli v rámci prevence proti listerióze dodržovat základní požadavky osobní hygieny a bezpečné manipulace s potravinami (SZPI 2015).

Z důvodu poměrně vysoké prevalence výskytu *L. monocytogenes* v potravinách, je důležité optimalizovat co nejrychlejší, nejpresnější a nejlevnější metody identifikace těchto bakterií. V této diplomové práci bylo zjištěno, že vhodnou metodou pro spolehlivou identifikaci listerií je metoda PCR.

## 7 Závěr

- Byly nalezeny dostatečně specifické PCR primery pro spolehlivou rodovou a druhovou identifikaci listerií izolovaných ze vzorků potravin.
- Bylo zjištěno, že použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* a pro *L. innocua* v multiplexu představuje rychlou a spolehlivou metodu jejich identifikace. Stejně je tomu při použití primerů specifických pro sérotypy listerií. Multiplexní PCR zefektivňuje proces identifikace.
- Po zavedení těchto primerů byly optimalizovány podmínky pro správný průběh PCR reakce v podmínkách naší laboratoře. Nalezené primery mohou být použity pro druhovou identifikaci listerií, identifikaci sérotypů listerií a pro určení jejich patogenního potenciálu.
- Celkově bylo izolováno ze vzorků potravin (např. salám Vysočina, mleté maso, čajovka, cibuláček, feferonky se sýrem naložené v oleji, hermelínový salát, salát holandský, vege burger, Bukovánek sýrový) 118 kmenů listerií, které byly identifikovány jako *L. monocytogenes* (84 kmenů), *L. innocua* (3 kmeny).

## 8 Literatura

- Allerberger F. 2003. *Listeria*: growth , phenotypic differentiation and molecular microbiology. FEMS Immunology & Medical Microbiology **35**: 183-189.
- Allerberger F, Wagner M. 2010. Listeriosis: A resurgent foodborne infection. Clinical Microbiology and Infection **16**:16–23. European Society of Clinical Infectious Diseases. Available from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x>.
- Barre L, Angelidis AS, Boussaid D, Decourseulles E, Manso E, Gnanou N. 2016. Applicability of the EN ISO 11290-1 standard method for *Listeria monocytogenes* detection in presence of new *Listeria* species. International Journal of Food Microbiology **238**:281-287. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.028>.
- Bartt R. 2000. *Listeria* and atypical presentation of *Listeria* in the central nervous system. Seminars in Neurology. Georg Thieme Verlag KG, New York.
- Bhunia AK. 2018. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis, 2nd edition. Springer Science+ Business Media, New York.
- Blažková M, Karamonová L, Fukal L, Rauch P. 2005. *Listeria monocytogenes*- Nebezpečný patogen a jeho detekce v potravinách. Chemické listy:467–473.
- Borah P. 2011. Primer designing for PCR. Science Vision **11**:134–136.
- Bortolussi R. 2008. Listeriosis: a primer. CMAJ **179**:795–797.
- Borucki MK, Call DR. 2003. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. Journal of Clinical Microbiology **41**:5537–5540.
- Bruno Jr JC, Freitag NE. 2010. Constitutive activation of PrfA tilts the balance of *Listeria monocytogenes* fitness towards life within the host versus environmental survival. PLOS ONE 5(12): e15138. Available from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015138>
- Brychta J. 2018. Výskyt *Listeria monocytogenes* v potravinách a riziko onemocnění pro člověka. 1.vydání. Praha. ISBN: 9788088019312
- Carpentier B, Cerf O. 2011. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. International Journal of Food Microbiology **145**:1–8. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>.
- Coelho MC, Silva CCG, Ribeiro SC, Dapkevicius MLNE, Rosa HJD. 2014. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology **191**:53–59. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029>.
- Coillie E van, Werbrouck H, Heyndrickx M, Herman L, Rijpens N. 2004. Prevalence and typing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food products on the Belgian market **67**:2480–2487.
- Colagiorgi A, Bruini I, Di Ciccio PA, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. 2017. *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry.
- Cossart P, Lebreton A. 2014. A trip in the “new Microbiology” with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. FEBS Letters **588**:2437–2445.
- Das S, Surendran P, Thampuran N. 2010. Detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by multiplex PCR. Fishery Technology **47**:91–94.



