

Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů**

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Výskyt *Listeria monocytogenes* v potravinách

Bakalářská práce

Anna Lišková

Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Hana Šubrtová Salmonová, Ph.D.

© 2020/2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 3.5.2021 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Haně Šubrtové Salmonové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, za příjemnou spolupráci, trpělivost, odborné vedení, vstřícnost a ochotu při konzultacích, předané vědomosti, a především za čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala Ing. Tereze Kodešové, za poskytnuté rady a pomoc v laboratoři, a také mé rodině za veškerou podporu, a to nejen ve studiu.

Výskyt *Listeria monocytogenes* v potravinách

Souhrn

Listeria monocytogenes je grampozitivní, nesporeující, tyčinkovitá bakterie, která je prakticky všudypřítomná. Běžně se nachází v půdě, ve vodě, na rostlinách, v trávicím traktu lidí i zvířat a také v potravinách. Tato bakterie je původcem alimentárního onemocnění zvaného listerióza. Navzdory tomu, že se jedná o relativně vzácné onemocnění, je velice závažné a v porovnání s jinými alimentárními infekcemi se vyznačuje vysokou mortalitou. Z tohoto důvodu je monitorování bakterie *L. monocytogenes* v potravinách nezbytné.

Cílem práce bylo shrnutí dosavadních poznatků o *L. monocytogenes* a sledování výskytu této bakterie v potravinách určených k přímé spotřebě, které se běžně vyskytují na českém trhu. Celkem bylo testováno 51 vzorků potravin, které patřily do kategorií masné výrobky (13 vzorků), lahůdky (17 vzorků), mléko a mléčné výrobky (18 vzorků), ryby a výrobky z nich (3 vzorky).

Pro stanovení *Listeria monocytogenes* byla použita kultivační metoda dle ČSN EN ISO 11290-1/2017. Pro primární pomnožení byl použit Half-Fraser bujón. Pro sekundární pomnožení Fraser bujón. Pro růst kolonií na pevném médiu byl použit agar podle Ottavianiho a Agostiho. Nárůst charakteristických kolonií byl hodnocen po 24 a 48 hodinách kultivace. Následně byly odebrány izoláty a provedena identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací s pomocí matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS).

Kontaminace bakteriemi rodu *Listeria* byla prokázána v 11 vzorcích (21,57 %) a druh *Listeria monocytogenes* byl dle MALDI-TOF MS přítomný v 7 vzorcích. Skupinou, která vykazovala nejvíce pozitivních vzorků na *L. monocytogenes*, byly lahůdky, kde byla nalezena tato bakterie v 6 vzorcích (35,29 %). Primárně se jednalo o lahůdkové saláty a chlebičky. Přítomnost *L. monocytogenes* byla zaznamenána i v masných výrobcích. Ve 109 izolátech bylo identifikováno 21 různých druhů bakterií. Často se vyskytujícími bakteriemi byly například *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* nebo bakterie rodu *Enterococcus* či *Staphylococcus*.

Předpokládaná hypotéza byla potvrzena, jelikož u testovaných vzorků potravin určených k přímé spotřebě běžně dostupných na českém trhu, byla prokázána kontaminace bakteriemi druhu *Listeria monocytogenes*.

Klíčová slova: *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, listerióza, alimentární onemocnění, patogenita, potraviny

Occurrence of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs

Summary

Listeria monocytogenes is gram positive, non spore-forming, rod shaped bacterium that occurs almost everywhere. It is commonly present in soil, water, plants, in human and animals digestive tract, and also in food. This bacterium causes a food borne illness called listeriosis. In spite of being a relative rare disease, the high rate of death associated with this infection makes it a significant public health concern. Therefore, monitoring of *Listeria monocytogenes* in food is necessary.

The aim of this thesis was to summarize already existing knowledge of this problematic and to monitor the occurrence of the *L. monocytogenes* in ready-to-eat foods which are commonly available on the Czech market. A total of 51 samples belonging into the categories of meat products (13 samples), delicacies (17 samples), milk and dairy products (18 samples), fish and fish products (3 samples) were tested.

L. monocytogenes was detected by cultivation method according to CSN EN ISO 11290-1/2017. Half-Fraser broth was used for primary multiplication and Full-Fraser broth for secondary multiplication. Agar according to Ottaviani and Agosti was used as a solid selective medium. The presence of characteristic colonies was evaluated after 24 and 48 hours of cultivation. Subsequently, bacterial isolates were removed and identified by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS).

The contamination by bacteria of the genus *Listeria* was found in 11 samples (21,57 %) and *L. monocytogenes* based on MALDI-TOF MS results was found in 7 samples. *L. monocytogenes* was the most prevalent in group of delicacies with 6 positive samples (35,29 %). Positive were especially delicatessen salads and typical Czech sandwiches. The presence of *L. monocytogenes* was also found in meat products. In 109 isolates 21 different species were identified. Frequently detected bacteria were, *L. innocua*, *L. ivanovii* and bacteria of the genera *Enterococcus* or *Staphylococcus*.

The hypothesis was confirmed, because ready-to eat-foods contaminated with bacteria *L. monocytogenes* are commonly available on the Czech market.

Keywords: *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, listeriosis, alimentary diseases, pathogenicity, food

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Hypotéza a cíl práce.....	8
3	Literární řešerše	9
3.1	Rod <i>Listeria</i>.....	9
3.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	11
3.3	Výskyt <i>Listeria monocytogenes</i>	13
3.3.1	Výskyt v potravinách.....	13
3.3.1.1	Výskyt v potravinách živočišného původu	14
3.3.1.2	Výskyt v potravinách rostlinného původu	15
3.3.2	Typizace <i>L. monocytogenes</i>	15
3.4	Listerióza	16
3.4.1	Faktory virulence.....	19
3.4.2	Léčba	20
3.4.3	Prevence	21
3.4.4	Legislativa	22
3.4.5	Metody izolace a identifikace.....	24
4	Metodika.....	25
4.1	Materiál	25
4.2	Metody	27
4.2.1	Mikrobiologický rozbor	27
4.2.1.1	Příprava médií	27
4.2.1.2	Zpracování vzorků a kultivace.....	29
4.2.2	Izolace čistých kultur.....	31
4.2.3	Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI–TOF MS ..	32
5	Výsledky	33
7	Diskuze	37
8	Závěr.....	40
9	Literatura	41
10	Seznam použitých zkratk a symbolů	46

1 Úvod

Rod *Listeria* se skládá ze skupiny grampozitivních, fakultativně anaerobních, drobných, tyčinkovitých bakterií. Hlavním a nejvíce diskutovaným patogenem této skupiny je *L. monocytogenes*, která se může vyskytovat v potravinách a způsobovat vážné alimentární onemocnění zvané listerióza (Vazquez-Boland et al. 2001; Shen et al. 2006; Orsi & Wiedmann 2016).

Listerióza, přestože její výskyt není tak častý, je považována za velmi vážnou hrozbu, z důvodu vysoké mortality, a to 20-30% (Jadhav et al. 2015). Listeriíza obvykle zasahuje jedince s oslabeným imunitním systémem, populaci již trpící jinými onemocněními jako je rakovina, AIDS a cukrovka nebo starší osoby, těhotné ženy, novorozence či plod. Toto onemocnění má dvě formy. První formou je invazivní systémové onemocnění, které vykazuje klinické život ohrožující příznaky jako je meningoencefalitida, otrava krve (septikémie), zánět žaludku nebo také zánět tenkého střeva. Může také způsobit poškození plodu nebo potrat. Druhou formou onemocnění je neinvazivní onemocnění (febrilní gastritida), jehož příznaky ohrožují život pouze vzácně. Léčba listeriózy závisí na tom, jak závažné jsou příznaky. Ve většině případů jsou příznaky mírné, a proto léčba není zahájena vůbec. V případě potřeby je léčba provedena pomocí antibiotik (Wing & Gregory 2000; Glaser et al. 2001; Warriner & Namvar 2009; Gasanov et al. 2005; Foltýnová 2014; Zhu et al. 2017; Ricci et al. 2018).

Hlavním zdrojem nákazy bývají kontaminované potraviny a to proto, že bakterie *L. monocytogenes* přežívají technologické procesy zpracování potravin, které jsou založeny na ošetření potravin kyselými či slanými podmínkami. Na rozdíl od mnoha jiných patogenů se tyto bakterie mohou dále pomalu množit i při nízkých teplotách, což umožňuje růst i v chlazených potravinách. Bylo zaznamenáno, že v posledních letech se četnost nahlášených případů listeriózy zvyšuje. Proto je velmi důležitá prevence jako je dodržení správných výrobních, hygienických, distribučních a skladovacích postupů, ale velmi důležitá je také i dostatečná informovanost a školení pracovníků manipulujících s potravinami (Allerberger & Wagner 2010; WHO 2018; EFSA 2002).

2 Hypotéza a cíl práce

Předpokládáme, že v některých potravinách určených ke přímé spotřebě a běžně dostupných na českém trhu bude zjištěna přítomnost *Listeria monocytogenes*.

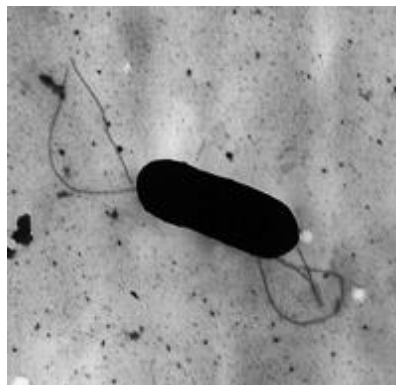
Cílem práce je shrnutí dosavadních poznatků o *L. monocytogenes* a monitoring výskytu této bakterie u rizikových skupin potravin, které jsou dostupné na našem trhu.

3 Literární rešerše

3.1 Rod *Listeria*

Bakterie rodu *Listeria* náleží do čeledi *Listeriaceae*, řádu *Bacillales*, třídy *Bacilli* a kmene *Firmicutes*. Jsou příbuzné rodům *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Staphylococcus* (Blažková et al. 2005; McLauchlin & Rees 2009).

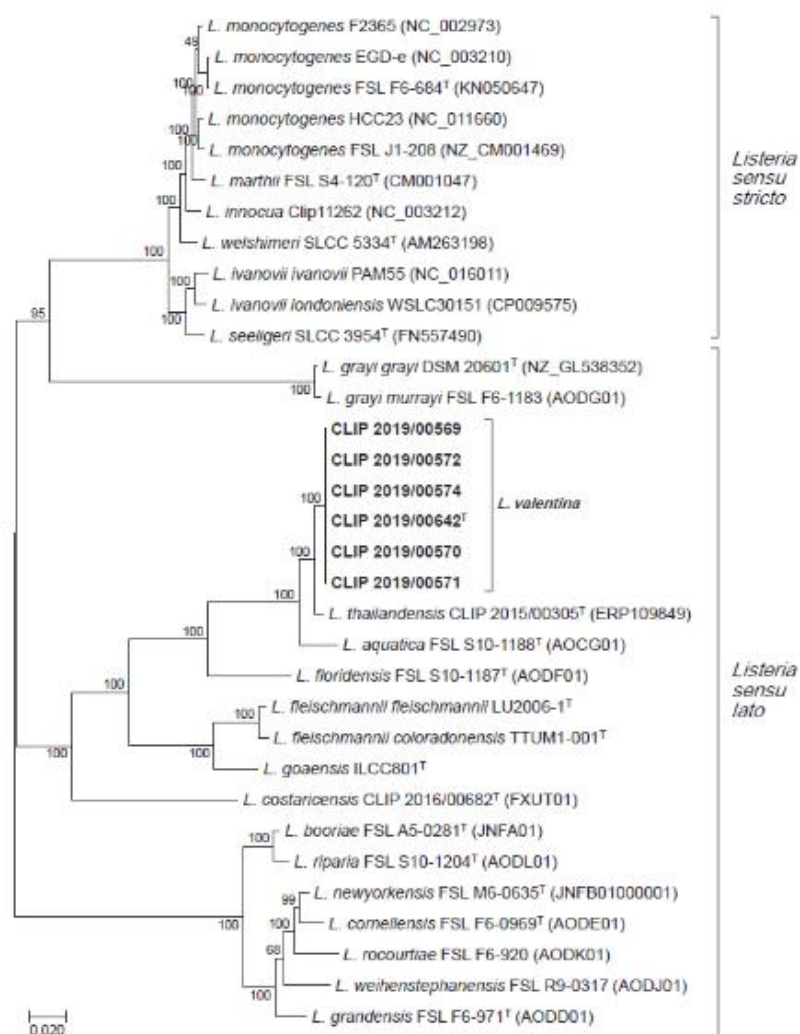
Jedná se o grampozitivní, nesporulující, aerobní a fakultativně anaerobní bakterie ve tvaru krátkých tyčinek o velikosti přibližně 0,4-0,5 x 1-2 μm . Buňky jsou pravidelné, mírně protáhlé a zakončené oblými okraji (Lous et al. 2011). Někdy mohou připomínat spíše koky, dosahující velikosti kolem 0,5 μm v průměru, a mohou být tak snadno zaměnitelné se streptokoky. U starších kultur se naopak mohou vyskytovat delší buňky. Prodloužení buněk je pravděpodobně důsledkem osmotického šoku (Sauders & Wiedmann 2007). Buňky se často spojují do řetězců, které mohou být uspořádány do tvaru V, Y nebo mohou tvořit palisády (Sauders & Wiedmann 2007; Lous et al. 2011). Listérie jsou pohyblivé díky peritrichním bičíkům (Obrázek č. 1). Počet bičíků je různý, ale většinou mají jeden až čtyři. Se zvyšující se teplotou počet bičíků klesá. Při teplotě těla, která přesáhne 25 °C se pohyblivost bakterie snižuje a při teplotě 37 °C bičíky vymizí úplně. Běžným světelným mikroskopem jsou bičíky téměř neviditelné, proto pro jejich pozorování musíme použít náročné barvicí metody (např. stříbření) anebo elektronový mikroskop (Brychta et al. 2018).



