

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Typizační metody využitelné v epidemiologii listeriových nákaz

Daniela Králová

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Daniela Králová**
Osobní číslo: **C16252**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Typizační metody využitelné v epidemiologii listeriových
nákaz**

Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši popisující alimentární onemocnění listeriózu. Zaměřte se na případy epidemií v ČR i v sousedních státech EU. Popište používané laboratorní metody i epidemiologické dotazníky, které se používají k určení vehikula nákazy.
2. Literární zdroje čerpejte zejména z databází WOS a Medline. Prostudujte hlášení služby Epidat státního zdravotního ústavu..
3. Bakalářskou práci zpracujte dle směrnice Univerzity Pardubice 9/2012.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 5. 2019

.....

Daniela Králová

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Marcelle Pejchalové, Ph.D. za její odborné vedení při zadání a vypracování mé bakalářské práce.

ANOTACE

Téma mé bakalářské práce je zaměřit se na typizační metody pro epidemiologii listerióz. V první části jsou popsány základní vlastnosti, které jsou charakteristické pro rod Listeria a následně základní identifikační metody, které jsou nezbytné pro přesnou diagnostiku a rozlišení jednotlivých druhů, spolu s výhodami a nevýhodami, které dané metody přináší. V závěru své práce se zaměřuji na incidenci listeriózy v EU a ČR spolu s organizacemi a orgány státní správy, které se této problematice věnují a dále popisují dotazníky, které se používají nejčastěji pro studium trvanlivosti Listeria monocytogenes u potravin určených k přímé spotřebě.

KLÍČOVÁ SLOVA: *Listeria monocytogenes, epidemie, potraviny, diagnostika*

TITLE

Typizing methods applicable to epidemiology of lister diseases

ANOTATION

The topic of my bachelor thesis is to focus on typing methods for epidemiology of listeriosis. The first part describes the basic characteristics of the genus Listeria and basic identification methods that are necessary for accurate diagnosis and differentiation of the species, along with the advantages and disadvantages that methods bring. At the end of my work I focus on the incidence of listeriosis in the EU and the Czech Republic, together with organizations and state administration that deal with this issue and further describe the questionnaires that are used most often for the study of durability of Listeria monocytogenes for ready-to-eat food.

KEYWORDS: *Listeria monocytogenes, epidemics, food, diagnostics*

OBSAH

ÚVOD	13
1 ROD <i>LISTERIA</i>	14
1.1 Historie	14
1.2 Taxonomie	14
1.3 Morfologie	15
1.4 Buněčný infekční cyklus	16
1.5 Patogenita a výskyt	16
1.6 Virulentní faktory	17
1.7 Klinické projevy	18
1.7.1 Těhotenská listerióza	19
1.7.2 Novorozenecká listerióza	19
1.7.3 Meningitida	21
1.7.4 Bakteriémie	21
2 IDENTIFIKACE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> V KLINICKÉM MATERIÁLU	22
2.1 Mikroskopie	23
2.1.1 Nativní preparát	23
2.1.2 Barvení dle Grama	24
2.2 Kultivace	24
2.3 Biochemická identifikace	27
2.3.1 API Listeria test	27
2.3.2 Rapid L. mono test	28
2.3.3 CAMP test	28
2.3.4 Katalázový test	29
2.3.5 Fermentace cukrů	29
2.4 Druhová identifikace mikroorganismů hmotnostní spektrometrií MALDI – TOF MS	30
2.5 Imunochemické metody	31
2.6 Molekulární metody	31
2.6.1 Průkaz bakteriálních nukleových kyselin	31
3 IDENTIFIKACE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> Z IZOLÁTU V EPIDEMIOLOGII	33
3.1 Subtypizační metody	33
3.1.1 Ribotypizace	33
3.1.2 Elektroforéza v pulzním poli (PFGE)	33
3.2 Sérologická typizace	34
3.3 Multilokusová enzymová elektroforéza (MLEE)	35
3.4 Cel genomové sekvenování	36

3.5	REA a RAPD	37
3.6	Fágová typizace.....	37
3.7	Proteomické metody.....	38
4	MODERNÍ ÚROVNĚ IDENTIFIKACE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	40
4.1	Testy zaměřující se na RNA	40
4.2	DNA mikročipy.....	40
5	LÉČBA, VYUŽITÍ A PREVENCE LISTERIÓZY	41
6	EPIDEMIE LISTERIÓZY V ČR A SOUSEDNÍCH STÁTECH EU	42
6.1	Dotazník pro studium trvanlivosti <i>Listeria monocytogenes</i> u potravin	42
6.2	Situace v EU.....	43
6.3	Situace v ČR.....	47
6.4	Mikrobiologická kritéria pro potraviny.....	49
6.5	Orgány dohlížející na bezpečnost potravin v ČR.....	51
7	ZÁVĚR	53
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	54
9	SEZNAM INTERNETOVÝCH ZDROJŮ (Dostupné ke dni: 13. 3. 2019)	62

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 <i>Listeria monocytogenes</i> ve světelném mikroskopu, Gramovo barvení, 400x rozlišení (Dostupné 13. 3. 2019 z: http://www.msevens.com/cnsinfections/listeria.html).....	15
Obrázek 2 <i>Listeria monocytogenes</i> v elektronovém mikroskopu zobrazující přítomné bičíky (Dostupné 13. 3. 2019 z: http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/eng/micro/listeria.html).....	15
Obrázek 3 Postup a průběh identifikace <i>Listeria monocytogenes</i> (Převzato z: GASANOV, 2005)	22
Obrázek 4 <i>Listeria monocytogenes</i> na krevním agaru (Dostupné 13. 3. 2019 z: https://medium.com/@MicrobeADay/listeria-monocytogenes-646c323d0039)	25
Obrázek 5 PALCAM agar s <i>Listeria monocytogenes</i> (Dostupné 13. 3. 2019 z: https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xlm/xlm08-10.html)	26
Obrázek 6 <i>Listeria monocytogenes</i> na ALOA agaru (Dostupné 13. 3. 2019 z: https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xlm/xlm05-07.html)	26
Obrázek 7 API <i>Listeria</i> pozitivní test (Převzato z: FAROUK, 2015).....	27
Obrázek 8 CAMC test – <i>Listeria monocytogenes</i> a <i>Staphylococcus aureus</i> (Dostupné 20. 4. 2019 z: https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/listeria-monocytogenes-photos/listeria-monocytogenes-camp-test.html)	28
Obrázek 9 CAMP test – <i>Streptococcus agalactiae</i> a <i>Staphylococcus aureus</i> (Dostupné 20. 4. 2019 z: https://www.pictame.com/media/1224542815594752825_1354617)	29
Obrázek 10 Schéma MALDI-TOF MS (Převzato z: BURSOVÁ et al., 2014)	30
Obrázek 11 PCR technika na agarovém gelu, dráha 1: žebřík DNA, dráhy: 2, 4, 7- <i>Listeria monocytogenes</i> , dráhy: 3, 5, 6, 8- negativní výsledky (Převzato z: FAROUK, 2015).....	32
Obrázek 12 PFGE (Dostupné 20. 4. 2019 z: https://is.muni.cz/el-/1431/podzim2014/Bi7311/um/Pulzni_gelova_elektroforeza.pdf?lang=cs).....	34
Obrázek 13 Jednotlivé kroky Celogenomového sekvenování (Převzato z: FRASER, C. M., 2000) ...	36
Obrázek 14 Distribuce potvrzených případů listeriózy v EU, za roky 2007-2017 (Převzato z: ECDC, 2018).	46
Obrázek 15 Distribuce potvrzených případů listeriózy na 100 000 obyvatel podle zemí, EU / EHP, 2016 (Převzato z: ECDC, 2018).....	46
Obrázek 16 Distribuce potvrzených případů listeriózy v ČR, za roky 2012–2016 (Převzato z: ECDC, 2018)	47
Obrázek 17 Distribuce potvrzených případů listeriózy v ČR, za roky 2007–2017 (Převzato z: ECDC, 2018)	48
Obrázek 18 Grafické zobrazení potvrzených případů listeriózou na základě věku v ČR, v roce 2017 (Převzato z: ECDC, 2018).....	48

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Charakteristika novorozenecké listeriózy (Převzato z: GREENWOOD, 1999).....	20
Tabulka 2 Klasifikace základních druhů listerií podle kultivačních vlastností (Převzato z: GREENWOOD, 1999).....	27
Tabulka 3 Klasifikace vybraných druhů listerióz podle biochemických znaků (Převzato z: GREENWOOD, 1999).....	29
Tabulka 4 Sérovary rodu <i>Listeria</i> (Převzato z: BEDNÁŘ, 1994)	35
Tabulka 5 Vybrané metody pro identifikaci <i>Listeria monocytogenes</i> (Převzato z: JADHAY et al., 2012)	39
Tabulka 6 Rozvržení potvrzených případů listeriózy a četnost na 100000 obyvatel, EU/EHP, 2012-2016 (Převzato z: ECDC, 2019).....	45
Tabulka 7 Počet onemocnění listeriózou v roce 2006 (Převzato z: MZČR, 2007).	47
Tabulka 8 Kritéria bezpečnosti <i>Listeria monocytogenes</i> (Převzato z: Komise (ES) č. 1441/2007)	49

SEZNAM ZKRATEK

Act A protein – Actin-assembly inducing protein (Aktin-indukující protein)

ALOA agar – Agosti Ottaviani Listeria agar (selektivní agar pro rod *Listeria* dle Ottavianiho a Agostiho)

a_w – aktivita vody

CFU – colony forming unit (kolonie tvořící jednotka)

cgMLST – core genome multilocus sequence typing

CNS – Centrální nervový systém

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control (Evropské centrum pro prevenci a kontrolu onemocnění)

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

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (enzymová-imunoanalýza)

ES – Evropské společenství

CHEF – Contour-clamped homogeneous electric field

LM – *Listeria monocytogenes*

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

MZČR – Ministerstvo zdravotnictví České republiky

NASBA – nucleic acid sequence based amplification (amplifikace založená na sekvenci nukleové kyseliny)

PCR – poly-chain reaction (polymerázová reakce)

PFGE – Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

PrfA – positive regulatory factor A (pozitivní regulační faktor A)

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA (náhodná amplifikace polymorfnní DNA)

REA – restriction endonuclease analysis (restrikční endonukleázová analýza)

RNA – riboxynukleová kyselina

SZÚ – Státní zdravotní ústav

ÚVOD

Nejvýznamnější z rodu *Listeria* je *Listeria monocytogenes*, ostatní druhy nemají velký význam. (VOTAVA, 2003)

Listeria monocytogenes je bakterie, která byla objevena roku 1926, jako zoonóza, což bylo později uvedeno na pravou míru. Právě tuto bakterii je možné izolovat, jak ze zvířecích, tak lidských hostitelů. Další možnosti materiálů, ze kterých může být listerióza izolována je půda, voda a potraviny. Pouze druh *monocytogenes* a *ivanovii* jsou potenciaálně patogenní.

Jedna z nejdůležitějších vlastností *Listeria monocytogenes* je její pohyblivost díky bičíkům. Tato vlastnost je velice snadno ovlivnitelná teplotou.

Listeriózou jsou často napadeny osoby s poruchou imunity, těhotné ženy a následně novorozenci. Na základě toho může mít tato nemoc různý charakter. Nejčastější je listerióza těhotných a novorozenců. Z dalších typů bývá nejčastější meningitida a bakteriémie.

Tato bakterie je velice odolná především v potravinách a je velmi kultivačně nenáročná. Díky faktorům virulence má onemocnění listeriózou velice rychlý a silný průběh.

Mezi nejdůležitější faktory virulence patří hemolyzin, jehož náhlá ztráta vede ke ztrátě virulence. Dalším faktorem je Act A, který má zásadní roly v pohyblivosti a virulenci pro rod *Listeria*.

Nejčastější bránou vstupu je zažívací trakt, a to nejčastěji kontaminovanými potravinami. Trávicím traktem může bakterie vstupovat do střevních plaků a následně do dalších orgánů, jako jsou plíce a játra. Dále může být do těla vnesena dýchacími cestami, otevřenými ránami nebo poraněnou sliznicí například dutiny ústní.

1 ROD LISTERIA

Tyto bakterie je možné izolovat z materiálu, které mohou být původu živočišného ale i lidského. (SWAMINATAN, 2007)

1.1 Historie

Objevení rodu *Listeria* je datováno do roku 1926, kdy Murray, Webb a Swann izolovaly *Listeria monocytogenes* jako původce septické nemoci králíků a morčat. U těchto zvířat bylo onemocnění provázeno monocytózou v periferní krvi, proto byl izolovaný mikrob pojmenován *Bacterium monocytogenes*. Rok poté bylo u písečných rys v Africe izolováno toto onemocnění. Jako počtu lorda *Listeria* bylo toto onemocnění nazváno *Listeria hepatolytica*. Pojmenování *Listeria monocytogenes* bylo domluveno roku 1940, kdy bylo zjištěno, že jsou oba druhy stejné. První případ, který se vyskytl u člověka byl hlášen roku 1929 v Danmarksu. Tento případ popsal Nyfeldt u pacientů, kteří trpěli angínou a mononukleózou, u kterých izoloval mikroba z hemokultury, popřípadě z likvoru u pacientů s meningitidou.

U pacienta přesto první zaznamenaná kultura *Listeria monocytogenes* pochází z roku 1921, byla odebrána ve francii u pacientů s meningitidou. V oblasti Československa se tato hromadná nákaza listeriózy objevila kolem roku 1953 a předtím v Německu roku 1951. (BEDNÁŘ, 1994; BENEŠ, 2009)

1.2 Taxonomie

Tento rod je složen z 18 druhů a můžeme je rozdělit do dvou skupin na základě jejich podobnosti s *Listeria monocytogenes*, které zahrnují *Listeria monocytogenes*, *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria marthii*, *Listeria rocoutiae*, které patří do první skupiny. Druhá skupina zahrnuje *Listeria fleischmanni*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria cornellenis*, *Listeria riparia*, *Listeria booriae*, *Listeria neyorkensis* a *Listeria grandensis*.

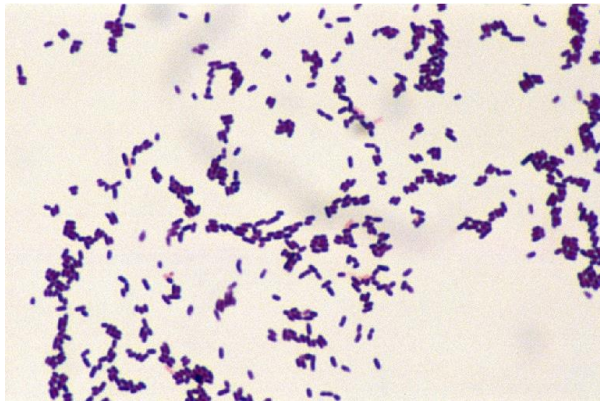
Pouze dva z těchto druhů jsou považovány za patogenní, a to *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii*. (WELLER, 2015; ORSI, 2016)

1.3 Morfologie

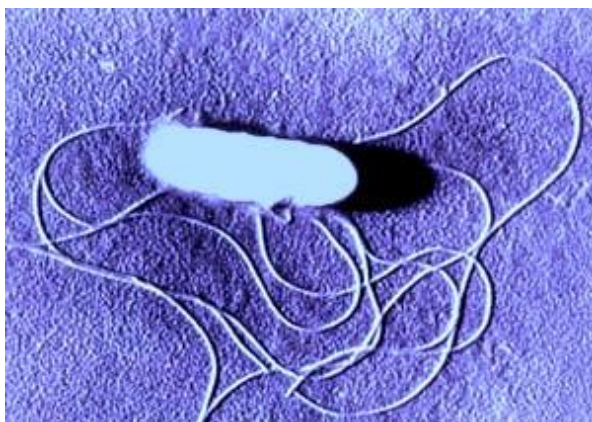
Listeria jsou grampozitivní tyčinky, které mají oblé konce. Jedná se o anaerobní rovné tyčinky, které netvoří spory. Jejich délka je poměrně malá přibližně 0,5 – 2 um. Mohou se v zorném poli mikroskopu vyskytovat buď jednotlivě spojené (krátké řetízky) nebo v menších shlucích. Pohyblivost je jedna z dominantních vlastností pro rod *Listeria*. Je to způsobeno díky přítomnosti (1–4) bičíků, které slouží především k pohybu s předměty a k rotaci.