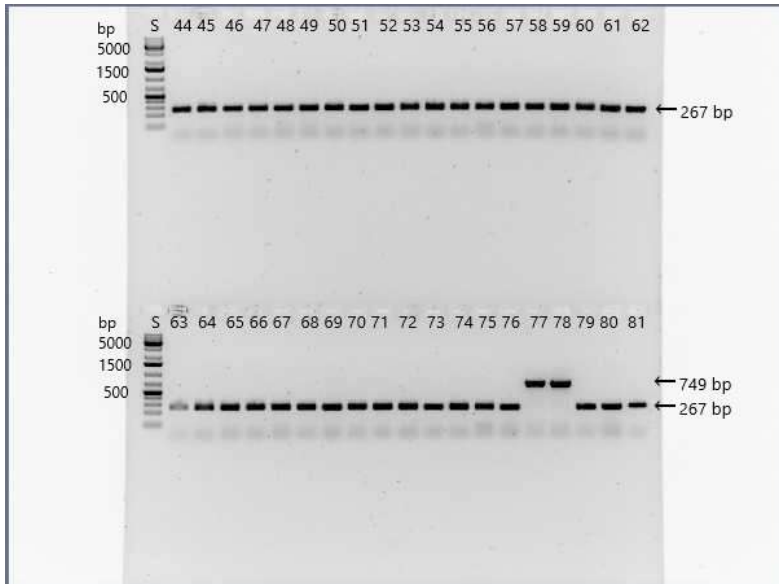
- Demnerová K. 2012. Mikrobiologická bezpečnost potravin: Současné strategie pro efektivní kontrolu. *Chemické listy* **106**:920–925.
- Doganay M. 2003. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **35**:173–175.
- Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* **8**:881–890.
- Donovan S. 2015. Listeriosis: A rare but deadly disease. *Clinical Microbiology Newsletter* **37**:135-140. Elsevier Inc. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2015.08.001>
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:3819–3822.
- ECDC. 2019. Surveillance Atlas of Infectious Diseases. Available from <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=33>.
- EFSA, ECDC. 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA JOURNAL* **16**.
- Fernández Guerrero ML, Torres R, Mancebo B, González-López JJ, Górgolas M, Jurdado JJ, Roblas RF. 2012. Antimicrobial treatment of invasive non-perinatal human listeriosis and the impact of the underlying disease on prognosis. *Clinical Microbiology and Infection* **18**:690–695.
- Ferreira V, Wiedmann M, Teixeira P, Stasiewicz MJ. 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection* **77**:150–170.
- Fogaça MBT, Bhunia AK, Lopes-Luz L, de Almeida EPRP, Vieira JDG, Bühner-Sékula S. 2021. Antibody and nucleic acid-based lateral flow immunoassay for *Listeria monocytogenes* detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **413**:4161–4180.
- Gandhi M, Chikindas ML. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* **113**:1–15.
- Gasnov U, Hughes D, Hansbro PM. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews* **29**:851–875.
- Gelbíčková T, Karpíšková R. 2011. Využití metody PCR-RFLP invazivních kmenů. *Chemické listy*:702–706.
- Gérard A, El-Hajjaji S, Niyonzima E, Daube G, Sindic M. 2018. Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese — A review. *Dairy Technology* **71**:825–843.
- Göselová S, Blažková M, Holubová B, Karamonová L, Rauch P. 2014. Imunodetekce v laterálním toku na membráně. *Chemické Listy* **108**:114–119.
- Ishii K, Fukui M. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:3753–3755.
- Jami M, Ghanbari M, Zunabovic M, Domig KJ, Kneifel W. 2014. *Listeria monocytogenes* in aquatic food products — A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**.