Obrázek č. 1: *L. monocytogenes* s bičíky
(zdroj:<https://www.pei.de/DE/newsroom/pm/jahr/2011/09-bakteriengesseln-zur-therapie-von-lebensmittelallergien.html>)

Optimální teplota růstu se pohybuje mezi 30-37 °C, ale obvykle mohou růst od 1 °C do 45 °C. Vyšší teploty nepřezívají, avšak u nižších teplot existují výjimky. Například zamražené potraviny poskytují listériím ideální prostředí, protože jiné bakterie nedokáží tak nízké teploty přežít. Nejvíce vyhovují listériím hodnoty pH od pH 6 do pH 9, ale jsou schopné přežít i růst při pH 4,4 a salinitě až 14 %. Na agaru obvykle tvoří pravidelné, kruhové a hladké kolonie, jejichž obvyklá velikost je 0,5-1,5 mm v průměru. Jejich velikost se mění v závislosti na teplotě a době kultivace (McLauchlin & Rees 2009; Lous et al. 2011; Kramarenko et al. 2013).

V současné době rod zahrnuje 21 druhů. Tyto druhy jsou rozděleny do dvou větších skupin, a to *Listeria sensu stricto* a *Listeria sensu lato* (viz Obrázek č. 2). *Listeria sensu stricto* zahrnuje šest druhů, které mají podobné fylogenetické vlastnosti jako například schopnost růst při nízkých teplotách, flagelární pohyb nebo patogenitu. Do této skupiny patří *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* a *L. marthii*. Skupina *sensu lato* byla v roce 2016 rozdělena do tří odlišných monofyletických skupin, které neobsahují patogenní druhy, jsou nepohyblivé (kromě *L. grayi*) a schopné redukovat dusičnany (kromě *L. floridensis*). Jedná se o skupiny *Murraya* (*L. grayi*), *Mesolisteria* (*L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*) a *Paenilisteria* (*L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae*, *L. newyorkensis*). Později byla objevena *L. costarricensis*, *L. goaensis* a *L. thailandensis* a jako poslední byla v roce 2020 popsána *L. valentina* (Chiara et al. 2015; Orsi & Wiedmann 2016; Quereda et al. 2020). Nejznámějšími druhy jsou *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* a *L. grayi*. *L. monocytogenes* je pro člověka patogenní. Spolu s méně rozšířeným druhem *L. ivanovii* je *L. monocytogenes* také patogenní pro širokou škálu zvířat, hlavně pro ovce a kozy (Lous et al. 2011).



Obrázek č. 2: Fylogenetický strom rodu *Listeria* rozdělený do skupin *sensu stricto* a *sensu lato* (dle Quereda et al. 2020)

Jednotlivé druhy listerií se dají rozlišit na základě jejich schopnosti fermentovat různé sacharidy (D-xyloza, L-rhamnosa, α -methyl-D-mannosid a D-mannitol, D-arabitol, methyl-D-glukosid, ribosa, glukosa-1-fosfát, D-tagatosa). Některé druhy lze také odlišit na základě hemolytické aktivity na tuhém médiu obsahujícím 5 % ovčí, koňské, králičí nebo lidské krve (Blažková et al. 2005). Betahemolýzu můžeme pozorovat konkrétně u kolonií *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* a *L. seeligeri* (Borucki et al. 2005).

Rod *Listeria* je považován za nenáročný na kultivaci. Listérie rostou dobře na běžných pevných kultivačních půdách (krevní a živný agar) či v tekutých médiích jako bujón z mozko-srdcové infúze (Brain-heartinfusion, BHI) nebo trypton sójový bujón (Tryptone-soya broth, TSB) (Blažková et al. 2005; Borucki et al. 2005).

Zástupci rodu *Listeria* jsou široce rozšířeni. Mohou se vyskytovat v půdě, na vegetaci, v odpadních vodách, krmivech pro zvířata, čerstvé i mražené drůbeži, jatečním odpadu i ve výkalech zdravých zvířat či člověka (Lous et al. 2011).

3.2 *Listeria monocytogenes*

Historicky první zmínka o *L. monocytogenes* pochází z roku 1924. Bakterie byla izolována z králíků a morčat, vykazujících symptomy mononukleární leukocytózy. V roce 1926 byla tato bakterie E.G. D. Murraym pojmenována jako *Bacterium monocytogenes* a o rok později H. Piriem přejmenována na *Listerella hepatolytica*. Až v roce 1940 dostala své současné jméno *Listeria monocytogenes* (Dortet et al. 2019).

L. monocytogenes je stejně jako ostatní druhy, rodu grampozitivní, fakultativně anaerobní, oxidáza negativní, kataláza pozitivní, nesporulující bakterie. Má buňky ve tvaru drobných tyčinek o velikosti 0,4-0,5 x 1-2 μm , které jsou pohyblivé. Schopnost pohybu je závislá na teplotě, přičemž optimální teplota pro pohyblivost se pohybuje mezi teplotami 22-30 $^{\circ}\text{C}$. Při 37 $^{\circ}\text{C}$ se už nevytváří bičíky, a bakterie schopnost pohybu ztrácí. Pro růst je optimální teplota v rozmezí 30-37 $^{\circ}\text{C}$. Tento druh je velmi odolný a dokáže přežít dokonce i růst v nepříznivých podmínkách, jako je nízká (růst už od -0,4 $^{\circ}\text{C}$) nebo vysoká (maximum 45 $^{\circ}\text{C}$) teplota, velké rozpětí hodnot pH (4,4–10), salinita kolem 10 % a nízká vodní aktivita (0,9). Celkové usmrcení těchto patogenních bakterií vyžaduje teplotu alespoň 75 $^{\circ}\text{C}$. V optimálních podmínkách bývá pomnožení listerií velice rychlé. V potravinách může snadno počet buněk přesáhnout legislativou stanovený limit bezpečnosti 100 KTJ/g (ml) během 3–4 dnů (McMullen & Freitag 2014; Brychta et al. 2018; Chlebicz & Śliżewska 2018).

Listérie fermentují různé sacharidy (např. melecitózu, methyl α -D-glukososid, methyl α -D-mannosid, L-Rhamnózu, sacharózu a glukózu), a produkují z nich kyseliny (např. kyselinu mléčnou nebo octovou) a další produkty (McLauchlin & Rees 2009). Stanovení fermentačního profilu by mohlo být nápomocné, při určování patogenity *L. monocytogenes*. Groves & Welshimer (1977) uvádějí, že kmeny *L. monocytogenes*, které dokáží fermentovat xylózu, ale ne rhamnózu, jsou nepatogenní na rozdíl od těch, které fermentují rhamnózu, ale ne xylózu. Jiné zdroje však tuto informaci neuvádějí, proto by toto tvrzení nemělo být považováno za stavební kámen při určování patogenity jednotlivých druhů.

Na tuhých pěstebních médiích tvoří pravidelné kruhové 1–3 mm velké kolonie, jejichž barva se liší podle druhu média, na němž rostou. Základním médiem pro selektivní kultivaci *L. monocytogenes* je Agar dle Ottavianiho a Agostiho (Ottaviani et al. 1997), kde mají kolonie modrozelenou barvu, což vyjadřuje galaktosidázovou aktivitu, a jsou obklopené kruhovou mléčně zabarvenou zónou precipitace (viz obrázek č. 3), která vyjadřuje aktivitu fosfolipázy C (= tzv. lecitinázová aktivita). Některé kolonie ale lecitinázovou aktivitu nevykazují a to znamená, že nejsou patogenní (Ermolaeva et al. 2003; Brychta et al. 2018).



Obrázek č. 3: Lecitinázová aktivita *L. monocytogenes*

(zdroj: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Canadian%20Catalog_EN_FR.pdf)

L. monocytogenes vykazuje také β -hemolytickou aktivitu (viz Obrázek č. 4), která je důležitou fenotypovou vlastností, pomáhající při její detekci a identifikaci. Avšak někdy se stává, že i přesto, že se jedná o *L. monocytogenes*, kmeny hemolytickou aktivitu nevykazují. Nehemolytické kmeny mohou pocházet například z půdy, vegetace, odpadních kalů, mrtvých těl nebo od zdravých lidí a zvířat. Hemolytická aktivita *L. monocytogenes* bývá studována používáním erytrocytů z různých zdrojů (např. koňská, kravská, králičí, ovčí nebo lidská krev). To, že jsou kmeny *L. monocytogenes* hemolytické, podobně jako u lecitinázy ukazuje míru virulence (Fujisawa & Mori 1994; Groves & Welshimer 1977; McLauchlin & Rees 2009).



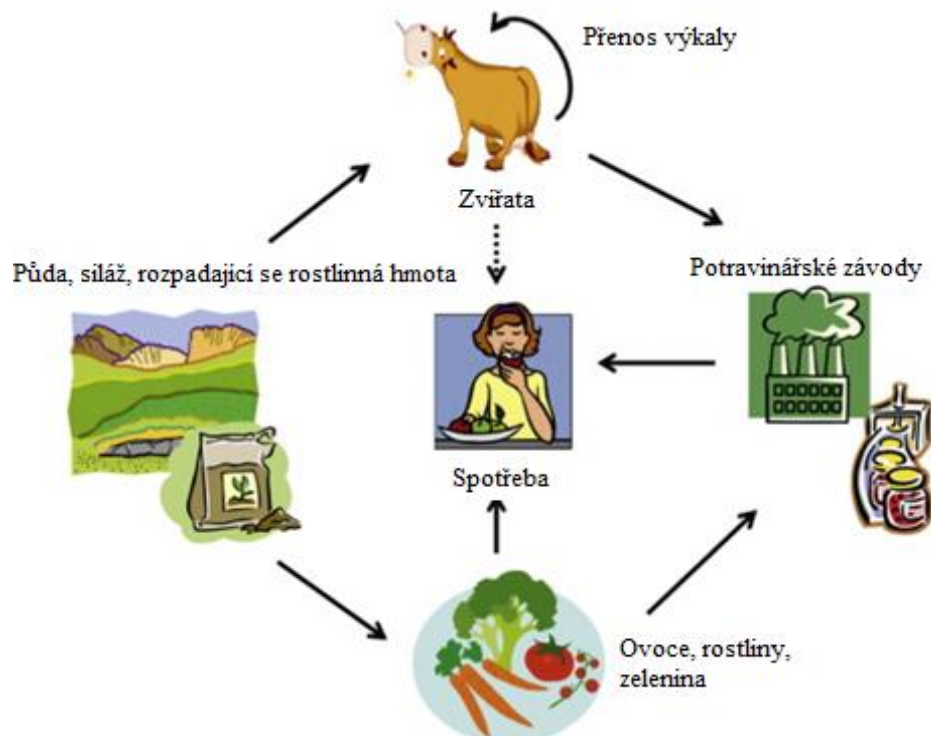
Obrázek č. 4: β -hemolytická aktivita *L. monocytogenes*

(zdroj: <https://microbeonline.com/listeria-monocytogenes-pathogenesis-lab-diagnosis/>)

3.3 Výskyt *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes je běžně přítomná v životním prostředí. Vyskytuje se v půdě, v bahně, ve vodě, vegetaci, hnojivech, silážích, výkalech zvířat i lidí, v rozkládajícím se organickém materiálu, cytosolu buněk savců, ale také v potravinách (Southwick & Purich 1996; McLauchlin & Rees 2009; Kramarenko et al. 2013).

Často je také nacházena v trávicím traktu lidí a zvířat. Jak lidé, tak divoká či domestikovaná zvířata mohou být asymptomatickými nositeli, tedy přenašeči *L. monocytogenes*. Jedná se hlavně o skot, prasata, kuřata, krocany, kachny, korýše a mouchy. Ti pak tyto bakterie mohou šířit dál výkaly či, v případě skotu, mlékem (obrázek č. 5), a to bez jakýchkoliv symptomů ukazujících na onemocnění. Může také dojít ke kontaminaci masa při porážce zvířete, v důsledku špatného vykrvení nebo přímým kontaktem svaloviny s obsahem trávicího traktu při nesprávné manipulaci. Hlavním zdrojem infekce u přežvýkavců bývá nekvalitní siláž, může to ale být i voda nebo krmivo kontaminované hmyzem či ptačím trusem (Blažková et al. 2005; Vilar et al. 2007).



Obrázek č. 5: Koloběh potenciální kontaminace *L. monocytogenes*
(Upraveno podle McMullen & Freitag 2014)

3.3.1 Výskyt v potravinách

Nejčastěji se *Listeria monocytogenes* vyskytuje v masných, mléčných výrobcích a skoro ve všech čerstvých („raw“) potravinách či „ready to eat“ produktech (Kramarenko et al. 2013). Najít ji ale můžeme i ve zmrzlinářské výrobě či při zpracování ryb (Tabulka č. 1) (Blažková et al. 2005). V potravinách byly listérie také nalezeny v lahůdkách (masových i zeleninových), mléce, měkkých a poloměkkých sýrech, uzeninách, zelenině a ovoci (např. zelí, meloun). Přítomnost *L. monocytogenes* byla také zjištěna v rozmražených potravinách. K pomnožení listérií a rozšiřující se kontaminaci může dojít i uchováváním

hotových jídel při pokojové teplotě (Blažková et al. 2005; McMullen & Freitag 2014; Brychta et al. 2018).

Tabulka č. 1: Prevalence *L. monocytogenes* u komodit v severní Americe a Evropě (Upraveno dle Warriner & Namvar 2009).

Výskyt <i>L. monocytogenes</i>	prevalence
Výroba sýrů	8%
Zpracování mléka	23%
Výroba zmrzliny	6%
Hovězí výroba	28–92%
Drůbež a zpracování	13,30%
Zpracování ryb	12,80%
Ledničky v domácnosti	20%

Kromě primární kontaminace popsané výše, může dojít k sekundární kontaminaci potravin nedostatečnou hygienou, v chladničkách, či nesprávným očištěním povrchů po práci s infikovanými potravinami v potravinářských provozech (Blažková et al. 2005). Také ji můžeme najít v mléčných tancích, kam se dostává z mlékařského vybavení v důsledku fekálního znečištění při dojení (Vilar et al. 2007).

Skutečnost, že se listérie v potravině vyskytují, ještě neznamená, že konzument listeriózou onemocní. Záleží především na virulenci daného kmene a počtu životaschopných buněk přítomných v potravině. Významnou roli v rozvoji onemocnění hraje také imunitní systém hostitele. Důležitým faktorem, který bezpečnost potravin ovlivňuje je teplota a doba skladování. V případě špatného uskladnění se množství bakterií zvyšuje a s ním i riziko propuknutí nákazy (Brychta et al. 2018).

