Listeria monocytogenes – NEBEZPEČNÝ PATOGEN A JEHO DETEKCE V POTRAVINÁCH

MARTINA BLAŽKOVÁ, LUDMILA KARAMONOVÁ, LADISLAV FUKAL a PAVEL RAUCH

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 26 Praha 6
Ladislav.Fukal@vscht.cz

Došlo 4.4.05, přijato 27.5.05.

Klíčová slova: *Listeria monocytogenes,* virulentní protein, imunoanalýza, potraviny

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika *Listeria monocytogenes*
3. Listerióza
4. Virulentní proteiny *Listeria monocytogenes*
5. Detekce *Listeria monocytogenes* v potravinách
   5.1. Klasické kultivační metody
   5.2. Moderní kultivační metody
   5.3. Molekulárně-genetické postupy
   5.4. Imunoanalýza
   5.5. Komerční soupravy
6. Závěr

1. Úvod

Listeria monocytogenes je obávaným patogenním mikroorganismem vyskytujícím se v potravinách. Nejčastěji kontaminuje mlékárenské a masné výrobky. Onemocnění vyvolaná touto bakterií, tzv. listeriózy, jsou velmi závažná a zasahují specifické skupiny populace: staré lidi, děti, těhotné ženy a osoby s oslabenou imunitou. Způsobují záněty mozkových blan, septikémie a potraty. *Listeria monocytogenes* je jako původce alimentárních onemocnění (souvisejících s příjmem potravy) známa teprve od roku 1980. Odhaduje se, že je příčinou přibližně 0,5–1 % všech hromadných alimentárních onemocnění. Mezi těmito nemocemi má však zcela nesporné prvenství v procentu mortality, které dosahuje až 33 % z celkového počtu onemocnění. Alimentární listerióze podlehne více pacientů než salmonelóze. Zájem o listerie a zejména o jejich rychlou detekci v posledních letech velmi vzrostl. Příčinou jsou epidemie, které se objevují od osmdesátých let stále častěji.

2. Charakteristika *Listeria monocytogenes*

Rod *Listeria* zahrnuje v současné době 6 různých druhů[1] – *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* a *L. grayi*. *L. monocytogenes* je podmíněným patogenem lidí i zvířat, *L. ivanovii* vyvolává onemocnění zejména u ovcí a skotu[2] a jen velmi výjimečně u lidí[3,4]. Ostatní druhy jsou považovány za nepatogenní[5].

Listerie jsou grampozitivní bakterie, které jsou úzce příbuzné s rody *Bacillus, Clostridium, Enterococcus, Streptococcus* a *Staphyloccocus*[1]. Buňky mají tvar krátkých až kokoidních tyčinek o velikosti 0,4–1,5 μm. Listerie nejsou acidorezistentní a nevytvářejí pouzdra ani spory. Jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní[6,7].

Bakterie rodu *Listeria* produkují enzym katalasu, netvoří oxidasu ani ureasu, hydrolyzují eskulin a hippurát sodný, ale močovinu, kasein či želatinu nehydrolyzují[8]. Listerie jsou aktivně sacharolytické mikroorganismy a pro jejich růst je esenciální D-glukosa. Na základě schopnosti fermentovat různé sacharidy (D-xylosa, L-rhamnosa, α-methyl-D-mannosid a D-mannitol, D-arabitol, methyl-D-glukosid, ribosa, glukosa-1-fosfát, D-tagatosa) jsou rozlišovány jednotlivé druhy listerií. Další významnou vlastností některých listerií, jež přispívá k potvrzení druhu, je jejich hemolytická aktivita. *L. monocytogenes* tvoří, podobně jako *L. seeligeri,* diskrétní zónu hemolýzy. Výraznou zónu tvoří pouze *L. ivanovii*, zbylé druhy listerií hemolytickou aktivitu nemají.

Kultivačně nejsou listerie náročné a jsou značně rezistentní ke změnám vnějšího prostředí. Rostou dobře na běžných kultivačních půdách (živný agar, krevní agar)[9] a v širokém teplotním rozmezí (1 až 45 °C). Optimální teplota růstu se pohybuje okolo 37 °C (cit.[10]). Teplota velmi ovlivňuje patogenní vlastnosti bakterie. Většina kmenů se pomnožuje v rozmezí pH 5,6–9,6, přičemž optimální pH pro růst je 7,0 až 7,5 (cit.[11]). Listerie se dobře množí i při vysokých koncentracích soli (10% NaCl)[9], jsou schopné přežít i v 25% NaCl, 20 dní v suchém prostředí a 6 dní v destilované vodě[11].

Buněčná stěna a cytoplazmatická membrána *Listeria monocytogenes* obsahují, kromě různých látek lipidového charakteru, řadu proteinů, které jí umožňují proniknout do buněk hostitelského organismu, přežít v nich a dále se šířit. Takové proteiny, které jsou pro přežití a rozšiřování bakterie v hostitelském organismu nepostradatelné, označujeme jako virulentní.

3. Listerióza

Všechny druhy listerií, včetně *L. monocytogenes*, jsou v přírodě hojně rozšířeny. Mohou se vyskytovat ve vodě,

v půdě, na rostlinách, ale také ve střevním traktu volně žijících zvířat. V souvislosti s používáním nekvalitních krmiv, obsahujících velké množství listerií, lze pozorovat výskyt *L. monocytogenes* i u hospodářských zvířat. Onemocnění bývají zpravidla bezpříznaková, a tedy neléčená. To v konečném důsledku může vést až ke kontaminaci masa při porážce zvířete. Primárně kontaminované může být rovněž mléko a syrová zelenina (hnojená fekáliemi infikovaných zvířat). Potravinářské suroviny obsahující listerie mohou mít za následek znečištění prostředí potravinářských závodů v průběhu zpracovatelského procesu, což může způsobit sekundární kontaminaci potravin.

Hlavním způsobem přenosu na člověka je konzumace kontaminovaných potravin. Mezi potraviny s nejvyšším rizikem patří maso a tepelně neopracované masné výrobky, syrové mléko a mléčné výrobky (měkké a plísňové sýry), zelenina. K další kontaminaci a pomnožení listerií může dojít v průběhu přípravy pokrmů a uchovávání hotových jídel při pokojové teplotě[10]. Velmi nebezpečná je neonatální infekce, kde je zdrojem nákazy mateřský organismus (listerie pronikají placentou a infikují plodovou vodu). V nemocnicích hrozí nozokomiální infekce, při hospitalizaci nemocných pacientů je třeba dbát na protiepidemická opatření. Je zaznamenáno několik případů profesionálního onemocnění u veterinářů, ošetřovatelů a řezníků, kteří byli v přímém styku s nakaženými zvířaty[9,12].

4. Virulentní proteiny *Listeria monocytogenes*

Listerióza má většinou velmi progresivní a těžký průběh. Hlavní příčinou jsou účinné mechanismy, kterými *Listeria monocytogenes* infikuje savčího hostitele. Je schopna pronikat přes různé tělní bariéry (intestinální, hematoencefalitickou, placentární) a rychle se rozšiřuje po celém těle. K tomuto způsobu života je dobře vybavena celou řadou virulentních proteinů. Celý proces lze rozdělit do několika fází, z nichž některé jsou již známé, ale některé ještě čekají na své objasnění.

Infekce hostitelské buňky je zahájena internalizací bakterie. Pro vstup listerií do nefagocytujících hostitelských buněk je nezbytná přítomnost speciálních proteinů, které jsou schopné fagocytosu indukovat. Jde především o povrchové proteiny tzv. internaliny – internalin A (InlA, 800 aminokyselin, 88 kDa) a internalin B (InlB, 630 aminokyselin, 65 kDa). Dalším významným proteinem podílejícím se na internalizaci bakterie je p60 (484 aminokyselin, 60 kDa), který je dominantním extracelulárním proteinem listerií a je často využíván k diagnostice *Listeria monocytogenes*.

Poté, co je bakterie pohlcena, musí rychle uniknout z fagocytické vakuoly (fagosomu), která ji obklopuje, aby se mohla dále množit. Na uvolnění z vakuoly se podílí virulentní protein zvaný listeriolysin O (LLO, 529 aminokyselin, 58 kDa), který je schopen tvořit v membráně fagosomu póry. Celého děje se v některých typech hostitelských buněk účastní ještě fosfolipasa C specifická pro fosfatidylinositol (PI-PLC, 317 aminokyselin, 35 kDa, EC 4.6.1.13). Po úniku z fagosomu se bakterie v hostitelské buňce množí. Aby mohly bakterie po pomnožení z buňky uniknout, musí se přemístit k její cytoplazmatické membráně. Jejich pohyb je zprostředkován proteinem ActA (actin assembly protein, 639 aminokyselin, 97 kDa). Tento protein polymerizuje buněčný aktin a vytváří za bakterií jakýsi chvost. Tím, jak se tato struktura prodlužuje, je bakterie přemisťována až k membráně. Výsledně se vytvoří výčnělek, který interaguje se sousední buňkou a je jí následně pohlcen. V nové hostitelské buňce je tedy bakterie obalena fagosomem se dvěma membránami, k jehož rozrušení bakterie používá své dva další virulentní proteiny – lecitinasu (PlcB, 264 aminokyselin, 29 kDa) a metaloproteasu (Mpl, 510 aminokyselin, 57 kDa). Po uvolnění do cytosolu se bakterie začíná množit a výše popsané děje se opakují.

5. Metody detekce *Listeria monocytogenes* v potravinách

Stále nejčastějším způsobem stanovení *Listeria monocytogenes* v potravinách je použití klasických kultivačních metod. Na jejich základě je založena i metoda popsaná v ČSN EN ISO 11290-1:1999 (cit.[13]). Jelikož jde však o metody značně časově náročné (5–8 dnů) a včasná diagnostika je vzhledem k progresivnímu průběhu onemocnění listeriózou velmi důležitá, je v posledních letech vyvíjen značný tlak na vývoj nových, rychlých metod. Tyto metody je možno rozdělit podle principu stanovení na moderní kultivační techniky, metody molekulárně-genetické a techniky imunochemické.

5.1. Klasické kultivační metody

ČSN ISO 11290-1:1999

Prvním krokem je primární pomnožení listerií v selektivním médiu Fraser se sníženou koncentrací antibiotik. Toto pomnožení částečně inhibuje růst doprovodné mikroflóry a současně umožňuje oživení poškozených buněk listerií. Potom následuje selektivní sekundární pomnožení buněk v médiu Fraser s plnou koncentrací antibiotik. Výsledně pomnožená kultura je vždy naočkována na dvě selektivně-diagnostická agarová média (Oxford a PALCAM). Po inkubaci při teplotě 30, 35 nebo 37 °C se po 24 h (popř. 48 h) zjišťuje přítomnost kolonií *Listeria monocytogenes*. Každá z vybraných kolonií se očkuje na povrch neselektivního tuhého média TSYEA. Následuje kultivace 18–24 h při 35 nebo 37 °C. Potvrzení identity se provádí vhodnými morfologickými, fyziologickými a biochemickými testy (hemolýza, fermentace sacharidů). Celková doba stanovení se pohybuje mezi 5–8 dny a vzhledem k vyhledávání suspektních kolonií po sekundárním pomnožení vyžaduje zkušené pracovníky.

5.2. Moderní kultivační metody

Následující testy využívají k potvrzení příslušnosti k jednotlivým druhům listerií jejich biochemické vlastnosti. Jsou většinou založeny na průkazu charakteristického enzymu způsobujícího přeměnu substrátu, která je přímo či nepřímo doprovázena změnou zabarvení média. Substráty jsou buď obsaženy v sérii tekutých kultivačních médií (API Listeria test) nebo jsou součástí speciálních tuhých půd (Rapid L. mono test, ALOA™ a COMPASS L. mono agar).

API Listeria test[14]

Tento test firmy bioMérieux rozlišuje všechny druhy listerií běžnými biochemickými testy. Součástí komerčně dodávané sady je 10 mikrozkumavek. Každá obsahuje dehydratovaný chromogenní substrát pro testování enzymových reakcí nebo fermentace sacharidů, které jsou charakteristické pro jednotlivé druhy listerií.

Jednotlivé testy sledují buď přítomnost enzymů (arylamidasy, mannosidasy, glukosidasy), nebo fermentaci následujících sacharidů: D-arabitolu, D-xylosy, rhamnosy, α-methyl-D-glukosidu, ribosy, glukosa-1-fosfátu, D-tagatosy.

Očkuje se čistá bakteriální kultura, jež se nechá 18 až 24 h kultivovat při 37 °C. Vyhodnocení se provádí vizuálně, porovnáním barev v jednotlivých mikrozkumavkách s interpretační tabulkou, která je k testu přiložena. Listerie se nakonec identifikují s pomocí „seznamu profilů“, nebo s identifikačním softwarem.

RAPID L. mono test

Princip detekce na médiu Rapid L. mono (Sanofi Diagnostics Pasteur) je založený na specifickém průkazu aktivity enzymu fosfolipasy (projevující se modrým zbarvením kolonií) a na schopnosti využívat xylosu, což se pozná tak, že se okolo bakteriálních kolonií vytvoří patrná žlutá zóna. Složení selektivního média inhibuje růst většiny interferující mikroflóry (G^+, G^- bakterie, kvasinky i plísně). *L. monocytogenes* vykazuje fosfolipasovou aktivitu a není schopná využívat xylosu, její kolonie mají proto čistě modrou barvu bez doprovodné „halo“ zony. Díky fosfolipasové aktivitě a schopnosti využívat xylosu tvoří buňky *L. ivanovii* modrozelené kolonie se žlutou „halo“ zónou. Kolonie jiných druhů rodu *Listeria* mají barvu bílou; *L. seeligeri* a *L. welshimeri* s „halo“ zónou, *L. innocua* a *L. grayi* „halo“ zónu netvoří.

ALOA a COMPASS L. mono Agar

ALOA (AES Laboratoire) a COMPASS L. mono Agar (Solabia) jsou diagnostická chromogenní média pro izolaci *Listeria* spp. a identifikaci *Listeria monocytogenes*. Jsou založeny na průkazu β-glukosidasy, obsažené v buňkách všech druhů rodu *Listeria* a způsobující modré až modrozelené zabarvení kolonií. *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii* navíc tvoří působením fosfolipasy C specifické pro fosfatidylinositol (PI-PLC) kolem kolonií žlutou „halo“ zónu. Součástí obou agarů je i inhibiční systém, který znemožňuje v prvních 24 hodinách inkubace růst jiných bakterií (např. *Bacillus*) a specificky i *L. ivanovii*. Po 24 h kultivaci při 37 °C jsou typické kolonie (modré se žlutou „halo“ zónou) určeny jako *Listeria monocytogenes*. Při jejich absenci kultivace při 37 °C pokračuje dalších 12–24 h, kdy tvoří typické kolonie také *L. ivanovii*. Při objevení těchto kolonií je pro rozlišení obou druhů nutno použít L. Monodisk test (AES Laboratorie, Francie). V něm se *L. ivanovii*, na rozdíl od *L. monocytogenes*, projeví žlutým zabarvením.

5.3. Molekulárně-genetické metody

Molekulárně-genetické metody umožňují určit mikroorganismus na základě jeho genetické informace. K tomu jsou využívány různé molekulárně-genetické techniky, z nichž nejvýznamnější jsou hybridizace a polymerasová řetězová reakce (PCR). Tyto metody jsou založeny na specifické komplementaci (hybridizaci) mezi hledaným úsekem jednovláknové nukleové kyseliny z lyzovaných buněk bakterie a sondou. Sondou rozumíme synteticky připravenou krátkou sekvenci nukleotidů komplementární k hledanému úseku. Tyto metody využívají pro specifickou detekci *L. monocytogenes* charakteristické sekvence jejího genomu. Nález takové sekvence ve zkoumaném materiálu indikuje přítomnost *L. monocytogenes*.

Molekulárně-genetické metody jsou vysoce citlivé v případě použití čistých bakteriálních kultur, ale při stanovení ve složitých matricích (např. v některých potravinách) se citlivost výrazně snižuje. Proto je často nezbytné mikroorganismy před vlastní analýzou separovat. Lze při tom využít jak metody fyzikálně-chemické (např. filtrace, extrakce), tak metody bioafinitní (např. imunochemické).

Hybridizace

Jak již bylo uvedeno, základem metody je hybridizace mezi hledaným úsekem jednovláknové nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) a sondou. Sonda, komplementární k hledanému úseku, bývá značena např. chemiluminiscenční značkou, jež umožní finální detekci. Po hybridizaci je přidáno selekční činidlo, které slouží k rozlišení hybridizované a volné sondy, případně může být nenavázaná sonda separována[15].

Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction – PCR) je enzymová metoda umožňující namnožení definovaného úseku DNA *in vitro*. Vlastní PCR předchází izolace bakterie ze zkoumaného vzorku (matrice může snižovat citlivost stanovení), její pomnožení v tekutém médiu a lýza. Lýzované buňky (popř. DNA izolovaná z těchto buněk) jsou pak analyzovány PCR. Prvním krokem metody je oddělení vlákna dvoušroubovice DNA teplotní denaturací (při teplotě přesahující 90 °C). Následuje hybridizace primeru (krátká sekvence nukleotidů) ke komplementárnímu úseku DNA (45–65 °C) a extense připojeného primeru termostabilní DNA polymera-

sou (většinou při 72 °C), kdy probíhá syntéza druhého řetězce DNA (cit.[16]).

Produkty PCR bývají nejčastěji detegovány elektroforézou v agarosovém gelu v horizontálním uspořádání v přítomnosti ethidiumbromidu. Po rozdělení je elektroforeogram vyvolán UV světlem. Lze také použít radioaktivně nebo fluorescenčně značené primery a po elektroforetickém dělení lze výsledek PCR detegovat autoradiograficky, nebo měřením fluorescence. Další možností je použití hybridizačních sond, značených na konci 5' křenovou peroxidasou.

Amplifikace specifických úseků RNA

Tato metoda (angl. nucleic acid sequence-based amplification – NASBA) využívá k amplifikaci specifický úsek bakteriální RNA. Tento úsek RNA je v prvním kroku přepsán do komplementární DNA (cDNA) reverzní transkriptasou. Ribonukleasa H z Escherichia coli (RNAasa H) uvolní cDNA z hybridu DNA-RNA. Po syntéze komplementárního řetězce je cDNA DNA-dependentní RNA-polymerasou přepsána zpět do molekul RNA. Několikanásobným opakováním těchto kroků dochází k namnožení cílového úseku. Jako sondy jsou využívány krátké oligonukleotidové sekvence komplementární ke specifickým sekvencím bakteriální RNA. Používají se dva typy primerů – první obsahuje „záchytnou" sekvenci komplementární k RNA a sekvenci promotoru pro polymerasu RNA, druhý pak obsahuje pouze „záchytnou" sekvenci. Detekce se provádí např. elektroforézou v agarosovém gelu[17].

Ligasová řetězová reakce (LCR)

Tato metoda je založena na podobném principu jako PCR. Hlavní rozdíl spočívá ve využití dvou párů primerů (PCR využívá dvou primerů). Primery, které tvoří pár, jsou komplementární ke dvěma sousedním oblastem stejného vlákna DNA. Dvojice primerů nepřekrývá celý hledaný úsek DNA, na jejich styku je ponechána mezera, která je termostabilní polymerasou DNA doplněna. Po tomto kroku následuje spojení obou úseků termostabilní ligasou. Mnohonásobným opakováním tohoto postupu se množství hledaného úseku DNA ve vzorku zvětšuje[18].

5.4. Imunochemické techniky

Mezi největší přednosti imunochemických stanovení patří rychlost, jednoduchost provedení, možnost stanovení velkého počtu vzorků současně a především možnost detekce ve složitých matricích. Rozšíření těchto technik podporuje také nenáročnost na laboratorní vybavení a relativně nízká cena. Základem všech imunochemických metod je interakce protilátek s antigenem. Při těchto metodách jsou používány *in vitro* polyklonální, monoklonální nebo rekombinantní protilátky vytvořené proti antigenním strukturám, které jsou charakteristické pouze pro bakterie rodu *Listeria*[19]. Před vlastní imunodetekcí je nutné bakterie namnožit ve vzorcích potravin běžnými kultivačními metodami.

Enzymová imunoanalýza

Při této metodě (angl. Enzyme linked immunosorbent assay – ELISA) je jeden z imunoreaktantů vázán na tuhou fázi a druhý je značený enzymem. Detekce je prováděna prostřednictvím enzymové reakce.

V současné době je pro detekci bakterií nejčastěji využíván přímý nekompetitivní (tzv. sendvičový) postup[20]. Ten se skládá z několika po sobě jdoucích kroků:

V prvním kroku jsou na tuhou fázi (nejčastěji stěnu jamky v mikrotitrační destičce) imobilizovány protilátky. Poté je přidán vzorek obsahující bakterie. Buňky *Listeria monocytogenes* interagují s protilátkou. Po odstranění nenavázaných složek následuje aplikace protilátky značené enzymem. K detekci je využita enzymová reakce, kdy je bezbarvý substrát přeměněn na barevný produkt.

Imunochromatografická technika na membráně

Tato metoda (angl. lateral flow immunoassay) je velmi oblíbená pro svoji rychlost a technickou jednoduchost provedení[20].

Nejčastěji je opět využíváno sendvičové uspořádání. První typ protilátky je imobilizován na povrch membrány, druhá protilátka je konjugována s barevnými latexovými částicemi a je nanesena spolu se vzorkem na počátek membrány. Tato směs se pohybuje membránou působením kapilárních sil. Pokud je ve vzorku přítomen antigen, specificky interaguje s označenou protilátkou. Vzniklý imunokomplex se následně naváže na imobilizovanou protilátku, což se projeví vznikem barevné linky v testovací oblasti.

Imunosenzor

V posledních letech se objevují snahy o využití imunochemických biosenzorů (imunosenzorů). Jde o rozmanitá bioelektronická zařízení umožňující sledovat přímo či nepřímo interakce mezi specifickými protilátkami a antigenem. Jeden z imunoreaktantů je imobilizován na povrchu vhodného nosiče a následně jsou monitorovány změny jeho elektrických, optických či piezoelektrických vlastností v závislosti na průběhu imunochemického děje. Přestože již několik imunosenzorů našlo v praxi uplatnění při stanovení různých látek, vzhledem k problémům při vývoji a použití imunosenzorů pro detekci bakterií jsou tyto techniky stále spíše otázkou budoucnosti[21].

5.5. Komerční testy pro detekci listerií v potravinách

Na základě výše uvedených rychlých metod detekce byly sestaveny komerční soupravy pro stanovení listerií v potravinách. Soupravy dostupné v současné době na trhu jsou uvedeny v tab. I. Jsou rozděleny podle principu stanovení na molekulárně-genetické a imunochemické. U každého testu je uvedeno, zda slouží k průkazu celého rodu *Listeria*, nebo zda lze specificky odlišit *Listeria monocytogenes* od ostatních, nepatogenních druhů listerií.

Dalším důležitým parametrem při výběru metody je její celková časová náročnost. Mezinárodně uznávaným

Tabulka I
Přehled komerčně dostupných diagnostických souprav k detekci *Listeria monocytogenes*

Test	Princip stanovení	Doba detekce[a]	Specifita	Výrobce
	molekulárně-genetický			
AccuProbe Listeria monocytogenes	hybridizace a chemiluminiscenční detekce	37 h	*L. monocytogenes*	GeneProbe, Inc
BAX for L. monocytogenes	PCR	45 h	*L. monocytogenes*	Qualicon, Inc.
Gene-Trak Listeria Assay[b]	hybridizace a spektrofotometrická detekce	42–50 h	*Listeria*	Neogen Corp.
Gene-Trak Listeria monocytogenes Assay[b]	hybridizace a spektrofotometrická detekce	48 h	*L. monocytogenes*	Neogen Corp.
Probelia PCR System	PCR a spektrofotometrická detekce	28 h	*L. monocytogenes*	Sanofi Diagnostics Pasteur
	imunochemický			
Assurance Listeria EIA[b]	nepřímá sendvičová ELISA	50 h	*Listeria*	BioControl Systems, Inc.
EIA-Foss for Listeria [b]	imunomagnetická separace a přímá sendvičová ELISA	50 h	*Listeria*	Foss North America, Inc.
Listeria Rapid Test[b]	imunochromatografická detekce	43 h	*Listeria*	OXOID, Inc.
Listeria-Tek[b]	přímá sendvičová ELISA	50 h	*Listeria*	Organon Teknika Corp.
ListerTest[b]	imunomagnetická separace a přímá sendvičová ELISA	24 h	*Listeria*	Vicam
Pathalert Listeria monocytogenes	nepřímá sendvičová ELISA	42–52 h	*Listeria*	Diagnostica, Merck
Reveal for Listeria	imunochromatografická detekce	43 h	*Listeria*	Neogen Corp.
Singlepath Listeria	imunochromatografická detekce	37–49 h	*Listeria*	Merck
Transia Plate Listeria	přímá sendvičová ELISA	46 h	*Listeria*	Diffchamb
Transia Plate Listeria monocytogenes	přímá sendvičová ELISA	46 h	*L. monocytogenes*	Diffchamb
TECRA Listeria Visual Immuno Assay[b]	přímá sendvičová ELISA	48–50 h	*Listeria*	Tecra Diagnostic
TECRA Unique Listeria	dipstick	32 h	*Listeria*	Tecra Diagnostic
Vidas LIS	přímá sendvičová ELISA	50–54 h	*Listeria*	BioMérieux Vitek
Vidas LMO[b]	přímá sendvičová ELISA	50–54 h	*L. monocytogenes*	BioMérieux Vitek
Visual immunoprecipitate (VIP) for Listeria[b]	imunochromatografická detekce	48 h		BioControl Systems, Inc.
	ostatní			
Dynabeads anti-Listeria	imunomagnetická separace a kultivace a standardní ověření	24 h	*Listeria*	Dynal Biotech ASA

[a] Doba detekce zahrnuje i pomnožení mikroorganismů před vlastní detekcí, [b] metody schválené AOAC (Asociace analytických chemiků)

standardem pro patogeny (začleněným i v ČSN ISO 10560:1996 – Mléko a mléčné výrobky) je průkaz jediné buňky *Listeria monocytogenes* ve 25 g (popř. 25 ml) vzorku potravin. Jelikož je velmi obtížné zachytit jedinou buňku v tak velkém objemu vzorku, předchází obvykle každému stanovení selektivní pomnožení buněk na úroveň, která umožní jednodušší detekci. Tento postup je zahrnut ve většině uváděných souprav.

Zde se přednostně soustředíme na metody, u kterých bylo uvedeno, že jsou ověřeny organizací Association of Analytical Chemists (AOAC).

Souprav ke specifické detekci *L. monocytogenes* bylo až dosud vyvinuto šest. Čtyři jsou založeny na molekulárně-genetickém principu. *AccuProbe Listeria monocytogenes* (GeneProbe) a *Gene-Track Listeria monocytogenes Assay* (Neogene) využívají hybridizace s chemiluminiscenční či spektrofotometrickou koncovou detekcí. *BAX assay* (Qualicon) a *Probelia PCR System* (Sanofi Diagnostics Pasteur) jsou metody založené na PCR. Další dvě soupravy využívají imunochemické detekce. *VIDAS LMO* využívající protilátky je součástí poloautomatizovaných imunochemických stanovení série *VITEK* firmy BioMeriéux. Testovaný vzorek je nejprve pomnožen v tekutém médiu a vzorek tohoto média je poté aplikován na reagenční proužek s imobilizovanou protilátkou. Analýza je automatizována pomocí přístroje *VITEK* s fluorescenční koncovou detekcí. Druhou je souprava *Transia Plate Listeria monocytogenes (*Diffchamb), která je založená na přímé metodě sendvičové ELISA s protilátkami proti specifickým peptidovým sekvencím extracelulárního proteinu p60. Protilátky tedy neinteragují přímo s buňkou, ale s proteinem přítomným v roztoku.

Soupravy, které umožňují detegovat celý rod *Listeria* jsou mnohem početnější. Dvě z nich, *Gene-Track Listeria Assay* (Neogene) a *Probelia PCR system* (Sanofi Diagnostics Pasteur) jsou založeny na molekulárně-genetických metodách. Ostatní soupravy využívají imunochemický princip. *VIDAS* pro celý rod *Listeria (VIDAS LIS)* je rovněž dostupný pro přístroj *VITEK*, založený na stejném principu jako výše uvedený specifický test na *L. monocytogenes*. Ten však získal od AOAC osvědčení PTM (performance tested method, číslo licence 981202). Jiný automatizovaný imunodiagnostický systém, *EIAFoss* od Foss Electric, má modul pro detekci *Listeria monocytogenes* a je od AOAC certifikovaný pro maso a mléko pod označením PTM 980801. Ostatní, neautomatizované testy lze rozdělit mezi ELISA testy (s vizuální nebo přístrojovou koncovkou) a ostatní formáty, jako jsou magnetické částice a tyčinky ze syntetických polymerů (dipsticks). *Tecra Listeria Visual Immunoassay* (Tecra Diagnostics) je upravena jako ELISA v mikrotitračních destičkách (rozdělených na jednotlivé řádky), založená na polyklonálních protilátkách s vizuální nebo spektrofotometrickou detekcí. Tato souprava získala od AOAC osvědčení OM (official method) pro detekci rodu *Listeria* v potravinách s číslem licence 995.02. *Assurance EIA* (BioControl) je podobná metoda, která je AOAC certifikovaná jako OM 995.02. *Listeria-Tek* (Organon-Teknika) je založena na ELISA v mikrotitračních destičkách s monoklonálními protilátkami, opět s fotometrickou detekcí. Má licenci AOAC (OM 994.03) pro použití při analýze mléčných, mořských a masných produktů. Komerčně dostupné jsou i další testy, než je ELISA. Např. v testu *Unique* (Tecra) se používají plastikové tyčinky ze syntetických polymerů s imobilizovanými protilátkami, které jsou schopny zachytit antigen z média obsahujícího namnožené buňky listerií. Barevné linky na povrchu těchto tyčinek znamenají průkaz listerií v analyzovaném vzorku. Příkladem imunochromatografického testu jsou *Listeria Rapid Test* od firmy Oxoid a *Visual Immunoprecipitate Assay* (BioControl). Oba mají AOAC licenci: Oxoid PTM 960701 a BioControl OM 997.03.

Na závěr je nutno zmínit *ListerTest* (Vicam) a *Dynabeads anti-Listeria* (Dynal Biotech ASA) pracující na odlišném principu: protilátky imobilizované na magnetických částicích zachytí buňky listerií z upraveného potravinového vzorku (princip imunomagnetické separace – IMS). Magnetické částice se zachycenými buňkami jsou poté přeneseny na povrch pevné půdy. Při použití *ListerTest* následuje po inkubaci imunochemická detekce. U *Dynabeads anti-Listeria* jsou po inkubaci vyhledávány kolonie charakteristické pro listerie, které jsou ověřovány standardními biochemickými a serologickými metodami. Tyto testy jsou dobrou ukázkou flexibility využití protilátek v rychlých mikrobiologických testech.

6. Závěr

Mikroorganismy jsou stálým a trvalým nebezpečím ohrožujícím zdraví obyvatelstva a patří dle každoročních zpráv WHO k nejrizikovějším faktorům i ve srovnání s takovými civilizačními chorobami jako je rakovina a AIDS. Zavedení systému kritických kontrolních bodů (angl. hazardous analysis critical control points – HACCP) systému) do potravinářských technologií (v ČR pro výrobu povinné od 1.1.2000) vyvolalo tlak na urychlený vývoj metod pro rychlé a specifické stanovení sledovaných parametrů. V oblasti mikrobiologie se pozornost soustředila na potravní patogeny, jejichž stanovení klasickými kultivačními normovanými metodami trvá běžně 5–8 dní (dle náročnosti vyšetření). Z moderních metod, které mohou výrazně snížit dobu stanovení, jsou perspektivní imunochemické a molekulárně-genetické metody, které mají vysokou specificitu. Jejich využívání bylo ověřeno v řadě laboratoří a v současné době jsou ve fázi konečné přípravy návrhy norem založených na těchto stanoveních. Pro snadné a pohodlné používání těchto metod přímo ve výrobních závodech se firmy zabývající mikrobiální detekcí soustředily na přípravu komerčních souprav na principu molekulárně-genetickém nebo imunochemickém a dále na výrobu selektivních specifických chromogenních medií. Vývoj mikrobiologické diagnostiky jde jednoznačně touto cestou.

Práce vznikla s podporou GA ČR (číslo grantu 525/03/0350) a grantem MŠMT (MSM 6046137305).

LITERATURA

1. Vázquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J.: Clin. Microbiol. Rev. *14*, 584 (2001).

2. Alexander A. V., Walker R. L., Johnson B. J., Charlton B. R., Woods L. W.: J. Am. Vet. Med. Assoc. *200*, 711 (1992).
3. Cummins A. J., Fielding A. K., McLauchlin J.: J. Infect. *28*, 89 (1994).
4. Chand P., Sadana J. R.: Vet. Rec. *145*, 83 (1999).
5. Rocourt J., Grimont P. A. D.: Int. J. Syst. Bacteriol. *33*, 866 (1983).
6. Collins M. D., Wallbanks S., Lane D. J., Shah J., Nietupski R., Smida J., Dorsch M., Stackebrandt E.: Int. J. Syst. Bacteriol. *41*, 240 (1991).
7. Prats N., Briones V., Blanco M. M., Altimira J., Ramos J. A., Domínguez L., Marco A.: Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *11*, 5 (1992).
8. Zahradnický J.: *Mikrobiologie a epidemiologie*. Avicenum, Brno 1987.
9. Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J.: *Lékařská mikrobiologie*. Marvil, Praha 1996.
10. Tomancová I.: *Problematika Listeria monocytogenes v potravinách*. LAST – Vydavatelství potravinářské literatury, Brno 1991.
11. Waites W. M., Arbuthnott J. P.: Lancet *336*, 722 (1990).
12. Šrámová H., Beneš Č., Karpíšková R.: Zpráva SZÚ, Praha 2000.
13. ČSN ISO 11290-1: *Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu listeria monocytogenes – Část 1: Metoda průkazu*, leden 1999.
14. bioMérieux: *Návod k API Listeria*. Francie 1998.
15. Okwumbua O., Swaminathan B., Edmonds P., Wenger J., Hogan J., Alden M.: Res. Microbiol. *143*, 183 (1992).
16. Ruml T.: *Laboratoř z genového inženýrství*. VŠCHT Praha, Praha 1997.
17. Uyttendaelc M., Schukkink R., Gemen van B., Debevere J.: Int. J. Food Microbiol. *54*, 2933 (1988).
18. Wiedmann M., Barany F., Batt C. A.: Appl. Environ. Microbiol. *59*, 2743 (1993).
19. Karamonová L., Blažková M., Fukal L., Rauch P., Greifová M., Horáková K., Tomáška M., Roubal P., Brett G. M., Wyatt G. M.: Food Agric. Immunol. *15*, 167 (2003).
20. Mičková B., Rauch P., Fukal L.: Chem. Listy *98*, 970 (2004).
21. Koubová V., Brynda E., Karasová L., Škvor J., Homola J., Dostálek J., Tobiška P., Rošický J.: Sensors and Actuators B *74*, 100 (2001).

M. Blažková, L. Karamonová, L. Fukal, and P. Rauch *(Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague):* ***Listeria monocytogenes* – Dangerous Pathogen and Its Detection in Foods**

The aim of the review is to characterize *Listeria monocytogenes* as one of the most dangerous microbial contaminants in foods. A survey of methods for its detection is given. Molecular genetic methods and immunoassay techniques are recognized as promising methods for *Listeria monocytogenes* screening in food samples. A list of commercially available kits is presented.

Impaktový faktor Chemických listů opět narostl !

Na ISI Web of Knowledge (http://isi17.isiknowledge.com/portal.cgi?DestApp=JCR&Func=Frame) byly aktualizovány hodnoty impaktových faktorů za rok 2004. Je potěšitelné, že Chemické listy opět potvrdily každoroční vzrůstající trend, který nastartovaly v roce 1998 (IF_{1998} = 0,108). Současná hodnota činí:

$$IF_{2004} = 0{,}348.$$

Zvýšení proti roku 2003 je sice nepatrné (IF_{2003} = 0,345) a naše možnosti se zřejmě blíží k limitě, ale stále si udržujeme první místo mezi impaktovanými časopisy vydávanými v České republice v národním jazyce.

redakce