- Janakiraman V. 2008. Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment, and prevention. *Reviews in obstetrics & gynecology* **1**:179-185. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19173022> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2621056>.
- Kramarenko T, Roasto M, Meremäe K, Kuningas M, Põltasama P, Elias T. 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* **30**:24–29.
- Law JW, Mutalib NA, Chan K, Lee L, Lee L. 2015. An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food **6**:1–15.
- Leclercq A. 2004. Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid 'L' mono and ALOA solid media. *Journal of Microbiological Methods* **57**:251–258.
- Lecuit M, Cossart P. 2001. *L.monocytogenes*. *Molecular Medical Microbiology* **1**:1437–1455.
- Lee Wong AC. 1998. Biofilms in food processing environments. *Journal of Dairy Science* **81**:2765–2770. Elsevier. Available from [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75834-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75834-5).
- Liu D. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology* **55**:645–659.
- Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML. 2003a. Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. *Journal of Medical Microbiology* **52**:1065–1070.
- Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML. 2003b. Identification of *Listeria innocua* by PCR targeting a putative transcriptional regulator gene. *FEMS Microbiology Letters* **223**:205–210.
- Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ. 2007. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods* **71**:133–140.
- Lorber B. 2005. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **24**:854.
- Lungu B, Ricke SC, Johnson MG. 2009. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe* **15**:7–17. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.08.001>.
- Malhotra K, Foltz L, Mahoney WC, Schueler PA. 1998. Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **26**:854–856.
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. **16**: 47-51
- Marth EH, Steele JL. 2001. *Applied dairy microbiology*, 2nd edition.
- McMullen PD, Freitag NE. 2014. *Listeria monocytogenes*. Page *Molecular Medical Microbiology: Second Edition*. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00074-3>.

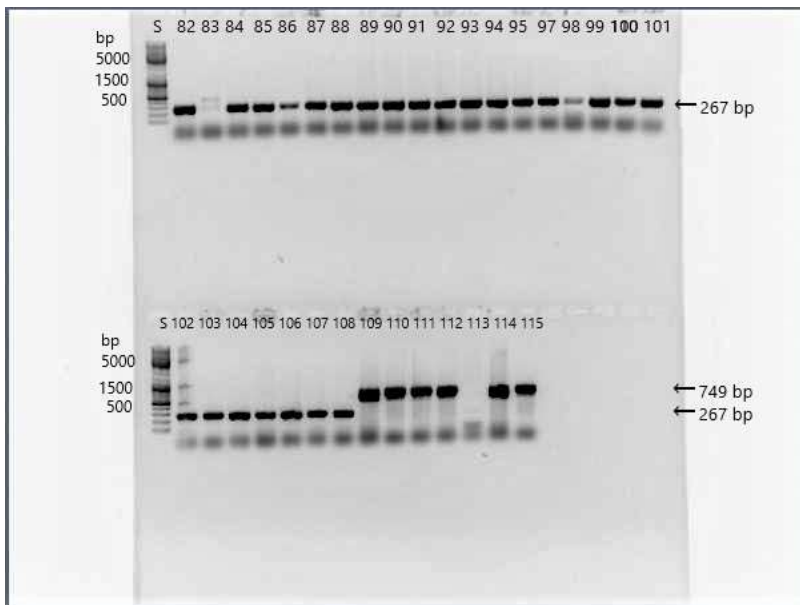
- McNeill C, Sisson W, Jarrett A. 2017. Listeriosis: A resurfacing menace. *Journal for Nurse Practitioners* **13**:647-654. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2017.09.014>.
- Midelet G, Carpentier B. 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes* from various materials to beef. *Microbiology* **68**:4015–4024.
- Møretrø T, Langsrud S. 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* **1**:107–121.
- Nadon CA, Woodward DL, Young C, Rodgers FG. 2001. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes* **39**:2704–2707.
- Nolan DA, Chamblin DC, Troller JA. 1992. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology* **16**:323–335.
- O’Toole G, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* **54**:49–79.
- Ojima-Kato T, Yamamoto N, Takahashi H, Tamura H. 2016. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) can precisely discriminate the lineages of *Listeria monocytogenes* and species of *Listeria*. *PLoS ONE* **11**:1–13.
- Orsi RH, Bakker HC Den, Wiedmann M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages : Genomics , evolution , ecology , and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology* **301**:79-96. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.05.002>.
- Pritchard TJ, Flanders KJ, Donnelly CW. 1995. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. *International Journal of Food Microbiology* **26**:375–384.
- Salmonová H, Killer J, Bunešová V, Geigerová M, Vlková E. 2018. Cultivable bacteria from *Pectinatella magnifica* and the surrounding water in South Bohemia indicate potential new Gammaproteobacterial, Betaproteobacterial and Firmicutes taxa. *FEMS Microbiology Letters* **365**:1–10.
- Saltijeral JA, Alvarez VB, Garcia B. 1999. Presence of *Listeria* in Mexican cheeses. *Journal of Food Safety* **19**:241–247.
- Schardt J, Jones G, Müller-Herbst S, Schauer K, D’Orazio SEF, Fuchs TM. 2017. Comparison between *Listeria sensu stricto* and *Listeria sensu lato* strains identifies novel determinants involved in infection. *Scientific Reports* **7**:1–14.
- Schlech WF. 2000. Special section: food safety. *Clinical Infectious Diseases* **31**:770–775. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913408>.
- Schwartzman MS, Gonzalez-Barron U, Butler F, Jordan K. 2014. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear- or mold-ripened cheese. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
- Singh J, Birbian N, Sinha S, Goswami A. 2014. A critical review on PCR, its types and applications. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* **1**:65–80.
- Sleator RD, Gahan CGM, Hill C. 2003. A Postgenomic appraisal of osmotolerance in. *Microbiology* **69**:1–9.