3.3.1.1 Výskyt v potravinách živočišného původu

L. monocytogenes se vyskytuje v syrovém vepřovém, hovězím, drůbežím i rybím mase. Dále i v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích či měkkých a koryších. Mléko a mléčné výrobky nejsou výjimkou. Do syrového mléka se listérie dostanou nejčastěji z krmiva, špatně ošetřených struků, srsti atd. To je jeden z důvodů, proč by se mléko mělo konzumovat převařené. Jejich výskyt byl prokázán také u zrajících sýrů, čerstvých sýrů, v tvarohu a másle. Dobře se jim daří u sýrů zrajících pod mazem, které mají optimální vodní aktivitu, zdroj živin a ideální atmosféru. Vyšší záchyt této bakterie pak logický bývá v produktech, vyrobených z nepasterovaných mlék (Brychta et al. 2018).

Navzdory dodržování kritérií bezpečnosti potravin (FSC = food safety criteria) pro *L. monocytogenes*, které jsou určeny k přímé spotřebě (RTE), byl v letech 2009–2013 zaznamenán přírůstek množství nakažených v EU. V letech 2010–2011 byl v EU učiněn průzkum, který se snažil odhalit rozšíření a koncentrace *L. monocytogenes* v potravinách určených k přímé spotřebě a to: balené (nemražené) ryby, balené tepelně opracované masné produkty a měkký a polotvrdý sýr. Přibližný odhad vzorků EU s počtem *L. monocytogenes*

vyšším než 100 KTJ/g na konci data spotřeby, činil 1,7 % u RTE ryb, 0,43 % RTE masa a 0,06 % RTE sýra (Ricci et al. 2018).

3.3.1.2 Výskyt v potravinách rostlinného původu

L. monocytogenes je jakožto běžná environmentální bakterie i častou součástí epifytní mikrobioty rostlin. Byla nalezena a izolována z velkého množství syrové zeleniny včetně brambor, okurek, zelí, rajčat a ředkviček. U hlávkového salátu, celeru, kukuřice, chřestu bylo potvrzeno, že se zde dokáže i aktivně množit. Horší podmínky pro proliferaci a růst poskytuje fenykl, mrkev a rajčata. Vyšší míru kontaminace vykazují čerstvě krájené zeleninové pokrmy. Bylo také zjištěno, že dobré podmínky pro růst listérií poskytuje zelenina, která je balena a ukládána v modifikované atmosféře (Brychta et al. 2018).

Mnozí se domnívají, že konzumace tzv. biopotravin je mnohem zdravější. Z hlediska mikrobiální kontaminace je u nich ale, jak si málokdo uvědomuje, mnohem vyšší riziko alimentární otravy než u plodin pocházejících z konvenčního zemědělství. Hlavním důvodem je zvýšené množství použití živočišných hnojiv. V případě, že dojde ke kontaminaci, je velmi obtížné se listérií zbavit, protože na povrchu vytvářejí odolný biofilm. Běžným omytím není odstraněno kolem 10 % enteropatogenů a kontakt s vodou bez následného vysušení navíc může způsobit další šíření bakterií po povrchu potraviny a následné pomnožení (Brychta et al. 2018).

Případy nákazy listeriózou v důsledku požití kontaminované potraviny rostlinného původu, se objevily např. v roce 2014 v USA. Pacienti se nakazili jablky obalenými v karamelu (caramel apples), které pocházely ze státu Ohio. Celkem onemocnělo 35 osob a 7 zemřelo. Z toho 11 pacientů byly těhotné ženy, z nichž jedna potratila a dále byly potvrzeny 3 případy dětské meningitidy, u dětí od 5 do 15 let věku (Brychta et al. 2018).

3.3.2 Typizace *L. monocytogenes*

Na základě průkazu jednotlivých antigenů O (somatické = I–XV) a H (flagelární = bičíkových = A–D) se *L. monocytogenes* řadí do 13 sérovarových skupin viz Tabulka č.2 (Brychta et al. 2018).

Tabulka č. 2 - Somatické a flagelární antigeny použité k určení serotypů *L. monocytogenes*^(a) (upraveno podle Lous et al. 2011)

Serotyp	Somatické (O) antigeny ^(b)	Flagelární (H) antigeny
1/2a	I, II, III	A, B
1/2b	I, II, III	A, B, C
1/2c	I, II, III	B, D
3a	II, III, IV, (XII), (XIII)	A, B
3b	II, III, IV, (XII), (XIII)	A, B, C
3c	II, III, IV, (XII), (XIII)	B, D
4a	III, (V), VII, IX	A, B, C
4ab	III, V, VI, VII, IX, X	A, B, C
4b	III, V, VI	A, B, C
4c	III, V, VII	A, B, C
4d	III, (V), VI, VIII	A, B, C
4e	III V, VI, (VIII), X	A, B, C
7	III, XII, XIII	A, B, C

(a) Faktory v závorce nebyly vždy detekovány

(b) Faktor II je termolabilní

Sérovarové skupiny byly dále rozděleny do pěti linií: I.1 (sérotypy 1/2a-3a), I.2 (sérotypy 1/2c-3c), II.1 (sérotypy 4b-4d-4e), II.2 (sérotypy 1/2b-3b-7) a III (4a-4ab-4c) (Chen et al., 2019). Četnost výskytu jednotlivých sérovarů v klinických vzorcích je: 1/2a (15–25 %), 1/2b (10–35 %), 1/2c (0–4 %), 3 (1–2 %), 4b (37–64 %) a 4a, 4c, 4d, 4e (0–6 %) (Brychta et al. 2018).

Sérotypizace ale není dostačující metodou pro spolehlivé rozlišení *L. monocytogenes* pro účely epidemiologické typizace. K detailnějšímu rozlišení kmenů v rámci jednotlivých sérotypů se používá metoda multilokusové sekvenční typizace (Multilocus sequence typing = MLST). Na základě jedno-nukleotidového polymorfismu sedmi provozních tzv. housekeeping genů byly ustanoveny sekvenční typy a klonální komplexy (Chen et al. 2019).

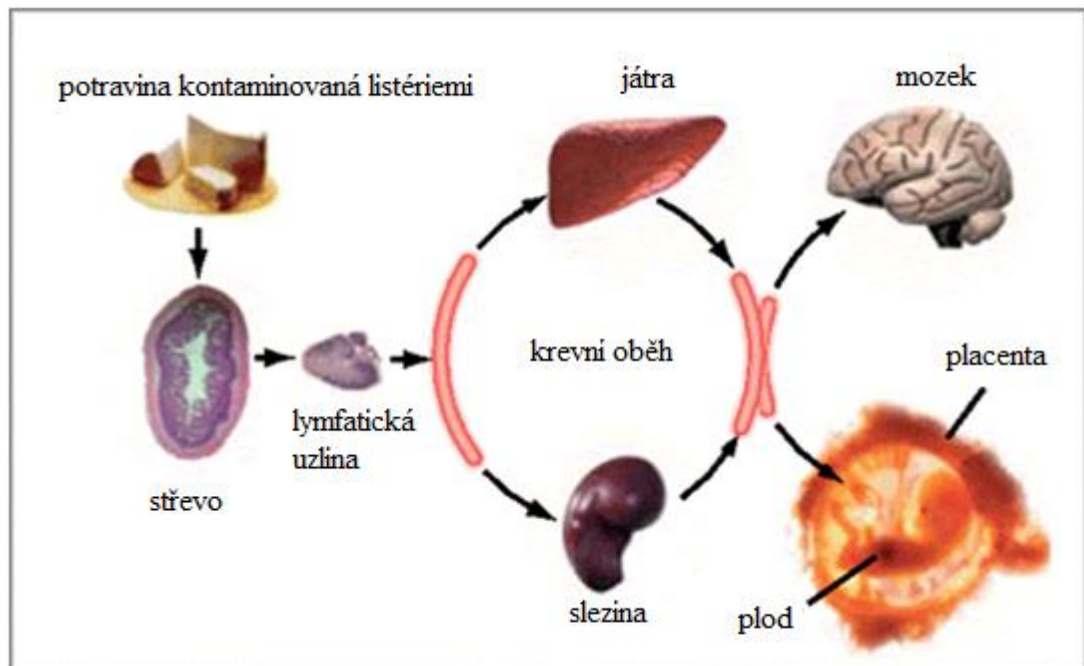
Míra virulence a patogenity se u jednotlivých izolátů *L. monocytogenes* velice liší. Epidemiologická data kombinovaná s výsledky genetického sekvenování a zvířecích modelů (> 6 000 izolátů) poukazují na to, že téměř 80 % všech izolátů spadá do 12 různých klonálních komplexů (KK). Ačkoliv je listerióza nemoc alimentárního původu, klonální komplexy byly pojmenovány jako „související s infekcí“, „související s potravinami“ nebo „intermediární.“ Toto označení závisí na poměru četnosti výskytu izolátů daného komplexu v určitém typu vzorků. Jsou-li kmeny náležící danému KK nejčastěji izolovány z klinických vzorků, pak je KK označován jako „související s infekcí“. Klonální komplex „související s infekcí“ je nejčastěji spojován s centrálním nervovým systémem, zatímco klonální komplexy „související s potravinami“ jsou izolovány z klinických vzorků jen zřídka. Pokud se však v klinických vzorcích vyskytnou, bývají izolovány z krve. Na základě pokusů s myši byla prokázána nižší invazivita u KK „pojících se s potravinami“, než u „pojících se s infekcí.“ Nicméně navzdory pozorování variability jejich virulence, skoro každý kmen *L. monocytogenes* má schopnost vyvolat onemocnění (Ricci et al. 2018).

3.4 Listeriόza

Listeriόza byla dlouhou dobu považována pouze za onemocnění zvířat. Že je také původcem alimentárních onemocnění (onemocnění, které souvisí s příjmem potravy), bylo zjištěno až v roce 1980 (Ricci et al. 2018).

L. monocytogenes v zásadě způsobuje dvě formy onemocnění. Prvním je invazivní systémové onemocnění způsobené vysoce invazivními formami *L. monocytogenes*. Bakterie obvykle infikují takzvané sterilní části těla, kam se řadí játra, slezina, mícha nebo krev. Po požití napadá *L. monocytogenes* epitel gastrointestinálního traktu, rozšíří se do lumenu střeva a proniká do krve, kudy se následně dostává do jater, sleziny a lymfy. Od tohoto bodu může *L. monocytogenes* putovat napříč nervovým systémem i přes placentární bariéru, kde infikuje plod matky. Celý tento koloběh je znázorněn Obrázkem č. 6. U zdravých dospělých jedinců jsou hlavními příznaky průjem a horečka, u těhotných způsobuje potraty, usmrcení dítěte. U novorozenců může způsobit sepsi, zápal plic a meningitidu. Mezi další klinické příznaky patří meningoencefalitida, otrava krve (septikémie), zánět žaludku nebo také zánět tenkého střeva. Vzhledem k vážnosti nemoci a jejích příznaků je tato forma ve 30 % případů smrtelná. Bylo také zjištěno, že více než 90 % případů propuknutí invazivní listeriόzy je způsobeno konzumací potravin, která obsahovala více než 2 000 KTJ/g. Zejména vysoce virulentní

kmeny sérotypu 4b mívají fatální následky i pro zdravé jedince. U citlivých osob není infekční dávka zcela upřesněna, pohybuje se v rozmezí od 100 do 1000 buněk (Glaser et al. 2001; Warriner & Namvar 2009; Zhu et al. 2017; Ricci et al. 2018).



Obrázek č. 6: Proces infekce v živém organismu: upraveno podle: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=2610&typ=html

Druhá forma onemocnění, které může *L. monocytogenes* způsobit se nazývá febrilní gastroenteritida nebo též neinvazivní gastroenteritida. Gastroenteritida nastává u zdravých jedinců po konzumaci vysoké dávky *L. monocytogenes* (>8 log KTJ). Inkubační doba je 1–7 dní. Po uplynutí inkubační doby se projevují symptomy podobné chřipce (Tabulka č. 3), které mohou být doprovázeny bolestmi břicha a průjmem. Na rozdíl od invazivní formy, jež je zmíněna výše, tady symptomy ohrožují život pouze vzácně a odeznívají během pár dní, ačkoliv někteří jedinci se *L. monocytogenes* mohou zbavovat i několik týdnů (Warriner & Namvar 2009; Zhu et al. 2017).

