

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Stanovení a charakterizace *Listeria monocytogenes*  
v potravinách**

**Diplomová práce**

**Bc. Anna Lišková**

**Výživa a potraviny**

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

© 2022/2023 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení a charakterizace *Listeria monocytogenes* v potravinách" 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Haně Šubrtové Salmonové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské i diplomové práce a Ing. Tereze Kodešové, za příjemnou spolupráci, trpělivost odborné vedení, vstřícnost, ochotu při konzultacích a velkou pomoc v krizových momentech.

# Stanovení a charakterizace *Listeria monocytogenes* v potravinách

## Souhrn

*Listeria monocytogenes* je významným alimentárním patogenem, který způsobuje mnoho závažných onemocnění včetně potratů, meningitidy, septikémie a gastroenteritidy u lidí a zvířat. Jedná se o grampozitivní, nesporulující, tyčinkovitou bakterii, která je prakticky všudypřítomná. Navzdory tomu, že onemocnění zvané listerióza, jehož je původcem, se vyskytuje relativně vzácně, vyznačuje se vysokou mortalitou. Z toho důvodu je monitorování přítomnosti *L. monocytogenes* v potravinách nezbytné.

Cílem práce bylo sledování výskytu této bakterie u rizikových skupin potravin, které se běžně vyskytují na českém trhu, a její charakterizace. Celkem bylo testováno 51 vzorků potravin, které náležely kategoriím: masné výrobky (13 vzorků), lahůdky (17 vzorků), mléko a mléčné výrobky (18 vzorků), ryby a výrobky z nich (3 vzorky).

Pro stanovení *L. monocytogenes* byla použita kultivační metoda dle ČSN EN ISO 11290-1/2017. Příslušnost izolátů k druhu *L. monocytogenes* byla ověřena pomocí CAMP testu, MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie a molekulárně genetických metod (PCR s druhově specifickými primery a sekvenováním 16S rDNA). Charakterizace *L. monocytogenes* proběhla za použití metod REP-PCR a sérotypizace. Patogenní potenciál izolátů *L. monocytogenes* byl testován na základě sledování lecitinázové a hemolytické aktivity, a testování přítomnosti internalinu B. Nakonec byla zkoumána citlivost bakterií *L. monocytogenes* vůči antibiotikům ampicilinu, benzylpenicilinu (penicilin G), erytromycinu, meropenemu a trimetoprim-sulfometaxazolu podle ISO 20776-1.

Předpokládaná hypotéza byla potvrzena, jelikož u testovaných vzorků potravin určených k přímé spotřebě, byla zjištěna kontaminace bakterií *L. monocytogenes*. Tato bakterie byla nalezena ve 2 vzorcích (3,92 %). V obou případech se jednalo o lahůdkové saláty. Z jednotlivých vzorků bylo vždy odebráno více izolátů (Bukovánek sýrový - 15 izolátů, holandský salát - 14 izolátů). Potvrdilo se také, že kmeny, které byly izolované z různých produktů, pocházejících ze stejné výrobní provozovny, byly stejného sérotypu (1/2a) a byly genomicky shodné. Dále byla potvrzena citlivost všech testovaných kmenů na antibiotika ampicilin, erytromycin, meropenem a penicilin, v rámci hodnot stanovených EUCAST, ale u trimetoprim-sulfometaxazolu byla zaznamenána zvýšená rezistence, rovněž u všech testovaných kmenů. V obou produktech se tedy pravděpodobně vyskytoval tentýž kmen.

**Klíčová slova:** listerióza, alimentární onemocnění, PCR, patogenita, potraviny

# Detection and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods

## Summary

*Listeria monocytogenes* is an important foodborne pathogen that causes many serious diseases including miscarriages, meningitis, septicemia and gastroenteritis in both humans and animals. It is a gram-positive, non-spore-forming, rod-shaped ubiquitous bacterium. Despite the fact that listeriosis, a disease caused by *Listeria*, is relatively rare, it is characterized by severe symptoms and a high mortality rate. For this reason, it is essential to monitor the presence of *L. monocytogenes* in food.

The aim of this work was monitoring of this bacterium in risk groups of foods that are commonly found on the Czech market and its characterization. In total, 51 food samples were tested. It belonged to the following categories: meat products (13 samples), delicatessen (17 samples), milk and milk products (18 samples), and fish and fish products (3 samples).

*L. monocytogenes* was determined by cultivation method according to ČSN EN ISO 11290-1/2017. The confirmation was carried out by the CAMP test, MALDI-TOF mass spectrometry and molecular genetic methods (species-specific PCR with and sequencing of 16S rDNA). Confirmed *L. monocytogenes* strains were then characterized using REP-PCR and serotyping methods. The pathogenic potential was tested by monitoring lecithinase and hemolytic activity, and by detecting the presence of the internalin B gene. Finally, the sensitivity of *L. monocytogenes* to antibiotics (ampicillin, benzylpenicillin (penicillin G), erythromycin, meropenem and trimethoprim-sulfamethoxazole) was investigated according to ISO 20776-1.

The assumed hypothesis was confirmed, as the presence of *L. monocytogenes* was demonstrated in the tested food samples intended to direct consumption. This bacterium was found in 2 samples (3,92 %). Both samples were of gourmet salad origin. From each sample were taken isolates: Bukovánek sýrový – 15 isolates, holandský salát – 14 isolates. It was also confirmed that strains that were isolated from different products originating from the same manufacturing facility were of the same serotype and were genomically identical. Further, the sensitivity of all tested strains to the antibiotics ampicillin, erythromycin, meropenem and penicillin was confirmed within the values established by EUCAST with the same MICs values, but a slightly increased resistance was observed for trimethoprim-sulfamethoxazole, again in all tested strains.

Thus it can be assumed that all the isolates are clones of the same organism.

**Keywords:** listeriosis, alimentary disease, PCR, pathogenicity, 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>
<b>3.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>12</b>
3.2.1 Charakterizace <i>Listeria monocytogenes</i> .....	12
<b>3.3 Výskyt <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>14</b>
3.3.1 Výskyt v potravinách.....	14
3.3.1.1 Výskyt v potravinách živočišného původu .....	15
3.3.1.2 Výskyt v potravinách rostlinného původu .....	16
<b>3.4 Listerióza.....</b>	<b>17</b>
3.4.1 Patogeneze a faktory virulence .....	20
3.4.2 Léčba .....	22
3.4.3 Prevence.....	23
3.4.4 Antibiotická rezistence .....	23
3.4.5 Legislativa.....	25
<b>3.5 Metody izolace a identifikace .....</b>	<b>27</b>
3.5.1 MALDI-TOF MS.....	27
3.5.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	29
3.5.3 Sangerovo sekvenování .....	30
3.5.4 Typizace <i>L. monocytogenes</i> .....	31
<b>4 Metodika.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Materiál.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Mikrobiologický rozbor a izolace čistých kultur .....</b>	<b>35</b>
<b>4.3 Identifikace a konfirmace.....</b>	<b>36</b>
4.3.1 CAMP test.....	36
4.3.2 MALDI-TOF MS .....	37

4.3.3	Identifikace pomocí molekulárně biologických metod .....	37
4.3.3.1	PCR s druhově specifickými primery .....	37
4.3.3.2	Identifikace sekvenováním genu pro 16S rRNA .....	39
4.3.3.3	Sangerovo sekvenování .....	40
<b>4.4</b>	<b>Charakterizace <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>40</b>
4.4.1	REP-PCR .....	40
4.4.2	Sérotypizace .....	41
4.4.2.1	Multiplex PCR .....	41
4.4.2.2	Skličková aglutinace .....	42
<b>4.5</b>	<b>Testování patogenní potenciálu .....</b>	<b>44</b>
4.5.1	Lecitinázová a hemolytická aktivita .....	44
4.5.2	Detekce internalinu B pomocí PCR .....	45
<b>4.6</b>	<b>Citlivost vůči antibiotikům .....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>Mikrobiologický rozbor, izolace čistých kultur a následná identifikace pomocí MALDI-TOF MS .....</b>	<b>47</b>
<b>5.2</b>	<b>CAMP Test .....</b>	<b>50</b>
<b>5.3</b>	<b>Identifikace pomocí molekulárně biologických metod .....</b>	<b>50</b>
<b>5.4</b>	<b>Rozdělení jednotlivých izolátů <i>L. monocytogenes</i> pomocí REP-PCR .....</b>	<b>51</b>
<b>5.5</b>	<b>Sérotypizace .....</b>	<b>52</b>
<b>5.6</b>	<b>Patogenní potenciál .....</b>	<b>53</b>
<b>5.7</b>	<b>Citlivost vůči antibiotikům .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

*Listeria monocytogenes* je grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporeující, pohyblivá bakterie, jejíž buňky jsou ve tvaru drobných tyčinek. Tato bakterie dokáže přežít a růst v nepříznivých podmínkách jako jsou nízká nebo vysoká teplota, velké rozpětí hodnot pH, vysoká salinita a nízká vodní aktivita. *L. monocytogenes* se běžně vyskytuje v životním prostředí a díky její odolnosti ji můžeme dokonce považovat za všudypřítomnou. Vyskytuje se ve vodě, půdě, bahně, na vegetaci, v hnojivech, silážích, rozkládajícím se organickém materiálu, cytosolu buněk savců, ale také v potravinách (McMullen & Freitag, 2014; Brychta et al. 2018; Chlebicz & Śliżewska 2018).

*L. monocytogenes* je původcem velmi vážného onemocnění, zvaného listerióza. Přestože incidence listeriózy není příliš častá, je toto onemocnění považováno za velmi vážnou hrozbu z důvodu vysoké mortality, a to 20-30 %. Listeriíza obvykle zasahuje imunokompromitované jedince nebo populaci s jinými onemocněními jako je rakovina, AIDS či cukrovka. Rizikovými skupinami jsou také starší osoby, těhotné ženy, plod či novorozenci. Toto onemocnění má dvě formy. První formou je invazivní systémové onemocnění, které vykazuje klinické život ohrožující příznaky jako je meningoencefalitida, septikémie nebo různé záněty (žaludek, tenké střevo). Může také způsobit poškození plodu anebo potrat. Druhou formou onemocnění je neinvazivní onemocnění (febrilní gastritida), jehož příznaky ohrožují život pouze vzácně (Warriner & Namvar, 2009; Zhu et al., 2017). Pokud se listérie nacházejí v trávicím traktu zvířat, či lidí, obě skupiny se mohou stát asymptomatickými přenašeči *L. monocytogenes*. Zvířata tak mohou tyto bakterie šířit dál výkaly či, v případě skotu, mlékem, a to bez jakýchkoliv symptomů poukazujících na onemocnění. U přežvýkavců bývá hlavním zdrojem infekce nekvalitní siláž, kontaminovaná voda či krmivo. Ke kontaminaci masa pak může dojít při porážce zvířete, v důsledku špatného vykrvení nebo přímým kontaktem svaloviny s obsahem trávicího traktu při nesprávné manipulaci (Blažková et al., 2005; Vilar et al., 2007). Proto se *L. monocytogenes* vyskytuje nejčastěji v potravinách živočišného původu (RASFF, 2021). Může být přítomná v syrovém vepřovém, hovězím, drůbežím i rybím masu. Můžeme ji také najít trvanlivých fermentovaných masných výrobcích či měkkých a korýších. Mléko a mléčné výrobky nejsou výjimkou. Jejich přítomnost byla také prokázána u zrajících sýrů, čerstvých sýrů, v tvarohu a másle. Listerie se však nevyskytují pouze v živočišných potravinách, ale také v potravinách rostlinného původu. Jsou potvrzené nálezy z velkého množství syrové zeleniny například brambor, okurek, zelí, rajčat a ředkviček. Vyšší míru kontaminace vykazují čerstvě krájené zeleninové pokrmy. Dobré podmínky pro růst listerií také poskytuje zelenina, která je balena a ukládána v modifikované atmosféře (Brychta et al. 2018).

Hlavním zdrojem nákazy lidí 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. Proto je velmi důležitá prevence jako je dodržení správných výrobních, hygienických, distribučních a skladovacích postupů (HACCP), ale velmi důležitá je také dostatečná informovanost a školení pracovníků manipulujících s potravinami (Allerberger & Wagner, 2009; Blažková et al., 2005; Sauders & Wiedmann 2007).



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

Hypotéza: V některých potravinách určených k přímé spotřebě bude zjištěna přítomnost *Listeria monocytogenes*. Dále předpokládáme, že kmeny izolované z různých produktů pocházejících ze stejné výrobní provozovny, budou shodné.

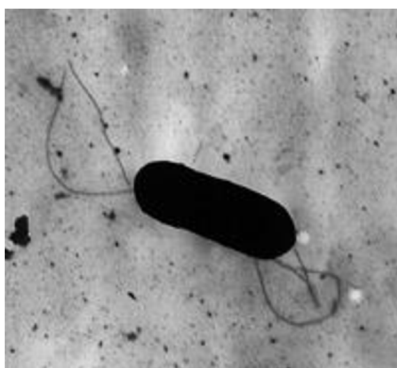
Cílem diplomové práce byl monitoring výskytu této bakterie u rizikových skupin potravin dostupných na našem trhu a její charakterizace.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Rod *Listeria*

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

Jedná se o grampozitivní, nesporeující, 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 tak být 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 řetízků, které mohou být uspořádány do tvaru V, Y nebo tvořit palisády (Sauders & Wiedmann 2007; Lous et al. 2011). Listérie jsou pohyblivé díky peritrichním bičíkům (Obrázek č. 1). Počet bičků se může lišit, ale obvykle bývá jeden až čtyři. Se zvyšující se teplotou počet bičků klesá. Při teplotě prostředí, která přesáhne 25 °C se pohyblivost bakterie snižuje a při teplotě 37 °C bičiky vymizí úplně. Běžným světelným mikroskopem jsou bičiky téměř neviditelné, pro jejich vizualizaci musí být použity náročné barvicí metody (např. stříbření) anebo elektronový mikroskop (Brychta et al. 2018).



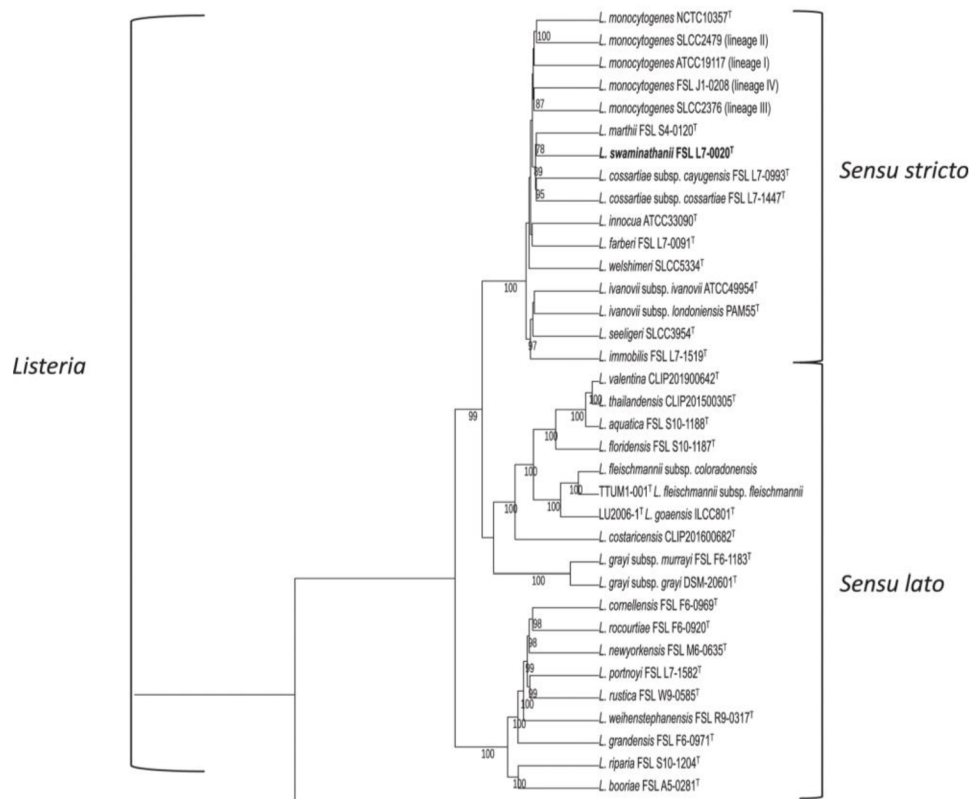
**Obrázek č. 1:** *L. monocytogenes* s bičiky (zdroj: <https://www.pei.de/DE/newsroom/pm/jahr/2011/09-bakteriengesseln-zur-therapie-von-lebensmittelallergien.html>).

Optimální teplota růstu se pohybuje mezi 30-37 °C, obvykle ale rostou v rozmezí teplot od 1 °C do 45 °C. Vyšší teploty nepřežívají, avšak u nižších teplot existují výjimky. 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. Velikost se mění v závislosti na teplotě, době kultivace a druhu použitého média (McLauchlin & Rees 2009; Lous et al. 2011; Kramarenko et al. 2013). 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-heart infusion, 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 stolici člověka (Lous et al. 2011).

Listérie jsou kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Jsou homofermentativní a jsou schopné oxidovat glykolytické meziprodukty. Všechny kmeny rostou na glukóze a za aerobních podmínek tvoří jako hlavní konečné produkty laktát, acetát a acetonin. Za anaerobních podmínek acetonin nevzniká. Jednotlivé druhy listérií lze vzájemně odlišit na základě schopnosti metabolizovat různé sacharidy (D-xyloza, L-rhamnosa,  $\alpha$ -methyl-D-mannosid, D-mannitol, D-arabitol, methyl-D-glukosid, ribosa, glukosa-1-fosfát, D-tagatosa) (Ryser et al. 2007). 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).

V současné době rod zahrnuje 28 druhů. Tyto druhy se pro lepší orientaci dělí na dvě skupiny podle příbuznosti s *L. monocytogenes*, a to *Listeria sensu stricto* a *Listeria sensu lato* (viz Obrázek č. 2).



**Obrázek č.2:** Rozdělení rodu *Listeria* na skupiny *sensu stricto* a *sensu lato* (Carlin et al., 2022).

*Listeria sensu stricto* je reprezentována druhy, které jsou fylogeneticky nejvíce příbuzné *L. monocytogenes*. Všechny vykazují například schopnost růst při nízkých teplotách, flagelární pohyb nebo patogenitu. Do této skupiny patří *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. cossartiae*, *L. farberii*, *L. immobilis* a *L. marthii*. Nově by se měl do skupiny *sensu stricto* řadit také druh *L. swaminathanii*, zatím ale nebyl validně pospán a oficiálně uznán. Skupina *sensu lato* obsahuje druhy fylogeneticky odlišné od

*L. monocytogenes*. Oproti skupině *sensu stricto* jsou nepatogenní, neschopné růst při 4 °C, jsou nepohyblivé (kromě *L. grayi*) a schopné redukovat dusičnany (kromě *L. floridensis*). Jedná se o druhy *L. valentina*, *L. thailandensis*, *L. aquatica*, *L. floridensis*, *L. fleischmanii*, *L. goanensis*, *L. costaricensis*, *L. ilorinensis*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rustica*, *L. portnoyi*, *L. goanensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. rocourtiae*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae*, *L. grayi*. (Carlin et al. 2022; Hudson et al. 2022; Parte et al. 2020, Rossi et al. 2022). 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).

## 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).

### 3.2.1 Charakterizace *Listeria monocytogenes*

*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 pohyb se pohybuje mezi 22-30 °C. Při 37 °C se netvoří nové bičíky a stávající přestávají fungovat, bakterie tedy ztrácí schopnost pohybu. Pro růst je optimální teplota v rozmezí 30-37 °C. Tento druh je velmi odolný, dokáže přežít a růst v nepříznivých podmínkách jako jsou nízká (růst už od -0,4 °C) nebo vysoká (maximum 45 °C) teplota, velké rozpětí hodnot pH (4,4–10), vysoká salinita (až 10 %) a nízká vodní aktivita (0,9). Usmrcení těchto bakterií vyžaduje teplotu alespoň 75 °C. V optimálních podmínkách bývá pomnožení listérií velice rychlé (McMullen & Freitag, 2014; Brychta et al. 2018; Chlebicz & Śliżewska 2018).

*L. monocytogenes* fermentuje různé sacharidy (např. melecitózu, methyl α-D-glukososid, methyl α-D-mannosid, L-rhamnózu, sacharózu a glukózu), a produkuje z nich organické kyseliny (např. kyselinu mléčnou nebo octovou) (McLauchlin & Rees 2009). 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, v důsledku galaktosidázové aktivity, a jsou obklopené kruhovou mléčně zabarvenou zónou precipitace (viz obrázek č. 3), která vyjadřuje aktivitu fosfolipázy C (tzv. lecitinázová aktivita). Některé kmeny lecitinázovou aktivitu nevykazují a jsou považovány za

nepatogenní, přestože patogenní jsou. Tento jev se může vyskytovat u kmenů z životního prostředí, protože produkují pouze nízké hladiny virulentních faktorů, a tím je ovlivněn jejich typický projev na agarových plotnách (Ermolaeva et al. 2003; Brychta et al. 2018). Ermolaeva et al. (2003) uvádí, že přidavek 0,2 % dřevěného uhlí do živného média, výrazně zvyšuje produkci virulentních faktorů a zlepšuje tak detekci. Blíže o významu fosfolipázy C v kapitole 3.4.1 Faktory virulence.



**Obrázek č. 3:** Lecitinázová aktivita *L. monocytogenes* (zdroj: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Canadian%20Catalog\\_EN\\_FR.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Canadian%20Catalog_EN_FR.pdf)).

*L. monocytogenes* vykazuje také  $\beta$ -hemolytickou aktivitu (viz Obrázek č. 4), která je důležitou fenotypovou vlastností napomáhající při její detekci a identifikaci. Stejně jako v případě lecitinázy se stává, že některé kmeny *L. monocytogenes* 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 pomocí erytrocytů různého původu (např. koňská, kravská, králičí, ovčí nebo lidská krev). To, že jsou kmeny *L. monocytogenes* hemolytické, podobně jako u lecitinázy, poukazuje na míru virulence (Fujisawa & Mori 1994; Groves & Welshimer 1977; McLauchlin & Rees 2009).



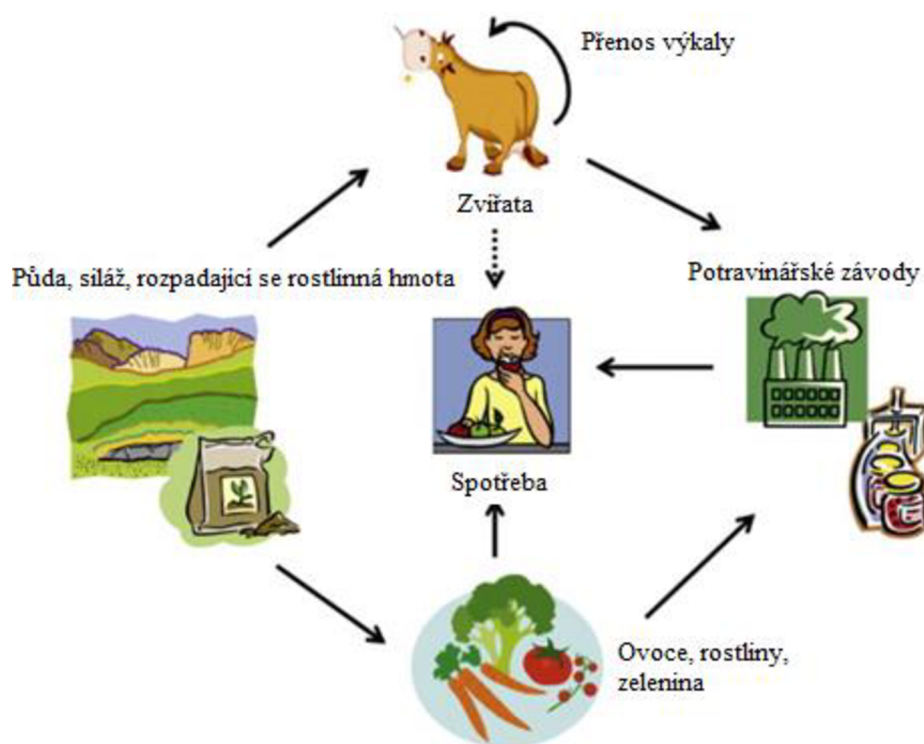
**Obrázek č. 4:**  $\beta$ -hemolytická aktivita *L. monocytogenes* (zdroj: <https://microbeonline.com/listeria-monocytogenes-pathogenesis-lab-diagnosis/>).

### 3.3 Výskyt *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* se běžně vyskytuje v životním prostředí. Tuto bakterii můžeme dokonce považovat za všudypřítomnou, a to díky její schopnosti odolávat silným enviromentálním stresům (jako jsou vysoké koncentrace solí, nízké hodnoty pH, nízké teploty, nízká aktivita vody nebo přítomnost iontů těžkých kovů). Proto může tento patogen kolonizovat velké množství různých prostředí (Haddad, 2022). Vyskytuje se ve vodě, půdě, bahně, na vegetaci, v hnojivech, silážích, rozkládajícím se organickém materiálu, cytosolu buněk savců, ale také v potravinách (Southwick & Purich 1996; McLauchlin & Rees 2009; Kramarenko et al. 2013).