- Somer L, Kashi Y. 2003. A PCR method based on 16S rRNA sequence for simultaneous detection of the genus *Listeria* and the species *Listeria monocytogenes* in food products. *Journal of Food Protection* **66**:1658–1665.
- SZPI. 2015. Prevence onemocnění z potravin: Listeriόza. Available from <https://www.szpi.gov.cz/clanek/prevence-onemocneni-z-potravin-listerioza.aspx>.
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* **14**:584–640. Available from [https://www.inetsoft.com/business/solutions/objectives\\_of\\_business\\_intelligence\\_project/](https://www.inetsoft.com/business/solutions/objectives_of_business_intelligence_project/).
- Weller D, Andrus A, Wiedmann M, den Bakker HC. 2015. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**:286–292.
- Yadav MM, Roy A, Bhandari B, Joshi C. 2010. Pheno-genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* from bovine clinical mastitis. *Buffalo Bulletin* **29**:29–38.

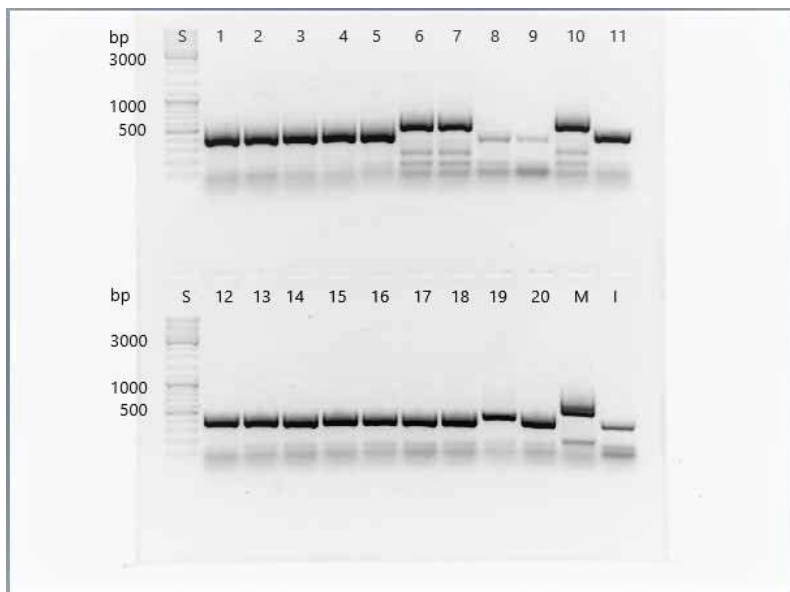
## 9 Samostatné přílohy



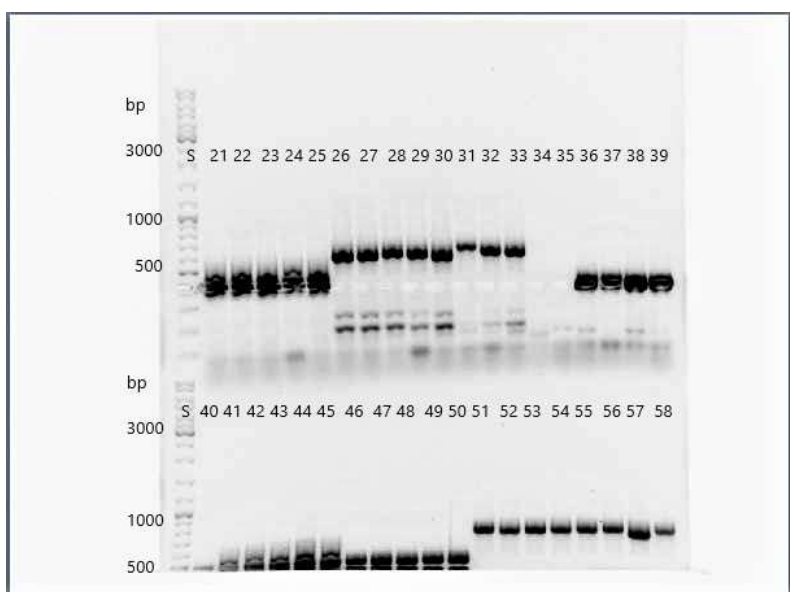
Příloha 1: Vizualizace produktů PCR při použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6; produkt o velikosti 267 bp) a pro *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R; produkt o velikosti 749 bp); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder



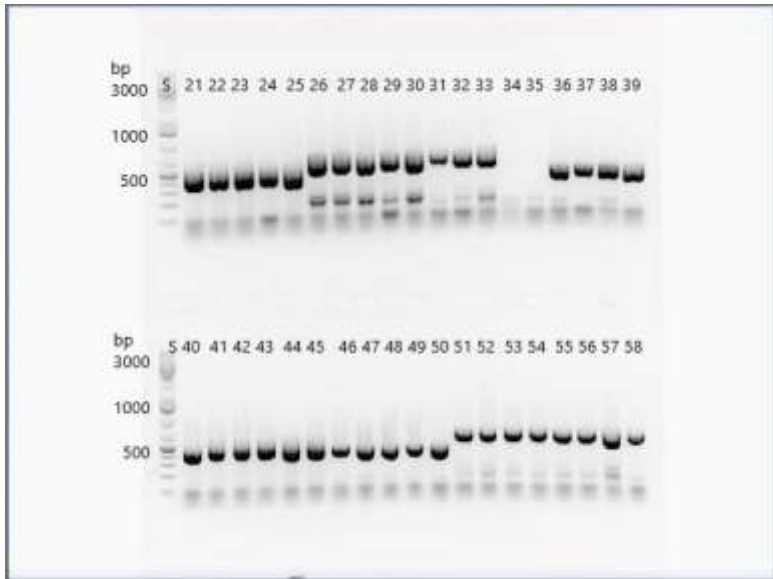
Příloha 2: Vizualizace produktů PCR při použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (LL5, LL6; produkt o velikosti 267 bp) a pro *L. innocua* (lin0464-F, lin0464-R; produkt o velikosti 749 bp); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder



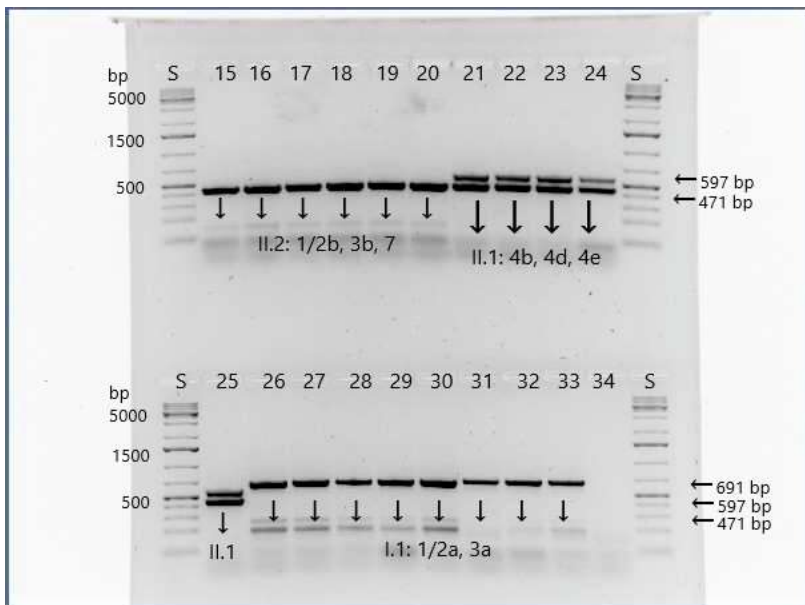
Příloha 3: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro sérotypy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R); standard: GeneRuler DNA Ladder mix