Tabulka č. 3 - Příznaky listeriózy (Upraveno dle Janakiraman 2008)

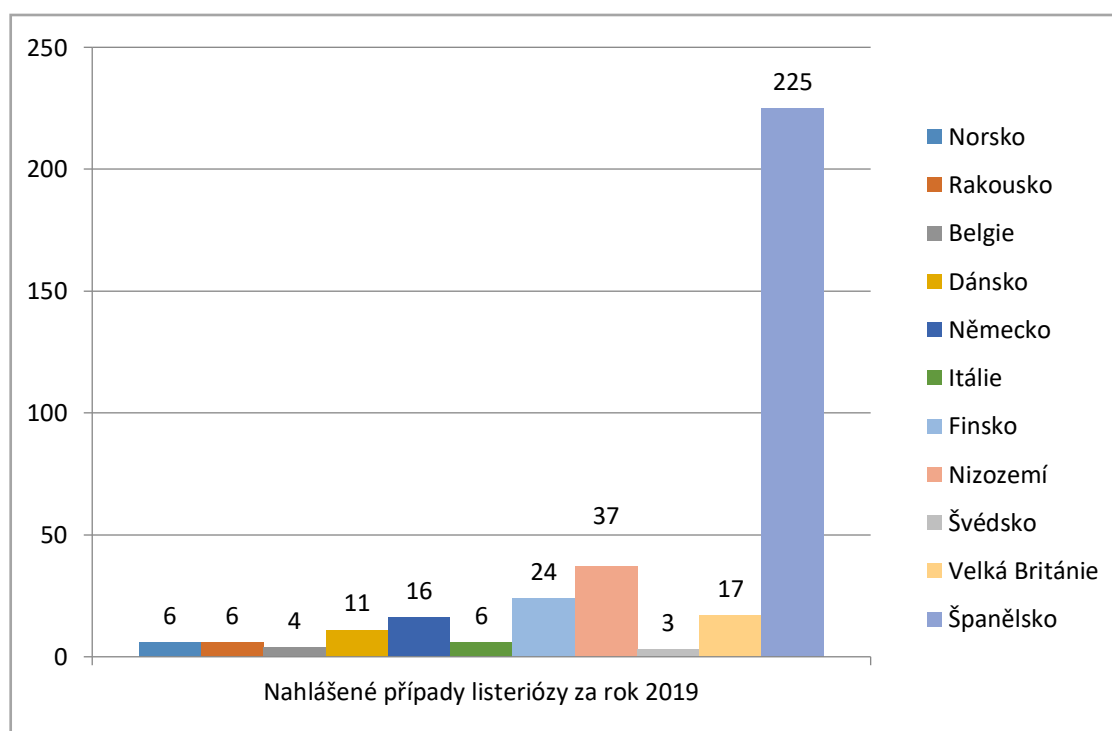
Symptom	Počet pacientů	Procento
Horečka	126	65
Chřipce podobné příznaky	61	32
Bolest břicha nebo zad	41	21,5
Zvracení/průjem	14	7
Bolesti hlavy	20	10,5
Svalová bolest	8	4
Bolest v krku	7	4
Žádné příznaky	55	29

Data od 191 případů, pacienti mohou trpět více než jedním příznakem

Rizikovou skupinou jsou lidé s oslabeným imunitním systémem, osoby po transplantaci orgánu, lidé trpící rakovinou a náchylné jsou také osoby HIV pozitivní. Kromě zdravotně znevýhodněných osob se zvýšené riziko rozvoje onemocnění týká také starší populace (> 65 let), kojenců a batolat (děti mladší 5 let), těhotných žen a nenarozených dětí. Může také dojít k tomu, že je potvrzena přítomnost *L. monocytogenes* ve stolici osob bez příznaků infekce. Takové osoby jsou přenašeči (Blažková et al. 2005; Borucki et al. 2005; Zhu et al. 2017; Brychta et al. 2018; Chlebicz & Śliżewska 2018).

V porovnání s ostatními alimentárními onemocněními se listerióza vyskytuje poměrně vzácně. Odhaduje se, že je zodpovědná 0,5-1 % všech alimentárních onemocnění. Mortalita postižených osob je ale ve srovnání s ostatními vysoká. To je tedy také důvod, proč se od osmdesátých let zájem o listerie značně zvýšil a stále roste (Blažková et al. 2005; Borucki et al. 2005; Ricci et al. 2018).

Ricci et al. uvádí, že v letech 2008–2015 došlo v EU k nárůstu potvrzených případů invazivní listeriózy u lidí ve věku kolem 75 let a u žen ve věku 25 až 44 let (pravděpodobně to souvisí s těhotenstvím) (Ricci et al. 2018). Listeriózou v USA každý rok onemocní kolem 2500 osob a 500 lidí zemře (Borucki et al. 2005). V roce 2019 bylo nahlášeno 355 případů listeriózy, z toho 349 pocházelo ze států EU. Následkem tohoto onemocnění zemřelo 31 osob. Srovnáme-li data s dalším významným alimentárním onemocněním salmonelózou, tak během stejného období činil počet nakažených bakteriemi rodu *Salmonella* 9663 osob, z nichž pouze 7 nemoci podlehl. Mezi státy, které nahlásily pozitivní nálezy listeriózy, patří Norsko (6 případů), Rakousko (6 případů), Belgie (4 případy), Dánsko (11 případů), Německo (16 případů), Itálie (6 případů), Finsko (24 případů), Nizozemí (37 případů), Švédsko (3 případy), Velká Británie (17 případů) a nejvíce případů bylo nahlášeno ve Španělsku (225 případů) (viz Graf č. 1). Potraviny, které byly příčinou otrav, jsou následující: ryby a rybí produkty (0,5 %), ovoce, zelenina a ovocné džusy (2,38 %) a největší procento kontaminace má maso a masné produkty (4,35 %) (EFSA 2019).



Graf č. 1: Počet nahlášených případů za rok 2019 dle jednotlivých zemí (podle EFSA 2019)

V České Republice došlo v letech 2006–2007 k nárůstu případů na více než 85. Tito lidé se nakazili po konzumaci zrajícího sýra. Další ohnisko nákazy bylo zaznamenáno v letech 2008–2009, kdy se devět osob nakazilo vakuově balenou vepřovou šunkou, kterou jim naservírovali v nemocnici k večeři. Čtyři z těchto pacientů zemřeli. Mezi rokem 2009 a 2010 byl zaznamenán další výskyt listeriózy, tentokrát ale pouze jeden na našem území, kdežto v Rakousku 25 a v Německu 8. Všech těchto 34 případů bylo následkem tzv. „Quargel“ sýru, u nás známého jako tvarůžky (zrající tvarohový sýr s mazem na povrchu). V roce 2016 se v Moravskoslezském kraji objevilo 14 případů. Došlo tedy ke zvýšení počtu případů z 0,45 na 1,15 případů na 100 000 obyvatel (Gelbíčová et al. 2018).

Nejnovější informace o výskytu listeriózy na našem území jsou zaznamenány na portálu RASFF („Rapid Alert System for Food and Feed“ = Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva). Tam se uvádí, že od posledního hlášení (pozitivní nález v humusu pocházejícího z Polska obsahoval 140 KTJ/g), které proběhlo v roce 2018 se *L. monocytogenes* u nás neobjevila. Až nedávno zde byl hlášen výskyt, a to 12. 2. a 26. 3. 2021. V prvním případě byla objevena přítomnost *L. monocytogenes* v uzeném sýru vyrobeném v ČR a v druhém případě se jednalo o salám pocházející ze Španělska, který obsahoval do 300 KTJ/g potraviny (European Commission 2021).

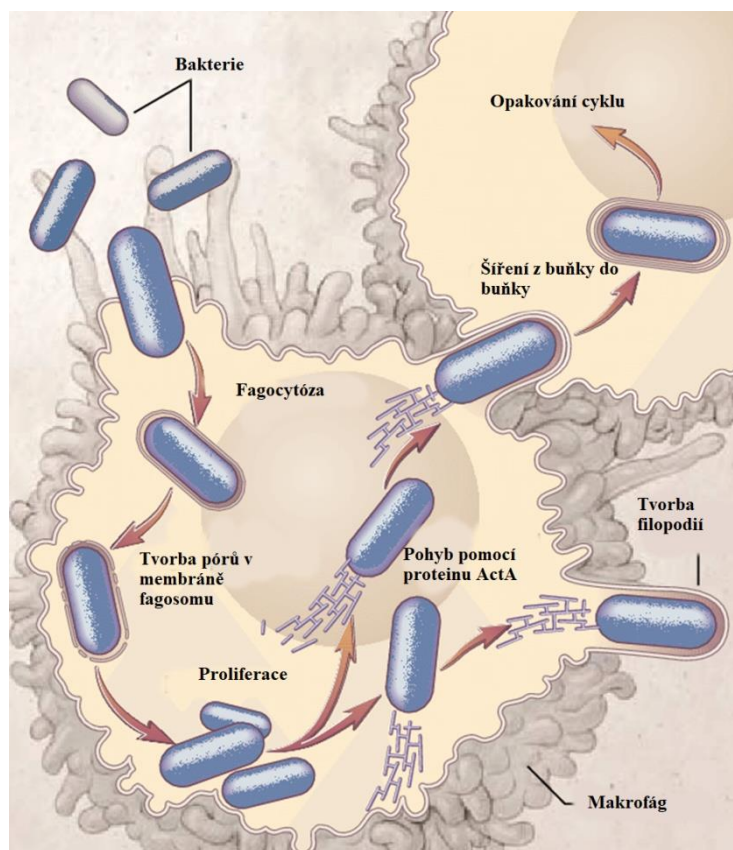
3.4.1 Faktory virulence

L. monocytogenes ve své buněčné stěně a cytoplazmatické membráně obsahuje širokou škálu proteinů, které způsobují, že nejen dokáže proniknout do hostitelské buňky jiného organismu a přežít v ní, ale ještě se dále šířit. Tyto proteiny, které bakterie pro přežití a šíření v hostitelském organismu potřebuje, jsou označovány jako virulentní (viz Obrázek č. 7) (Blažková et al. 2005).

Proteiny, které zajišťují vstup listérií do nefagocytujících hostitelských buněk a zároveň mají schopnost proces fagocytózy indukovat, jsou povrchové proteiny tzv. internaliny – internalin A (InlA, 800 aminokyselin) a internalin B (Inl B, 630 aminokyselin). Dalším proteinem, který se podílí na přijetí bakterie je p60 (484 aminokyselin) a tento protein je také dominantním extracelulárním proteinem listérií. Často se proto používá k jejich diagnostice (Blažková et al. 2005).

Po pohlcení se musí bakterie rychle přesunout z fagocytované vakuoly (fagosomu), která ji obklopuje. Důvodem rychlého úniku je potřeba zmnožení. Na to, aby se dostala z vakuoly je potřeba další virulentní protein zvaný listeriolysin O (LLO, 529 aminokyselin), který dokáže vytvořit póry v membráně fagosomu. Celého tohoto procesu se také může účastnit fosfolipasa C, která je typická pro fosfatidylinositol (PI-PLC, 317 aminokyselin). Když bakterie uniknou z fagosomu začne se v hostitelské buňce množit. Pro pohyb pomnožených bakterií je potřeba protein ActA (actin assembly protein, 639 aminokyselin). Tento protein tedy posune bakterii až k membráně. Následně je vytvořen výčnělek (filopodium), který interaguje se sousední buňkou a ta ho pohltí. Bakterie je tedy v nové buňce a je obklopena fagosomem se dvěma membránami. Následně přicházejí na řadu další dva virulentní proteiny, které membrány dokáží rozrušit. Je to lecitinasa (PlcB, 264 aminokyselin) a metaloproteasa (Mpl, 510 aminokyselin). Po rozrušení fagosomu dochází

k uvolnění bakterie do cytosolu, kde se bakterie začíná množit a výše popsané děje se opakují (Blažková et al. 2005).



Obrázek č. 7: Cyklus *L. monocytogenes* (Upraveno podle: Southwick & Purich 1996)

3.4.2 Léčba

Před zahájením samotné léčby je potřeba provést diagnostiku. Musí se provést přímý průkaz listerií a to kultivací z krve anebo pomocí PCR metody (polymerase chain reaction). Vzorky se odebírají například z plodové vody, mozkomíšního moku, hlenu nebo smolky. Léčba závisí na závažnosti příznaků. Ve většině případů jsou příznaky mírné, a proto léčba není zahájena vůbec. K léčbě antibiotiky se přistupuje pouze v některých případech (Tabulka č. 4) (Foltýnová 2014).

Aby byla antibiotika efektivní, musí být schopna dobře prostupovat do hostitelských buněk a udržet se v nich ve vysokých koncentracích. Výrazné změny v koncentraci nebo pH při penetraci do buněk, mohou účinnost antibiotik snižovat. Antibiotika také musí mít schopnost navázat se na penicilin vázající protein 3 (penicillin binding protein 3, PBP3) bakterií, což způsobuje jejich buněčnou smrt. V případě těhotných musí antibiotikum projít placentou v přiměřené koncentraci. K léčbě listeriózy se používá penicilin, ampicilin a amoxicilin. Některé studie navrhují využít synergického efektu těchto antibiotik s gentamycinem, ale výzkumy na zvířecích modelech to spolehlivě nepotvrdily. Vzhledem k toxicitě je použití gentamycinu zpochybnováno. Pokud jsou někteří pacienti alergičtí

na penicilin, používá se trimethoprim nebo sulfamethoxazole jako náhrada. Proti meningitidě způsobené listeriózou se intravenózně používá vancomycin. Dalšími antibiotiky používající se při léčbě listeriózy jsou erytromycin, propenem, linezolid a rifampin (Janakiraman 2008).

Tabulka č. 4 - Možnosti léčby listeriálních infekcí (Upraveno dle Janakiraman 2008)

Infekce	Léčba	Doba
Bakteriémie	V první řadě: ampicilin ≥ 6 g/d (3), v případě, že je pacient starší 50 let nebo má chronické onemocnění, kardiovaskulární nebo respirační potíže přidat gentamicin	14 dní
	V druhé řadě: erytromycin 4 g/d, nebo TMP/SMX 200 - 320 mg/d, nebo vancomycin 1 g třikrát denně	14 dní
Bakteriémie v těhotenství	V první řadě: ampicilin ≥ 6 g/d (3)	7 - 14 dní (1)
	V druhé řadě: erytromycin 4 g/d (3)	7 - 14 dní (1)
Akutní meningitida	V první řadě: ampicilin ≥ 6 g/d (3), v případě, že je pacient starší 50 let nebo má chronické onemocnění, kardiovaskulární nebo respirační potíže přidat gentamicin	21 dní
	V druhé řadě: TMP/SMX 200 - 320 mg	21 dní
Infekční endokarditida	V první řadě ampicilin ≥ 6 g/d (3), v případě, že je pacient starší 50 let nebo má chronické onemocnění, kardiovaskulární nebo respirační potíže přidat gentamicin	6 - 8 týdnů (2)
	V druhé řadě: vancomycin 1 g třikrát denně plus gentamicin 2,5 mg/kg/d	6 - 8 týdnů (2)
Absces mozku	V první řadě: ampicilin 14 g/d plus gentamicin 2,5 mg/kg/d	4 - 6 týdnů
	V druhé řadě: TMP/SMX 200 - 320 mg	4 - 6 týdnů
Infekce kloubů/kostí	V první řadě: ampicilin ≥ 6 g/d (3), v případě, že je pacient starší 50 let nebo má chronické onemocnění, kardiovaskulární nebo respirační potíže přidat gentamicin	2 - 6 týdnů

1) U těhotných: pokud plod přežije, zvážit delší léčbu, 2) 6 týdnů pro normální funkci chlopní, 8 pokud jsou chlopně prostetické, 3) intravenózně; TMP/SMX, trimetoprim/sulfametoxazol

3.4.3 Prevence

Vytvoření přesných pravidel, které by na 100 % zaručily zamezení kontaktu s bakterií *Listeria monocytogenes*, je takřka nemožné (Janakiraman 2008). Vzhledem k tomu, že ke kontaminaci může dojít i v průběhu zpracování potravin, je důležité striktní dodržování hygienických a sanitačních postupů. U produktů s vysokým rizikem výskytu této bakterie, by mělo být zavedené opatření, které sleduje nejen potraviny, ale i povrchy, na kterém jsou potraviny zpracovávány. V případě pozitivního nálezu by měla být přijatá rychlá a účinná opatření, aby bylo zabráněno další kontaminaci potravin (Oliveira et al. 2019). Důležité je

dodržování systému HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points = systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů) a pravidelných kontrol v potravinářských provozech (Sauders & Wiedmann 2007).