#### 3.3.1 Výskyt v potravinách

Vzhledem k tomu, že se listérie nacházejí v trávicím traktu lidí a zvířat, tak lidé i zvířata (divoká i domestikovaná) mohou být asymptomatickými přenašeči *L. monocytogenes*. Jedná se hlavně o skot, prasata, kuřata, krocany, kachny, koryše a mouchy. Ti pak tyto bakterie mohou šířit dál výkaly či, v případě skotu, mlékem, a to bez jakýchkoliv symptomů poukazujících na onemocnění. Koloběh potenciální kontaminace je znázorněn na Obrázku č. 5. Hlavním zdrojem infekce u přežvýkavců bývá nekvalitní siláž, může to ale být i voda nebo krmivo kontaminované hmyzem či ptačím trusem. Ke kontaminaci masa může také docházet sekundárně při porážce zvířete, v důsledku špatného vykrvení nebo přímým kontaktem svaloviny s obsahem trávicího traktu při nesprávné manipulaci (Blažková et al., 2005; Vilar et al., 2007).



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

U člověka se listérie nejčastěji přenáší konzumací kontaminovaných potravin. Primárně se *L. monocytogenes* vyskytuje v syrových („raw“) či „ready to eat“ potravinách, ale také v kuřecím/hovězím/vepřovém mase a výrobcích z nich. Dále v rybách a rybích výrobcích, mléce a mléčných výrobcích, měkkých a poloměkkých sýrech, lahůdkách (masových i zeleninových) a také v zelenině a ovoci (např. zelí, meloun). Najít je ale můžeme i ve zmrzlinářské výrobě. Přítomnost *L. monocytogenes* byla také zjištěna v rozmražených potravinách. K pomnožení listérií a rozšiřující se kontaminaci může dojít i nesprávným uskladněním hotových jídel. Pozornost ale musíme věnovat i sekundární kontaminaci, která je rizikem u zpracovaných potravin v různých fázích výroby. K sekundární kontaminaci potravin dochází nedostatečnou hygienou v chladničkách, či nesprávným očištěním povrchů po práci s infikovanými potravinami v potravinářských provozech. *L. monocytogenes* můžeme najít také v mléčných tancích, kam se dostává z mlékařského vybavení v důsledku fekálního znečištění při dojení (Blažková et al., 2005; Brychta et al., 2018; EFSA, 2022; Kramarenko et al., 2013; McMullen & Freitag, 2014; 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 nejčastěji vyskytuje v potravinách živočišného původu (RASFF, 2021). Nachází se v syrovém vepřovém, hovězím, drůbežím i rybím mase. Dále v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích či měkkých a korýších. Mléko a mléčné výrobky nejsou výjimkou. Do syrového mléka se listérie dostanou nejčastěji z krmiva, špatně ošetřených struků, srstí 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 logicky 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), se případy kontaminovaných potravin stále vyskytují. Případy výskytu *L. monocytogenes* v České republice na základě oznámení týkající se kontroly trhu z roku 2021 (v rámci výroční zprávy RASFF = Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva) jsou znázorněny v Tabulce č.1.

**Tabulka č. 1:** Oznámení výskytu *Listeria monocytogenes* v potravinách v roce 2021 (Fišnar, 2021).

Datum oznamu	Produkt	Země původu
12.2.	Uzený sýr	ČR
10.2.	Jelení salám	Itálie
26.3.	Salám salchichon	Španělsko
14.5.	Uzený sýr	ČR
4.6.	Chlazené matjesové řezy s cibulí	ČR
15.6.	Bageta se šunkou a sýrem	ČR
21.9.	Uzený sýr	ČR
8.12.	Sýry	Francie
27.12.	Mražené grilované kachní maso	Německo

### 3.3.1.2 Výskyt v potravinách rostlinného původu

*L. monocytogenes* je jakožto běžná environmentální bakterie i častou součástí epifytní mikrobioty. 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 pozření 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).

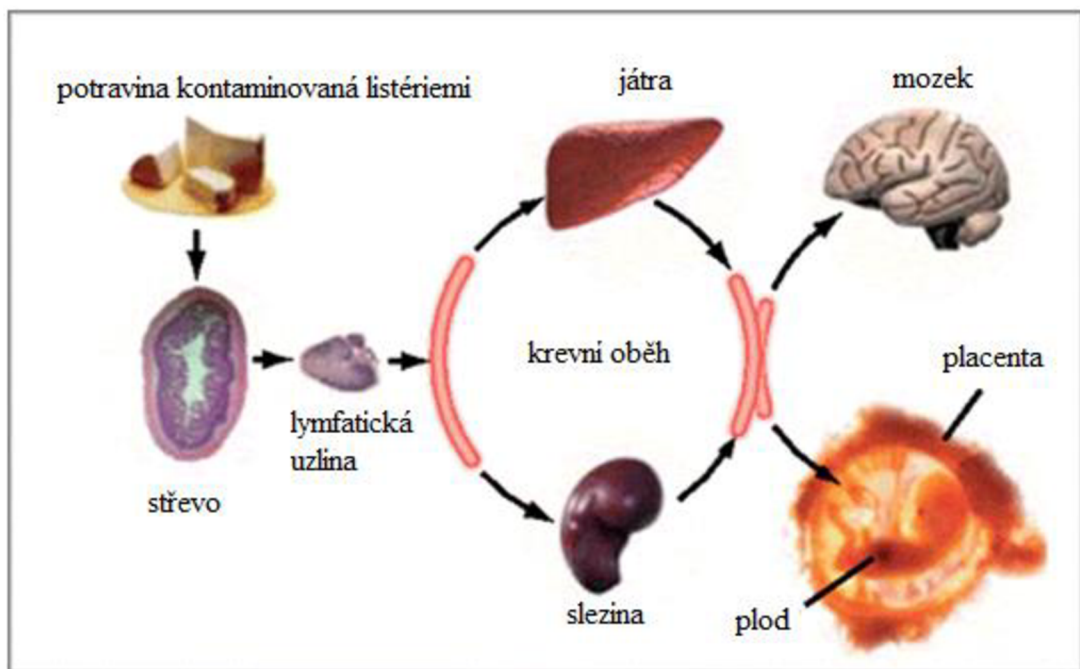
Nejnovější informace o přítomnosti *L. monocytogenes* v potravinách rostlinného původu uvádí databáze RASSF (Evropské komise) a to konkrétně z 15.12.2022 a 17. ledna 2023, kdy se jednalo o přítomnost *L. monocytogenes* v humusu z Nizozemí. *L. monocytogenes* byla také nahlášena v prosinci 2022 v ready-to-eat salátu, který také pocházel z Nizozemí. V Itálii byla ohlášena přítomnost této bakterie v listopadu 2022 v Kantonské rýži (rýže upravená na asijský způsob). V roce 2021 byly listérie přítomné například v sýru vyrobeném z kešu ořechů. V roce 2020 byly nahlášeny případy výskytu listérií v maaltijdsalade (typický Nizozemský salát), v italském těstovinovém salátu, v pestu (Belgie), v mražené kukuřici (Švýcarsko) anebo také v kouskách červené řepy (Nizozemí)(RASFF, 2023).



### 3.4 Listeri3za

Listeri3za byla dlouhou dobu považov3na pouze za onemocn3n3 zv3rat. Źe je tak3 p3vodcem aliment3rn3ch onemocn3n3 lid3 (onemocn3n3, kter3 souvis3 s p3jmem potravy), bylo zjišt3no aŹ v roce 1980 (Ricci et al., 2018).

*L. monocytogenes* v z3sad3 zp3sobuje dv3 formy onemocn3n3. Prvn3m je invazivn3 syst3mov3 onemocn3n3 zp3soben3 vysoce invazivn3mi formami *L. monocytogenes*. Bakterie obvykle infikuj3 takzvané steriln3 části t3la, kam se rad3 j3tra, slezina, m3cha nebo krev. Po poŹit3 napad3 *L. monocytogenes* epitel gastrointestin3ln3ho traktu, rozš3r3 se do lumenu st3eva a pronik3 do krve, kudy se n3sledn3 dost3v3 do jater, sleziny a lymfy. Od tohoto bodu m3Źe *L. monocytogenes* putovat nap33ch nervov3m syst3mem i p3es placent3rn3 bari3ru, kde infikuje plod matky. Cel3 tento kolob3h je zn3zorn3n Obr3zkem 3. 6. U zdrav3ch dosp3l3ch jedinc3 jsou hlavn3mi p3znaky p3jem a hore3ka, u t3hotn3ch zp3sobuje potraty, usmrcen3 d3t3e. U novorozenc3 m3Źe zp3sobit sepsi, z3pal plic a meningitidu. Mezi dalš3 klinick3 p3znaky pat3i meningoencefalitida, otrava krve (septik3mie), z3n3t Źaludku nebo tak3 z3n3t tenk3ho st3eva. Vzhledem k v3Źnosti nemoci a jej3ch p3znak3 je tato forma ve 30 % p3pad3 smrteln3. Bylo tak3 zjišt3no, Źe v3ce neŹ 90 % p3pad3 propuknut3 invazivn3 listeri3zy je zp3sobeno konzum3c3 potraviny, kter3 obsahovala v3ce neŹ 2 000 kolonii tvo33c3ch jednotek (KTJ)/g. Zejm3na vysoce virulentn3 kmeny s3rotypu 4b m3v3j3 fat3ln3 n3sledky i pro zdrav3 jedince. U citliv3ch osob nen3 infekcn3 d3vka zcela up3esn3na, pohybuje se v rozmez3 od 100 do 1000 bun3k (Glaser et al., 2001; Ricci et al., 2018; Warriner & Namvar, 2009; Zhu et al., 2017).



**Obr3zek 3. 6:** Proces infekce v Źiv3m organismu:

(Upraveno podle: [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projektv2/vseo/print.php?page=2610&typ=html](http://web2.mendelu.cz/af_291_projektv2/vseo/print.php?page=2610&typ=html)).

Druh3 forma onemocn3n3, kter3 m3Źe *L. monocytogenes* zp3sobit se naz3v3 febriln3 gastroenteritida nebo t3Ź neinvasivn3 gastroenteritida. Gastroenteritida nast3v3 u zdrav3ch jedinc3 po konzum3ci vysok3 d3vky *L. monocytogenes* (>8 log KTJ). Inkuba3n3 doba je 1–7

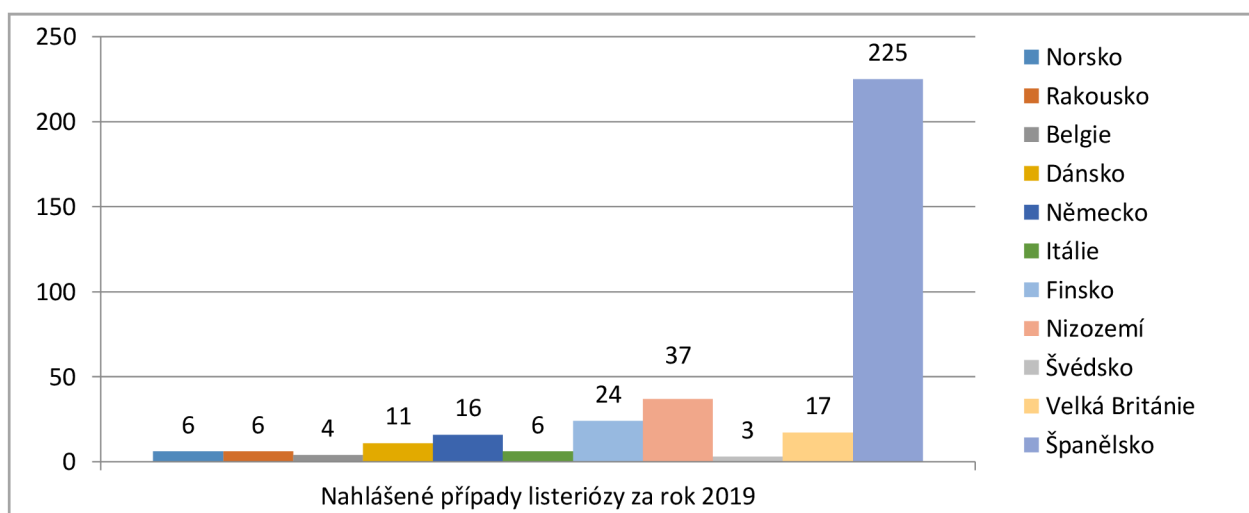
dní. Po uplynutí inkubační doby se projevují symptomy podobné chřipce, které mohou být doprovázeny bolestmi břicha a průjmem. Na rozdíl od invazivní formy, jež je zmíněna výše, tady symptomy ohrožují život pouze vzácně a odeznívají během pár dní, ačkoliv někteří jedinci se *L. monocytogenes* mohou zbavovat i několik týdnů (Warriner & Namvar, 2009; Zhu et al., 2017).

Rizikovou skupinou jsou lidé s oslabeným imunitním systémem, osoby po transplantaci orgánu, lidé trpící rakovinou a 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; Brychta et al., 2018; Chlebicz & Śliżewska, 2018; Zhu et al., 2017).

V porovnání s ostatními alimentárními onemocněními se listerióza vyskytuje poměrně vzácně. Odhaduje se, že je zodpovědná za 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).

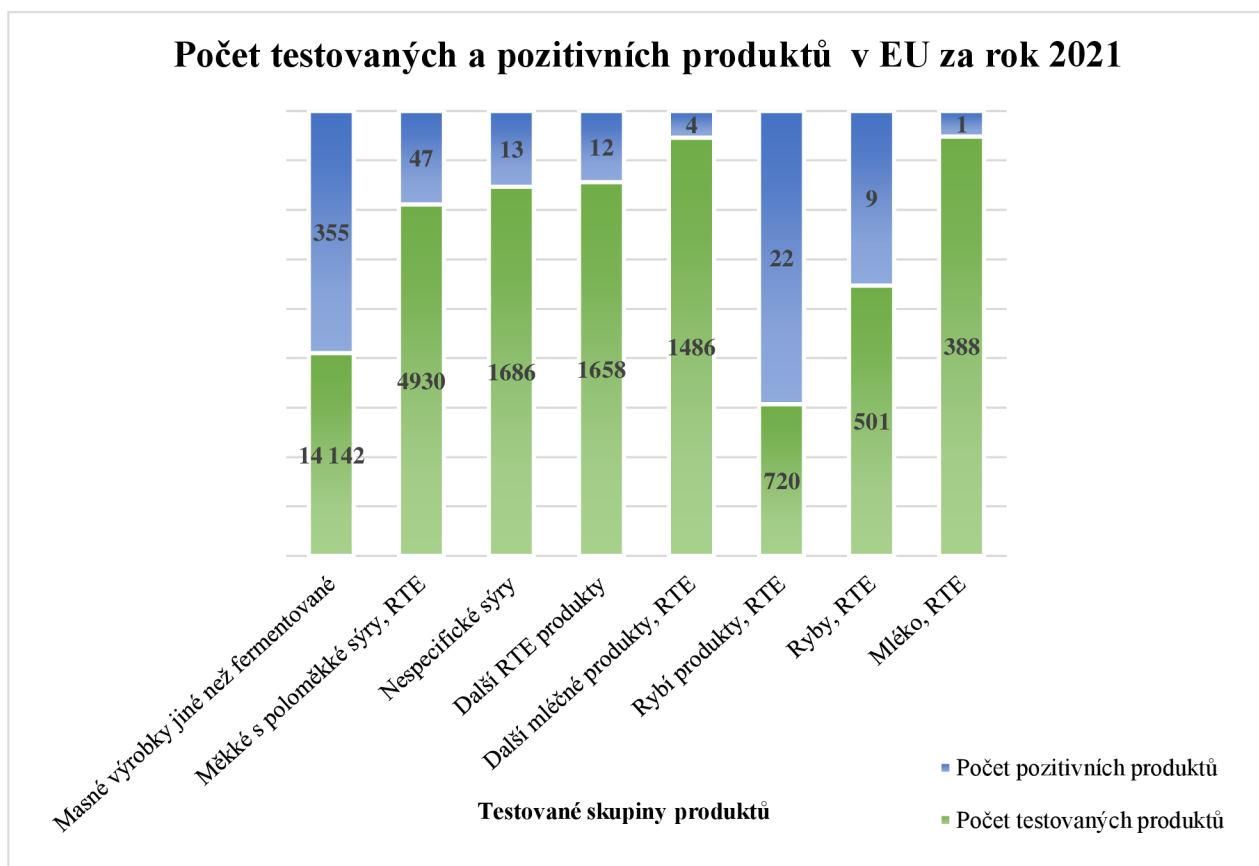
Ricci et al. (2018) uvádí, že v letech 2008–2015 došlo v EU k nárůstu potvrzených případů invazivní listeriózy u lidí ve věku kolem 75 let a u žen ve věku 25 až 44 let (pravděpodobně to souvisí s těhotenstvím). Listeriózou v USA každý rok onemocní kolem 2500 osob, z nichž 500 onemocnění podlehnou (Borucki et al., 2005).

V roce 2019 bylo nahlášeno 349 případů listeriózy, které pocházely 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 podlehlo. 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, ovoce, zelenina a ovocné džusy a největší procento kontaminace má maso a masné produkty (EFSA, 2019).



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

V roce 2021 bylo v Evropě nahlášeno 2 183 potvrzených intenzivních případů infekce *L. monocytogenes*. Z těchto případů bylo 923 osob hospitalizováno a 196 zemřelo. Listerióza byla v tomto roce pátou nejčastěji hlášenou zoonózou u lidí v EU. Míra oznámení v EU byla 0,49 na 100 000 obyvatel. Celková úmrtnost byla vysoká, a to 13,7 %. Infekce *L. monocytogenes* byly nejčastěji hlášeny ve věkové skupině nad 64 let a zejména ve věkové skupině nad 84 let. Dvacet čtyři členských států Evropské unie oznámilo celkem 244 357 pozitivních vzorků různých kategorií potravin „připravených k přímé spotřebě“ (RTE) z fáze distribuce nebo výroby. Při výrobě, na základě detekčního testu, byly podíly jednotlivých vzorků pozitivních na *L. monocytogenes* vyšší ve srovnání s těmi na úrovni distribuce, a to u všech kategorií potravin RTE. Údaje o testovaných a pozitivních produktech jsou uvedeny v Grafu č. 2 (EFSA, 2022).



**Graf č. 2:** Počet testovaných a pozitivních produktů v EU za rok 2021 (Upraveno podle EFSA, 2022).

V České republice bylo v letech 2008-2018 hlášeno celkem 380 případů listeriózy (průměrná roční incidence 0,33/100 000 obyvatel). Nejvyšší průměrný výskyt byl zaznamenán u dětí mladších než jeden rok (1,85/100 000 obyvatel) a potom u osob starších 60 let (0,95/100-000), kde incidence byla 0,39/100 000 obyvatel. Podle pohlaví bylo v těchto letech nahlášeno více případů u osob mužského pohlaví (222 osob). Nakažených žen bylo hlášeno 158 (incidence 0,27/100 000 obyvatel). Hospitalizováno bylo 96,3 % hlášených případů a 81 hlášených v souvislosti s listeriózou zemřelo (u 50 případů byla listerióza uvedena jako přímá příčina smrti). Sezónně byl nejvyšší výskyt případů v období června až října a dále pak v lednu (Špačková et al., 2021).

Státní zdravotnický ústav pravidelně zveřejňuje výběr hlášených infekcí v České republice. V Tabulce č. 2 je znázorněn výběr dat k porovnání výskytu jednotlivých infekcí a jejich vývoj v období leden–říjen od roku 2013 do roku 2022 (SZÚ, 2022).

**Tabulka č. 2:** Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice podle (SZÚ, 2022).

Diagnóza	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Listerióza	27	34	31	41	25	0	24	11	22	43
Salmonelóza	8623	11907	10931	10426	10037	9821	11265	9004	8959	6568
Shigelóza	211	83	85	46	127	114	100	70	33	81
Kampylobakteriíza	15463	17901	17481	20914	20795	20588	19652	15454	14582	12320
Virové střevní infekce	6585	8640	17757	7659	8553	8493	10846	3809	3365	12397

### 3.4.1 Patogeneze a faktory virulence

*L. monocytogenes* je oportunitní intracelulární patogen, který ve své buněčné stěně a cytoplazmatické membráně obsahuje širokou škálu proteinů, které mu umožňují proniknout do hostitelských buněk jiného organismu, přežít v nich, pomnožit se a dále se v organismu šířit. Tyto proteiny jsou označovány jako virulentní (Blažková et al. 2005).

Mechanismus průniku spočívá v adhezi k cílové buňce a následně iniciaci procesu fagocytózy (viz Obrázek č. 7). Adheze je zprostředkována listéria adhezivním proteinem (LAP), který se váže na HSP60 hostitelských buněk. LAP je významný pro transepitelilální translokaci (Burkholder & Bhunia, 2010).

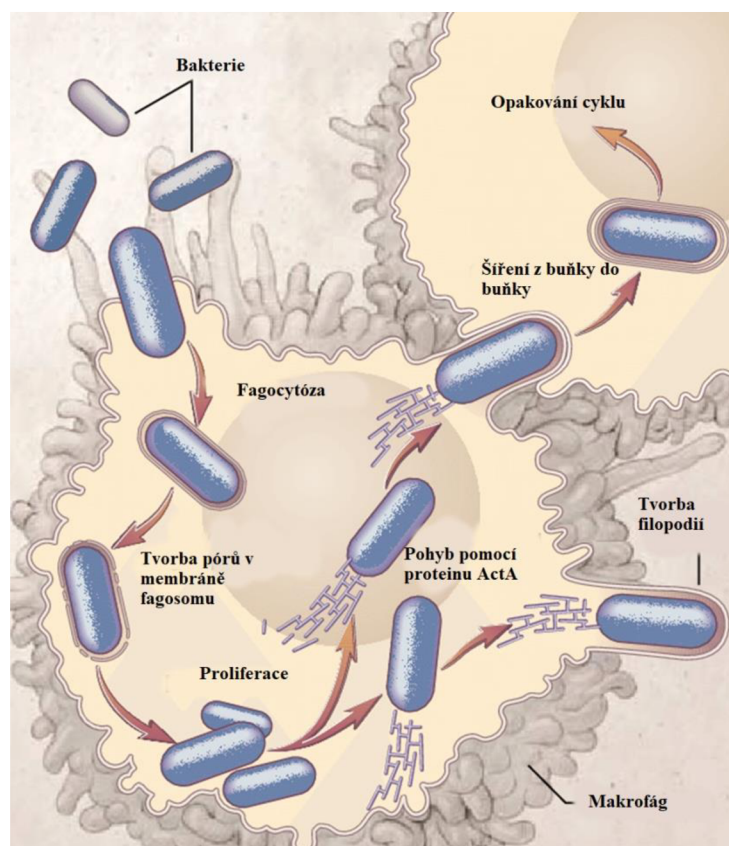
Listérie jsou fagocytovány makrofágy, ale i buňkami, které běžně nefagocytují (hepatocyty, epitelie, některé buňky CNS)(Jilich & Machala, 2008). U nefagocytujících buněk je endocytóza zprostředkována skrze receptory. Proteiny, které umožňují navázání na povrch buněk a indukci fagocytózy, jsou povrchové proteiny tzv. internaliny – internalin A (InlA, 800 aminokyselin) a internalin B (Inl B, 630 aminokyselin). Internalin A se váže na E-kadherin, což vede ke shlukování receptorů a internalizaci bakterie. E-kadherin je exprimován epiteliální tkání většiny orgánů v místě buněčných spojů. Hojně se nachází v hematoencefalitické bariéře a také v bariéře mezi placentou a plodem. To je důvod, proč bakterie mohou infikovat plod a způsobit meningitidu. Internalin B se pak váže na receptor pro hepatocytární růstový faktor (Met) a indukuje internalizaci u nefagocytujících buněk jako jsou hepatocyty a trofoblasty (Blažková et al., 2005; Radoshevich & Cossart, 2018; Rogalla & Bomar, 2022). Dalším proteinem, který se podílí na vstupu bakterie do buňky je p60 (484 aminokyselin). Tento protein je také dominantním extracelulárním proteinem listérií a často se proto používá k jejich diagnostice (Blažková et al. 2005).

Po vstupu do hostitelské buňky musí bakterie uniknout z fagozomu, který ji obklopuje. K tomu je nezbytný další virulentní protein zvaný listeriolysin O (LLO, 529 aminokyselin), kódovaný genem *hly*. Jedná se o cytolytický toxin, který vytváří póry v membráně fagozomu. Také je zodpovědný za beta-hemolytickou aktivitu (Blažková et al. 2005; Rogalla & Bomar, 2022). Dalšími faktory podílejícími se na lýze vakuolární membrány jsou dvě fosfolipázy C (PLC), fosfatidylinositol-specifická PLC tzv. fosfolipáza A (PlcA, 317 aminokyselin) a širokospektrální PLC (PC-PLC, 264 aminokyselin) též známá jako fosfolipáza B (PlcB).

Fosfolipáza B je vylučována jako inaktivní proenzym o velikosti 33-kDa a do enzymaticky aktivního stavu (29-kDa) štěpena pomocí metaloproteinázy Mpl (510 aminokyselin)(Mengaud et al., 1991; Portnoy et al., 2002).