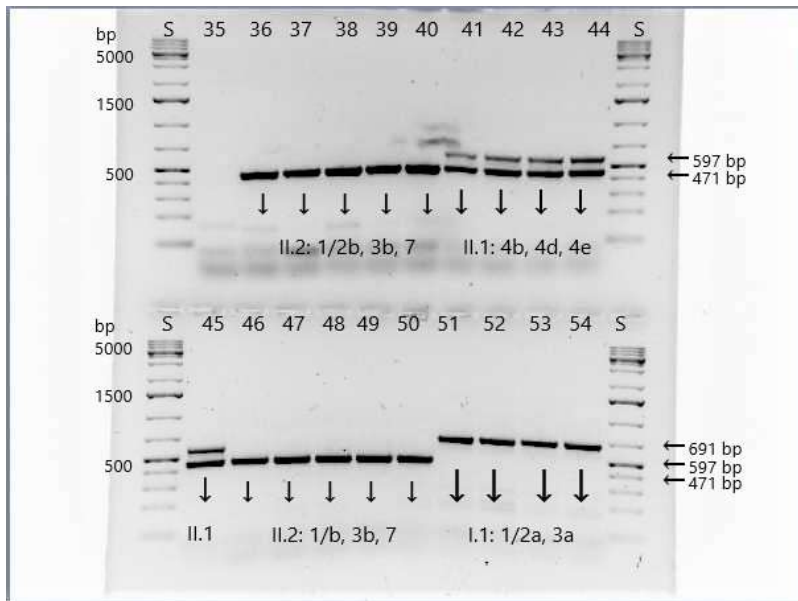
Příloha 4: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro sérotypy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R); standard: GeneRuler DNA Ladder mix



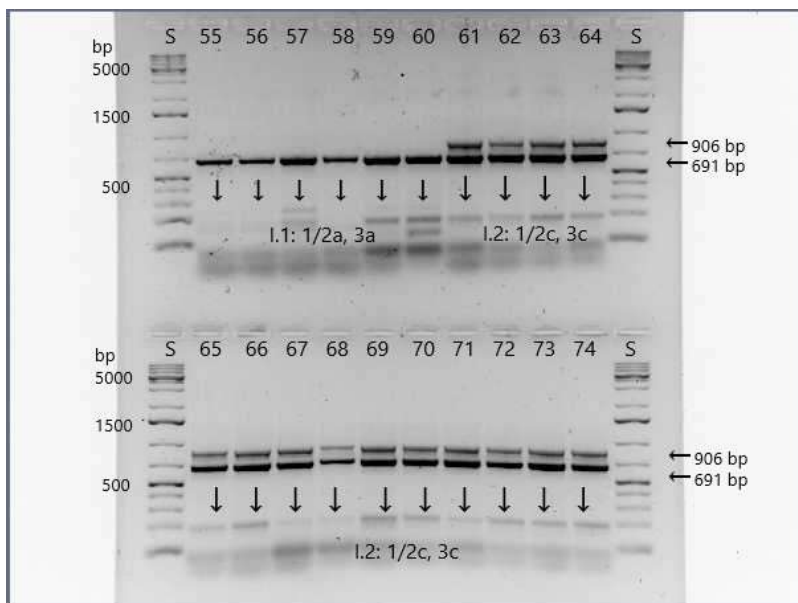
Příloha 5: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro sérotypy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R); standard: GeneRuler DNA Ladder mix



Příloha 6: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro sérotypy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