Snížení rizika nákazy je možné řádným omytím syrové zeleniny, oddělováním syrových potravin od uvařených, řádná osobní hygiena, sanitace pracovních nástrojů a ploch, kde se potraviny připravují. Doporučené je také omezení konzumace rizikových potravin jako jsou nepasterované mléčné produkty a tepelně neupravené maso (Brychta et al. 2008; Janakiraman 2008).

3.4.4 Legislativa

Výskyt *L. monocytogenes* v potravinách upravuje v České Republice nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. Listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny Úředního věstníku Evropské unie.

Toto nařízení zahrnuje limity výskytu *L. monocytogenes* pro (viz Tabulka č. 5):

1. Potraviny určené k přímé spotřebě pro kojence a potraviny určené k přímé spotřebě pro zvláštní léčebné účely – jsou vyhovující v případě, že všechny zjištěné hodnoty poukazují na nepřítomnost této bakterie a nevyhovující, pokud je přítomnost této bakterie určena v kterékoli jednotce vzorku
2. Potraviny určené k přímé spotřebě, které podporují růst *L. monocytogenes*, jiné než pro kojence a pro zvláštní léčebné účely – před tím, než potraviny opustí bezprostřední kontrolu provozovatele potravinářského podniku, který je vyrábí, musí provozovatel být schopen prokázat, že výrobek nepřekročí limit 100 KTJ/g po celou dobu údržnosti – ty jsou vyhovující, pokud jsou zjištěné hodnoty negativní a nevyhovující v případě, že je přítomnost bakterie prokázána v jakékoli jednotce vzorku.
3. Potraviny určené k přímé spotřebě, které nepodporují růst *L. monocytogenes*, jiné než pro kojence a pro zvláštní léčebné účely.
4. *L. monocytogenes* v ostatních potravinách, které jsou určené k přímé spotřebě – výsledky jsou vyhovující za předpokladu, že všechny zjištěné hodnoty se rovnají limitu nebo jsou nižší a nevyhovující, když je jakákoli hodnota vyšší než limit.

V případě, že výsledky nevyhovují požadovaným kritériím, musí být příslušný produkt stažen z prodeje. Provozovatelé, kteří ve svých podnicích vyrábějí produkty náchylné ke kontaminaci *L. monocytogenes*, musí pravidelně provádět odběry vzorků z míst a zařízení pro zpracování a zároveň musí prověřit, jestli jsou po celou dobu údržnosti potraviny tato kritéria dodržována. Zároveň vědecký výbor pro veterinární opatření týkající se veřejného zdraví vydal stanovisko, které doporučuje udržování koncentrace *L. monocytogenes* v potravinách pod 100 KTJ/g (Nařízení Komise (ES) 2005).

Tabulka č. 5 – Kritéria bezpečnosti potravin (Nařízení Komise (ES) 2005)

Kategorie potravin	Plán odběru vzorků(1)		Limity(2)		Fáze, na niž se kritérium vztahuje
	n	c	m	M	
1. Potraviny určené k přímé spotřebě pro kojence a potraviny určené k přímé spotřebě pro zvláštní léčebné účely (4)	10	0	nepřítomnost ve 25g		produkty uvedené na trh během doby údržnosti
2. Potraviny určené k přímé spotřebě, které podporují růst <i>L. monocytogenes</i> , jiné než pro kojence a pro zvláštní léčebné účely	5	0	100 KTJ/g(5)		produkty uvedené na trh během doby údržnosti
	5	0	nepřítomnost ve 25g(6)		před tím, než potraviny opustí bezprostřední kontrolu provozovatele potravinářského podniku, který je vyrobil
3. Potraviny určené k přímé spotřebě, které nepodporují růst <i>L. monocytogenes</i> , jiné než pro kojence a pro zvláštní léčebné účely(4) (7)	5	0	100 KTJ/g		produkty uvedené na trh během doby údržnosti

(1) n = počet jednotek tvořících vzorek; c = počet jednotek vzorku, jejichž hodnoty převyšují m nebo leží mezi m a M.

(2) U bodů 1.1–1.24 se m rovná M.

(3) Použije se nejnovější vydání příslušné normy.

(4) Pravidelné provádění vyšetření podle příslušného kritéria není za běžných podmínek užitečné u těchto potravin určených k přímé spotřebě: — u takových, které byly tepelně ošetřeny nebo jinak zpracovány za účelem účinného odstranění *L. monocytogenes*, pokud po tomto ošetření není možná opětovná kontaminace (např. výrobky, které jsou tepelně ošetřeny v konečném obalu), — u čerstvé, nekrájené a nezpracované zeleniny a ovoce, vyjma naklíčených semen, — u chleba, sušenek a podobných výrobků, — u vod, nealkoholických nápojů, piva, jablečného vína, vína, lihovin a podobných výrobků v lahvích nebo baleních, — u cukru, medu a cukrovinek, včetně výrobků z kaka a čokolády, — u živých mlžů.

(5) Toto kritérium platí, pokud je výrobce schopen ke spokojenosti příslušného orgánu prokázat, že výrobek nepřekročí limit 100 KTJ/g po celou dobu údržnosti. Provozovatel může pro průběh procesu stanovit průběžné limity, které musejí být dostatečně nízké, aby zaručily, že limit 100 KTJ/g nebude na konci doby údržnosti překročen.

(6) Toto kritérium se vztahuje na výrobky před tím, než opustí bezprostřední kontrolu provozovatele potravinářského podniku, který je vyrábí, pokud není schopen ke spokojenosti příslušného orgánu prokázat, že výrobek nepřekročí limit 100 KTJ/g po celou dobu údržnosti.

(7) Výrobky s $\text{pH} \leq 4,4$ nebo $a_w \leq 0,92$, výrobky s $\text{pH} \leq 5,0$ a $a_w \leq 0,94$, výrobky s dobou údržnosti pod 5 dní jsou automaticky považovány za výrobky spadající do této kategorie. Je-li to vědecky opodstatněné, mohou do této kategorie spadat také jiné kategorie výrobků.

3.4.5 Metody izolace a identifikace

Výskyt a četnost *L. monocytogenes* v různých typech vzorků mohou být studovány pomocí klasických nebo nověji vyvinutých rychlých testů. Detekce a identifikace tradičně zahrnuje kultivační metody zakládající se na selektivním pomnožení (platí pro vzorky, které jsou kontaminované velkým množstvím různých bakterií, jako jsou potraviny) a následném nanášení na pevná selektivní média. Charakterizace pak probíhá na základě morfologie kolonií, schopnosti fermentovat různé sacharidy a na hemolytické aktivitě. Kromě selektivních médií byla vyvinuta i média chromogenní např. Rapid'L.mono, BCM chromogenní médium nebo CHROMagar *Listeria* test. Selektivní média obsahují inhibiční složku (např. různá antibiotika, barviva, anorganické soli a další látky) nebo naopak některá základní složka chybí, což zvýhodňuje jiné než cílové skupiny mikroorganismů. Selektivita těchto půd není stoprocentní, proto je vždy nutno provést konfirmační testy. Chromogenní média mají za cíl odlišit kolonie cílové skupiny mikroorganismů od ostatních, na základě typické biochemické reakce. Tato média obsahují jeden nebo více chromogenních substrátů, které umožňují detekci specifických enzymů schopných odštěpit z chromogenního substrátu chromofor, který je vázaný na barevný indikátor, a tím dojde ke změně barvy dané kolonie hledaného mikroorganismu. Konfirmační testy u těchto médií nejsou nutné. Tyto metody jsou časově náročné, a proto nejsou vhodné pro kontrolu potravin s krátkou životností či klinickou diagnózu. Kultivace trvá přibližně 5–8 dní (Blažková et al. 2005; Perry & Freydière 2007; Dortet et al. 2019; Redakce Choice 2019; O.K. Servis Biopro 2021).

Dlouhá doba kultivace byla důvodem pro vývoj a aplikaci rychlejších technik, jako jsou imunochemické a molekulárně-genetické metody. Imunochemické metody jsou založeny na reakci protilátky s antigenem a mezi běžně používané techniky patří enzymová imunoanalýza, imunochromatografická technika na membráně anebo imunochemické biosenzory tzv. imunosenzory. Molekulárně-genetické metody jsou založené na analýze DNA a patří mezi ně např. DNA hybridizace, polymerázová řetězová reakce (PCR), amplifikace specifických úseků RNA nebo ligázová řetězová reakce (LCR). Tyto testy jsou stejně citlivé, ale lze je dokončit do 48 hodin. Sérologické testování nemůže být používáno přímo pro diagnostiku z důvodu antigenní reaktivity mezi *L. monocytogenes* a dalšími grampozitivními bakteriemi. Avšak dobrým indikátorem infekce může být detekce anti-listeriolysinových protilátek po adsorpci na streptolysin O bakterie *Streptococcus pyogenes* (Blažková et al. 2005; Dortet et al. 2019).

4 Metodika

V praktické části bakalářské práce byla studována kontaminace potravin bakteriemi *L. monocytogenes*. Byly testovány vzorky běžně dostupných potravin, jako maso, mléko, rybí produkty a další, podle ČSN EN ISO 11290-1/2017. Presumptivní *Listeria* spp. byly identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

4.1 Materiál

Analýze bylo podrobena celkem 51 vzorků potravin. Seznam testovaných vzorků je uveden v následující Tabulce č. 6. Rozbor všech těchto vzorků byl proveden v rámci data použitelnosti či data minimální trvanlivosti.

Tabulka č. 6: Seznam vzorků testovaných potravin

	Konkrétní vzorek potraviny
Masné výrobky	Laborecká klobása
	Bravcova sunka (Slovensko)
	Malokarpatska salama
	Šunka nejvyšší jakosti
	Debrecínská pečeně
	Slanina anglická extra
	Salám vysočina
	Utopenec
	Čabajka
	Vesnická klobása nepálivá
	Anglický rostbíf
	Tataráček
	Lahůdková paštika
Lahůdky	Salát Pálivec
	Bukovánek sýrový
	Salát rybí s majonézou
	Salát holandský
	Chlebíček salám
	Chlebíček šunka
	Salát ála KRAB s jogurtem
	Bramborový salát
	Hermelínový salát
	Pochoutkový salát
	Camping salát
Chlebíček hermelínový	
Chlebíček s rostbífem	

Tabulka č. 6: Pokračování, Seznam vzorků testovaných potravin

	Konkrétní vzorek potraviny
Lahůdky	Debrecínský chlebíček
	Kemping salát s majonézou
	Salámová pomazánka
	Papričky plněné sýrem v oleji
Mléko a mléčné výrobky	Kozí sýr - stánkový prodej
	Liptovské nitě- stánkový prodej
	100% Ovčia bryndza - nepasterizovaná
	Sýr Brie 60 %
	Sýr tavený uzený
	Niva
	Tavený sýr
	Čerstvý sýr přírodní
	Sýr Balkánského typu
	Hermelín
	Romadur
	Čerstvé kravské mléko
Bůvolí mléko - vzorek č. 1 – 6	
Ryby a rybí výrobky	Zavináč
	Pstruh lososovitý, uzený - plátky - uzený studeným kouřem
	Rybí salát

4.2 Metody

4.2.1 Mikrobiologický rozbor

4.2.1.1 Příprava médií

4.2.1.1.1 Primární pomnožovací médium se sníženou koncentrací selektivních látek (Half-Fraser bujón)

Do 1000 ml destilované vody bylo odváženo 54 g Listeria enrichment broth base (Oxoid) a přidán chlorid litný (3 g/1000 ml). Následně bylo médium rozvářeno po dobu 15-20 min do úplného rozpuštění všech složek. Po zchlazení bylo médium rozdávkováno do Erlenmeyerových baněk po 225 ml. Erlenmeyerovy baňky byly překryty alobalem. Takto připravená média byla sterilována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Po zchlazení (na 50 °C) byl do Erlenmeyerových baněk přidán selektivní suplement UVM1 (Oxoid) v množství 1 vialka na 500 ml média, obsahující akriflavin (6 mg/500 ml média) a kyselinu nalidixovou (10 mg/500 ml média). K obsahu vialky s UVM1 byl před aplikací resuspendován ve 2 ml destilované vody.

4.2.1.1.2 Sekundární pomnožovací médium (Fraser bujón)

Pro přípravu sekundárního pomnožovacího média byl rovněž použit Listeria enrichment broth base bujón (Oxoid). Po rozváření a následném zchlazení bylo do vialek pipetováno 10 ml bujónu pomocí automatické pipety. Vialky byly taktéž sterilovány v autoklávu. Před použitím byl do každé vialky přidán sekundární selektivní suplement (UVM2, Oxoid), obsahující kyselinu nalidixovou (10 mg/500 ml média) a akriflavin (12,5 mg/500 ml média). Obsah jedné vialky (2 ml) je určen na 500 ml média. Z důvodu lepší manipulace s malým množstvím suplementu, byl obsah vialky se suplementem, rozředěn 5 ml destilované vody a řádně promíchán. Následně bylo do každé vialky s médiem (10 ml) asepticky převedeno 0,2 ml naředěného UVM2.

4.2.1.1.3 Chromogenní *Listeria* agar (ISO) = agar podle Ottavianiho a Agostiho (ALOA)

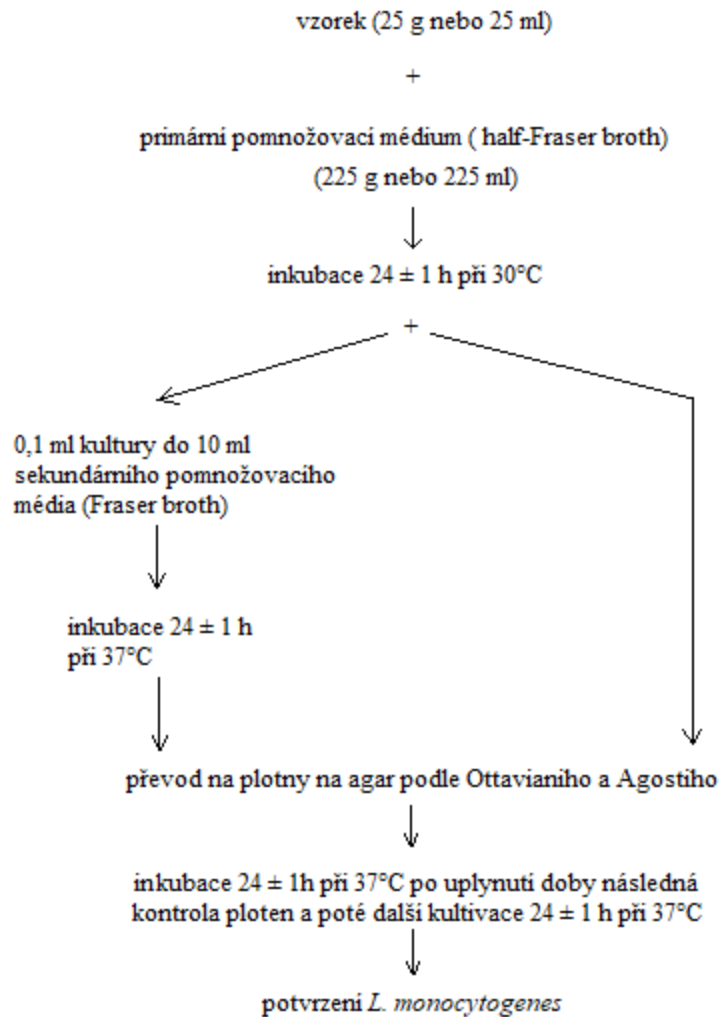
Pro přípravu 500 ml agaru dle Ottavianiho a Agostiho bylo důkladně rozpuštěno 34,5 g Chromogenic Listeria agar (ISO) (Oxoid) ve 480 ml destilované vody. Následně bylo médium vysterilováno a zchlazeno na 46 °C. Po zchlazení byla přidána jedna vialka selektivního suplementu OCLA (1 vialka na 500 ml média, kyselina nalidixová 10 mg polymyxin B 38,350 I, ceftazidim 10 mg, amfotericin 5 mg) (Oxoid) a 20 ml diferenciálního suplementu (20 ml na 500 ml média, lecitin 20 ml) (Oxoid). Po přidání suplementů bylo médium opatrně promícháno, aby se v něm nevytvořily vzduchové bublinky a po 10-15 ml rozdávávalo do sterilních Petriho misek. Plotny s agarem byly uchovávány při teplotě 4 °C.

4.2.1.1.4 Neselektivní bujón z mozkosrdcové infuze BHI (Oxoid)

Pro přípravu média bylo rozpuštěno 37 g BHI (Oxoid) v 1000 ml destilované vody. Následně bylo médium důsledně homogenizováno, rozdávkováno automatickou pipetou po 9 ml do vialek a vysterilováno (121 °C, 15 min).

4.2.1.2 Zpracování vzorků a kultivace

Jednotlivé kroky kultivace jsou znázorněny v Obrázku č. 9.



Obrázek č. 9 – Diagram průběhu kultivace

Vzorky byly důkladně zhomogenizovány v mixéru a 25 g z pevných či 25 ml z tekutých vzorků bylo asepticky převedeno do 225 ml primárního pomnožovacího média (Half-Fraser bujón) (viz Obrázek č. 10 a 11) a opatrně promícháno. Takto upravené vzorky byly inkubovány 24 hod při 30 °C.

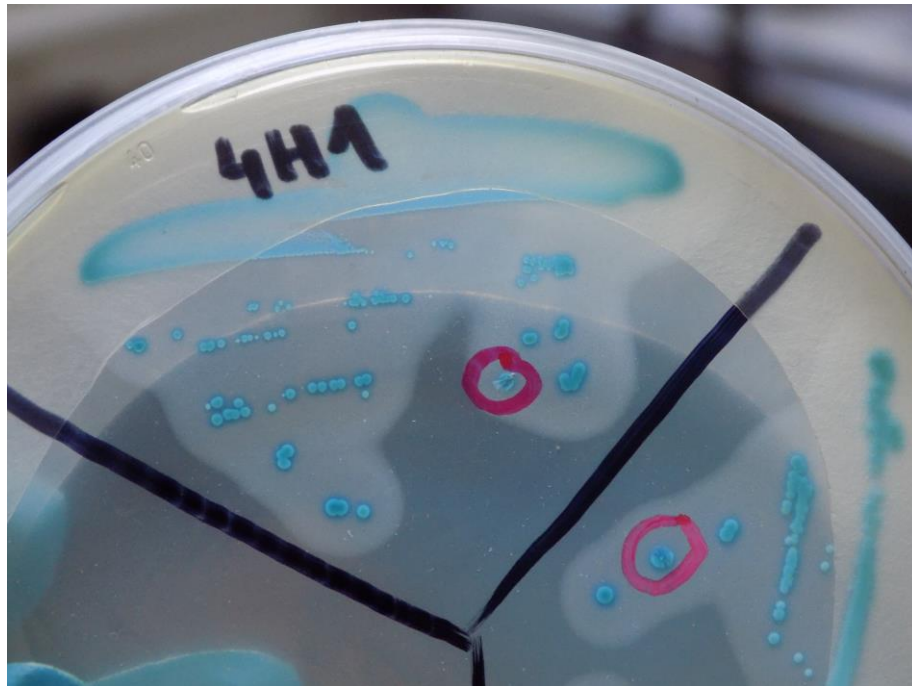


Obrázek č. 10 a 11 – Zhomogenizované vzorky a převedené do Erlenmeyerových baněk a připravené na kultivaci 24 hod při 30 °C.

Po uplynutí stanovené doby bylo asepticky odebráno 0,1 ml a převedeno do připravených vialek s 10 ml média pro sekundární pomnožení (Fraser bujón) a současně byla převedena kapka suspenze z primárního pomnožovacího média na předem připravenou agarovou plotnu s agarem (ALOA). Takto převedené vzorky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C. Po uplynutí doby kultivace byla provedena kontrola nárůstu charakteristických kolonií na miskách. Z vialek s UVM2 byl převeden vzorek na Petriho misky s agarem (ALOA) připravených pro sekundární pomnožení. Po naočkování byly již zkontrolované i nově naočkované misky přeneseny do termostatu na 24 hodin při teplotě nastavené na 37 °C.

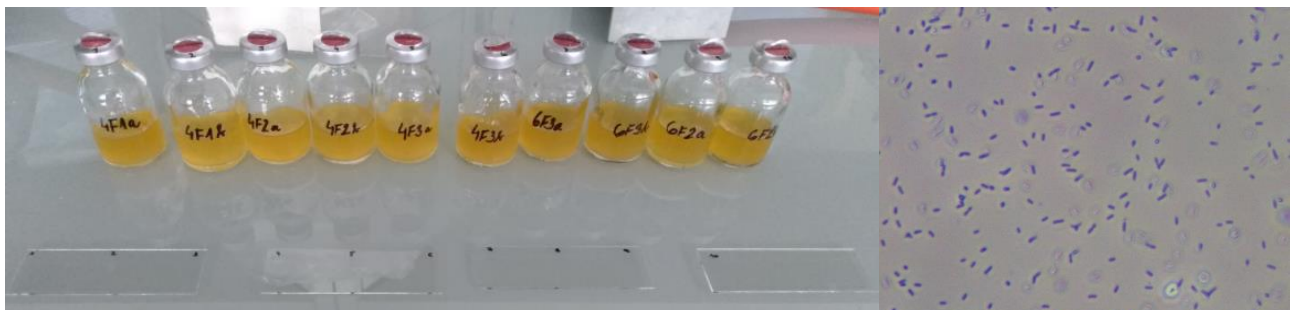
4.2.2 Izolace čistých kultur

Po dokončení kultivace proběhla kontrola charakteristických kolonií (Obrázek č. 12). Byla zaznamenána morfologie a následně vybrány kolonie, které byly dostatečně daleko od sebe (zakroužkované na Obrázku č. 12). Počet izolovaných kolonií závisel na jejich morfologii a počtu.



Obrázek č. 12 – Charakteristické kolonie *L. monocytogenes*

Ty pak byly asepticky převedeny do neselektivního bujónu BHI a kultivovány 24 hodin při 37 °C. Po 24 hodinách se v penicilinkách vytvořil zákal, což značilo nárůst bakterií v médiu (Obrázek č. 13). Následně byla mikroskopicky ověřena čistota narostlých kultur (Obrázek č. 14). Čisté kultury pak byly připraveny na identifikaci pomocí MALDI – TOF hmotnostní spektrometrie.



Obrázek č. 13 – Kolonie převedené do BHI, kultivované a připravené na mikroskopickou kontrolu čistoty

Obrázek č. 14 – Čistá kultura *L. monocytogenes* v BHI

4.2.3 Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS

Jeden mililitr čisté čerstvě narostlé kultury byl převeden do mikrocentrifugačních zkumavek (Eppendorf). Ve zkumavkách byl odstředěn 2,5 minuty při 14,5 tis otáček za minutu. Poté byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno 0,5 ml 70% etanolu. Pomocí pipety byl pelet v etanolu resuspendován a následně znovu stejnou dobu při stejných otáčkách centrifugován. Znovu byl odstraněn supernatant a pelet byl pár minut ponechán při pokojové teplotě vyschnout. K peletu byla pak přidána 70% kyselina mravenčí a 100% acetonitril v poměru 1:1 (v objemu 10 - 15 μ l v závislosti na množství peletu). Po přidání každé složky byla směs důkladně promíchána pipetou a následně i zvortexována. Po promíchání došlo opět k centrifugaci po dobu 2,5 min při 14,5 tis ot/min. Jeden mikrolitr každého supernatantu byl nanesen ve dvou opakováních na čistou MTP 384 MALDI destičku (Obrázek č. 15) a bezprostředně po zaschnutí byly vzorky překryty 1 μ l HCCA matrice (nasycený roztok kyseliny α -kyano-4-hydroxycinnamové v 50 % acetonitrilu s 2,5 % kyselinou trifluoroctovou, BrukerDaltonik GmbH). Připravená destička byla vložena do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF MS.



Obrázek č. 15 – MTP 384 MALDI-TOF MS destička

5 Výsledky

Celkem bylo hodnoceno 51 vzorků potravin. Všechny vzorky byly podrobeny mikrobiologickému rozboru. V případě pozitivního nálezu, byly odebrány typické (modrozelené kolonie s lecitinázovou aktivitou) i netypické (lišící se od typických kolonií či barvou) kolonie a izoláty pak identifikovány metodou MALDI-TOF MS hmotnostní spektrometrie. Spolehlivost identifikace je hodnocena na tzv. skóre. Maximální spolehlivost je dosažena tehdy, kdy je hodnota skóre rovna 3. Hodnota $\geq 2,0$ svědčí o spolehlivé identifikaci mikroorganismu na úrovni druhu (Tabulka č. 7). V Tabulce č. 8 je ukázka výsledku identifikace a nejvyššího skóre vzorku.

Tabulka č 7: Spolehlivost identifikace na základě výsledného skóre

Skupina	Skóre	Identifikace
1	2,300 - 3,000	Vysoce pravděpodobná identifikace druhu
2	2,000 - 2,299	Bezpečná identifikace rodu, pravděpodobná identifikace druhu
3	1,700 - 1,999	Pravděpodobná identifikace rodu
4	0,000 - 1,699	Nespolehlivá identifikace

Tabulka č. 8: Výsledky identifikace MALDI-TOF MS s nejvyšším skóre

ID vzorku	Organismus (nejlepší shoda)	Hodnota skóre	Organismus (druhá nejlepší shoda)	Hodnota skóre
16Ha *	Listeria innocua	2,39	Listeria innocua	2,24

* Hermelínový salát, izolát č. 1

Charakteristické kolonie, tedy modrozelené s lecitinázovou aktivitou byly zjištěny u 5 vzorků. U tří vzorků se lecitinázová aktivita projevila hned po uplynutí doby kultivace. Jednalo se o kolonie pocházející ze vzorku ze Salátu holandského, Bukovánku sýrového a Chlebičku hermelínového. U dvou vzorků se lecitinázová aktivita projevila až po týdně uchování v chladničce. Konkrétně u Hermelínového salátu a u Chlebičku s rostbífem. U zbylých vzorků se žádná lecitinázová aktivita neobjevila. Mezi netypické izolované kolonie patřily kolonie drobné modrozelené bez lecitinázové aktivity, velké modrozelené bez lecitinázové aktivity, drobné bílé a také velké bílé s nazelenalým středem.

Izolováno bylo 109 kmenů bakterií, z nichž bylo metodou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií identifikováno 76 (viz Tabulka č. 8), nejméně na úroveň rodu (55 izolátů identifikováno na úroveň druhu (hodnoty skóre $\geq 2,000$), 21 izolátů na úroveň rodu (hodnoty skóre 1,700-1,999), u 33 izolátů se identifikace nepodařila.

Tabulka č. 8: Identifikované mikroorganismy a počet provedených izolátů

Vzorek potraviny	Morfologie kolonií*	Identifikovaný mikroorganismus	Celkem izolátů ve vzorku	Celkem izolátů ve skupině
Masné výrobky				
Laborecká klobása	b	-	1	25
Bravcova sunka (Slovensko)	b	-	1	
Malokarpatska salama	b	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	
Šunka nejvyšší jakosti	b	-	1	
Debrecínská pečeně	b	<i>Enterococcus ratti</i>	1	
Slanina anglická extra	a ⁺ , b	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	
Salám vysočina	a ⁺ , b	<i>Micrococcus luteus</i>	2	
Utopenec	a ⁺ , b	-	1	
Čabajka	a ⁺ , b	-	2	
Vesnická klobása nepálivá	a ⁺ , b	<i>Listeria innocua</i>	5	
		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		
Anglický rostbíf	b	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	
		<i>Staphylococcus aureus/warneri</i>		
Tataráček	a ⁺ , b	<i>Listeria innocua</i>	3	
		<i>Listeria monocytogenes</i>		
Lahůdková paštika	a ⁺ , b	<i>Bacillus safensis</i>	2	
		<i>Staphylococcus carnosus</i>		
Lahůdky (a)				
Salát Palivec	b	-	1	47
Bukovánek sýrový	a ⁺	<i>Listeria monocytogenes</i>	15	
		<i>Listeria ivanovii</i>		
Salát rybí s majonézou	-	-	0	
Salát holandský	a ⁺ , b	<i>Listeria monocytogenes</i>	14	
		<i>Listeria ivanovii</i>		
		<i>Listeria innocua</i>		
		<i>Enterococcus faecalis</i>		
Chlebiček salám	b	<i>Enterococcus mundtii</i>	3	
Chlebiček šunka	b	<i>Enterococcus mundtii</i>	3	
Salát ála KRAB s jogurtem	a ⁻	<i>Listeria innocua</i>	4	
		<i>Listeria monocytogenes</i>		
Bramborový salát	-	-	0	
Hermelínový salát	a ⁺	<i>Listeria innocua</i>	3	
		<i>Listeria monocytogenes</i>		
Pochoutkový salát	a ⁻	<i>Bacillus circulans</i>	2	
Camping salát	b	-	2	

Tabulka č. 8: Pokračování

Vzorek potravin	Morfologie kolonií*	Identifikovaný mikroorganismus	Celkem izolátů ve vzorku	Celkem izolátů ve skupině
Lahůdky (b)				
Chlebíček hermelínový	a ⁺	<i>Listeria innocua</i>	2	7
		<i>Listeria monocytogenes</i>		
Chlebíček s rostbífem	a ⁺	<i>Listeria innocua</i>	2	
		<i>Listeria monocytogenes</i>		
Debrecínský chlebíček	-	-	0	
Kemping salát s majonézou	b	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	
Salámová pomazánka	b	-	2	
Papričky plněné sýrem v oleji	-	-	0	
Mléko a mléčné výrobky				
Kozí sýr - stánkový prodej	a ⁻ , b	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	30
		<i>Klebsiella oxytoca</i>		
Liptovské nitě	a ⁻	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	
100% Ovčia bryndza - nepasterizovaná	a ⁻ , b	<i>Enterococcus mundtii</i>	2	
Sýr Brie 60 %	a ⁻ , b	<i>Staphylococcus vitulnus</i>	3	
Sýr tavený uzený	-	-	0	
Niva	a ⁻	<i>Listeria aquatica</i>	2	
Tavený sýr	b	<i>Staphylococcus hominis</i>	1	
Čerstvý sýr přírodní	a ⁻ , b	-	1	
Sýr Balkánského typu	-	-	0	
Hermelín	b	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	
Romadur	-	-	0	
Čerstvé kravské mléko	a ⁻ , b	<i>Enterococcus faecium</i>	3	
		<i>Listeria innocua</i>		
Bůvolí mléko - vzorek č. 1 - 7	a ⁻ , b	<i>Oerskovia turbata</i>	14	
		<i>Micrococcus luteus</i>		
		<i>Enterococcus casseliflavus</i>		
		<i>Listeria newyorkensis</i>		
		<i>Listeria cornellensis</i>		
Ryby a rybí výrobky				
Zavináč	-	-	0	0
Pstruh lososovitý, uzený - plátky - uzený studeným kouřem	-	-	0	
Rybí salát	-	-	0	

* a⁺- typické zelenomodré kolonie s lecitinázovou aktivitou
a⁻- typické zelenomodré kolonie bez lecitinázové aktivity
b- atypické kolonie (bílá, bílá se zeleným středem, nažloutlá)

Kontaminace bakteriemi rodu *Listeria* byla pomocí identifikace MALDI-TOF MS zjištěna v 11 vzorcích (21,57 %). *L. monocytogenes* byla detekována v 7 vzorcích (13,72 %).

Nejvyšší zastoupení *L. monocytogenes* bylo ve skupině lahůdek (6 vzorků = 11,76 %). Ve skupině masných výrobků byl pozitivní 1 vzorek (1,96 %). V mléčných výrobcích se *L. monocytogenes* nevyskytla ani v jednom případě a stejně tak ve skupině rybích výrobků.

Co se týče ostatních mikroorganismů, které jsou schopné nárůstu na selektivních médiích pro *L. monocytogenes*, bylo detekováno 21 různých druhů. Bakterie rodu *Klebsiella* (kozí sýr) a *Micrococcus* (vysočina, buvolí mléko) tvořily bílé kolonie. Bakterie rodu *Staphylococcus* (Malokarpatska salama, sýr Brie, rostbíf, tavený sýr, lahůdková paštika) tvořily bílé kolonie čisté i se zeleným středem. Bílé až nažloutlé kolonie tvořil rod *Oeskorvia* (buvolí mléko). Modrozelené kolonie bez lecitinázové aktivity tvořily kromě rodu *Listeria* (salát holandský, niva, vesnická klobása, tataráček, čerstvé mléko kravské nepasterizované, buvolí mléko, Bukovánek sýrový, salát ála krab, hermelínový salát, hermelínový chlebiček, chlebiček s rostbífem) ještě bakterie rodu *Enterococcus* (kozí sýr, liptovské nitě, ovčia bryndza, chlebiček se salámem, chlebiček se šunkou, kemping salát s majonézou, debrecínská pečeně, anglická slanina, hermelín, čerstvé nepasterizované kravské a buvolí mléko) a *Bacillus* (lahůdková paštika, pochoutkový salát). Největší variabilita druhů byla nalezena ve skupině mléka a mléčných výrobků (6 různých druhů) a v masných výrobcích (5 různých druhů). Nejčastěji nalezenými mikroorganismy byly bakterie rodu *Enterococcus* a *Staphylococcus*.

Celkem bylo pomocí MALDI-TOF MS zaznamenáno 6 různých druhů rodu *Listeria* a to *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis* a *L. cornellensis*.

6 Diskuze

Listeria monocytogenes je grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterie ve tvaru tyčinek. Řadí se do rodu *Listeria* a je úzce příbuzná druhům *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* a *L. grayi*. Z těchto druhů je za patogenní pro člověka považována pouze *L. monocytogenes*. Díky svým fyziologickým vlastnostem, jako je odolnost vůči stresu kyselého a slaného prostředí, schopnosti růstu při nízkých teplotách a možnosti tvorby biofilmů, může přetrvávat nebo rekontaminovat potraviny, což představuje významné riziko pro bezpečnost konzumentů. Mezi kontaminované potraviny patří produkty jak živočišného, tak rostlinného původu, jako jsou masné produkty, sýry a mléčné produkty, ryby a rybí produkty, zelenina, ovoce a obecně potraviny určené k přímé spotřebě (Vazquez-Boland et al. 2001; Gasanov et al. 2005; Lianou & Sofos 2007; Alessandria et al. 2010; Brychta et al. 2018).

Cílem této práce bylo zjistit, zda se v potravinách, které jsou běžně dostupné na českém trhu, objeví *L. monocytogenes*. Po nárůstu na selektivním agaru, dle Ottavianiho a Agostiho, byl zkoumán vzhled narostlých kolonií a následně morfologie buněk izolovaných bakterií. Prvotní hodnocení tedy probíhalo na základě kultivačních a mikroskopických znaků.

Bakterie rodu *Listeria*, tvořily na ALOA agaru modrozelené, pravidelné kruhové kolonie. Stejně jako popisuje Willis et al. (2006). Shodně s Willis et al. (2006) i v tomto pokusu byl přidán sojový lecitin, který je hydrolyzován enzymy *L. monocytogenes* a *L. ivanovii*, a který umožňuje odlišit patogenní listérie od těch nepatogenních. U patogenních druhů se kolonií vytvoří neprůhledný halo efekt (neboli zónu precipitace). Willis et al. (2006) také popisuje, že se halo efekt objevil už po 24 hodinách inkubace a u tradičního nechromogenního média se halo efekt objevil do 48 hod (jako u 3 našich vzorků), avšak při provádění praktické části této práce se stalo to, že u dvou vzorků se zóna precipitace neobjevila po 24 ani po 48 hod inkubace, ale až po týdnů uchovávání vzorku v chladničce. Mohlo by to být tím, že nižší teploty vyvolaly stres a bakterie na to reagovaly vytvořením zóny. Výsledky tohoto pozorování, tedy ještě před tím, než bylo pokračováno s přesnější identifikací, naznačily, že u 5 vzorků by se mohlo jednat o jeden z patogenních druhů listérií. Což nekoresponduje s výsledky z MALDI-TOF MS hmotnostní spektrometrií, která vyhodnotila jako *L. monocytogenes* i kmeny, které nevykazovaly lecitinázovou aktivitu. Důvodem může být změna pH nebo působení selektivních látek, působících stres a kolonie tak ztrácí schopnost produkovat lecitinázu.

Další bližší rozlišení mikroorganismů proběhlo s využitím mikroskopu, kdy byly sledovány jednotlivé buňky, ze vzorků kultivovaných v BHI médiu. Morfologie buněk pocházejících ze vzorků se lišila. Různé druhy potravin obsahovaly buňky s odlišnou morfologií. V některých případech byly i v rámci jedné potraviny pozorovány odlišné morfologické znaky kolonií i buněk. Kromě drobných tyčinek typických pro listérie (z modrozelených kolonií s/bez lecitinázové aktivity), se objevily koky (z modrozelených kolonií bez lecitinázové aktivity a z bílých kolonií se zeleným středem), diplokoky (z modrozelených, bílých kolonií a z bílých kolonií se zeleným středem), kokotyčinky (z bílých kolonií se zeleným středem) nebo jiné buňky různých rozmanitých tvarů (z bílých

a nažloutlých kolonií). U tvarů, které nebyly drobnými tyčinkami, se mohlo s jistotou určit, že se nejedná o bakterie rodu *Listeria*.

Metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS se stala standardním nástrojem pro rychlou a spolehlivou identifikaci mikroorganismů v klinických a potravinářských laboratořích (Ojima-Kato et al. 2016). Tato technika spojuje vysokou citlivost s přesností a je ideální pro detekci proteinů s vysokou a nízkou molekulovou hmotností. MALDI-TOF MS má vysoký potenciál pro rychlé rozlišení mezi patogenními a nepatogenními druhy bakterií. Výhodou je také to, že lze použít pro správnou identifikaci hmotnostní spektra získaná z neznámých bakteriálních vzorků pro srovnání s referenčními databázemi známých organismů. Cílem této metody je analýza tzv. „fingerprintu“ ribozomálních proteinů, který je specifický pro daný rod, druh a kmen (Barbuddhe et al. 2008). Bylo však zjištěno, že *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshiemri*, *L. ivanovii* a *L. seeligeri* nelze touto „fingerprintovou“ metodou s jistotou odlišit. Také byly zjištěny nepřesnosti mezi serotypem 4a a 4c u *L. monocytogenes* (Ojima-Kato et al. 2016). Nelze tedy s jistotou určit, že vyhodnocená data jsou stoprocentní, a tedy zda se skutečně jedná o druh *L. monocytogenes* nade vší pochybnost. Proto by měly být výsledky této metody potvrzeny ještě dalšími konfirmačními metodami.

Počet izolátů, který byl podroben analýze MALDI-TOF MS, se rovnal 109, přičemž, jak je již zmíněno výše v kapitole s výsledky, identifikováno alespoň na úroveň rodu bylo pouze 76, tedy 69,72 %. U 33 izolátů (30,28 %) se identifikace nepodařila, hodnoty skóre byly v rozmezí 1,7-2,39. Vzhledem k tomu, jaké množství izolátů se nepodařilo identifikovat a proto, že došlo k ne příliš jasným výsledkům, by také bylo vhodné použít další metody, které by mohly pomoci specifikovat výsledky. Vyhodnocení výsledků MALDI-TOF MS je závislé na referenčních spektrech zanesených v databázi. Není-li daný druh v databázi uveden, nemůže ho MALDI identifikovat.

Z výsledků lze vyčíst, že přítomnost *Listeria* spp. byla zaznamenána ve 21,57 % všech vzorků. Největší procento výskytu *L. monocytogenes* ze všech vzorků vykázala skupina lahůdek (11,76 %). Především asi proto, že lahůdky patří mezi potraviny určené k přímé spotřebě a jsou velmi náchylné ke kontaminaci. Ke kontaminaci může dojít již při výrobě. Kontaminována může být jen některá z mnoha ingrediencí, ze kterých se potravina skládá (např. sýr, majonéza, klobása...). Ke kontaminaci může také dojít přímo na prodejně, kde se výrobky dávají do menších balení (podle požadavků zákazníků). Ve skupině lahůdek byl zaznamenán výskyt *Listeria* spp. a *L. monocytogenes* ve 35,29 % (6 vzorků ze 17). Vysokou náchylnost ke kontaminaci uvádí i Pinto et al. (2010), kde byl prokázán výskyt *L. monocytogenes* ve 27 % lahůdek.

Ve skupině masných výrobků byla přítomnost *Listeria* spp. v 15,38 % (2 z 13) a *L. monocytogenes* v 7,69 % (1 z 13). Údaje o výskytu listérií v masných výrobcích se liší. Například v Íránu byl zaznamenán výskyt *Listeria* spp. v 6,33 % masných výrobků a *L. monocytogenes* v mraženém hovězím mase ve 14,2 % (Jalali & Abedi 2008). Zato Cordano & Rocourt (2001) uvádějí, že v Chile bylo v masných výrobcích pozitivních na *L. monocytogenes* 3,6 % vzorků.

V mléčných výrobcích byl výskyt *Listeria* spp. v 15,78 % (3 z 19) a *L. monocytogenes* v 0 % (0 z 19). Ve dvou pozitivních nálezech se jednalo o nepasterizované mléko (10,53 %). Přítomnost listérií v nepasterizovaném mléce zkoumali Moshtaghi & Mohamadpour (2007),

kterí uvádějí, že výskyt *Listeria* spp. byl roven 2,2 % a výskyt *L. monocytogenes* v 1,6 % testovaných vzorků.

U rybích výrobků nebyl zjištěn žádný pozitivní nález. Důvodem byl pravděpodobně nízký počet testovaných vzorků (n=3). Studie uvádějí poměrně vysoká procenta výskytu *L. monocytogenes* v rybích výrobcích. Například Mena et al. (2004) uvádí přítomnost *L. monocytogenes* u 12 % testovaných vzorků. Cordano & Rocourt (2001) ve své studii uvádějí 11,6% výskyt *L. monocytogenes*, což je nejvyšší procento prevalence této bakterie ze všech jejich testovaných vzorků. A Pinto et al. (2010) ve své studii uvádí také velmi vysoké procento zastoupení *L. monocytogenes* v rybích výrobcích, konkrétně z uzeného lososa, a to 34,1 % z testovaných vzorků.

Identifikace provedená metodou MALDI-TOF MS není stoprocentní a vzhledem k nedostatku času a nepříznivé situaci nebylo možné provést další potřebné konfirmační testy. V tomto případě můžeme tedy nade vši pochybnost potvrdit pouze to, že v testovaných vzorcích byla potvrzena přítomnost bakterií rodu *Listeria*. Ačkoliv vzhledem k výskytu typických kolonií, lecitinázové aktivitě, tvaru a velikosti jednotlivých buněk, je velice pravděpodobné, že v budoucnu, po provedení dalších potřebných testů, bude v těchto vzorcích potvrzen výskyt *L. monocytogenes*.

Vzhledem k nebezpečnosti listérií je více než vhodné se snažit minimalizovat jejich výskyt. Proto je třeba jejich přítomnost monitorovat a přijímat vhodná preventivní opatření. Spotřebitelé by měli dodržovat základní hygienická a bezpečnostní opatření při manipulaci s potravinami. Tento problém je i přes veškerá opatření aktuální a je potřeba stále hledat řešení a alternativy, jak snížit výskyt této bakterie v potravinách.

7 Závěr

Byl potvrzen výskyt bakterií rodu *Listeria* v potravinách běžně dostupných na českém trhu a to v 11 vzorcích z 51, z nichž *L. monocytogenes* byla potvrzena v 11,76 % vzorků testovaných potravin (7 vzorků). Skupinou s nejvyšším množstvím nálezů *L. monocytogenes* byly lahůdky (35,29 %).

Na selektivních médiích určené pro listérie jsou schopny přežít i bakterie rodu *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Oeskorvia*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* a *Bacillus*. Některé z těchto rodů vytvářejí shodné kolonie jako listérie, ale bez zóny precipitace. Jsou to rody *Enterococcus* a *Bacillus*.

V budoucnu budou provedeny další konfirmační testy a ověřena schopnost metody MALDI-TOF spolehlivě identifikovat a odlišit jednotlivé druhy v rámci rodu *Listeria*.

8 Literatura

- Allerberger, F., Wagner, M. 2010. Listeriosis: A resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*. 16 . 16–23. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x.
- Barbuddhe, S. B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T., Hain, T. 2008. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (17). 5402–5407. doi: 10.1128/AEM.02689-07.
- Blažková, M., Karamonová, L., Fukal, L., Rauch, P. 2005. *Listeria monocytogenes* - Nebezpečný patogen a jeho detekce v potravinách. *Chemicke Listy*. 99 (7). 467–473.
- Borucki, M. K., Gay, C. C., Reynolds, J., McElwain, K. L., Kim, S. H., Call, D. R., Knowles, D. P. 2005. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* strains from a high-prevalence dairy farm. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (10). 5893–5899. doi: 10.1128/AEM.71.10.5893-5899.2005.
- Brychta, J., Bartošová, L., Brychta, V. 2018. Výskyt *Listeria ,pmpcytogenes* v potravinách a riziko onemocnění pro člověka. 1. vydání. Praha. ISBN: 9788088019312.
- Chen, M, et al. 2019. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* sequence type 121 strains using a novel multiplex PCR assay. *LWR-Food Science and Technology*, 116:108474. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108474.
- Chiara, M, et. al. 2015. Comparative Genomics of *Listeria* Sensu Lato: Genus-Wide Differences in Evolutionary Dynamics and the Progressive Gain of Complex, Potentially Pathogenicity-Related Traits through Lateral Gene Transfer. *Genome Biology and Evolution*. 7 (8). 2154–2172. doi: 10.1093/gbe/evv131.
- Chlebicz, A., Śliżewska, K. 2018. , Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15:863. MDPI AG. doi: 10.3390/ijerph15050863.
- Cordano, A. M., Rocourt, J. 2001. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *International Journal of Food Microbiology*. 70 (1–2). 175–178. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00533-5.
- Dortet, L., Radoshevich, L., Veiga, E., Cossart, P. 2019. *Listeria monocytogenes*. *Encyclopedia of Microbiology*. 4th ed. Elsevier Inc. p. 803–818. ISBN: 9780128117378.
- Ermolaeva, S., Karpova, T., Novella, S., Wagner, M., Scotti, M., Tartakovskii, I., Vazquez-Boland, J. A. 2003. A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal. *International Journal of Food Microbiology*. 82 (1). 87–94. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00399-9.

- European Commission 2021. RASFF Portal. Available from <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList> (accessed March 2021).
- European Food Safety Authority (EFSA) 2002. Listeria. Available from <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/listeria> (accessed April 2021).
- European Food Safety Authority (EFSA) 2019. Foodborne outbreaks reported in 2019. Available from <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiY2FmNmUzYWVtZjg4Zi00ODJiLTkwMDMtOGUzYTY0YzYxMWY5IiwidCI6ImM0ODdkZDVhLTM3NjktNDQyYy1hYjc3LTI5MTkwODFkODVmYyIsImMiOiJl9> (accessed March 2021).
- Foltýnová, S. 2014. 74 Přehledové články. **15** (2). 74–75.
- Fujisawa, T., Mori, M. 1994. Evaluation of Media for determining hemolytic activity and that of API *Listeria* system for identifying strains of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*. **32**:1127-1695.
- Gasanov, U., Hughes, D., Hansbro, P. M. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. *FEMS Microbiology Reviews*. **29** (5). 851–875. doi: 10.1016/j.femsre.2004.12.002.
- Gelbíčová, T., Zobaníková, M., Tomáščíková, Z., Van Walle, I., Ruppitsch, W., Karpíšková, R. 2018. An outbreak of listeriosis linked to Turkey meat products in the Czech Republic, 2012-2016. *Epidemiology and Infection*. **146** (11). 1407–1412. doi: 10.1017/S0950268818001565.
- Glaser P, et al. 2001. Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science*. **294**(5543):849-852. doi: 10.1126/science.1063447.
- Groves, R. D., Welshimer, H. J. 1977. Separation of Pathogenic from Apathogenic *Listeria monocytogenes* by Three In Vitro Reactions. *Journal of Clinical Microbiology*. **5**:559-563.
- Jadhav, S., Gulati, V., Fox, E. M., Karpe, A., Beale, D. J., Sevier, D., Bhave, M., Palombo, E. A. 2015. Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.023.
- Jalali, M., Abedi, D. 2008. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. *International Journal of Food Microbiology*. **122** (3). 336–340. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.082.
- Janakiraman, V. 2008. Listeriosis in Pregnancy: Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Reviews in obstetrics & gynecology* **1**:179-85. Available from <http://phil.cdc.gov/phil/home>.

- Komise, E. 2005. (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.
- Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Pöltsuma, P., Elias, T. 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.06.047.
- Lianou, A., Sofos, J. N. 2007. A Review of the Incidence and Transmission of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Products in Retail and Food Service Environments. *Journal of Food Protection*. 70:2172. doi: 10.1111/j.1745-4522.2007.00089.x.
- Lous, J., Ryborg, C. T., Thomsen, J. L. 2011. A systematic review of the effect of tympanostomy tubes in children with recurrent acute otitis media. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 75 (9):1058-61. doi: 10.1016/j.ijporl.2011.05.009.
- McLauchlin, J., Rees, C. E. D. 2009. Systematic Bacteriology. In: W. B. Whitman, G. M. Garrity, P. De Vos, D. Jones, N. Kreig, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes Systematic Bacteriology*. second Edition. p. 244–257. New York, NY. Springer Dordrecht Heidelberg London. ISBN: 978-0-387-95041-9
- McMullen, P. D., Freitag, N. E. 2014. *Listeria monocytogenes*. In: *Molecular Medical Microbiology: Second Edition*. Vol. 2–3. p. 1345–1361. Elsevier Ltd. ISBN: 9780123971692.
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., Gibbs, P. A. 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*. 21 (2). 213–216. doi: 10.1016/S0740-0020(03)00057-1.
- Moshtaghi, H., Mohamadpour, A. A. 2007. Incidence of *Listeria* spp. in Raw Milk in Shahrekord, Iran. *Foodborne Pathogens and Disease*. 4 (1): 107–110. doi: 10.1089/fpd.2006.61.
- O.K. Servis Biopro 2021. Klasická a chromogenní média. Available from <https://www.biopro.cz/mikrobiologicka-diagnostika-mikrobiologie-klasicka-a-chromogenni-media> (accessed March 2021).
- 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*, 11.7:e0159730. doi: 10.1371/journal.pone.0159730.
- Oliveira, N. A., Bittencourt, G. M., Oliveira, C. A. F. 2019. *Listeria monocytogenes* in Brazilian foods: Occurrence, risks to human health and their prevention. *Current Research in Nutrition and Food Science*. 7 (2). 320–330. doi: 10.12944/CRNFSJ.7.2.02.
- Orsi, R. H., Wiedmann, M. 2016. , Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**: 5273-5287.

- Ottaviani, F., Ottaviani, M., Agosti, M. 1997. Differential agar medium for *Listeria monocytogenes* [foods]. Industrie Alimentari (Italy).
- Pinto, A. Di, Novello, L., Montemurro, F., Bonerba, E., Tantillo, G. 2010. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy. *New Microbiologica*. **33**:249-252.
- Perry, J. D., Freydière, A. M. 2007. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *Journal of Applied Microbiology*. 103 (6). 2046–2055. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x.
- Quereda, J., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Gómez-Martín, Á., García-Muñoz, Á., Thouvenot, P., Tessaud-Rita, N., Bracq-Dieye, H., Lecuit, M. 2020. *Listeria valentina* sp. nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi: 10.1099/ijsem.0.004494i.
- Redakce Choice 2019. Rozdíl mezi selektivními a diferenciálními médii - 2021 - Zprávy. Available from <https://cs.weblogographic.com/difference-between-selective> (accessed March 2021)
- Ricci A, et al. 2018. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*. 16 (1). doi: 10.2903/j.efsa.2018.5134.
- Sauders B. D., Wiedmann M. 2007. Ecology of *Listeria* Species and *L. monocytogenes* in the Natural Environment. Pages 21-53 in Ryser ET, Marth E H, editors. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety, Third Edition (Food Science and Technology)*. CRC Press, USA.
- Shen, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Cripe, J., Conway, W., Meng, J., Hall, G., Bhagwat, A. A. 2006. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods in Florida. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (7). 5073–5076. doi: 10.1128/AEM.00435-06.
- Southwick, F. S., Purich, D. L. 1996. Intracellular Pathogenesis of Listeriosis. *New England Journal of Medicine*. 334 (12). 770–776. doi: 10.1056/nejm199603213341206.
- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, Gustavo Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. 2001. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. 14 (3). 584–640. doi: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.
- Vilar, M. J., Yus, E., Sanjuán, M. L., Diéguez, F. J., Rodríguez-Otero, J. L. 2007. Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 90 (11). 5083–5088. doi: 10.3168/jds.2007-0213.
- Warriner, K., Namvar, A. 2009. What is the hysteria with *Listeria*? *Trends in Food Science and Technology*. 20 (6–7). 245–254. doi: 10.1016/j.tifs.2009.03.008.
- Willis, C., Baalham, T., Greenwood, M., Presland, F. 2006. Evaluation of a new chromogenic agar for the detection of *Listeria* in food. *Journal of Applied Microbiology*. 101 (3). 711–717. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02917.x.

Wing, E. J., Gregory, S. H. 2000. An Updated Model of Cell-Mediated Immunity-listeriosis: Clinical and Research Aspects. OceanSide Publications. **21** (4):209.

World Health Organization (WHO) 2018. , February 20 Listeriosis. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis> (accessed April 2021)

Zhu, Q., Gooneratne, R., Hussain, M. A. 2017. Listeria monocytogenes in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. Foods (Basel, Switzerland). 6 (3). 21. doi: 10.3390/foods6030021.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

ActA – Actin assembly protein (protein aktivující polymerizaci aktinu)

AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome (Syndrom získaného selhání imunity)

ALOA – Agosti-Ottaviani Listeria agar

aw – aktivita vody

BHI – Brain Heart Infusion

ČSN – Česká státní norma

ČR – Česká Republika

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EFSA – European Food Safety Authority (Evropský úřad pro bezpečnost potravin)

ES – Evropské společenství

EU – Evropská unie

FSC – Food safety kriteria (Kriteria pro bezpečnost potravin)

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Points (Systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů)

HIV – Human imuno-defficiency virus

InlA – internalin A

Inl B – internalin B

KK – klonální komplex

KTJ – kolonie tvořící jednotky

LCR – ligázová řetězová reakce

LLO – listeriolysin O

MALDI-TOF MS – Matrix laser desorption/ionization Time-of-flight Mass Spectrometry (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem)

MLST – Multilocus sequence typing (Multilokusová sekvenční typizace)

Mpl – metaloproteasa

OCLA – Diferenciální suplement (pro listérie)

PBP3 – penicilin binding protein (penicilin vázající protein)

PCR – Polymerase chain reaction (Polymerázová řetězová reakce)

PI-PLC – fosfatidylinositol fosfolipáza C

PlcB – gen kódující fosfatidilcholin-specifickou fosfolipázu C

RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed (System rychlého varování pro potraviny a krmiva)

RNA – ribonukleová kyselina

RTE – Ready to eat (určené k přímé spotřebě)

SMX – sulfamethoxazol

TMP – trimethoprim

TSB – Trypton sójový bujón

USA – Spojené státy americké

UVM1- primární selektivní pomnožovací suplement

UVM2 – sekundární selektivní pomnožovací suplement