Proteiny, které tvoří bičíky a jejich exprese závisí na teplotním rozmezí, které je 20–25 °C, což znamená, že pohyblivost je při nižších teplotách (do 25 °C). Při teplotě těla bičíky vymizí. Teplotní rozmezí pro růst je od 1 do 45 stupních celsia.

Rod *Listeria* rostou v pH rozmezí od 4,5 do 9,2, optimální je pH 7. (BEDNÁŘ, 1994; VOTAVA, 2010; PEEL, 1988; SCHINDLER, 2014; PAINTER, 2007; BRYCHTA, 2018)



Obrázek 1 *Listeria monocytogenes* ve světelném mikroskopu, Gramovo barvení, 400x rozlišení (Dostupné 13. 3. 2019 z: <http://www.msevans.com/cnsinfections/listeria.html>)



Obrázek 2 *Listeria monocytogenes* v elektronovém mikroskopu zobrazující přítomné bičíky (Dostupné 13. 3. 2019 z: <http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/eng/micro/listeria.html>)

1.4 Buněčný infekční cyklus

Listeria je invazivní patogen, který může vyvolávat jejich vlastní internalizaci v různých typech buňky, které nejsou normálně fagotické, jako jsou například epiteliální buňky, fibroblasty, hepatocyty, endotel a různé typy nervových buněk, zahrnující neurony. Cyklus začíná přilnutím na povrch eukaryotické buňky a penetrace do hostitelské buňky. Během procesu je membrána cílových buněk těsně uzavřena bakteriální buňkou. Nevytváří žádné okamžité procesy, které jsou typické pro jiné rody jako jsou například rod *Salmonella*. Povaha infekcí, kde je původce rod *Listeria* naznačuje že *Listeria monocytogenes* rozpozná řadu receptorů, které obsahují tyto eukaryotické buňky. Během invaze se *Listeria* stávají propojené s fagotickou vakuolou. Třicet minut po vstupu začnou bakterie narušovat fagozomální membránu a během 2 hodin se dostane k cytoplazmě. Tento krok je nutný pro intracelulární přežití a proliferaci a je zprostředkován hemolysinem s fosfolipázou. Poté se v cytosolu pomnoží bakterie, tato doba trvá přibližně 1 hodinu. (PEEL, 1988)

1.5 Patogenita a výskyt

Mohou být izolovány z různých původních zdrojů jako je půda, voda, potraviny a z exkrementů lidských a zvířecích. (BELL, 2005)

Velice vážné ale i asymptomatické formy onemocnění může mít rod *Listeria*. *Listeria monocytogenes* způsobuje vážné infekce u lidí a různých obratlovců, což zahrnuje domácí a divoké ptáky a savce. (BELL, 2005)

U osob s poruchou imunity nebo u novorozenců může tato nemoc probíhat asymptomaticky. Může napadat dospělé ale i novorozence. Novorozenec je touto nemocí ohrožen jak v děloze matky, tak při porodu i následně po něm. Do těla dospělého může být vnesena nejčastěji dýchacími cestami. Další cesty vniknutí do těla mohou být otevřené rány nebo infekce probíhající v těle. (VOTAVA, 2003)

Jako další velice častý vstup *Listeria monocytogenes* do těla může být zažívací trakt, to konkrétně přenos kontaminovanými potravinami. Jedná se o patogenní bakterii, která přechází ve střevě do buněk plaků a dále pak do ostatních orgánů jako jsou plíce, játra nebo placenta. Některé studie uvádějí že 1 až 10 lidí patří právě mezi bacilonosiče. (HERNANDEZ-MILAN, 2014).

Dalším vstupem může být poraněná kůže nebo poraněná sliznice dutiny ústní, popřípadě poraněné dásně.

Rozšířenost bakterií rodu *Listeria* je velká. Jejich výskyt je možný jak ve vodě, v půdě, rostlinách a ve zvířatech, které žijí volně. Jedná se především o hospodářská zvířata, lovná zvěř a maso připravené z nich. (BRYCHTA, 2018) V konečném důsledku to může vést ke vzniku infekce u člověka. (NIGTHINGALE et al., 2004). Velice častá je kontaminace mléčných výrobků a zeleniny, která je syrová.

Pro zachování bezpečnosti potravin je velice důležité testovat přítomnost *Listeria monocytogenes* i v pokrmech. V rámci EU, tedy i v ČR je právě onemocnění listeriózou a její výskyt na velkém vzestupu. *Listeria monocytogenes* se nejvíce vyskytuje právě v rybích, sýrových a masných výrobcích. (EFSA)

Nenáročnost a velká odolnost rodu *Listeria* vůči okolním podmínkám je velmi vysoká, tedy i velká doba perzistence v potravinářství, především v mlékárenském průmyslu. (NORWOOD, 1999)

Listeria monocytogenes je také šířena ptáky, kteří se volně živí na skládkách. (HELLSTROM et al., 2008)

Tato bakterie byla izolována z člověka, 42 druhů volně žijících i domácích zvířat, 17 druhů ptáků, z ryb, korýšů, mlžů, a much. Může se vyskytovat i v silážích. Příčina hromadných listerióz, která bývá velice častá je použití čerstvého hnoje nebo zalévání kontaminovanou vodou. (BRYCHTA, 2018)

1.6 Virulentní faktory

Jedná se o faktory, které pomáhají mikroorganismům zahájit infekci a usnadňují daný průběh. Virulentní faktory jsou pro *Listeria monocytogenes* důležité především pro vstup do hostitelské buňky a pohyb uvnitř buňky. Faktorů virulence pro rod *Listeria* je opravdu hodně. Patří sem například hemolyzin, fosfolipázy, ActA, internaliny a řada dalších. (MAY et al., 1999)

Harvey a Faber v roce 1941 prokázali první produkci rozpustného hemolyzinu u *Listeria monocytogenes*. Poté Jenkins a jeho kolegové dokázali podobnost hemolyzinu *Listerií* se streptolyzinem O ze *Streptococcus pyogenes*. Kingdon a Sword prokázali, že hemolyzin je inhibován cholesterolem, a také to, že je jeho optimální pH pod 7. Především prokázali cytotoxické vlastnosti v buňkách, které fagocytují. U rodu *Listeria* je velký vzájemný vztah mezi hemolytickou aktivitou a patogenitou. Bylo prokázáno, že náhlá ztráta produkce hemolyzinu vede ke ztrátě virulence. (KAYAL, 2006)

Další z virulentních faktorů jsou fosfolipázy. Patogenní *Listeria* produkují 3 různé enzymy s aktivitou fosfolipázy C, které se podílejí na virulenci. Dva PlcA a PlcB, které se vyskytují v *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii*, třetí SmcL je specifická pro *Listeria ivanovii*. Produkce fosfolipázové aktivity u *Listeria monocytogenes* byla poprvé popsána v roce 1962. Fosfolipáza *Listeria monocytogenes* byla charakterizována jako fosfatidylcholinová cholinfosfohydroláza, která je podobná té, která je zodpovědná za aktivitu lecitináz u *Bacillus cereus* a *Clostridium perfringens*.

ActA je jeden z dalších faktorů virulence a jedná se o aktin polymerační protein, který je produktem actA genu. Má zásadní roly v pohyblivosti a virulenci pro rod *Listeria*. ActA je složen z 639 aminokyselin a je zachycen k cytoplazmatické membráně C-koncem, který obsahuje ActA. (MAY et al., 1999; BLAŽKOVÁ, 2005; THERIOR, 1992)

Internaliny jsou důležité pro zachycení na povrch buňky a pro průnik do jejích nitra. Jedná se o proteiny bílkovinné povahy. Internalin A je protein, který je využíván při invazi transplacentární a k průniku listerií do buněk ve střevě. Do buněk jater se při invazi využívá internalin B. (COSSART, 2001) Principem je přítomnost specifických receptorů, kde se daný internalin A váže na povrchový buněčný transmembránový protein (E-cadherin) na epiteliální buňky střevních klků. (POSFAY-BARBE, 2009)

Mezi další faktory virulence patří například proteiny p60. Jedná se o proteiny, které jsou syntetizovány všemi druhy *Listerií*, ale každý druh má jiné rozdíly v sekvenci aminokyselin, které se dají využívat k následné identifikaci (PCR). (BUBERT, 1992; BUBERT, 1994) Tyto proteiny p60 se podílejí na internalizaci mikroorganismu. (BLAŽKOVÁ, 2005)

1.7 Klinické projevy

Můžeme rozlišit dvě základní skupiny listerióz: jedná se o těhotenskou listeriózu a novorozeneckou listeriózu. Další může být listerióza dospělých. Těhotenská listerióza a listerióza dospělých má v obou případech převládající klinické formy stejné s šířením infekce nebo lokální infekcí v CNS. Listeriózy způsobují velmi těžké nemoci – jedná se o jednu z nejvážnějších bakteriálních infekcí, která může způsobovat smrt i přes důkladnou léčbu antibiotiky. (MCLAUHLIN, 1990)

Listerióza má i další formu, která je velice častá, jedná se o bakteriémii (až 50 % případů), které jsou často spojeny se stavu, kdy je pacient invalidní. Atypické formy listeriózy (až 10

%), do kterých patří endokarditida, pneumonie, hepatitida, cholecystitida, abscesy (které jsou ve většině případů ohraničené), sinusitida atd.

1.7.1 Těhotenská listerióza

Listerióza se může rozvinout kdykoliv během těhotenství. Většinou se tato infekce vyskytuje ve třetím trimestru, a to díky snížené imunitě těhotných. Na začátku těhotenství tato nemoc nemusí být často detekována. Těhotné ženy infikované *Listeria monocytogenes* mohou mít pouze lehké příznaky jako jsou horečka, bolest hlavy, bolest kloubů a gastrointestinální potíže. Jedná se především o příznaky, které by mohly být zaměněny za příznaky chřipky. (BECROFT, 1971) Ženy mohou mít často přechodné příznaky, které mohou komplikovat těhotenství, kdy může dojít k přenosu infekce přes placentu, což bývá často způsobeno špatnou detekcí imunitního systému matky již na počátku infekce. (SCHUCHAT, 1991) Infekce plodu se často nazývá granulomatosis infantiseptica (septická granulomatóza), která se často projevuje tvorbou malých abscesů a granulí v játrech, ve slezině a kůži novorozence. (LECUIT, 2007)

Včasná diagnostika a léčba antibiotiky během těhotenství může zabránit onemocnění novorozenců. Pokud má některá z žen v anamnéze onemocnění listeriózou, je této ženě doporučena právě tato léčba jako profylaxe antibiotiky. (SCHUCHAT, 1991)

1.7.2 Novorozenecká listerióza

Listeriózu tohoto typu lze rozdělit podle rychlosti nástupu příznaků na časnou a pozdní. Časná listerióza je způsobena především intrauterinní infekcí, která může u novorozence při narození nebo krátce po narození způsobit klinické příznaky (až 7 dnů po porodu), což bývá nejčastěji sepse. Méně často se mohou projevit příznaky meningitidy. (SCHUCHAT, 1991)

Nejvyšší koncentrace bakterií se vyskytují v plicích a střevech, infekce je tedy z infikované plodové vody. Z infikované plodové vody je také přenášena již zmíněná septická granulomatóza, která je častějším příznakem než meningitida. (BECROFT, 1971; LORBER, 1997)

Pozdní listerióza má nástup několik dnů až týdnů po narození. (SCHUCHAT, 1991) Forma, která se vyskytuje často u pozdního onemocnění je meningitida. (GREENWOOD, 1999)

Novorozenecká listerióza je u asi 8,6 na 100000 narozených dětí, a to z důvodu transplacentárního přenosu nebo při vdechnutí plodové nody. (DE LUCA et al., 2015)

Tabulka 1 Charakteristika novorozenecké listeriózy (Převzato z: GREENWOOD, 1999)

	Typ infekce	
	časná	pozdní
Začátek po porodu	<2 dny	> 5 dní
Faktory matky: <ul style="list-style-type: none"> - Obtížný porod - Nízká porodní hmotnost - Horečnaté onemocnění - Abnormální amniová voda 	časná	vzácná
Zdroj infekce	Matka	Nemocniční původ a získaná od matky
Příznaky	Diseminovaná infekce, exantém, kardiopulmonální potíže, znaky postižení CNS	Meningitida, dráždivost, nechutenství, horečka
Laboratorní nález	Leukocytóza a leukopenie, trombocytopenie, stíny na RTG hrudníku	Leukocytóza, RTG změny, mozkomíšní mok: bílkoviny a leukocyty zvýšeny
Místo izolace	Nejčastěji krev, povrch těla, amniová a mozkomíšní tekutina	Mozkomíšní mok, méně často krev
Mortalita	30-60 %	10-12 %

1.7.3 Meningitida

Meningitida je nejčastější forma listeriózy u dospělých. Klinicky lze toto onemocnění špatně diagnostikovat a odlišit od meningitidy jiné příčiny (pneumokokové nebo meningokokové). (GREENWOOD, 1999; MURRAY, 1990) Tato nemoc je pozorována spíše u pacientů nad 50 let. (BROUWER, 2006)

Listeriózy u dospělých se, často vyskytují u mužů či žen, které nebyly těhotné. Tato nemoc postihuje CNS. Meningeální formy jsou pozorovány v některých případech, ale nejčastěji se infekce rozvíjí v mozkové oblasti doprovázené závažnými změnami ve vědomí a v některých případech dokonce i paralýzou lebečních nervů.

V některých studiích je odhadováno, že asi 10 % bakteriálních meningitid je způsobeno právě *Listeria monocytogenes* a šířeno v rámci populace. Pokud je infekce CNS spojena s jiným onemocněním, které výrazně oslabuje pacienta je míra úmrtnosti až 40–60 %. Díky vysoce účinnému očkování proti *Haemophilus influenzae*, patří *Listeria monocytogenes* mezi čtvrtou nejčastější příčinu meningeální infekce u dospělých osob.

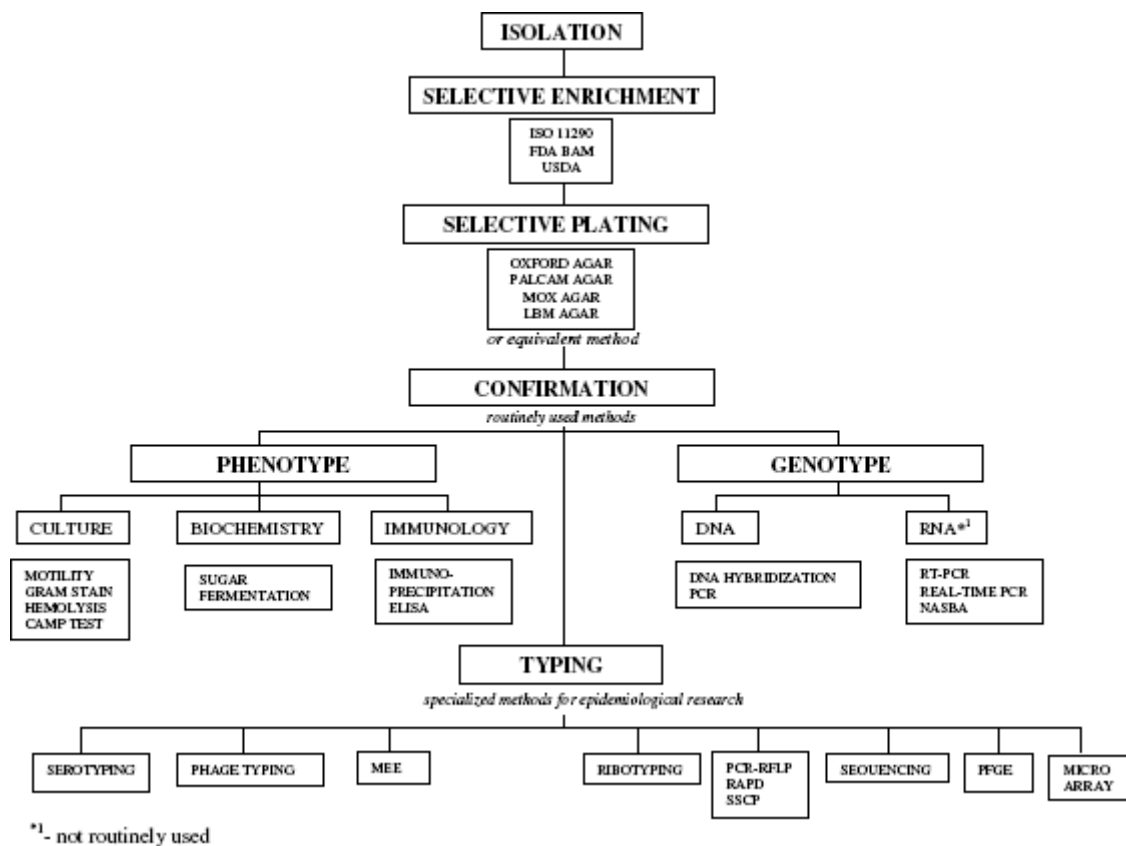
Mezi bakterie, které tuto příčinu předběhly patří například *Streptococcus pneumoniae* a *Neisseria meningitidis*. U pacientů s vysoce oslabenou imunitou jako je například rakovina, patří mezi nejčastější příčinu *Listeria monocytogenes*. (LORBER, 1996; NIEMAN, 1980; SCHUCHAT, 1997)

1.7.4 Bakteriémie

Jedná se o onemocnění, které častěji postihuje muže a pacienty s nádory krve nebo u pacientů po transplantaci ledvin. (GREENWOOD, 1999; MURRAY, 1990)

IDENTIFIKACE *LISTERIA MONOCYTOGENES* V KLINICKÉM MATERIÁLU

Základem při diagnostice je zjištění infekčního agens vyskytující ho se ve vzorku. Izolace listerióz se nejčastěji provádí na krevním agaru, živném agaru nebo na selektivních půdách u vzorků, které jsou kontaminované. Hemokultura, krev, mozkomíšní moc, hnis z rány, amniová voda, gynekologické odběry a vzorky z biopsie, pokud možno s granulomy (vyskytující se nejčastěji v játrech, mozku a slezině) mohou být dobrým materiálem pro diagnostiku. Průkaz rodu *Listeria* z urogenitálního traktu a stolice se provádí u nosičů. U ověřeného výskytu listeriózy je nutné hlásit. (KOLÍNSKÁ et al., 2012)



Obrázek 3 Postup a průběh identifikace *Listeria monocytogenes* (Převzato z: GASANOV, 2005)

Daný kmen se dá diagnostikovat na základě vlastností, které jsou pro rod *Listeria* typické jako jsou pohyblivost, tvar, biochemické vlastnosti, produkce hemolyzinů a snížení jejich hemolytické aktivity, což je způsobeno působením solubilních produktů druhu *Rhodococcus equi* a *Corynebacterium ovis* (podobné jako u streptokoků – CAMP test). Ověřování virulence se provádí u jednotlivých kmenů na pokusném zvířeti. Sérotypizace by měla být provedena u každého kmene. Kultivace trvá poměrně dlouhou dobu, proto se využívá také metoda PCR pro rychlejší diagnostiku. (BEDNÁŘ, 1994; JANČOVÁ, 2007)

Stolice, stěry z dutiny ústní, poševní výtěry a další jsou materiály kontaminované, u kterých se používá půda selektivní, jako je *Listeria selective agar*, kde jsou mikroorganismy další potlačeny, a to především jejich růst. (JANČOVÁ, 2007) Mezi rychlé diagnostické testy patří přímý průkaz mikroorganismu monoklonálními značenými protilátkami (EIA, imunofluorescence). (BEDNÁŘ, 1994)

Základem je rychlá diagnostika *Listeria monocytogenes* z důvodu zabránění šíření a následné úmrtnosti pomocí specifikace fenotypových a genotypových vlastností *Listeria monocytogenes*. (LIU et al., 2006a)

Přímo lze mikroba nalézt ve vyšetřovaném vzorku. Daného mikroba, pak můžeme mikroskopicky pozorovat nebo ho můžeme izolovat na kultivačních půdách. Dále ve vzorku můžeme zjišťovat přítomnost složek mikroorganismu (antigenu, nukleových kyselin). Nepřímý průkaz mikroba se zakládá na průkazu protilátek, popřípadě průkazu serologickém. (VOTAVA, 2005)

K odlišení *Listeria monocytogenes* od ostatních avirulentních druhů v potravinách se využívá řada metod, jako je sérotypizace, typizace plazmidů, typizace fágů, různých biochemických testů a multilokusové enzymové elektroforézy. (HOWARD, 1992)

1.8 Mikroskopie

Jedná se o velice starou metodu, která se datuje k druhé polovině 17. století. Důležitým doplněním jsou barviva pro lepší rozlišení struktur, které chceme pozorovat. Díky tomuto vyšetření dostáváme základní informace o dané bakterii. (BEDNÁŘ, 1994; KALHOTKA et al., 2014). Často se mikroskopicky vyšetřuje likvor. Pokud je v tomto vzorku málo bakterií může být tato metoda negativní, což může být zkreslený výsledek při diagnostice mikroskopicky. (VOTAVA, 2003) Jedná se o velice rychlou a levnou metodu. (VOTAVA, 2005)

1.8.1 Nativní preparát

Zde se využívá jevu, kdy bakterie mají typický pohyb, který je vidět pouze při inkubaci v pokojové teplotě. Pokud jsou tyto mikroorganismy vystaveny působením jiné teploty, jako je teplota v termostatu, tuto vlastnost pohybu ztrácí. Principem je ztráta bičíku a tím i ztráta jejich pohyblivosti. (VOTAVA, 2010) Tato metoda se při diagnostice listerióz využívá velice málo, daleko častěji se preparát barví. (VOTAVA, 2005)

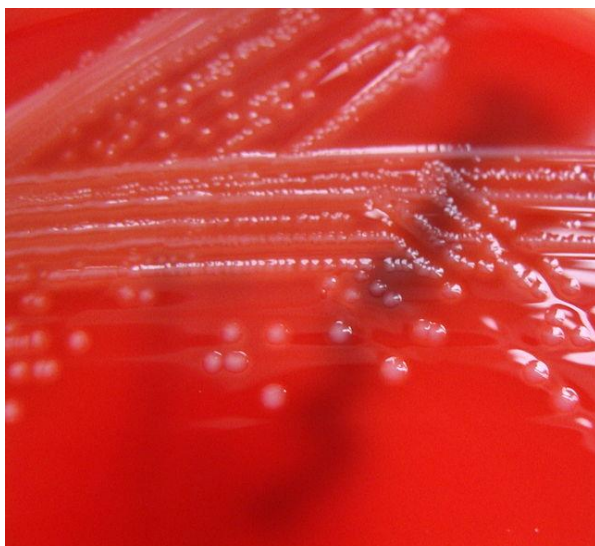
1.8.2 Barvení dle Grama

Tento typ barvení je velice často využíváný, především pro ekonomickou nenáročnost a rychlost. Dostáváme informace o přítomnosti daných mikrobů, o jejich velikosti, tvaru a uspořádání. (VOTAVA, 2005) Nejdůležitější část pro identifikaci je buněčná stěna, která odděluje buňku od prostředí. Můžeme rozlišit gramnegativní a grampozitivní mikroorganismy podle stavby a struktury buněčné stěny. Důležitá je vrstva peptidoglykanu, která zodpovídá za ohebnost a pevnost buněčné stěny. Silná vrstva peptidoglykanu se vyskytuje právě u grampozitivních bakterií, kam patří i *Listeria monocytogenes*. Gramnegativní bakterie mají tenkou vrstvu peptidoglykanu. Při barvení podle Grama, grampozitivní bakterie zadržují dané barvivo (krystalovou violet). Po další části barvení, kdy se moří dále (jodovým) roztokem nedojde k odbarvení na rozdíl od gramnegativních bakterií. Již zmíněná silná vrstva peptidoglykanu obsahuje u grampozitivních bakterií určité množství kyseliny teichoové, která se u gramnegativních bakterií nevyskytuje. (KALHOTKA et al., 2014)

1.9 Kultivace

Jedná se o techniku, která má taky jako mikroskopie velice dlouhou historii. Následuje ihned po izolaci daného mikroorganismu. Příčina velké využívanosti kultivace je především testování daného kmene k citlivosti na antibiotika. (VOTAVA, 2005) Principem je nárůst mikrobů, kdy nám tato metoda dovoluje prokázat vlastní mikroorganismus, diagnostika by bez nárůstu byla velice obtížná. Úspěšnost je zajištěna správným odběrem a transportem do laboratoře. (BENEŠ, 2009) *Listeria monocytogenes* vytváří kolonie různé barvy v závislosti na použitém médiu. (BRYCHTA, 2018)

Rostou v poměrně širokém teplotním rozmezí 30-37 °C při inkubaci 24 hodin vyrůstají na MPA agaru ve velkých a hladkých průhledných koloniích s pravidelnými okraji. *Listeria monocytogenes* na KA s 5 % beraní krve, popřípadě koňské či králičí krve, tvoří šedostříbrné kolonie se zónou hemolýzy, která nepřesahuje okraje kolonie na rozdíl od *Listeria ivanovii*, kdy je zóna hemolýzy široká a na ni navazuje zóna neúplné hemolýzy.



Obrázek 4 *Listeria monocytogenes* na krevním agaru (Dostupné 13. 3. 2019 z: <https://medium.com/@MicrobeADay/listeria-monocytogenes-646c323d0039>)

Listeria má velmi malou kultivační náročnost. V běžných i extrémních podmínkách, jako jsou například slabě alkalické půdy je *Listeria* schopna růst a pomnožovat se poměrně dobře. Jsou schopny přežívat i mimo organismus samotného hostitele, což je způsobeno díky jejich kultivační nenáročnosti. Schopnost růstu v teplotě podobné teplotě v lednici je velkou výhodou při analýze nadměrně kontaminovaných vzorků. Generační doba je při nižších teplotách delší (až 40 hodin) než při teplotě vyšší (až 13 hodin), proto je nižší teplota pro *Listeria* příznivější. (BRYCHTA, 2018; BEDNÁŘ, 1994)

Rozpustné hemolýziny do prostředí jsou schopné tvořit *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* a *Listeria seeligeri*. Přítomnost hemolýzinů je jedna z rozlišovacích znaků těchto druhů. Na krevním agaru může být *Listeria ivanovii* chybně zaměněna s beta hemolytickými streptokoky, protože jsou taky schopny tvořit velkou zónu beta hemolýzy. Hemolýzu ostatní druhy neprodukují. (BEDNÁŘ, 1994)

Speciální půdy je potřeba použít pro záchyt daných patogenů. Oxford agar je jedno ze selektivních médií, kde rod *Listeria* díky hydrolýze eskulinu, kolem sebe tvoří černou zónu. (BRYCHTA, 2018) Tato půda obsahuje inhibitory, jako je chlorid lithný, cykloheximid, kolistin, akriflavin, cefotetan a fosfomycin. Substrátem je zde právě eskulin.

Dalším selektivním médiem je PALCAM agar, kde pozadí těchto kolonií je černé společně s koloniemi. Indikátorem je zde citrát amonno-železitý a fenolová červen. Eskulin a mannitol jsou zde substráty, kde je stejně jako u Oxford media eskulin hydrolyzován na glukózu a eskuletin, který reaguje s ionty železa. (MOSIO, 2012)



Obrázek 5 PALCAM agar s *Listeria monocytogenes* (Dostupné 13. 3. 2019 z: <https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xlm/xlm08-10.html>)

Na půdě ALOA (Agar pro rod *Listeria* podle Ottavianiho a Agostiho) roste tato bakterie barvou modrozelené způsobené aktivitou galaktosidázy a obklopené průhlednou zónou precipitace díky aktivitě fosfolipázy C. (BRYCHTA, 2018) *Listeria monocytogenes* po 24 hodinách a *Listeria ivanovii* po 48 hodinách inkubace štěpí L-alfa-fosfatidylinositol, a to se projevuje zakalenou zónou. (MOSIO, 2012)



Obrázek 6 *Listeria monocytogenes* na ALOA agaru (Dostupné 13. 3. 2019 z: <https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xlm/xlm05-07.html>)

Tabulka 2 Klasifikace základních druhů *Listeria* podle kultivačních vlastností (Převzato z: GREENWOOD, 1999)

Druh	Hemolýza	Redukce nitrátů	CAMP test	
			S. aureus	R. equi
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	++	-	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	-
<i>L. grayi</i>	-	-	N	N
<i>L. murrayi</i>	-	+	N	N

N - není známo

1.10 Biochemická identifikace

Jedná se o identifikaci biochemických a fyziologických vlastností daného kmene. (VOTAVA, 2005)

1.10.1 API *Listeria* test

Jedná se o biochemický test, který je schopný identifikovat všechny druhy *Listeria*. Skládá se z 10 mikrozkušavek z nichž každá obsahuje substrát pro testování enzymových reakcí, popřípadě fermentací sacharidů na základě jednotlivých druhů *Listerií*. Vizuální hodnocení je základem závěrečné diagnostiky. (BLAŽKOVÁ, 2005; BILLE, 1992)



Obrázek 7 API *Listeria* pozitivní test (Převzato z: FAROUK, 2015)

1.10.2 Rapid L. mono test

Identifikace je založena na průkazu modrého zbarvení na médiu Rapid L. mono a to na přítomnosti aktivity enzymu fosfolipázy a na možnosti využít xylózu, což se projeví kolem kolonií žlutou zónou. *Listeria monocytogenes* neumí využít xylózu a má aktivitu fosfolipázovou. (BLAŽKOVÁ, 2005)

1.10.3 CAMP test

CAMP test je pojmenován pro objevitelích (Christie, Atkins a Much-Peterson) v roce 1944 a používá se pro identifikaci hemolytických druhů *Listeria*. CAMP test lze využít k rozlišení *Listeria monocytogenes* od *Listerie ivanovii*. *Listeria monocytogenes* má větší zónu beta – hemolýzy než *Listeria ivanovii*. (VOTAVA, 2005)

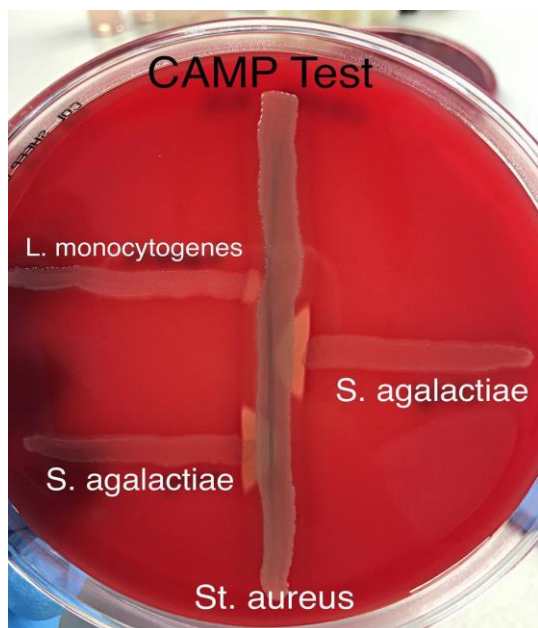
U *Listeria ivanovii* je CAMP test negativní na rozdíl od *Listeria monocytogenes* s bakterií *Staphylococcus aureus*. *Listeria monocytogenes* se proužkuje v pravém úhlu k pruhu *Staphylococcus aureus* na agar s přidavkem ovčí krve. Tento agar se inkubuje při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. (ACHARYA, 2013; MCKELLAR, 1994; VOTAVA, 2010)

Pro CAMP test lze využít i bakterii *Rhodococcus equi*, kde je naopak test s *Listeria ivanovii* pozitivní. (VOTAVA, 2010)



Obrázek 8 CAMC test – *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* (Dostupné 20. 4. 2019 z: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/listeria-monocytogenes-photos/listeria-monocytogenes-camp-test.html>)

Je velice velká podobnost kolonií *Listeria* a kolonie *Streptococcus agalactiae* na krevním agaru. (VOTAVA, 2010)



Obrázek 9 CAMP test – *Streptococcus agalactiae* a *Staphylococcus aureus* (Dostupné 20. 4. 2019 z: https://www.pictame.com/media/1224542815594752825_1354617)

1.10.4 Katalázový test

Principem je přítomnost enzymu katalázy, který štěpí peroxid vodíku na kyslík a vodu. Postup tohoto testu je velice jednoduchý, kdy se 3 % peroxid vodíku kápne na podložní sklíčku a rozmíchá se s bakteriální kolonií. Pozitivní reakce u *Listeria monocytogenes* je pozorována jako unikání bublinek. (VOTAVA, 2010)

1.10.5 Fermentace cukrů

Tabulka 3 Klasifikace vybraných druhů listerióz podle biochemických znaků (Převzato z: GREENWOOD, 1999)

Druh	Okyselení			
	D-manitol	D-xylóza	L-ramnoza	Alfa-methyl.D.manosid
<i>L. monocytogenes</i>	-	+	-	+
<i>L. ivanovii</i>	-	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	R	-	+
<i>L. welshimeri</i>	-	R	+	+
<i>L. seeligeri</i>	-	-	+	R
<i>L. grayi</i>	+	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	+	R	-	-

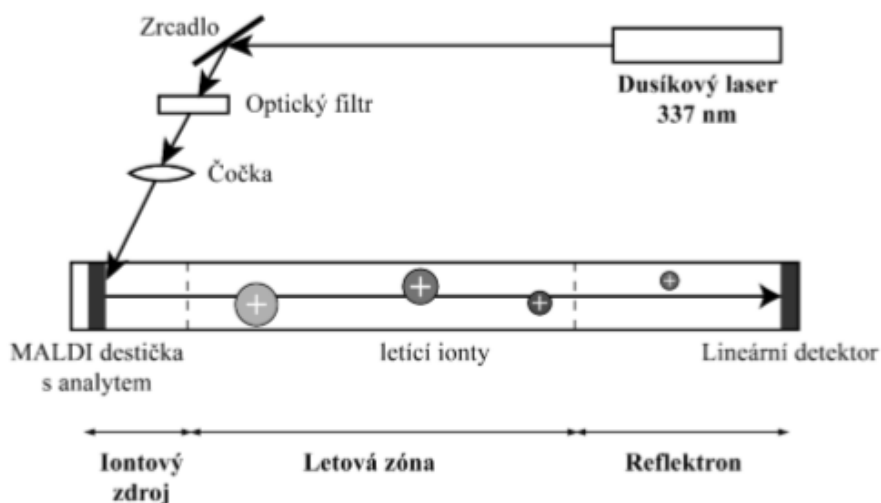
R – různé reakce

1.11 Druhov identifikace mikroorganismů hmotnostní spektrometrií MALDI – TOF MS

Jedná se o metodu, pomocí nz provádíme velice rychlou identifikaci bakterií, plsn a kvasinek izolovaných z různých typů biologického materiálu, jako jsou potraviny a zvrata, pomocí hmotnostní spektrometrie. Jedná se o metodu velice přesnou, je ji možno použít na ˇsirouk ˇsklu mikroorganismů a je poměrně levn. Individuln kolonie mikroorganismů jsou využívány k identifikaci a přeneseny do nosiˇce target MALDI a nsledn usuˇseny a oˇeteny speciln matriˇc.

Dan vzorek je druhov identifikovan porovnáním jeho hmotnostního spektra s databází, kter obsahuje velké množství referenˇcnch indikátorů zskan pro jednotliv kmeny mikroorganismů. Vyhodnocení výsledků je vždy na daném mikrobiologovy. V některých případech je potřeba provést řadu doplňkových vyˇetren. (BRYCHTA, 2016; FERREIRA, 2011)

MALDI-TOF MS je duleitm nástrojem pro rutinn identifikaci, jedná se o metodu, která velmi ˇasto nahrazuje Gramovo barvení a nroˇcnj biochemick identifikace. Dříve byla tato metoda velice finanˇcn nroˇcn, ale postupem ˇasu se snzily náklady a díky tomu se rozˇsřilo i pouzt této metody v mnoha zemích Evropy a Asie. (FALL et al., 2015)



Obrázek 10 Schéma MALDI-TOF MS (Převzato z: BURSOVÁ et al., 2014)

1.12 Imunochemické metody

Principem imunochemických metod je reakce protilátek s antigenem. Základem je použití protilátek proti antigenním strukturám, které jsou typické pro mikroorganismy rodu *Listeria*. (BLAŽKOVÁ, 2005)

Mezi nejčastější metodu patří ELISA. V tomto testu jsou dané protilátky proti rodu *Listeria* imobilizovány na mikrotitrační jamce pro přichycení antigenů *Listerií* společně se sekundárními protilátkami, které jsou navázány na příslušný enzym. Nejvíce využívané jsou tyto testy pro testování potravin, zejména pro velice rychlou a snadnou detekci. Výsledek je možné odečíst již po 30-50 hodinách. (BELL, 2005; BLAŽKOVÁ, 2005) Tato metoda má řadu výhod jako je možnost automatizace a existence souprav protilátek proti většině mikrobů, a to ve všech třídách imunoglobulinů. Vysoká cena je jedna z nevýhod této metody.

Jedná se o metody, které jsou velice rychlé a jednoduché i pro velký počet vzorků. (BLAŽKOVÁ, 2005)

1.13 Molekulární metody

Jsou založeny na typizaci kmenů a to metody, jejichž základem je vyšetření DNA. Restriční endonukleázy štěpí DNA na fragmenty, které jsou rozděleny v elektrickém poli. Tento profil je pro daný mikroorganismus jedinečný. Tyto techniky nám umožňují prokázat daný kmen s jistotou. (VOTAVA, 2005)

Typizační metody se využívají k zjištění nedodržení postupů při výrobě nebo dalších procesech související s manipulací s danou potravinou. Jedná se o metody, které jsou nutné k rozlišení perzistentních a neperzistentních kmenů, které se vyskytují v potravinářských výrobnách a provozech. Je možné určit, kde se daný mikroorganismus vyskytuje a kde dochází ke kontaminaci potravin. (KARPÁŠKOVÁ, 2011)

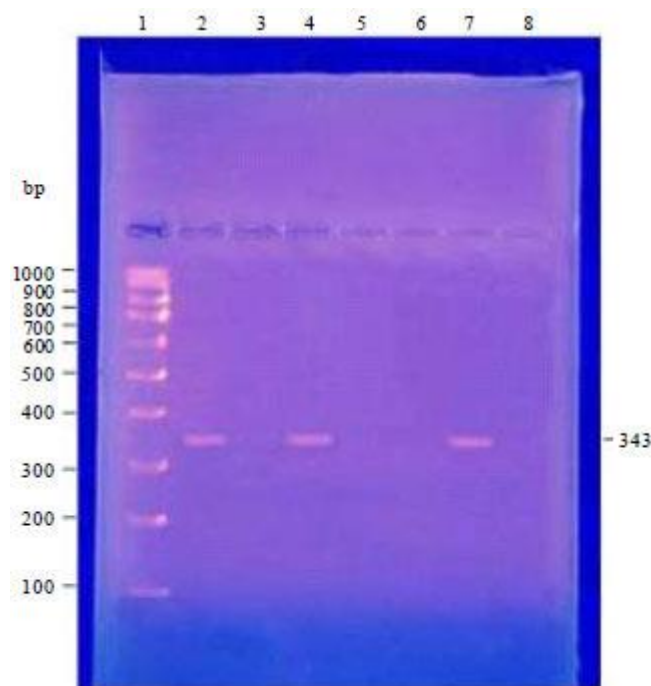
1.13.1 Průkaz bakteriálních nukleových kyselin

Průkaz DNA pomocí metody bez amplifikace se prokazuje pomocí tzv. genové sondy. Což je úsek jednovláknité DNA, který je komplementární k DNA daného mikroorganismu, kde dochází k jejich hybridizaci (vazbě). Genomová sonda se zviditelní, díky tomu, že byla označena.

Nejpoužívanější metodou amplifikace (zmnožení) DNA je PCR (polymerázová řetězová reakce), kde dochází k opakování několika kroků. V první reakci dochází k rozdělení dvojité

šroubovice DNA na dvě vlákna pomocí denaturace teplem. V druhém kroku jsou na tyto vlákna připojeny krátké syntetické nukleotidy (primery), kdy dochází k ohraničení DNA. Tento krok proběhne po krátkém ochlazení, daný úsek DNA je v tomto kroku ohraničený. V posledním kroku se primery prodlužují a na každém z vláken vzniká kopie hledané sekvence DNA, podstatné je, aby reakce probíhala za přítomnosti důležitých složek a enzymů. Všechny popsané reakce jsou schopné proběhnout pouze za dané teploty. (VOTAVA, 2005)

Tato metoda se často využívá k testování likvoru na přítomnost DNA *Listeria monocytogenes*. (LE MONNIER et al., 2011)



Obrázek 11 PCR technika na agarovém gelu, dráha 1: žebřík DNA, dráhy:2, 4, 7- *Listeria monocytogenes*, dráhy: 3, 5, 6, 8- negativní výsledky (Převzato z: FAROUK, 2015)

Další metodou je DNA hybridizace, což je velice jednoduchá a často používaná metoda pro identifikaci *Listeria monocytogenes* v potravinách. (GASANOV, 2005)

IDENTIFIKACE *LISTERIA MONOCYTOGENES* Z IZOLÁTU V EPIDEMIOLOGII

Jde o metody, které jsou založené na druhově specifických proteinech nebo genech. Tyto metody se musí zaměřovat na epidemiologické shody. (GASANOV, 2005)

Typizační metody jsou často využívány k detekci bakterií a zjištění jejich genotypu. (BURSOVÁ, 2014)

1.14 Subtypizační metody

Tyto metody jsou využívány k rozlišení jednotlivých druhů *Listerií*. Sérotypizace je univerzální technika, která se dělá jako základ pro další metody subtypizace. Jedním z cílů subtypizace izolátů druhů *Listeria* je zajistit přesnější srovnání klinických a environmentálních vzorků na rozdíl od sérotypování. (SCHUCHAT, 1991)

1.14.1 Ribotypizace

Ribotypizace je příkladem subtypizační metody, jejich základem jsou polymorfismy restričních fragmentů rRNA genu. (NADON, 2001; GENDEL, 2000)

Tato metoda je založena na různých typech ribozomálních genů nebo proteinů a je velice často využívaná pro epidemiologické výzkumy i pro rutinní praxi. (GASANOV, 2005)

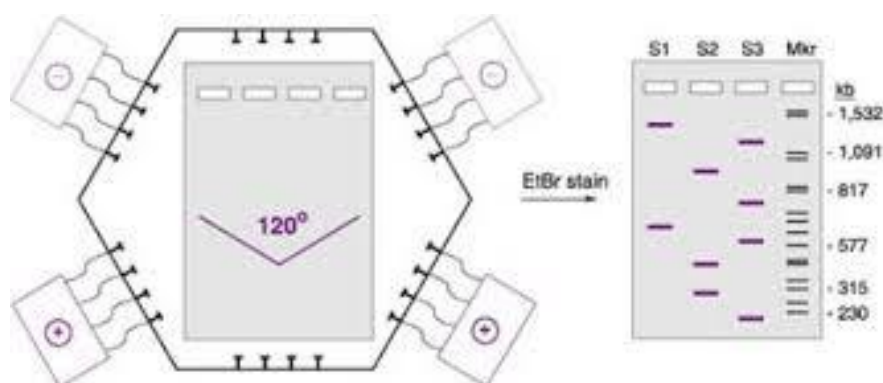
1.14.2 Elektroforéza v pulzním poli (PFGE)

Elektroforéza v pulzním poli je složena z několika kroků, které zahrnují vložení mikroorganismu do agaru, lýzu daného organismu in situ a štěpení chromozomální DNA restričními endonukleázami. Fragmenty DNA jsou většinou štěpeny v systému PFGE CHEF. Rozdíly v profilech nám umožňují genetické srovnání mezi kmeny. Profily musí být dobře viditelné jinak nemohou být hodnoceny. (FELIX, 2012) Tato metoda se často používá k charakterizaci kmene a typizaci epidemiologických a kontaminačních zkoušek *Listeria monocytogenes*. (TENOVER, 1995)

Tato metoda byla často využívána k identifikaci epidemiologie a molekulární biologie jiných rodů k získání map bakteriálních genomů. (HOWARD, 1992)

Jedná se o metodu molekulární subtypizace, která odlišuje více sérotypů než již zmíněná sérotypizace. Zabývá se rutinní subtypizací lidských izolátů *Listeria monocytogenes* a to v souvislosti s kontrolou vypuknutí listeriózy u člověka. Díky národní síti PulseNet bylo

patrné snížení ohnisek listeriózy přenášených potravinami. (FUGETT, 2007) Tato databáze byla zřízena roku 1996 Centrem pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC), kde jsou vzorky z PFGE z izolátů patogenních bakterií z potravin a informace o nich. (HUNTER, 2005)



Obrázek 12 PFGE (Dostupné 20.4. 2019 z: https://is.muni.cz/el-1431/podzim2014/Bi7311/um/Pulzni_gelova_elektroforeza.pdf?lang=cs)

1.15 Sérologická typizace

Metoda sérologie dělí rod *Listeria* na sérovary na základě antigenů. Tato metoda je velice kvalitní a spolehlivá ale přesto se v současné době používá v malém počtu laboratoří. (PAINTER, 2007)

Rod *Listeria* má sérovary dle tělových antigenů (O – antigeny) a bičíkových antigenů (H-antigeny). (VOTAVA, 2003)

Tato metoda je založena na protilátkách, které specificky reagují s O-antigeny nebo H-antigeny. Často se používá k určení sérotypů v epidemiologických studiích. (GASANOV, 2005)

Největším úspěchem v objasnění vnitřní genetické struktury rodu *Listeria* byla právě sérotypizace. První schéma antigenní struktury bylo popsáno Patersonem, který popsal první čtyři sérovary. Postupem času bylo toto schéma doplněno o nové sérovary. (PAINTER, 2007)

V dnešní době můžeme dané kmeny rozčlenit do čtyř linií, které se evolučně liší. Většina izolátů *Listeria monocytogenes* patří do prvních dvou linií. Sérotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e patří do linie číslo I, sérotypy 1/2a, 3a, 1/2c, 3c patří do linie II. Sérotypy 4a, 4c a 4b patří do linie III a IV. (GELBÍČOVÁ, 2017; KOUDELKA, 2018)

Ve většině případů listeriózy vyskytující se u člověka je způsobená sérotypy 1/2a, 1/2b a 4b. Jedná se jen o tyto 3 sérovary. Z tohoto důvodu je tato epidemiologická metoda velice málo používaná. (PAINTER, 2007)

Tabulka 4 Sérovary rodu *Listeria* (Převzato z: BEDNÁŘ, 1994)

Paterson	Seeliger Donker-Voet	O-antigen	H-antigen
1	1/2a	I II (III)	AB
	1/2b	I II (III)	ABC
2	1/2c	I II (III)	BD
3	3a	II (III) IV	AB
	3b	II (III) IV (XII XIII)	ABC
	3c	II (III) IV (XII XIII)	BD
4	4a	(III) (V) II IX	ABC
	4ab	(III) V VI VII IX X	ABC
	4b	(III) V VI	ABC
	4c	(III) V VII	ABC
	4d	(III) (V) VI VIII	ABC
	4e	(III) V VI (VIII) (IX)	ABC
	7	(III) XII XIII	ABC
<i>L. ivanovii</i>	5	(III) (V) VI (VIII) X	ABC
<i>L. innocua</i>	6a	(III) (V) VI VIII X	ABC
	6b	(III) (V) VI VII IX X XI	ABC
<i>L. grayi</i>		(III) XII XIV	E

() ne vždy přítomné

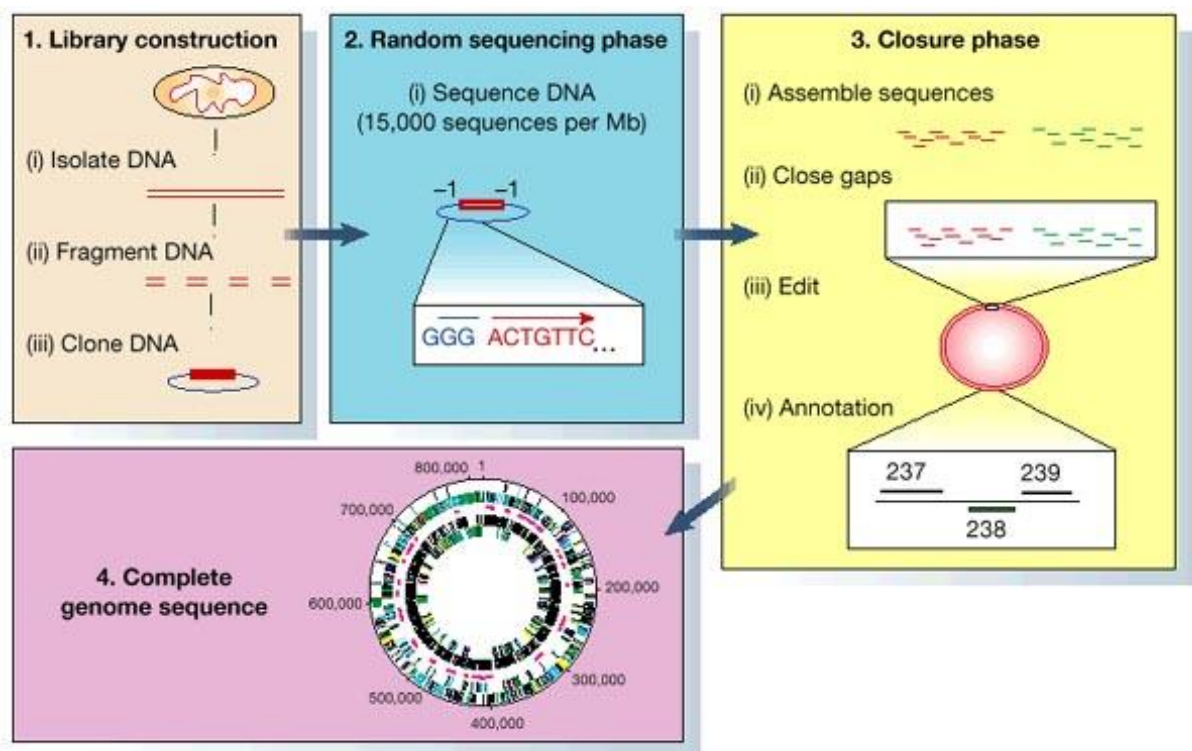
1.16 Multilokusová enzymová elektroforéza (MLEE)

Jedná se o velice častou molekulovou metodu, která je určena pro studium genetické struktury a epidemiologie patogenních druhů bakterií. Tato metoda je založena na porovnávání změn v aminokyselinových sekvencích enzymů, a to má za následek změnu v mobilitě. Na základě elektroforetické mobility lze vzorky třídit do několika typů. (GASANOV, 2005) Na této metodě je založena metoda MLST (Multilokusová sekvenční typizace), která byla primárně navržena k testování *Neisseria meningitidis* a postupem času validována na další bakterie jako jsou *Streptococcus pneumoniae*, *pyogenes* a *Staphylococcus aureus*. (SALCEDO, 2003; RAGON, 2008)

1.17 Celogenomové sekvenování

Srovnání sekvenování celého genomu daných kmenů je v současné době prováděno. V dnešní době jsou kompletní genomové sekvence *Listeria monocytogenes* (sérotyp ½ a), (sérotyp 4 b), *Listeria innocua* (sérotyp 6 a), *Listeria welshimeri* (sérotyp 6 b), *Listeria seeligeri* (sérotyp ½ b) a *Listeria ivanovii* (sérotyp 5). Ostatní jsou postupně dokončovány. (GLASER, 2001; NELSON, 2004.) Genomy *Listeria* jsou kruhové chromozomy o velikosti do 3,0 Mb. Sekvence genomu kóduje asi 2800 genů kódujících protein, kdy asi 65 % má přiřazenou funkci. (HAIN, 2006)

Pomocí sekvenování celého genomu od roku 2015 probíhá v Rakousku, Dánsku, Finsku, Švédsku a Spojeném království ohnisko *Listeria monocytogenes*. V tomto případě se jedná o kontaminovanou zmraženou zeleninu. ECDC plně podporuje sekvenování celého genomu u lidských izolátů, které mohou být spojeny s tímto ohniskem a podporuje v tomto testování země, které tento test běžně neprovádějí, a to především z důvodu finanční náročnosti. (EFSA, 2018)



Obrázek 13 Jednotlivé kroky Celogenomového sekvenování (Převzato z: FRASER, 2000)

Sekvenování celého genomu s následnou analýzou je velice dobrý nástroj k rozlišení izolátů, které nejsou rozlišitelné jinými metodami jako je PFGE.

WGS může fungovat jako epidemiologický nástroj k identifikaci velmi podobných izolátů a může být také použit k identifikaci ostrovů patogenicity. (HILLIARD, 2018)

Tato metoda v budoucí době bude představovat jednu z možností, jak získat co nejvíce informací o daném mikroorganismu v co nejkratší době. (BURSOVÁ, 2014) Jedná se především o technologii, která se zabývá vypuknutím nemoci, jako je právě Listerióza. (KWONG, 2016)

Během posledních pár let se zavádí WGS spolu s cgMLST (core-genome) což velice usnadňuje porovnatelnost v rámci laboratoří. Metoda cgMLST byla poprvé popsána v Rakousku a Německu v letech od 2011 do roku 2013. Typizace potravinových a lidských izolátů pomocí WGS v reálním čase ulehčuje slučování potravinových izolátů s lidskými, aby došlo k zastavení přenosu *Listeria monocytogenes*. (HALBEDEL, 2018)

Metoda cgMLST analýza je založena na porovnávání 1701 genů *Listeria monocytogenes*. (RUPPITSCH, 2015)

1.18 REA a RAPD

Obě tyto metody jsou prováděny za účelem zjistit původ a cesty šíření *Listeria monocytogenes*. (AGUADO et al., 2004; ELLIOT, 2007)

Metoda REA byla v poslední době použita k identifikaci *Listeria monocytogenes* ve spojení s epidemiemi v Los Angeles, Novém Skotsku a ve Švýcarsku. (AGUADO et al., 2004) Je to technika štěpení a rozpoznávání určité sekvence v molekulách DNA a je prováděna díky restrikcčním enzymům.

RAPD je metoda založená na PCR a využívá náhodných primerů pro náhodnou amplifikaci fragmentů DNA. Test je velice jednoduchý, rychlý a má schopnost identifikace velkého množství vzorků. (GASANOV, 2005)

1.19 Fágová typizace

Tato metoda nás informuje o tom, že se *Listeria* vyskytuje v potravině. Jde o interakci daného bakteriofága daným kmenem *Listeria*, kdy výsledkem je lýze buňky hostitele. Bohužel všechny kmény *Listeria monocytogenes* nejdou typizovat. Jedná se zejména o sérotyp 1/2, kdy je typizace velmi nízká. (ROCOURT, 1985; GASANOV, 2005)

Metody tohoto typu se zaměřují na rezistenci dané bakterie k řadě daných suspenzí. (BURSOVÁ, 2014)

1.20 Proteomické metody

Jedná se o metody, kde je snaha o kombinaci molekulárních a biochemických technik s metodami fyzikálně-chemickými. Tyto metody dovolují studovat genomy celé a následně jejich expresi. Proteomické metody umožňují identifikovat proteiny v buňce i mimo ni. Pro rozvoj těchto metod byly a jsou velice důležité právě bakterie. Mikrobiální proteomika se zabývá identifikací mikroorganismů, které jsou patogenní, a to především studium virulentních faktorů a studium proteomů daných bakterií. Mezi základní metody proteomiky patří gelová elektroforéza nebo chromatografické metody. (WEISER, 2005)

Povrchový subproteom, který byl charakterizován u *Listeria monocytogenes* má řadu proteinů, které jsou součástí virulentních faktorů a účastní se interakce s buňkami hostitelů. U grampozitivních bakterií lze proteom rozdělit do čtyř subproteomů, což jsou menší skupiny proteinů. Sekretované extracelulární proteiny, membránové a integrálně asociované proteiny, proteiny asociované s buněčnou stěnou a cytoplazmatické proteiny. (SCHAUMBURG, 2005)

Subproteomy lze získat membránovou nebo cytoplazmatickou frakcí. Buněčná stěna a membrána je pro bakterie důležitá hlavně pro jejich virulenci, a to především u *Listeria monocytogenes*. (WEISER, 2005) Podobně jako u *Bartonella henselae*. (RHOMBERG, 2005) Dále je možné využít ribosomální frakci. (WEISER, 2005)

Informace exprimované v biofilmech *Listeria monocytogenes* jsou velmi malé. Pro stanovení proteinové exprese v biofilmech *Listeria monocytogenes* je často prováděna analýza 2D gelů. Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF je omezená, proto byla vytvořena databáze hmotnostních peptidů z projektu genomové sekvence LM. (THREMOULET, 2002)

Dvojměrná (2D) polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů bakterií je v praxi již 25 let. Jedná se o metody, které jsou založeny na separaci proteinů izoelektrickým bodem v první dimenzi a molekulovou hmotností v druhé dimenzi. Dvojměrné analýzy proteinů jsou často používány ke studii pH napětí, slanosti, reakce na stres, identifikaci a klasifikaci rodu *Listeria*. (RAMMATH, 2003)

V této tabulce jsou stručně sepsány hlavní výhody a nevýhody metod, které jsou nejčastěji využívané pro identifikaci *Listeria monocytogenes*.

Tabulka 5 Vybrané metody pro identifikaci *Listeria monocytogenes* (Převzato z: JADHAY et al., 2012)

Metoda	Výhody	Nevýhody
Kultivace	<ul style="list-style-type: none"> - Detekce živých buněk - Chromogenní medium (pro lepší detekci) 	<ul style="list-style-type: none"> - 5-10 dní pro získání výsledků - Podmínky prostředí mohou ovlivnit výsledek
MALDI-TOF MS	<ul style="list-style-type: none"> - Rychlá metoda 	<ul style="list-style-type: none"> - Vysoká pořizovací cena přístroje pro detekci - Směsné vzorky nelze detekovat
PCR	<ul style="list-style-type: none"> - Vysoká citlivost 	<ul style="list-style-type: none"> - Možnost falešné positivity výsledků - Finančně náročné
Imunochemické metody	<ul style="list-style-type: none"> - Rychlý získání výsledků (1-2 dny) 	<ul style="list-style-type: none"> - Malá spolehlivost - Falešná pozitivita výsledků
Subtypizační metody	<ul style="list-style-type: none"> - Možnost dohledání zdroje nákazy - Prevence (další nákazy) 	<ul style="list-style-type: none"> - Finančně náročné - Časově náročnější

MODERNÍ ÚROVNĚ IDENTIFIKACE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Následující testy pro identifikaci *Listeria* jsou využívány v environmentálních, potravinářských a klinických oblastech. Jedná se o metody, které nejsou využívány pro rutinní praxi ale na specializovaných pracovištích a v laboratořích.

1.21 Testy zaměřující se na RNA

RNA, popřípadě mRNA jsou jako cíle vybírány u testování patogenních bakterií v potravinách. Přítomnost RNA značí výskyt živých buněk bakterie. Zatím co testy založené na DNA mohou falešně ovlivnit výsledek, a to přítomností mrtvých buněk, které mohou poskytnout pozitivní výsledek, protože molekula DNA je velice stabilní. Mezi tyto testy patří RT-PCR, která je složena ze dvou kroků, kdy první využívá reverzní transkriptázu k převedení mRNA do komplementární DNA. Ve druhém kroku se tato DNA použije pro amplifikaci specifických sekvencí pomocí PCR. Další metodou je Real-time PCR, kde reakční směs obsahuje fluorescenční marker, který váže DNA. NASBA je jednou z alternativních metod PCR, která je často využívána k identifikaci *Listeria monocytogenes* v potravinách.

1.22 DNA mikročipy

Jedná se o moderní technologii, která je založena na DNA nebo RNA hybridizaci. Často se používají k detekci mikrobiálního a epidemiologického vývoje. Jsou dva hlavní typy mikročipů, kde je jeden založen na sekvenčně specifických oligonukleotidech a ten druhý využívá PCR produkty. (GASANOV, 2005)

LÉČBA, VYUŽITÍ A PREVENCE LISTERIÓZY

Listeriózy bývají převážně léčeny antibiotickou léčbou. Nejčastější léčba antibiotiky je kombinovaná. Tedy užíváním ampicilinu a gentamycinu. Ampicilin je podáván u těžkých případech listerióz. Kombinace těchto antibiotik bývá podávána ve velice těžkých formách tohoto onemocnění pro dosažení synergického působení. Jako náhrada těchto antibiotik se dá také léčit vankomycinem, klotrimazolem nebo peniciliny. Cefalosporinové formy antibiotik jsou neúčinné vůči *Listeria monocytogenes* stejně jako u enterokoků. (JILICH, 2008; BEDNÁŘ, 1994; VOTAVA, 2003; HOF, 2008) Daná léčba může být velice obtížná, a to díky přežití mikroorganismů v těle hostitele a tvorbě abscesů. (HOF, 2008)

Využívají se k přípravě rekombinantních vakcín, jako jeden z vhodných organismů. Jako příklad si můžeme uvést vakcinaci kmenem exprimujícím genem papilomaviru 16 E7, což mělo za následek zastavení růstu nádorové tkáně u myši. (VOTAVA, 2003)

Listerióza je jedna z onemocnění, proti které se nelze očkovat. Tepelná úprava zejména masa je nejdůležitějším klíčem k prevenci. Osoby s poruchou imunity nebo s jiným onemocněním, které ho může oslabovat by se měl vyhnout konzumaci potravin, které nejsou dobře umyté, jako je zelenina nebo mléko, které není pasterizováno. Toto riziko hrozí zejména u těhotných žen, u kterých by se na tuto prevenci mělo dbát. (JILICH, 2008; VOTAVA, 2010) Gama-záření je jedno z metod, které bylo úspěšné při ošetřování potravin, další metody nejsou dosud známy. (VOTAVA, 2003)

EPIDEMIE LISTERIÓZY V ČR A SOUSEDNÍCH STÁTECH EU

Listerióza je poměrně vzácné onemocnění ale přesto velice závažné, s vysokou mírou úmrtnosti (která může překročit 30 %) a nemocnosti. To je jeden z důvodů, proč je sledování onemocnění velice důležité.

Převážnou formou nákazy je potrava, proto je možné těmto případům onemocnění předcházet odstraněním kontaminovaného zdroje potravy nebo všeobecným zlepšením hygieny výroby potravin. (ECDC, 2018; GOULET, 1992)

1.23 Dotazník pro studium trvanlivosti *Listeria monocytogenes* u potravin

Pro tyto případy se využívá dotazník, pro studium trvanlivosti LM u potravin určených k přímé spotřebě. Dokument, ze kterého jsem čerpala byl vypracován Referenční laboratoří EU pro *Listeria monocytogenes* (EURL Lm, 2018) ve spolupráci s dalšími referenčními laboratořemi, za účelem vytvořit harmonizovaný přístup k hodnocení.

V tomto dotazníku je vymezená část pro identifikaci provozovatele potravinářského podniku což zahrnuje název (výrobní závod), adresa a kontaktní osoba.

Dále popis výrobku (název, doba trvanlivosti, deklarovaná teplota uložení, balení výrobku v g, objem dané výroby, a stručný popis výroby), poté složení výrobku (seznam jednotlivých složek).

Další část je zaměřena na fyzikálně-chemické a mikrobiologické vlastnosti výrobku jako jsou pH, a_w a obsah jednotlivých konzervantů výrobku na konci výroby, obsah soli, tuku, obsah sušiny příp. vlhkost, obsah cukru, přidaná mikroflóra do výrobku, přirozeně se vyskytující mikroflóra a bakterie mléčného kvašení na konci výroby.

Částí další jsou podmínky balení výrobku jako jsou typ a kontrola balení. Důležitou částí jsou podmínky chladicího řetězce, která se zabývá distribuční teplotou při výrobě. Minulé nálezy LM ve výrobě a hodnoty překračující limit 100 KTJ/g LM na konci doby spotřeby jsou společně v části nazvané historická data.

Poslední část se zabývá prediktivní mikrobiologií (software, model stimulace růstu LM). (EURL Lm, 2018)

Dotazníky pro šetření propuknutí nemocí přenášených potravinami a vodou pro LM, které jsou tvořeny pro respondenty by měly obsahovat skupiny otázek zabývajících se:

- demografií,
- nemocemi,
- cestováním,
- stravovacími návyky, alergiemi a dietou,
- restauracemi a jinými místy veřejného stravování,
- zeleninou a rostlinnými produkty,
- ovocem a ovocnými výrobky,
- masem a masnými výrobky,
- rybami a plody moře,
- mlékem a mléčnými výrobky,
- vejci a výrobky z nich
- a potravinářskými výrobky pro malé děti. (ECDC, 2016)

1.24 Situace v EU

Po infekcích *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia* a *Escherichia coli* produkující verocytotoxin (VTEC) byla listerióza v roce 2006 (hlášeno ve 23 členských státech EU) pátou nejčastější zoonózou v EU. Jedná se o nemoc z potravin, která patří mezi známé patogenní původce a vede k hospitalizaci (91 %). (EFSA, 2014; JEMMI, 2006)

V Programu Surveillance je zaznamenávaný výskyt listerióz v konkrétních krajích. (BEDNÁŘ, 1994) Jedná se o systém, který byl některými zeměmi zaveden pro dozor listeriózy od roku 1987, kdy se tato nemoc prokázala jako nemoc přenosná především potravinami. Mezi hlavní cíle této organizace patří roční hodnocení výskytu choroby, identifikace ohrožených populací, stanovit rizikové potraviny a zdroje jejich kontaminace a zhodnotit dopad preventivních opatření (ROCOURT, 1997; BORGDORFF, 1997)

EFSA (European Food Safety Authority) je jedna z organizací EU, která koná práci převážně na základě žádosti o vědecké poradenství Evropské Komise, Evropského parlamentu a členských států EU. Sídlo této organizace je v Itálii, jejichž počátky jsou z roku 2002. Jedná se o úřad pro bezpečnost potravin.

Státy mají zákonitou povinnost oznamovat EU (EFSA) případy listeriózy u lidí. Tyto případy listeriózy by měli být mikrobiologicky potvrzené po předchozí izolaci *Listeria monocytogenes*. (EFSA, 2003)

Mezi další organizace tohoto typu patří ECDC (European Centre for Disease prevention and Control) což je centrum pro kontrolu a prevenci nemocí, která je orgánem Evropské Komise, jejíž sídlo je ve Stockholmu. Jejím cílem je převážně monitorace a prevence infekčních onemocnění.

V roce 2016 uvedlo 30 zemí EU potvrzení 2555 případů onemocnění listeriózou. V EU byla v roce 2016 míra oznámení 0,47 případů na 100 000 obyvatel. Největší výskyt byl zaznamenán u kojenců do 1 roku a u osob starších 64 let. Nejvyšší výskyt byl pozorován v Belgii a Finsku. Počet případů listeriózy v EU se postupně zvyšuje. (ECDC, 2018)

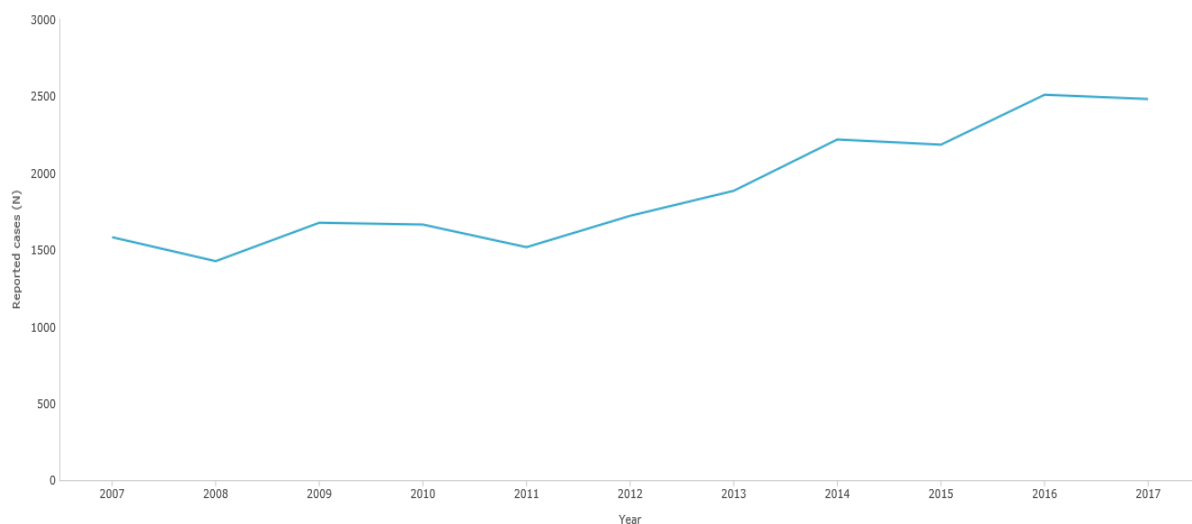
Počet případů listeriózy u lidí v EU se od roku 2008 zvýšil o 270 a to v roce 2015. (ECDC, 2018; GOULET, 1992)

V EU zemích probíhá od roku 2015 epidemie onemocnění listeriózou, a to konkrétně způsobená *Listeria monocytogenes* sérologické skupiny 4b. Bylo hlášeno 26 případů z Rakouska, Dánska, Finska, Švédska a Spojeného království. Tyto hlášení byly potvrzeny celogenomovou sekvencí, založené na metodách používané v jednotlivých státech. Byly hlášeny 4 úmrtí. Sekvence potvrdila podobnost humánních izolátů, což vede k hypotéze, že pochází toto onemocnění ze stejného zdroje. Zdroj bohužel není zatím znám.

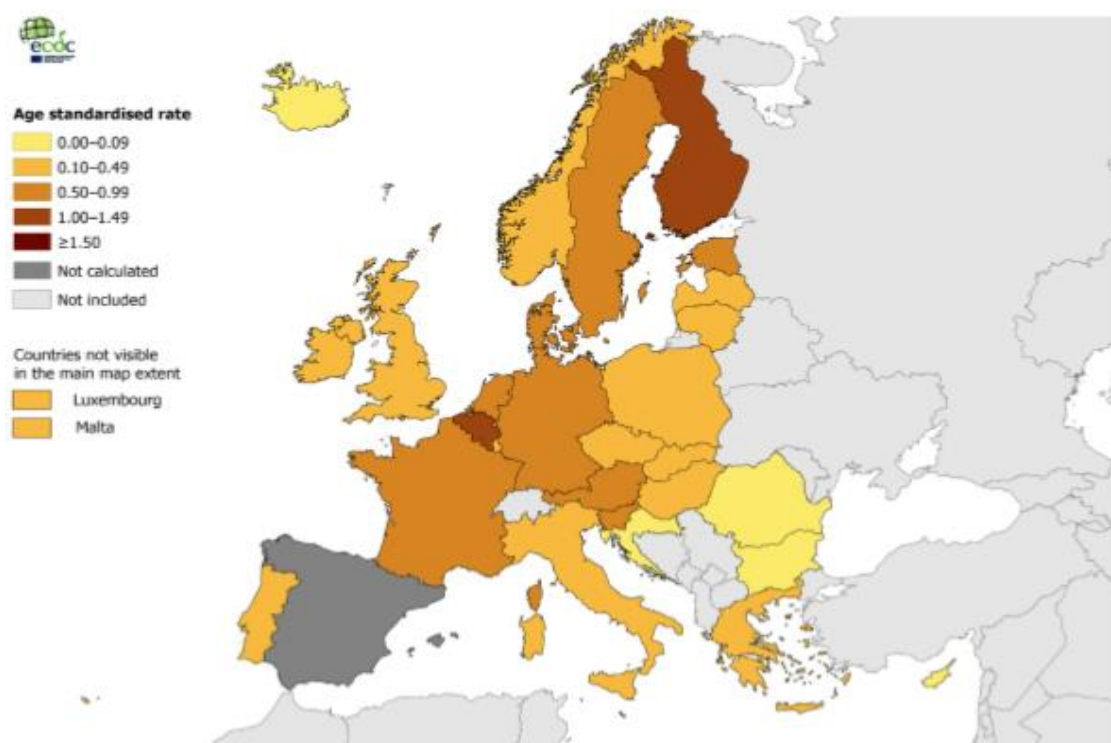
ECDC doporučuje k identifikaci případů používat dotazník, a to co nejdříve od podezření z onemocnění listeriózou. (ECDC, 2017)

Tabulka 6 Rozvržení potvrzených případů listeriózy a četnost na 100000 obyvatel, EU/EHP, 2012-2016
(Převzato z: ECDC, 2019)

Země	2012	2013	2014	2015	2016
	Počet potvrzených případů listeriózy				
Rakousko	36	36	49	38	46
Belgie	83	66	84	83	104
Bulharsko	10	3	10	5	5
Chorvatsko	0	0	4	2	4
Kypr	1	1	0	0	0
Česká republika	32	36	38	36	47
Dánsko	50	51	92	44	40
Estonsko	3	2	1	11	9
Finsko	61	61	65	46	67
Francie	346	369	373	412	375
Německo	414	463	598	580	697
Řecko	11	10	10	31	20
Maďarsko	13	24	39	37	25
Irsko	11	8	15	19	13
Itálie	112	143	132	153	179
Lotyšsko	6	5	3	8	6
Litva	8	6	7	5	10
Nizozemsko	73	72	90	71	89
Norsko	30	21	29	18	19
Polsko	54	58	87	70	101
Rumunsko	11	9	5	12	9
Slovensko	11	16	29	18	10
Slovinsko	7	16	18	13	15
Španělsko	109	140	161	206	362
Švédsko	72	93	125	88	68
Spojené království	183	192	201	186	201
EU/EEA	1754	1905	2275	2224	2555



Obrázek 14 Distribuce potvrzených případů listeriózy v EU, za roky 2007-2017 (Převzato z: ECDC, 2018)



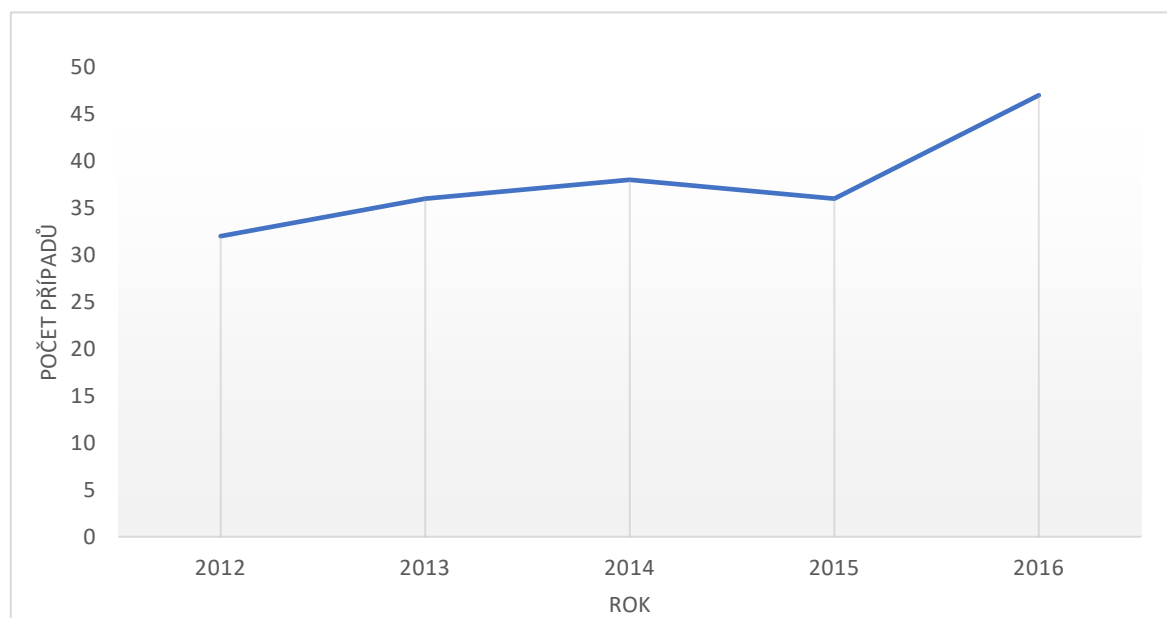
Obrázek 15 Distribuce potvrzených případů listeriózy na 100 000 obyvatel podle zemí, EU / EHP, 2016 (Převzato z: ECDC, 2018)

1.25 Situace v ČR

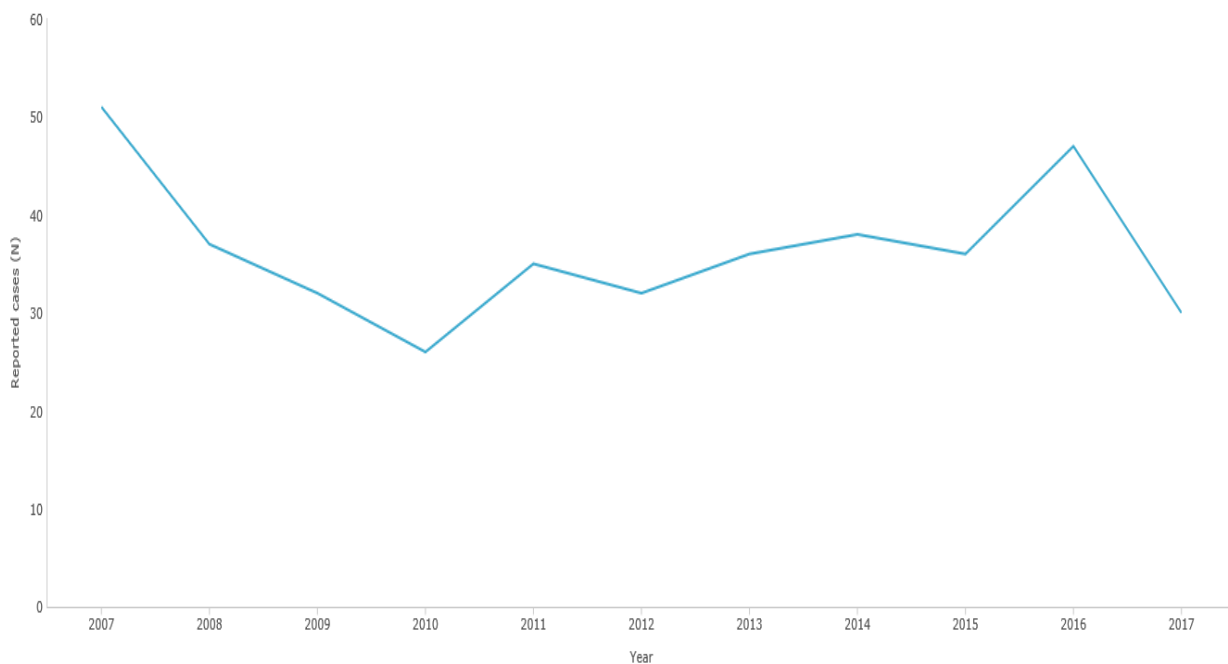
Za rok 2006 bylo v ČR nahlášeno 62 případů, u kterých byla diagnostikována listerióza. V tomto roce bylo zaznamenáno 8 úmrtí jako důsledek onemocnění listeriózou. Další incidence v roce 2006:

Tabulka 7 Počet onemocnění listeriózou v roce 2006 (Převzato z: MZČR, 2007)

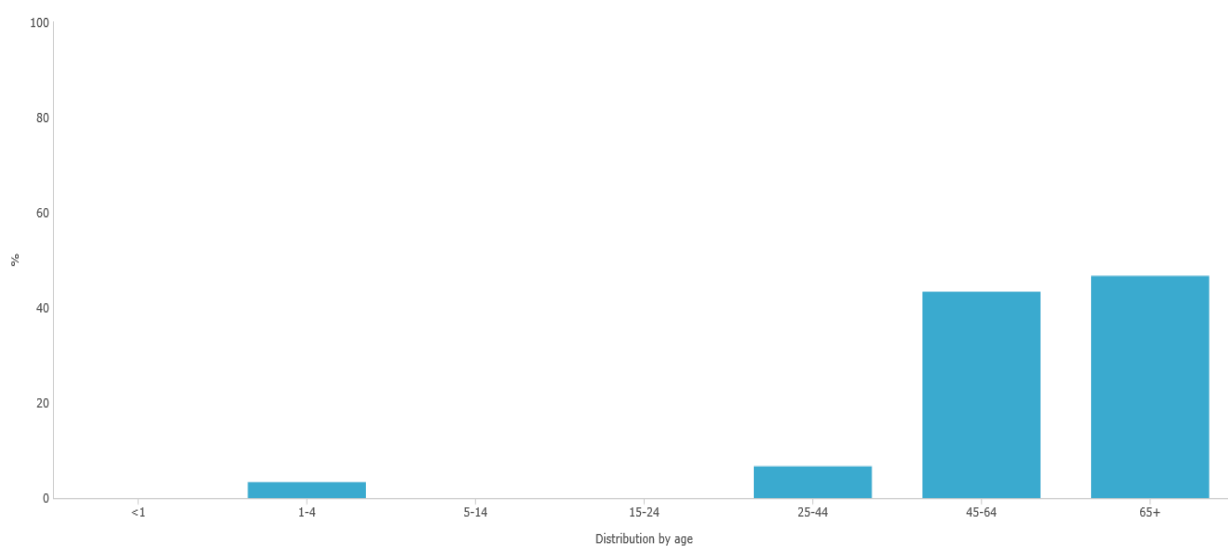
počet onemocnění	62	4x více proti roku 2005 do 52. týdne
z toho úmrtí	8	v roce 2005 1 případ
novorozenecká listerióza	9	v roce 2005 2 případy
listerióza v graviditě	9	v roce 2005 2 případy
postižených okresů	32	v roce 2005 11 okresů



Obrázek 16 Distribuce potvrzených případů listeriózy v ČR, za roky 2012–2016 (Převzato z: ECDC, 2018)



Obrázek 17 Distribuce potvrzených případů listeriózy v ČR, za roky 2007–2017 (Převzato z: ECDC, 2018)



Obrázek 18 Grafické zobrazení potvrzených případů listeriózou na základě věku v ČR, v roce 2017 (Převzato z: ECDC, 2018)

V EU došlo k epidemii listerióz v Německu v roce 1951 a v tehdejším Československu v roce 1953. Od těchto dob se objevují informace o listeriózách vyskytujících se v Evropě, Americe a v dalších částech světa. (BEDNÁŘ, 1994)

1.26 Mikrobiologická kritéria pro potraviny

V roce 2007 dne 5. 12. bylo Komisí (ES) změněno nařízení č. 1441/2007 komise (ES) č. 2073/2005, které se zabývá oblastí kritérií pro potraviny z pohledu mikrobiologie. Toto nařízení obsahuje část, která se zaměřuje na kritéria hygieny výrobního procesu (zaměřuje se na maso, mléko, vaječné výrobky, produkty rybolovu, zelenina, ovoce a výrobky z něj).

Další část je zaměřena na kritéria bezpečnosti potravin a poslední třetí část jsou pravidla pro odběr vzorků a přípravu zkušebních vzorků.

Tabulka 8 Kritéria bezpečnosti *Listeria monocytogenes* (Převzato z: Komise (ES) č. 1441/2007)

Kategorie potravin	Počet jednotek tvořících vzorek	Limity	Analytická referenční metoda	Fáze, na niž se kritérium vztahuje
Určené k přímé spotřebě pro kojence a určené k přímé spotřebě (1)	10	Nepřítomnost ve 25 g	EN ISO 11290-1	Produkty uvedené na trh během doby údržnosti
Určené k přímé spotřebě, které podporují růst LM, jiné než pro kojence	5	100 CFU/ml (2)	EN ISO 11290-2 (3)	Produkty uvedené na trh během doby údržnosti
	5	Nepřítomnost ve 25 g (4)	EN ISO 11290-1	Před tím, než potravina opustí kontrolu pozorovatele, který ji vyrobil
Určené k přímé spotřebě, které nepodporují růst LM (1) (5)	5	100 CFU/ml	EN ISO 11290-2 (3)	Produkty uvedené na trh během doby údržnosti

„(1) Pravidelné provádění vyšetření podle příslušného kritéria se za běžných podmínek nevyžaduje u těchto potravin určených k přímé spotřebě:

- u takových, které byly tepelně ošetřeny nebo jinak zpracovány za účelem účinného odstranění *Listeria monocytogenes*, pokud potom to ošetření není možná opětovná kontaminace (např. výrobky, které jsou tepelně ošetřeny v konečném obalu),
- u čerstvé, nekrajené a nezpracované zeleniny a ovoce, vyjma naklíčených semen,
- u chleba, sušenek a podobných výrobků,
- u vod, nealkoholických nápojů, piva, jablečného vína, vína, lihovina podobných výrobků v lahvích nebo baleních,
- u cukru, medu a cukrovinek, včetně výrobků z kaka a čokolády,
- u živých mlžů.

(2) 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.

(3) 1 ml inokula se naočkuje na Petriho misku o průměru 140 mm nebo natří Petriho misky o průměru 90 mm.

(4) 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.

(5) 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.

Dále je v daném nařízení „Interpretace výsledků“: Uvedené limity se vztahují na každou vyšetřovanou jednotku vzorku, vyjma živých mlžů a živých ostnokožců, pláštěnců a plžů v souvislosti s vyšetřením na *E. coli*, kdy se limit vztahuje na směsný vzorek. Výsledky vyšetření vypovídají o mikrobiologické jakosti vyšetřované partie.

Listeria monocytogenes v potravinách určených k přímé spotřebě pro kojence a pro zvláštní léčebné účely:

- vyhovující, pokud všechny zjištěné hodnoty poukazují na nepřítomnost této bakterie,
- nevyhovující, pokud je přítomnost této bakterie určena v kterékoli jednotce vzorku.

Listeria monocytogenes v potravinách určených k přímé spotřebě, které podporují růst. *Listeria monocytogenes*, předtím, než potraviny opustí bez prostřední kontrolu provozovatele potravinářského podniku, který je vyrábí, pokud není schopen prokázat, že výrobek nepřekročí limit 100 KTJ/g po celou dobu údržnosti:

- vyhovující, pokud všechny zjištěné hodnoty poukazují na nepřítomnost této bakterie,
- nevyhovující, pokud je přítomnost této bakterie určena v kterékoli jednotce vzorku.

Listeria monocytogenes v ostatních potravinách určených k přímé spotřebě a *Escherichia coli* v živých mlžích:

- vyhovující, pokud jsou všechny zjištěné hodnoty \leq limit,
- nevyhovující, pokud je kterákoli hodnota $>$ limit.“

1.27 Orgány dohlížející na bezpečnost potravin v ČR

Ministerstvo zemědělství ČR je jeden z orgánů, který dohlíží nad potravinami. Další je Ministerstvo zdravotnictví ČR.

Státní zdravotní ústav (SZÚ) je příspěvková organizace ministerstva zdravotnictví, která sleduje dlouhodobé trendy infekčních onemocnění (související s předcházením vzniku a šíření onemocnění) a zpracovává podklady pro tvorbu státní zdravotní politiky pro orgány ochrany veřejného zdraví. Mezi další činnosti SZÚ patří vědecká a výzkumná činnost, sledování vztahů životních podmínek a zdraví, mezinárodní spolupráce, zdravotní výchova obyvatelstva, poskytování závodní preventivní péče a zpracování a analýzy údajů a zdraví fyzických osob v souvislosti s předcházením vzniku a šíření infekčních onemocnění, nemocí z povolání a další. Dále plní úkoly vyplývající z jiných právních předpisů ČR, přímo použitelných předpisů EU, mezinárodních smluv, nebo uložených Ministerstvem zdravotnictví ČR. Prostřednictvím svých odborníků zastupuje Ministerstvo zdravotnictví ČR nebo Českou republiku ve vnitrostátních, evropských a mezinárodních komisích, orgánech a organizacích.

Státní zdravotní ústav se skládá z několika center, které jsou centrum zdraví a životního prostředí, centrum zdraví, výživy a potravin, centrum hygieny práce a pracovního lékařství, centrum podpory veřejného zdraví, centrum epidemiologie a mikrobiologie a poslední je centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti. (SZÚ)

Pod MZ ČR patří obor epidemiologie infekčních onemocnění, který zajišťuje koordinaci mezi ECDC a ČR. Má vliv na přípravu Surveillance daných infekčních onemocnění, a hlavně monitoruje a analyzuje situace týkající se onemocnění až na mezinárodní úrovni. Dále obor hygieny výživy a bezpečnosti potravin. (SZÚ)

ZÁVĚR

Listeria monocytogenes je invazivní patogen, který může velice snadno proniknout do hostitele.

Onemocnění listeriózou má velmi rychlý a silný průběh, především díky mechanismům, kterými tato bakterie napadá organismus. Tato bakterie je sama schopná procházet skrz různé bariéry a velkou rychlostí se šíří do tělních orgánů. (BLAŽKOVÁ, 2005)

Klinické příznaky infekce *Listeria monocytogenes* jsou velmi podobné u všech náchylných hostitelů ale přesto se můžeme setkat s případy, kdy se tato nemoc neprojevuje.

Listeria monocytogenes se vyskytuje prakticky všude a byla získána z různých druhů potravin, které byly určeny k přímé spotřebě. Jako je drůbež, skot, malý přežvýkavci, čerstvá zelenina. (BRYCHTA, 2018)

Mezi hlavní typizační metody patří sérotypizační, subtypizační metody, fágová typizace a ribotypizace. Další z metod jsou proteomické metody, které jsou důležitý nástroj pro spojení transkripčních studií celého genomu a buněčné fyziologie mikroorganismů. (HAIN, 2006)

Další z metod, které jsou velice důležité pro rozlišení izolátů *Listeria monocytogenes*, které není možné rozlišit jinými metodami je celogenomové sekvenování. Je to jeden z epidemiologických možností identifikace izolátů.

Od roku 2012 v ČR byla incidence onemocnění listeriózou 32 případů na rozdíl od roku 2016, kdy se tato incidence zvýšila na 47 případů postižených listeriózou. V rámci EU se incidence postupně zvyšuje, v roce 2012 byla incidence 1752 případů a v roce 2016 byla tato incidence 2555 případů onemocnění listeriózou. Největší výskyt byl zaznamenán u kojenců do 1 roku a u osob starších 64 let. Obecně lze tedy říct, že trend onemocnění listeriózou se postupně zvyšuje.

U člověka jsou nákazy vyvolány nejčastěji sérovary 1/2a a 4b. Právě sérologická skupina 4b způsobila v EU epidemii listeriózou, která probíhá od roku 2015, kdy bylo hlášeno 26 případů. Epidemiologický dotazník je v podobných situacích doporučen již při podezření tohoto onemocnění.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] AGUADO, V., VITAS, A.I., GARCÍA-JALON, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *International Journal of Food Microbiology*. 2004 Feb 1; 90(3): 341–347.
- [2] *Appl. Environ. Microbiol.* Jun 2003, 69 (6) 3368-3376; DOI: 10.1128/AEM.69.6.3368-3376.
- [3] BEDNÁŘ, M., ANDREJ, S. a VÁVRA, J. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Triton, 1994, 43-45 s., ISBN 80-901521-4-7.
- [4] BELL, CH. and KYRIAKIDES, A. *Listeria. A practical approach to the organism and its control in foods*. Wiley-Blackwell, Mar 2005, 1-8 s., ISBN: 978-1-405-10618-4.
- [5] BENEŠ, J. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009. 15-16 s., 211-212 s., ISBN 978-80-7262-644-1.
- [6] BERCOFT, D.M.O., FARMER, K., SEDDON, R.J., SOWDEN, R., STEWART, J.H., VINES, A. et al. Epidemic Listeriosis in the Newborn. *Br Med J* 1971; 3 :747, doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.3.5777.747>
- [7] BILLE, J., CATIMEL, B., BANNERMAN, E., JACQUET, C., YERSIN, M.-N., CANIAUX, I., MONGET, D., a ROCOURT, J. API Listeria, a New and Promising One-Day System To Identify Listeria Isolates. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. June 1992, p. 1857-1860, 0099-2240/92/061857-04\$02.00/0,
- [8] BLAŽKOVÁ, M., KARAMONOVÁ, L., FUKAL, L. a RAUCH, P. *Listeria monocytogenes-NEBEZPEČNÝ PATOGEN A JEHO DETEKCE V POTRAVINÁCH*. Chem. Listy 99. 2005, 467–473 s.
- [9] BORGDOFF, M.W. a MOTARJEMI, Y. Surveillance of foodborne diseases: what are the options? *Food Safety Issues*. 1997. WHO/FSF/FOS/97.3. p. 3
- [10] BROUWER, M.C., VAN DE BEEK, D., HECKENBERG, S.G., SPANJAAR, L. a DE GANS, J. Community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. *Clin Infect Dis* (2006) 43: 1233–1238
- [11] BRYCHTA, J., BARTOŠOVÁ, L. a BRYCHTA, V. *Výskyt Listeria monocytogenes v potravinách a riziko onemocnění pro člověka*. MZe ČR, Praha 2018, ISBN 978-80-88019-31-2, 8-11 s.

- [12] BUBERT, A., KOHLER, S., a GOEBEL, W. The homologous and heterologous regions within the iap gene allows genus and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 1992, p. 2625-2632, 0099-2240/92/082625-08\$02.00/0.
- [13] BUBERT, A., SCHUBERT, P., KOHLER, S., FRANK, R. a GOEBEL, W. Synthetic peptides derived from the *Listeria monocytogenes* p60 protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free *L. monocytogenes* p60 proteins. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(9):3120–3127.
- [14] BURSOVÁ, Š., et al. MIKROBIOLOGICKÉ LABORATORNÍ METODY. FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE. BRNO 2014
- [15] COSSART, P. Met, the HGF-SF receptor: another receptor for *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 9, 2001. p. 105–107.
- [16] DE LUCA, C., DONATI, L., D'ORIA, L., LICAMELI, A., PELLEGRINO, M. a DE SANTIS, M. *Listeria* Infection in Pregnancy: A Review of Literature. *The Open Infectious Diseases Journal*, 2015, 9, p. 20-25
- [17] ELLIOT, T. R. a ELMER, H. M. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. CRC Press, 2007, ISBN 9780824757502
- [18] FALL, B., et al. “The ongoing revolution of MALDI-TOF mass spectrometry for microbiology reaches tropical Africa.” *The American journal of tropical medicine and hygiene* vol. 92,3 (2015): 641-7. doi:10.4269/ajtmh.14-0406
- [19] FAROUK, M., ABDEL-SHAFI, S., SHALABY, M. a MOHAMED, R. Application of Specific Media, API Technique and PCR for Rapid Confirmation of *Listeria monocytogenes* in Foodstuffs and Water. *Research Journal of Microbiology*, 2015 10: 100-113. 10.3923/jm.2015.100.113
- [20] FELIX, B., et al. The Use of Pulsed Field Gel Electrophoresis in *Listeria monocytogenes* Sub-Typing – Harmonization at the European Union Level, *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), (2012). ISBN: 978953-51-0458-2
- [21] FERREIRA, L., SÁNCHEZ-JUANES, F., MUNOZ-BELLIDO, J.L. a GONZÁLEZ-BUITARO, J.M. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry:

intact cell vs. extraction method. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect.* 2011. Dis. 17, 1007–1012. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03339.x

[22] FRASER, C. M., EISEN, J. A., SALZBERG, S. L. Microbial genome sequencing. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):799-803.

[23] FUGETT, E.B., SCHOONMAKER-BOPP, D., DUMAS N.B., CORBY, J. a WIEDMAN, M. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):865–873. doi:10.1128/JCM.01285-06

[24] GASANOV, U., HUGHES, D. a HANSBRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 29, Issue 5, November 2005, Pages 851–875, <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.002>

[25] GELBÍČOVÁ, T., TOMÁŠTÍKOVÁ, Z. a KARPÍŠKOVÁ, R. Molekulárně epidemiologická charakteristika a diverzita *Listeria monocytogenes* v humánní populaci České republiky v letech 2013–2016. 2017 66, č. 3 EPIDEMIOLOGIE, MIKROBIOLOGIE, IMUNOLOGIE

[26] GELBÍČOVÁ, T., KARPÍŠKOVÁ, R. a DEMNEROVÁ, K. Mléko a prostředí mlékárenské výroby: zdroje a cesty šíření *Listeria monocytogenes*. Článek v odborném periodiku Mlékařské listy. rok: 2011, ročník: 22, vydání: 128

[27] GENDEL, S. M. a ULASZEK, J. Ribotype Analysis of Strain Distribution in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, Vol. 63, No. 2, 2000, Pages 179–185

[28] GLASER, P., FRANGUEL, L., BUCHRIESER, C., RUSNIOK, C., AMEND, A., BAQUERO, F., BERCHE, P. et al. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 294 (2001), pp. 849-852

[29] GOULET, V., MARCHETTI, P. Listeriosis in 225 non-pregnant patients in 1992: clinical aspects and outcome in relation to predisposing conditions. *Scand J Infect Dis.* 1996;28(4):367-74

[30] GREENWOOD, D., SLACK R. C. B. a PEUTHERER J. F. Lékařská mikrobiologie. Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a

epidemiologie. Přel. J. SCHINDLER. London: Livingstone. 1999. ISBN 80-7169-365-0. s. 209-215

[31] HAIN, T., STEINWAG, Ch., a CHAKRABORTY, T. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. Journal of Biotechnology, Volume 126, Issue 1, 20 October 2006, Pages 37-51, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.047>

[32] HALBEDEL, S., et al. Whole-Genome Sequencing of Recent *Listeria monocytogenes* Isolates from Germany Reveals Population Structure and Disease Clusters. 2018.DOI: 10.1128/JCM.00119-18

[33] HELLSTROM, S., KIVINIEM, K., AUTIO, T. a KORKEALA, H. *Listeria monocytogenes* is common in wild birds in Helsinki region and genotypes are frequently similar with those found along the food chain. Journal of Applied Microbiology, 104 (2008), p. 883–888.

[34] HERNANDEZ-MILAN, A. a PAYERAS-CIFRE, A. What Is New in Listeriosis? BioMed Research International Volume 2014, Article ID 358051, 7 pages.

[35] HILLIARD, A., et al. Genomic Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolates Associated with Clinical Listeriosis and the Food Production Environment in Ireland. Genes (Basel). 2018 Mar; 9(3): 171. Published online 2018 Mar 20. doi: 10.3390/genes9030171

[36] HOF, H. *Listeriosis: therapeutic options*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. 35(3): p.203205.

[37] HOWARD, P. J., et al. Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 2007, p. 865–873 Vol. 45, No. 3 0095-1137/07/\$08.000 doi:10.1128/JCM.01285-06

[38] HUNTER, S. B., et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 2005, p. 1045–1050 Vol. 43, No. 3 0095-1137/05/\$08.000 doi:10.1128/JCM.43.3.1045–1050.2005

[39] JADHAY, S., BHAVE, M. a PALOMBO, E.A. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. J. Microbiol. Methods 88, 2012. 327–341. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.002

- [40] JEMMI, T. a STEPHEN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Rev Sci Tech.* 2006;25(2):571-80.
- [41] KALHOTKA, L. a TESAŘOVÁ, M. MENDELOVA UNIVERZITA a AGRONOMICKÁ FAKULTA, 2014. *Potravinářská mikrobiologie pro Zahradnickou fakultu.* Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7509-017-1, s. 21-23
- [42] KAYAL, S., CHARBIT, A. Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 2006. 514–529. doi:10.1111/j.15746976.2006.00021.x
- [43] KOUDELKA, Š., GELBÍČOVÁ, T., PROCHÁZKOVÁ, M., KARPÍŠKOVÁ, R. Lineage and serotype identification of *Listeria monocytogenes* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Czech J. Food Sci.*, 36 (2018): 452–458.
- [44] KWONG, J.C., et al. Prospective Whole-Genome Sequencing Enhances National Surveillance of *Listeria monocytogenes* DOI: 10.1128/JCM.02344-15, February 2016 Volume 54 Number 2
- [45] LE MONNIER, A., ABACHIN, E., BERETTI, J. L., BERCHE, P. a KAYAL, S. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* Meningoencephalitis by Real-Time PCR for the hly Gene. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 11., roč. 49, č. 11, 2011, s. 3917–3923. ISSN 0095-1137, 1098. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01072-11
- [46] LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection*, Volume 9, Issue 10, August 2007, Pages 1216-1225,
- [47] LIU, D., LAWRENCE, M., GORSKI, L., MANDRELL, R. E., AUSTIN, F. W. a ANISWORTH, A. J. *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular features. *J. Clin. Microbiol.* 44, (2006 a). 204–207
- [48] LOBER, B. Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 24, Issue 1, January 1997, Pages 1–11, <https://doi.org/10.1093/clinids/24.1.1>.
- [49] MAY, R.C., HALL, M.E., HIGGS, H.N., POLLARD, T.D., CHAKRABORTY, T., WEHLAND, J., MACHESKY, L.M. a SECHI, A.S. The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *Curr. Biol.* 9, 1999. 759–762. doi:10.1016/S09609822(99)80337-6

- [50] MCKELLAR, R. C. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 1994 Dec; 60(12): 4219–4225.
- [51] MCLAUCHLIN, J. Human listeriosis in Britain, 1967–1985, a summary of 722 cases. 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. *Epidemiol. Infect.* 104 (1990)181–189
- [52] MOSIO, P. Atlas bakterií. Pardubice 2012, s. 21-24
- [53] Murray R., et al. *Medical Microbiology*. Mosby International (June 30, 1990), s. 205–209
- [54] MYLONAKIS, E., PALIOU, M., HOHMAN, E.L. CALDEWOD, S.B. a WING, E.J. Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases. *Medicine (Baltimore)* (2002) 81: 260–269
- [55] NADON, C.A., WOODWARD, D.L., YOUNG, C., RODGERS, F.G., WIEDMANN, M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2704–2707. 2001. doi:10.1128/JCM.39.7.2704-2707.2001
- [56] NELSON, K.E. et al. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res.*, 32 (2004), pp. 2386-2395
- [57] NIEMAN, R. a Lorber, B. Listeriosis in adults: a changing pat-tern. Report of eight cases and review of the literature, 1980. *Rev.Infect. Dis.* 2:207–227.
- [58] NIGHTINGALE, K. K., et al. Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment. *Applied and Environmental Microbiology.* 2004; 70(8): 4458–4467
- [59] NORWOOD, DE., GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology*, 86, (4), (1999), s. 576-582.
- [60] ORSI, R. H., et al. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, June 2016, Volume 100, Issue 12, pp 5273–5287
- [61] PAINTER, J. a SLUTSKER L. Listeriosis in Humans. In: ELLIOT T. RYSER a ELMER M. MARTH, ed. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2007. ISBN 978-0-8247-5750-2.,
- [62] PEEL, M., DONACHIE, W. a SHAW, A. Temperature-dependent Expression of Flagella of *Listeria manocytogenes* Studied by Electron Microscopy, SDS-PAGE and Western

Blotting, Moredun Research Institute, Journal of General Microbiology (1988), 134, 21 71-21 78. Printed in Great Britain 2171

[63] POSFAY-BARBE, K.M. a WALD, E.R. *Listeriosis*. Semin Fetal Neonatal Med, 2009. 14(4): p. 228-233.

[64] RAGON, M., WIRTH, T., HOLLANDT, F., LAVIER, R., LECUIT, M. a LE MONNIER A., et al. A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. PLoS Pathog (2008) 4(9): e1000146. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000146>

[65] RAMMATH, M. Development of a *Listeria monocytogenes* EGDe Partial Proteome Reference Map and Comparison with the Protein Profiles of Food Isolates. Appl Environ Microbiol. 2003 Jun;69(6):3368-76., DOI:10.1128/aem.69.6.3368-3376.2003

[66] REINGOLD, L. a PERKINS, B. A. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active surveillance team. N. Engl. J. Med. 1997. 337:970–976.

[67] RHOMBERG, T.A., et al. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of the bacterial pathogen *Bartonella henselae*. Proteomics 4(10): 3021-3033, 2004

[68] ROCOURT, J., et al. A multi-centre study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*. Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. [A] 259, (1985) 489–497

[69] ROCOURT, J., et al. Human listeriosis, 1991/1992. WHO/FNU/FOS/97.1. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1997. s. 4–5

[70] RUPPITSCH, W. Defining and Evaluating a Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Whole-Genome Sequence-Based Typing of *Listeria monocytogenes*. J Clin Microbiol. 2015 Sep;53(9):2869-76. doi: 10.1128/JCM.01193-15. Epub 2015 Jul 1

[71] SALCEDO, C., et al. Development of a Multilocus Sequence Typing Method for Analysis of *Listeria monocytogenes*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb. 2003, p. 757–762 Vol. 41, No. 2 0095-1137/03/\$08.000 DOI: 10.1128/JCM.41.2.757–762.2003

[72] SCHAUMBURG, J., et al. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. Proteomics 2004, 2991-3006, DOI 10.1002/pmic.200400928

[73] SCHINDLER, J. Mikrobiologie pro studenty zdravotních oborů. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4771-2.s. 103-104. 2014.

- [74] SCHUCHAT, A., et al. Epidemiology of Human Listeriosis. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Apr. 1991, p. 169-183 Vol. 4, No. 2 0893-8512/91/020169-15\$02.00/0
- [75] SWAMINATHAN, B., et al. The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection, Volume 9, Issue 10, August 2007, Pages 1236-1243
- [76] TENOVER, F. C., et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 1995, p. 2233–2239 Vol. 33, No. 9 0095-1137/95/\$04.0010
- [77] THERIOT, J.A., MITCHISON, T.J., et al. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. Nature 357, 1992. 257–260. doi:10.1038/357257a0
- [78] TRÉMOULET, F., et al. Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. FEMS Microbiology Letters, Volume 210, Issue 1, April 2002, Pages 25–31, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11155.x>
- [79] VOTAVA, M. Lékařská mikrobiologie obecná: 2. přepracované vydání, Nakladatel: Neptun 2005, s. 295-308
- [80] VOTAVA, M. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: NEPTUN. 2003. ISBN 80-902896-6-5.s. 134-135
- [81] VOTAVA, M. Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody. Brno: NEPTUN. 2010. ISBN 978-80-86850-04-8. s. 313-314
- [82] WEISER, J., HOLUB, M., NEZBEDOVÁ, Š. a BEZOUKOVÁ, S. PROTEOMIKA JAKO KOMPLEXNÍ PŘÍSTUP KE STUDIU FYZIOLOGICKCH REGULACÍ U BAKTERIÍ. Chem. Listy 99, 890–895 (2005)
- [83] WELLER, D., et al. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. 2015 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 65: 286-292, doi: 10.1099/ijs.0.070839-0

SEZNAM INTERNETOVÝCH ZDROJŮ (Dostupné ke dni: 13. 3. 2019)

1. EFSA
 - a) <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1496>
 - b) https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/Infografiky/E_coli.pdf
 - c) www.efsa.europa.eu/publicationsEFSA
 - d) <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.13.13.08082-en>
 - e) <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1448>
2. ECDC
 - a) https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2016-listeriosis.pdf
 - b) https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/food-and-water-borne-diseases-outbreak-investigation-questionnaire-guidance-2016_CS.pdf
 - c) <https://www.uzis.cz/content/ecdc-european-centre-disease-prevention-and-control>
 - d) https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/RRA-Listeria-monocytogenes-2017_0.pdf
3. SZÚ
 - a) <http://www.szu.cz/poslani-ustavu>
 - b) <http://www.szu.cz/uploads/documents/szu/statut.pdf>
4. EURL Lm
 - a) https://sites.anses.fr/en/system/files/EURL-Lm_Guidance%20doc%20competence%20labs%20Lm%20shelf-life%20studies_V2-2018-05-07.pdf
5. MZČR
 - a) http://www.mzcr.cz/dokumenty/aktualni-informace-k-poctu-onemocneni-listeriozou_863_871_1.html
6. EEC
 - a) <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:325:0031:0040:EN:PDF>
7. JANČOVÁ, J. a ŠKAPOVÁ, T., 2007. Listeria monocytogenes – původce listeriózy. Zpravodaj centra MPI [online].
(http://www.zuova.cz/Content/files/zpravodaj_ckl/zpravodajmpi200703.pdf)
8. JILICH, D. a MACHALA, L., 2008. Listeriόza [online].
(<http://www.medicinapopraxi.cz/pdfs/med/2008/09/03.pdf>)

9. KOLÍNSKÁ, R., MAREJKOVÁ, M., URBÁŠKOVÁ, P. a ŽEMLIČKOVÁ, H. 2012. Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie [online].
(http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/21_2012/05_kveten/199_ek734.pdf)
10. KUCHAROVIČOVÁ, I. a BRYCHTA, M., 2016. Státní veterinární ústav Jihlava [online].
(<http://www.svujihlava.cz/229-maldi-tof.html> 12.3.2019)
11. TANKESHWAR, A., 2013. *CAMP Test: Principle, Procedure and results: CAMP test* [online].
(<https://microbeonline.com/camp-test-principle-procedure-results/>)
12. VOTAVA, M. Sérologická vyšetření a interpretace serologických nálezů, 5/2004, Interní medicína pro praxi [online].
(<https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2004/05/05.pdf>)