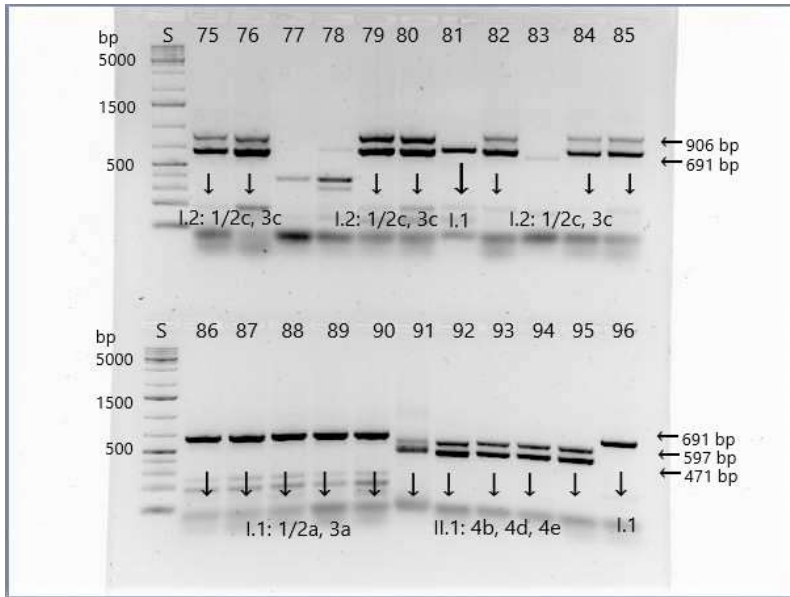


Příloha 7: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro sérotypy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

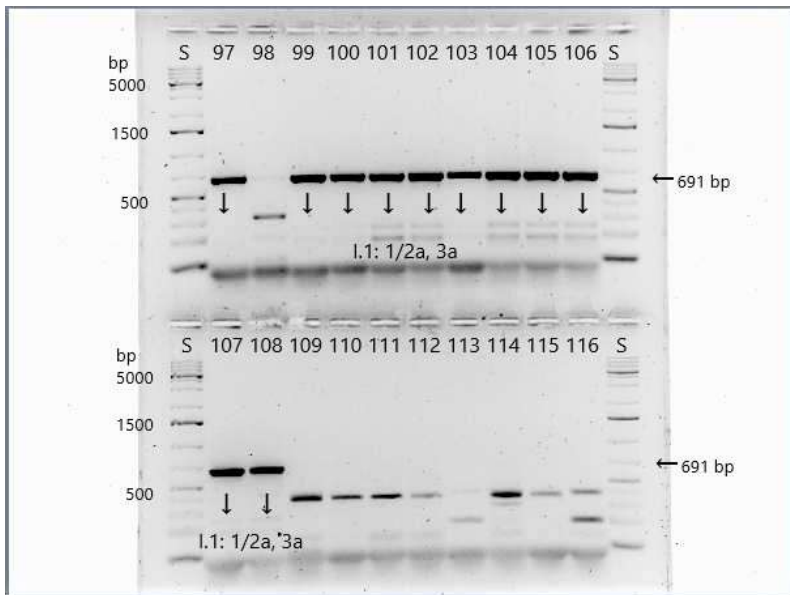


Příloha 8: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro sérotypy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