Po úniku z fagozomu se bakterie začne v cytoplasmě hostitelské buňky množit a vytvářet prstovité výběžky (filopodia), které interagují se sousední buňkou. Tyto výběžky vznikají polymerací aktinu pomocí aktin polymeračního proteinu ActA (actin assembly protein, 639 aminokyselin). Filopodia umožňují listériím rychle se pohybovat mezi buňkami a pronikat do dalších buněk. Zároveň je chrání před prostředím extracelulárního prostoru a detekcí protilátek. Po průniku do nové buňky je bakterie obklopena fagozomem se dvěma membránami. Úniku se z něj se opět účastní výše zmíněný LLO a fosfolipázy, které s LLO působí synergicky. Po rozrušení fagozomu dochází k uvolnění bakterie do cytosolu, kde se bakterie začíná množit a výše popsané děje se opakují (Blažková et al., 2005; Jilich & Machala, 2008; Rogalla & Bomar, 2022).

Většina genů *L. monocytogenes* včetně *hly*, *plcA* a *plcB* se nachází na bakteriálním chromosomu, v oblasti o velikosti 10 kb. Transkripce genu *plcB* probíhá simultánně s transkripcí genu *actA*, který kóduje bakteriální povrchový protein potřebný pro pohyb v cytosolu hostitelské buňky. Exprese všech genů virulence popsaných výše je koordinovaně regulován transkripčním aktivátorem PrfA. Obecně je exprese PrfA-regulovaných genů nízká, pokud jsou bakterie kultivované v bujónu. Avšak v případě přidání aktivního uhlí do média nebo při kultivaci v médiu určeném pro tkáňové kultury, bylo pozorováno zvýšení exprese PrfA-regulovaných genů (Gründling et al., 2003).



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

### 3.4.2 Léčba

Před zahájením samotné léčby je potřeba provést diagnostiku. Musí být proveden přímý průkaz listerií, a to kultivací z krve anebo pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR). Vzorky se odebírají například z plodové vody, mozkomíšního moku, hlenu nebo smolky. Léčba závisí na závažnosti příznaků (Tabulka č. 3) (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 zpochybňováno. Pokud jsou někteří pacienti alergičtí na penicilin, používá se trimethoprim nebo sulfamethoxazol jako náhrada. Proti meningitidě způsobené listeriózou se intravenózně používá vankomycin. Dalšími antibiotiky používanými při léčbě listeriózy jsou erytromycin, meropenem, linezolid a rifampicin (Janakiraman, 2008).

**Tabulka č. 3:** Možnosti léčby listeriálních infekcí (Upraveno dle Janakiraman, 2008).

<b>Infekce</b>	<b>Léčba</b>	<b>Doba</b>
<b>Bakteriémie</b>	V první řadě: ampicilin $\geq 6$ g/d (3), v případě, že je pacient starší 50 let nebo má chronické onemocnění, kardiovaskulární nebo respirační potíže přidat gentamycin	14 dní
	V druhé řadě: erytromycin 4 g/d, nebo TMP/SMX 200–320 mg/d, nebo vankomycin 1 g třikrát denně	14 dní
<b>Bakteriémie v těhotenství</b>	V první řadě: ampicilin $\geq 6$ g/d (3)	7–14 dní (1)
	V druhé řadě: erytromycin 4 g/d (3)	7–14 dní (1)
<b>Akutní meningitida</b>	V první řadě: ampicilin $\geq 6$ g/d (3), v případě, že je pacient starší 50 let nebo má chronické onemocnění, kardiovaskulární nebo respirační potíže přidat gentamycin	21 dní
	V druhé řadě: TMP/SMX 200–320 mg	21 dní
<b>Infekční endokarditida</b>	V první řadě ampicilin $\geq 6$ g/d (3), v případě, že je pacient starší 50 let nebo má chronické onemocnění, kardiovaskulární nebo respirační potíže přidat gentamycin	6–8 týdnů (2)
	V druhé řadě: vankomycin 1 g třikrát denně plus gentamycin 2,5 mg/kg/d	6–8 týdnů (2)

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

**Tabulka č. 3: Pokračování.**

<b>Infekce</b>	<b>Léčba</b>	<b>Doba</b>
<b>Absces mozku</b>	V první řadě: ampicilin 14 g/d plus gentamycin 2,5 mg/kg/d V druhé řadě: TMP/SMX 200–320 mg	4–6 týdnů 4–6 týdnů
<b>Infekce kloubů/kostí</b>	V první řadě: ampicilin $\geq$ 6 g/d (3), v případě, že je pacient starší 50 let nebo má chronické onemocnění, kardiovaskulární nebo respirační potíže přidat gentamycin	2–6 týdnů

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

### 3.4.3 Prevence

Vytvoření přesných pravidel, které by 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 (Menšíková 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., 2018; Janakiraman, 2008).

### 3.4.4 Antibiotická rezistence

Antibiotická rezistence je schopnost organismu přežít nebo růst v přítomnosti antibiotika o koncentraci, která se používá v klinické praxi (WHO, 2021). Je to vlastnost buď přirozená (primární), vycházející z obecné fyziologie dané bakterie, nebo získaná (sekundární). K sekundární rezistenci dochází adaptací bakterie po kontaktu s antibiotikem nebo z důvodu environmentálních stresů (Menšíková, 2020).

ATB rezistence je považována za jednu z hlavních celosvětových hrozeb pro veřejné zdraví, bezpečnost a vývoj potravin. Snížení citlivosti patogenních bakterií na konvenční antibiotika značně znesnadňuje léčbu, má za následek navýšení úmrtnosti, prodloužení doby hospitalizace a také navýšení nákladů na léčbu. Za posledních několik desítek let došlo k progresi rezistence na antibiotika mezi alimentárními patogeny, včetně *L. monocytogenes*, a to z důvodu jejich nadměrného nebo nesprávného používání (jak u lidí, tak i u zvířat)

a zvyšujícím se obsahu jejich reziduí v prostředí. Léčiva, která se používají ve veterinární medicíně pocházejí ze stejných chemických skupin, jako léčiva používaná v humánní medicíně. A právě přenos ze zvířat na člověka je jedním z nejvýznamnějších způsobů přenosu rezistentních kmenů bakterií. V mnoha zemích jsou ATB u zvířat běžně používána nejen při léčbě nemocí, ale také k prevenci a podpoře růstu. V Evropě se antibiotika hojně používala jako přísada do krmiv od padesátých let minulého století. V současné době (od r. 2006 s výjimkami, od r. 2013 bez výjimek) je však jejich použití, jako doplňkových látek, zakázáno (Menšíková, 2020; Olaimat et al., 2018; Vorlíček, 2018; WHO, 2021).

Wilson et al. (2018) uvádí, že zejména v jižních a západních oblastech Asie se vyskytly izoláty *L. monocytogenes* rezistentních na jedno nebo více antibiotik (běžně používaných na léčbu listeriózy –  $\beta$ -laktamová). Projev rezistence byl spojen se zvýšeným selektivním tlakem způsobeným rozsáhlým používáním ATB jako stimulatoru růstu u hospodářských zvířat nebo při léčbě lidí/zvířat.

Přestože existuje mnoho způsobů přenosu rezistentních kmenů mezi zvířaty a lidmi, nejpravděpodobnější je stále přenos skrze potravní řetězec. Právě během procesu zpracování a výroby potravin se *L. monocytogenes* setkává s řadou subletálních stresových faktorů, jako jsou faktory fyzikální (teplo, vysoký tlak, vysychání, ozáření), chemické (kyseliny, soli, oxidanty, konzervanty atd.) či biologické (mikrobiální antagonismus). Bakterie na stres reagují změnou fyziologického stavu a/nebo buněčného složení, což jim umožňuje udržet si své normální funkce a přežít během zpracování potravin. Stresové faktory mohou také vyvolat konjugativní přenos plazmidu nesoucí geny rezistence, a to mezi patogenními i nepatogenními bakteriemi (Olaimat et al., 2018).

Faezi-Ghasemi & Kazemi (2015) uvádějí, že u izolátů *L. monocytogenes*, pocházejících z potravin, které byly vystaveny stresu z pH, chladu a vysoké koncentraci solí, došlo ke zvýšení odolnosti vůči různým antibiotikům. Konkrétně se jednalo o koncentrace soli 6 % nebo 12 %, snížení pH na hodnotu 5 a/nebo snížení teploty na 10 °C. Další pokusy ukázaly, že vystavení buněk *L. monocytogenes*, v exponenciální fázi růstu, peroxidu vodíku o koncentraci 600 ppm a neletálnímu teplu (45 °C) významně zvýšilo jejich odolnost k antibiotikům penicilinu, ampicilinu, tetracyklinu, chloramfenikolu, gentamycinu, rifampicinu a trimethoprim-sulfamethoxazolu.



### 3.4.5 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 25 g		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 25 g (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 kakaa 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.

### 3.5 Metody izolace a identifikace

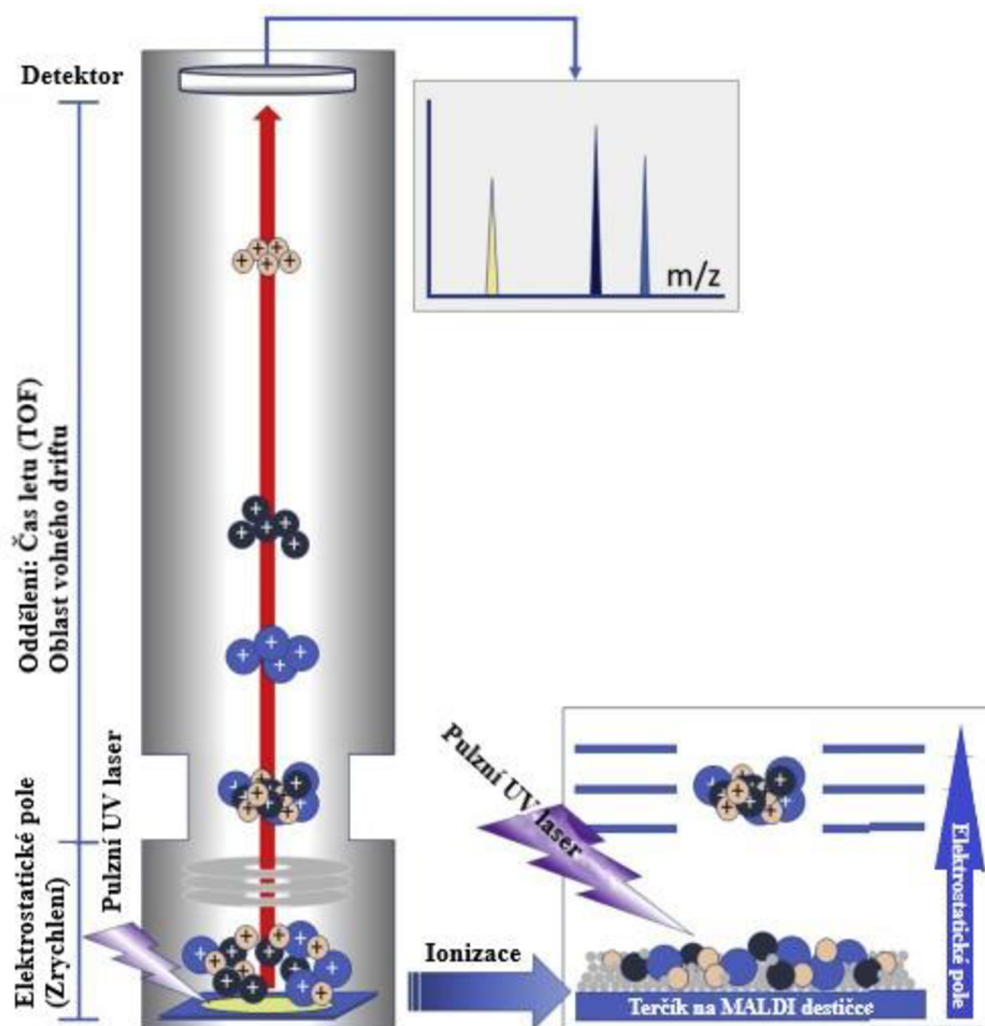
Výskyt a četnost *L. monocytogenes* v různých typech vzorků mohou být studovány pomocí klasických nebo nověji vyvinutých rychlých testů. Detekce a identifikace tradičně zahrnuje kultivační metody, zakládající se na selektivním pomnožení a následném nanášení na tuhá selektivní média. Charakterizace pak 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 složky (např. různá antibiotika, barviva, anorganické soli a další látky) nebo naopak některé základní složky chybí, což znevýhodňuje 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 navázaný na barevný indikátor, a tím dojde ke změně barvy dané kolonie cílového 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; Dortet et al., 2019; O.K. Servis Biopro, 2021; Perry & Freydière, 2007; Redakce Choice, 2019).

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, imunochromatografické metody na membráně anebo imunochemické biosenzory tzv. imunosenzory. Molekulárně-genetické metody jsou založené na analýze DNA. Mezi nejvýznamnější se řadí DNA hybridizace a metoda PCR. Tyto metody jsou vysoce citlivé, pokud se používají čisté bakteriální kultury, ale při použití ve složitějších matricích (např. v některých potravinách) se citlivost výrazně snižuje. To je důvod, proč je často nezbytné mikroorganismy před vlastní analýzou separovat. Lze při tom použít metody fyzikálně-chemické (filtrace, extrakce) či metody bioafinitní (imunochemické) (Blažková et al., 2005; Dortet et al., 2019).

#### 3.5.1 MALDI-TOF MS

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) patří mezi relativně nové technologie. Od svého vzniku tento přístroj působí revoluci nejen v metodách identifikace mikroorganismů (analýza ribozomálních proteinů) v klinických mikrobiologických laboratořích, ale také při analýze nukleových kyselin či farmaceutických analýzách. Důvodem je, že se jedná o rychlý, vysoce výkonný, levný a účinný systém. Mezi hlavní výhody MALDI-TOF MS patří tedy primárně úspora času, protože identifikace bakterií může být provedena za méně než hodinu, místo 24 nebo 48 hodin. Tato doba je kritickou pro pacienty se základním autoimunitním onemocněním nebo pro imunokompromitované jedince (Hou et al., 2019; Li et al., 2022; Ying, 2022).

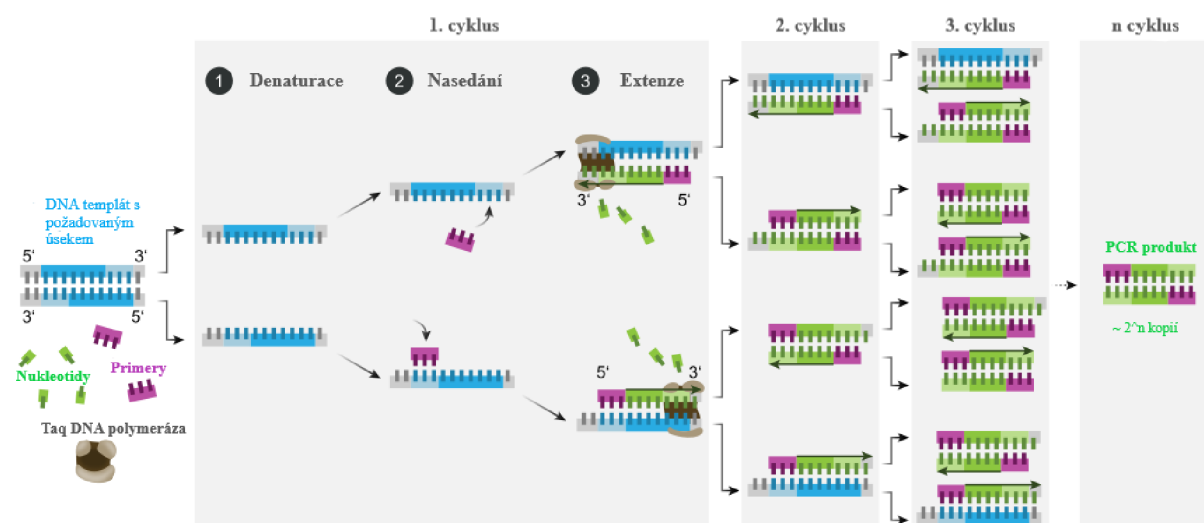
Metoda je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli. MALDI-TOF je šetrnou ionizační technikou, při které dochází k tvorbě iontů bez fragmentace molekul. Ionizace vzorku probíhá působením matrice (např.  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, kyselina hořčičná nebo kyselina 2,5-dihydroxybenzoová), která zajišťuje kontakt laseru s analyzovanou molekulou tak, aby nebyla biomolekula atakována přímo a štěpena tak nežádoucím způsobem. Matrice také zároveň absorbuje energii dodanou laserovým paprskem. Excitované molekuly matrice následně ionizují vzorek přenosem protonu za vzniku pseudomolekulového iontu  $[A+H]^+$ . Ionty jsou pak urychleny silným elektrickým polem a vstupují do vakua v trubici detektoru (hmotnostní analyzátor doby letu), kde se pohybují rychlostí úměrnou jejich hmotnosti a náboji. Hmotnostní analyzátor měří čas, který je potřeba k tomu, aby každý iont dosáhl detektoru. Zaznamenává také čas průletu (TOF). Získané hodnoty se převádí na poměr molekulové hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Hmotnostní spektra, která se analýzou získají, jsou velmi specifická (jako otisk prstu – tzv. fingerprint) pro každý testovaný mikroorganismus. Na identifikaci mikroorganismů se získané proteinové profily porovnávají s referenčními spektry v databázi kontrolních kmenů. Samotná analýza vzorku probíhá na přístroji hmotnostním spektrometru MALDI-TOF, jehož schéma a princip je uveden na Obrázku č. 8 (Hou et al., 2019; Li et al., 2022; Ying, 2022).



Obrázek č.8: Princip metody MALDI-TOF MS (Upraveno podle: Li et al., 2022).

### 3.5.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metodu polymerázové řetězové reakce vyvinul v Kalifornii v roce 1983 americký chemik Kary Mullis a o deset let později za ni obdržel Nobelovu cenu. Tato metoda napodobuje přirozený proces replikace DNA v *in-vitro* podmínkách a umožňuje zmnožení cílového úseku DNA. Zatímco v živých buňkách je replikace velmi složitý proces, který vyžaduje účast mnoha enzymů, PCR využívá pouze základní komponenty tohoto komplexního aparátu. Metoda je založena na střídání různých teplot ve třech základních krocích viz Obrázek č. 9 (Blažková et al., 2005; McPherson & Møller, 2000). Aby mohl být požadovaný úsek DNA amplifikován, musí být vymezen tzv. primery. Primery jsou oligonukleotidy, které jsou komplementární se sekvencemi na začátku a na konci cílového úseku templátu. Při PCR lze amplifikovat simultánně více cílových genů najednou. Taková PCR je označována jako multiplex PCR (Werner, 2016).



Obrázek č. 9: Princip PCR (Upraveno dle:

[https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction#/media/File:Polymerase\\_chain\\_reaction-en.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction#/media/File:Polymerase_chain_reaction-en.svg)).

V prvním kroku, který se nazývá denaturace, dochází vlivem teploty o 94-95 °C k rozvolnění templátové DNA a vzniku jedno-vláknenných řetězců. Následně se teplota sníží, aby se primery mohly spárovat se svými komplementárními sekvencemi na templátových vlákních. Tato fáze se nazývá hybridizace (annealing) a probíhá při teplotách 45-65 °C. Přesná teplota pak závisí na konkrétním primeru. V posledním kroku, zvaném elongace nebo též extenze, dochází k vlastní syntéze nového vlákna. Syntéza je zprostředkována enzymem DNA polymerázou a děje se tak obvykle při teplotě 68-72 °C. Přesná teplota pak závisí na druhu použité polymerázy. V současné době se pro PCR používají tzv. Taq DNA polymerázy, což jsou termostabilní polymerázy z hypertermofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Na rozdíl od běžných polymeráz, je Taq DNA polymeráza odolná vůči vysokým teplotám a zůstává aktivní i po opakované denaturaci. Aby bylo dosaženo dostatečného množství kopií, je nutno celý děj opakovat v několika cyklech, obvykle 30-40. K tomu slouží přístroj zvaný termocycler (obrázek č. 10), který umožňuje rychle měnit teplotu a zároveň ji udržovat po předem stanovenou dobu. Počet řetězců cílové sekvence se v každém cyklu PCR dvojnásobí. To znamená, že při 100% účinnosti by každý templát přítomný na začátku reakce dal vzniknout 10<sup>6</sup> novým řetězcům po pouhých 20 cyklech. Touto metodou lze tedy amplifikovat a detekovat

i velmi nízký počet molekul přítomných ve vzorku na takřka neomezení množství (Blažková et al., 2005; McPherson & Møller, 2000).

PCR produkty pak bývají nejčastěji detekovány pomocí elektroforézy na agarózovém gelu s vhodným fluorescenčním barvivem. Po separaci je elektroforeogram vizualizovatelný UV světlem (Blažková et al., 2005).



**Obrázek č. 10:** Termocycler (Zdroj: <https://www.bio-rad.com/featured/en/thermocycler.html>).

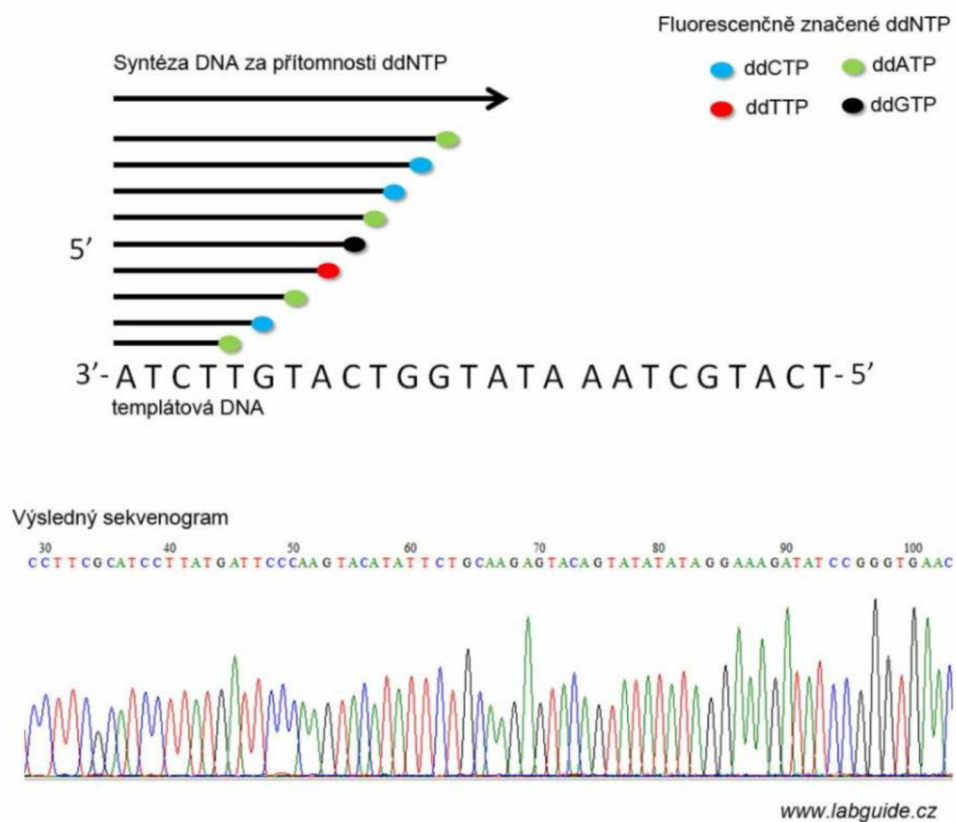
### 3.5.3 Sangerovo sekvenování

Sekvenování slouží k určení pořadí nukleotidů v molekule DNA. Za účelem sekvenování DNA bylo vyvinuto poměrně velké množství různých metod a technik. Tyto používané moderní technologie můžeme rozdělit na tradiční metody a metody tzv. nové generace (1.-4.). Metody „nové“ generace využívají principu paralelizace procesu sekvenování. To znamená, že dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí najednou. Výsledkem je masivní produkce výstupních dat. Nejčastěji používanými platformami sekvenování nové generace jsou např. 454, Ion Torrent, Illumina nebo SOLiD (Kolísko, 2017; Koubková et al., 2014).

Většina technik sekvenování DNA se zakládá na metodách, které zjišťují pořadí postupně přidávaných nukleotidových bází při syntéze nového řetězce DNA, který vzniká podle stávající předlohy (templátu). V roce 1977 objevil Frederick Sanger metodu, která umožnila čtení velmi dlouhých řetězců a to až 1000 bází na jednu sekvenační reakci. Tato, po něm pojmenovaná metoda, mu zajistila druhou Nobelovu cenu. Principem Sangerova sekvenování je opakovaná syntéza nového řetězce DNA podle stejného templátu. Při každém opakování ale dochází k přerušení syntézy nového řetězce tím, že se do něj náhodně přiřadí modifikovaná nukleotidová báze (dideoxynukleotid), která nedovolí DNA polymeráze pokračovat v syntéze nově vznikajícího vlákna. Specifické je to, že každá modifikovaná báze (která ukončí postupné řetězení) navíc nese příslušnou fluorescenční barvu, podle které se pozná, o jakou bázi se jedná. Náhodným přerušováním syntézy nově vznikajícího komplementárního řetězce DNA (podle

templátu) vznikají molekuly, které jsou různě dlouhé. Při dostatečném opakování vznikne směs molekul obsahující různě dlouhé řetězce (10, 11, 12, 13, 14 až 1000 bází). Na konci každého řetězce se nachází fluorescenčně označený dideoxynukleotid, který podle barvy určí, o jaký nukleotid jde. Následně se na základě velikosti molekuly DNA seřadí od nejkratší po nejdelší a díky jejich odlišnému fluorescenčnímu značení se přečte výsledná sekvence, tedy pořadí bází (Obrázek č. 11)(Kolísko, 2017).

K hlavním výhodám Sangerova sekvenování se řadí značná délka čtených úseků DNA a nízká chybovost. Nevýhodou je, že v rámci celého procesu dochází k sekvenování pouze jednoho úseku DNA (na rozdíl od metod dalších generací). Další nevýhodou je poměrně vysoká cena a nízká rychlost, což je nepříjemné při potřebě sekvenace celého genomu, či při testování genů velkého počtu různých organismů (Kolísko, 2017).



**Obrázek č. 11:** Syntéza DNA za přítomnosti ddNTP a výsledný sekvenogram  
(Zdroj: <https://labguide.cz/metody/sekvenovani-dna/klasicke-metody-sekvenovani/>).

### 3.5.4 Typizace *L. monocytogenes*

U jednotlivých kmenů *L. monocytogenes* byly zjištěny velké rozdíly ve virulenci. Některé jsou vysoce virulentní a někdy až smrtelné, zatímco jiné jsou málo virulentní až avirulentní, a jejich vliv na hostitele je nízký. Proto byly vyvinuty různé metody, které napomáhají blíže diferenciovat jednotlivé kmeny, a lépe porozumět distribuci a epidemiologii *L. monocytogenes* (Wu et al., 2016). V zásadě existují dva různé přístupy k typizaci. Ty jsou založené buď na fenotypových či genotypových charakteristikách. Typizační a identifikační metody založené na fenotypu zahrnují např. sérotypizaci, fágovou typizaci, multilokusovou enzymovou elektroforézu (Multilocus enzyme electrophoresis = MLEE) či esterázovou

typizaci. Hlavním nedostatkem fenotypových metod je, že některé vlastnosti se mohou lišit v reakci na vnější stres nebo v závislosti na fázi růstu bakterií. Základní členění kmenů *L. monocytogenes* je založeno na sérotypizaci, tj. detekci povrchových antigenů. Na somatické (O = I–XV) a flagelární H (bičíkové, H = A–D). Na povrchu se tvoří různé typy protilátek, a na základě jejich kombinace u daného kmene se *L. monocytogenes* dělí do 13 skupin tzv. sérotypů (=sérovarů) viz Tabulka č. 6. Brychta et al (2018) uvádí následující četnost výskytu jednotlivých sérovarů v klinických vzorcích 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 %). Sérotypizace se tradičně provádí pomocí specifických komerčně vyráběných zvířecích sér na mikroskopickém podložním sklíčku. Pozitivní výsledek se projeví vznikem aglutinátu. Sérotypy je také možné určit metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Na základě genetických markerů lze kmény rozdělit na několik rodových linií a fylogenetických skupin, v závislosti na konkrétních použitých markerech (Bednář et al., 1996; Doumith & Buchrieser et al., 2004; Chen et al., 2019; Lüth et al., 2018). Na základě studie Doumith et al. (2004) se *L. monocytogenes* dělí do třech linií a pěti fylogenetických skupin: 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). Metoda PCR je rychlou a praktickou metodou klasické sérotypizace.

Sérotypizace ale nemá dostačující diskriminační schopnost pro spolehlivé odlišení jednotlivých kmenů. K detailnějšímu rozlišení v rámci jednotlivých sérotypů se používají genotypové metody. Prvním typem jsou techniky založené za zkoumání odlišností délky fragmentů DNA, vzniklých buď štěpením restrikcími enzymy či amplifikací se specifickými primery. Tyto metody pokrývají variabilitu celého genomu, jsou proto velice citlivé. Hojně využívaná je pulzní gelová elektroforéza (PFGE). Mezi metody založené na PCR pak patří např. metody: náhodná amplifikace polymorfnní DNA (RAPD) nebo REP (repetitive sequence based) PCR. Dalším typem jsou metody zkoumající polymorfismus nukleotidových sekvencí, mezi něž patří multilokusová sekvenční typizace (Multilocus sequence typing = MLST), DNA microarray nebo sekvenování celého genomu. Sekvenování celých bakteriálních genomů poskytuje nejdetailnější informace o daném organismu, nicméně je finančně náročné a nelze jej aplikovat do rutinní praxe (Chen et al., 2019; Lüth et al., 2018).

**Tabulka č. 6:** Somatické a flagelární antigeny přítomné u jednotlivých sérotypů *L. monocytogenes* (upraveno podle Lous et al., 2011).

Sérotyp	Somatické (O) antigeny	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

Poznámky: Faktory v závorce nebyly vždy detekovány; faktor II je termolabilní



Pro rychlé a mezilaboratorní porovnání kmenů se jako nejvíce vhodnou jeví výše zmíněná metoda MLST. Ta je založena na detekci jedno-nukleotidového polymorfismu sedmi provozních tzv. housekeeping genů. Výsledky jsou porovnatelné s databází poskytovanou Pasteurovým ústavem a na jejich základě se ustanovuje tzv. sekvenční typ a klonální komplexy. 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 myšmi 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 (Chen et al., 2019; Moura et al., 2016; Ricci et al., 2018; odkaz na Pasteurův institut: <https://bigsd.bpasteur.fr/listeria/>).

## 4 Metodika

Praktická část diplomové práce navazuje na praktickou část bakalářské práce, kde byla studována kontaminace *L. monocytogenes* u vzorků běžně dostupných potravin. Testovány byly vzorky masných, mléčných a rybích výrobků a lahůdek, dle ČSN EN ISO 11290-1/2017. V praktické části diplomové práce byly jednotlivé izoláty detailně charakterizovány.

### 4.1 Materiál

Analýze bylo podrobena celkem 51 vzorků potravin. Seznam testovaných vzorků je uveden v následující Tabulce č. 7. Rozbor všech těchto vzorků byl proveden v rámci data použitelnosti či data minimální trvanlivosti.

Tabulka č. 7: Seznam vzorků testovaných potravin.

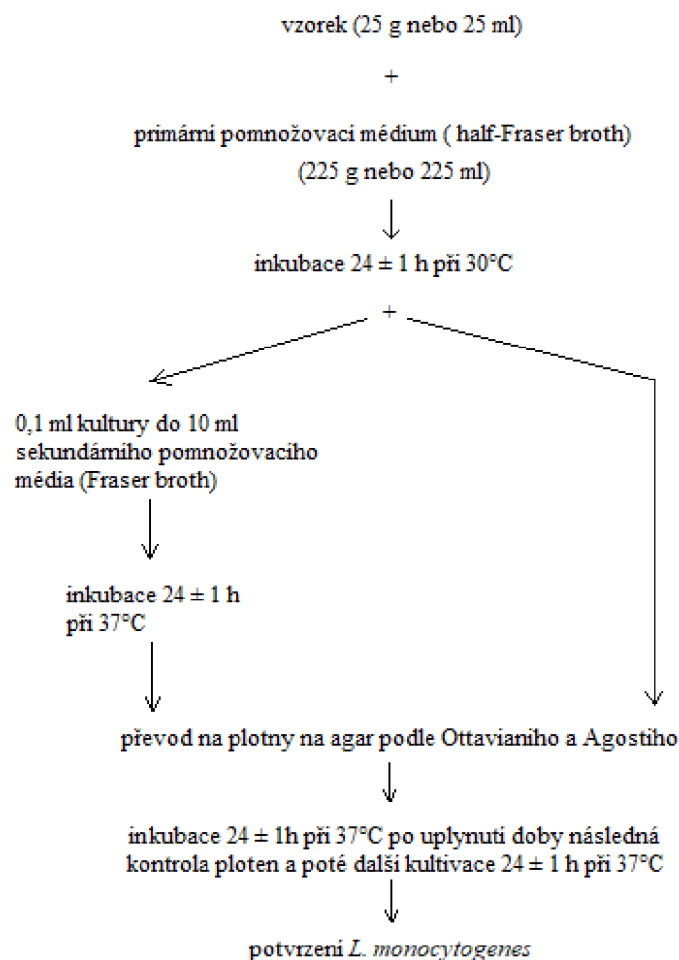
Konkrétní vzorek potravin		
Masné výrobky	Lahůdky	Mléko a mléčné výrobky
Laborecká klobása	Salát Pálivec	Kozí sýr-stánkový prodej
Bravcova sunka (Slovensko)	Bukovánek sýrový	Sýrové nitě-stánkový prodej
Malokarpatska salama	Salát rybí s majonézou	100% Ovčia bryndza - nepasterizovaná
Šunka nejvyšší jakosti	Salát holandský	Sýr Brie 60 %
Debrecínská pečeně	Chlebíček salám	Sýr tavený uzený
Slanina anglická extra	Chlebíček šunka	Niva
Salám vysocina	Salát ala KRAB s jogurtem	Tavený sýr
Utopenec	Bramborový salát	Čerstvý sýr přírodní
Čabajka	Hermelínový salát	Sýr Balkánského typu
Vesnická klobása nepálivá	Pochoutkový salát	Hermelín
Anglický rostbíf	Camping salát	Romadur
Tataráček	Chlebíček hermelínový	Čerstvé kravské mléko
Lahůdková paštika	Chlebíček s rostbífem	Bůvolí mléko-vzorek č. 1-6
	Debrecínský chlebíček	<b>Ryby a rybí výrobky</b>
	Kemping salát s majonézou	Zavináč
	Salámová pomazánka	Pstruh lososovitý, uzený-plátky-uzený studeným kouřem
	Papričky plněné sýrem v oleji	Rybí salát

## 4.2 Mikrobiologický rozbor a izolace čistých kultur

Listérie byly ve vzorcích stanoveny podle ČSN EN ISO 11290-1/2017 viz Obrázek č. 12. K primárnímu pomnožení bylo použito tekuté médium se sníženou koncentrací selektivních látek Half-Fraser bujón (Oxoid) (=poloviční bujón podle Frasiera). Jednotlivé vzorky byly důkladně homogenizovány a následně bylo asepticky odebráno 25 ml u tekutých nebo 25 g u pevných vzorků a toto množství bylo převedeno do 225 ml média pro primární pomnožení. Vzorky byly inkubovány 24 hod při 30 °C.

Po uplynutí doby kultivace byl 0,1 ml asepticky rozetřeno mikrobiologickou kličkou na plotny obsahující chromogenní *Listeria* agar (ALOA, Oxoid). Dále byl odebrán 0,1 ml kultury z primárního pomnožení a převeden do vialky obsahující 10 ml bujónu podle Frasiera (Oxoid) určeného pro sekundární pomnožení. Následně byly plotny i vialky kultivovány při 37 °C.

Po uplynutí doby kultivace proběhl asepticky roztěr na ALOA agar (0,1 ml kultury) ze sekundárního pomnožení (Fraser bujón) a také byl hodnocen nárůst charakteristických kolonií *L. monocytogenes* z primárního pomnožení. Charakteristické kolonie jsou na ALOA agaru kruhového pravidelného tvaru. Jsou hladké, modrozelené a obklopené mléčně zbarvenou zónou precipitace. Následně byly asepticky odebrány čisté kmeny a převedeny do bujónu z mozko-srdcové infúze (brain-heart infusion, BHI, Oxoid). Kultivace (kultur v BHI a plotny ze sekundárního pomnožení) probíhala po dobu 24 hodin při 37 °C. Následně byla mikroskopicky ověřena morfologie a čistota kultur. Dále proběhla kontrola ploten ze sekundárního pomnožení a stejný proces odebrání izolátů charakteristických kolonií.



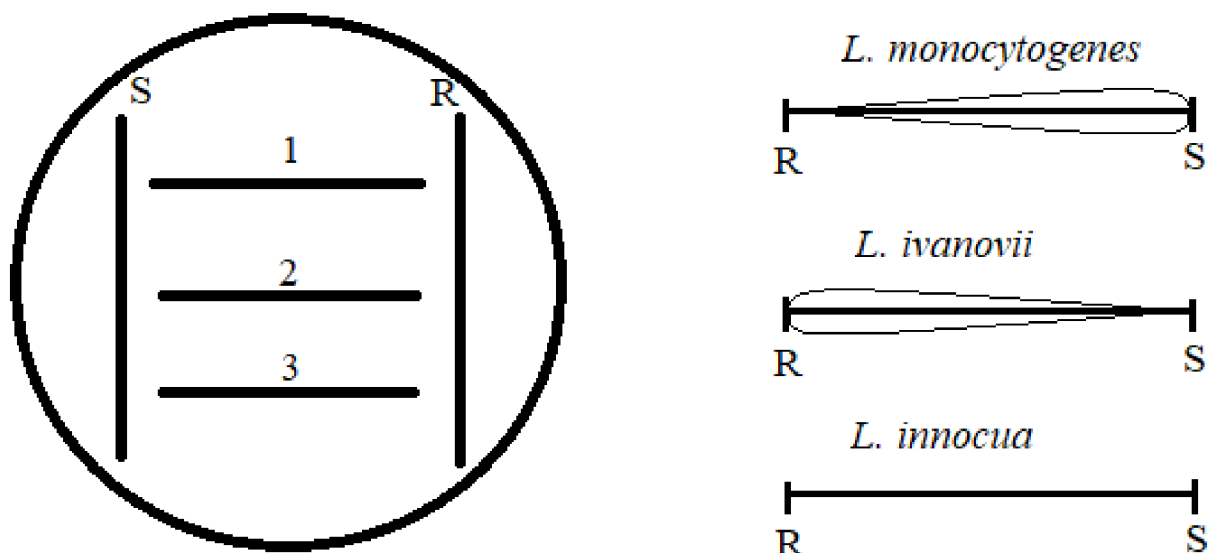
Obrázek č. 12: Diagram průběhu kultivace.

### 4.3 Identifikace a konfirmace

Příslušnost izolátů k druhu *L. monocytogenes* byla ověřena pomocí CAMP testu, MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie a molekulárně genetických metod (PCR s druhově specifickými primery a Sangerovo sekvenování 16S rDNA).

#### 4.3.1 CAMP test

ČSN EN ISO 11290-1/2017 udává několik typů konfirmačních testů pro ověření druhu kultur presumptivních *L. monocytogenes* izolovaných z potravin. Jednou z těchto metod je tzv. CAMP test. Dle stejné normy byl na tento test byl použit krevní agar (Columbia Agar Base). Agar byl vysterilován v autoklávu a vytemperován ve vodní lázni na teplotu 50 °C. Následně bylo asepticky přidáno 5 % defibrinované ovčí krve (Oxoid). Médium bylo důkladně promícháno a po 10 ml rozdávkováno do Petriho misek. Po zatuhnutí byly na agarové plotny asepticky rozetřeny mikrobiologickou kličkou kultury bakterií *Rhodococcus equi* (nehemolytický), *Staphylococcus aureus* (hemolytický) a kultury presumptivních *L. monocytogenes* viz Obrázek č. 13. Podle druhu listérie došlo u izolovaných kultur buď k zesílení hemolytické aktivity v blízkosti jednoho z indikátorových kmenů nebo k žádné hemolytické aktivitě. Všechny izoláty byly dále identifikovány pomocí MALDI-TOF MS a molekulárně genetických metod.



**Obrázek č. 13: CAMP Test – Roztěr jednotlivých kmenů na misce.**  
S – *Staphylococcus aureus*  
R – *Rhodococcus equi*  
1,2,3 – Presumptivní *L. monocytogenes*

### 4.3.2 MALDI-TOF MS

Z čistých čerstvě narostlých kultur byl odebrán 1 ml a asepticky převeden do sterilních mikrocentrifugačních zkumavek (Eppendorf). Kultura byla odstředěna po dobu 2,5 minut při 14,5 tis otáček za minutu. Následně byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno 0,5 ml 70% etanolu. Pomocí pipety byl pelet ve zkumavce resuspendován a následně znovu při stejných podmínkách odstředěn. Po odstranění supernatantu byl pelet ponechán při pokojové teplotě několik minut vyschnout. K peletu byla přidána 70% kyselina mravenčí (Fluka) v množství 10-15 µl, v závislosti na množství peletu, a suspenze byla řádně homogenizována na vortexu. Následně byl přidán 100% acetonitril (Fluka) ve stejném množství jako k. mravenčí a obsah opět důkladně homogenizován. Po centrifugaci 2,5 min/14,5 tis ot/min byl 1 µl každého supernatantu (ve dvou opakováních) nanesen na čistou MPT 384 MALDI destičku a bezprostředně po zaschnutí překryt 1 µl HCCA matricí (nasycený roztok kyseliny  $\alpha$ -kyano-4-hydroxycinnamové v 50 % acetonitrilu s 2,5 % kyselinou trifluoroctovou, BrukerDaltonik GmbH). Takto připravená destička byla vložena do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF MS. Spektra byla měřena automaticky pomocí softwaru FlexControl. Identifikace byla provedena na základě porovnání hmotnostních spekter (viz Tabulka č. 8) s referenčními kmeny, uvedenými v databázi pomocí softwaru BioTyper verze 2.0 (BrukerDaltonik GmbH).

**Tabulka č. 8:** 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

### 4.3.3 Identifikace pomocí molekulárně biologických metod

#### 4.3.3.1 PCR s druhově specifickými primery

##### 4.3.3.1.1 Příprava buněčného lyzátu pro PCR

Jeden ml čerstvě narostlé kultury byl převeden do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky (=mikrozukavky) (Eppendorf) a odstředěn při 14 500 ot/min po dobu 2 min. Následně byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno 100 µl lyzačního pufu (PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent). Po důkladné homogenizaci byla suspenze zahřívána v termobloku při 100 °C po dobu 10 min. Po uplynutí doby byly vzorky ponechány několik minut při pokojové teplotě zchladnout a odstředěny při 14 500 ot/min po dobu 2 min. Osmdesát µl supernatantu bylo převedeno do nové sterilní mikrozukavky a takto připravený lyzát použit pro další analýzy.

##### 4.3.3.1.2 Příprava reakční směsi

Veškeré PCR reakce probíhaly o celkovém objemu reakční směsi 25 µl. Reakční směs obsahovala 12,5 µl DreamTaq Green Master Mixu (Thermo Fisher Scientific), dále 8,5 µl PCR

vody (Thermo Fisher Scientific), 1 µl forward primeru (10 µM), 1 µl reverzního primeru a 2 µl buněčného lyzátu. K identifikaci druhu bakterií rodu *Listeria* byly zvoleny primery specifické pro druh *L. monocytogenes*: LL5 a LL6 (Das et al. 2010), a pro druh pro *L. innocua*: lin0464F a lin0464R (Liu et al. 2003b). Sekvence primerů a velikost očekávaných PCR produktů jsou uvedeny v Tabulce č. 9.

**Tabulka č. 9:** Přehled použitých primerů pro druhovou identifikaci.

Název primeru	Druh	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost produktu (bp)	Citace
LL5	<i>L. monocytogenes</i>	AACCTATCCAGGTGCTC	267	(Das et al. 2010)
LL6		CTGTAAGCCATTTCGTC		
lin0464F	<i>L. innocua</i>	CGCATTTATCGCCAAAACCTC	749	(Liu et al. 2003b)
Lin0464R		TCGTGACATAGACGCGATTG		

Připravená reakční směs byla zvortexována a vzorky umístěny do termocykelru C 1000 Touch (BioRad). Pro oba sety primerů byl použit shodný teplotní program uvedený v Tabulce č. 10.

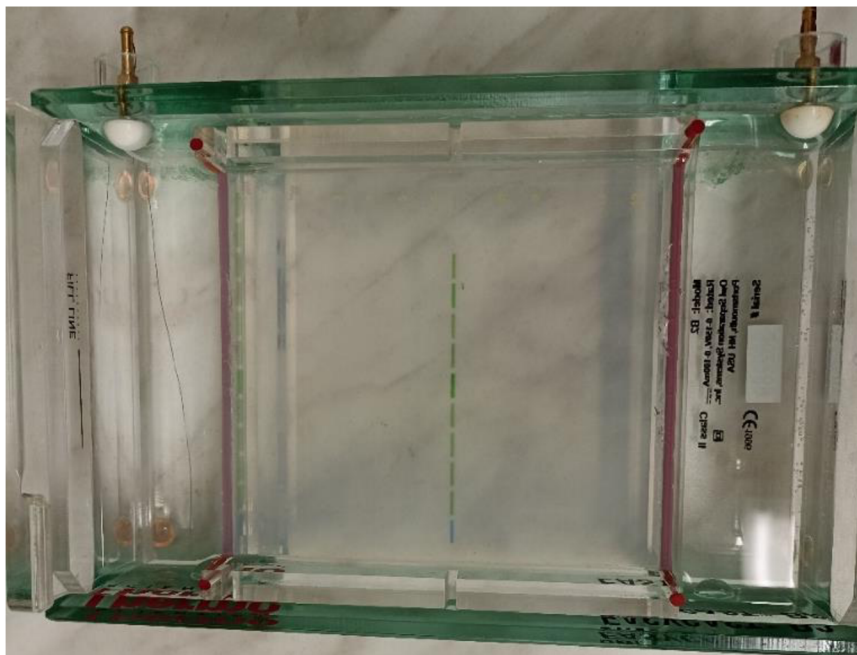
**Tabulka č. 10:** Podmínky PCR (Das et al. 2010).

Fáze	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	3 min	
Denaturace	94	45 s	30
Annealing	55	45 s	
Extenze	72	45 s	
Závěrečná extenze	72	5 min	

#### 4.3.3.1.3 Detekce PCR produktů

DNA fragmenty vzniklé PCR reakcí byly detekovány pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu. Gel byl připraven následovně: do 100 ml 0,75 x TAE pufru (40mM tris(hydroxymethyl)aminomethan, 20mM octová kyselina, 1mM EDTA; Fermentas) byl přidán 1 g agarózy (SERVA). Vzniklá směs byla za občasného míchání rozpuštěna v mikrovlnné troubě (cca 3 min) a po mírném zchlazení do ní bylo přidáno 5 µl vizualizačního činidla Gel red (Biotinum). Následně byla připravená směs nalita do tvořítka s dvěma hřebínky pro vytvoření jamek. Po zatuhnutí, byl gel umístěn do elektroforetické vany a do vzniklých jamek pipetovány vzorky po 5 µl. Jako velikostní standard byl použit GeneRuler 1kb Plus DNA

Ladder (Thermo Fisher Scientific), který byl nanesen v objemu 5  $\mu$ l do první jamky v každém řádku viz obrázek č. 14.



**Obrázek č. 14:** Elektroforetická vana s gelem a nanesenými vzorky.

Separace probíhala v elektroforetickém pufru (0,75 x TAE, Fermentas) za stálého napětí 110 V po dobu 35 min. Po uplynutí doby byl gel přenesen do transiluminátoru (Biorad Universe Hood II Gel Doc System). PCR produkty byly vizualizovány pomocí UV světla, upraveny v programu Quantity One (BIORAD) a byly pořízeny digitální snímky.

#### **4.3.3.2 Identifikace sekvenováním genu pro 16S rRNA**

Kmeny, které nebylo možné identifikovat pomocí metody MALDI-TOF MS a druhově specifické PCR, byly identifikovány sekvenováním genu pro 16S rRNA. Pro ověření specifity primerů byly také sekvenovány vybrané izoláty, u nichž proběhla úspěšně identifikace pomocí PCR. Pro amplifikaci 16S rDNA byl použit stejný buňečný lyzát jako v kapitole 4.3.3.1.1.

##### **4.3.3.2.1 Amplifikace genu pro 16S rRNA**

Objem a složení reakční směsi byly shodné jako v kapitole 4.3.3.1.2. Pro amplifikaci genu 16S rRNA byly použity primery fD1 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') a rP2 (5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3'), které byly navrženy ve studii Weisburg et al. (1991) s očekávanou velikostí PCR produktu okolo 1000 párů bází (pb). Podmínky amplifikace jsou znázorněny v následující Tabulce č. 11. PCR produkty byly vizualizovány shodně jako v kapitole 4.3.3.1.3.

**Tabulka č. 11:** Podmínky PCR pro 16S rRNA (Somer & Kashi, 2003).

Fáze	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	92	5 min	
Denaturace	92	1 min	35
Annealing	52,5	90 s	
Extenze	72	2 min	
Závěrečná extenze	72	5 min	

#### 4.3.3.2 Purifikace PCR produktů

PCR produkty byly přečištěny pomocí kitu E.Z.N.A. Cycle Pure kit (OMEGA bio-tek) dle návodu výrobce. K 20  $\mu$ l PCR produktu bylo napipetováno 100  $\mu$ l CP pufru a jemně promícháno pipetou. Celý objem byl převeden do HiBind DNA kolonky, umístěné ve sběrné mikrozkuhavce. Následně byly vzorky odstředěny při 14,5 tis ot/min po dobu 60 sekund a filtrát odstraněn ze sběrných zkumavek. Do kolonky bylo přidáno 700  $\mu$ l promývacího pufru, vzorky byly opět odstředěny při 14,5 tis ot/min po dobu 60 sekund a filtrát odstraněn. Tento krok byl opakován dvakrát. Proces promývání byl zakončen 2minutovou centrifugací při maximálních otáčkách, aby byl odstraněn zbytkový ethanol. Kolonka byla pak přenesena do nové 1,5 $\mu$ l mikrocentrifugační zkumavky a do jejího středu bylo napipetováno 30  $\mu$ l elučního pufru. Následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 2 minut a odstředění při 14,5 tis ot/min po dobu 60 sekund. Takto přečištěný PCR produkt byl použit na sekvenaci.

#### 4.3.3.3 Sangerovo sekvenování

Pět  $\mu$ l přečištěného PCR produktu bylo smícháno s 5  $\mu$ l fd1 primeru (5 $\mu$ M). Vlastní sekvenování bylo uskutečněno Sangerovou metodou servisem GACT společnosti Eurofins Genomics. Získaná data byla zpracovávána v programu Chromas Lite a následně porovnána programem BLAST se sekvencemi, které jsou publikovány v databázi nukleotidů GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

## 4.4 Charakterizace *Listeria monocytogenes*

### 4.4.1 REP-PCR

Pro studium podobnosti kmenů, identifikovaných jako *L. monocytogenes*, na úrovni celého genomu byla použita metoda REP-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub> (Versalovic et al., 1994). Na tuto metodu byla použita DNA extrahovaná, jak je uvedeno v kapitole 4.3.3.1.1. Celkový objem reakční směsi činil 25  $\mu$ l a obsahoval: 12,5  $\mu$ l DreamTaq Green Master Mixu (Thermo Fisher Scientific), 9,5  $\mu$ l PCR vody (Thermo Fisher Scientific), 1  $\mu$ l primeru (10  $\mu$ M) a 2  $\mu$ l



DNA. Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (BioRad) za podmínek uvedených v následující Tabulce č. 12.

**Tabulka č. 12:** REP-PCR program (Versalovic et al., 1994).

Fáze	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	7 min	
Denaturace	90	1,5 min	30
Hybridizace	40	1 min	
Extenze	65	8 min	
Závěrečná extenze	65	16 min	

PCR produkty byly separovány v 1,5% agarózovém gelu, připraveném jak je uvedeno v kapitole 4.3.3.1.3, při konstantním napětí 80 V po dobu 180 min. Jako velikostní standard byl použit GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), který byl nanesen v objemu 5  $\mu$ l do první a poslední jamky v každém řádku. Vzniklé bendy byly vizualizovány v transiluminátoru (Biorad Universe Hood II Gel Doc System) a byly pořízeny digitální snímky. Výsledky pak byly zpracovány pomocí verze softwaru BioNumerics 6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem). Dendrogram byl vytvořen na základě metody párování pomocí nevážených aritmetických průměrů (UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic mean) s tolerancí vzdálenosti 1 % a optimalizací 1 % (Salmonová et al., 2018).

#### 4.4.2 Sérotypizace

K určení sérotypů byly použity 2 metody. Pomocí metody Multiplex PCR byly kultury *L. monocytogenes* rozděleny do linií (I.1, I.2, II.1, II.2, a III.). Pro přesné určení sérotypů (1/2a, 3a; 1/2c, 3c; 4d, 4b,4e; 1/2b, 3b, 7; 4a, 4b, 4c) byla použita metoda sklíčkové aglutinace.

##### 4.4.2.1 Multiplex PCR

Při identifikaci sérotypů *L. monocytogenes* byly vybrány specifické primery pro jednotlivé sérotypové linie *L. monocytogenes* (Tabulka č. 13) podle studie Doumith et al. (2004).

**Tabulka č.13:** Přehled použitých primerů pro sérotypové linie *L. monocytogenes* (Doumith et al. 2004).

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

Pro multiplex PCR byl celkový objem reakční směsi 25 µl. Směs obsahovala 12,5 µl Master mixu (Thermo Fisher Scientific), 1 µl každého z primerů (lmo0737, ORF2819, ORF2110 – 1µM; lmo1118 – 1,5 µM) uvedených v Tabulce č. 11, 2,5 µl PCR vody (Thermo Fisher Scientific) a 2 µl DNA. Teplotní profil pro amplifikaci je uveden v Tabulce č. 14.

**Tabulka č.14:** Podmínky PCR pro stanovení sérotypových linií *L. monocytogenes* (Doumith et al. 2004).

Fáze	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	3 min	35
Denaturace	94	40 s	
Hybridizace	53	1 min 15 s	
Extenze	72	1 min 15 s	
Závěrečná extenze	72	7 min	

PCR produkty byly separovány pomocí elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu (viz. 4.3.3.1.3) za stálého napětí 80 V po dobu 90 min. Jako velikostní standard byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA (Thermo Fisher Scientific). Následně byly vzniklé bandy vizualizovány v UV transiluminátoru (Bio-Rad) a pořízeny digitální snímky.

#### 4.4.2.2 Sklíčková aglutinace

Sérotypy byly stanoveny pomocí sklíčkové aglutinace, na základě kombinace pozitivních reakcí na somatické (O) a flagelární (H) antigeny.

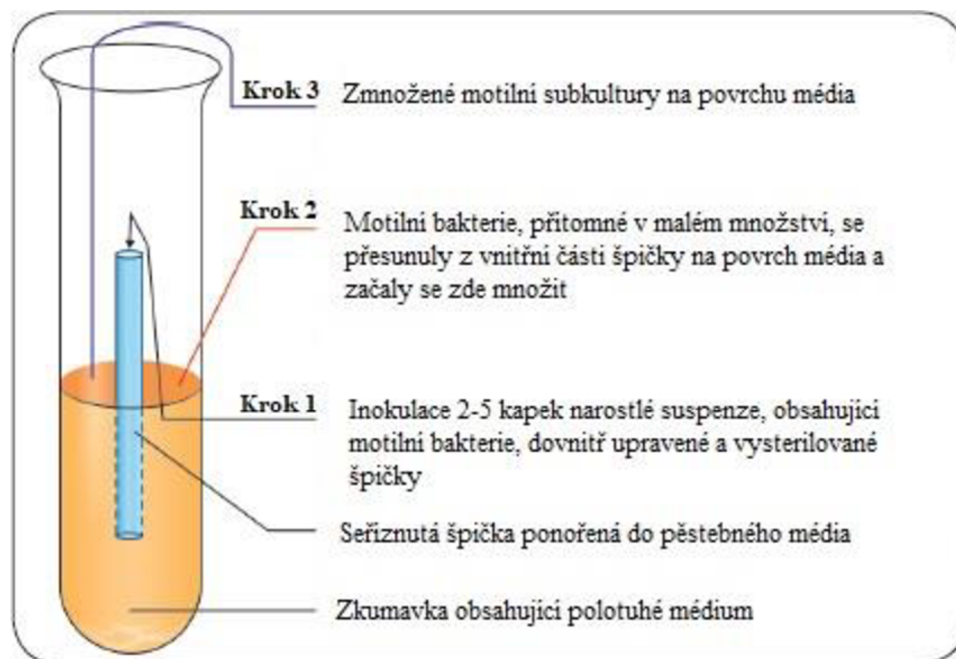
##### 4.4.2.2.1 Somatické antigeny

Somatické antigeny byly testovány podle upraveného návodu výrobce (Mast Group). Pro test byly použity čerstvě narostlé kultury na BHI agaru při 37 °C po dobu 24 hod. Sterilní sklíčkou byla odebrána samostatně rostoucí kolonie a přenesena na podložní sklíčko, kam

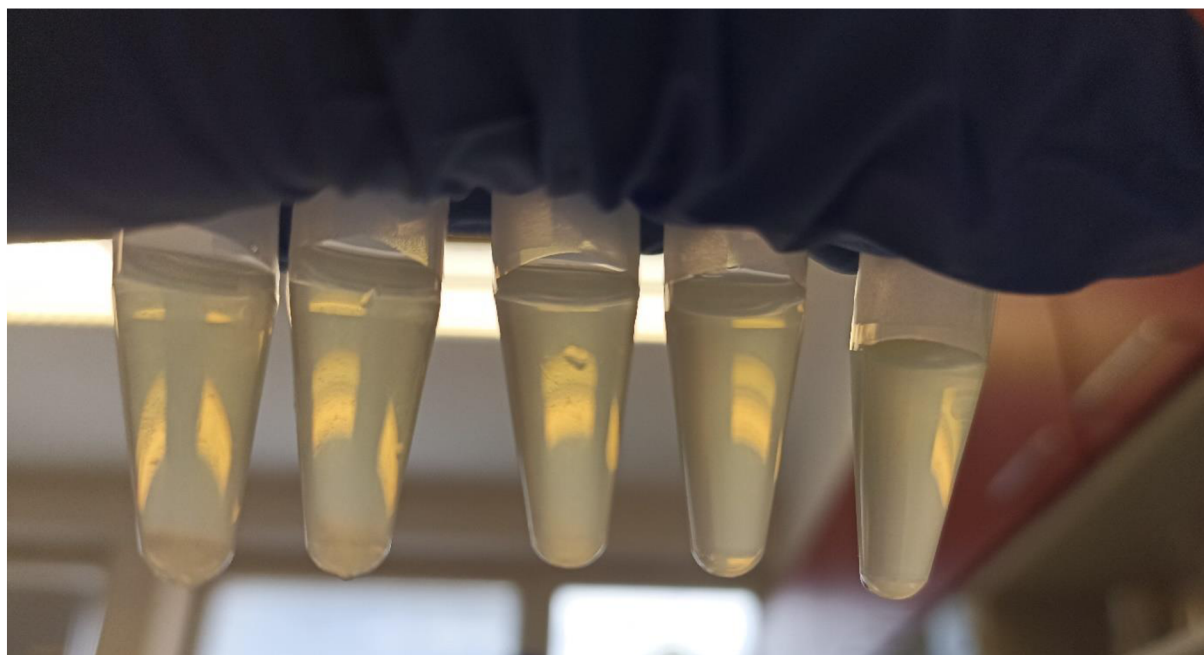
předtím byla nanesena kapka příslušného O-antiséra (MAST ASSURE ANTISERUM LISTERIA 'O', Mast Group). Kolonie byla kličkou v antiséru důkladně promíchána a následně byla pozorována aglutinace. Nejprve byla testována aglutinace s polyvalentními antiséry O I/II a O V/VI. V případě pozitivní reakce na antiséru O I/II, byla dále testována reakce s monovalentními antiséry O I a O IV. V případě vzniku aglutinátu se sérem O V/VI, byla dále testována reakce s monovalentními antiséry O VI, O VII, O VIII a O IX.

#### 4.4.2.2 Flagelární antigeny

Flagelární antigeny byly stanoveny podle návodu výrobce (Merck Group). Nejprve byly odděleny pohyblivé buňky na polotuhém BHI agaru (0,2 % w/v agar). Pro oddělení pohyblivých bakterií byla použita metoda Craigieho zkumavky (viz Obrázek č. 15). Zkumavky byly inokulovány 2-5 kapkami čerstvě narostlé bakteriální suspenze. Kultivace proběhla při 30 °C po dobu 48–72 hod. Z povrchu polotuhého média pak byla odebrána kultura a ta inokulována do nové Craigieho zkumavky. Po 48-72 hod kultivaci při 30 °C byla odebrána narostlá kultura, přenesena do BHI bujónu a kultivována 24 hod při 30 °C. Následně byl přidán 1% solný roztok v poměru 1:1. Do mikrocentrifugační zkumavky byly nanесeny 2 kapky příslušného H-antiséra a přidáno 0,5 ml suspenze. Zkumavky byly promíchány a vloženy do vodní lázně (50-52 °C) na 60 min. Po uplynutí této doby byla pozorována aglutinace (Obrázek č. 16). Výsledek byl porovnán s tabulkou, jak uvádí výrobce (viz Tabulka č. 15) společně s výsledky somatických antigenů a na základě toho byl určen příslušný sérotyp.



Obrázek č. 15: Craigieova zkumavka – upraveno podle Sastry et al. (2016).



**Obrázek č. 16:** Sledování aglutinace.

**Tabulka č. 15:** Somatické a flagelární antigeny (upraveno podle výrobce: Mast Group).

Sérotyp	Somatické (O) antigeny	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	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), (IX)	A, B, C
7	(III), XII, XIII	A, B, C

## 4.5 Testování patogenní potenciálu

U kultur, které byly identifikovány jako *L. monocytogenes*, byla testována lecitinázová a hemolytická aktivita, a detekován gen internalinu B.

### 4.5.1 Lecitinázová a hemolytická aktivita

Lecitinázová aktivita byla pozorována při selektivním stanovení na ALOA agaru. Hemolytická aktivita byla stanovena v rámci Camp testu (kapitola č. 4.3.1).

#### 4.5.2 Detekce internalinu B pomocí PCR

Metodou PCR byl detekován gen pro internalin B za použití primerů lmo2821-F a lmo2821-R podle Liu et al.(2003a). Internalin je protein, který umožňuje *L. monocytogenes* proniknout do hostitelské buňky. V následující tabulce č. 16 jsou podrobněji popsány použité primery a v Tabulce č. 17 jsou uvedeny podmínky amplifikace. Separace a vizualizace PCR produktů proběhla stejným způsobem, jak je již uvedeno v kapitole č. 4.3.3.1.3.

**Tabulka č. 16:** Podmínky primerů použitých při detekci internalinu B.

Název primeru	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost produktu (bp)	Citace
lmo2821-F	TGTAACCCCGCTTACACAGTT	611	(Liu et al., 2003a)
lmo2821-R	TTACGGCTGGATTGTCTGTG		

**Tabulka č. 17:** Podmínky amplifikace při zjišťování přítomnosti internalinu B (Liu et al., 2003).

Fáze	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	2 min	25
Denaturace	94	20 s	
Hybridizace	60	20 s	
Extenze	72	45 s	
Závěrečná extenze	72	2 min	

#### 4.6 Citlivost vůči antibiotikům

Citlivost jednoho izolátu *L. monocytogenes* z každého kontaminovaného vzorku vůči antibiotikům byla stanovena dle ISO 20776-1, bujónovou mikrodiluční metodou. Stanovena byla minimální inhibiční koncentrace (MIC), tedy nejnižší koncentrace antibiotika inhibující viditelný nárůst bakterií *L. monocytogenes*. Testována byla antibiotika uváděná v databázi EUCAST (2022), která jsou používána v klinické praxi: ampicilin, benzylpenicilin (penicilin G), erytromycin, meropenem nebo trimetoprim-sulfometaxazol.

Ke zjištění citlivosti izolovaných kmenů vůči vybraným antibiotikům byl použit Müller-Hilton bujón (MH, Oxoid) s 5 % lyzované koňské krve (Oxoid) a nikotinamidem (NAD) o koncentraci 20 mg/l. Bujón byl vysterilován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min, vytemperován na 50 °C, a následně byly asepticky přidány suplementy a testovaná antibiotika. U penicilinu, ampicilinu a erytromycinu byly testovány koncentrace 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 a 0,125 µg/ml (ředěno dvojkovým ředěním). Meropenem byl testován v koncentracích 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 a 0,03125 µg/ml. Trimetoprim-sulfametaxazol byl testován v poměru 1:19 o celkové koncentraci 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 a 0,007813 µg/ml.

Testování bylo uskutečněno v mikrotitrační destičce (Tissue Culture Plates 96 wells-F, WVR), kam bylo pipetováno 90  $\mu$ l média a 10  $\mu$ l čerstvě narostlé bakteriální suspenze optimalizované na koncentraci  $5 \times 10^5$  KTJ/ml. Vzorky byly připravovány ve Flow-boxu (Class II Biological Safety Cabinet, ESCO) zajišťujícím sterilní prostředí. Kultivace takto připravených vzorků probíhala aerobně při 37 °C po dobu 18 hodin. Výsledky byly hodnoceny na základě intenzity zákalu v jednotlivých jamkách. Všechny stanovení byly provedeny ve třech opakováních.

Jako pozitivní kontrola bylo použité čisté médium bez antibiotik s přídavkem bakteriální suspenze. Jako negativní kontrola bylo testováno samotné médium bez přítomnosti bakteriálních buněk. Pro ověření správného provedení metody byla současně testována citlivost *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Pro inokulaci byla použita čerstvě narostlá bakteriální kultura *S. pneumoniae* ATCC 49619 o koncentraci inokula  $5 \times 10^5$  KTJ/ml. Po naočkování do mikrotitračních destiček probíhala kultivace za anaerobních podmínek po dobu 18 hod při 37 °C.

## 5 Výsledky

### 5.1 Mikrobiologický rozbor, izolace čistých kultur a následná identifikace pomocí MALDI-TOF MS

Celkově bylo testováno 51 vzorků potravin pocházejících z masných výrobků, mléka a mléčných výrobků, ryb a rybích výrobků a lahůdek, z nichž byly na ALOA agaru izolovány specifické i nespecifické kolonie presumptivních *Listeria monocytogenes*.

Charakteristické kolonie, tedy modrozelené s lecitinázovou aktivitou, byly zjištěny u 5 vzorků. Jednalo se o vzorky lahůdek: Bukovánek sýrový, holandský salát, hermelínový salát, hermelínový chlebiček a chlebiček s ála rostbífem. U dvou vzorků se lecitinázová aktivita projevila hned po uplynutí doby kultivace. Tyto kolonie pocházely ze vzorku holandského salátu a Bukovánku sýrového. U tří vzorků se lecitinázová aktivita projevila až po týdnu uchovávání v chladničce. Konkrétně u hermelínového salátu a u chlebičku ála rostbíf. U zbylých vzorků se žádná lecitinázová aktivita neobjevila. Mezi atypické izolované kolonie patřily kolonie drobné modrozelené bez lecitinázové aktivity, velké modrozelené bez lecitinázové aktivity, drobné bílé a také velké bílé s nazelenalým středem. Z těchto vzorků bylo získáno celkem 109 izolátů, typických i atypických kolonií. Všechny odebrané izoláty byly dále identifikovány pomocí MALDI-TOF MS (viz Tabulka č. 18).

Izolováno bylo 109 kmenů bakterií, z nichž bylo metodou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií identifikováno 76, 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. 18:** Výsledky mikrobiologického rozboru a identifikace pomocí MALDI-TOF MS.

Vzorek potravin	Morfologie kolonií*	Identifikovaný mikroorganismus MALDI-TOF MS	Celkem izolátů ve vzorku	Celkem izolátů ve skupině
<b>Masné výrobky</b>				
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 <sup>-</sup> , b	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	
Salám vysočina	a <sup>-</sup> , b	<i>Micrococcus luteus</i>	2	
Utopenec	a <sup>-</sup> , b	-	1	
Čabajka	a <sup>-</sup> , b	-	2	
Vesnická klobása nepálivá	a <sup>-</sup> , b	<i>Listeria innocua</i>	5	
		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		
Anglický rostbif	b	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	
		<i>Staphylococcus aureus/warneri</i>		
Tataráček	a <sup>-</sup> , b	<i>Listeria innocua</i>	3	
		<i>Listeria monocytogenes</i>		
Lahůdková paštika	a <sup>-</sup> , b	<i>Bacillus safensis</i>	2	
		<i>Staphylococcus carnosus</i>		
<b>Mléko a mléčné výrobky</b>				
Kozí sýr-stánkový prodej	a <sup>-</sup> , b	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	
		<i>Klebsiella oxytoca</i>		
Sýrové nitě-stánkový prodej	a <sup>-</sup>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	
100% Ovčia bryndza - nepasterizovaná	a <sup>-</sup> , b	<i>Enterococcus mundtii</i>	2	
Sýr Brie 60 %	a <sup>-</sup> , b	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	3	
Sýr tavený uzžený	-	-	0	
Niva	a <sup>-</sup>	<i>Listeria aquatica</i>	2	
Tavený sýr	b	<i>Staphylococcus hominis</i>	1	
Čerstvý sýr přírodní	a <sup>-</sup> , b	-	1	
Sýr Balkánského typu	-	-	0	
Hermelín	b	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	
Romadur	-	-	0	
Čerstvé kravské mléko	a <sup>-</sup> , b	<i>Enterococcus faecium</i>	3	
		<i>Listeria innocua</i>		
Bůvolí mléko vzorek č. 1-6	a <sup>-</sup> , b	<i>Oerskovia turbata</i>	14	
		<i>Micrococcus luteus</i>		
		<i>Enterococcus casseliflavus</i>		
		<i>Listeria newyorkensis</i>		
		<i>Listeria cornellensis</i>		

\* a<sup>+</sup>- typické zelenomodré kolonie s lecitinázovou aktivitou

a<sup>-</sup>- typické zelenomodré kolonie bez lecitinázové aktivity

b – atypické kolonie (bílá, bílá se zeleným středem, nažloutlá)



Tabulka č. 18: Pokračování

Vzorek potraviny	Morfologie kolonií*	Identifikovaný mikroorganismus MALDI-TOF MS	Celkem izolátů ve vzorku	Celkem izolátů ve skupině
<b>Ryby a rybí výrobky</b>				
Zavináč	-	-	0	0
Pstruh lososovitý, uzený – plátky - uzený studeným kouřem	-	-	0	
Rybí salát	-	-	0	
<b>Lahůdky</b>				
Salát Palivec	b	-	1	54
Bukovánek sýrový	a <sup>+</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	15	
		<i>Listeria ivanovii</i>		
Salát rybí s majonézou	-	-	0	
Salát holandský	a <sup>+</sup> , 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 <sup>-</sup>	<i>Listeria innocua</i>	4	
		<i>Listeria monocytogenes</i>		
Bramborový salát	-	-	0	
Hermelínový salát	a <sup>+</sup>	<i>Listeria innocua</i>	3	
		<i>Listeria monocytogenes</i>		
Pochoutkový salát	a <sup>-</sup>	<i>Bacillus circulans</i>	2	
Camping salát	b	-	2	
Chlebiček hermelínový	a <sup>+</sup>	<i>Listeria innocua</i>	2	
		<i>Listeria monocytogenes</i>		
Chlebiček s rostbífem	a <sup>+</sup>	<i>Listeria innocua</i>	2	
		<i>Listeria monocytogenes</i>		
Debrecínský chlebiček	-	-	0	
Kemping salát s majonézou	b	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	
Salámová pomazánka	b	-	2	
Papričky plněné sýrem v oleji	-	-	0	

\* a<sup>+</sup>- typické zelenomodré kolonie s lecitinázovou aktivitou

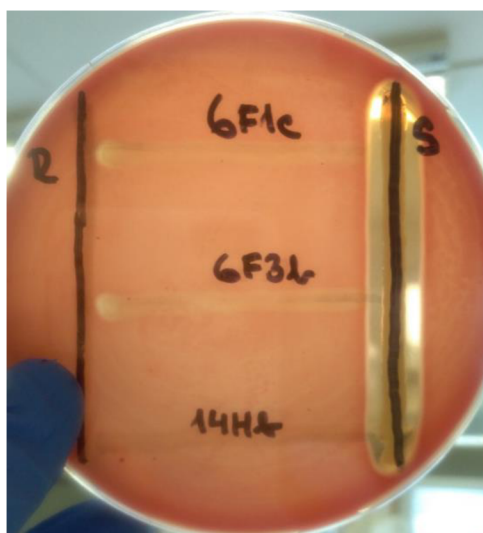
a<sup>-</sup>- typické zelenomodré kolonie bez lecitinázové aktivity

b – atypické kolonie (bílá, bílá se zeleným středem, nažloutlá)

Podle MALDI-TOF MS se *L. monocytogenes* vyskytovala v 7 vzorcích (Bukovánek sýrový, salát holandský, salát ála krab s jogurtem, hermelínový salát, hermelínový chlebiček, chlebiček s ála rostbífem a tataráček). Dalšímu testování byly podrobeny pouze vzorky, u kterých byly izoláty pozitivně určeny jako rod *Listeria*.

## 5.2 CAMP Test

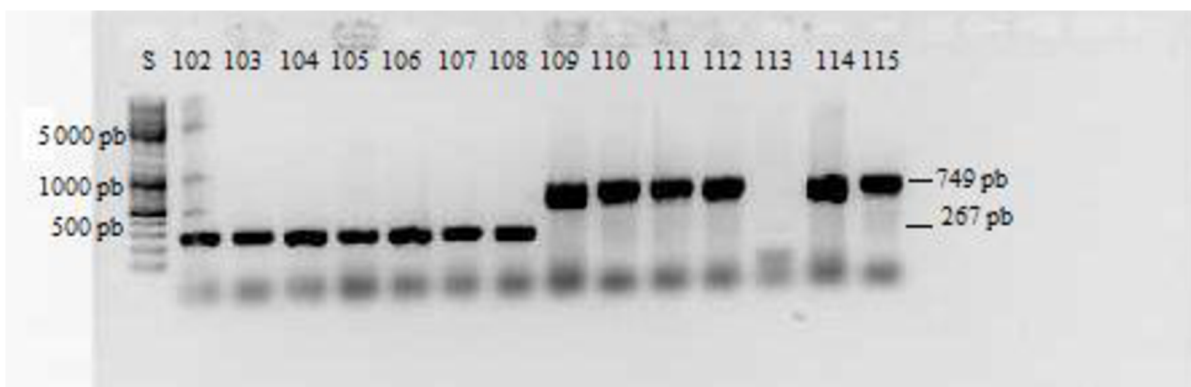
Ke konfirmaci typických kolonií presumptivních *L. monocytogenes*, narostlých na ALOA agaru a izolátů, které byly pomocí MALDI-TOF MS zařazeny do rodu *Listeria*, byl použit CAMP Test (celkem 37 kmenů). Jako *L. monocytogenes*, pomocí této metody, nebyl potvrzen žádný z izolátů. Jako *L. innocua* 4 izoláty. Jako *L. ivanovii* bylo určeno 13 izolátů. Na Obrázku č. 17 je ukázán příklad jednoho z výsledků identifikace. Výsledek ukazuje, že izoláty 6F1c a 6F3b odpovídají *L. ivanovii* a izolát 14Hb jako *L. innocua*.



Obrázek č. 17: Potvrzení vzorků 6F1c a 6F3b jako *L. ivanovii* a izolátu 14Hb jako *L. innocua*

## 5.3 Identifikace pomocí molekulárně biologických metod

Pomocí PCR a specificky druhových primerů bylo testováno 21 izolátů, pocházejících z 10 vzorků. Třináct izolátů bylo identifikováno jako *L. monocytogenes* viz Obrázek č. 18. Izoláty pocházely ze dvou lahůdkových salátů (konkrétně Bukovánek sýrový a holandský salát). Druhová příslušnost k *L. innocua* byla zjištěna u sedmi izolátů, které opět pocházely z lahůdkového zboží (salát holandský, salát ála krab s jogurtem, hermelínový salát, hermelínový chlebíček, chlebíček s ála rostbífem, vesnická klobása nepálivá a tataráček).

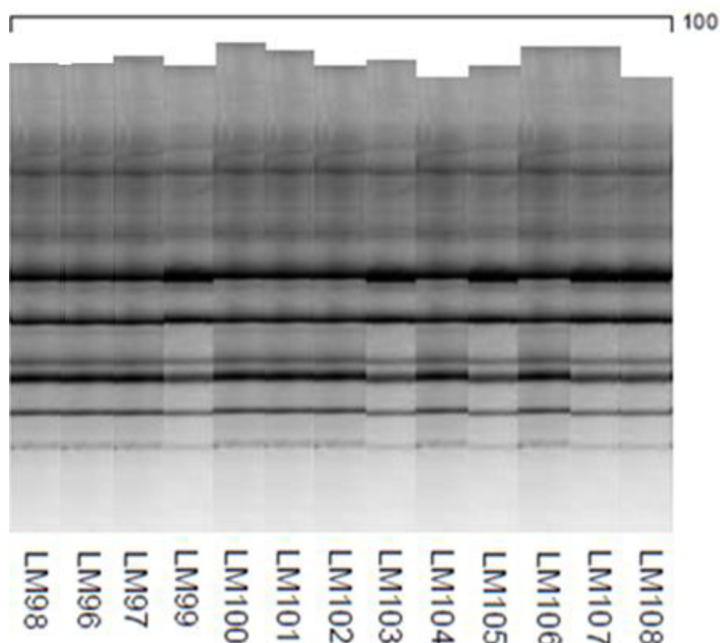


**Obrázek č. 18:** Vizualizace PCR produktů vzorků při použití druhově specifických primerů pro *L. monocytogenes* (produkt o velikosti 267 bp, 102-108) a pro *L. innocua* (produkt o velikosti 749 bp, 109-115), standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.

U dvou izolátů pocházejících ze dvou vzorků (Niva a buvolího mléka) nebylo možné určit druh, proto byla použita metoda sekvenace genu pro 16S rRNA. Bylo potvrzeno, že se jedná o *L. aquatica*. V souhrnné tabulce č. 21 na konci kapitoly 5.7 jsou uvedené i výsledky sekvenace *L. innocua* a *L. monocytogenes*. Výsledky obou metod se shodovaly.

#### 5.4 Rozdělení jednotlivých izolátů *L. monocytogenes* pomocí REP-PCR

Pro určení, zda jsou izoláty, potvrzené jako *L. monocytogenes* genomicky shodné, byla použita metoda REP-PCR. Fingerprinty jednotlivých izolátů byly totožné. Výsledky fingerprintingu z programu Bionumerics jsou ukázány na Obrázku č. 19.

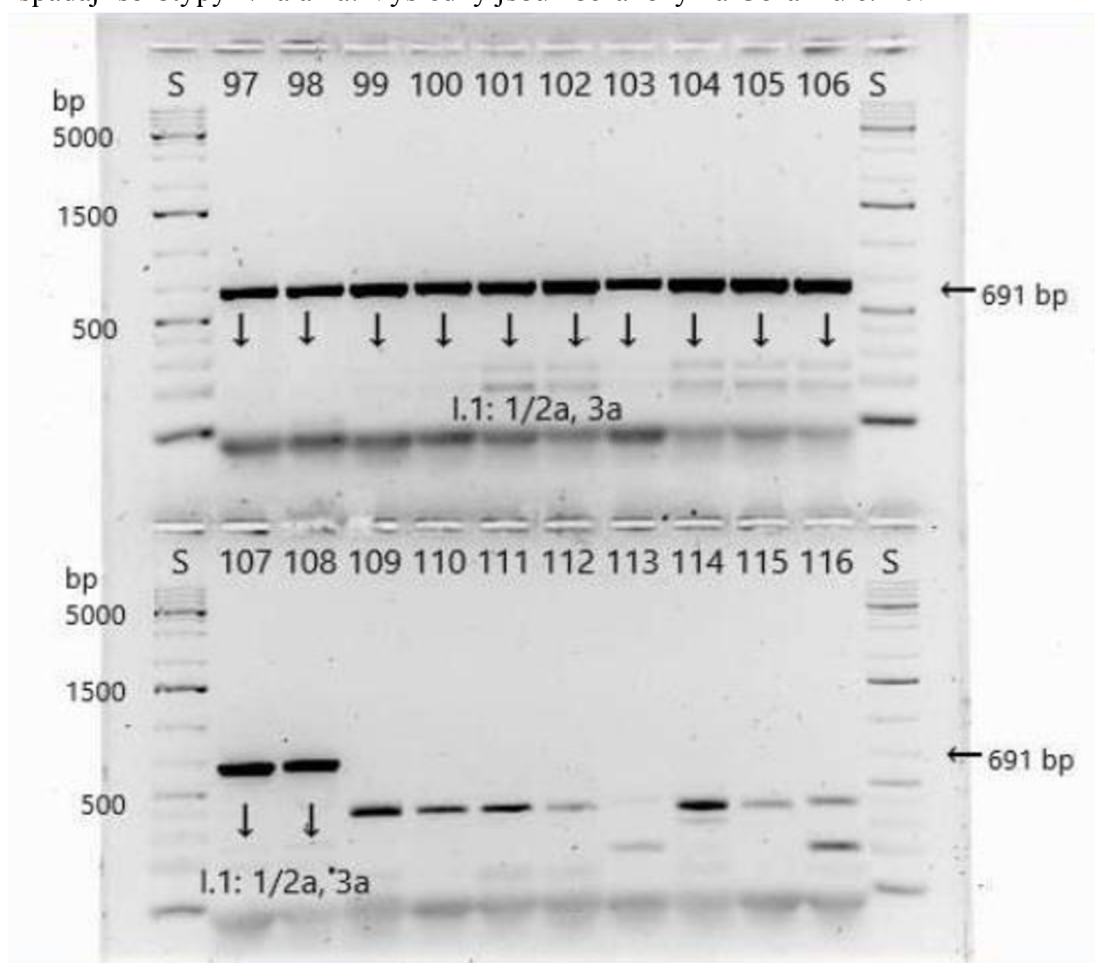


**Obrázek č. 19:** Dendrogram finemrintových profilů *L. monocytogenes*.

Izoláty LM96-LM108 pocházely z Bukovánku sýrového a holandského salátu. Oba saláty byly zakoupeny ve stejné prodejně a pocházely od stejného výrobce.

## 5.5 Sérotypizace

Na základě multiplex PCR byla zjištěna příslušnost všech izolátů k I. fylogenetické linii, kam spadají sérotypy 1/2a a 3a. Výsledky jsou zobrazeny na Obrázku č. 20.



**Obrázek č. 20:** Elektroforeogram produktů PCR s použitím primerů specifických pro: Fylogenetickou skupinu I.1 (sérotypy: 1/2a, 3a; velikost PCR produktů: 691 bp, vzorky: 97,99-108), skupinu I.2 (sérotypy 1/2c, 3c; velikost PCR produktů: 906 pb), skupinu II.1 (4b, 4d, 4e; velikost pcr produktů: 597 bp), skupinu II.2 (1/2b, 3b; velikost PCR produktů: 471 bp); Standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, bp – pár bází.

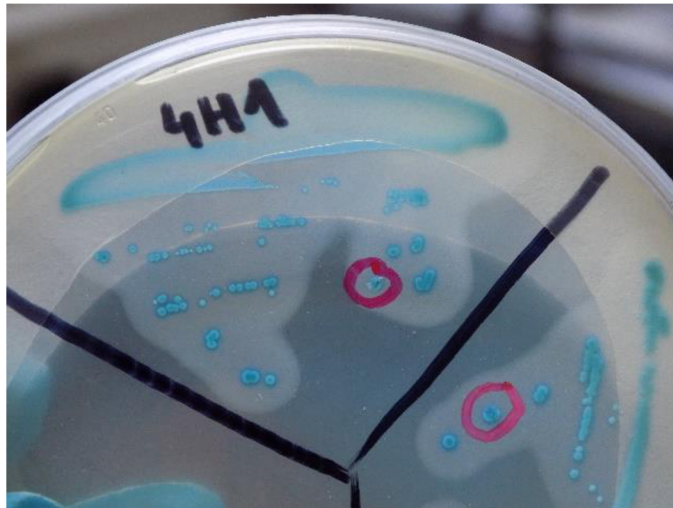
Na základě sklíčkové aglutinace byly tyto výsledky blíže specifikovány. Bylo zjištěno, že se u všech izolátů jedná o sérotyp 1/2a. Příklad vzniklé aglutinace je na Obrázku č. 21.



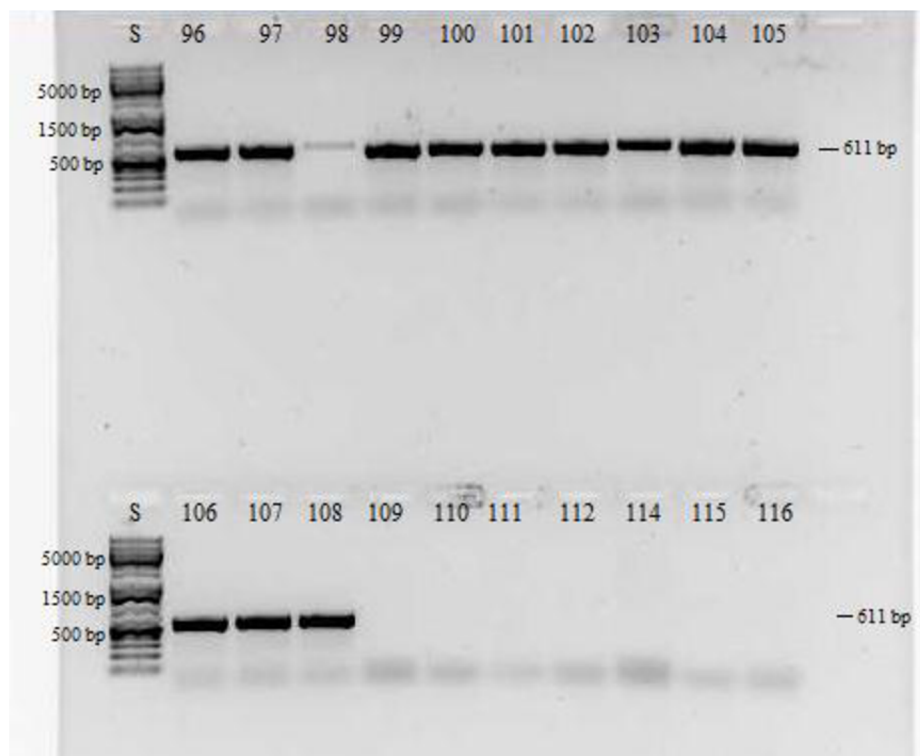
**Obrázek č. 21:** Sklíčková aglutinace – kapka vlevo bez aglutinace, kapka vpravo aglutinace (potvrzení sérotypu).

## 5.6 Patogenní potenciál

Lecitinázová aktivita byla hlavním rozpoznávacím znakem při selektivním stanovení. Byla detekována u všech izolátů potvrzených jako *L. monocytogenes* (13). Tyto izoláty pocházely opět ze vzorku lahůdkových salátů: Bukovánek sýrový a holandský salát. Příklad vzorku vykazující lecitínázovou aktivitu je na Obrázku č. 22. Hemolytická aktivita byla testována v rámci CAMP testu (viz kapitola 5.2). Všechny kmeny *L. monocytogenes* byly hemolytické a rovněž byla u všech potvrzena přítomnost genu pro internalin B viz Obrázek č. 23.



**Obrázek č. 22:** Typické kolonie *L. monocytogenes* na OCLA agaru. Kolonie jsou obklopené mléčně zbarvenou zónou precipitace, značící lecitínázovou aktivitu.



**Obrázek č. 23:** Vizualizace PCR produktů při použití primerů specifických pro gen internalinu B (produkt o velikosti 611 bp); standard: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.

## 5.7 Citlivost vůči antibiotikům

Oba testované izoláty *Listeria monocytogenes* (2) vykazovaly citlivost vůči všem testovaným antibiotikům, ve všech opakováních (3) (viz Tabulka č. 19).

Hodnoty MIC splňovala dle EUCAST (2022) (Tabulka č. 20) antibiotika penicilin G, ampicilin, erytromycin a meropenem. Minimální inhibiční koncentrace trimetoprim-sulfametaxazolu byly vyšší než hodnoty požadované EUCAST (2022). Oba testované kmeny vykazovaly zvýšenou rezistenci. U některých antibiotik byly hodnoty MIC zcela shodné (ampicilin, erytromycin), a to u obou kmenů a u všech opakování. U penicilinu G byla pozorována dvakrát vyšší MIC u kmene 103, než u kmene 97, a to u všech opakování. Pro meropenem a trimetoprim-sulfametaxazol byla pozorována odchylka MIC mezi jednotlivými opakováními.

**Tabulka č. 19** - Výsledky testování ATB rezistence. Každý kmen byl testován ve třech opakováních.

Vzorek	Penicilin G MIC (mg/l)	Ampicilin MIC (mg/m)	Erytromycin MIC (mg/l)	Meropenem MIC (mg/l)	Trimetoprim- sulfametaxazol MIC (mg/l)
97a	0,25	0,5	0,5	0,0625	0,5
97b	0,25	0,5	0,5	0,0625	0,5
97c	0,25	0,5	0,5	0,0625	0,25
103a	0,5	0,5	0,5	0,0625	0,5
103b	0,5	0,5	0,5	0,125	0,5
103c	0,5	0,5	0,5	0,125	0,5

MIC – minimální inhibiční koncentrace

a–c: 1.-3. opakování

**Tabulka č. 20:** Hodnoty koncentrace antibiotik uváděné EUCAST (2022).

Antibiotikum	Koncentrace (mg/l)
Benzylpenicilin (Penicilin G)	$\leq 1$
Ampicilin	$\leq 1$
Meropenem	$\leq 0,25$
Erytromycin	$\leq 1$
Trimetoprim-sulfametaxazol	$\leq 0,06$

Souhrnný přehled výsledků jednotlivých metod je uveden v Tabulce č. 21 a č. 22.

Tabulka č. 21: Souhrnný přehled výsledků 1a.

Vzorek potraviny	Počet izolátů	CAMP Test	PCR s druhově specifickými primery	16S rDNA	Shoda se sekvencí typového kmene (%)	Sérotypizace			Inernalin B
						O antigeny	H antigeny	Sérotyp	
<b>Lahůdky</b>									
Bukovánek sýrový	7	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	99,84	I.:1/2a, 3a	AB	1/2a	+
					99,85				
					99,84				
					99,84				
					99,84				
					99,79				
Salát holandský	6	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	99,85	I.:1/2a, 3a	AB	1/2a	+
					99,84				
					99,84				
					NI				
					NI				
NI									
Salát ála KRAB s jogurtem	1	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	100				
Hermelínový salát	1	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>						
Chlebiček hermelínový	1	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>						
Chlebiček s rostbífem	1	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	99,87				
<b>Maso a masné výrobky</b>									
Tataráček	1	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	NI	NI				
<b>Mléko a mléčné výrobky</b>									
<b>Výsledky sekvenování 16S rDNA</b>									
Níva	1	<i>L. aquatica</i>			100				
Buvolí mléko	1	<i>L. aquatica</i>			100				

NI – neidentifikováno

Tabulka č. 22 – Souhrnný přehled výsledků 1b.

Vzorek	Původ	Lecitináza	MALDI	Hodnota skóre	PCR	Sekvenace	SSTK (%)
LM96	Bukovaneč sýrový	+	<i>L. monocytogenes</i>	2,23/2,27	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	99,84
LM97	Bukovaneč sýrový	+	<i>L. monocytogenes</i>	2,28/2,24	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	99,85
LM98	Bukovaneč sýrový	+	<i>L. monocytogenes</i>	2,28/2,25	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	99,84
LM99	Bukovaneč sýrový	+	NI	NI	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	99,84
LM100	Bukovaneč sýrový	+	<i>L. monocytogenes</i>	2,19/2,25	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	99,84
LM101	Bukovaneč sýrový	+	<i>L. monocytogenes</i>	2,19/2,26	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	99,84
LM102	Bukovaneč sýrový	+	<i>L. monocytogenes</i>	2,19/2,27	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	99,79
LM103	Salát holandský	+	<i>L. ivanovii/innocua</i>	1,88/1,89	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	99,84
LM104	Salát holandský	+	<i>L. monocytogenes</i>	2,24/2,25	<i>L. monocytogenes</i>	NI	NI
LM105	Salát holandský	+	<i>L. monocytogenes</i>	1,68/1,77	<i>L. monocytogenes</i>	NI	NI
LM106	Salát holandský	+	<i>L. monocytogenes</i>	1,77	<i>L. monocytogenes</i>	NI	NI
LM107	Salát holandský	+	<i>L. monocytogenes</i>	1,77	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	99,85
LM108	Salát holandský	+	NI	NI	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	99,84
LM109	Salát ála KRAB s jogurtem	-	<i>L. innocua</i>	2,30/2,23	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	100
LM110	Hermelínový salát	-*	<i>L. innocua</i>	2,39/2,24	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	100
LM111	Chlebiček hermelínový	-*	<i>L. innocua/monocytogenes</i>	2,26/2,22	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	100
LM112	Chlebiček s ála roastbeefem	-*	<i>L. innocua/monocytogenes</i>	2,33/2,22	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	99,87
LM113	Niva	-	<i>L. aquatica</i>	1,94/1,84	NB	<i>L. aquatica</i>	100
LM114	Vesnická klobása nepálivá	-	<i>L. innocua</i>	2,14/2,08	<i>L. innocua</i>	NI	NI
LM115	Tataráček	-	<i>L. innocua</i>	2,20/2,05	<i>L. innocua</i>	NI	NI
LM116	Bůvolí mléko	-	<i>L. newyorkensis/cornellensis</i>	1,82/1,81	NB	<i>L. aquatica</i>	100

SSTK – Shoda se sekvencí typového kmene

-\* lecitinázová aktivita se objevila po týdnu v chladničce

NB – nevznikl žádný band při amplifikaci s druhově specifickými primery

NI – neidentifikováno



## 6 Diskuze

*Listeria monocytogenes* patří mezi grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterie ve tvaru pravidelných tyčinek. Řadí se do rodu *Listeria* a je blízce příbuzná druhům *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* a *L. grayi*. Za patogenní je z těchto druhů považována pro člověka pouze *L. monocytogenes* (Blažková et al., 2018).

Bakterie *L. monocytogenes* způsobuje onemocnění zvané listerióza. Přestože toto alimentární onemocnění není tak časté, je velmi závažné. Toto onemocnění nejčastěji postihuje těhotné ženy, kojence a starší osoby. Rizikovými skupinami jsou však i novorozenci a imunokompromitovaní jedinci. Objevit se ale může i u osob, které nemají žádné predisponující faktory či onemocnění. Na rozdíl od infekcí jinými běžnými alimentárními patogeny jako je *Salmonella*, která má zřídka za následek úmrtí, je u listeriózy mortalita kolem 30 %. Proto je nutné výskyt této bakterie v potravinách důkladně monitorovat (Ryser et al., 2007; Zhu et al., 2017).

Díky svým fyziologickým vlastnostem jsou tyto bakterie odolné vůči extrémním podmínkám. Jsou schopné zpomaleného růstu při chladírenských teplotách, tolerují široký rozsah hodnot pH a salinitu kolem 10 %. Schopnost tvorby biofilmu jim umožňuje přetrvávat nebo rekontaminovat potraviny, čímž představují významné riziko pro bezpečnost konzumentů. Mezi potraviny, které bývají často kontaminovány se řadí produkty jak živočišného, tak rostlinného původu. Příkladem mohou být masné produkty, sýry a mléčné produkty, ryby a rybí produkty, ale také zelenina, ovoce a obecně potraviny určené k přímé spotřebě (Blažková et al., 2005; Borucki et al., 2003; Brychta et al., 2018; Kramarenko et al., 2013; Lous et al., 2011; McMullen & Freitag, 2014).

Prvním cílem této práce byl monitoring výskytu bakterie *L. monocytogenes* u rizikových skupin potravin dostupných na našem trhu a její charakterizace. Celkem bylo testováno 51 vzorků (odebráno 109 izolátů), z nichž u pěti se vyskytly typické kolonie (tj. 9,8 %). Potvrzena pak byla kontaminace u 2 vzorků (3,92 %). Navratilova et al. (2004) na základě svých analýz uvádí, že prevalence výskytu *L. monocytogenes* v mléce a mléčných výrobcích je 2,6 % (16 z 619 vzorků). V této práci nebyl v kategorii mléčných výrobků zjištěn žádný produkt kontaminovaný *L. monocytogenes*. V dalších studiích se prevalence výskytu *L. monocytogenes* v mléce a mléčných výrobcích pohybuje od 0 do 5 % (například Rakousko 1,5 %; Španělsko 3,6 %; Indie 1,7 %; USA 4,1 % a Kanada 1,9 %). V mase a masných výrobcích byla zjištěna prevalence 6,5 % (25 z 385). V porovnání s dalšími studiemi se prevalence v masných výrobcích velice liší, někteří autoři uvádějí do 10 % jiní až kolem 30 % (Navratilova et al., 2004). V rybách a rybích produktech se dle studie Basha et al. (2019) *L. monocytogenes* vyskytovala ve 2,6 % testovaných vzorků (6 z 227). Další studie uvádějí výskyt v rybách a rybích výrobcích od 4 do 12 % (Basha et al. 2019). V porovnání s výsledky výše uvedených studií, naše výsledky nepotvrdily kontaminaci *L. monocytogenes* v masných výrobcích ani rybách a rybích produktech. Co se týče lahůdkového zboží, tak Uyttendaele et al. (2009) uvádí výskyt v 6,7 % jimi testovaných vzorků (80 z 1187). Další studie uvádí prevalenci od 3 do 21 % (Uyttendaele et al., 2009). Ke kontaminaci těchto potravin mohlo dojít z důvodu nedodržování správných hygienických postupů ve výrobě nebo až na prodejně například při dávkování do menších spotřebitelských obalů na základě specifických požadavků zákazníka. V porovnání

s výše uvedenými studii byla prevalence výskytu *L. monocytogenes* v potravinách na českém trhu ještě relativně nízká.

CAMP test je jedním z prvních kroků ke confirmaci *L. monocytogenes* a diferenciaci druhů *L. ivanovii* a *L. innocua*. V této práci bylo CAMP testem chybně určeno 13 izolátů (35,14 %). Tyto izoláty byly na základě CAMP testu vyhodnoceny jako *L. ivanovii*, molekulárně genetickými metodami byly ale identifikovány jako *L. monocytogenes*. Nakazava & Nemoto (1980) uvádějí, že v rámci jejich studie 25 z 25 testovaných kmenů *L. monocytogenes* vykazovalo pozitivní reakci s *R. equi*, tudíž by mohly být vyhodnoceny, stejně jako v našem případě, jako *L. ivanovii*. Podle Mckellar (1994) mohou vyjít falešně pozitivní výsledky (pozitivní reakce jak se *S. aureus* tak s *R. equi*), ale i falešně negativní výsledky (tj. virulentní *L. monocytogenes* nereagující se *S. aureus* ani *R. equi*). Falešně negativní i falešně pozitivní výsledky mohou rovněž vycházet z chybného čtení na agarových plotnách. CAMP test je nezbytný, ale jako samostatná metoda identifikace nedostatečný. Pro identifikaci virulentní *L. monocytogenes* je tedy potřeba dalších metod. V normě se jako další confirmace vyžaduje testování schopnosti růstu na různých substrátech. Konfirmační testy, které se opírají o kultivaci jsou obecně zdlouhavé a zejména v případě potravin s krátkou dobou trvanlivosti je zapotřebí rychlejších a spolehlivějších metod.

MALDI-TOF MS identifikovala 21 izolátů jako zástupce rodu *Listeria* (pocházející z 11 vzorků různých potravin). Molekulárně genetickými metodami bylo potvrzeno, že se ve všech případech jednalo o rod *Listeria*, avšak identifikace na úroveň druhu zcela spolehlivá nebyla. Druh byl správně určen u 11 izolátů, tedy u 52,38 %. Tato metoda je tedy vhodná pro identifikaci listérií na úroveň rodu (*Listeria*), není ale schopna rozlišit jednotlivé druhy. Tyto výsledky se shodují s Li et al. (2022), kteří uvádějí, že pomocí MALDI-TOF nelze jednotlivé druhy rodu *Listeria* spolehlivě odlišit. To může být dáno vysokou genetickou podobností mezi některými druhy (Czajka et al., 1993). Kromě toho, přesnost identifikace hmotnostních spekter závisí na kvalitě použité databáze. Neúplné informace v databázi kmenů omezí přesnost identifikace (Li et al., 2022; Ying, 2022). Druhově specifická PCR s vhodně navrženými primery byla shledána jako dostačující a spolehlivá metoda pro identifikaci listérií. Je levnější a rychlejší alternativou k sekvenaci 16S rDNA.

Kromě *L. monocytogenes* byly nalezeny druhy *L. innocua* a *L. aquatica*. Izoláty pocházely z Jihočeské Nivy a buvolího mléka, což je zvláštní. *L. aquatica* patří mezi nepatogenní environmentální druh, který se vyskytuje ve vodě. Odtud si nese i svůj název (aqua=ang. voda) (Orsi & Wiedmann, 2016 a Bakker et al. (2014). V potravinách výskyt této bakterie není obvyklý. Je možné, že se do vzorků dostala při styku potravin s vodou či se zařízením, které bylo kontaminované vodou omyto. Jelikož byla ve vzorcích mléka a mléčných výrobků, je také možné, že se do vzorků dostala z výkalů nebo z vemene.

K charakterizaci izolátů, které byly určeny jako *L. monocytogenes* byla jako první provedena sérotypizace metodou PCR s primery podle Doumith et al. (2004). Pomocí této metody není možné od sebe odlišit jednotlivé sérovary. Lze je však spolehlivě rozdělit do čtyř fylogenetických skupin a zařadit je do příslušných linií. Výhodou této metody je, že není náročná, je rychlá a levná. Analyzováno bylo 13 izolátů (LM96-108, pocházejících ze dvou vzorků potravin Bukovánek sýrový a Salát holandský). Všechny vykazovaly příslušnost k I. fylogenetické linii, kam spadají sérotypy 1/2a a 3a. Vzhledem k tomu, že se v potravinách sérovar 3a vyskytuje velmi vzácně a sérovar 1/2a je naopak velmi běžný, předpokládali jsme,

že se u těchto identifikovaných kmenů jednalo o sérovar 1/2a. To bylo potvrzeno metodou sklíčkové aglutinace, všechny izoláty patřily do sérovaru 1/2a.

Sérovar 1/2a je nejvíce zastoupeným sérovarem v potravinách, přestože nejčastěji spojovaný s onemocněním listeriózou je sérovar 4b (Gorski et al., 2006). Frekvenci výskytu sérovaru 1/2a potvrzuje i Pontello et al. (2012), kteří testovali klinické vzorky osob nakažených listeriózou v různých věkových kategoriích a zkoumali prevalenci jednotlivých sérotypů. Zjištěna byla nejvyšší prevalence sérotypu 1/2a (46,6 %), dále pak sérotypů 4b (30,7 %) a 1/2b (14,7 %). Sérotyp 1/2a nejvíce zastoupený u všech věkových skupin. Sérovar 4b je spojován s meningitidou, zatímco 1/2a s infekcí krevního řečiště (Pontello et al. 2012). Typickými příznaky onemocnění sérotypem 1/2a jsou horečka a průjem, ale mnoho případů vykazuje příznaky podobné chřipce bez známky jakýchkoliv gastrointestinálních potíží. Vyskytují se symptomy jako bolest hlavy, svalů nebo kloubů (Sim et al.; 2002). Jeršek et al. (1996) uvádí, že více než 90 % případů listeriózy je způsobeno právě sérovary 1/2a, 1/2b a 4b. Sérotypizace ale nemá dostatečnou diskriminační schopnost pro spolehlivé odlišení jednotlivých kmenů. Proto je třeba jiných technik, které dokáží najít odlišnosti mezi jednotlivými izoláty.

REP-PCR představuje snadno proveditelnou metodu, která je založena na primerech komplementárních k určitým repetitivním sekvencím rozptýleným v bakteriálních genomech. Často se používá v bakteriální taxonomii a pro identifikaci různých skupin bakterií, například laktobacilů, stafylokoků, mykobakterií nebo streptomycét (Švec et al., 2005). Naopak u široce rozšířených druhů, jako je *E. coli* byla tato metoda testována jako citlivý nástroj pro diferenciaci jednotlivých kmenů. Metoda byla použita pro zjištění genomických odchylek u izolátů z různých prostředí. Fingerpriny jednotlivých izolátů se hodně liší a touto metodou by mohl být snadno nalezen zdroj infekce (Mohapatra & Mazumder, 2008). U bakterií rodu *Listeria* tuto metodu aplikovali Jeršek et al. (1996). Pro amplifikaci zvolili sety primerů REP 1R-I a REP 2-1, a ERIC 1R, ERIC 2. Na základě fingerprintů byla zjištěna grupovací tendence, která odpovídala jednotlivým sérotypům, zejména pro set primerů REP 1R-I a REP 2-1. Nucera et al. (2013) uvádí, že důvodem, proč REP-PCR představuje účinnou a rychlou subtypizační metodu pro *L. monocytogenes* je, že vykazuje 95,5% senzitivitu, 75% specificitu, 95% opakovatelnost, 91,2% prediktivní pozitivní hodnotu a 85,7% prediktivní negativní hodnotu.

V našem případě bylo metodou REP-PCR zjištěno, že jsou všechny testované izoláty genomicky shodné. Mohlo to být tím, že pocházely ze stejného zdroje. Po sérotypizaci je hlavním nástrojem pro diferenciaci kmenů pulzní gelová elektroforéza, pomocí níž se ustanovuje tzv. pulzotyp. REP-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub> by mohla být dalším nástrojem pro detailní charakterizaci jednotlivých kmenů. Metodu je ale třeba důkladněji otestovat na větším množství izolátů, reprezentujících různé sérotypy a různé, spolu nesouvisející zdroje.

Pro určení patogenního potenciálu listérií byly použity metody zjišťování lecitinázové, hemolytické aktivity a detekce přítomnosti internalinu B. Lecitinázová aktivita vyjadřuje aktivitu fosfolipázy C, která listériím umožňuje šířit se v hostitelských tkáních (Camilli et al.; 1991). Pro průkaz lecitinázové aktivity je do média přidáván sojový lecitin, který je hydrolyzován a umožňuje odlišit patogenní listérie od nepatogenních. U patogenních druhů se kolem kolonií vytvoří neprůhledný halo efekt (tzv. zóna precipitace). Tato vlastnost byla popsána u druhů *L. monocytogenes* a *L. ivanovii* (Willis et al., 2006). V této práci se objevily kolonie se zónou precipitace u 5 vzorků. Ve dvou případech se jednalo o *L. monocytogenes*. U dalších tří vzorků (hermelínový chlebiček, hermelínový salát, chlebiček s ala rostbífem) se

lecitinázová aktivita objevila až po týdnu uchovávání v chladničce. Jednalo se o kmeny *L. innocua*. Literatura uvádí, že *L. innocua* při testování nevykazuje lecitinázovou aktivitu a nepodařilo se ani dohledat žádné výjimky. Avšak Abay et al. (2019) uvádí, že přestože je *L. innocua* stále považována za nepatogenní, existují případy nákazy touto bakterií, jak u lidí, tak i u zvířat. Perrin et al. (2003) dokonce uvádí případ úmrtí, způsobené bakterií *L. innocua*. Přestože tedy doposud nebyla popsána lecitinázová aktivita u *L. innocua* neznamená to, že by ji nemohly tyto bakterie vykazovat, pokud se bude jednat o patogenní nebo atypické kmeny.

Hemolytickou aktivitu vykazovaly všechny izoláty, které vykazovaly i lecitinázovou aktivitu a byly potvrzeny jako *L. monocytogenes*. Nicméně projevy hemolytické aktivity byly na krevním agaru slabě viditelné, což mohlo být způsobené nižší mírou virulence nebo snížené exprese. Leimeister-Wachter et al. (1992) uvádí, že exprese u virulentních genů *L. monocytogenes* je silně ovlivněná prostředím, ve kterém se bakterie nachází. Autoři také popisují, že projev patogenních faktorů je závislý na teplotě růstu. Ke slabému projevu hemolytické aktivity tedy mohlo dojít i z důvodu nepříznivé teploty k růstu pro daný kmen.

Pro přesnější stanovení patogenního potenciálu listérií byla testována přítomnost internalinu B. Pro *L. monocytogenes* je internalin B nezbytný pro adhezi a zprostředkování průniku do lidských endoteliálních buněk. V případě, že nedojde k expresi genu pro internalin B anebo ho bakterie postrádá, nedojde k průniku do hostitelské buňky (Parida et al., 1998). Testování proběhlo podle Liu et al. (2003) za použití druhově specifických primerů lmo2821-F a lmo2821-R. Všechny testované izoláty (13) vykazovaly pozitivní reakci na přítomnost internalinu B.

Rozvoj patogenních bakterií rezistentních na antibiotika je závažný celosvětový problém (WHO, 2021). Poslední fází této práce bylo testování citlivosti izolovaných kmenů *L. monocytogenes* vůči antibiotikům, která uvádí EUCAST (Breakpoint Tables, 2022), a která jsou používána v klinické praxi. Jedná se antibiotika ampicilin, penicilin G, erytromycin, meropenem nebo trimetoprim-sulfometaxazol. Baquero et al. (2020) uvádí, že rezistence listérií na jednotlivá antibiotika se vyskytuje zatím velmi vzácně. Například ve své studii uvádí, že rezistence na ampicilin je u *L. monocytogenes* extrémně vzácná a že pravděpodobně zahrnuje méně než 0,1 % izolátů. Rezistence na erytromycin se vyskytuje také velmi vzácně (méně než 3 %). Avšak Duval et al. (2018) popisuje mechanismus bakteriální antibiotické rezistence, který je založený na štěpení a recyklaci ribozomů, zajišťující účinnou translaci v přítomnosti erytromycinu. To znamená, že u *L. monocytogenes* byla nedávno pozorována vnitřní indukovatelná rezistence na erytromycin. Sice úroveň rezistence neumožňuje bakteriím růst v přítomnosti vysokých dávek antibiotik, může však hrát roli v přežití *L. monocytogenes* při nízkých koncentracích (Baquero et al. 2020).

Všechna námi testovaná antibiotika byla účinná v koncentracích odpovídajících EUCAST až na trimetoprim-sulfometaxazol, kde byla zjištěna zvýšená rezistence. V některých případech se hodnoty MIC mírně lišily, a to jak mezi vzorky, tak u jednotlivých opakování. Rozdíly zaznamenané v rámci jednotlivých opakování téhož kmene naznačují chybu způsobenou při ředění antimikrobiální látky nebo inokula. Buňky *L. monocytogenes* mohou vytvářet agregáty, čemuž napomáhá ActA protein (Travier et al., 2013). Je tedy možné, že v inokulu bylo nerovnoměrné rozložení buněk v důsledku agregace, a to i přes důkladnou homogenizaci vortexem. Rozdílný počet inokulovaných buněk může být příčinou odchylek v MIC. Skutečnost, že některé MIC se lišily mezi testovanými kmeny, zatímco ve všech

opakováních vyšly shodně, by mohlo znamenat, že jsou kmeny odlišné. Vysvětlením by mohla být také rozdílná reakce na antibiotika na úrovni jednotlivých buněk. Toto potvrzují ve své studii i Taniguchi et al. (2010), kteří uvádí, že geneticky identické buňky mohou ve stejném prostředí vykazovat rozdíly v expresi genů, což může způsobit fenotypové variace.

Ve studii Yan et al. (2019) byla zjištěna rezistence na erytromycin, u 2,2 % (63 z 2862) testovaných kmenů *L. monocytogenes* a stejně jako v našem případě, na trimetoprim-sulfometaxazol (0,98 %). Monitoring a testování účinnosti antibiotik prokazuje, že v průběhu času se bakterie, viry, plísňe a paraziti mění a již nereagují na léky, což výrazně ztěžuje léčbu infekcí. V důsledku lékové rezistence se antibiotika a další antimikrobiální léky stávají neúčinnými a infekce se stávají stále obtížnějšími léčit (WHO, 2021).

Všechny testované izoláty, získané z lahůdkového zboží (Bukovánek sýrový, holandský salát), potvrzené jako *L. monocytogenes* měly shodný sérotyp, fingerprinty a shodný patogenní potenciál. Při testování míry rezistence na antibiotika izoláty z obou vzorků vykazovaly hodnoty splňující požadavky EUCAST až na jedno testované antibiotikum (trimetoprim-sulfametaxazol). Zjištěné hodnoty MIC se lehce lišily jak v rámci jednotlivých opakování, tak mezi kmeny. Výsledek CAMP testu, který určil všechny izoláty pocházející z těchto vzorků chybně, by mohl poukazovat na možnost jedinečnosti tohoto konkrétního organismu, který může být v projevu hemolytické aktivity atypický. Přestože byly zaznamenány mírné odlišnosti, tak na základě těchto výsledků bychom mohli dojít k závěru, že se jedná o shodný kmen. Podstatným faktorem potvrzující toto tvrzení je fakt, že oba vzorky pocházely od stejného výrobce a byly zakoupeny ve stejné prodejně.

## 7 Závěr

- Bylo zjištěno, že CAMP test není zcela spolehlivou a dostatečnou metodou odlišení druhů *L. monocytogenes* a *L. ivanovii*. Touto metodou bylo chybně určeno 13 izolátů (35,14 %).
- Bylo potvrzeno, že metoda MALDI-TOF MS je spolehlivou metodou pro identifikaci izolátů na úroveň rodu, není ale schopna rozlišit jednotlivé druhy.
- Identifikace pomocí PCR s druhově specifickými primery byla vyhodnocena nejen jako spolehlivá, ale také jako levnější a rychlejší než biochemické testy a sekvenace 16S rDNA.
- Celkově byl rod *Listeria* detekován v 11 z 51 vzorků potravin (21,57 %). *L. monocytogenes* byla potvrzena ve 2 vzorcích (3,92 %; Bukovánek sýrový, salát holandský), *L. innocua* v 6 vzorcích (11,76 %; salát ala krab, hermelínový salát, hermelínový chlebíček, chlebíček s ala rostbífem, vesnická klobása a tataráček) a *L. aquatica* ve 2 vzorcích potravin (3,92 %; niva a buvolí mléko).
- Všechny izoláty *L. monocytogenes* detekované ve vzorcích náležely sérotypu 1/2a a vykazovaly shodné vlastnosti. Pravděpodobně se jedná o klony.
- Byla potvrzena funkčnost antibiotik ampicilinu, erytromycinu, meropenemu a penicilinu, v rámci hodnot stanovených EUCAST. Zjištěné hodnoty MIC se lehce lišily jak v rámci jednotlivých opakování, tak mezi kmeny. Avšak tyto rozdíly nevyvracejí možnost identity testovaných kmenů. Zaznamenána byla u obou kmenů zvýšená rezistence na trimetoprim-sulfometaxazol. Pro potvrzení antibiotické rezistence u tohoto antibiotika je potřeba dalšího zkoumání.

## 8 Literatura

- ABAY, S., L. Ç. BAYRAM, F. AYDIN, H. K. MÜŞTAK, K. S. DIKER a İ. EROL, 2019. *Pathogenicity, genotyping and antibacterial susceptibility of the Listeria spp. recovered from stray dogs*. **126**, 123-133. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2018.10.037.
- ALLERBERGER, F a M WAGNER, 2009. *Listeriosis: a resurgent foodborne infection*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, **16**, 16-23. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x.
- BAKKER, H. C., S. WARCHOCKI, E. M. WRIGHT, et al., 2014. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **64**(6), 1882-1889. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.052720-0.
- BASHA, K. A., N. R. KUMAR, V. DAS, K. RESHMI, B. M. RAO, K. V. LALITHA a T. C. JOSEPH, 2019. *Prevalence, molecular characterization, genetic heterogeneity and antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes associated with fish and fishery environment in Kerala, India*. *Letters in Applied Microbiology*. **69**(4), 286-293. Dostupné z: doi:10.1111/lam.13205.
- BAQUERO, F., V. F. LANZA, M. DUVAL a T. M. COQUE, 2020. *Ecogenetics of antibiotic resistance in Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*. **113**(3), 570-579. Dostupné z: doi:10.1111/mmi.14454.
- BEDNÁŘ, M., V. FRAŇKOVÁ, J. SCHINDLER, A. SOUČEK aj. VÁVRA, 1996. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. ISBN 8023802976.
- BLAŽKOVÁ, M., L. KARAMONOVÁ, L. FUKAL a P. RAUCH, 2005. *Listeria monocytogenes-Nebezpečný patogen a jeho detekce v potravinách*. *Chemické listy*. **7**(99), 467-473. ISSN 00092770.
- BORUCKI, M. K. a D. R. CALL, 2003. *Listeria monocytogenes Serotype Identification by PCR*. *Journal of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, **41**(12), 537-5540. Dostupné z: doi:0.1128/JCM.41.12.5537-5540.2003.
- BORUCKI, M.K., C. C. GAY, J. REYNOLDS, K. L. MCELWAIN, S. H. KIM, D. R. CALL a D. P. KNOWLES, 2005. *Genetic Diversity of Listeria monocytogenes Strains from a High-Prevalence Dairy Farm*. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, **10**(71), 5893-5899. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.71.10.5893-5899.2005.

- BRYCHTA, J., L. BARTOŠOVÁ a V. BRYCHTA, 2018. *Výskyt Listeria monocytogenes v potravinách*. Praha. ISBN 978-80-88019-31-2.
- BURKHOLDER, K. M. a A. K. BHUNIA, 2010. *Listeria monocytogenes uses Listeria Adhesion Protein (LAP) to promote bacterial transepithelial translocation and induces expression of LAP receptor Hsp60*. Infection and Immunity. Indiana: American Society for Microbiology, **12**(78), 5062–5073. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.00516-10.
- CAMILLI, A., H. GOLDFINE a D. A. PORTNOY, 1991. *Listeria monocytogenes mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent*. Journal of Experimental Medicine. **173**(3), 751-754. Dostupné z: doi:10.1084/jem.173.3.751.
- CARLIN, C. R., J. LIAO, L. K. HUDSON, T. L. PETERS, T. G. DENES, R. H. ORSI, X. GUO a M. WIEDMANN, 2022. *Soil Collected in the Great Smoky Mountains National Park Yielded a Novel Listeria sensu stricto Species, L. swaminathanii*. Microbiology Spectrum. **3**(10). ISSN 21650497. Dostupné z: doi:10.1128/SPECTRUM.00442-22/FORMAT/EPUB.
- CZAJKA, J., N. BSAT, M. PIANI, W. RUSS, K. SULTANA, M. WIEDMANN, R. WHITAKER a C. A. BATT, 1993. *Differentiation of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of Listeria monocytogenes strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms*. Applied and Environmental Microbiology. **59**(1), 304-308. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.59.1.304-308.1993.
- DAS, S., P. K. SURENDRAN a N. THAMPURAN, 2010. *Detection and Differentiation of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by Multiplex PCR*. Fishery Technology. **1**(47), 91-94.
- DORTET, L., L. RADOSHEVICH, E. VEIGA a P. COSSART, 2019. *Listeria monocytogenes*. In: Encyclopedia of Microbiology. 4th ed. France: Elsevier, s. 803-818. ISBN 9780128117378. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.02297-2.
- DOUMITH, M., C. BUCHRIESER, P. GLASER, CH. JACQUET a P. MARTIN, 2004. *Differentiation of the Major Listeria monocytogenes Serovars by Multiplex PCR*. Journal of Clinical Microbiology. France: American Society for Microbiology, **8**(42), 3819-3822. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.42.8.3819–3822.2004.
- DOUMITH, M., CH. CAZALET, N. SIMOES, et al., 2004. *New Aspects Regarding Evolution and Virulence of Listeria monocytogenes Revealed by Comparative Genomics and DNA Arrays*. Infection and Immunity. **2**(72), 1072-1083. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.72.2.1072–1083.2004.



- EFSA: *Story map on Listeria monocytogenes* [online], 2022. EFSA (European Food Safety Authority) [cit. 2023-03-20].  
Dostupné z: <https://storymaps.arcgis.com/stories/629e6627e6c64111bfd5b9257473c74a>.
- EUCAST: *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters* [online], 2022. Version 13.0 [cit. 2023-03-20]. Dostupné z:  
[https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_12.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf).
- ERMOLAEVA, S., T. KARPOVA, S. NOVELLA, M. WAGNER, M. SCORTTI, I. TARTAKOVSKII aj. A. VAZQUEZ-BOLAND, 2003. *A simple method for the differentiation of Listeria monocytogenes based on induction of lecithinase activity by charcoal*. International Journal of Food Microbiology. Elsevier, **1**(82), 87-94.  
Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1605(02)00399-9.
- FAEZI-GHASEMI, M. a S. KAZEMI, 2013. *Effect of Sub-Lethal Environmental Stresses on the Cell Survival and Antibacterial Susceptibility of Listeria monocytogenes PTCC1297*. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences [online]. Iran, **1**(17), 1-6 [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: [www.zjrms.ir](http://www.zjrms.ir).
- FIŠNAR, J., 2022. *Zpráva o činnosti systému RYCHLEHO VAROVÁNÍ PRO POTRAVINY A KRMIVA (RASFF) v České republice za rok 2021*. Praha: Ministerstvo zemědělství, Odbor bezpečnosti potravin. ISBN 978-80-7434-663-7. Dostupné také z:  
[https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace1/RASFF\\_2021.pdf](https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace1/RASFF_2021.pdf).
- FOLTÝNOVÁ, Soňa, 2014. Listeriόza. *Pediatr v praxi*. **15**(2), 74-75.
- FUJISAWA, T. a M. MORI, 1994. *Evaluation of Media for Determining Hemolytic Activity and That of API Listeria System for Identifying Strains of Listeria monocytogenes*. Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, **32**(4), 1127-1129.
- GLASER, P., L. FRANGEUL, C. BUCHRIESER, et al., 2001. *Comparative Genomics of Listeria Species*. Science. **294**(5543), 849-852. ISSN 0036-8075. PMID 1063447.  
Dostupné z: doi:10.1126/science.1063447.
- GORSKI, L., D. FLAHERTY a R. E. MANDRELL, 2006. *Competitive fitness of Listeria monocytogenes serotype 1/2a and 4b strains in mixed cultures with and without Food in the U.S. Food and Drug Administration Enrichment Protocol*. Applied and Environmental Microbiology. **72**(1), 776-783. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.72.1.776-783.2006.
- GROVES, R. D. a H. J. WELSHIMER, 1977. *Separation of Pathogenic from Apathogenic Listeria monocytogenes by Three In Vitro Reactions*. Journal of Clinical Microbiology. USA: American Society for Microbiology, **5**(6), 559-563.

- GRÜNDLING, A., M. D. GONZALEZ a D. E. HIGGINS, 2003. *Requirement of the Listeria monocytogenes Broad-Range Phospholipase PC-PLC during Infection of Human Epithelial Cells*. Journal of Bacteriology. Boston: American Society for Microbiology, **21**(185), 6295-6307. Dostupné z: doi:10.1128/JB.185.21.6295-6307.2003.
- HADDAD, N., 2022. *Hazards in the Food Processing and Distribution Chain*. London: ISTE Ltd. ISBN 978-1-78945-093-4.
- HOU, T., CH. CHIANG-NI a S.TENG, 2019. *Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology*. Journal of Food and Drug analysis. **2**(27), 404-414. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfda.2019.01.001.
- HUDSON, L. K., H. K. CHAGGAR, C. N. SCHAMP, et al., 2022. *Phenotypic characterization and analysis of complete genomes of two distinct strains of the proposed species "L. swaminathanii"*. Scientific Reports. **12**(9137). ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-022-13119-y.
- CHEN, M., J. CHENG, R. PANG, et al., 2019. *Rapid detection of Listeria monocytogenes sequence type 121 strains using a novel multiplex PCR assay*. LWT - Food Science and Technology. Elsevier, **116**(108474). Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2019.108474.
- CHLEBICZ, A. a K. ŚLIŹEWSKA, 2018. *Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases*. International Journal of Environmental Research and Public Health [online]. MDPI, 1-28 [cit. 2023-03-21]. ISSN 16604601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph15050863.
- JANAKIRAMAN, V., 2008. *Listeriosis in Pregnancy: Diagnosis, Treatment, and Prevention*. REVIEWS IN OBSTETRICS & GYNECOLOGY. MedReviews, **1**(4), 179-185. Dostupné také z: <http://phil.cdc.gov/phil/home>.
- JERŠEK, B., E. TCHERNEVA, N. RIJSENS a L. HERMAN, 1996. *Repetitive element sequence-based PCR for species and strain discrimination in the genus Listeria*. Letters in Applied Microbiology. (23), 55-60. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/lambio/article/23/1/55/6707644>.
- JILICH, D. a L. MACHALA, 2008. *Listerióza*. Med. Pro Praxi. Praha, **5**(9), 299-300. Dostupné také z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2008/09/03.pdf>.
- KOLÍSKO, M., 2017. *Moderní metody sekvenování DNA*. Živa. **3**, LXXIII-LXXVI. Dostupné také z: <https://flxlexblog.wordpress.com/2014/>.

- KOUBKOVÁ, L., B. VOJTĚŠEK a R. VYZULA, 2014. *Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi: Next Generation Sequencing – Application in Clinical Practice*. Klinická Onkologie. Brno, **27**(1), 61-68.
- KRAMARENKO, T., M. ROASTO, K. MEREMÄE, M. KUNINGAS, P. PÕLTSAMA a T. ELIAS, 2012. *Listeria monocytogenes prevalence and serotype diversity in various foods*. Food Control. Elsevier, (30), 24-29. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2012.06.047.
- LEIMEISTER-WACHTER, M., E. DOMANN a T. CHAKRABORTY, 1992. *The Expression of Virulence Genes in Listeria monocytogenes Is Thermoregulated*. Journal of Bacteriology. **174**(3), 947-952.
- LIU, D., A. J. AINSWORTH, F. W. AUSTIN a M. L. LAWRENCE, 2003. *Characterization of virulent and avirulent Listeria monocytogenes strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalingenes*. Journal of Medical Microbiology. **12**(52), 1065-1070. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.05358-0.
- LI, Y., Z. GAN, X. ZHOU a Z. CHEN, 2022. *Accurate classification of Listeria species by MALDI-TOF mass spectrometry incorporating denoising autoencoder and machine learning*. Journal of Microbiological Methods. Elsevier, **2**(192). ISSN 18728359. Dostupné z: doi:10.1016/J.MIMET.2021.106378.
- LOUS, J., CH. T. RYBORG a J. L. THOMSEN, 2011. *A systematic review of the effect of tympanostomy tubes in children with recurrent acute otitis media*. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. **9**(75), 1058-1061. ISSN 01655876. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijporl.2011.05.009.
- LÜTH, S., S. KLETA a S. AL DAHOUK, 2018. *Whole genome sequencing as a typing tool for foodborne pathogens like Listeria monocytogenes –The way towards global harmonisation and data exchange*. Trends in Food Science & Technology. Elsevier, (73), 67-75. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:10.1016/J.TIFS.2018.01.008.
- MCKELLAR, R. C., 1994. *Use of the CAMP Test for Identification of Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. **12**(60), 4219-4225. Dostupné také z: <https://journals.asm.org/journal/aem>.
- MCLAUHLIN, J. a C., E. D. REES, 2009. Genus I. Listeria Pirie 1940a, 383AL. In: WHITMAN, W. B., G. M. GARRITY, P. DE VOS, D. JONES, N. KREIG, W. LUDWIG, F. A. RAINEY a K. H. SCHLEIFER. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes Systematic Bacteriology*. 2nd edition. New York: Springer Dordrecht Heidelberg London, s. 244-257. ISBN 978-0-387-95041-9.

- MCMULLEN, D. P. a N. E. FREITAG, 2014. *Listeria monocytogenes*. In: Molecular Medical Microbiology. 3rd ed. University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, USA: Elsevier, s. 1345-1364. ISBN 9780123971692.
- MCPHERSON, M. J. a S. G. MØLLER, 2000. *PCR*. USA: BIOS Scientific Publishers. ISBN 0-203-34667-X.
- MENGAUD, J., C. BRAUN-BRETON a P. COSSART, 1991. *Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in Listeria monocytogenes: a novel type of virulence factor?*. Molecular Microbiology. **5**(2), 367-372.
- MENŠÍKOVÁ, K., 2020. *Antibiotická rezistence* [online]. [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: <https://bmedic.cz/antibioticka-rezistence/>.
- MOHAPATRA, B. R. a A. MAZUMDER, 2008. *Comparative efficacy of five different rep-PCR methods to discriminate Escherichia coli populations in aquatic environments*. Water Science and Technology. **58**(3), 537-547. Dostupné z: doi:10.2166/wst.2008.424.
- MOURA, A., A. CRISCUOLO, H. POUSEELE, et al., 2016. *Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of Listeria monocytogenes*. Nature Microbiology. Macmillan Publishers Limited, **2**(16185), 1-10. ISSN 20585276. Dostupné z: doi:10.1038/nmicrobiol.2016.185.
- NAKAZAWA, M. a H. NEMOTO, 1980. *Synergistic hemolysis phenomenon of Listeria monocytogenes and Corynebacterium equi*. J. Vet. Sci. Japan, **42**(603).
- Nature Microbiology: Institut Pasteur MLST databases and software, 2016. *Listeria monocytogenes* [online]. MLST [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: <https://bigsd.bpasteur.fr/listeria/>.
- NAVRATILOVA, P., J. SCHLEGELOVA, A. SUSTACKOVA, E. NAPRAVNIKOVA, J. LUKASOVA a E. KLIMOVA, 2004. *Prevalence of Listeria monocytogenes in milk, meat and foodstuff of animal origin and the phenotype of antibiotic resistance of isolated strains*. Vet. Med. - Czech. **49**(7), 243-252.
- Nařízení Komise (ES): č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny*, 2005. In: . CS: Úřední věstník Evropské unie, ročník 2005, číslo 2073.4.
- NUCERA, D. M., S. LOMONACO, A. COSTA, P. MORRA a M. A. GRASSI, 2013. *Diagnostic Performance of rep-PCR as a Rapid Subtyping Method for Listeria monocytogenes*. Food Anal. Methods. **6**, 868-871. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-012-9496-1.

- O.K. SERVIS BIOPRO, 2021. *Klasická a chromogenní média* [online]. [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: <https://www.biopro.cz/mikrobiologicka-diagnostika-mikrobiologie-klasicka-a-chromogenni-media>.
- OLAIMAT, A. N., M. A. AL-HOLY, H. M. SHAHBAZ, A. A. AL-NABULSI, M. H. ABU GHOUSH, T. M. OSAILI, M. M. AYYASH a R. A. HOLLEY, 2018. *Emergence of Antibiotic Resistance in Listeria monocytogenes Isolated from Food Products: A Comprehensive Review*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **17**(5), 1277-1292. ISSN 15414337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12387.
- OLIVEIRA, N. A., G. M. BITTENCOURT a C. A. F. OLIVEIRA, 2019. *Listeria monocytogenes in Brazilian Foods: Occurrence, Risks to Human Health and Their Prevention*. *Current Research in Nutrition and Food Science*. **7**(2), 32-330. ISSN 23220007. Dostupné z: doi:10.12944/CRNFSJ.7.2.02.
- ORSI, R. H. a M. WIEDMANN, 2016. *Characteristics and distribution of Listeria spp., including Listeria species newly described since 2009*. *Appl Microbiol Biotechnol*. **100**, 5273-5287. Dostupné z: doi:DOI 10.1007/s00253-016-7552-2.
- OTTAVIANI, F., M. OTTAVIANI a M. AGOSTI, 1977. *Differential agar medium for Listeria monocytogenes* [foods]. *Industrie Alimentari*. Italy.
- PARIDA, S. K., E. DOMANN, M. ROHDE, S. MULLER, A. DARJI, T. HAIN, J. WEHLAND a T. CHAKRABORTY, 1998. *Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of Listeria monocytogenes into human endothelial cells*. *Molecular Microbiology*. **28**(1), 81-93.
- PARTE, A. C., J. S. CARBASSE, J. P. MEIER-KOLTHOFF, L. C. REIMER a M. GÖKER, 2020. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **70**, 5607-5612. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.004332.
- PERRIN, M., M. BEMER a C. DELAMARE, 2003. *Fatal Case of Listeria innocua Bacteremia*. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**(11), 5308-5309. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.41.11.5308-5309.2003Copyright.
- PERRY, J. D. a A. M. FREYDIÈRE, 2007. *The application of chromogenic media in clinical microbiology*. *Journal of Applied Microbiology*. **6**(103), 2046-2055. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x.
- PONTELLO, M., A. GUAITA, G. SALA, M. CIPOLLA, A. GATTUSO, M. SONNESSA a M. V. GIANFRANCESCHI, 2012. *Listeria monocytogenes serotypes in human infections (Italy, 2000-2010)*. *Original Articles and Reviews*. **48**(2), 146-150. Dostupné z: doi:10.4415/ANN\_12\_02\_07.

- PORTNOY, D. A., V. AUERBUCH a I. J. GLOMSKI, 2002. *The cell biology of Listeria monocytogenes infection the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity*. Journal of Cell Biology. **3**(158), 409-414. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/JCB.200205009.
- RADOSHEVICH, L. a P. COSSART, 2018. *Listeria monocytogenes: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis*. Nature Reviews Microbiology. **16**(1), 32-46. ISSN 17401534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro.2017.126.
- RASFF: *The Rapid Alert System for Food and Feed – Annual Report 2020*, 2021. Luxembourg: Publications Office of the European Union. Dostupné také z: [https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-08/rasff\\_pub\\_annual-report\\_2020.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-08/rasff_pub_annual-report_2020.pdf).
- RASFF. *European Commission* [online]. [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/592601>.
- REDAKCE CHOICE, 2019. *Rozdíl mezi selektivními a diferenciatními médii - 2021 - Zprávy*. Citit rozdíl: Betweenmates [online]. cs.weblogographic.com [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: <https://cs.weblogographic.com/difference-between-selective>.
- RICCI, A., A. ALLENDE, D. BOLTON, et al., 2016. *Listeria monocytogenes contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU*. EFSA Journal. **16**(1). ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2018.5134.
- ROGALLA, D. a P. A. BOMAR, 2022. *Listeria monocytogenes*. StatPearls Publishing LLC [online]. [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534838/>.
- ROSSI, F., V. GIACCONE, G. COLAVITA, C. AMADORO, F. POMILIO a P. CATELLANI, 2022. *Virulence Characteristics and Distribution of the Pathogen Listeria ivanovii in the Environment and in Food*. Microorganisms. **10**(1679), 1-19. ISSN 20762607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10081679.
- RYSER, E.T. a E. H. MARTH, 2007. *Listeria, listeriosis, and food safety*. 3rd ed. USA: CRC Press. ISBN 10: 0-8247-5750-5.
- SALMONOVÁ, H., J. KILLER, V. BUNEŠOVÁ, M. GEIGEROVÁ a E. VLKOVÁ, 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**(13), 1-10. ISSN 15746968. Dostupné z: doi:doi: 10.1093/femsle/fny118.

- SASTRY, A., K. SANDHYA a A. JANAGOND, 2016. *Enterobacteriaceae II: Salmonella*. Essentials of Medical Microbiology. 317. Dostupné z: doi:10.5005/JP/BOOKS/12637\_31.
- SAUDERS, B. D. a M. WIEDMANN, 2007. *Ecology of Listeria Species and L. monocytogenes in the Natural Environment*. In: Listeria, Listeriosis, and Food Safety. 3rd ed. USA: CRC Press, s. 21-53. ISBN 10: 1-4200-1518-4.
- SIM, J., D. HOOD, L. FINNIE, M. WILSON, C. GRAHAM, M. BRETT a J. A. HUDSON, 2002. *Series of incidents of Listeria monocytogenes non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats*. Letters in Applied Microbiology. **35**(5), 409-413. Dostupné z: doi:10.1046/j.1472-765X.2002.01207.x.
- SOMER, L. a Y. KASCHI, 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. Israel: International Association for Food Protection, **66**(9), 1658-1665.
- SOUTHWICK, F. S., M. D. PURICH a D. L. PURICH, 1996. *Intracellular Pathogenesis of Listeriosis*. New England Journal of Medicine. **334**(12), 770-776. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/nejm199603213341206.
- SZÚ (STÁTNÍ ZDRAVOTNICKÝ ÚSTAV), 2022. *Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice: leden - říjen 2022 porovnání se stejným obdobím v letech 2013-2021 (počet případů)* [online]. [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: [https://szu.cz/wp-content/uploads/2022/11/tabulka\\_leden\\_rijen\\_2022.pdf](https://szu.cz/wp-content/uploads/2022/11/tabulka_leden_rijen_2022.pdf).
- ŠPAČKOVÁ, M., M. GAŠPÁREK a F. STEJSKAL, 2021. *Listerióza – analýza výskytu humánních případů v České republice v letech 2008-2018*. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie. **1**(70), 42-51.
- ŠVEC, P., M. VANCANNEYT, M. SERMAN, C. SNAUWAERT, K. LEFEBVRE, I. SEDLÁČEK a J. SWINGS, 2005. *Evaluation of (GTG)5-PCR for identification of Enterococcus spp.* FEMS Microbiology Letters. **247**(1), 59-63. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsle.2005.04.030.
- TANIGUCHI, Y., P. J. CHOI, G. LI, H. CHEIN, M. BABU, J. HEARN, A. EMILI a X. S. XIE, 2010. *Quantifying E. coli Proteome and Transcriptome with Single-Molecule Sensitivity in Single Cells*. Science. **329**(5991), 533-538. Dostupné z: doi:10.1126/science.1188308.
- TRAVIER, L., S. GUADAGNINI, E. GOUIN, et al., 2013. *ActA Promotes Listeria monocytogenes Aggregation, Intestinal Colonization and Carriage*. PLOS Pathogens. **9**(1), 1-16. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1003131.

- UYTTENDAELE, M., P. BUSSCHAERT, A. VALERO, et al., 2009. *Prevalence and challenge tests of Listeria monocytogenes in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007*. International Journal of Food Microbiology. **133**(1-2), 91-104. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.002.
- VERSALOVIC, J., M. SCHNEIDER, F. J. DE BRUJIN a J. R. LUPSKI, 1994. *Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction*. Methods in molecular and cellular biology. Wiley-Liss, (5), 25-40. ISSN 00951137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.43.1.199-207.2005.
- VILAR, M. J., E. YUS, M. L. SANJUÁN, F. J. DIÉGUEZ a J. L. RODRÍGUEZ-OTERO, 2007. *Prevalence of and risk factors for Listeria species on dairy farms*. Journal of Dairy Science. **11**(90), 5083-5088. ISSN 15253198. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2007-0213.
- VORLÍČEK, P., 2018. *Zodpovědný přístup k antibiotikům*. Státní veterinární správa (SVS) [online]. [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/zodpovedny-pristup-k-antibiotikum/>.
- WARRINER, K. a A. NAMVAR, 2009. *What is the hysteria with Listeria?* Trends in Food Science and Technology. **20**(6-7), 245-254. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2009.03.008.
- WERNER, R. K., 2016. *Chapter 139 - Escherichia coli O157:H7 (Enterohemorrhagic E. coli)*. In: Ciottone's Disaster Medicine. 2nd Ed. Philadelphia: Elsevier, s. 746-749. ISBN 978-0-323-28665-7.
- WHO, 2021. *Antimicrobial resistance*. World Health Organization [online]. Switzerland: WHO [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
- WILLIS, C., T. BAALHAM, M. GREENWOOD a F. PRESLAND, 2006. *Evaluation of a new chromogenic agar for the detection of Listeria in food*. Journal of Applied Microbiology. **3**(101), 711-717. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02917.x.
- WILSON, A., J. GRAY, P. S. CHANDRY a E. M. FOX, 2018. *Phenotypic and Genotypic Analysis of Antimicrobial Resistance among Listeria monocytogenes Isolated from Australian Food Production Chains*. Genes. **9**(80), 1-13. Dostupné z: doi:10.3390/genes9020080.
- WU, S., Q. WU, J. ZHANG, M. CHEN a W. GUO, 2016. *Analysis of Multilocus Sequence Typing and Virulence Characterization of Listeria monocytogenes Isolates from Chinese Retail Ready-to-Eat Food*. Frontiers in Microbiology. **7**(168), 1-11. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.00168.



- YAN, S., M. LI, L. LUQUE-SASTRE, et al., 2019. *Susceptibility (re)-testing of a large collection of Listeria monocytogenes from foods in China from 2012 to 2015 and WGS characterization of resistant isolates*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **74**(7), 1786-1794. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkz126.
- YING, Z., 2022. *Co je MALDI-TOF*. Antiteck Life Sciences [online]. China: AntiTeck Life Sciences Limited [cit. 2023-03-21]. Dostupné z: <https://antiteck.com/cs/co-je-maldi-tof/>.
- ZHU, Q., R. GOONERATNE a M. A. HUSSAIN, 2017. *Listeria monocytogenes in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels*. Foods. MDPI, **6**(21), 1-11. Dostupné z: 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

**ATB** – antibiotikum

**A<sub>w</sub>** – aktivita vody

**BHI** – Brain Heart Infusion

**CAMP test** – Christie–Atkins–Munch–Peterson test

**CNS** – centrální nervová soustava

**ČSN** – Česká státní norma

**ddNTP** – dideoxynukleotid

**DNA** – deoxyribonukleová kyselina

**EDTA** – kyselina ethylendiamitetraoctová

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

**ES** – Evropské společenství

**EU** – Evropská unie

**FSC** – Food safety criteria (Kriteria pro bezpečnost potravin)

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

**HCCA** –  $\alpha$ -kyno-4-hydroxyskořicová kyselina

**HIV** – Human imuno-defficiency virus

**InlA** – internalin A

**InlB** – internalin B

**KK** – klonální komplex

**KTJ** – kolonie tvořící jednotky

**LAP** – listérie adhezivní protein

**LLO** – listeriolysin O

**LM** – *Listeria monocytogenes*

**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)

**MIC** – minimální inhibiční koncentrace

**MLEE** – Multilocus enzyme electrophoresis (multilokusová enzymová elektroforéza)

**MLST** – Multilocus sequence typing (Multilokusová sekvenční typizace)

**Mpl** – metaloproteasa

**NAD** – nikotinamid

**NCBI** – National Center for Biotechnology Information (Národní centrum pro biotechnologické informace)

**PBP3** – penicilin binding protein (penicilin vázající protein)

**PC-PLC** – fosfatidylinositol fosfolipáza C

**PCR** – Polymerase chain reaction (Polymerázová řetězová reakce)

**PFGE** – pulzní gelová elektroforéza

**PlcA** – fosfolipáza A

**PlcB** – fosfolipáza B

**RAPD** – Random Amplification of Polymorphic DNA (náhodná amplifikace polymorfni DNA)

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

**rDNA** – ribozomální DNA

**REP PCR** – repetitive sequence based PCR (PCR založená na repetitivní sekvenci)

**RNA** – ribonukleová kyselina

**rRNA** – ribozomální RNA

**RTE** – Ready to eat (určené k přímé spotřebě)

**SSTK** – Shoda se sekvencí typového kmene

**SVS** – Státní veterinární správa

**SZÚ** – Státní zdravotní ústav

**TAE** – tris-acetát EDTA pufr

**Taq DNA** – termostabilní polymerázy z hypertermofilní bakterie *Thermus aquaticus*

**TMP/SMX** – trimethoprim/sulfametoxazol

**TSB** – Trypton sójový bujón

**UPGMA** – unweighted pair group method with arithmetic mean (metoda neváženého párování s aritmetickým průměrem)

**USA** – Spojené státy americké

**UV** – ultrafialové záření

**WHO** – World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)



# 10 Samostatné přílohy

Výsledky z této práce byly prezentovány na vědecké konferenci.



Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin  
CzechFoodChem 2021  
24-26. 5. 2021 • on-line

## OCCURRENCE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN FOOD AND THEIR IDENTIFICATION

Tereza Kodešová, Anna Lišková, Andrea Rosová, Hana Šubrtová Salmonová, Eva Vlčková

Department of Microbiology, Nutrition and Dietsetics, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague

### Introduction

*Listeria monocytogenes* – LM (Fig. 1) is an important human foodborne pathogen. The prevalence of the disease caused by this bacterium is low (0,5-1 %), but the mortality is high (30 %). The incidence of the disease has been slightly increasing these days. The aim of the work was the detection of LM and optimization of methods for its identification.

### Materials and methods

A total of 251 food samples of animal and plant origin were analyzed. The presence of LM was determined according to the ČSN EN ISO 11290-1 standard. After incubation on selective medium, colonies characteristic to LM (Fig 2) were isolated, transferred to brain heart infusion broth (BHI, Oxoid) and cultured (37 °C, 24 hours). Isolates were identified by MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonik GmbH) and PCR using species-specific primers for LM and *L. innocua* (Tab. 1). To verify the reliability of the methods, selected strains were identified using 16S rDNA sequencing.

Table 1: Used primers for PCR identification of *Listeria monocytogenes* (LM) and *Listeria innocua* (LI)

Primer name	Specificity	Sequence (5' - 3')	Product size (bp)	Original reference
lin0464F	LI	CGCATTATCGCCAAAATC	749	Dongyou L et al (2003) FEMS Microbiology Letters 223 (2).
lin0464R	LI	TCGTGACATAGACGCGATTG		
ll5	LM	AACCTATCCAGTGCTC	267	Sanjoy D et al (2010) Fishery Technology, 47 (1).
ll6		CTGTAAGCCATTTCGTC		
linA-F	LM	ACGAGTAACGGGACAAATGC	800	Liu et al (2007) Journal of Microbiological Methods 71 (2).
linA-R		CCCGACAGTGTGCTAGATT		

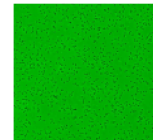


Figure 1: *Listeria monocytogenes* – phase contrast magnif. 400x

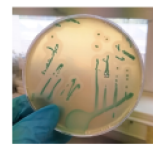


Figure 2: Specific colonies of *Listeria monocytogenes* on Ottaviani and Agosti agar

### Results and Discussions

There were 29 (12 %) food samples found to be positive for the presence of listeria with lecithinase activity, of which 21 samples (8 %) were LM positive. Total of 121 listeria strains were isolated, of which 98 were identified as LM. LM were most commonly found in meat and milk foodstuff. Twelve of these samples were intended for direct consumption (Fig. 3). The prevalence of LM in food is high, so it is important to optimize the most accurate, fastest and cheapest methods of identifying these bacteria. It was found that the MALDI-TOF MS method does not have sufficient resolution in this taxonomic group for reliable identification at the species level. However, it is useful for preliminary identification at the genus level. Identification using PCR was evaluated as more reliable. PCR showed up to 100% reliability of identification using primers LL6, LL5 for LM and lin0464-F, lin0464-R for *L. innocua* (Fig. 4-7). Samples that were unable to identify by PCR were sent for 16S rDNA sequencing (Tab. 2). Samples 31-35 which were unable to be differentiated by PCR were isolated from one food sample and determined by sequencing as LM (Tab. 2, Fig. 8). Display of both bands in the PCR method can be caused by another copy of section 16S rDNA in this listeria strain (Fig. 8, 9). Nevertheless, the PCR method is faster and more accurate than biochemical assays and cheaper and faster than 16S rDNA sequencing.

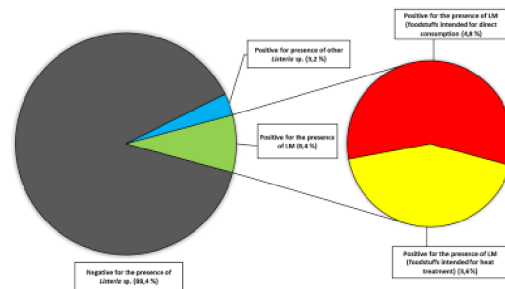


Figure 3: *Listeria monocytogenes* (LM) frequency in foodstuff samples.

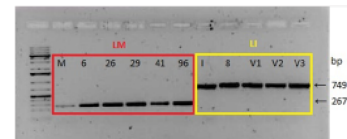


Figure 4: PCR results (primers: lin0464F, lin0464R, ll5 and ll6) – LM – *Listeria monocytogenes*, LI – *Listeria innocua*

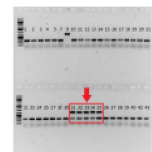


Figure 5: PCR results (primers: lin0464F, lin0464R, ll5 and ll6) – *L. monocytogenes* (1-7, 10-25, 27-30, 36-43); *L. innocua* (9); undifferentiated (31-35).

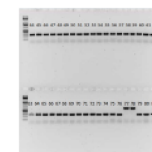


Figure 6: PCR results (primers: lin0464F, lin0464R, ll5 and ll6) – *L. innocua* (44-76, 79-80); *L. innocua* (77,78).

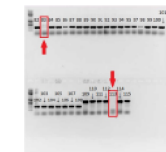


Figure 7: PCR results (primers: lin0464F, lin0464R, ll5 and ll6) – *L. monocytogenes* (82, 84-95, 97-108); *L. innocua* (109-112,114,115); unspecified (83, 113).

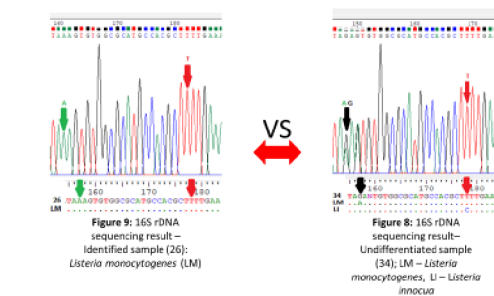


Figure 9: 16S rDNA sequencing result – Identified sample (26): *Listeria monocytogenes* (LM)

Figure 8: 16S rDNA sequencing result – Undifferentiated sample (34): LM – *Listeria monocytogenes*, LI – *Listeria innocua*

Table 2: Results from 16S rDNA sequencing for samples that were unable to identify by PCR (LM – *Listeria monocytogenes*, LI – *Listeria innocua*)

Sample	Top-hit taxons of 16S rDNA Sequencing	Similarity (%)
32	LM/LI	99,91
34	LM/LI	99,63
83	<i>L. welshimeri</i>	100,00
113	<i>L. aquatica</i>	99,44
116	<i>L. aquatica</i>	99,63

ACKNOWLEDGEMENTS: This study was supported by the European Regional Development Fund – Project NutRisk Center (No. CZ.02.1.01./0.0/0.0/16\_019/0000845).



EUROPEAN UNION  
European Structural and Investment Funds  
Operational Programme Research, Development and Education