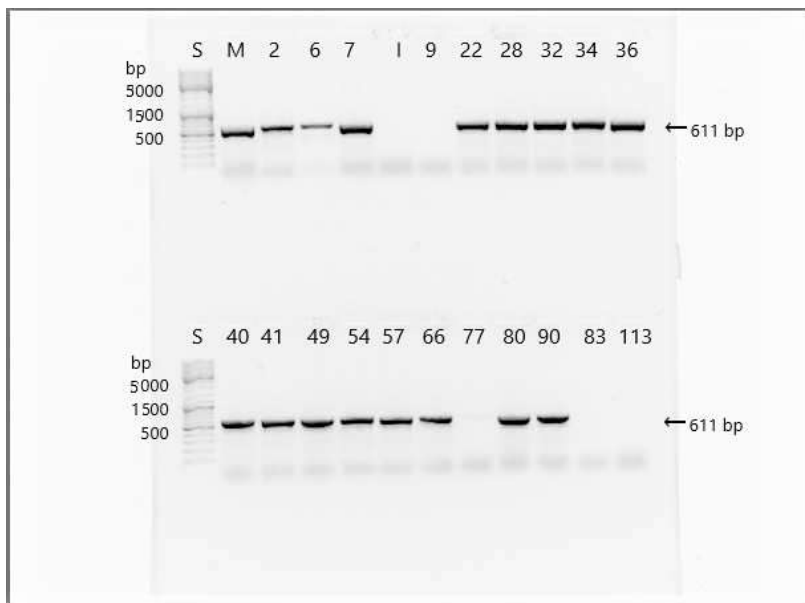




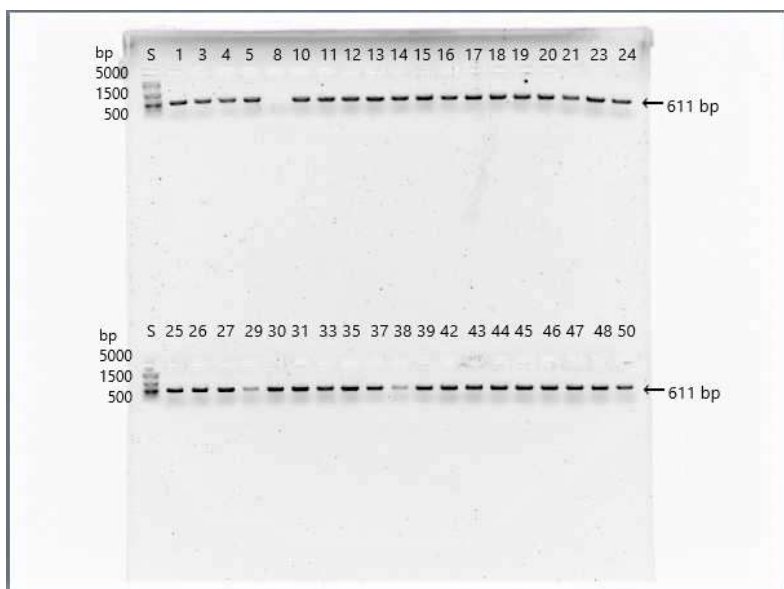
Příloha 9: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro sérotypy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder



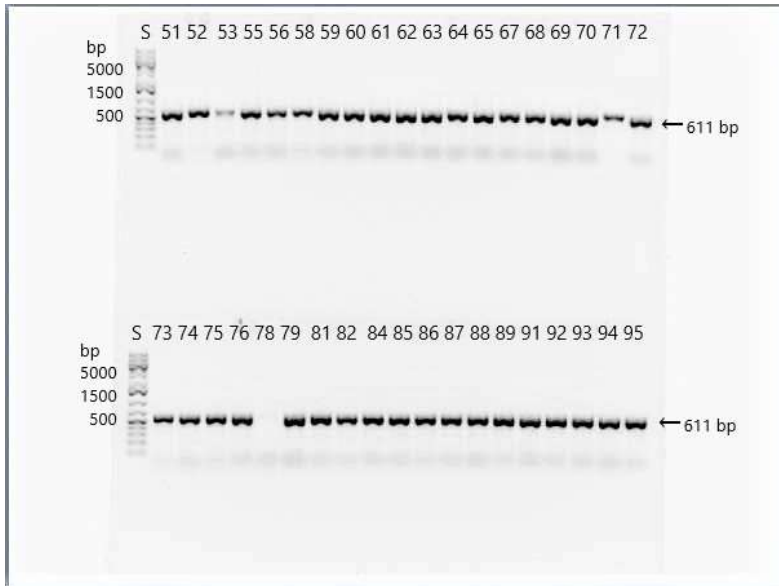
Příloha 10: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro sérotypy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c (lmo0737-F, lmo0737-R), sérotypy 1/2c, 3c (lmo1118-F, lmo1118-R), sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e (ORF2819-F, ORF2819-R), sérotypy 4b, 4d, 4e (ORF2110-F, ORF2110-R); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder



Příloha 11: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro detekci genů virulence (Imo2821-F, Imo2821-R; produkt o velikosti 611 bp); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder



Příloha 12: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro detekci genů virulence (Imo2821-F, Imo2821-R; produkt o velikosti 611 bp); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder



Příloha 13: Vizualizace produktů PCR při použití primerů specifických pro detekci genů virulence (lmo2821-F, lmo2821-R; produkt o velikosti 611 bp); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder