

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Maja KAVALIČ

**TIPIZACIJA IZOLATOV *Listeria monocytogenes* S
KLASIČNO SEROLOŠKO METODO IN PCR TER
SUBTIPIZACIJA S PFGE**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Maja KAVALIČ

**TIPIZACIJA IZOLATOV *Listeria monocytogenes* S KLASIČNO
SEROLOŠKO METODO IN PCR TER SUBTIPIZACIJA S PFGE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**TYPING OF *Listeria monocytogenes* ISOLATES USING
CONVENTIONAL SEROLOGICAL METHOD AND PCR AS WELL
AS SUBTYPING USING THE PFGE METHOD**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme, za somentorico doc. dr. Ireno Zdovc in za recenzentko prof. dr. Evo Ružić Sabljić.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme
Somentorica: doc. dr. Irena Zdovc
Recenzentka: prof. dr. Eva Ružić Sabljić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Alojz IHAN
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Irena ZDOVC
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo

Članica: prof. dr. Eva RUŽIĆ SABLJIĆ
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Ocena:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana, se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Maja Kavalič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 579.25:579.6.083(043)=163.6
KG patogeni mikroorganizmi/*Listeria monocytogenes*/tipizacija/klasična serotipizacija/subtipizacija/molekularne tehnike/PCR/PFGE
AV KAVALIČ, Maja, dipl. mikrobiol. (UN)
SA SEME, Katja (mentorica)/ZDOVC, Irena (somentorica)/ RUŽIĆ SABLJIĆ, Eva (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2014
IN TIPIZACIJA IZOLATOV *Listeria monocytogenes* S KLASIČNO SEROLOŠKO METODO IN PCR TER SUBTIPIZACIJA S PFGE
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XIII, 104 str., 32 pregl., 23 sl., 6 pril., 113 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI *Listeria monocytogenes* je patogena bakterija, ki lahko povzroča listeriozo pri ljudeh in živalih. Okužba sicer ni pogosta, vendar je bolezen lahko izjemno huda in smrtnost visoka. Prav zaradi tega je hitrost pri odkrivanju vira okužbe ali kontaminacije, še posebej pri pojavu epidemij, ključna pri zajezitvi širjenja okužb. Namen magistrskega dela je bil določiti genetski profil, ki bo osnova za analizo poti in načinov prenosa *L. monocytogenes*. Za to smo skupaj s klasičnimi načini serotipizacije, uporabili še genotipizacijske metode (PCR, PFGE). Domnevamo smo, da bodo imele uporabljene fenotipske in genotipske tipizacijske metode zadostno moč razlikovanja za določitev različnih tipov, ki se pojavljajo v posameznem okolju, kar bi nam omogočalo identifikacijo morebitnih prevladujočih tipov. Predvidevali smo tudi, da bodo tipi, ki jih najpogosteje ugotavljamo v živilih, identični s tistimi, ki najpogosteje povzročajo klinična obolenja pri ljudeh. Ugotovili smo, da sta serotipizacijski metodi primerljivi, a imata kot epidemiološko orodje omejeno vrednost, saj večina kliničnih izolatov *L. monocytogenes* lahko razvrstimo v serološke tipe 1/2a, 1/2b 1/2c ali 4b. Za uspešen epidemiološki nadzor ima večji pomen genotipizacijska metoda PFGE, ki smo jo uporabili za subtipizacijo listerij. Z njo smo uspeli potrditi hipotezo, da bodo imele naše uporabljene tipizacijske metode zadostno moč razlikovanja za določitev različnih podtipov, ki se pojavljajo v okolju. Hipoteze, da bodo podtipi, ki jih najpogosteje odkrijemo v živilih identični s tistimi, ki najpogosteje povzročajo klinična obolenja pri ljudeh, pa nismo mogli v celoti potrditi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 579.25:579.6.083(043)=163.6
CX pathogens/*Listeria monocytogenes*/typing/conventional serological typing/subtyping/molecular techniques/PCR/PFGE
AU KAVALIČ, Maja
AA SEME, Katja (supervisor)/ZDOVC, Irena (co-advisor)/ RUŽIĆ SABLJIĆ, Eva (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2014
TY TYPING OF *Listeria monocytogenes* ISOLATES USING CONVENTIONAL SEROLOGICAL METHOD AND PCR AS WELL AS SUBTYPING USING THE PFGE METHOD
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XIII, 104 p., 32 tab., 23 fig., 6 ann., 113 ref.
LA sl
AI sl/en
AB *Listeria monocytogenes* is a pathogenic bacterium that causes a disease called listeriosis in humans and animals. Despite the fact that an infection with it is not common it does cause high mortality. That is why the speed in detecting the source of infection or contamination, especially during an epidemic, is vital in stopping the spread of the disease. The purpose of the master thesis was to determine the genetic profile that will be the basis for the analysis of routes and modes of transmission of *L. monocytogenes*. To achieve this we used the traditional methods of serotyping, together with genotyping methods (PCR, PFGE). We hypothesized that the methods used will have sufficient power to determine the differentiation of different types that occur in a particular environment, which would allow us to identify any dominant types. We also assumed that the types that are most often found in foods are identical to the ones that most often cause clinical disease in humans. We found that the serotyping methods are comparable, but are both of limited value as an epidemiological tool, since the majority of clinical isolates of *L. monocytogenes* can be classified into serological types 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b. The genotyping method PFGE that we used to subtype *Listeria* was much better suited for a successful epidemiological surveillance. With it we were able to verify the hypothesis that our typing methods used will have sufficient power to determine the differentiation of different subtypes that occur in the environment. We were however unable to fully confirm the hypothesis that the subtypes most frequently detected in foods are identical to those that most often cause clinical disease in humans.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli.....	XII
 1 UVOD	 1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
 2 PREGLED OBJAV	 3
2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ IZ RODU <i>LISTERIA</i>	3
2.2 VRSTE LISTERIJ	3
2.3 PATOGENOST BAKTERIJE <i>L. monocytogenes</i>	5
2.3.1 Patogeneza	5
2.3.2 Virulenčni dejavniki	7
2.4 LISTERIOZA PRI LJUDEH.....	8
2.4.1 Incidenca v Evropi in Sloveniji.....	9
2.4.2 Klinični znaki	9
2.4.3 Listerioza med nosečnostjo	10
2.4.4 Neonatalna listerioza	11
2.4.5 Invazivna bolezen pri odraslih	11
2.4.6 Neinvazivna listerioza – bolezen prebavil	12
2.4.7 Zdravljenje	12
2.5 LISTERIOZA PRI ŽIVALIH.....	13
2.5.1 Ovce	13
2.5.2 Koze	14
2.5.3 Govedo	14
2.6 <i>Listeria monocytogenes</i> V ŽIVILIH.....	14
2.6.1 Dejavniki, ki vplivajo na preživetje listerij v živilih.....	15
2.6.1.1 Temperatura.....	15
2.6.1.2 Kislost.....	15
2.6.1.3 Slanost	15
2.6.1.4 Vodna aktivnost (a_w)	16
2.6.2 <i>Listeria monocytogenes</i> v posameznih skupinah živil	16
2.6.3 Kontaminacija živil	16
2.7 RAZŠIRJENOST BAKTERIJ <i>Listeria monocytogenes</i>	17

2.7.1. <i>Listeria monocytogenes</i> v zemlji in vegetaciji	18
2.7.2 <i>Listeria monocytogenes</i> v vodi.....	19
2.7.3 <i>Listeria monocytogenes</i> v odplakah	19
2.7.4 <i>Listeria monocytogenes</i> v živalski krmí.....	20
2.7.5 <i>Listeria monocytogenes</i> v predelovalni industriji.....	20
2.8 TIPIZACIJA IN TIPIZACIJSKE METODE	21
2.8.1 Fenotipske tipizacijske metode.....	22
2.8.1.1 Serotipizacija	22
2.8.2 Genotipske tipizacijske metode	24
2.8.2.1 Verižna reakcija s polimerazo	24
2.8.2.1.1 Serotipizacija <i>Listeria monocytogenes</i> z uporabo verižne reakcije s polimerazo	26
2.8.2.2 Pulzna gelska elektroforeza (PFGE).....	27
2.8.3 Kapilarna elektroforeza	29
3 MATERIALI IN METODE DELA	30
3.1 MATERIALI	30
3.1.1 Vrste vzorcev, izolatov in vzorčenje.....	30
3.1.2 Gojišča za izolacijo bakterije <i>Listeria monocytogenes</i> iz različnih okolij	32
3.1.3 Materiali za klasično serotipizacijo	35
3.1.4 Materiali in reagenti za serotipizacijo <i>Listeria monocytogenes</i> z verižno reakcijo s polimerazo (večkratni PCR)	36
3.1.5 Materiali in reagenti za serotipizacijo <i>Listeria monocytogenes</i> z verižno reakcijo s polimerazo (enkratni PCR)	36
3.1.6 Materiali in reagenti za kapilarno elektroforezo.....	37
3.1.7 Materiali in reagenti za subtipizacijo s PFGE	37
3.1.8 Potrošni material	38
3.1.9 Laboratorijska oprema	38
3.2 UPORABLJENE METODE DELA	39
3.2.1 Izolacija <i>Listeria monocytogenes</i>	39
3.2.2 Potek identifikacije	42
3.2.3.2.2 Izkoriščanje ogljikovih hidratov	43
3.2.4 Klasična serotipizacija bakterije <i>Listeria monocytogenes</i>	44
3.2.4.1 Določitev O antiga	44
3.2.4.2 Določitev H antiga	46
3.2.4.3 Interpretacija rezultatov	49
3.2.5 Serotipizacija bakterije <i>Listeria monocytogenes</i> z verižno reakcijo s polimerazo	49
3.2.5.1 Izolacija DNA	49
3.2.5.2 Pomnoževanje DNA	49
3.2.6 Subtipizacija bakterije <i>Listeria monocytogenes</i> s pulzno gelsko elektroforezo... ..	53
3.2.6.1 Izolacija DNA	53

3.2.6.2 Cepitev DNA	58
3.2.6.2.1 Cepitev DNA z <i>Asc I</i>	58
3.2.6.2.2 Cepitev DNA referenčnih sevov <i>Salmonella braenderup</i> z <i>XbaI</i>	58
3.2.6.2.3 Cepitev DNA z <i>ApaI</i>	59
3.2.6.3 Elektroforeza	62
3.2.6.4 Odčitavanje rezultatov	65
3.2.6.5 Analiza rezultatov	65
4 REZULTATI.....	67
4.1 REZULTATI SEROTIPIZACIJE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> PRIDOBLEDJENI Z METODO VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO IN KLASIČNO SEROLOŠKO METODO	67
4.2 REZULTATI PRIDOBLEDJENI Z METODO PULZNE GELSKE ELEKTROFOREZE (PFGE).....	71
5 RAZPRAVA.....	73
5.1 EPIDEMIOLOŠKE POVEZAVE KLINIČNIH IZOLATOV	77
6 SKLEPI	79
7 POVZETEK.....	80
8 VIRI	82
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Klinične oblike okužb z bakterijami rodu <i>Listeria</i> pri domačih živalih in ljudeh (Quinn in sod., 2011).....	4
Preglednica 2: Laboratorijske metode za razlikovanje med bakterijskimi vrstami rodu <i>Listeria</i> (Quinn in sod., 2011, Graves in sod., 2010, Leclercq in sod., 2010)	5
Preglednica 3: Število obolelih ljudi za listeriozo/100.000 prebivalcev in skupno število obolelih v Sloveniji (v letih 2005-2010) (Poročilo ..., 2011, Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni ..., 2013).	9
Preglednica 4: Oblike bolezni pri listeriozi glede na prevladujoče klinične simptome (Painter in Slutsker, 2007)	10
Preglednica 5: Shema za serološko tipizacijo bakterij z rodu <i>Listeria</i> (Gasanov in sod., 2005).....	23
Preglednica 6: Razvrstitev <i>Listeria monocytogenes</i> v molekularne serološke skupine na podlagi prisotnosti specifičnih tarčnih genov (Kérouanton in sod., 2010).	26
Preglednica 7: Primerjava med rezultati molekularne in klasične serotipizacije (Doumith in sod., 2004)	27
Preglednica 8: Tarčni geni za pomnoževanje <i>Listeria monocytogenes</i> z verižno reakcijo s polimerazo (večkratni PCR) in poimenovanje ter sekvenca začetnih oligonukleotidov.....	36
Preglednica 9: Tarčni gen za pomnoževanje <i>Listeria monocytogenes</i> z verižno reakcijo s polimerazo (enkratni PCR) in poimenovanje ter sekvenca začetnih oligonukleotidov.....	37
Preglednica 10: Določanje serotipa <i>Listeria monocytogenes</i> na podlagi kombinacije O in H antigenov	49
Preglednica 11: Mešanica za večkratno verižno reakcijo s polimerezo (količine so podane za en vzorec)	50
Preglednica 12: Pogoji pomnoževanja za večkratno verižno reakcijo s polimerezo.....	50
Preglednica 13: Velikosti produktov večkratne verižne reakcije s polimerezo.....	51
Preglednica 14: Mešanica za enkratno verižno reakcijo s polimerezo (količine so podane za en vzorec)	51
Preglednica 15: Pogoji pomnoževanja enkratne verižne reakcije s polimerezo.....	51
Preglednica 16: Velikost produkta enkratne verižne reakcije s polimerezo.....	51
Preglednica 17: Potrebne količine 10 % natrijev dodecil sulfata, 1,2 % agaroze in proteinaze K za pripravo agaroze	53
Preglednica 18: Potrebne količine pufra za lizo celic in proteinaze K potrebne za lizo celic	56
Preglednica 19: Priprava ultrapure vode in pufra 4 za pripravo predcepitvene mešanice ..	58
Preglednica 20: Priprava ultrapure vode, pufra 4 in encima <i>AscI</i> za pripravo cepitvene mešanice	58
Preglednica 21: Potrebne količine ultrapure vode in pufra 4 za pripravo predcepitvene mešanice referenčnih sevov	58
Preglednica 22: Potrebne količine ultrapure vode, pufra 4 in encima <i>XbaI</i> za pripravo cepitvene mešanice referenčnih sevov	59

Preglednica 23: Potrebne količine ultrapure vode in pufra 4 za pripravo predcepitvene mešanice	59
Preglednica 24: Potrebne količine ultrapure vode, pufra 4 in encima <i>ApaI</i> za pripravo cepitvene mešanice	59
Preglednica 25: Parametri elektroforeze za <i>Listeria monocytogenes</i> za vse vzorce	62
Preglednica 26: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi živalskimi izolati <i>Listeria monocytogenes</i>	68
Preglednica 27: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi živilskimi izolati <i>Listeria monocytogenes</i>	68
Preglednica 28: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi izolati <i>Listeria monocytogenes</i> iz naravnega okolja	69
Preglednica 29: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi izolati <i>Listeria monocytogenes</i> iz klavnic	69
Preglednica 30: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi človeškimi izolati <i>Listeria monocytogenes</i>	70
Preglednica 31: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi izolati <i>Listeria monocytogenes</i>	71
Preglednica 32: Pulzoskupine, podtipi in serotipi izolatov <i>Listeria monocytogenes</i>	72

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz patofiziologije listerijske okužbe (povzeto po: Vazquez-Boland in sod., 2001).....	6
Slika 2: Prenos <i>Listeria monocytogenes</i> med različnimi okolji in njenimi gostitelji (povzeto po: Ivanek in sod., 2006).....	18
Slika 3: Shema postopka za verižno reakcijo s polimerazo (Brown, 2010).....	25
Slika 4: Kapilarna elektroforeza (povzeto po QIAxcel® DNA Handbook, 2013).....	29
Slika 5: Zbiranje vzorcev iz naravnega okolja po kmetijah: a) vzorčenje silaže, b) vzorčenje vode iz napajalnika, c) vzorčenje gnoja in d) vzorčenje zemlje.....	31
Slika 6: <i>Listeria monocytogenes</i> (levo) in <i>Listeria innocua</i> (desno) na ALOA gojišču (Agar Listeria Ottaviani Agosti)	40
Slika 7: <i>Listeria monocytogenes</i> na PALCAM agarju (Polymyxin Acriflavine LiCl Ceftazidime Aesculin Mannitol).....	40
Slika 8: Shema postopka za izolacijo listerij (povzeto po standardu ISO11290-2:1998) ...	41
Slika 9: Shema postopka za identifikacijo <i>Listeria monocytogenes</i> (povzeto po standardu ISO11290-2:1998)	42
Slika 10: Rast <i>Listeria monocytogenes</i> (levo), <i>Listeria ivanovii</i> (na sredini) in <i>Listeria innocua</i> (desno) na krvnem agarju.....	43
Slika 11: Reakcija izkoriščanja različnih sladkorjev, pozitivna (levo) in negativna (desno) reakcija.....	44
Slika 12: Shema determinacije O antigena bakterije <i>Listeria monocytogenes</i>	45
Slika 13: Shema determinacije H antigena bakterije <i>Listeria monocytogenes</i> ; vzpodbujanje tvorbe bičkov <i>Listeria monocytogenes</i>	47
Slika 14: Shema determinacije H antigena bakterije <i>Listeria monocytogenes</i> ; aglutinacija z antiserumi.....	48
Slika 15: Shema serotipizacije bakterije <i>Listeria monocytogenes</i> z metodo verižne reakcije s polimerazo	52
Slika 16: Shema izolacije DNA iz kulture <i>Listeria monocytogenes</i> ; priprava suspenzije celic za restrikcijo	54
Slika 17: Shema izolacije DNA <i>Listeria monocytogenes</i> v agarozni; priprava natrijevega dodecil sulfata, agaroze, proteinaze K in čepkov.....	55
Slika 18: Shema lize <i>Listeria monocytogenes</i> v agaroznih čepkih in spiranje čepkov	57
Slika 19: Shema priprave in inkubacije DNA <i>Listeria monocytogenes</i> in <i>Salmonella braenderup</i> v predcepitvenih mešanicah	60
Slika 20: Shema cepitve DNA <i>Listeria monocytogenes</i> z <i>AscI</i> in <i>ApaI</i> ter cepitve DNA <i>Salmonella braenderup</i> z <i>XbaI</i> – priprava in inkubacija v cepitvenih mešanicah	61
Slika 21: Shema priprave vzorcev na elektroforezo.....	63
Slika 22: Shema priprave gela in aparata za elektroforezo	64
Slika 23: Shema detekcije rezultatov po končani elektroforezi.....	66

KAZALO PRILOG

- Priloga A 1: Rezultati klasične serološke tipizacije in tipizacije s PCR pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz živali
- Priloga A 2: Rezultati klasične serološke tipizacije in tipizacije s PCR pri izolatih *L. monocytogenes*, izoliranih iz živil
- Priloga A 3: Rezultati klasične serološke tipizacije in tipizacije s PCR pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz naravnega okolja
- Priloga A 4: Rezultati klasične serološke tipizacije in tipizacije s PCR pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz klavnic
- Priloga A 5: Rezultati klasične serološke tipizacije in tipizacije s PCR pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz ljudi
- Priloga A 6: Shema PFGE profilov pridobljenih z restrikcijo izolatov *L. monocytogenes* z encimom *Apal*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALOA agar	Selektivno trdno gojišče za izolacijo listerij (ang. Agar Listeria Ottaviani Agosti)
a_w	Vodna aktivnost (ang. Water Activity)
BHI	Neselektivno tekoče gojišče (ang. Brain Heart Infusion)
C (PC-PLC)	Fosfatidilholin specifična fosfolipaza (ang. Phosphatidylcholine specific Phospholipase C)
C (PI-PLC)	Fosfatidilinozitol specifična fosfolipaza (ang. Phosphatidylinositol specific Phospholipase C)
CFU	Število organizmov, ki tvorijo kolonije (ang. Colony Forming Units)
CLB	Puffer za lizo celic (ang. Cell Lysis Buffer)
DNK	Deoksiribonukleinska kislina (ang. DNA - Deoxyribonucleic Acid)
EDTA	Etilendiamintetraocetna kislina (ang. Ethylenediaminetetraacetic Acid)
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (ang. European Food Safety Authority)
EURL	Evropski referenčni laboratorij (ang. European Union Reference Laboratory)
F1	Polovični Fraiser-jev bujon
F2	Fraiser-jev bujon
FDA	Zvezni urad za živila in zdravila (ang. Food and Drug Administration)
HACCP	Sistemska metoda, ki ugotavlja in ocenjuje dejavnike tveganja pri posameznih postopkih proizvodnje in prometa z živili (ang. Hazard Analysis Critical Control Point)
InlA	Internalin A
InlB	Internalin B
KA	Krvni agar
LLO	Listeriolizin O
MPN	Najverjetnejša vrednost (ang. Most Probable Number)
OD	Optična gostota (ang. Optical Density)
PALCAM agar	Selektivno trdno gojišče za izolacijo listerij (ang. Polymyxin Acriflavine LiCl Ceftazidime Aesculin Mannitol)
PCR	Verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Pulzna gelska elektroforeza (ang. Pulsed Field Gel Electrophoresis)
PI3K	Fosfatidilinositol 3 kinaza (ang. Phosphoinositide 3 Kinase)
PLC	Selektivno trdno gojišče PALCAM agar za izolacijo listerij
SCVPH	Znanstveni odbor za veterinarske javnozdravstvene ukrepe (ang. Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health)
SDS	Natrijev dodecil sulfat (ang. Sodium Dodecyl Sulfate)
SDV	Sterilna destilirana voda

SSP	SeaKem Gold agarosa, SDS, proteinaza K
TE pufer	Tris EDTA pufer
TT	Telesna temperatura
UPGMA	Metoda neponderirane aritmetične sredine (ang. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)
VURS	Veterinarska Uprava Republike Slovenije

1 UVOD

Listeria monocytogenes je za človeka patogena bakterija. Povzroča različne bolezni, od influenci podobne bolezni do spontanega splava pri nosečnicah ter do sepse in smrtno nevarnega meningoencefalitisa pri dojenčkih in imunsko oslabelih ljudeh. Do okužbe ljudi najpogosteje pride ob zaužitju živil kontaminiranih z *L. monocytogenes*. Okužbe ljudi in živali niso pogoste, vendar je bolezen lahko huda in med obolelimi povzroča veliko smrtnost. Prav zaradi visoke umrljivosti prištevamo v industrializiranih državah *L. monocytogenes* med najpomembnejše bakterije, ki se prenašajo s kontaminirano hrano (Vazquez-Boland in sod., 2001; Painter in Slutsker, 2007).

L. monocytogenes namreč uspešno raste pri širokem razponu temperatur (tudi pri temperaturah hladilnika), sposobna je preživetja pri večjem razponu pH vrednosti, prav tako pa lahko preživi zelo slane pogoje. Zaradi tega jo lahko izoliramo iz veliko različnih živil, tako živalskega kot rastlinskega izvora ter iz že obdelanih živil in surovin (Khelef in sod., 2006; Lado in Yousef, 2007; Griffiths, 2003; Norton in Braden, 2007).

Različne metode tipizacije bakterijskih sevov so orodje za iskanje poti širjenja bakterij in tako vira okužbe ali kontaminacije. Hitro in učinkovito razlikovanje med sorodnimi bakterijskimi izolati je namreč izjemnega pomena za epidemiološki nadzor nalezljivih bolezni. V času epidemije je hitro ukrepanje nujno in s pomočjo tipizacije lahko identificiramo epidemiološko povezane izolate in določimo rezervoar ter poti širjenja okužbe (van Belkum in sod., 2007).

Metodi za serotipizacijo listerij sta klasična serološka tipizacija s pomočjo komercialnih antiserumov in serotipizacija z verižno reakcijo s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction - PCR). Večina humanih kliničnih in živilskih sevov vrste *L. monocytogenes* sodi v serološke tipe 1/2a, 1/2b 1/2c ali 4b. Zaradi tega ima serotipizacija, kot epidemiološko orodje, omejeno vrednost (van Belkum in sod., 2007; Gasanov in sod., 2005; McLauchlin in sod., 2004).

Za subtipizacijo listerij pa uporabljam pulzno gelsko elektroforezo (ang. Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE), ki je ena izmed najbolj ponovljivih molekularnih tipizacijskih metod z visoko ločljivostjo. Z njeno pomočjo namreč lahko ocenimo razlike oz. spremembe v genomih bakterijskih izolatov in tako določimo njihovo medsebojno podobnost oziroma sorodnost. Metoda PFGE za namene epidemioloških študij velja za zlati standard za odkrivanje s hrano povezanih bakterijskih patogenov, vključno z *L. monocytogenes* (van Belkum in sod., 2007).

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je uporabiti genotipizacijske metode, skupaj s klasičnimi načini serotipizacije, in z njimi določiti genetski profil, ki bo osnova za analizo poti in načinov prenosa *L. monocytogenes* v vseh fazah prehranske verige, od hleva do predelovalnega obrata, oziroma živilskega izdelka in končno do človeka.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljeni smo, da bodo imele uporabljeni fenotipske in genotipske tipizacijske metode zadostno moč razlikovanja za določitev različnih tipov, ki se pojavljajo v posameznem okolju. To nam bo namreč omogočalo identifikacijo morebitnih perezistentnih oz. prevladujočih tipov.

Predvidevali smo tudi, da bodo tipi, ki jih najpogosteje ugotavljamo v živilih, identični s tistimi, ki najpogosteje povzročajo klinična obolenja pri ljudeh.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ IZ RODU *Listeria*

Bakterije z rodu *Listeria* so majhne, grampozitivne paličke ali kokobacili, ki so dolge od 0,5 do 2 μm , in široke od 0,4 do 0,5 μm . Pod mikroskopom jih lahko najdemo posamezno, v obliki črke V in kratkih verižic. Morfološko so podobne korinebakterijam. So nesporogene in nimajo kapsule. Za rast so nezahtevne, saj rastejo na številnih gojiščih, tudi na neobogatenih medijih. Na krvnem agarju povzročijo hemolizo beta (Müller-Premru, 2002).

Filogenetsko so najbolj sorodne bakterijam iz rodu *Lactobacillus* in tako kot homofermentativne mlečno kislinske bakterije pretvorijo glukozo v kisle produkte, a pri tem ne nastane plin (Madigan in Martinko, 2006). Listerije so fakultativno anaerobne bakterije, zato se lahko dobro razmnožujejo tudi med okužbo. Odlično rastejo tudi v aerobnih laboratorijskih pogojih. Pri anaerobnih pogojih pa je njihova rast ustavljenata ali pa vsaj močno inhibirana. Ena od pomembnih značilnosti je sposobnost rasti pri širokem temperaturnem razponu (Khelef in sod., 2006). Rastejo lahko pri temperaturah od 0 °C do 45 °C (Lado in Yousef, 2007), njihov optimum pa je med 30-37 °C. Prav tako lahko tolerirajo širok razpon pH vrednosti, med 4,5 in 9,6 in slane razmere (10 % NaCl). Za optimalno rast pa je najbolj ustrezen nevtralen pH in 0,5 % NaCl (Khelef in sod., 2006).

Listerije so katalaza pozitivne, oksidaza negativne in gibljive, imajo namreč do šest peritrihnih flagelov (Müller-Premru, 2002). Na osnovi flagelarnih antigenov (H) lahko listerije razvrstimo v 5 seroloških skupin: A, B, C, D in E. Flagelarni protein je kodiran na genu *flaA*, izraženost pa je odvisna od temperature. Do največje izraženosti, in posledično do najbolj izrazite gibljivosti, pride pri temperaturah 4-30 °C, pri temperaturi 37 °C pa običajno niso več gibljivi (Khelef in sod., 2006).

V rodu *Listeria* sta za ljudi in živali patogeni dve vrsti, *L. monocytogenes* in *L. ivanovii*. Pri živalih pa redko lahko povzroča bolezen tudi *L. innocua*. Najbolj pomembna od teh je *Listeria monocytogenes*, saj je razširjena po celem svetu in povzroča listeriozo pri številnih živalskih vrstah in ljudeh. Prvič so jo izolirali leta 1924 po izbruhu hude mononukleoze pri zajcih in morskih prašičkih (Khelef in sod., 2006). Bakterija se prenaša preko kontaminirane hrane, običajno z živili, ki so namenjena uživanju brez predhodne termične obdelave. Po zaužitju lahko povzroči vse od blažje oblike bolezni do smrtne oblike meningitisa (Madigan in Martinko, 2006).

2.2 VRSTE LISTERIJ

V rod *Listeria* danes uvrščamo 8 vrst: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. marthii* in *L. rocourtiae*. Zadnji dve sta bili opisani šele leta 2009. *L. ivanovii* ima še dve podvrsti *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* in *L. ivanovii* subsp.

londoniensis. *L. grayi* je le daljno sorodna z ostalimi vrstami, zato je bilo tudi predlagano, da se jo premesti v rod *Murraya* (den Bakker in sod., 2010).

L. marthii trenutno ne povezujejo z bolezni pri ljudeh in živalih (Graves in sod., 2010), prav tako je nevirulentna tudi *L. rocourtiae* (Leclercq in sod., 2010). *L. monocytogenes* in *L. ivanovii* sta patogeni za toplokrvne gostitelje. *L. monocytogenes* povzroča resno bolezen pri ljudeh, prav tako pa tudi invazivne okužbe pri številnih drugih toplokrvnih gostiteljih, še posebno prežvekovalcih. *L. ivanovii* pretežno povzroča okužbe pri prežvekovalcih, vendar je bila povezana tudi z redkimi primeri okužb pri ljudeh. Velja, da ima ta vrsta ožji izbor gostiteljev kot *L. monocytogenes* (preglednica 1). Vsaka od teh dveh patogenih vrst je tesno sorodna z nepatogeno vrsto, *L. monocytogenes* je ozko sorodna z *L. innocua* in *L. marthii*, *L. ivanovii* pa z *L. seeligeri*, ki ni patogena čeprav mnogi izolati vsebujejo gene homologne virulenčnim genom listerij (den Bakker in sod., 2010).

V rodu *Listeria* so tri vrste, ki na krvnem agarju povzročajo hemolizo, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* in *L. seeligeri*. Vse te vsebujejo niz genov za virulenco, ki vključuje gene *hly* (kodira hemolizin), *prfA*, *plcA*, *mpl*, *actA* in *plcR* (Graves in sod., 2010) (preglednica 2).

Filogenetske raziskave kažejo, da imata *L. monocytogenes* in *L. innocua* skupnega prednika. Prav tako pa velja tudi za skupino *L. seeligeri*, *L. ivanovi* in *L. welshimeri*. V obeh skupinah so vrste z virulenčnimi dejavniki in brez njih. Domnevajo, da je skupni prednik bakterij z rodu *Listeria*, ki je vseboval virulenčne dejavnike, med evolucijo v dveh ločenih dogodkih te izgubil z delecijo, kar je vodilo do razvoja nevirulentnih vrst (Kuhn in Goebel, 2007).

Preglednica 1: Klinične oblike okužb z bakterijami rodu *Listeria* pri domačih živalih in ljudeh (Quinn in sod., 2011)

Vrsta bakterije	Gostitelj	Oblika bolezni
<i>L. monocytogenes</i>	Ovce, govedo, koze	Encefalitis, abortus, sepsa, endoftalmitis
	Govedo	Mastitis (redko)
	Psi, mačke, konji	Abortus, encefalitis (redko)
	Prašiči	Abortus, sepsa, encefalitis
	Ptiči	Sepsa
	Ljudje	Influenci podobna bolezen, abortus, sepsa, meningoencefalitis
<i>L. ivanovii</i>	Ovce, govedo	Abortus
	Ljudje	Bakteriemija, gastroenteritis
<i>L. innocua</i>	Ovce	Meningoencefalitis (redko)

Preglednica 2: Laboratorijske metode za razlikovanje med bakterijskimi vrstami rodu *Listeria* (Quinn in sod., 2011; Graves in sod., 2010; Leclercq in sod., 2010)

Vrsta iz rodu <i>Listeria</i>	Hemoliza na KA	CAMP test		Proizvodnja kisline iz sladkorja		
		<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	D-manitol	L-ramnoza	D-ksiloza
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	++	-	+	-	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	R	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	-	-	+
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	-	R	+
<i>L. grayi</i>	-	-	-	+	R	-
<i>L. marthii</i>	-			-	-	-
<i>L. rocourtiae</i>	-	-	-	+	+	+

*KA – krvni agar

*R – različne reakcije

**S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

**R. equi* – *Rhodococcus equi*

*CAMP (Christie Atkins Munch-Peterson) – test za identifikacijo patogenih vrst listerij, predvsem *Listeria monocytogenes*

2.3 PATOGENOST BAKTERIJE *L. monocytogenes*

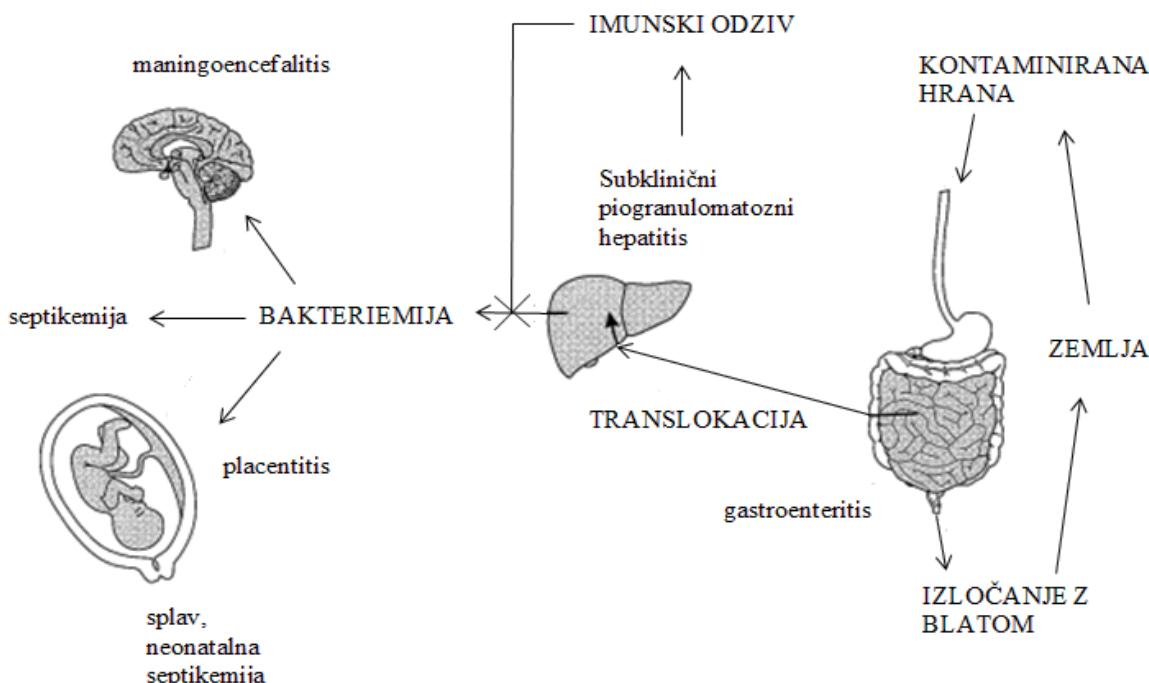
2.3.1 Patogeneza

L. monocytogenes je patogena bakterija, ki se lahko naseli v številnih gostiteljih in tipih gostiteljskih celic. Primarna pot okužbe je ponavadi preko črevesnega epitelija in je posledica zaužitja kontaminirane hrane (Freitag in sod., 2009). V želodcu je listerija izpostavljena gostiteljevim proteolitičnim encimom, kislemu okolju (pH 2), žolčnim solem in nespecifičnemu vnetnemu odzivu. Sposobnost preživetja takega okolja je posledica izražanja alternativnega faktorja sigma, σ^B , ki je kodiran z genom *sigB*. Ta regulira izražanje genov stresnega odziva (*opuCA*, *lmo1421* in *bsh*) ter z njimi povezanih proteinov (Sleator in sod., 2003). Nato bakterije predrejo črevesno bariero in se širijo po gostitelju preko limfe in krvi do različnih tkiv (Freitag in sod., 2009). Predvidevajo, da so jetra prvi tarčni organ po vstopu v krvožilni sistem. Tu se bakterija aktivno pomnožuje, dokler ni okužba zavrta s pomočjo celično posredovanega imunskega odziva. Do te stopnje okužbe pride pogosto, saj je *L. monocytogenes* dokaj pogosto prisotna v hrani ljudi. Prav zaradi pogoste izpostavljenosti listerijskim antigenom se pri ljudeh z normalnim imunskim odzivom vzdržujejo spominske T-celice. Problem pa nastane pri imunsko oslabljenih posameznikih, saj ima neomejeno razmnoževanje listerij v jetrih za posledico nizko stopnjo bakteriemije, ki traja dalj časa, kar vodi do invazije bakterij v sekundarne tarčne organe (možgani ali placenta) ter do kliničnega pojava bolezni (Ramaswamy in sod., 2007). Okužba možganov se pri imunsko oslabelih

Ijudeh kaže kot meningitis ali encefalitis, okužba rodil pri nosečnicah pa lahko povzroči splav (Freitag in sod., 2009) (slika 1).

L. monocytogenes in *L. ivanovii* sta fakultativni intracelularni bakteriji, ki lahko preživita v makrofagih, prav tako pa lahko vdreta tudi v ne-fagocitne celice, kot so epitelne celice, hepatocite in endotelijalne celice (Ramaswamy in sod., 2007). *L. monocytogenes* je razvila mehanizem s katerim inducira lastno fagocitozo in s tem pridobi vstop v gostiteljsko celico. Na površini ima namreč specifične proteine, ki jih imenujemo internalini (InlA, InlB). Ti omogočajo pritrditev bakterij na epitelne celice gostitelja in kasnejši prevzem s strani slednjih (Wehland in Carl, 1998). Prav zaradi svoje intracelularne sposobnosti razmnoževanja in neposrednega širjenja med celicami, se lahko uspešno izogne humoralnemu obrambnemu sistemu gostitelja (Liu in sod., 2007).

Virulentni sevi listerij preživijo znotraj celic gostitelja, ker pobegnejo iz fagosoma, predno se ta razvije v fagolizosom. *L. monocytogenes* ima citolizin, ki ga imenujemo listeriolizin O (LLO) ter fosfolipazni encim (fosfatidilinozitol specifična fosfolipaza C), ki skupaj z proteinom PlcA, uniči membrano fagocitne vakuole, kar listeriji omogoči vstop v citoplazmo. Po vstopu v citoplazmo gostiteljske celice prične listerija z intracelularnim pomnoževanjem. Proizvaja namreč aktin-polimerizirajoči protein, ActA. Ta omogoča nastanek repu podobnih struktur iz celičnih mikrofilamentov gostitelja, ki pripomorejo h gibljivosti tega invazivnega patogena. Gibljiva listerija nato sproži nastanek pseudopodom podobnih izrastkov na citoplazemski membrani, ki nato prenesejo bakterije v sosednje gostiteljske celice. Postopek se nato ponavlja, vsakič pa mu sledi še pomnoževanje listerije v na novo okuženih celicah (Liu in sod., 2007).



Slika 1: Shematski prikaz patofiziologije listerjske okužbe (povzeto po: Vazquez-Boland in sod., 2001)

2.3.2 Virulenčni dejavniki

Virulenčni dejavniki bakterij so vse snovi, ki jih bakterija ustvari in ji omogočajo povzročitev bolezni. Bakterija *L. monocytogenes* ima več virulenčnih dejavnikov, ki ji omogočajo preživetje in s katerimi povzroči okužbo. Preživeti mora namreč v kislem okolju želodca, se prebiti preko prebavnega trakta v kri in se ob tem izogniti imunskemu sistemu (Kuhn in Goebel, 2007).

Virulenčni dejavniki *L. monocytogenes* so: citolizin (listeriolizin O), internalini, površinska proteina p60 in p104, protein Act A ter fosfolipaze.

Prvi opisan virulenčni dejavnik pri listerijah je bil listeriolizin O. Tega kodira gen *hly* in ima ključno vlogo pri patogenezi, tako pri intracelularnem ciklu patogenih listerij, kot tudi pri interakciji bakterije s svojim gostiteljem. Po vstopu v celico, je *L. monocytogenes* namreč takoj obdana z membrano fagosoma. Njeno preživetje je odvisno od pobega iz nastale vakuole. Za to pa je ključen listeriolizin O (LLO), ki je bakterijski toksin in dela pore v membrani fagosoma. Tako omogoči *L. monocytogenes*, da pobegne v citoplazmo gostiteljske celice. Njegova aktivnost se še poveča pri kislem pH, kakršen je v fagosomu (Vazquez-Boland in sod, 2001).

Internalin A (InlA) je protein na površini listerij, ki je pomemben za vstop *L. monocytogenes* v ne-fagocitne celice, kot so npr. epitelne celice. Internalin B (InlB) pa ima vlogo pri invaziji hepatocitov v jetrih. Ugotovili so, da sta tako InlA kot InlB nujno potrebna za vstop *L. monocytogenes* v ne-fagocitne celice, vendar sledita različnim signalnim potem. Receptor za internalin A je protein E-kadherin, ki je na površini nekaterih sesalskih celic (hepatociti, dendritične celice, možganske mikrovaskularne endotelijalne celice, epitelne celice horioidnega pleteža in placentne horionske črevesne resice), ki so tarča za listerije. Internalin B pa sodeluje pri aktivaciji fosfatidilinositol 3 kinaze (PI3K), ki je vključena v nadzor aktinskega citoskeleta. Signalni receptor za InlB je Met, ki je tirozin kinaza. Poleg tega pa so odkrili še en receptor gC1q-R (celični ligand globularnega dela C1q), ki nima transmembranske domene, kar nakazuje, da ima lahko vlogo koreceptorja. Trenutni podatki kažejo, da je vloga InlA omejena na invazijo v celice, ki tvorijo E-kadherin, medtem ko InlB posreduje vstop v širši spekter celičnih tipov različnih živalskih vrst (Vazquez-Boland in sod, 2001).

Poleg internalinov so pri *L. monocytogenes* nedavno odkrili še en površinski protein, p104. Ta ima vlogo predvsem pri adheziji na intestinalne celice (Pandiripalli in sod., 1999).

L. monocytogenes sintetizira tudi dve različni fosfolipazi C, fosfatidilinozitol specifično fosfolipazo C (PI-PLC) in fosfatidilholin specifično fosfolipazo C (PC-PLC). Obe imata pomembno vlogo pri invaziji in širjenju *L. monocytogenes*. PI-PLC pomaga pri pobegu iz

primarne vakuole, medtem ko je PC-PLC aktivna pri širjenju bakterij iz ene v drugo gostiteljsko celico (Smith G. A. in sod., 1995).

ActA protein inducira polimerizacijo globularnih aktinskih molekul v oblikovanje polimeriziranih aktinskih filamentov. Ti pa omogočajo bakterijskim celicam premikanje do celične membrane ter nastanek listeriopodov (deli membrane, ki se izbočijo navzven) (Moors in sod., 1999). Te izrastke zajame sosednja celica s čimer je omogočeno razširjanje *L. monocytogenes* brez izpostavitve protitelesom in drugim imunsko aktivnim molekulam. ActA lahko tudi pomaga pri privzemu tistih listerij, ki ne sintetizirajo internalinov (Kocks in sod., 1992).

Protein p60 je encim murein hidrolaza, ki katalizira reakcijo zadnje stopnje celične delitve *L. monocytogenes*. Ponavadi je prisoten na celični površini, prav tako pa ga celice tudi izločajo v okolico. Njegova natančna vloga še ni znana, je pa bistvenega pomena za bakterijsko preživetje (Kuhn in Goebel, 2007).

2.4 LISTERIOZA PRI LJUDEH

Listeriozo pri ljudeh lahko izmed osmih vrst listerij povzročijo le tri. Od teh pa je povzročitelj skoraj vedno *L. monocytogenes*, le izjemoma jo lahko povzročita tudi *L. ivanovii* in *L. seeligeri*. *Listeria monocytogenes* je priznana kot humani patogen od leta 1929 (Painter in Slutsker, 2007).

Glavni vir okužb pri ljudeh je hrana, ki je kontaminirana z *L. monocytogenes*. Največkrat gre za surovo neobdelano hrano, kot so mehki siri, paštete, zelenjava (vrtnine, zelje), nezadostno kuhanjo ali slabo topotno obdelano meso bolnih živali ter surovo mleko in mlečni izdelki bolnih živali (Schuppler in Loessner, 2010; Painter in Slutsker, 2007). Čeprav listerioza predstavlja zelo majhen delež vseh znanih bolezni, povezanih z okužbami s hrano, povzroča zelo hudo bolezen. Z njo je namreč povezanih 3,8 % s hrano povezanih hospitalizacij in 27,6 % s hrano povezanih smrtnih primerov. Ugotovili so, da lahko *L. monocytogenes* občasno izoliramo tudi iz prebavil zdravih ljudi. Kljub temu, da se bakterije *L. monocytogenes* pogosto pojavljajo v živilih, je incidenca listerioze pri ljudeh nizka (Painter in Slutsker, 2007).

Listerioza je pri ljudeh oportunistična okužba. Za okužbo so bolj dovetni starejši od 65 let, nosečnice, še nerojeni otroci, novorojenčki, ljudje po transplantaciji in ljudje, ki prebolevajo kakšno drugo bolezen. Posebej nevarna pa je za bolnike z levkemijo ali drugimi malignimi tvorbami, za ljudi z AIDS-om, alkoholike, ljudi s sladkorno boleznijo, tiste, ki se zdravijo s kortikosteroidi ali obsevanjem. Torej za vse, ki imajo zmanjšano T-celično posredovano imunost. Okužbo pri ljudeh je tudi težko dokazati, saj je čas med zaužitjem kontaminirane hrane in nastopom bolezni zelo različen, od 1 do 90 dni (Mook in sod., 2011).

Infekcijsko dozo za *L. monocytogenes* težko določimo, saj je odvisna predvsem od načina okužbe in naravne odpornosti gostitelja. V dokumentiranih izbruhih se je ta gibala med 3×10^1

CFU in $1,6 \times 10^9$ CFU. Seveda pa je infekcijska doza pri dozvetnih posameznikih mnogo nižja (Painter in Slutsker, 2007).

2.4.1 Incidenca v Evropi in Sloveniji

V letu 2010 so poročali o 1.601 primeru listerioze v Evropi, kar je 3,2 % manj kot leta 2009. Povprečna obolenost za listeriozo v letu 2010 je bila torej 0,35 primerov/100.000 prebivalcev. Največ primerov bolezni je bilo na Finskem, Danskem in v Španiji (EFSA, 2012).

O najvišji obolenosti poročajo pri starejših od 65 let (1,21 primerov/100.000 prebivalcev). Ti predstavljajo kar 60,2 % vseh prijavljenih primerov. Med prijavljenimi primeri je tudi 6,7 % otrok starih do štirih let, v večini (96,3 %) teh primerov je šlo za otroke mlajše od enega leta. Smrtnost med obolelimi za listeriozo leta 2010 je bila 17 %, leta 2009 pa 16,6 %. (EFSA, 2012; Lahuerta in sod., 2011).

V Sloveniji so listeriozo leta 2010 potrdili pri enajstih ljudeh, od tega jih je pet umrlo. V desetih primerih je bila ugotovljena *L. monocytogenes*. Največ okuženih je starejših od 65 let in v skupini med 45 in 64 leti, sledijo pa otroci pod enim letom starosti. Med 2005 in 2010 se je število obolelih za listeriozo gibalo med 3 in 11 (Poročilo ..., 2011) V letu 2011 je za listeriozo zbolelo pet ljudi, v letu 2012 pa sedem. Umrl ni nihče (Epidemiološko spremeljanje nalezljivih bolezni ..., 2013) (preglednica 3).

Preglednica 3: Število obolelih ljudi za listeriozo/100.000 prebivalcev in skupno število obolelih v Sloveniji (v letih 2005-2010) (Poročilo ..., 2011; Epidemiološko spremeljanje nalezljivih bolezni ..., 2013).

Leto	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Število obolelih /100.000 prebivalcev	0,2	0,35	0,2	0,2	0,3	0,6	0,2	0,35
Skupaj	3	7	4	3	6	11	5	7

2.4.2 Klinični znaki

Klinični znaki pri okužbi so različni. Lahko so blagi in nespecifični, in vključujejo gripi podobne simptome ali drisko. Navadno pa so klinične manifestacije resne in vključujejo sepsko, pojav abcesov, meningitis in encefalitis. Pri nosečnicah lahko listerije povzročijo splav, pri novorojenčkih pa pogosto smrt (Vazquez-Boland in sod., 2001) (preglednica 4).

Preglednica 4: Oblike bolezni pri listeriozi glede na prevladujoče klinične simptome (Painter in Slutsker, 2007)

Populacija	Klinični znaki	Diagnoza	Predispozicija ali posebne okoliščine
Noseče ženske	Povišana TT, bolečine v mišicah, diareja Prezgodnji porod Splav Mrtvorojen otrok	Kultura iz krvi in plodovnice	
Novorojenčki mlajši od 7 dni	Sepsa, pljučnica	Kultura iz krvi	Prezgodnji porod
starejši od 7 dni	Sepsa, meningitis	Kultura iz krvi in plodovnice in likvorja	
Odrasle osebe	Sepsa, meningitis, fokalna žarišča	Kultura iz krvi, likvorja in drugih normalno sterilnih mest	Imunska oslabljenost, starost nad 65 let
Zdravi posamezniki	Povišana TT, diareja	Kultura iz blata na obogatenih medijih	Večji inokulum

*TT – telesna temperatura

2.4.3 Listerioza med nosečnostjo

Okužba z *L. monocytogenes* v času nosečnosti ima lahko za posledico izgubo ploda, mrtvorojenost, prezgodnji porod ali neonatalne okužbe. Nosečnice lahko zbolijo za listeriozo kadar koli, vendar je to najbolj pogosto v zadnji tretjini nosečnosti. Zbolevajo večinoma sicer zdrave ženske, le 4% okuženih ima predispozicijske dejavnike, kot so uporaba kortikosteroidov, sladkorna bolezen, lupus ali okužba s HIV (Painter in Slutsker, 2007). Simptomi pri nosečnicah, brez predispozicijskih dejavnikov tveganja, so ponavadi blagi in nespecifični, medtem, ko so simptomi pri neonatalni listeriozi zelo resni. Pri približno 75% nosečnic z listeriozo se pojavi povišana telesna temperatura in gripi podobni simptomi, ki trajajo približno šest dni. Lahko pa so prisotne tudi bolečine v hrbtnu in mišicah, glavobol, boleče grlo ter slabost in bruhanje (Lamont in sod., 2011).

Simptomi so povezani s fazo bakteriemije in zato je potrebno v tem času odvzeti vzorce krvi za testiranje. Okužba ploda z *L. monocytogenes* je posledica prenosa preko placente v času materine bakteriemije. Nekatere okužbe pa so lahko posledica širjenja bakterij iz kolonizirane nožnice. Pri okužbah ploda lahko pride do prezgodnjega poroda, vnetja plodovnice, spontanega splava ali pojava zgodnje neonatalne okužbe. Slabša prognoza je v tistih primerih, ko je do okužbe prišlo zgodaj v nosečnosti, saj je tu delež smrtnosti najvišji. V teh primerih sta splav ali mrtvorojenost namreč zelo pogosta (Lamont in sod., 2011). Neonatalno okužbo lahko preprečimo z antibiotičnim zdravljenjem med nosečnostjo (Painter in Slutsker, 2007).

2.4.4 Neonatalna listerioza

Neonatalna listerioza, ki jo povzroča *L. monocytogenes* je zelo resna in ponavadi usodna bolezen. Opisani sta dve klinični oblikи: zgodnji pojav neonatalne okužbe in pozni pojav neonatalne okužbe (Painter in Slutsker, 2007).

Do neonatalne listerioze lahko pride preko vertikalnega prenosa *L. monocytogenes* z matere na plod, z inhalacijo okužene amnijske tekočine, transplacentalno preko materinega krvožilja ali preko kolonizirane nožnice matere. Kljub temu, da je slednja redka, je *L. monocytogenes* v nožnici lahko prisotna pri številnih zdravih nosečnicah (Lamont in sod., 2011).

Pri zgodnjem pojavu neonatalne okužbe, do katere pride že v maternici, se posledično bolezen razvije ob rojstvu ali kmalu po njem (tekom prvega tedna življenja). Med 45 in 70 % primerov neonatalne listerioze prištevamo med zgodnjo neonatalno okužbo (Painter in Slutsker, 2007). V več kot polovici primerov, so bili med nosečnostjo prisotni simptomi kot so povišana telesna temperatura, glavobol in bolečine v mišicah. Poleg tega je v teh primerih izolacija *L. monocytogenes* iz krvi ali rodil matere pogosta (Lamont in sod., 2011). V tem primeru je najpogostejša klinična oblika pri novorojenčkih sepsa in ne meningitis. Pogosti simptomi so še: dihalna stiska, povišana telesna temperatura in živčne motnje. *L. monocytogenes* lahko izoliramo iz krvi, cerebrospinalne tekočine, izločkov žrela, placente in amnijske tekočine (Painter in Slutsker, 2007).

Pozni pojav neonatalne okužbe se lahko zgodi od enega do nekaj tednov po porodu. Novorojenčki so običajno ob rojstvu zdravi in tudi nosečnost ponavadi vseh 9 mesecev poteka normalno, brez kakršnih koli simptomov. V tem primeru se listerioza kaže najpogosteje kot meningitis in ne kot sepsa. Način okužbe še ni poznан. Menijo, da lahko do okužbe pride med prehodom novorojenčka skozi porodni kanal, vendar so poznani tudi primeri listerioze, kjer je bil izveden carski rez. Do okužbe lahko pride preko neposrednega ali posrednega stika s kontaminirano hrano. Opisani so tudi primeri, pri katerih je do okužbe prišlo nozokomialno (Painter in Slutsker, 2007). Možnost preživetja lahko bistveno izboljšamo z antibiotičnim zdravljenjem (Lamont in sod., 2011).

2.4.5 Invazivna bolezen pri odraslih

Listeria monocytogenes je pomemben vzrok bakterijskega meningitisa pri odraslih. Smrtnost je približno 30 %. Klinični znaki vključujejo: sepsa, meningitis ali meningoencefalitis. Simptomi pri listeriozi centralnega živčevja pa so lahko: povišana telesna temperatura, slabo počutje, ataksija, epileptični napadi in spremenjeno duševno stanje. Približno tretjina bolnikov na začetku ne kaže nobenega simptoma. Bakteriemijo spremiļa povišana telesna temperatura, lahko pa se tudi pojavijo drugi nespecifični simptomi kot so utrujenost, slabo počutje in abdominalne bolečine. V 80 % primerov je kultura iz krvi pozitivna, na računalniški

tomografiji pa so lahko vidne žariščne poškodbe ali hidrocefalus. Lahko pride tudi do listerioze, kjer je prisotna bakteriemija brez meningitisa. Po fazi bakteriemije se lahko pojavijo tudi žariščne okužbe na drugih mestih v telesu. Do endokarditisa lahko pride pri bolnikih z srčnimi lezijami, vključno z prostetičnimi srčnimi zaklopkami. Lahko se pojavi tudi endoftalmitis, septični arthritis, osteomielitis, okužba pljuč ali peritonitis. Kožna okužba brez bakteriemije lahko nastane po neposrednem stiku z okuženo živaljo (Zelenik in sod., 2013) in izjemoma v laboratorijskih pogojih. V večini primerov pride pri odraslih do listerioze zaradi kliničnih stanj kot so: imunosupresivno zdravljenje, presaditev organov, malignomi, okužbe s HIV in visoka starost. S temi stanji je namreč povezana zmanjšana celično posredovana imunost. Kljub temu, pa mnogo primerov listerioze pri odraslih osebah ni povezanih s predispozicijskimi dejavniki (Painter in Slutsker, 2007).

2.4.6 Neinvazivna listerioza – bolezen prebavil

L. monocytogenes lahko povzroči vročinski gastroenteritis pri ljudeh z normalnim imunskeim sistemom. Inkubacijska doba je zelo različna od, 6 ur do 10 dni, a najpogosteje simptomi nastopijo 24 ur po okužbi. Najbolj pogosta simptoma sta povišana telesna temperatura in diareja, lahko pa nastopi tudi glavobol in eritromegalija. Za razliko od ostalih s hrano povezanih izbruuhov, ljudje v primerih neinvazivne listerioze večkrat tožijo o zaspanosti in utrujenosti. Simptomi običajno trajajo od 1 do 3 dni, lahko pa tudi do 1 tedna. Hospitalizacija v večini primerov ni potrebna (Ooi in Lorber, 2005). Trenutno še ni znano kateri so dejavniki, ki vodijo do vročinskega gastroenteritisa namesto do invazivne bolezni. Večje tveganje za razvoj invazivne bolezni imajo seveda bolj dovezetni posamezniki, a z neinvazivno listeriozo trenutno še niso povezali nobenih dejavnikov tveganja. Med sevi, ki povzročajo neinvazivno listeriozo in tistimi, ki povzročajo invazivno listeriozo niso našli nobenih razlik. Ker ni nobene indikacije, da obstaja listerijski enterotoksin, domnevajo, da je vročinski gastroenteritis posledica omejene možnosti vdora v črevesno sluznico (Painter in Slutsker, 2007).

2.4.7 Zdravljenje

Okužbo z *L. monocytogenes* pri odraslih se ponavadi zdravi z visokimi odmerki amoksicilina (2-3 g 3-4x na dan), z dodatkom gentamicina (360 mg 1x na dan). Ljudi, ki so alergični na penicilin se učinkovito zdravi tudi s trimetoprim sulfometoksazolom, saj antibiotika vstopita v celice in ubijeta listerije. Antibiotiki kot so tetraciklin in kloramfenikol niso priporočljivi, prav tako ne cefalosporini (Painter in Slutsker, 2007).

Zdravljenje poteka 2 tedna pri pojavi listerioze v nosečnosti, 2-3 tedne pri neonatalni listeriozi in 2-4 tedne pri bolnikih z meningitism in bakteriemijo, pri zaplenenih okužbah kot je endokarditis pa še dlje. Pri imunsko oslabljenih bolnikih pa zdravljenje poteka 3-6 tednov (Painter in Slutsker, 2007).

2.5 LISTERIOZA PRI ŽIVALIH

Za listeriozo lahko zbolijo številne živali, med njimi pa je tudi velik delež asimptomatskih prenašalcev, ki izločajo *L. monocytogenes* v blatu. Večina okužb pri živalih je subkliničnih, vendar lahko listerioza vodi tudi do smrtnih oblik encefalitisa. Klinično se listerioza kaže kot encefalitis, septikemija ali splav v zadnjem obdobju brejosti. Za listeriozo so dovzetne skoraj vse udomačene živali, predvsem: ovce, govedo, koze, redkeje pa obolevajo ptice, konji in prašiči (Wesley, 2007).

V Sloveniji se ob sumu na listeriozo izvede laboratorijska preiskava vzorcev in ob pozitivnem rezultatu se obvesti območni urad VURS ter pristojno zdravstveno službo. Najpogosteje se pojavlja bolezen pri govedu in drobnici (Poročilo ..., 2011).

2.5.1 Ovce

Med prežvekovalci so za listeriozo še posebej dovzetne ovce (Hoelzer in sod., 2012). Povzročata jo *L. monocytogenes* (serotipi 1/2, 3 in 4) in *L. ivanovii*. Klinične oblike listerioze pri ovcah vključujejo: encefalitis, placentitis (vnetje placente, predvsem v zadnji tretjini brejosti) in gastrointestinalna septikemija z hepatitisom, splenitisom in pneumonitisom (vnetje jeter, vranice in pljuč). V čredi ponavadi zboli 5-10 % ovc, kljub temu, da so verjetno podobno izpostavljeni enaki kontaminirani krmi, kar nakazuje na visoko naravno odpornost (Wesley, 2007). Največja incidenca je pozimi in zgodaj spomladvi, kar je povezano z uživanjem pokvarjene silaže in slabšo odpornostjo živali ob koncu zime (Hoelzer in sod., 2012).

Najbolj pogosta oblika bolezni pri starejših ovcah je encefalitis, medtem ko jagenjčki, stari do 5 tednov, lahko razvijejo septikemijo. Septikemija se pojavi od 2 do 3 dni po oralni okužbi. Pri tem pride do povišane telesne temperature, izgube apetita in diareje. Do smrti lahko pride zaradi obsežnih poškodb jeter ali pljučnice, vendar je smrtnost bistveno nižja kot pri primerih encefalitisa (Wesley, 2007).

Najpogostejša bakterijska okužba centralnega živčnega sistema pri odraslih ovcah je meningoencefalitis, povzročen z *L. monocytogenes*. Po tritedenski inkubacijski dobi se pojavijo znaki encefalitisa. Ti vključujejo: povišano telesno temperaturo, nevrološke motnje (mletje z zobmi, paralizo žvezkalnih mišic ter obilno slinjenje zaradi nezmožnosti požiranja) in odklanjanje hrane ter vode. V tem času pride tudi do pojava krožnega gibanja v levo ali desno, odvisno od smeri v katero je obrnjena glava. V zadnjih stadijih ovce ne morejo več hoditi. Smrt se pojavi v roku 2-3 dni po pojavu kliničnih simptomov (Wesley, 2007).

2.5.2 Koze

Listerioza pri kozah se kaže v več oblikah: encefalitis, septikemija in splav. Okužba pa je lahko tudi asimptomatska. *L. monocytogenes* po zaužitju prodre skozi sluznico prebavil ter povzroči bakteriemijo in se razširi do centralnega živčnega sistema, notranjih organov ali placente. Če *L. monocytogenes* prodre do placente, se okužba prenese na plod, kar ima za posledico splav. Pri septikemični obliki se pojavi depresija, izguba apetita, povišana telesna temperatura ter zmanjšanje količine mleka. Lahko pride tudi do diareje. Najpogostejsa oblika listerioze je meningoencefalitis, pri katerem je smrtnost kar 60 %. Klinični znaki so odvisni od vrste prizadetega živca. Lahko pride do: povešenih ušes, slinjenja, visečega jezika in oteženega požiranja. Najpogosteje izolirani serotip je 1/2a (Wesley, 2007).

2.5.3 Govedo

Listeriozo pri govedu največkrat povzroči *L. monocytogenes*, lahko pa je povzročitelj tudi *L. ivanovii*. Simptomi vključujejo: encefalitis, splav in septikemijo z miliarnimi abcesi. Glavna oblika okužbe je prenos s hrano, največkrat gre za kontaminirano silažo. Ob izbruhu ponavadi zboli 8-10 % črede. Po zaužitju se bakterije hematogeno širijo do notranjih organov, možganov in maternice. Ker pa je *L. monocytogenes* prisotna v zemlji, blatu in vegetaciji, lahko vstopi v telo goveda tudi preko poškodb na sluznicah in koži (preko nosnic ali veznice). Pri direktni okužbi veznice pride do keratokonjuktivitisa. Do take okužbe lahko pride zaradi posledice kontaminirane silaže, ko delci hrane padajo na oči med hranjenjem. S širjenjem okužbe po perifernih živcih *L. monocytogenes* vstopi v centralni živčni sistem. Klinični znaki so različni, odvisno od prizadetega živca. Ko bolezen napreduje, pride do motenj vida in gibanja in žival postane čedalje bolj razdražljiva. Na koncu žival obleži, pade v komo in v roku 1 do 2 dni pogine. Listerioza pri govedu je povezana tudi s splavom v zadnji tretjini brejosti. Vendar pa se lahko kroničnim prenašalkam listerij rodijo tudi zdrava teleta. Največji problem listerioze pri govedu je tveganje za zdravje ljudi, saj uživanje nepasteriziranega mleka predstavlja pogost način okužbe ljudi z listerijami (Wesley, 2007).

2.6 *Listeria monocytogenes* V ŽIVILIH

Cilj proizvajalcev živil je proizvesti varno, zdravstveno ustrezno hrano s primernim rokom uporabe, ki je sprejemljiva za potrošnika. Pri tem se proizvajalci poslužujejo različnih metod, s katerimi inaktivirajo ali inhibirajo rast patogenih mikroorganizmov, hkrati pa želijo zatreći neželene kemične in biokemične spremembe in s tem zagotoviti varnost hrane ter obenem ohraniti njene fizične in senzorične lastnosti. Pri konzerviranju hrane uporabljajo fizikalne, kemijske in biološke postopke. Pod fizikalne postopke prištevamo segrevanje, ohlajevanje, obsevanje, procesiranje pod visokimi pritiski in pakiranje. Kemijski postopki vključujejo dodajanje protimikrobnih ter zakisovalnih sredstev. Biološki pa fermentacije, ki preprečujejo razrast patogenih mikroorganizmov z znižanjem vrednosti pH. Najpomembnejši fizikalni in

kemijski dejavniki, ki vplivajo na preživetje listerij v živilih so: temperatura, kislota (pH), vodna aktivnost ter slanost (Lado in Yousef, 2007).

2.6.1 Dejavniki, ki vplivajo na preživetje listerij v živilih

Preživetje *L. monocytogenes* v različnih vrstah živil je odvisen od večih dejavnikov: temperature, kislosti in slanosti živila ter vodne aktivnosti v živilu.

2.6.1.1 Temperatura

Temperatura živila je ključnega pomena, saj lahko spodbudi ali zatre rast mikroorganizmov. *L. monocytogenes* lahko raste v živilih pri temperaturah 0 °C–45 °C (Risk assessment ..., 2004). Temperature, nižje od 0 °C živilo zamrznejo in inaktivirajo listerije, temperature višje od 50 °C pa listerije ubijejo, saj povzročijo poškodbe ribosomov in denaturacijo proteinov ter posledično smrt bakterij. Njihova optimalna temperatura za rast je od 30 do 37 °C. Ti podatki so zelo pomembni pri obdelavi hrane, kajti *L. monocytogenes* je psihrotrofnna bakterija in zato lahko povzroča številne probleme, saj uspešno raste pri temperaturah hladilnika. Ugotovili so tudi, da se virulenza *L. monocytogenes* poveča, če jo gojimo pri temperaturah hladilnika (4 °C), ter da lahko manjši delež populacije preživi 3 mesečno shranjevanje pri temperaturah od -18 do -20 °C (Lado in Yousef, 2007).

2.6.1.2 Kislota

L. monocytogenes, tako kot mnogo drugih bakterij, najbolje raste pri neutralnem pH, a znano je, da je sposobna rasti pri večjem razponu pH vrednosti, od 4,0 do 9,6 (Risk assessment ..., 2004). Pri pH nižjem od 6,5 se močno upočasni generacijski čas in lag faza, a če je v živilu za listerije ugodna vodna aktivnost, se lahko kljub temu, uspešno razmnožujejo (npr. fermentirana živila). Eden izmed najbolj kritičnih dejavnikov varnosti in kakovosti fermentiranih živil je nizka pH vrednost. Rast *L. monocytogenes* pri pH nižjem od 4 sicer še ni dokumentirana, a organizem je dokaj acidotoleranten. Vpliv pH na celično viabilnost pa je močno odvisen od drugih okoljskih dejavnikov. Zaviranje rasti bakterije namreč lahko opazimo že pri $pH \leq 5,5$ če ostali pogoji v okolju niso optimalni za njeno preživetje. Ugotovili so tudi, da hlajenje sicer inhibira rast, a hkrati izboljša preživetje *L. monocytogenes* v kislih živilih. Listerije se lahko na kisloto prilagodijo, s tem pa lahko postanejo tudi bolj odporne proti drugim vrstam stresov (Lado in Yousef, 2007).

2.6.1.3 Slanost

Visoke koncentracije soli zmanjšajo rast *L. monocytogenes*, saj zmanjšajo a_w vrednost živila in elektrokemijski potencial membrane celic. *L. monocytogenes* preživi lahko zelo slane pogoje, saj lahko uspešno raste pri koncentraciji $NaCl < 10\%$ (Khelef in sod., 2006). Z višanjem koncentracije soli se zmanjšuje preživetje listerij. Pri tem pa je pomembna tudi

temperatura, saj višja temperatura in povečana koncentracija soli še prej inhibira rast listerij. Hkrati višja slanost vpliva tudi na morfologijo celic. Pri koncentraciji $\text{NaCl} \geq 6$ postanejo celice filamentozne in deformiranih oblik (Lado in Yousef, 2007).

2.6.1.4 Vodna aktivnost (a_w)

Vodna aktivnost je definirana kot razmerje med parnim tlakom živila in parnim tlakom vode, pri enaki temperaturi. Visoka ozmolarnost (nizka a_w) zniža turgor (notranji pritisk vode) v bakterijskih celicah in s tem inhibira njihovo rast. Večina svežih živil ima $a_w > 0,98$, kar je optimalno za rast večine bakterij, tudi *L. monocytogenes*. Vendar pa je *L. monocytogenes*, za razliko od drugih bakterij, sposobna razmnoževanja pri a_w vrednosti 0,90. Pri $a_w < 0,90$ verjetno ne raste, vendar pa lahko take pogoje vseeno preživi, še posebej pri temperaturah hladilnika. To pa je potrebno upoštevati pri pripravi hrane (Lado in Yousef, 2007).

2.6.2 *Listeria monocytogenes* v posameznih skupinah živil

Bakterijo *L. monocytogenes* so doslej izolirali iz veliko različnih živil živalskega in rastlinskega izvora, iz že obdelanih živil in surovin (Griffiths, 2003; Norton in Braden, 2007). Listerije lahko izoliramo iz številnih mlečnih izdelkov, med katerimi so najbolj izpostavljeni mehki siri, redkeje pa tudi jogurt, sirotka in maslo. Varnost teh živil je odvisna predvsem od ustrezne fermentacije, ki primerno zniža pH, in s tem zavira rast bakterij (Farber in Peterkin, 1991). Številne študije so pokazale, da so lahko tudi različne vrste mesa kontaminirane z listerijami. Sposobnost bakterije, da preživi in se uspešno razmnoži na mesu je odvisno od temperature in pH mesa ter vrste tkiva in začetne mikroflore prisotne na mesu (Farber in Peterkin, 1991). Kritična mesta za kontaminacijo so večinoma prostori hlajenja in rezanja ter roke delavcev in oprema. Možna je tudi navzkrižna kontaminacija med surovim in že obdelanim mesom (Griffiths, 2003). Velikokrat pa jo izoliramo tudi iz rib in morskih sadežev (Griffiths, 2003; Jinneman in sod., 2007). *L. monocytogenes* pogosto najdemo v zemlji in vodi, zato se lahko kontaminira tudi surova zelenjava (Griffiths, 2003) in sadje. Leta 2011 so bile namreč melone izvor nacionalnega izbruha listerioze v ZDA (McCollum in sod., 2013). Pogosto je lahko izvor kontaminacije tudi gnoj, ki ga uporabijo kot gnojilo (Griffiths, 2003). Pri prenosu listerij imajo pomembno vlogo tudi živali, saj so večinoma asimptomatski prenašalci teh bakterij. Kontaminirajo lahko hrano živalskega izvora, kot so meso ter mleko in mlečni izdelki (Hof, 2003). Pogosto listerije izoliramo tudi iz že gotovih in obdelanih jedi, kot so mehki siri ter delikatesni izdelki. Slednja se lahko kontaminirajo med predelovalnim postopkom, z navzkrižno kontaminacijo ali pa po topotni obdelavi pred pakiranjem (Tompkin, 2002).

2.6.3 Kontaminacija živil

Do kontaminacije živil lahko pride v kateri koli točki predelovalne verige. To vključuje kontaminacijo surovin na kmetijah, kontaminacijo v predelovalnih obratih, v trgovinah ali pa

doma (Nightingale in sod., 2005). Do kontaminacije živil z *L. monocytogenes* lahko pride iz najrazličnejših virov, saj so te bakterije v okolju zelo razširjene. *L. monocytogenes* lahko najdemo v zemlji, na živalih in drugih kmetijskih okoljih, zato je kontaminacija poljščin in živali pričakovana. Prav zaradi tega pa so surovine najverjetnejsi izvor *L. monocytogenes* med predelavo hrane (ILSI Research Foundation, 2005).

Z nekaterimi študijami so ugotovili, da se bakterije *L. monocytogenes* lahko naselijo in vztrajajo v okolju nekega živilsko predelovalnega obrata tudi več mesecov ali celo let, zaradi svoje nagnjenosti do vlažnih in mrzlih okolij ter sposobnosti vezave na površine in tvorbe biofilma (ILSI Research Foundation, 2005).

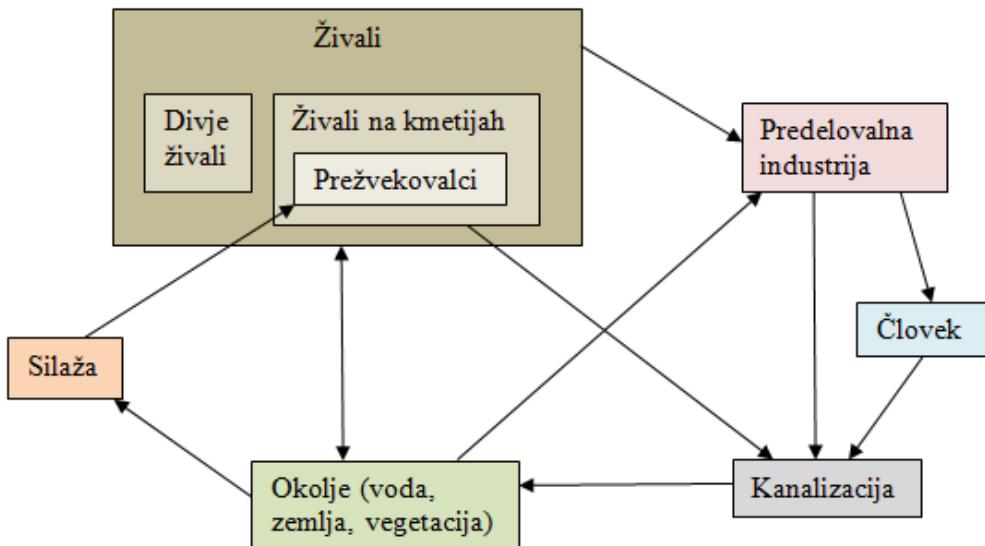
Celice *L. monocytogenes* so odkrili tudi v domačih okoljih ljudi. Bakterija je še posebej pogost kontaminant kuhinjskih površin in hladilnikov. Velik problem pa predstavlja možnost navzkrižne kontaminacije v hladilnikih, saj so tam prisotna tako surova, kot tudi že obdelana živila. Bakterija je namreč pogosto prisotna v surovem mesu in lahko kontaminira gotova živila, če le ta niso ustrezno shranjena. Prisotnost *L. monocytogenes* v domačem okolju tako predstavlja pomemben dejavnik tveganja za pojav listerioze. Potrošniki namreč pogosto ne izvajajo ustreznih higienskih praks, ki bi občutno zmanjšale tveganje kontaminacije (ILSI Research Foundation, 2005).

L. monocytogenes se lahko razmnožuje v določenih živilih tudi pri temperaturah hladilnika. Čeprav je rast počasna, se lahko v daljšem časovnem obdobju močno namnoži. Problem postane še bolj resen, kadar temperature hladilnika niso ustrezne, saj so previsoke od zahtevanih. V študiji izvedeni v ZDA so ugotovili, da so temperature hladilnikov pri 27 % domov neustrezne, saj so višje od 5 °C, morale pa bi biti 4,4 °C (Audits International/FDA ..., 1999).

Najpomembnejši preventivni ukrep glede zmanjšanja možnosti obolenj je shranjevanje živil za neposredno uživanje na ustrezno nizkih temperaturah in smiselna omejitev roka uporabnosti živila (ILSI Research Foundation, 2005).

2.7 RAZŠIRJENOST BAKTERIJ *Listeria monocytogenes*

Večina vrst listerij je v naravi zelo razširjenih. Taka je tudi *L. monocytogenes*, ki ima sposobnost preživeti in se uspešno razmnoževati v različnih okoljih ter povzročiti bolezen pri različnih skupinah živali in ljudeh. Najdemo jo v vodi, odplakah, na razpadajoči vegetaciji, zemlji, pridelovalnih obratih, na krmi, v silosih ter v živalskem in človeškem blatu (Sauders in Wiedmann, 2007) (slika 2).



Slika 2: Prenos *Listeria monocytogenes* med različnimi okolji in njenimi gostitelji (povzeto po: Ivanek in sod., 2006)

2.7.1. *Listeria monocytogenes* v zemljji in vegetaciji

Bakterije z rodu *Listeria* so v naravi pogosto prisotne v zemljji in vegetaciji. že leta 1975 sta Weiss in Seeliger izolirala listerije iz različnih rastlinskih vzorcev ter zemlje. Listerije so bile prisotne v 10-44 % vzorcev (Saunders in Wiedmann, 2007). Študije pa nakazujejo, da je prevalenca *L. monocytogenes* pogosto nižja od ostalih vrst listerij (MacGowan in sod, 1994).

Zaradi neposrednega stika med zemljo in vegetacijo, si ta dva medija delita tudi načine kontaminacije (Ivanek in sod., 2006). Kontaminacija krme in zelenjave z listerijo je najverjetnejše posledica neposrednega odlaganja živalskih iztrebkov ali pa uporabe blata iz čistilnih naprav ali živalskih iztrebkov kot gnojilo. Živalsko blato se že zelo dolgo uporablja kot gnojilo. Staranje gnoja pri ustreznih pogojih inaktivira prisotne patogene, nato pa je ta primeren za gnojenje (Nicholson in sod., 2005). Do problema pride pri intenzivnem kmetovanju, saj kmetje uporabijo neustrezno starano in obdelano blato kot gnojilo. To pa predstavlja višje tveganje za prenos *L. monocytogenes* v prehranjevalno verigo (Smith in sod., 2001).

Preživetje *L. monocytogenes* v zemljji je odvisno od številnih dejavnikov, kot so: vrsta zemlje, vsebnost vlage in vodna aktivnost. Na podlagi dosedanjih študij je *L. monocytogenes* sposobna preživeti v zemljji in se tam celo razmnoževati. Še posebej ugodno okolje predstavlja vlažna zemlja in prisotnost razpadajoče vegetacije (Saunders in Wiedmann, 2007). Fenlon in sodelavci (1996) so menili, da zemlja ni rezervoar, kjer se *L. monocytogenes* uspešno razmnožuje, ampak je njena prisotnost posledica kontaminacije zemlje z razpadajočim rastlinskim materialom in iztrebki, ki skupaj z vlažno zemljo nudijo ugodno okolje za bakterije.

2.7.2 *Listeria monocytogenes* v vodi

L. monocytogenes pogosto najdemo v površinskih vodah, vključno z jezeri, rekami in potoki. Botzler je že leta 1974 pokazal, da lahko *L. monocytogenes* preživi 63 dni v ribnikih (Botzler in sod., 1974). Soonthoranant in Garland (1995) sta ugotovila prisotnost *L. monocytogenes* v številnih vzorcih v usedalnem bazenu čistilnih naprav in odplak tovarn, ki se ukvarjajo s predelavo rib. Listerije so bile prisotne tudi v priobalnih morskih vodah, kamor so se te odpadne vode iztekale. Prav tako so bile prisotne v ostrigah in klapavicah. Colburn je s sodelavci (1990) odkril prisotnost listerij v 81 % sladkih voda in 62 % morskih voda z nizko vsebnostjo soli.

Trenutno epidemiološki podatki še ne kažejo na pojav neposredne okužbe ljudi z *L. monocytogenes* preko kontaminirane vode. Vendar pa je Gray s sodelavci (1956) dokazal, da je okužba z listerijo preko kontaminirane vode mogoča, ko je na ta način uspešno okužil dve ovci, štiri koze in eno kravo. Znan je tudi izbruh listerioze pri ovcah, ki so se okužile na pašniškem napajališču (Zdovc in sod., 2004). Voda kontaminirana z *L. monocytogenes* lahko služi kot posreden vir okužb ljudi preko kontaminacije sladkovodnih rib ali morskih sadežev, ki so nato neustrezno hlajeni (Huss in sod., 2000).

2.7.3 *Listeria monocytogenes* v odplakah

Odplake so pogosto kontaminirane z *L. monocytogenes*. V študiji, ki sta jo izvedla Watkins in Sleath (1981) sta zasledila več kot 18.000 CFU/l v odpadnih vodah po obdelavi. V raziskavi, ki so jo izvedli v Nemčiji pa je bila koncentracija listerij še višja (10^3 - 10^5 CFU/ml) (Geuenich in Muller, 1984). Ugotovili so tudi, da je razlika v količini listerij med neobdelano in obdelano odpadno vodo le 10x, kar nakazuje, da biološka oksidacija ni učinkovita metoda za zmanjšanje viabilnih listerij v odplakah. Al-Ghazali and al-Azawi (1988) sta ugotovila, da pride do inaktivacije listerij, če je blato v čistilni napravi vsaj 8 tednov shranjeno na direktni sončni svetlobi, medtem, ko to ne velja, če tako blato razprostremo po zemlji. Leta 2003 so Garrec in sodelavci ugotovili, da apnenje blata v čistilnih napravah zmanjša koncentracijo listerij pod mejo detekcije.

Najvišja koncentracija listerij v aktivnem blatu je običajno 2,743 MPN/g suhe snovi (MPN – ang. most probable number), najnižja pa v že obdelanem blatu (6 MPN/g suhe snovi) (De Luca in sod., 1998). S številnimi študijami so ugotovili, da blato iz odpadnih voda, ki se uporablja kot gnojilo na poljih, vsebuje *L. monocytogenes*. Zaradi uporabe kontaminiranega gnoja je bil dokazan tudi izbruh listerioze pri ljudeh. Prav zaradi tega je pomembna optimizacija čiščenja odpadnih voda in uporaba primernih gnojil za zmanjšanje širjenja listerij v okolje in nato tudi v hrano ljudi in živali (Sauders in Wiedmann, 2007).

2.7.4 *Listeria monocytogenes* v živalski krmí

Večina dobrih živalskih krmil ima nizko vsebnost vode, kar omeji razmnoževanje listerij in prepreči, da bi količina dosegla število, ki bi predstavljal nevarnost za živali. Največkrat je povzročitelj živalske listerioze silaža slabe kvalitete. Poznana so tudi številna poročila, ki povezujejo uporabo silaže z izbruhi listerioze pri ovcah in kravah (Wiedmann in sod., 1994).

V silaži dobre kvalitete, pripravljene iz trave, koruze in stročnic, in kjer so prisotni anaerobni pogoji, pride do stimulacije rasti mlečno kislinskih bakterij. Te se razmnožijo in pretvorijo sladkor v mlečno kislino, kar povzroči znižanje pH (ustrezen pH je $< 4,5$). V takih pogojih je inhibirana rast listerij. Silaže, ki vsebujejo večinoma trave in so v hladnejšem okolju, imajo nižjo vsebnost sladkorja in višjo vlažnost. Tu je fermentacija počasnejša, zato se *L. monocytogenes* lažje namnoži. Dijkstra (1982) je opisal, da lahko *L. monocytogenes* preživi v naravno kontaminirani silaži od 4 do 6 let. Kontaminirana silaža lahko povzroči tako sistemsko listeriozo, kot tudi vnetje veznice (Walker in Morgan, 1993).

2.7.5 *Listeria monocytogenes* v predelovalni industriji

Glavni cilj predelave hrane je ustvariti varno in kvalitetno živilo, ki je sprejemljivo za uporabnika in ima poleg tega primeren rok uporabe. Pri tem pa predstavlja velik problem proizvajalcem v živilsko predelovalnih obratih številni mikroorganizmi, med drugim tudi *L. monocytogenes* (Kornacki in Gurtler, 2007). *L. monocytogenes* lahko kontaminira številne površine in delovno opremo v predelovalnih obratih (Kabuki in sod., 2004). Je zelo prilagodljiva bakterija, saj je sposobna rasti tudi po zamrzovanju ali dehidraciji. Uniči pa se jo lahko s primerno toplotno obdelavo (Kornacki in Gurtler, 2007). Pogosteje je prisotna na površinah, ki ne pridejo v stik z izdelki, kot na površinah, ki pridejo v stik z živilom v času njegove predelave (Pritchard in sod., 1995). Pogosti viri teh bakterij so tudi odtoki, tla, stoječa voda stene, obutev delavcev, vrata, kljuke, ostanki hrane in celo razkuževalne bariere (Griffiths, 2003; Kornacki in Gurtler, 2007).

Prisotnost *L. monocytogenes* so odkrili tudi na že očiščeni in razkuženi opremi. To pa ni presenetljivo, saj gre v večini primerov za kompleksno opremo, z več ozkimi odprtinami in težko dostopnimi mestci, kar ovira učinkovito čiščenje in razkuževanje. Pri kontaminaciji je pomembna tudi temperatura in stanje površine. Nizke temperature površine so povezane s prisotnostjo psihrotrofne *L. monocytogenes*, medtem, ko je pri višjih temperaturah površine ($> 10^{\circ}\text{C}$) le ta pogosto odsotna, verjetno jo druga mikroflora izpodrine in preraste. Pomembno je tudi stanje površine. *L. monocytogenes* je pogosteje prisotna na hrapavih, zrnatih in poškodovanih površinah, medtem, ko je na gladkih površinah iz nerjavečega jekla pogosto odsotna (Chasseignaux in sod., 2002).

Do kontaminacije živil med predelavo lahko pride tudi preko aerosola. Celice *L. monocytogenes* lahko preidejo v prezračevalni sistem predelovalnega obrata in tako prispevajo h kontaminaciji živil (Zhang in sod., 2007), saj se lahko prenašajo preko zraka ter

kolonizirajo tako površine kot tudi surovine in živila (Burfoot in sod., 2003; Dobeic in sod., 2011).

Velik problem v živilsko predelovalnih obratih predstavlja tudi biofilmi, ki jih tvorijo nekatere vrste bakterij na različnih površinah. To sposobnost ima tudi *L. monocytogenes*. Biofilmi lahko služijo kot vir kontaminacije živil in so lahko rezervoar patogenih bakterij in kvarljivcev. Domneva se, da je *L. monocytogenes*, ki raste v predelovalnih obratih v obliki biofilmov, pomemben vir kontaminacije živil (Djordjevic in sod., 2002). Mikroorganizmi v biofilmih so mnogo bolj odporni proti protimikrobnim sredstvom kot planktonski organizmi. Zato jih z običajnimi metodami čiščenja in razkuževanja težko uničimo (Kalmokoff in sod., 2001).

S pomočjo študij so znanstveniki ugotovili, da k obvladovanju *L. monocytogenes* prispevajo predvsem odsotnost ostankov hrane in vlage. Zaradi teh ugotovitev so določili kodekse ravnanja v živilsko predelovalni industriji, ki pomagajo k obvladovanju problemov z *L. monocytogenes*. Ti vključujejo ustrezno osebno higieno, ločevanje surovih materialov od obdelanih ter učinkovito čiščenje in postopke dezinfekcije. Skupaj s sprejetjem sistema HACCP (ang. Hazard Analysis Critical Control Point) ter usposobljenega osebja tako prispevajo k večji mikrobiološki varnosti živil (Griffiths, 2003).

2.8 TIPIZACIJA IN TIPIZACIJSKE METODE

Tipizacija je postopek, s katerim fenotipsko ali genotipsko analiziramo bakterijske izolate, z namenom ugotavljanja razlik in posledično tudi stopnje sorodnosti med izolati znotraj vrste. Tako pridobljene podatke lahko nato uporabimo za ugotavljanje načina prenosa in širjenja mikroorganizmov, odkritja rezervoarjev oziroma izvora okužbe pri ljudeh in pojasnjevanje epidemij. Hitro in učinkovito razlikovanje med sorodnimi bakterijskimi izolati je izjemnega pomena za epidemiološki nadzor nalezljivih bolezni. V času epidemije je namreč hitro ukrepanje nujno, in s pomočjo tipizacije lahko identificiramo epidemiološko povezane izolate, določimo rezervoar in poti širjenja okužbe. Pridobljene podatke pa lahko uporabimo tudi pri raziskavah patogenosti nalezljivih bolezni, strukturi bakterijskih populacij in njihove genetike (van Belkum in sod., 2007).

Za tipizacijsko metodo so pomembne številne lastnosti:

- sposobnost opredelitev vsakega seva (z idealno metodo dobimo rezultat za vsak testiran izolat),
- dobra ločljivost med posameznimi sevi (sposobnost prepozname sorodnih sevov kot sorodnih in obratno),
- ponovljivost rezultatov,
- fleksibilnost (možnost, da lahko metodo uporabimo za tipizacijo različnih bakterijskih vrst z le minimalno modifikacijo protokola),
- lahka izvedba in interpretacija,
- dostopnost,

- nizka cena in
- možnost računalniške analize rezultatov, njihovo shranjevanje v elektronski obliki ter izmenjava le teh med laboratoriji (van Belkum in sod., 2007).

Starejše tipizacijske metode, kot so serotipizacija, fagotipizacija in tipizacija na osnovi rezistotipa temeljijo na fenotipskih značilnostih. Kljub temu, da so nekatere še danes v uporabi, imajo te metode številne omejitve, zaradi katerih so manj primerne za študije strukture in dinamike bakterijske populacije. Fenotip mikroorganizma namreč ne odraža vedno njegovega genotipa, saj pogosta izmenjava genetskega materiala med mikroorganizmi pomeni, da fenotip morda ne odraža evolucijske zgodovine mikroorganizma. To je tudi razlog, da običajno fenotip ni zanesljiv in stabilen epidemiološki pokazatelj. Zato so v zadnjih dveh desetletjih fenotipske metode zamenjale genotipske oziroma molekularne metode (van Belkum in sod., 2007).

2.8.1 Fenotipske tipizacijske metode

Fenotipizacija lahko vključuje morfologijo kolonij, barvo, vonj in druge makroskopske lastnosti, vendar pa se večina tipizacijskih metod zanaša na lastnosti mikroorganizmov, ki jih lahko dokumentiramo s posebnimi metodami. V večini primerov gre za kvalitativno ali kvantitativno oceno sposobnosti rasti ob prisotnosti specifičnih substratov ali njihova izraženost specifičnih molekul, kot so površinski antigeni ali hišni (ang. housekeeping) geni. Vse metode zahtevajo standardizacijo pogojev, saj so fenotipi zelo občutljivi na spremembe v okolju (van Belkum in sod., 2007).

2.8.1.1 Serotipizacija

Med najpomembnejše fenotipizacijske metode štejemo klasično serotipizacijo. Serotipizacija je prva široko uporabljeni metoda, ki je v uporabi še danes. To je metoda, ki pokaže razlike v površinskih antigenih. Danes jo uporabljajo predvsem v laboratorijih povezanih z zdravstveno oskrbo in mikrobioloških laboratorijih, ki se ukvarjajo s pregledovanjem živil. Z ustreznim nadzorom tako reagentov, kot tudi izvedbe metode, so rezultati serotipizacije dobro ponovljivi. Prav zato je pomembna standardizacija metode (van Belkum in sod., 2007).

Prva metoda, ki je bila razvita za razlikovanje med tipi *L. monocytogenes* je bila serotipizacija. Najprej jo je leta 1940 opisal Paterson, kasneje pa so jo Donker-Voet, Seeliger in Höhne izpopolnili (Orsi in sod., 2011). Trenutno lahko *L. monocytogenes* razvrstimo v 13 serotipov: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, in 7. Za razvrščanje listerij v serološke skupine danes uporabljamo spodnjo shemo (preglednica 5) (Gasanov in sod., 2005).

Preglednica 5: Shema za serološko tipizacijo bakterij z rodu *Listeria* (Gasanov in sod., 2005).

Vrsta listerije	Serološka skupina	O-antigen	H-antigen
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	I, II, (III)	AB
	1/2b	I, II, (III)	ABC
	1/2c	I, II, (III)	BD
	3a	II, (III), IV	AB
	3b	II, (III), IV, (XII), (XIII)	ABC
	3c	II, (III), IV, (XII), (XIII)	BD
	4a	(III), (V), VII, IX	ABC
	4ab	(III), V, VII, IX, X	ABC
	4b	(III), V, VI	ABC
	4c	(III), V, VII	ABC
	4d	(III), (V), VI, VII	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), (VII), (IX), XV	ABC
	6b	(III), (V), (VI), (VII), IX, X, XI	ABC
<i>L. grayi</i>		(III), (XII), XIV	E

Uporabnost serotipizacije v epidemiološke namene je razmeroma omejena. Večina sevov, ki jih povezujemo s humano listeriozo, lahko uvrstimo v serološke skupine 1/2a, 1/2b in 4b (McLauchlin in sod., 2004). Vrsta serotipa je v nekaterih primerih povezana tudi z ekološko nišo (Orsi in sod., 2011).

Serotipizacijska metoda aglutinacije temelji na aglutinaciji somatskih (O) in flagelarnih (H) antigenov, z različnimi mono ali polivalentnimi serumi. Na podlagi teh antigenov listerije razvrstimo v serološke tipe. Konvencionalna serotipizacija ima številne pomanjkljivosti, ker je draga in časovno zelo zamudna metoda, ki ima nizko ponovljivost. Zahteva izurjenega laboratorijskega delavca za opazovanje aglutinacije, ki se mora zanašati na visoko kvalitetne antiserume. Poleg tega si določeni sevi *L. monocytogenes* delijo antigene, kar nam preprečuje jasno določanje njihovega serotipa. To nakazuje na možnost, da lahko tesno sorodne seve, ki so se razvili z enega prednika z menjavo antigenov, uvrstimo v različne serotype. To moramo upoštevati pri klasifikaciji izolatov le na podlagi serotipizacije. Izolatov, ki manj pogosto povzročajo bolezni, namreč ne smemo obravnavati kot manj patogene, saj imajo lahko patogenega prednika. Tak primer so nekateri izolati *L. monocytogenes* in *L. seeligeri*, ki si

delijo serotype 1/2a, 1/2b, 3b, 4a, 4b in 4c (Jadhav in sod., 2012). S serotipizacijo lahko torej določimo rod *Listeria*, ne moremo pa neposredno določiti vrste listerij. Serotipizacijo uporabljamo predvsem za določanje prevalence specifičnega serotipa v epidemioloških študijah, ne pa za identifikacijo *L. monocytogenes*.

Na številne probleme so naleteli tudi pri internacionalni študiji, kjer so tipizirali izolate *L. monocytogenes* le s pomočjo klasične serološke metode. Med posameznimi vključenimi laboratoriji je namreč prišlo do številnih odstopanj v rezultatih (Schijnberg in sod., 1996).

Danes so za serotipizacijo listerij v uporabi komercialno dostopni serumi Denka Seiken (Tokio, Japonska) in Difco (Difco Laboratories/Becton Dick-inson and Co., Sparks, ZDA) (Gasarov in sod., 2005).

2.8.2 Genotipske tipizacijske metode

Bakterijski sevi se glede na njihovo nukleotidno zaporedje genoma med seboj lahko bolj ali manj razlikujejo. Z genotipizacijskimi metodami lahko ocenimo te razlike oz. spremembe v genomih bakterijskih izolatov in tako določimo njihovo medsebojno podobnost oz. sorodnost.

Metode tipizacije temeljijo na:

- analizi genomske DNA po njenem razrezu z restriktijskimi encimi,
- analizi zaporedja nukleotidov na izbranih odsekih genomske DNA,
- pomnožitvi specifičnih odsekov genoma s PCR
- ter s kombinacijo različnih metod (van Belkum in sod., 2007).

2.8.2.1 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je ena izmed najbolj priročnih in uporabljenih metod v molekularni biologiji, saj omogoča pomnožitev točno določenega dela ali več delov tarčne DNA v pogojih *in vitro*. Za pomnoževanje uporabljamo posebno polimerazo, *Taq* DNA polimerazo, ki je termostabilna in se ohrani med fazo denaturacije. Polimerazo so izolirali iz termofilnega organizma *Thermus aquaticus*, zato ima tudi višji temperaturni optimum kot večina drugih encimov, reakcija podaljševanja namreč poteka pri temperaturi 72 °C. Metoda je hitra, enostavna za izvedbo in visoko občutljiva, zato za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca (Rapley, 2010).

Standardni PCR poteka v treh stopnjah:

Denaturacija DNA

Prvi korak poteka pri temperaturi 95 °C in traja od 20 sekund do 1 minute. Pri tem pride do denaturacije dvovijačne verige DNA in do nastanka dveh enovijačnih molekul DNA. S tem postane dostopen tarčni del DNA znotraj verige, ki ga želimo pomnožiti.

Prileganje oligonukleotidnih začetnikov

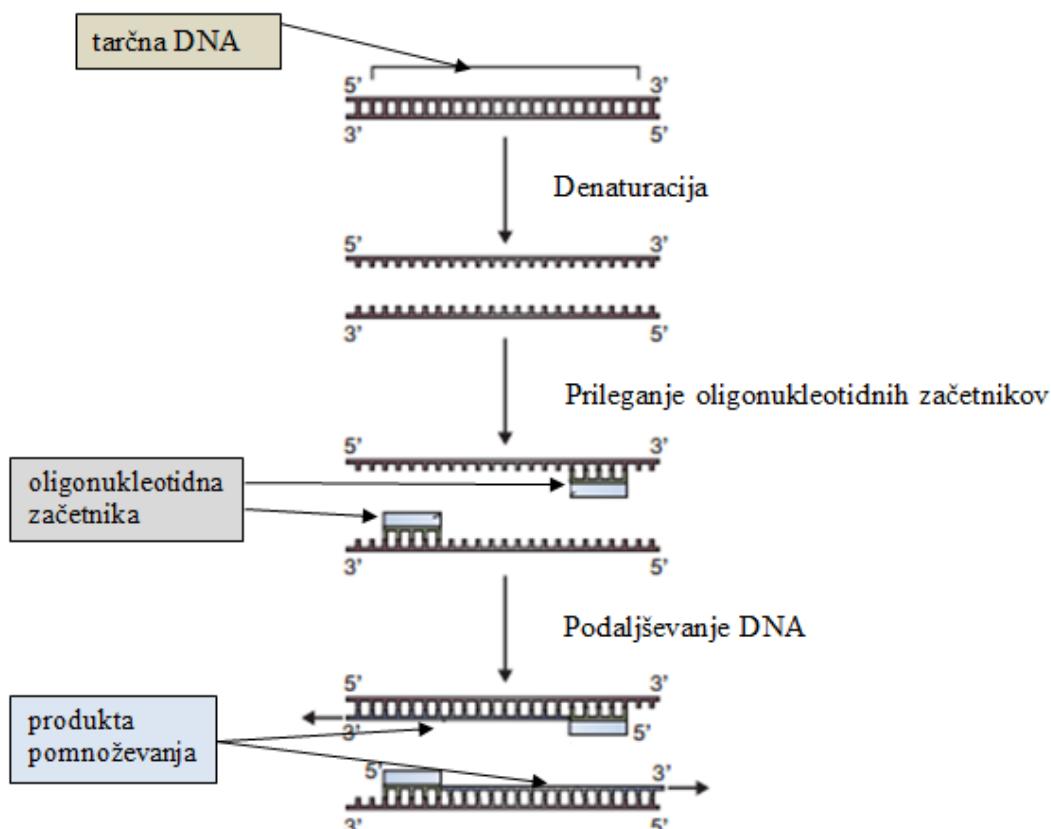
Drugi korak poteka pri temperaturi od 45 °C do 75 °C, temperatura je odvisna predvsem od sestave oligonukleotidnih začetnikov, in traja od 5 do 60 sekund. Pri tem pride do pripenjanja začetnih oligonukleotidov na komplementarna dela tarčne DNA.

Podaljševanje DNA

Tretji korak poteka pri temperaturi 72 °C, kar je optimum delovanja encima, in traja od 30 sekund do več minut, odvisno od dolžine pomnožka. Podaljševanje DNA oz. sinteza nove komplementarne molekule DNA poteka s pomočjo encima *Taq* polimeraze v smeri do 5'-konca proti 3'-koncu.

Celoten cikel reakcije običajno 25-40 krat ponovimo. Po končanem pomnoževanju iz ene molekule tarčne DNA teoretično dobimo $2^{\text{št. ciklov}}$ molekul (Poljak 2007; Brown, 2010). Shema postopka PCR je prikazana na sliki 3.

Reakcijska mešanica za PCR običajno vsebuje: tarčno dvovijačno DNA, dva oligonukleotidna začetnika, encim *Taq* DNA polimerazo, deoksinukleotidtrifosfate vseh štirih baz (dNTP), ustrezeno koncentracijo Mg²⁺ ionov in pufer z optimalnim pH in ionsko jakostjo, ki vpliva na encimsko aktivnost in natančnost (Poljak, 2007).



Slika 3: Shema postopka za verižno reakcijo s polimerazo (Brown, 2010).

2.8.2.1.1 Serotipizacija *Listeria monocytogenes* z uporabo verižne reakcije s polimerazo

Molekularna serotipizacija z verižno reakcijo s polimerazo je uporabna in hitra metoda za karakterizacijo serotipov *L. monocytogenes*, s katerimi se najpogosteje srečamo. Serotipizacija *L. monocytogenes* temelji na razlikah v somatskih (O) in flagelarnih (H) antigenih med sevi bakterij (Kérouanton in sod., 2010). Danes razlikujemo 13 različnih seroloških skupin, od katerih so pri ljudeh in živilih najpogosteje prisotni 1/2a, 1/2b, 1/2c in 4b (Jacquet in sod., 2002). Za razvrstitev *L. monocytogenes* v pet najpogostejših seroloških skupin (IIa, IIb, IIc, IVa in IVb), sta bila zasnovana dva postopka PCR, večkratni PCR in enkratni PCR. Pri večkratnem PCR pomnožujemo šest tarčnih genov: *prfA*, *prs*, *lmo0737*, *lmo1118*, *orf2819* in *orf2110*. Nato pa je bila, predvsem zaradi nekaterih netipičnih 1/2a, 3a in 1/2c sevov *L. monocytogenes*, uvedena še ena PCR reakcija, s katero pomnožujemo gen *flaA*. S pomočjo obeh postopkov PCR tako lahko razvrstimo vse seve v ustrezne serološke skupine. Prisotnost specifičnih tarčnih genov, namreč sovpada z eno izmed molekularnih seroskopin, kot je prikazano v preglednici 6.

Preglednica 6: Razvrstitev *Listeria monocytogenes* v molekularne serološke skupine na podlagi prisotnosti specifičnih tarčnih genov (Kérouanton in sod., 2010).

Gen	Molekularne serološke skupine				
	IIa	IIb	IIc	IVa	IVb
<i>prfA</i>	+	+	+	+	+
<i>prs</i>	+	+	+	+	+
<i>lmo0737</i>	+	-	+	-	-
<i>lmo1118</i>	-	-	+	-	-
<i>orf2819</i>	-	+	-	-	+
<i>orf2110</i>	-	-	-	-	+
<i>flaA</i>	+	-	-	+	-

S prisotnostjo gena *prs* dokazujemo rod *Listeria*, s *prfA* genom pa vrsto *L. monocytogenes*. Prisotnost gena *prs* tako uporabljam tudi kot pozitivno kontrolo pomnoževanja (Kérouanton in sod., 2010).

Rezultate, ki jih dobimo z uporabo molekularne serotipizacije (PCR) lahko primerjamo z rezultati klasičnega postopka serotipizacije, s pomočjo spodnje preglednice (preglednica 7) (Doumith in sod., 2004).

Preglednica 7: Primerjava med rezultati molekularne in klasične serotipizacije (Doumith in sod., 2004)

Rezultat molekularne serotipizacije	Rezultat klasične serotipizacije
IIa	1/2a - 3a
IIb	1/2b - 3b - 7
IIc	1/2c - 3c
IVa	4a - 4c
IVb	4b - 4ab - 4d - 4e

S pomočjo subtipizacijskih metod so *L. monocytogenes* razvrstili v dve glavni in eno redkeje najdeno filogenetsko skupino. Okužbe pri ljudeh najpogosteje povzročajo sevi iz skupine II in nekateri sevi, ki jih uvrščamo v skupino I. Seve iz skupine II pogosto najdemo tudi v živilih, sevi iz skupine III pa največkrat povzročajo okužbe pri živalih (Nightingale K. in sod., 2007). Te tri skupine lahko nadaljnje razdelimo v pet filogenetskih skupin od katerih je vsaka v korelaciiji z določenimi serotipi. V skupino I uvrščamo bakterije s serotipi 1/2b, 3b, 4b, 4d in 4e, v skupino II bakterije s serotipi 1/2a, 1/2c, 3a in v zadnjo najmanjšo skupino, skupino III, uvrščamo bakterije s serotipi 4a in 4c (Borucki in sod., 2003).

2.8.2.2 Pulzna gelska elektroforeza (PFGE)

Pulzna gelska elektroforeza je ena izmed najbolj ponovljivih molekularnih tipizacijskih metod z visoko ločljivostjo (Singh in sod., 2006). Slabost metode sta razmeroma draga oprema in nekoliko daljši čas (dva do štiri dni), ki je potreben, da dobimo rezultate (van Belkum in sod., 2007).

Metoda se uporablja za ločevanje zelo velikih molekul DNA, velikosti od 40 kb do 2000 kb (Félix in sod., 2012). Pri PFGE uporabimo namreč encim, ki redko cepi kromosomsko DNA. Pri tem nastanejo fragmenti, ki so preveliki, da bi jih ločili z navadno agarozno gelsko elektroforezo. Zaradi tega razloga uporabimo pulzno gelsko elektroforezo. S periodičnim spremjanjem smeri električnega toka morajo molekule ob vsaki zamenjavi električnega toka spremeniti tudi smer svojega potovanja. Hitrost potovanja molekul je odvisna od njihove velikosti. Večje molekule DNA po gelu potujejo počasneje, saj so bolj okorne in zato težje spremenijo smer potovanja, kot manjše molekule (Singh in sod., 2006).

Z vsako restrikcijo genomske DNA dobimo določeno število restrikcijskih fragmentov DNA, ki so različnih velikosti. Fragmente ločimo na gelu in po končani elektroforezi v pulzirajočem električnem polju ti tvorijo specifičen restrikcijski vzorec DNA. S primerjavo restrikcijskih vzorcev DNA med sevi lahko določimo njihovo medsebojno sorodnost (Singh in sod., 2006). Za tipizacijo *L. monocytogenes* uporabljamo dva restrikcijska encima *AscI* in *ApaI*. Z restrikcijo genoma z *AscI* dobimo med 6 in 12 restrikcijskih fragmentov, medtem ko dobimo s cepitvijo genoma z encimom *ApaI* med 14 in 17 restrikcijskih fragmentov. Za še boljše

rezultate in natančnejšo analizo restrikcijskih profilov lahko, poleg zgoraj navedenih encimov, uporabimo še encim *SmaI* (Carriere in sod., 1991). Pri izvajanju PFGE se moramo držati tudi določenih kriterijev. Parametri elektroforeze so natančno določeni in standardizirani v protokolu PulseNet. Pri PFGE *L. monocytogenes* je pulzni kot 120°, začetni pulzni čas 4 sekunde in končni pulzni čas 40 sekund (Félix in sod., 2012).

Razlike v profilih izolatov ugotavljamo na podlagi števila in lokacije pasov DNA na gelu. Prvega postopka interpretacije restrikcijskih profilov se je lotil Tenover s sodelavci leta 1995. Pokazali so, da interpretacija razlik v številu pasov med parom izolatov temelji na podlagi najmanjšega števila mutacijskih dogodkov, ki so se lahko zgodili na podlagi opaženih razlik. To je pomenilo, da bi morali dva izolata, ki se razlikujeta v dveh do treh pasovih, obravnavati kot tesno sorodna, saj lahko razlike med njima pojasnimo z enim samim genetskim dogodkom.

V zadnjem času pa so raziskovalci s strani CDC-ja (ang. Centers for Disease Control and Prevention) podali mnenje, da merila, ki jih je postavil Tenover, niso splošno uporabna pri preiskavah izbruhov povezanih s hrano. Pri interpretaciji PFGE profilov je potrebno namreč upoštevati tudi genetske prenose, prekrivanje pasov in druge artifakte, ki bi lahko vplivali na sorodnost med profili (Graves in Swaminathan, 2001). Leta 2006 so Barrett in sodelavci določili nova merila za razlikovanje med različnimi profili, ki zapovedujejo, da je za razlikovanje med profili dovolj že razlika v enem samem pasu. Navodila za interpretacijo PFGE profilov, ki veljajo danes, temeljijo na tej metodi ter na podlagi PulseNet standardnih operacijskih postopkov (SOP), ki vključujejo tudi spodnjo mejo za vključitev pasov v PFGE profil (33 kbp). V praksi je pri interpretaciji profilov potrebnih tudi veliko subjektivnih odločitev (Gerner-Smidt in sod., 2006). Zaradi tega temelji nova strategija za identifikacijo profilov na podlagi baze podatkov. Z njo bi namreč zmanjšali raznolikosti, ki so posledica subjektivne interpretacije (Félix in sod., 2012).

Za primerjavo velikega števila vzorcev so razvili računalniške programe, ki lahko izračunajo stopnjo sorodnosti med sevi. Na splošno velja, da se veve opredelimo kot genetsko neločljive, kadar je njihova stopnja sorodnosti 100 %. Če stopnja sorodnosti znaša več kot 80 %, seve opredelimo kot klonalno povezane. Kljub današnji digitalizaciji in računalniški obdelavi je potrebno restrikcijske vzorce na gelih še vedno natančno in pozorno preučiti (Singh in sod., 2006; van Belkum in sod., 2007).

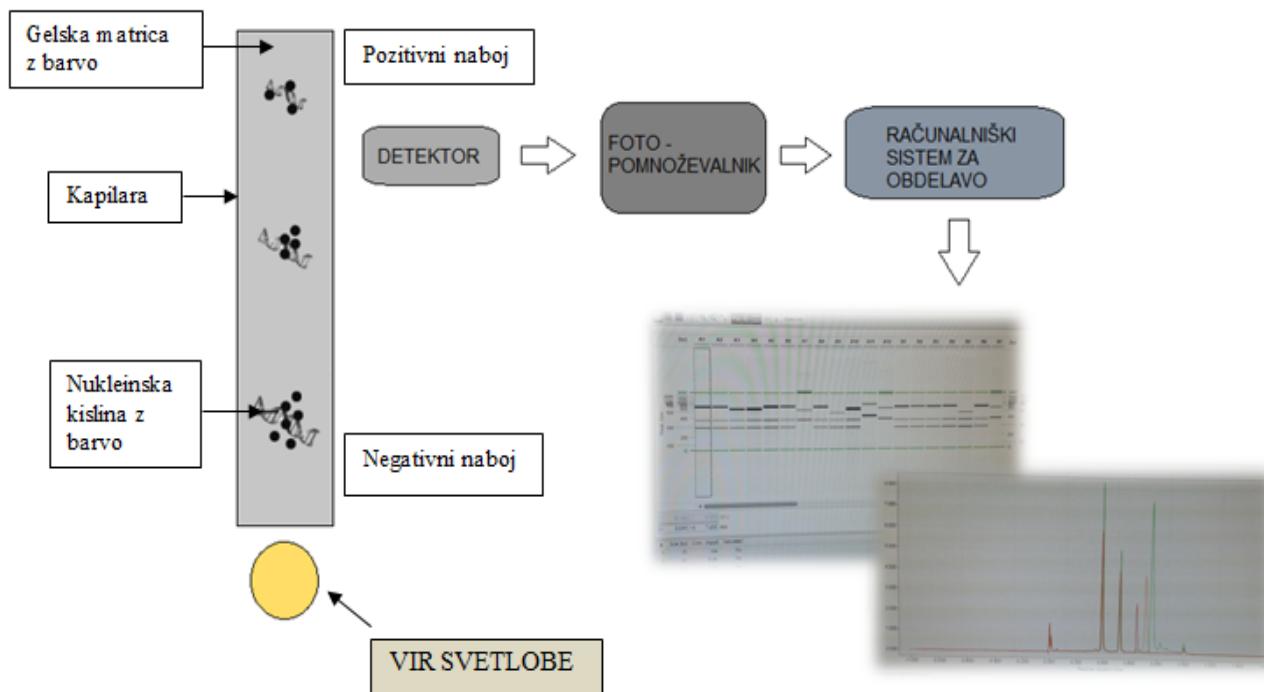
Ameriški CDC je za interpretacijo *L. monocytogenes* PFGE profilov uvedel referenčni sistem (Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes*, CDC, 2013). Pri izvedbi vsakega PFGE vedno uporabljamo tudi referenčne seve *Salmonella braenderup* H9812, ki jih razrežemo z encimom *XbaI* (Hunter in sod., 2005). Referenčni sevi nam namreč omogočijo učinkovito normalizacijo procesa. Pri elektroforezi zato postavimo čepke *Salmonella braenderup* na začetek, sredino in konec glavnička (Félix in sod., 2012).

2.8.3 Kapilarna elektroforeza

Elektroforeza je glavna metoda ločevanja molekul v molekularni biologiji. Kapilarna elektroforeza pa je izboljšana in učinkovitejša metoda od klasične agarozne gelske elektroforeze. Metoda omogoča hitro ločevanje pomnožkov DNA glede na njihovo velikost, ima visoko ločljivost in visoko občutljivost, majhno porabo vzorca in možnost avtomatizacije (Schmitt-Kopplin, 2008).

Pri našem laboratorijskem delu smo uporabili kapilarno elektroforezo znamke QIAxcel Advanced System (Qiagen, QIAxcel, Nemčija).

Ločevanje fragmentov DNA poteka v kapilari, ki je napolnjena z gelom. Delci DNA so negativno nabiti, zato v kapilari zaradi električnega polja potujejo proti pozitivno nabitem delu (anodi). Tako kot pri agarozni gelski elektroforezi, krajsi fragmenti DNA potujejo hitreje kot daljši. Med potovanjem po kapilari fragmente DNA zazna detektor, ki izmeri fluorescenco. Fotopomnoževalni detektor nato pretvori emisijski signal v elektronske podatke, ki so nato preneseni v računalnik za nadaljnjo obdelavo. Po obdelavi, so podatki lahko prikazani kot elektroferogram ali slika gela. Za ugotavljanje velikosti pomnožkov DNA dodamo v kapilarno elektroforezo še ustrezni velikostni standard. Poleg njega pa tudi ustrezni poravnalni marker. Ne smemo pa pozabiti tudi na določene komercialne pufre, kot so redčitveni pufer ter pufer za spiranje (QIAxcel® DNA Handbook, 2013) Princip poteka kapilarne elektroforeze prikazuje slika 4.



Slika 4: Kapilarna elektroforeza (povzeto po QIAxcel® DNA Handbook, 2013)

3 MATERIALI IN METODE DELA

V tem poglavju so navedeni materiali in metode, ki smo jih uporabljali tekom eksperimentalnega dela.

3.1 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili spodaj naštete in opisane materiale.

3.1.1 Vrste vzorcev, izolatov in vzorčenje

Pri magistrski nalogi smo se osredotočili na izolacijo *L. monocytogenes* iz petih različnih tipov okolij; človeka, živali, živila, naravnega okolja in predelovalne industrije. Vzorci, ki so bili vključeni v magistrsko nalogu, so vključevali: izolate iz kliničnih vzorcev ljudi in živali, izolate iz živil in njihovih surovin, izolate pridobljene iz brisov površin in zraka v klavnicih, izolate iz zemlje in površinske vode ter gnoja, krme in silaže s kmetij. Vsi izolati so del zbirke, ki je nastala za potrebe raziskovalnega projekta V4-1106, prispevali pa so jih partnerji z Veterinarske fakultete v Ljubljani, Inštituta za varovanje zdravja in Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. Odvzem večine vzorcev so opravili pooblaščeni veterinarji na terenu, v primeru pogina patologi, ko gre za živila pa tudi proizvajalci živil z namenom notranje kontrole (HACCP). Vsi vzorci so shranjeni na vodenikih na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Izolacija, identifikacija in determinacija, ki temelji na standardu ISO11290-2:1998, je bila opravljena po protokolu Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Klinični in patološki vzorci živali so bili odvzeti v letih 2010 do 2013. Skupno je vzorcev štirideset in vključujejo:

- izolate iz vzorcev možganskega tkiva (št. 19),
- izolate iz vzorcev fecesa (št. 8),
- izolate iz vzorcev mleka (št. 7),
- izolat iz vzorca bezgavk,
- izolat iz vzorca jeternega tkiva,
- rektalne brise (št. 3)
- in izolat pridobljen iz vzorca abortiranega plodu.

Vzorci živil so bili pridobljeni iz Inštituta za higieno živil (IHŽ), v letih 2010 do 2013. Skupno je vzorcev štiriinšestdeset in vključujejo:

- izolate iz vzorcev zaseke (št. 11),
- izolate iz vzorcev lososa in drugih rib (št. 18),
- izolate iz vzorcev mesa in mesnih pripravkov (št. 18),

- izolate iz vzorcev paštet, suhe salame, klobase, belih kozic in tatarskega bifka (št. 7),
- izolate iz vzorcev surovega mleka (št. 8),
- izolat iz vzorca zelenjave
- in izolat, pri katerem vrsta živila ni poznana.

Vzorci naravnega okolja so bili pridobljeni z vzorčenjem kmetij v Ljubljani in okolici leta 2012 in 2013. Pri vzorčenju sem sodelovala tudi sama (slika 5). Vzorce površinske vode pa smo dobili od Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. Vseh vzorcev je sedemindvajset in vključujejo:

- izolate iz vzorcev površinske vode (št. 13),
- izolate iz vzorcev gnoja (št. 8),
- izolate iz vzorcev silaže in krme (št. 3),
- izolata iz vzorcev zemlje (št. 2)
- in izolat pridobljen iz vode iz zajetja.



Slika 5: Zbiranje vzorcev iz naravnega okolja po kmetijah: a) vzorčenje silaže, b) vzorčenje vode iz napajalnika, c) vzorčenje gnoja in d) vzorčenje zemlje.

Vzorci iz klavnic in predelovalnih obratov so bili odvzeti v letih 2008 do 2013. Skupno je vzorcev šestindvajset in vključujejo:

- izolate pridobljene iz brisov površin v klavnicah (št. 13),
- in izolate iz vzorcev zraka v klavnicah (št. 13).

Klinične in patološke vzorce ljudi smo dobili iz Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. Vzorci so bili odvzeti v letih 2007 do 2013. Skupno je vzorcev osemindvajset in vključujejo:

- izolate iz hemokultur (št. 15),
- izolat pridobljen iz brisa kože,
- izolat iz vzorca likvorja,
- izolata iz vzorcev punktatov (plevralni in abdominalni) (št. 2)
- in 9 izolatov pri katerih natančno mesto odvzema ni bilo znano.

3.1.2 Gojišča za izolacijo bakterije *Listeria monocytogenes* iz različnih okolij

Primarno bogativno in selektivno tekoče gojišče z reducirano koncentracijo selektivnih snovi (polovični Fraser-jev bujon – F1)

Sestavine:

- Mesni pepton (peptično digestirano živalsko tkivo) 5,0 g
- Tripton (peptično digestiran kazein) 5,0 g
- Mesni ekstrakt 5,0 g
- Kvaščev ekstrakt 5,0 g
- Natrijev klorid 20,0 g
- Kalijev dihidrogen sulfat 1,35 g
- Dinatrijev hidrogen fosfat dihidrat 12,0 g
- Eskulin 1,0 g
- Destilirana voda 1000 ml
- Raztopina litijevega klorida 1,0 ml
- Raztopina soli nalidiksinske kisline 0,1 ml
- Raztopina akriflavin hidroklorida 0,5 ml
- Raztopina železovega amonijevega citrata 1,0 ml

Osnova

Priprava: Vse sestavine raztopimo v vodi, če je to potrebno, tudi s segrevanjem. pH uravnamo tako, da je ta po sterilizaciji 7,2+- 0,2 pri 25 °C. Pripravljeno gojišče razlijemo v količini, ki jo potrebujemo za preiskavo enega vzorca.

Sekundarno bogativno in selektivno tekoče gojišče s polno koncentracijo selektivnih snovi (Fraser-jev bujon – F2)

Sestavine:

- Mesni pepton (peptično digestirano živalsko tkivo) 5,0 g
- Tripton (peptično digestiran kazein) 5,0 g
- Mesni ekstrakt 5,0 g
- Kvaščev ekstrakt 5,0 g
- Natrijev klorid 20,0 g
- Kalijev dihidrogen sulfat 1,35 g
- Dinatrijev hidrogen fosfat dihidrat 12,0 g
- Eskulin 1,0 g
- Destilirana voda 1000 ml
- Litijev klorida 3,0 g
- Natrijeva sol nalidiksinske kisline 0,02 g

Priprava: Vse sestavine raztopimo v vodi, če je to potrebno, tudi s segrevanjem. pH uravnamo tako, da je ta po sterilizaciji 7,2+- 0,2 pri 25 °C. Pripravljeno gojišče razlijemo v epruvete po 10 ml za testiranje. Bujon steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C. Pripravimo tudi raztopini

akriflavina in amonijevega citrata kot pri F1. Vsaki epruveti z 10 ml F2 dodamo 0,1 ml raztopine akriflavina in 0,1 ml železovega (III) amonijevega citrata in dobro premešamo.

Selektivno gojišče ALOA agar (Agar Listeria Ottaviani Agosti)

Sestavine:

- Mesni pepton 18 g/l
- Tripton 6 g/l
- Kvasni ekstrakt 10 g/l
- Natrijev piruvat 2 g/l
- Glukoza 2 g/l
- Magnezijev glicerofosfat 1 g/l
- Magnezijev sulfat 0,5 g/l
- Natrijev klorid 5 g/l
- Litijev klorid 10 g/l
- Dinatrijev hidrogen fosfat 2,5 g/l
- 5-bromo-4-kloro-3-indolin-beta-D-glukopiranozid 0,05 g/l
- Agar 13,5 g/l
- L- α -fosfatidilinozitol 2 g (20ml)
- Nalidiksinska kislina 10 mg
- Ceftazidim 10 mg
- Cikloheksamid 25 mg
- Polimiksin B 38350 IU

Osnova

Selektivni suplement

Priprava: 35,5 g osnove suspendiramo v 500 ml hladne destilirane vode. Nato ob mešanju segrevamo do vrenja in avtoklaviramo pri 121 °C, 15 minut. Po sterilizaciji mešanico ohladimo do 45 oz. 50 °C in ji dodamo selektivni suplement, ki ga predhodno segregemo do 45 oz. 50 °C. Vsebino stekleničke selektivnega suplementa pripravimo v 5 ml mešanice etanola in sterilne destilirane vode (1:1). Nato vse dobro premešamo in razlijemo v sterilne petrijevke.

Selektivno trdno gojišče PALCAM agar – PLC

Sestavine:

- Peptoni 23 g
- Škrob 1,0 g
- NaCl 5,0 g
- Kvaščev ekstrakt 3,0 g
- Agar-agar 9,0-18,0 g
- D-glukoza 0,5 g
- D-manitol 10,0 g
- Eskulin 0,8 g

Osnova

- Železov (III) amonijev citrat 0,5 g
 - Fenol rdeče 0,08 g
 - Litijev klorid 15,0 g
 - Destilirana voda 960 ml
 - Raztopina polimiksin B sulfata 10 ml
 - Raztopina akriflavin hidroklorida 10 ml
 - Raztopina natrijevega ceftazidim pentahidrata 20 ml
- } Osnova

Priprava: Dehidrirano osnovo agarja raztopimo v vodi s kuhanjem in naravnomo pH na 7,2 +/- 0,2 pri 25 °C. Nato osnovo avtoklaviramo pri 121 °C, 15 minut. Osnovo po sterilizaciji ohladimo na 47 °C ter med mešanjem dodamo še ostale tri raztopine. Pripravljeno gojišče razlijemo v petrijevke po približno 15 ml in ohladimo, da se strdi. Gojišče hranimo v temi.

Agar z ovčjo krvjo

Sestavine:

- Mesni pepton 15 g
 - Ekstrakt jeter 2,5 g
 - Kvaščev ekstrakt 5,0 g
 - Agar-agar 9,0-18,0 g
 - Destilirana voda 1000 ml
 - Defibrinirana ovčja kri 5-7 ml (na 100 ml osnove)
- } Osnova

Priprava: Sestavine raztopimo s kuhanjem in naravnomo pH tako, da bo po avtoklaviranju 7,2 +/- 0,2 pri 25 °C. Nato gojišče razlijemo v primerne steklenice in avtoklaviramo pri 121 °C, 15 minut. Po sterilizaciji mešanico ohladimo in pri temperaturi 47 °C dodamo ovčjo kri ter dobro premešamo. Nato gojišče razlijemo v sterilne petrijevke in pustimo da se strdi.

Ogljikohidratna indikatorska gojišča (sladkorji)

Sestavine:

- Proteazni pepton 10,0 g
 - Mesni ekstrakt 1,0 g
 - Natrijev klorid 5,0 g
 - Bromkrezol rdeče 0,02 g
 - Destilirana voda 1000 ml
 - L-ramnoza (ali D-ksiloza) 5,0 g (na 100 ml destilirane vode)
- } Osnova

Priprava: Sestavine osnove raztopimo v vodi, če je potrebno s segrevanjem in naravnomo pH, da bo ta po avtoklaviranju 6,8 +/- 0,2 pri 25 °C. Gojišče razlijemo v epruvete in avtoklaviramo pri 121 °C, 15 minut. Vsak ogljikov hidrat posebej raztopimo v 100 ml vode in steriliziramo s filtracijo. Nato pa dodamo 1 del raztopine ogljikovega hidrata 9 delom osnovnega gojišča. To storimo posebej za ramnozo in posebej za ksilozo.

3.1.3 Materiali za klasično serotipizacijo

Gojišče za gibljivost

Sestavine:

- Kazeinski pepton 20,0 g
- Mesni pepton 6,1 g
- Agar-agar 3,5 g
- Destilirana voda 1000 ml

Priprava: Sestavine raztopimo v vodi s kuhanem in naravnomo pH, da bo ta po avtoklaviranju 7,3 +/- 0,2 pri 25 °C. Gojišče avtoklaviramo pri 121 °C, 15 minut in razlijemo po 30 ml v epruvete, v katere smo že prej položili nastavek za avtomatsko pipetiranje.

BHI (brain heart infusion)

Sestavine:

- Ekstrakt telečjih možganov 12,5 g/l
- Ekstrakt govejega srca 5,0 g/l
- Pepton kompleks 10,0 g/l
- Bakto dekstroza 2,0 g/l
- Natrijev klorid 5,0 g/l
- Natrijev fosfat 2,5 g/l
- Destilirana voda 1000 ml

Priprava: Osnovni medij BHI bujona raztopimo v 1000 ml destilirane vode in naravnomo pH, da bo ta po avtoklaviranju 7,4 +/- 0,2 pri 25 °C. Nato pa medij steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C, 15 minut.

Komercialno pripravljen komplet antiserumov - *Listeria Denka Seiken Antisera* (Hardy diagnostics, Tokio, Japonska)

Sestavine:

- Listeria As O I/II 2 ml
- Listeria As O I 2 ml
- Listeria As O IV 2 ml
- Listeria As O V/VI 2 ml
- Listeria As O VI 2 ml
- Listeria As O VII 2 ml
- Listeria As O VIII 2 ml
- Listeria As O IX 2 ml
- Listeria As H-A 5 ml
- Listeria As H-AB 5 ml

- Listeria As H-C 5 ml
- Listeria As H-D 5 ml

3.1.4 Materiali in reagenti za serotipizacijo *Listeria monocytogenes* z verižno reakcijo s polimerazo (večkratni PCR)

- Dodatno očiščena destilirana voda – mili-Q (Millipore)
- Pufer brez magnezija
- MgCl
- Deoksiribonukleotid trifosfati dNTP (Applied biosystems, Kalifornija, ZDA)
- Fast Start Taq polimeraza (Roche Applied Science, Penzberg, Nemčija)
- Pozitivni kontroli (seva *L. monocytogenes*, s serološkima skupinama 1/2c in 4ab)
- Negativna kontrola (sterilna destilirana voda)
- DNA vzorcev
- Začetni oligonukleotidi (tarčni geni za PCR pomnoževanje *L. monocytogenes* in poimenovanje ter sekvenca začetnih oligonukleotidov so prikazani v preglednici 8)

Preglednica 8: Tarčni geni za pomnoževanje *Listeria monocytogenes* z verižno reakcijo s polimerazo (večkratni PCR) in poimenovanje ter sekvenca začetnih oligonukleotidov

Tarčni gen	Začetni oligonukleotid	Sekvenca (5'-3')
<i>prfa</i>	lip 1	GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC
	lip 2	GTG TAA TCT ZGA TGC CAT CAG G
<i>prs</i>	prs 1	GCT GAA GAG ATT GCG AAA GAA G
	prs 2	CAA AGA AAC CTT GGA TTT GCG G
<i>lmo0737</i>	<i>lmo0737</i> 1	AGG GCT TCA AGG ACT TAC CC
	<i>lmo0737</i> 2	ACG ATT TCT GCT TGC CAT TC
<i>lmo1118</i>	<i>lmo1118</i> 1	AGG GGT CTT AAA TCC TGG AA
	<i>lmo1118</i> 2	CGG CTT GTT CGG CAT ACT TA
<i>orf2819</i>	<i>orf2819</i> 1	AGC AAA ATG CCA AAA CTC GT
	<i>orf2819</i> 2	CAT CAC TAA AGC CTC CCA TTG
<i>orf2110</i>	<i>orf2110</i> 1	AGT GGA CAA TTG ATT GGT GAA
	<i>orf2110</i> 2	CAT CCA TCC CTT ACT TTG GAC

3.1.5 Materiali in reagenti za serotipizacijo *Listeria monocytogenes* z verižno reakcijo s polimerazo (enkratni PCR)

- Dodatno očiščena destilirana voda – mili-Q (Millipore)
- Pufer brez magnezija
- Deoksiribonukleotid trifosfati dNTP (Applied biosystems, Kalifornija, ZDA)
- HotStart Taq polimeraza (Qiagen, Hilden, Nemčija)
- Pozitivni kontroli (seva *L. monocytogenes*, s serološkima skupinama 1/2a in 4a)

- Negativna kontrola (sterilna destilirana voda)
- DNA vzorcev
- Začetna oligonukleotida (tarčni gen za PCR pomnoževanje *L. monocytogenes* in poimenovanje ter sekvenca začetnih oligonukleotidov so prikazani v preglednici 9)

Preglednica 9: Tarčni gen za pomnoževanje *Listeria monocytogenes* z verižno reakcijo s polimerazo (enkratni PCR) in poimenovanje ter sekvenca začetnih oligonukleotidov

Tarčni gen	Začetni oligonukleotid	Sekvenca (5'-3')
<i>fla a</i>	fla A-F fla A-R	TTA CTA GAT CAA ACT GCT AC AAG AAA AGC CCC TCG TCC

3.1.6 Materiali in reagenti za kapilarno elektroforezo

- Presejalna gelska kartuša (QIAxcel DNA Screening kit, Qiagen, Hilden, Nemčija)
- Poravnalna markerja (alignment marker) AM: 15 bp – 3 kb in AM: 15 bp – 1 kb (Qiagen, Hilden, Nemčija)
- Velikostna standarda (size marker) SM: 100 bp – 3 kp in SM: 50 bp – 800 bp (Qiagen, Hilden, Nemčija)
- Komercialni pufri: redčitveni pufer, pufer za spiranje, kalibracijski pufer (Qiagen, Hilden, Nemčija)
- Mineralno olje (Qiagen, Hilden, Nemčija)

3.1.7 Materiali in reagenti za subtipizacijo s PFGE

- Tris 1 M (pH 8,0)
Priprava: V približno 800 ml sterilne destilirane vode raztopimo 121,1 g TRIZMA baze nato pa ob stalnem mešanju počasi dodajamo koncentriran HCl (približno 42 ml), da dobimo pH 8,0. Nato mešanico dopolnimo do 1000 ml s sterilno destilirano vodo in avtoklaviramo.
- EDTA 0,5 M (pH 8,0)
Priprava: V približno 400 ml sterilne destilirane vode raztopimo 93,05 g EDTA nato pa ob stalnem mešanju počasi dodajamo NaOH (približno 10 g), da dobimo pH 8,0. Nato mešanico dopolnimo do 500 ml s sterilno destilirano vodo in avtoklaviramo.
- TE pufer
Priprava: V čaši zmešamo 10 ml 1 M Tris (pH 8,0) in 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), nato dopolnimo z sterilno destilirano vodo do 1000 ml.
- Cell Lysis Buffer (CLB)
Priprava: V čaši zmešamo 25 ml 1 M Tris (pH 8,0), 50 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) in 50 ml 1 % sarcosyl, nato dopolnimo s sterilno destilirano vodo do 500 ml.
- Alkohol 70 %
Priprava: Zmešamo 7 delov absolutnega etanola s 3 deli sterilne destilirane vode.

- HCl 1 %
Priprava: V čaši zmešamo 2,7 ml koncentriranega HCl in 100 ml sterilne destilirane vode.
- Lizocim (10 mg/ml)
- Proteinaza K (20 mg/ml)
- SeaKem Gold agarozna (Lonza, Švica)
- Detergent SDS 10 % (natrijev dodecil sulfat)
- Sterilna destilirana voda
- *Xba*I (10U/μl) in pufer H (Invitrogen, Kalifornija, ZDA)
- *Asc*I (10U/ μl) in pufer 4 (New England BioLabs, Massachusetts, ZDA)
- *Apal* (50U/ μl) in pufer 4 (New England BioLabs, Massachusetts, ZDA)
- TBE (0,5-kratni)
Priprava: Zmešamo 50 ml pufra TBE in 950 ml destilirane vode ter dobro premešamo.
- Etidijev bromid (10 mg/ml, Invitrogen, Kalifornija, ZDA)

3.1.8 Potrošni material

- Nastavki s filtri za avtomatsko pipetiranje (Eppendorf, Nemčija in Biohit, Finska)
- Nastavki za avtomatsko pipetiranje brez filtrov (Biohit, Finska)
- Mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija)
- Mlečne epruvete (Golias, Slovenija)
- 50 ml centrifugirke (Sarstedt, Nemčija)
- Zaščitne rokavice (Kimtech, Kimberly-Clark, ZDA)
- Plastične pipete (Deltalab, Španija)
- Kivete (Eppendorf, Nemčija)
- Staničevina
- Fiziološka raztopina
- Etanol
- Predmetna stekelca (Deltalab, Španija)
- Bakteriološke zanke (Copan, Hrvaška)

3.1.9 Laboratorijska oprema

- Komori za varno delo (SMBC 122AV in M12)
- Namizna centrifuga (Eppendorf 5430, Nemčija)
- Vibracijsko mešalo (Ika, Severna Karolina, ZDA)
- Avtomatske pipete (območje pipetiranja: 0,1-10 μl, 0,2-0,5 μl, 0,5-10 μl, 10-100 μl, 20-200 μl, 100-1000 μl, 1000-5000 μl) (Biohit, Finska)
- Termobloki (Eppendorf, Nemčija)
- Mikrovalovna pećica (Moulinex, Francija)
- Laboratorijska tehtnica (KERN EG, Nemčija)

- Gorilnik (Fireboy plus, INTEGRA Bioscieces, Kalifornija, ZDA)
- Plastična stojala za mikrocentrifugirke in epruvete (Eppendorf, Nemčija)
- Cedilca za 50 ml centrifugirke (Bio-rad, Kalifornija, ZDA)
- Merilni valji (Brand, Nemčija)
- Erlenmajerice (Brand, Nemčija)
- Črna keramična ploščica
- Spatule
- Modeli za čepke (Bio-rad, Kalifornija, ZDA)
- Glavníček za izdelavo čepkov (Bio-rad, Kalifornija, ZDA)
- Zbiralniki za odpadke
- Stresalniki KIA KS 4000 i control, KIA MS 3 basic (Nemčija)
- Stresalnik (Tehnica železniki EV-201, Slovenija)
- UV presvetljevalnik (GENEGENIUS, Bio imaging system, Syngene, Indija)
- Biofotometer (Eppendorf, Nemčija)
- Vodna kopel s stresanjem (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija)
- Inkubatorji (Heraeus, Ehret)
- Vodna kopel (WB-13E, Kambič laboratorijska oprema, Slovenija)
- Aparat za kapilarno elektroforezo (Qiagen, QIAxcel, Nemčija)
- Aparat za PCR Veriti (Applied biosystems, Invitrogen, Kalifornija, ZDA)
- Aparat za PFGE (BIO-RAD, Kalifornija, ZDA)

3.2 UPORABLJENE METODE DELA

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili spodaj naštete in opisane metode.

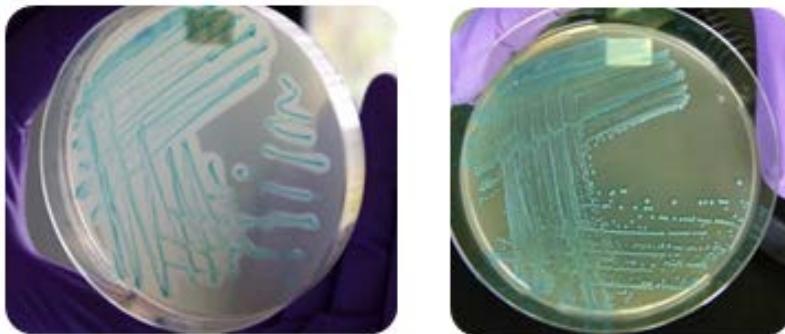
3.2.1 Izolacija *Listeria monocytogenes*

Postopek za ugotavljanje bakterije *L. monocytogenes* vključuje izolacijo na obogatitvenih in selektivnih gojiščih. Najpogosteje uporabljana referenčna metoda za izolacijo in identifikacijo listerij je standard EN ISO 11290 (Jeyalethchumi in sod., 2010).

Vsak vzorec smo najprej obogatili v obogatitvenem gojišču, polovičnem Fraser-jevem bujonu (F1), saj lahko vzorec vsebuje nizko število bakterij vrste *L. monocytogenes* in visoko skupno število bakterij. F1 bujon namreč vsebuje polovično koncentracijo selektivnih sestavin in tako omogoča rast in razmnoževanje tudi poškodovanim celicam. Nato smo vzorce prenesli v Fraser-jev bujon (F2), kjer je prišlo do sekundarne obogatitve. Po inkubaciji pa smo vzorce nasadili na trdna selektivna gojišča ALOA in PALCAM.

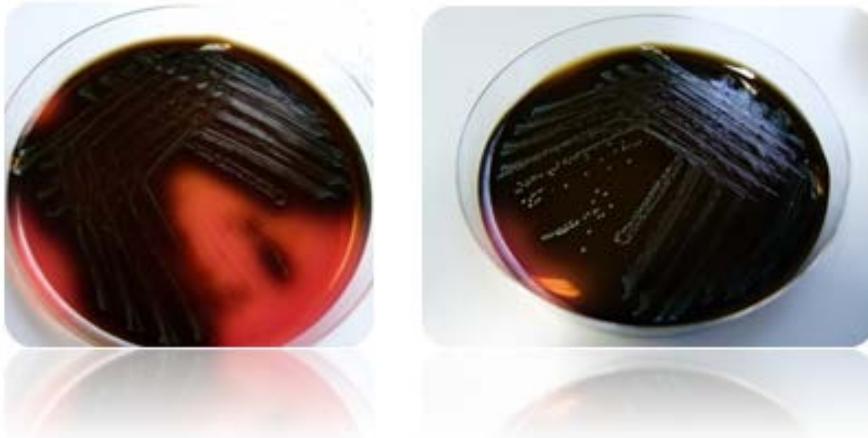
Na ALOA agarju so bile kolonije *L. monocytogenes* po 48 urah modro-zelene barve in obdane z motnim halo efektom. Od nepatogenih vrst listerij smo *L. monocytogenes* ločili ravno na

podlagi halo efekta. Nepatogene vrste so namreč prav tako na gojišču modro-zelene barve, a okoli njih ni halo efekta (Jeyaletchumi in sod., 2010) (slika 6).



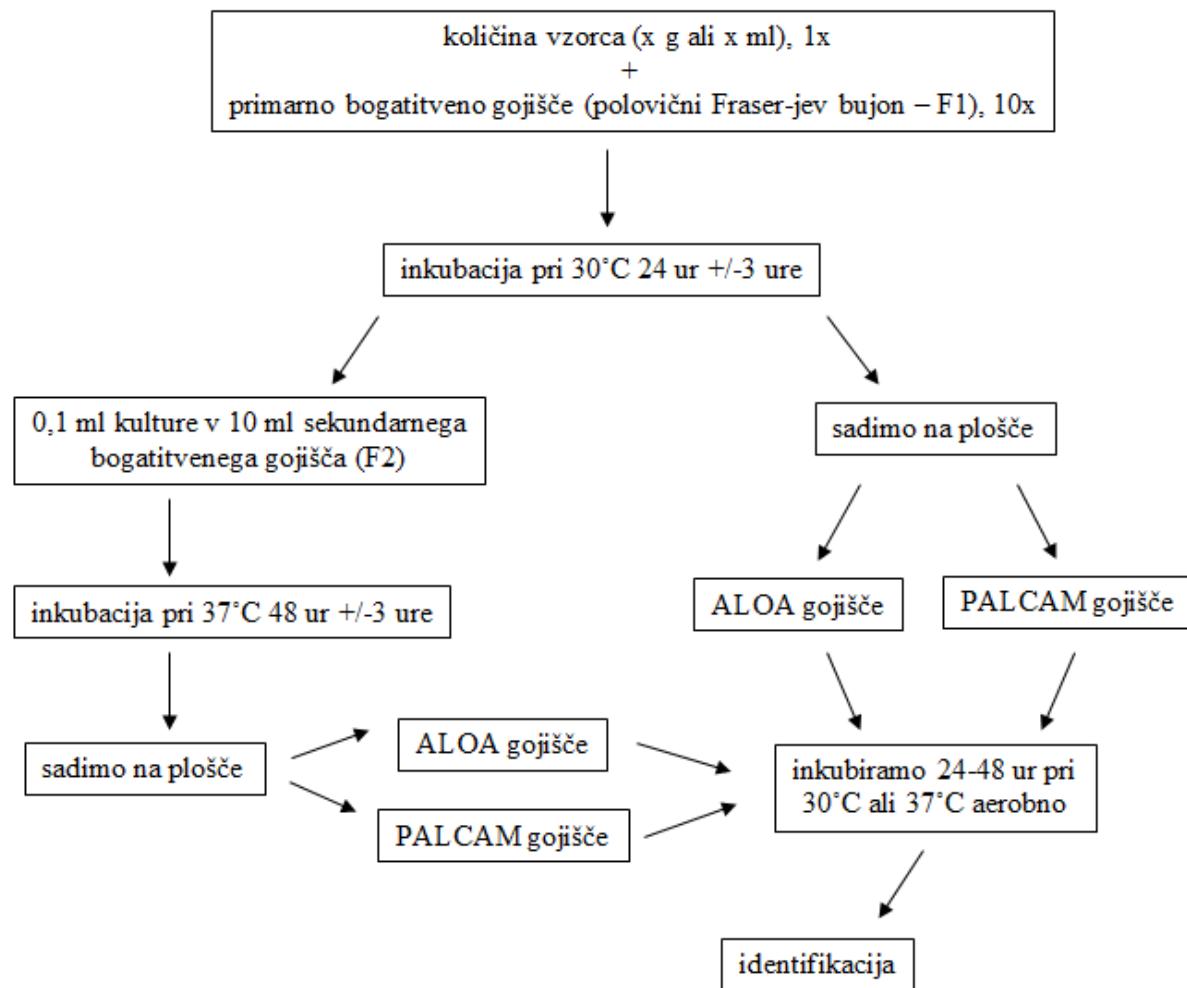
Slika 6: *Listeria monocytogenes* (levo) in *Listeria innocua* (desno) na ALOA gojišču (Agar Listeria Ottaviani Agosti)

Na PALCAM agarju, ki je rožnato do rdeče barve, so bile kolonije *Listeria* spp. po 24 urah zelo majhne, sivo zelene ali olivne barve, gojišče neposredno okrog kolonij pa se je obarvalo črno. Po 48 urah so ostale kolonije zelene, velike 1,5 do 2 mm v premeru, v sredini ugreznejene, gojišče pa se je v celoti obarvano črno (Jeyaletchumi in sod., 2010) (slika 7).



Slika 7: *Listeria monocytogenes* na PALCAM agarju (Polymyxin Acriflavine LiCl Ceftazidime Aesculin Mannitol)

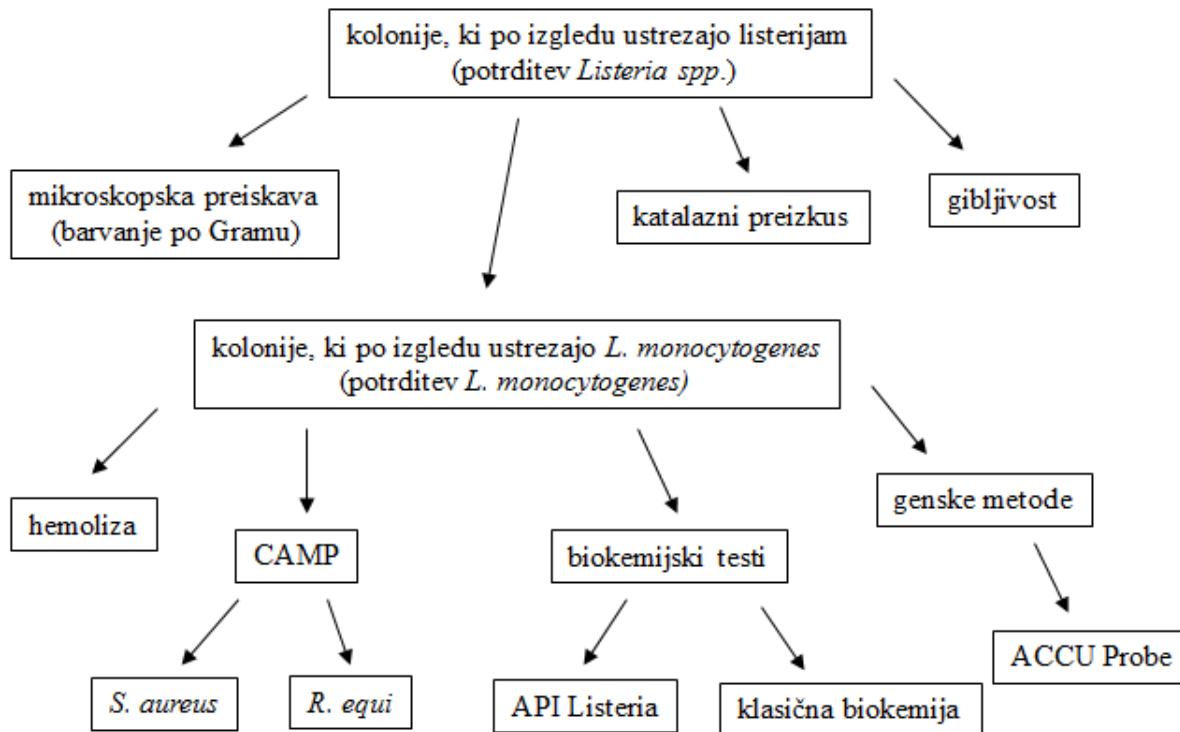
Iz vseh pridobljenih vzorcev smo listerije izolirali po spodaj prikazanem postopku (slika 8).



Slika 8: Shema postopka za izolacijo listerij (povzeto po standardu ISO11290-2:1998)

3.2.2 Potek identifikacije

Bakterije *L. monocytogenes* smo identificirali po spodaj prikazanem postopku (slika 9).



Slika 9: Shema postopka za identifikacijo *Listeria monocytogenes* (povzeto po standardu ISO11290-2:1998)

(*CAMP (Christie Atkins Munch-Peterson) – test za identifikacijo patogenih vrst listerij, predvsem *Listeria monocytogenes*, * ACCU Probe – test, ki se poslužuje hibridizacije DNA za identifikacijo *Listeria monocytogenes* izolirane iz kulture)

3.2.3 Identifikacija

Za identifikacijo *L. monocytogenes* smo pri eksperimentalnem delu uporabili spodaj naštete in opisane metode.

3.2.3.1 Potrditev rodu *Listeria* spp.

Rod *Listeria* smo potrdili z uporabo spodaj opisanih metod.

3.2.3.1.1 Izbira kolonij za potrditev

Za potrditev, da gre res za bakterije z rodu *Listeria*, smo morali iz vsakega trdnega selektivnega gojišča precepiti po 5 kolonij, ki so bile značilne za listerije. Kolonije smo razsadili do posameznih kolonij na predhodno osušeno KA gojišče. Nasajeno gojišče smo nato inkubirali pri 35–37 °C, 18–24 ur, oziroma toliko časa, da smo dobili zadovoljivo rast (do 48 ur). Tipične kolonije so bile velike 1–2 mm v premeru, konveksne, brezbarvne in motne z gladkim robom.

3.2.3.1.2 Katalazni preizkus

Bakterijsko kolonijo smo iz KA gojišča prenesli v kapljico raztopine H₂O₂. V pozitivnem primeru so se pojavili mehurčki plina.

3.2.3.1.3 Barvanje po Gramu

Listeria spp. so grampozitivne kratke paličke, ki so lahko razporejene posamezno, v parih pod kotom ali ena ob drugi, kar smo pod mikroskopom tudi opazili.

3.2.3.2 Potrditev vrste *Listeria monocytogenes*

Za potrditev vrste *L. monocytogenes* smo uporabili spodaj opisane metode.

3.2.3.2.1 Hemoliza

Za ugotavljanje hemolitične aktivnosti smo uporabili krvni agar z ovčjo krvjo. Bakterijsko kolonijo smo na agarju razsadili do posameznih kolonij. Vzoredno smo opravili še test s kontrolnim sevom *L. monocytogenes*. Inokulirana gojišča smo inkubirali pri temperaturi 37 °C 24 ur. *L. monocytogenes* je povzročila na krvnem agarju hemolizo beta, ki je bila včasih vidna le pod kolonijami, zato smo jih z bakteriološko zanko previdno odstranili in opazovali gojišče na mestu rasti. *L. innocua* ne povzroča hemolize. Slabo hemolizira tudi *L. seeligeri*. *L. ivanovii* pa na krvnem agarju tvori zelo močno in široko beta hemolizo (slika 10).



Slika 10: Rast *Listeria monocytogenes* (levo), *Listeria ivanovii* (na sredini) in *Listeria innocua* (desno) na krvnem agarju.

3.2.3.2.2 Izkoriščanje ogljikovih hidratov

Sumljive kolonije smo precepili na sveže gojišče za čisto kulturo, po inkubaciji pa v tekoča gojišča z dodatkom ustreznega ogljikovega hidrata. Po 24-48 urah inkubacije pri 37 °C je bila navadno že opazna pozitivna reakcija, v nasprotnem primeru pa smo inkubacijo nekoliko podaljšali. Izolirane bakterije smo preizkusili glede na njihovo sposobnost razkroja različnih sladkorjev (ramnoze in ksiloze) (slika 11).



Slika 11: Reakcija izkoriščanja različnih sladkorjev, pozitivna (levo) in negativna (desno) reakcija.

3.2.4 Klasična serotipizacija bakterije *Listeria monocytogenes*

Klasična serotipizacija je temeljila na modificirani metodi Denka Seiken.

Pri klasični serotipizaciji nam je za vzorec služila čista kultura bakterije *L. monocytogenes*. Za serotipizacijo smo uporabili komercialno pripravljene antiserume. Posebej smo determinirali O antigen in H antigen.

3.2.4.1 Določitev O antiga

L. monocytogenes smo nasadili na krvni agar in inkubirali pri 37 °C čez noč. Naslednji dan smo pričeli z aglutinacijo. Na predmetnico smo kanili kapljico serumov I/II in V/VI ter kapljico fiziološke raztopine kot negativno kontrolo. Nato smo vzeli bakteriološko zanko bakterijske kulture in jo zmešali s kapljico posameznega antiseruma. Za vsak antiserum smo uporabili svežo bakteriološko zanko. V primeru pozitivnega rezultata je prišlo do aglutinacije. Najprej smo preverili, da ni prišlo do aglutinacije v fiziološki raztopini, saj bi to pomenilo možnost avtoaglutinacije. Kot pozitiven rezultat smo šteli le močno aglutinacijo z enim od obeh antiserumov v roku 1 minute. Če je vzorec reagiral z I/II antiserumom, smo postopek ponovili še z antiserumoma I in IV. Če pa je prišlo do aglutinacije z antiserumom V/VI, smo postopek ponovili še z antiserumi VI, VII, VIII in IX (slika 12).

Uporabili smo prekonočno čisto kulturo *L. monocytogenes* na krvnem agarju



na predmetnico smo kanili kapljico antiserumov I/II in V/VI



v vsako kapljico smo dodali zanko bakterijske kulture



nato smo premešali



do močne aglutinacije je prišlo v roku 1 minute



če je vzorec reagiral z I/II

če je vzorec reagiral z V/VI



smo aglutinirali z antiserumi I in IV



smo aglutinirali z antiserumi VI, VII, VIII in IX



negativen rezultat –
aglutinacije ni



pozitiven rezultat –
aglutinacija

Slika 12: Shema determinacije O antiga na bakterije *Listeria monocytogenes*

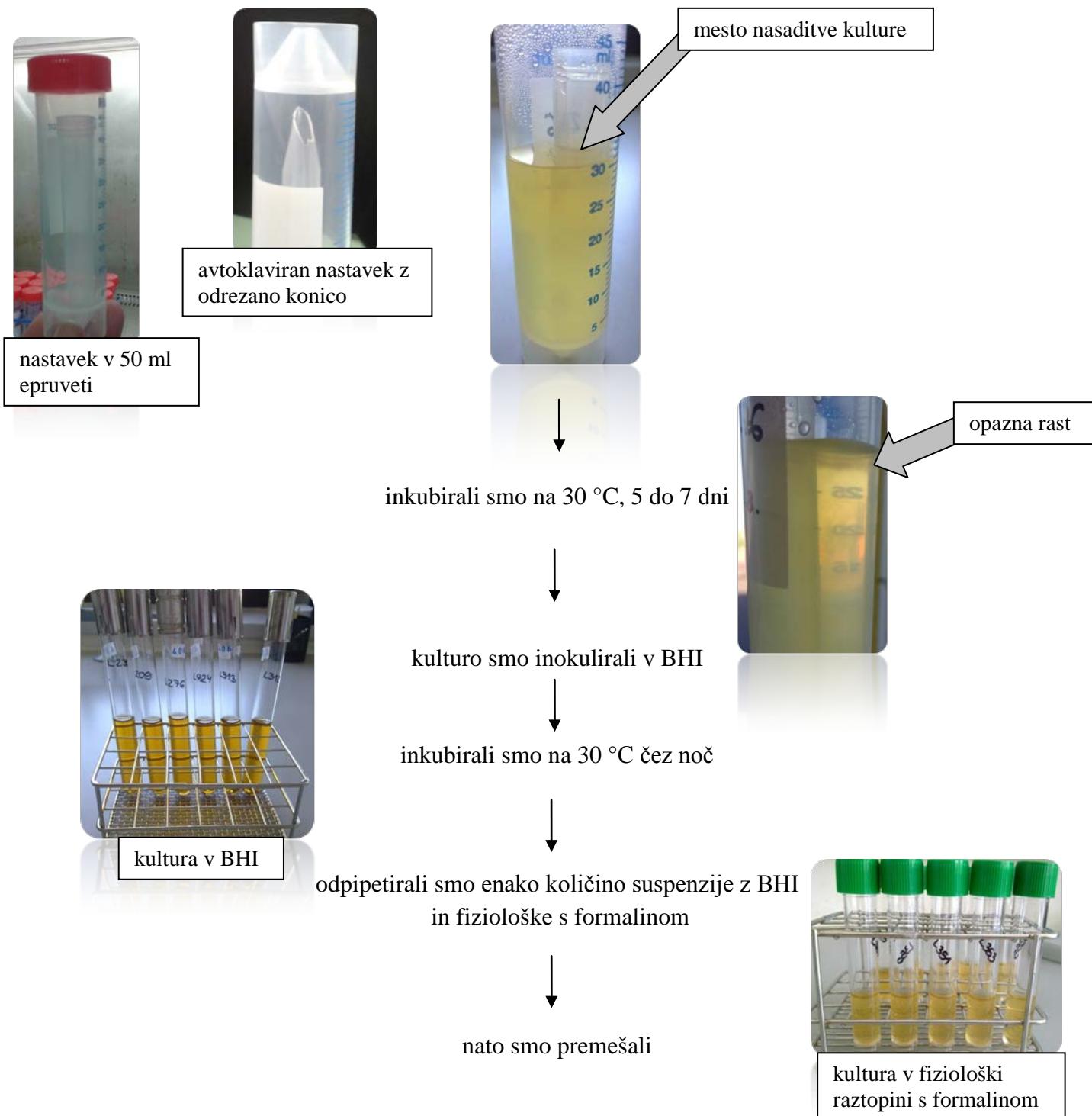
3.2.4.2 Določitev H antigena

L. monocytogenes smo nasadili na krvni agar in čez noč inkubirali pri 37 °C. Naslednji dan smo vzeli eno bakteriološko zanko kulture in jo nasadili na notranjo stran nastavka za pipetiranje, ki smo ga prej postavili v 50 ml epruvete napolnjene s poltekočim gojiščem BHI z 0,2 % agarjem. Nato smo kulturo inkubirali na 30 °C 5 do 7 dni, oziroma dokler nismo opazili rasti na zgornji strani gojišča izven nastavka za pipetiranje. Nato smo eno bakteriološko zanko inokulirali v tekoče gojišče BHI in inkubirali čez noč na 30 °C. Naslednji dan smo v novo epruveto odpipetirali enako količino prej inokuliranega BHI-ja in fiziološke raztopine s formalinom ter dobro premešali (slika 13). Nato smo v majhne epruvetke kanili po dve kapljici vsakega antiseruma (A, B, C in D) in le tem dodali 0,5 ml suspenzije preiskovane bakterije. Za negativno kontrolo smo uporabili fiziološko raztopino. Vse smo dobro premešali in dali inkubirati na 52 °C za 2 uri. Nato smo epruvetke pregledali za pojav aglutinacije, ki je pomenila pozitiven rezultat (slika 14).

Uporabili smo prekonočno čisto kulturo *L. monocytogenes* na krvnem agarju



kulturo smo nasadili v nastavek za pipetiranje v 50 ml
epruveto z BHI z 0,2 % agarja



Slika 13: Shema determinacije H antigena bakterije *Listeria monocytogenes*; vzpodbujanje tvorbe bičkov *Listeria monocytogenes*

V epruvetke smo kanili 2 kapljici antiseruma in
0,5 ml suspenzije (bakterijske kulture z BHI
in fiziološke raztopine s formalinom)



inkubirali smo na 52 °C približno 2 uri



aglutinacija je pomenila pozitiven rezultat

desno – pozitiven test
levo – negativen test



Slika 14: Shema determinacije H antigena bakterije *Listeria monocytogenes*; aglutinacija z antiserumi

3.2.4.3 Interpretacija rezultatov

Serotip *L. monocytogenes* smo določili na podlagi kombinacije O in H antigenov, kot je prikazano v preglednici 10.

Preglednica 10: Določanje serotipa *Listeria monocytogenes* na podlagi kombinacije O in H antigenov

Serotip	O-antigen	H-antigen
1/2a	I, II, (III)	AB
1/2b	I, II, (III)	ABC
1/2c	I, II, (III)	BD
3a	II, (III), IV	AB
3b	II, (III), IV, (XII), (XIII)	ABC
3c	II, (III), IV, (XII), (XIII)	BD
4a	(III), (V), VII, IX	ABC
4ab	(III), V, VII, IX, X	ABC
4b	(III), V, VI	ABC
4c	(III), V, VII	ABC
4d	(III), (V), VI, VII	ABC
4e	(III), V, VI, (VIII), (IX)	ABC
7	(III), XII, XIII	ABC

3.2.5 Serotipizacija bakterije *Listeria monocytogenes* z verižno reakcijo s polimerazo

Serotipizacija bakterije *L. monocytogenes* je povzeta po virih: Doumith in sod., 2004; Borucki in sod., 2003; D'Agostino in sod., 2004)

Shema postopka izolacije in pomnoževanja DNA je prikazana na sliki 15.

3.2.5.1 Izolacija DNA

Vzorce *L. monocytogenes* smo nasadili na krvni agar in jih čez noč inkubirali na 37 °C. Naslednji dan smo delo nadaljevali v komori za varno delo. V 2 ml mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 100 ml sterilne destilirane vode, nato smo dodali po eno bakteriološko zanko čiste kulture vzorca in dobro zmešali. Mešanico smo nato v termobloku inkubirali 15 minut na 95 °C. Po inkubaciji smo vse vzorce centrifugirali (short spin), da ni ostalo nič suspenzije na pokrovčku mikrocentrifugirke. Vzorce smo nato do uporabe shranili v zamrzovalniku.

3.2.5.2 Pomnoževanje DNA

Za vsak vzorec smo izvedli dva različna PCR pomnoževanja (preglednica 11 in preglednica 14). Z enim smo dobili šest produktov (preglednica 13), z drugim pa enega (preglednica 16). Za interpretacijo rezultatov sta pomembna oba.

Preglednica 11: Mešanica za večkratno verižno reakcijo s polimerezo (količine so podane za en vzorec)

Sestavina	Količina
pufer brez Mg	2,5 µl
MgCl	2 µl
dNTP	2 µl
lmo0737-1	0,1 µl
lmo0737-2	0,1 µl
lmo1118-1	0,1 µl
lmo1118-2	0,1 µl
orf2110-1	0,1 µl
orf2110-2	0,1 µl
orf2819-1	0,1 µl
orf2819-2	0,1 µl
prs-1	0,025 µl
prs-2	0,025 µl
lip-1	0,05 µl
lip-2	0,05 µl
FastStart Taq polimeraza (Roche)	0,2 µl
voda	16,85 µl

V vsako mikrocentrifugirko smo torej dali 24,5 µl reakcijske mešanice. Dodali smo ji po 1 µl izolirane DNA našega vzorca. Nato smo izvedli pomnoževanje z aparatom za PCR Veriti (Applied biosystems, Invitrogen, Kalifornija, ZDA) (preglednica 12).

Preglednica 12: Pogoji pomnoževanja za večkratno verižno reakcijo s polimerezo

Korak	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija (<i>FastStart Taq</i> polimeraza)	95 °C	4 min
35-krat	denaturacija	94 °C
	prileganje začetnih oligonukleotidov	53 °C
	podaljševanje verige	72 °C
Končno podaljševanje verige	72 °C	7 min
Zaustavitev reakcije	10 °C	∞

Preglednica 13: Velikosti produktov večkratne verižne reakcije s polimerezo

Gen	Produkt (bp)
<i>prfa</i>	274
<i>prs</i>	370
<i>lmo0737</i>	691
<i>lmo1118</i>	906
<i>orf2819</i>	471
<i>orf2110</i>	597

Produkte smo do analize s kapilarno elektroforezo shranili v hladilniku.

Preglednica 14: Mešanica za enkratno verižno reakcijo s polimerezo (količine so podane za en vzorec)

Sestavina	Količina
pufer brez Mg	2,5 µl
MgCl ₂	že pri polimerazi
dNTP	2 µl
flaA-F	0,25 µl
flaA-R	0,25 µl
HotStart Taq polimeraza (Qiagen)	0,125 µl
voda	17,375 µl

V vsako mikrocentrifugirko smo torej dali 22,5 µl reakcijske mešanice. Dodali smo ji po 2,5 µl izolirane DNA našega vzorca. Nato smo izvedli pomnoževanje z aparatom za PCR Veriti (Applied biosystems, Invitrogen, Kalifornija, ZDA) (preglednica 15).

Preglednica 15: Pogoji pomnoževanja enkratne verižne reakcije s polimerezo

Korak	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija (<i>Hot Start Taq Plus polimeraza</i>)	95 °C	5 min
45-krat	denaturacija	94 °C
	prileganje začetnih oligonukleotidov	62 °C
	podaljševanje verige	72 °C
Končno podaljševanje verige	72 °C	7 min
Zaustavitev reakcije	10 °C	∞

Preglednica 16: Velikost produkta enkratne verižne reakcije s polimerezo

Gen	Produkt (bp)
<i>fla a</i>	538

Produkte smo do analize z kapilarno elektroforezo shranili v hladilniku.

Uporabili smo prekonočno čisto kulturo *L. monocytogenes* na krvnem agarju



v 2 ml epruvetkah smo zmešali 100 µl sterilne destilirane vode in eno zanko kulture



inkubirali smo 15 min pri 95 °C



epruvetke z izolirano DNA smo shranili v hladilniku



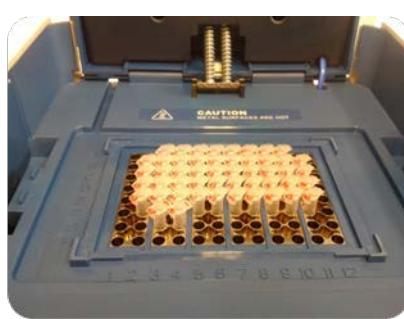
medtem smo pripravili mešanico za PCR



mešanici smo dodali ustrezno količino izolirane
DNA vzorca



izvedi smo pomnoževanje z aparatom za PCR Veriti pri ustreznih pogojih



epruvetke z dobljenimi produkti smo do nadaljnje analize shranili v hladilniku

Slika 15: Shema serotipizacije bakterije *Listeria monocytogenes* z metodo verižne reakcije s polimerazo

3.2.6 Subtipizacija bakterije *Listeria monocytogenes* s pulzno gelsko elektroforezo

Subtipizacija bakterije *L. monocytogenes* je povzeta po: Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes*. PulseNet, CDC, 2013.

3.2.6.1 Izolacija DNA

Pred začetkom izolacije DNA smo si vedno pripravili vse potrebne raztopine in material za delo. Poleg tega smo pred začetkom dela vklopili in nastavili na ustrezno temperaturo vodno kopel s stresanjem (54 °C), navadno vodno kopel (53-56 °C), termomikser (37 °C) in termoblok (55 °C).

Priprava suspenzije celic

Dan pred izvedbo dela smo nasadili izolate *L. monocytogenes* na krvni agar in jih čez noč inkubirali na 37 °C. Naslednji dan smo delo nadaljevali v komori za varno delo. Vsak izolat *L. monocytogenes* smo suspendirali v epruveti s 3 ml TE pufra. Nato smo suspenziji z biofotometrom izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 610 nm in vrednosti zabeležili na obrazec. Vrednosti OD so morale biti med 1,25 in 1,35. Po 240 µl suspenzije vsakega vzorca smo prenesli v novo 2 ml mikrocentrifugirko, dodali 60 µl lizocima (z založno koncentracijo 10 mg/ml) in premešali z obračanjem. Mikrocentrifugirke smo nato inkubirali 10 minut v termobloku pri temperaturi 37 °C (slika 16).

Priprava agaroze

V čaši smo v 10 ml sterilne destilirane vode raztopili 0,12 g agaroze SeaKem Gold in jo do uporabe postavili v vodno kopel na temperaturo 53-56 °C. V 50 ml centrifugirko smo odpipetirali 10 % SDS (natrijev dodecil sulfat), temu dodali agarozo, premešali in do uporabe centrifugirko postavili v vodno kopel na temperaturo 53-56 °C. Tik pred uporabo smo dodali še proteinazo K, premešali in mešanico odpipetirali v 2 ml mikrocentrifugirke, ki smo jih postavili v termoblok (53 °C). Vse sestavine in količine so navedene v preglednici 17, mešanico pa moramo pripraviti v dovolj veliki količini (število vzorcev + 4) (slika 17).

Preglednica 17: Potrebne količine 10 % natrijev dodecil sulfata, 1,2 % agaroze in proteinaze K za pripravo agaroze

Število vzorcev	SDS (10 %)	Agariza (1,2 %)	Proteinaza K (20 mg/ml)	Skupaj
1	30 µl	267 µl	3 µl	300 µl
16	480 µl	4272 µl	48 µl	4800 µl

Priprava čepkov

Po 10 minutni inkubaciji mikrocentrifugirk z lizocimom, smo suspenziji s pipetiranjem počasi dodali po 300 µl ogrete raztopine (SSP) in pazili, da niso nastali mehurčki. Mešanico smo takoj prenesli v modelčke za čepke in počakali 10-15 minut, da so se strdili. Zopet smo pazili, da ne nastanejo mehurčki (slika 17).

Uporabili smo čisto kulturo *L. monocytogenes* na krvnem agarju



kulturo smo suspendirali v epruveti s 3 ml pufra TE



suspenziji smo izmerili optično gostoto (OD približno 1,3)



po 240 µl suspenzije smo prenesli v epruvetke in dodali 60 µl lizocima



inkubirali smo 10 min pri 37 °C



Slika 16: Shema izolacije DNA iz kulture *Listeria monocytogenes*; priprava suspenzije celic za restrikcijo

0,12 g agaroze smo raztopili v 10 ml sterilne destilirane vode in postavili v vodno kopel (na 53-56 °C)



pripravili smo mešanico 10% SDS, agaroze
in proteinaze K



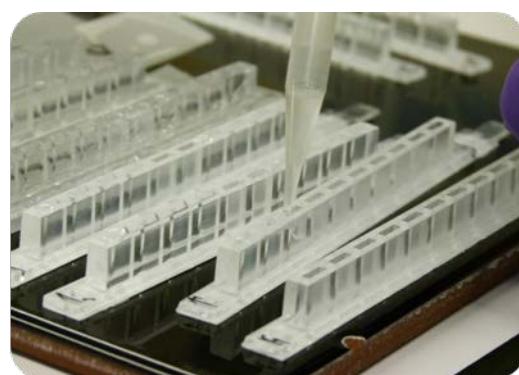
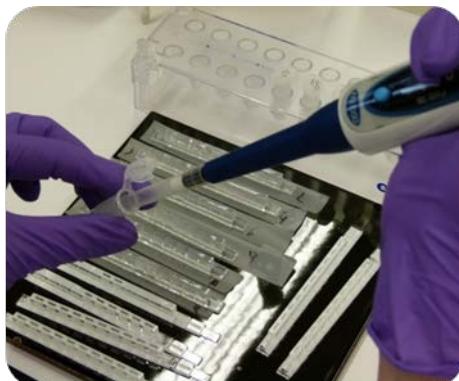
mešanico smo postavili v termoblok (53 °C)



suspenziji celic *L. monocytogenes* smo dodali 300 µl SSP



mešanico smo hitro odpipetirali v modelčke za čepke in počakali 15 min



Slika 17: Shema izolacije DNA *Listeria monocytogenes* v agarazi; priprava natrijevega dodecil sulfata, agaroze, proteinaze K in čepkov

Liza celic

Najprej smo v 50 ml centrifugirki pripravili mešanico pufra CLB (pufer za lizo celic) in proteinaze K. Količine so navedene v preglednici 18.

Preglednica 18: Potrebne količine pufra za lizo celic in proteinaze K potrebne za lizo celic

Število vzorcev	Pufer za lizo celic (CLB)	Proteinaza K (20 mg/ml)
1	4 ml	30 µl
12,5	50 ml	375 µl

Za vsak vzorec smo vzeli 50 ml centrifugirko, jo primerno označili, vanjo odpipetirali po 4 ml mešanice in s spatulo nato vanjo prenesli čepke. Med uporabo smo spatulo po vsakem vzorcu razkužili v alkoholu. Nato smo preverili, da so vsi čepki potopljeni v mešanico in jih inkubirali 2 uri pri temperaturi 54°C v vodni kopeli s stresanjem (150 rpm) (slika 18).

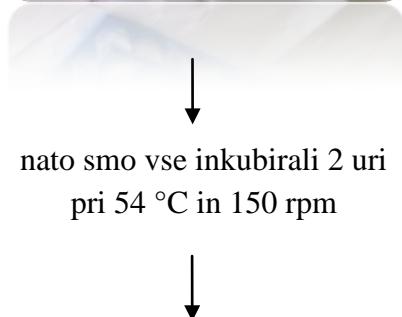
Spiranje čepkov

Pred začetkom spiranja smo ogreli zadostno količino sterilne destilirane vode (SDV) in pufra TE na 54°C. Čepke smo nato najprej 2x spirali s 15 ml ogrete SDV (50-54°C) in jih po vsakem spiranju inkubirali v vodni kopeli s stresanjem 10 minut. Nato smo čepke še 4x spirali s 15 ml ogretega TE (50-54°C). Po vsakem spiranju smo jih inkubirali v vodni kopeli s stresanjem 15 minut. Po spiranju smo čepke do cepitve DNA shranili v 1,8 ml svežega pufra TE v hladilniku (slika 18).

Pripravili smo mešanico pufra za lizo celic in proteinaze K



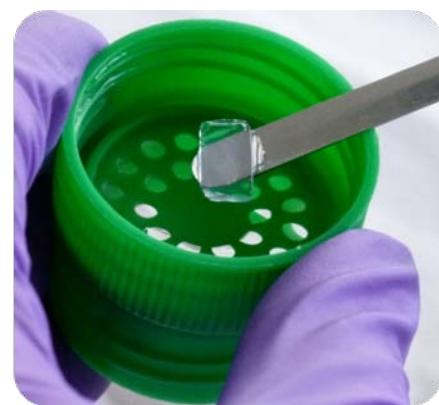
po 4 ml mešanice smo odpipetirali v 50 ml centrifugirke in dodali čepke agaroze z *L. monocytogenes*



nato smo vse inkubirali 2 uri
pri 54 °C in 150 rpm



čepke z *L. monocytogenes* smo spirali 2x po 10 min z ogreto sterilno destilirano vodo in 4x po
15 min z ogretim TE pufrom



Slika 18: Shema lize *Listeria monocytogenes* v agaroznih čepkih in spiranje čepkov

3.2.6.2 Cepitev DNA

Pred začetkom dela smo ogreli termobloke na ustrezne temperature in si pripravili in označili 2 ml mikrocentrifugirke.

3.2.6.2.1 Cepitev DNA z *Asc I*

Najprej smo v 2 ml mikrocentrifugirki pripravili predcepitveno mešanico tako, da smo pufer 4 razredčili z up (ultrapure) vodo v razmerju 1:10 (preglednica 19).

Preglednica 19: Priprava ultrapure vode in pufra 4 za pripravo predcepitvene mešanice

Število vzorcev	Ultrapure voda	Pufer 4	Skupaj
1	135 µl	15 µl	150 µl
13	1755 µl	195 µl	1950 µl

V označene mikrocentrifugirke smo za vsak vzorec odpipetirali po 150 µl razredčenega pufra. Nato smo čepke s spatulo izvlekli iz pufra TE in s skalpelom previdno odrezali 2 milimetrsko koščke ter jih prenesli v mikrocentrifugirke z razredčenim pufrom. Ostanek čepka smo pustili v TE pufru in ga shranili v hladilniku. Med rezanjem čepkov smo spatulo razkuževali v alkoholu. Čepke smo v predcepitveni mešanici inkubirali 15 minut pri 37 °C (slika 19). Med tem smo pripravili cepitveno mešanico z restriktijsko endonukleazo *AscI* (preglednica 20).

Preglednica 20: Priprava ultrapure vode, pufra 4 in encima *AscI* za pripravo cepitvene mešanice

Število vzorcev	Ultrapure voda	Pufer 4	<i>AscI</i> (10U/µl)	Skupaj
1	132,5 µl	15 µl	2,5 µl	150 µl
13	1722,5 µl	195 µl	32,5 µl	1950 µl

Po inkubaciji smo odstranili vso predcepitveno mešanico in pri tem pazili, da nismo poškodovali čepkov. Nato smo v mikrocentrifugirke dodali po 150 µl cepitvene mešanice (preglednica 20) in inkubirali v vodni kopeli vsaj 4 ure pri 37 °C (slika 20).

3.2.6.2.2 Cepitev DNA referenčnih sevov *Salmonella braenderup* z *XbaI*

Pri vsaki restrikciji smo opravili tudi cepitev referenčnih sevov. Vsakič smo opravili cepitev 3 vzorcev *Salmonella braenderup*. Najprej smo pripravili predcepitveno mešanico (preglednica 21).

Preglednica 21: Potrebne količine ultrapure vode in pufra 4 za pripravo predcepitvene mešanice referenčnih sevov

Število vzorcev	Ultrapure voda	Pufer 4	Skupaj
1	90 µl	10 µl	100 µl
4	360 µl	40 µl	400 µl

Nato smo s spatulo čepke izvlekli iz pufra TE, previdno odrezali 2 milimetrsko koščke ter jih prenesli v mikrocentrifugirke, kamor smo že prej odpipetirali po 100 µl predcepitvene mešanice, in jih inkubirali 15 minut pri 37 °C (slika 19). Med tem smo pripravili še cepitveno mešanico (preglednica 22).

Preglednica 22: Potrebne količine ultrapure vode, pufra 4 in encima *XbaI* za pripravo cepitvene mešanice referenčnih sevov

Število vzorcev	Ultrapure voda	Pufer 4	<i>XbaI</i> (10U/µl)	Skupaj
1	90 µl	10 µl	2 µl	102 µl
4	360 µl	40 µl	8 µl	408 µl

Po 15 minutni inkubaciji smo odstranili predcepitveno mešanico in sevom dodali po 102 µl cepitvene mešanice. Nato smo inkubirali vsaj 4 ure pri 37 °C (slika 20).

3.2.6.2.3 Cepitev DNA z *ApaI*

Najprej smo v 2 ml mikrocentrifugirki pripravili predcepitveno mešanico tako, da smo pufer 4 razredčili z ultrapure vodo v razmerju 1:10 (preglednica 23).

Preglednica 23: Potrebne količine ultrapure vode in pufra 4 za pripravo predcepitvene mešanice

Število vzorcev	Ultrapure voda	Pufer 4	Skupaj
1	135 µl	15 µl	150 µl
13	1755 µl	195 µl	1950 µl

Nato smo v označene mikrocentrifugirke za vsak vzorec odpipetirali po 150 µl razredčenega pufra. Potem smo s spatulo čepke izvlekli iz pufra TE in previdno s skalpelom odrezali 2 milimetrsko koščke ter jih prenesli v mikrocentrifugirke z razredčenim pufrom. Ostanek čepka smo pustili v TE pufru in ga shranili v hladilniku. Med rezanjem čepkov smo spatulo namakali v alkohol. Čepke smo v predcepitveni mešanici inkubirali 10 minut na 37 °C (slika 19). Med tem smo pripravili cepitveno mešanico z restriktijsko endonukleazo *ApaI* (preglednica 24).

Preglednica 24: Potrebne količine ultrapure vode, pufra 4 in encima *ApaI* za pripravo cepitvene mešanice

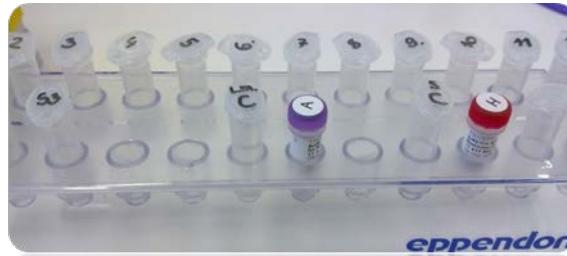
Število vzorcev	Ultrapure voda	Pufer 4	<i>ApaI</i> (50U/µl)	Skupaj
1	131 µl	15 µl	4 µl	150 µl
13	1703 µl	195 µl	52 µl	1950 µl

Po inkubaciji smo odstranili vso predcepitveno mešanico in pri tem pazili, da nismo poškodovali čepkov. Nato smo v mikrocentrifugirke dodali po 150 µl cepitvene mešanice in inkubirali v vodni kopeli vsaj 5 ur pri 25 °C (slika 20). Po končani restrikciji smo odpipetirali cepitveno mešanico in v mikrocentrifugirke dodali 150 µl pufra TE ter jih pred izvedbo elektroforeze inkubirali čez noč oz. do 1 tedna v hladilniku.

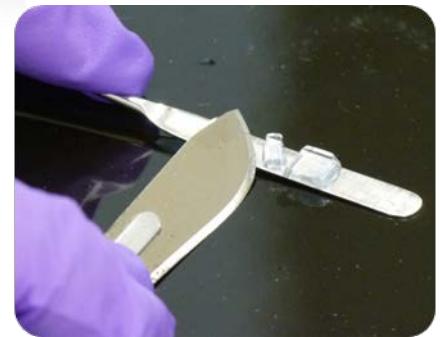
Pripravili smo predcepitveni mešanici za *AscI* (za listerije) in *XbaI* (za salmonele)



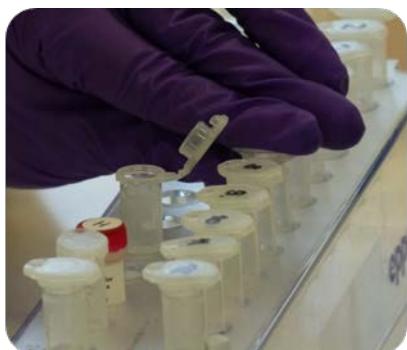
razporedili smo jih po 150 µl oz. po 100 µl v epruvetke



čepkom smo odrezali 2 milimetrskе
koščke in jih dodali v epruvetke



nato smo jih inkubirali 15 min pri 37 °C v predcepitveni mešanici (za *AscI* in *XbaI*)



medtem smo pripravili predcepitveno
mešanico za *ApaI*



in jo razporedili v epruvetke (po 150 µl)

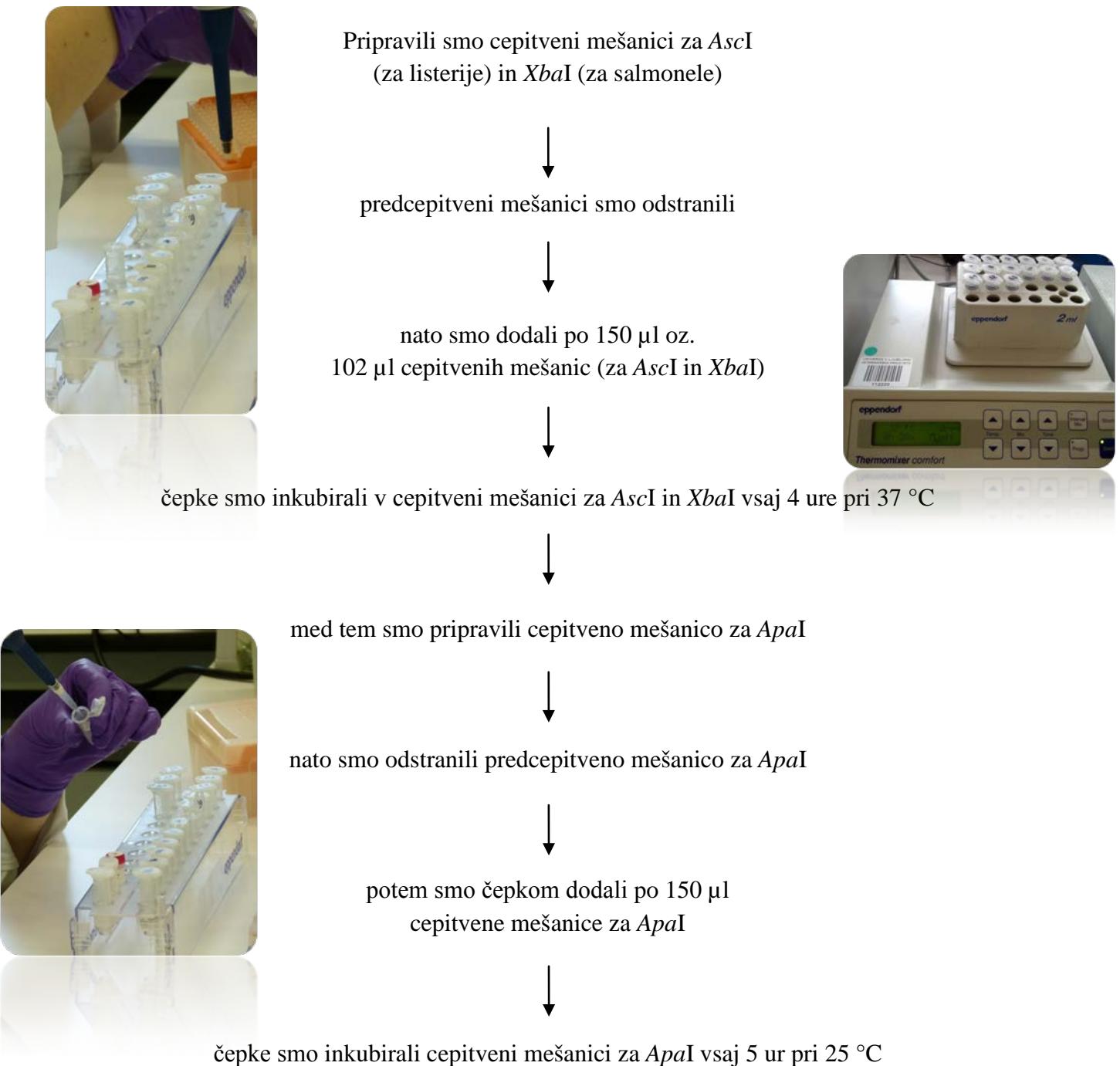


čepkom smo odrezali 2 mm koščke
in jih dodali v epice



nato smo jih inkubirali 10 min pri 37 °C v predcepitveni mešanici za *ApaI*

Slika 19: Shema priprave in inkubacije DNA *Listeria monocytogenes* in *Salmonella braenderup* v predcepitvenih mešanicah



Slika 20: Shema cepitve DNA *Listeria monocytogenes* z *AscI* in *ApaI* ter cepitve DNA *Salmonella braenderup* z *XbaI* – priprava in inkubacija v cepitvenih mešanicah

3.2.6.3 Elektroforeza

Najprej smo v celico aparata za elektroforezo vlili 2 litra 0,5 x TBE pufra (dva kratno mešanico: 50 ml + 950 ml destilirane vode). Nato smo vklopili vir napajanja, modul za nastavljanje programov, črpalko in hladilno enoto, nastavili program elektroforeze in počakali, da se je pufer v celici ohladil na zahtevano temperaturo.

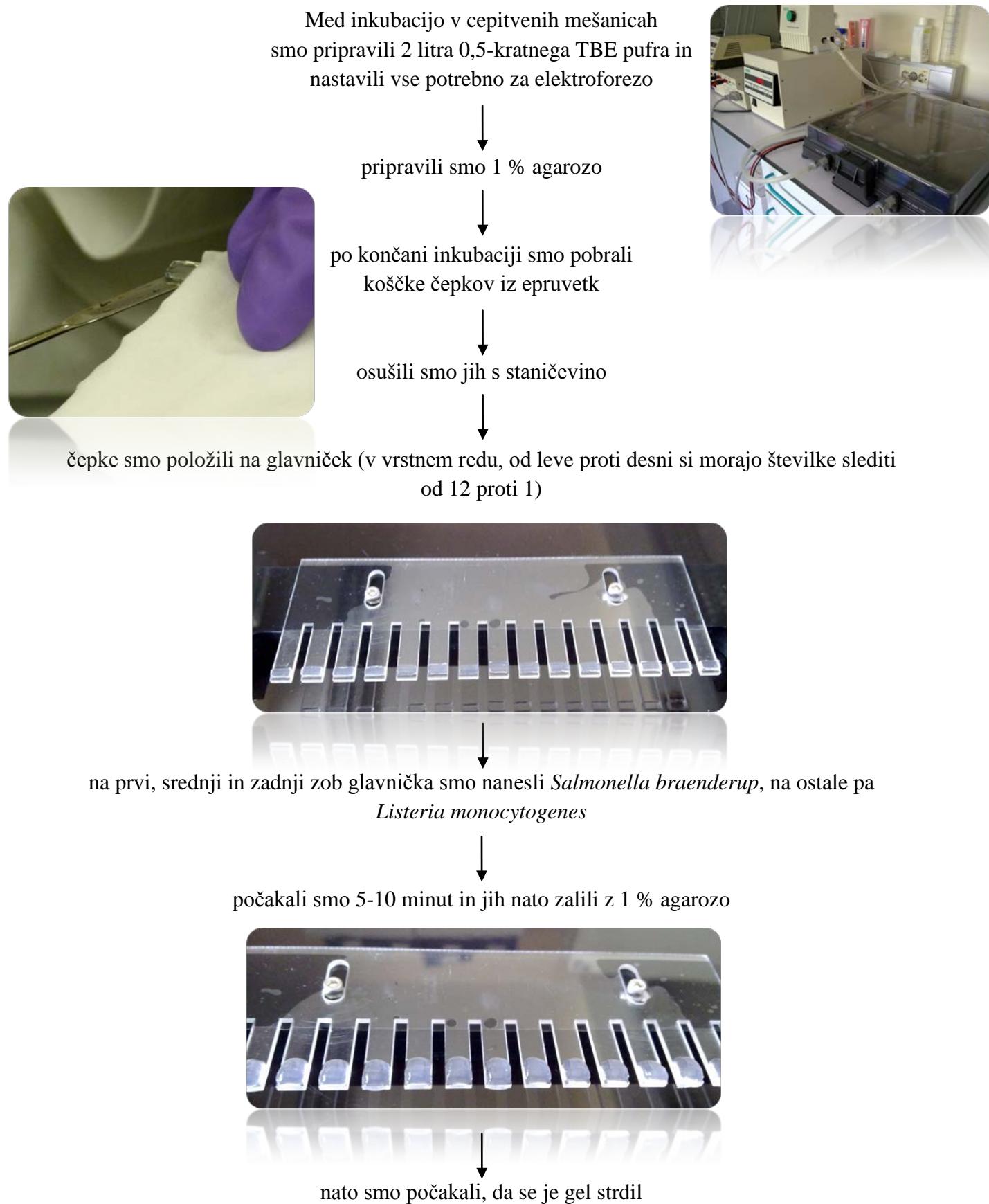
Nato smo pripravili 1 % agarozo SeaKem Gold tako, da smo 1,8 g agaroze raztopili v 180 ml 0,5 x TBE in jo do uporabe postavili v kopel na temperaturo 53-55 °C.

Okvir, glavniček in podlogo za gel smo splagnili z destilirano vodo. S spatulo smo pobrali koščke čepkov iz mikrocentrifugirk, jih osušili s staničevino, previdno položili na glavniček (približno 1 mm od spodnjega roba), počakali 5-10 minut in jih zalili z 1 % agarozo. Med polaganjem posameznih čepkov na glavniček smo spatulo vsakič razkužili v absolutnem etanolu. Na glavniček smo čepke polagali v obratnem vrstnem redu, tako da so si od leve proti desni sledile številke od 12 proti 1. Na prvi, srednji in zadnji zob glavnika smo nanesli čepke *S. braenderup*, na vse ostale pa preiskovane izolate *L. monocytogenes* (slika 21).

Nato smo sestavili okvir za vlivanje gela, vanj vstavili glavniček in vlili gel. Počakali smo približno 30 minut, da se je gel strdil in nato previdno odstranili glavniček. Jamice smo zalili z 1 % agarozo in počakali, da se je strdila. Pladenj z gelom smo prenesli v celico za elektroforezo in počakali 10-15 minut, da se je temperatura gela izenačila z temperaturo pufra v celici. Nato smo vnesli še parametre elektroforeze (preglednica 25) in zagnali aparat (slika 22).

Preglednica 25: Parametri elektroforeze za *Listeria monocytogenes* za vse vzorce

Parametri elektroforeze	
Temperatura	14 °C
Začetni pulzni čas	4 s
Končni pulzni čas	40 s
Napetost	6 V/cm
Trajanje	21 ur



Slika 21: Shema priprave vzorcev na elektroforezo

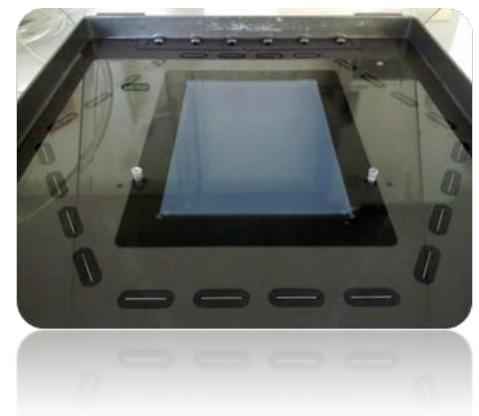
Na koncu smo sestavili okvir za vlivanje gela,
vanj vstavili glavniček in vlili gel v model



počakali smo, da se je gel strdil in odstranili glavniček



jamice smo zalili z 1 % agarozo in
počakali, da se je strdila



pladenj z gelom smo prenesli v celico
za elektroforezo



počakali smo 10-15 minut



nato smo zagnali aparat

Slika 22: Shema priprave gela in aparata za elektroforezo

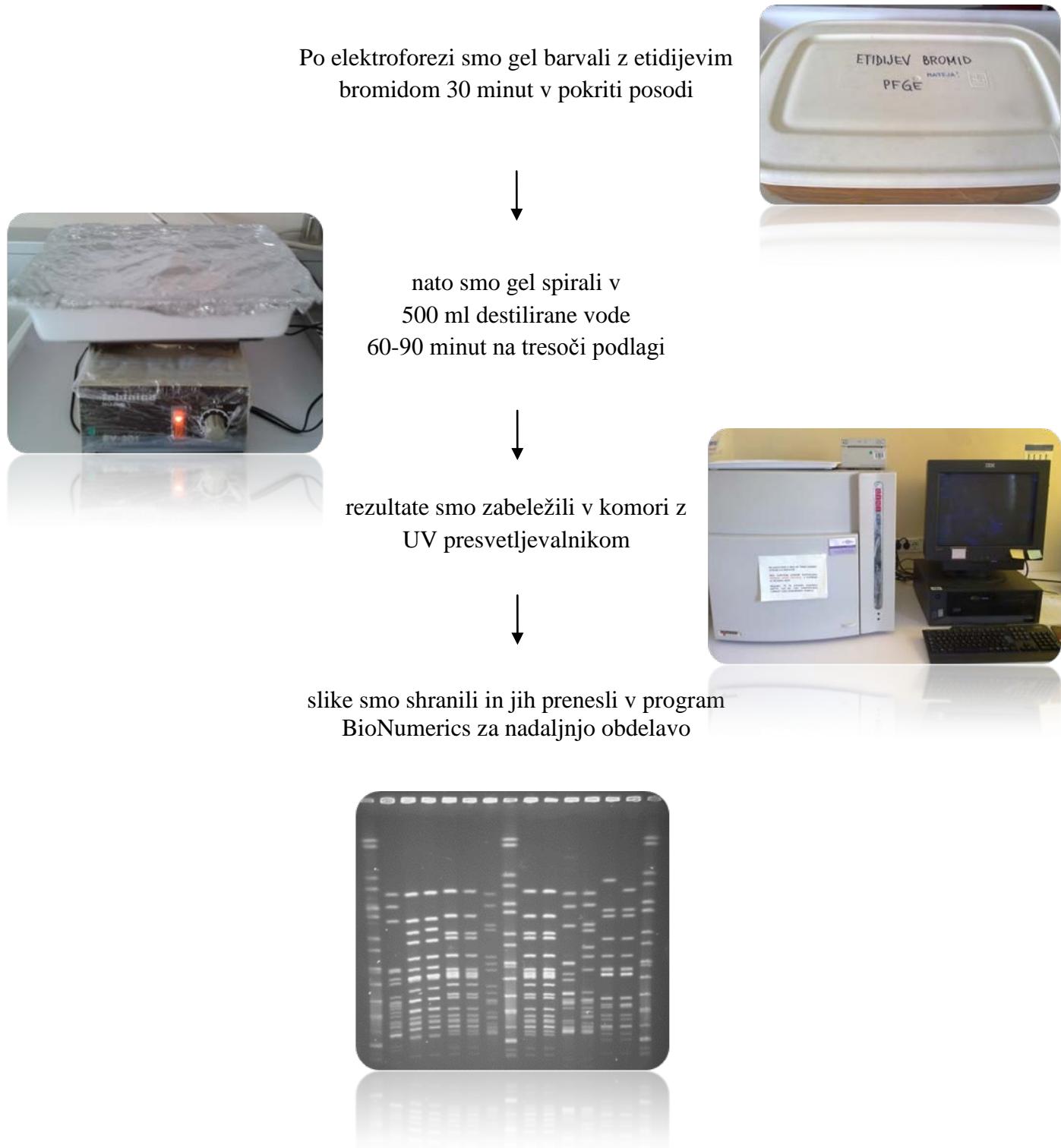
3.2.6.4 Odčitavanje rezultatov

Po končani elektroforezi smo gel barvali z etidijevim bromidom (10 mg/ml) 20-30 minut v pokriti posodi. Razredčino etidijevega bromida smo pripravili tako, da smo 40 µl etidijevega bromida redčili z 400 ml destilirane vode. Po barvanju smo gel spirali v približno 500 ml destilirane vode 60-90 minut na tresoči podlagi. Na vsakih 20-30 minut smo zamenjali vodo.

Po spiranju smo rezultate zabeležili v komori z UV presvetljevalnikom. Slikali smo pri različnih osvetlitvah in slike shranili v formatu „tif uncompressed“ ter jih prenesli v program BioNumerics za nadaljnjo obdelavo rezultatov (slika 23).

3.2.6.5 Analiza rezultatov

Rezultate smo analizirali s pomočjo računalniškega programa BioNumerics (verzija 5.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgija), ki omogoča medsebojno primerjavo pulzotipov in izdelavo dendrogramov. V programu BioNumerics je bila primerjava med izolati narejena le na podlagi encima *ApAI*. Za primerjavo smo uporabili algoritem UPGMA s koeficientom Dice, z 1 % optimizacijo ter z 1 % toleranco zamika med pasovi. Kriterij za razvrščanje izolatov v podtipe je bila 80 % skladnost med pulzotipi.



Slika 23: Shema detekcije rezultatov po končani elektroforezi

4 REZULTATI

V naši raziskavi smo skupno analizirali 185 izolatov *L. monocytogenes*. Vse izolate smo serotipizirali s klasično serološko metodo ter z verižno reakcijo s polimerazo in subtipizirali z metodo pulzne gelske elektroforeze.

Vključili smo izolate *L. monocytogenes*, ki so bili izolirani iz petih različnih okolij:

- živali (priloga A 1),
- živil (priloga A 2),
- naravnega okolja (priloga A 3),
- klavnic (priloga A 4) in
- ljudi (priloga B).

Največ izolatov *L. monocytogenes* smo pridobili iz vzorcev živil (64). Iz vzorcev živali smo pridobili 40 izolatov, iz vzorcev naravnega okolja 27, iz vzorcev klavnic pa 26 izolatov *L. monocytogenes*. Iz humanih vzorcev smo uspeli pridobili 28 izolatov *L. monocytogenes*.

4.1 REZULTATI SEROTIPIZACIJE *Listeria monocytogenes* PRIDOBLJENI Z METODO VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO IN KLASIČNO SEROLOŠKO METODO

Pri vseh serotipiziranih izolatih *L. monocytogenes* so se serološki tipi ugotovljeni s klasično serotipizacijsko metodo ujemali s serološkimi tipi ugotovljenimi z metodo serotipizacije z verižno reakcijo s polimerazo (PCR).

Vzorci živali so vključevali 19 vzorcev možganskega tkiva, 8 vzorcev fecesa, 7 vzorcev mleka, 1 vzorec bezgavk, 1 vzorec jetrnega tkiva, 3 vzorce rektalnih brisov ter vzorec, pridobljen iz abortiranega plodu. Največ vzorcev je bilo pridobljenih od goveda, kar 21, od tega sta bila 2 vzorca izolirana od teličkov in en iz abortiranega plodu. Poleg tega je bilo 8 vzorcev pridobljenih od ovac. Od koz smo pridobili 10 vzorcev, od tega sta bila 2 od kozličkov. En vzorec pa smo pridobili še od srne.

Pri izolatih *L. monocytogenes*, izoliranih iz živalih je prevladoval serološki tip 1/2a, kateremu je pripadalo kar 23 izolatov. Poleg tega je še 11 izolatov pripadalo serotipu 4b ter 5 izolatov serotipu 1/2b. Izolatov ostalih serotipov med našimi vzorci nismo našli.

Iz vzorcev odvzetih iz možganskega tkiva sta bila najpogosteje izolirana serotipa 1/2a in 4b, iz vzorcev mleka 1/2a, iz vzorcev fecesa pa prav tako 1/2a in 4b. Izolat iz bezgavke srne pa je pripadal serotipu 1/2a, istemu serotipu je pripadal tudi izolat iz jetrnega tkiva kozlička. Izolati, ki smo jih pridobili iz rektalnih brisov, so pripadali serotipu 1/2a. Izolat *L. monocytogenes* iz abortiranega plodu goveda smo analizirali le s klasično serotipizacijo in ugotovili serološki tip 4b, PCR serotipizacija pa ni bila narejena, a predvidevamo, da bi se rezultat PCR ujemal s klasično serotipizacijo (preglednica 26).

Preglednica 26: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi živalskimi izolati *Listeria monocytogenes*.

serotip	Vrsta živalskega vzorca						
	možgansko tkivo	mleko	feces	drugo	Skupaj (št. / %)		
1/2a	8	7	3	5	23	57,5	
1/2b	3	0	2	0	5	12,5	
1/2c	0	0	0	0	0	0	
4b	8	0	3	1	12	30	
skupaj	19	7	8	5	40	100	

Vzorci živil so vključevali 18 vzorcev rib, 35 vzorcev mesa in mesnih izdelkov, 8 vzorcev surovega mleka in po en vzorec zelenjave in kuhanih belih kozic. Za en živilski izolat pa vrsta živila ni bila znana. Med vzorci rib je bilo kar 16 vzorcev lososa. Med mesne izdelke pa smo vključili vzorce zaseke, suhih salam, paštet, svinjskega vratu ter mesne pripravke.

Pri izolatih *L. monocytogenes* iz živil je prevladoval serološki tip 1/2a. Od skupno 64 izolatov *L. monocytogenes*, je bilo namreč kar 49 izolatov s serotipom 1/2a. Izolatov ostalih serotipov je bilo bistveno manj, 8 izolatov je pripadalo serotipu 4b, 5 izolatov serotipu 1/2b, 2 izolata pa sta pripadala serotipu 1/2c. Izolatov ostalih serotipov med našimi vzorci nismo našli (preglednica 27).

Preglednica 27: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi živilskimi izolati *Listeria monocytogenes*

serotip	Vrsta živilskega vzorca						
	ribe	meso in mesni izdelki	mleko	drugo	skupaj (št. / %)		
1/2a	16	24	7	2	49	76,6	
1/2b	1	4	0	0	5	7,8	
1/2c	0	2	0	0	2	3,1	
4b	1	5	1	1	8	12,5	
skupaj	18	35	8	3	64	100	

Vzorci, odvzeti iz naravnega okolja so vključevali 13 vzorcev površinske vode, 8 vzorcev gnoja, 2 vzorca zemlje, 2 vzorca silaže ter po en vzorec krme in vode iz zajetja.

Pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz naravnega okolja sta prevladovala serološka tipa 1/2a in 4b. Serotipu 1/2a je pripadalo 15 izolatov *L. monocytogenes*, serotipu 4b pa 9. Poleg tega so 3 izolati pripadali serotipu 1/2b. Izolatov ostalih serotipov med našimi vzorci nismo našli.

Iz vzorcev odvzetih iz gnoja je bil najpogosteje izolirani serotip 1/2a, iz vzorcev površinske vode prav tako 1/2a, iz vzorcev zemlje pa 4b. Izolat izoliran iz krme je pripadal serotipu 1/2a, prav tako tudi izolat izoliran iz vode iz lastnega zajetja rejca ter en izolat iz silaže, drugi izolat iz silaže je pripadal serotipu 4b (preglednica 28).

Preglednica 28: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi izolati *Listeria monocytogenes* iz naravnega okolja

serotip	Vrsta naravnega okolja					
	gnoj	površinska voda	zemlja	drugo	skupaj (št. / %)	
1/2a	5	7	0	3	15	55,6
1/2b	1	2	0	0	3	11,1
1/2c	0	0	0	0	0	0
4b	2	4	2	1	9	33,3
skupaj	8	13	2	4	27	100

Vzorci odvzeti iz klavnic so vključevali 13 vzorcev zraka, 10 vzorcev brisa površine in po en vzorec iz bazena za kri, satelita za piščance in filetirke.

Pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz klavnic je prevladoval serološki tip 1/2a. Kar 18 izolatov *L. monocytogenes* od skupno 26 je namreč pripadalo serotipu 1/2a. Serotipu 4b je pripadalo 6 izolatov, serotipu 1/2b pa 2 izolata.

Vsi izolati *L. monocytogenes*, ki so bili izolirani iz zraka so imeli enak serotip, 1/2a. Pri vzorcih brisa površine je bil pa najpogosteji serotip 4b. Vzorca *L. monocytogenes* izolirana iz bazena za kri in satelita za piščance sta pripadala serotipu 1/2a, vzorec iz filetirke pa serotipu 4b (preglednica 29).

Preglednica 29: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi izolati *Listeria monocytogenes* iz klavnic

serotip	Vrsta vzorca odvzetega iz klavnice				
	bris površine	zrak	drugo	skupaj (št. / %)	
1/2a	3	13	2	18	69,2
1/2b	2	0	0	2	7,7
1/2c	0	0	0	0	0
4b	5	0	1	6	23,1
skupaj	10	13	3	26	100

Vzorci ljudi so vključevali 15 vzorcev hemokultur, vzorec brisa kože, vzorec likvorja, 2 vzorca punktatorjev (plevralni in abdominalni) pri ostalih 9 humanih vzorcih pa natančno mesto odvzema ni bilo znano.

Pri humanih izolatih *L. monocytogenes* sta prevladovala serološka tipa 1/2a in 4b. Serotipu 1/2a je pripadalo 14 izolatov *L. monocytogenes*, 9 pa serotipu 4b. Poleg tega so 3 izolati pripadali serotipu 1/2b, 2 pa serotipu 1/2c. Izolatov ostalih serotipov med našimi vzorci nismo našli.

Iz izolatov izoliranih iz hemokultur je bil najpogostejši serotip 1/2a. Izolat izoliran iz likvorja je pripadal serotipu 1/2a, izolat izoliran iz punktatorjev serotipu 1/2a, izolat kože pa serotipu 4b (preglednica 30).

Preglednica 30: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi človeškimi izolati *Listeria monocytogenes*

serotip	Vrsta humanega vzorca							
	hemokultura	likvor	bris kože	punktator	neznano	skupaj (št. / %)		
1/2a	9	1	0	2	2	14	50	
1/2b	2	0	0	0	2	4	14,3	
1/2c	1	0	0	0	0	1	3,6	
4b	3	0	1	0	5	9	32,1	
skupaj	15	1	1	2	9	28	100	

Analiza skupnih rezultatov

Med vsemi izoliranimi sevi *L. monocytogenes* je prevladoval serološki tip 1/2a. Izmed 185 izolatov je namreč kar 119 pripadalo temu serotipu, kar predstavlja 64,3 %. Drugi najpogostejši serološki tip je bil 4b, izolatov takega serotipa je bilo 44, kar je 23,8 %. Serotipu 1/2b je pripadalo 19 izolatov (10,3 %) in serotipu 1/2c trije izolati (1,6 %). Izolatov ostalih serotipov med našimi vzorci nismo našli (preglednica 31).

Preglednica 31: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi izolati *Listeria monocytogenes*

serotip	živali (št. / %)		živila (št. / %)		naravno okolje (št. / %)		klavnice (št. / %)		ljudje (št. / %)		skupaj (št. / %)	
1/2a	23	57,5	49	76,6	15	55,6	18	69,2	14	50	119	64,3
1/2b	5	12,5	5	7,8	3	11,1	2	7,7	4	14,3	19	10,3
1/2c	0	0	2	3,1	0	0	0	0	1	3,6	3	1,6
4b	12	30	8	12,5	9	33,3	6	23,1	9	32,1	44	23,8
skupaj	40		64		27		26		28		185	

4.2 Rezultati pridobljeni z metodo pulzne gelske elektroforeze (PFGE)

Rezultate, ki smo jih pridobili z metodo PFGE, smo analizirali s pomočjo računalniškega programa BioNumerics. Program omogoča izdelavo dendrogramov, na podlagi katerih smo izolate *L. monocytogenes* razvrstili v preglednico. Naš kriterij za razvrščanje izolatov v podtipe je bila 80 % skladnost med pulzotipi. V programu BioNumerics pa je bila primerjava med izolati narejena le na podlagi encima *Apal*.

Večino živalskih izolatov *L. monocytogenes* smo uvrstili v pulzoskupine A, B in G, večino živilskih izolatov v pulzoskupine B, C in F, večino izolatov iz naravnega okolja v pulzoskupino D, večino izolatov iz klavnic v pulzoskupino E in večino humanih izolatov v pulzoskupine A, D, C in J (preglednica 32).

Večino izolatov, ki smo jih uvrstili v isto pulzoskupino, je pripadalo enakemu serološkemu tipu. Izjeme so bili nekateri izolati, ki smo jih uvrstili v pulzoskupine A, D, E, J, L in N. V večini primerih sta izstopala po dva izolata.

Največja nehomologija je bila prisotna seveda pri izolatih, ki jih nismo uspeli uvrstiti v pulzoskupino. Takih je bilo 9, izolirani pa so bili iz živil, klavnic, naravnega okolja in živalskih tkiv. Pripadali so tudi različnim serotipom (1/2a, 1/2b in 4c).

Preglednica 32: Pulzoskupine, podtipi in serotipi izolatov *Listeria monocytogenes*

pulzoskupina	število podtipov (št. izolatov)	serotipi (št. izolatov)	št. živalskih izolatov	št. živilskih izolatov	št. izolatov iz naravnega okolja	št. izolatov iz klavnic	št. humanih izolatov
A	16 (26)	4b (24), 1/2b (2)	8	7	3	3	5
B	9 (25)	1/2a (25)	6	17	1	1	0
C	10 (18)	1/2a (18)	0	11	1	3	3
D	11 (15)	4b (13), 1/2a (1), 1/2b (1)	4	0	6	1	4
E	6 (13)	1/2a (12), 4b (1)	1	1	1	9	1
F	11 (12)	1/2a (12)	0	10	1	0	1
G	3 (11)	1/2a (11)	9	2	0	0	0
H	5 (7)	1/2b (7)	0	4	0	1	2
I	2 (5)	1/2a (5)	0	3	1	1	0
J	4 (5)	1/2c (4), 1/2a (1)	0	2	0	0	3
K	2 (5)	1/2a (5)	0	4	0	1	0
L	5 (5)	1/2a (4), 1/2b (1)	0	0	2	1	2
M	3 (3)	1/2a (3)	0	3	0	0	0
N	3 (3)	1/2a (1), 1/2b (2)	1	0	2	0	0
O	2 (3)	4b (3)	0	1	0	1	1
P	2 (2)	1/2a (2)	0	0	2	0	0
Q	2 (2)	1/2a (2)	1	0	0	0	1
R	2 (2)	1/2a (2)	0	0	0	2	0
S	2 (2)	1/2a (2)	1	1	0	0	0
T	2 (2)	1/2a (2)	0	0	1	0	1
U	2 (2)	1/2a (2)	0	2	0	0	0
V	2 (2)	1/2a (2)	0	0	0	0	2
W	2 (2)	1/2b (2)	2	0	0	0	0
X	1 (2)	1/2a (2)	1	0	1	0	0
Y	1 (2)	1/2a (2)	0	0	0	0	2
Izolati brez pulzoskupine	9 (9)	1/2a (4), 1/2b (2), 4b (3)	2	2	3	2	0

5 RAZPRAVA

V zadnjih petnajstih letih je postala listerioza ena izmed najbolj aktualnih, s hrano povezanih okužb ter velik problem zdravstvenih organov in živilske industrije. Okužba sicer ni pogosta, vendar je bolezen lahko izjemno huda in smrtnost visoka. Prav zaradi tega *L. monocytogenes* obravnavamo kot zelo resno patogeno bakterijo in enega izmed najpomembnejših vzrokov smrti, povezanih z okužbo s kontaminirano hrano v industrializiranih državah (Vazquez-Boland in sod., 2001; Painter in Slutsker, 2007).

V preteklosti so izvedli že več študij karakterizacije *L. monocytogenes* iz različnih okolij, največkrat je šlo za humane in živilske izolate (Grif in sod., 2006; Lukinmaa in sod., 2003a; Okwumabua in sod. 2005). Le redko pa so bili v take študije vključeni tudi živalski izolati ter izolati iz predelovalne industrije in naravnega okolja. In prav karakterizacija izolatov iz različnih tipov okolij je pomembna za razumevanje raznolikosti med tipi in podtipi sevov *L. monocytogenes*. Taki podatki so namreč ključnega pomena pri interpretaciji tipov in podtipov izolatov *L. monocytogenes* med preiskavami izbruhov listerioze ali prizadevanj nadzora okužb s to bakterijo.

Uporaba konvencionalnih serotipizacijskih metod v epidemiološke namene je razmeroma majhna, saj lahko večino sevov, ki jih povezujemo s humano listeriozo, uvrstimo v tri serološke skupine 1/2a, 1/2b in 4b (McLauchlin in sod., 2004). Ti podatki nam pri ugotavljanju poti širjenja okužb pri izbruhih listerioze in spremjanju raznolikosti sevov *L. monocytogenes* v različnih okoljih ne pomagajo veliko. V epidemioloških študijah uporabljam serotipizacijo predvsem za določanje prevalence specifičnega serološkega tipa. Ker s serotipizacijo tudi ne moremo neposredno določiti vrste listerije, je ne moremo uporabljati za identifikacijo bakterije *L. monocytogenes* (van Belkum in sod., 2007).

Pri pojasnjevanju poti prenosa patogenega mikroorganizma, še posebej v primerih s sumom epidemiološke povezave, je smiselno uporabiti molekularne tipizacijske metode, saj omogočajo boljše razlikovanje med podtipi *L. monocytogenes*, kot konvencionalne tipizacijske metode. PFGE je tako postala široko uporabljana metoda za karakterizacijo izolatov *L. monocytogenes* in trenutno velja za zlati standard (Graves in Swaminathan, 2001) za subtipizacijo *L. monocytogenes*, saj ima veliko moč diskriminacije in je zato zelo uporabna predvsem pri epidemioloških študijah (Zelenik in sod., 2013).

V naši raziskavi s pomočjo klasične serotipizacije nismo uspeli determinirati večje raznolikosti med 185 izolati *L. monocytogenes*, saj smo med vsemi izolati odkrili le štiri serološke tipe: 1/2a (64,3 %), 4b (23,8 %), 1/2b (10,3 %) in 1/2c (1,6 %) (preglednici 31 in 32). Večina izolatov je pripadala serotipoma 1/2a in serotipu 4b. Prav ta dva serotipa pa sta poleg serotipa 1/2b ugotovljena pri večini sporadičnih primerov in izbruhov listerioze po svetu (Gianfranceschi in sod., 2009). Serotipe 1/2a, 1/2b in 4b smo odkrili pri izolatih izoliranih iz vseh petih okolij. Serotip 1/2c pa je bil prisoten le pri izolatih iz živilskih in humanih vzorcev.

V vseh okoljih je bilo največ izolatov serotipa 1/2a (preglednici 31 in 32). Predvsem pa se je njegovo prevladovanje med izolati opazilo pri vzorcih iz klavnic ter živalskih in živilskih vzorcih. Pri izolatih izoliranih iz kliničnih vzorcev humanega izvora ter iz vzorcev naravnega okolja pa je bilo število izolatov serotipov 1/2a in 4b bolj izenačeno, vseeno pa je prevladoval serotip 1/2a. V številnih novejših študijah (Lukinmaa in sod., 2003b; Pak in sod., 2002; Loncarevic in sod., 1998) so opazili, da se pri humanih kliničnih vzorcih vse pogosteje pojavlja serotip 1/2a in, da le ta počasi zamenjuje serotip 4b. Razlog za to je lahko dejstvo, da postaja sepsa pogostejša klinična oblika listerioze kot meningoencefalitis. Iz krvi pa pogosteje izoliramo serotipa 1/2a in 1/2b kot 4b (Swaminathan in sod., 2007; Gianfranceschi in sod., 2009).

V naši raziskavi je pri vseh serotipiziranih izolatih *L. monocytogenes* prišlo do ujemanja seroloških tipov ugotovljenih s klasično serotipizacijsko metodo in z metodo serotipizacije z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Z izvedbo klasične serotipizacije nismo imeli nobenih težav, čeprav je znano, da je metoda dokaj subjektivna in da so v preteklosti ugotovili, da lahko pride med laboratoriji do številnih razlik v rezultatih (Schijnenberg in sod., 1996). V našem primeru je torej klasična serotipizacijska metoda primerljiva z molekularno serotipizacijsko metodo verižne reakcije s polimerazo. Glede na to, da je metoda PCR bistveno hitrejša in hkrati tudi bolj objektivna kot metoda klasične serotipizacije, bi lahko ta počasi zamenjala klasično metodo.

Subtipizacijska metoda PFGE omogoča bistveno bolj občutljivo razlikovanje med posameznimi izolati *L. monocytogenes*. Prav zato smo jo uporabili poleg serotipizacije, saj smo tako lahko ugotovili večjo raznolikost, porazdelitev in ekološko pripadnost bakterije *L. monocytogenes* v različnih okoljih.

Rezultate smo analizirali tudi s pomočjo računalniškega programa BioNumerics, ki omogoča medsebojno primerjavo pulzotipov in izdelavo dendrogramov. Naš kriterij za razvrščanje izolatov v podtipe je bila 80 % skladnost med pulzotipi. Po kriterijih, ki jih je leta 1995 opisal Tenover s sodelavci, razlika v enem pasu restrikcijskega vzorca pomeni tesno povezanost izolatov. Po novejših priporočilih (Barrett in sod., 2006; Felix in sod., 2012) pa je razlika v enem pasu dovolj za razlikovanje med izolati. Pri vseh naših izolatih je bila narejena restrikcija z dvema endonukleazama (*AscI* in *Apal*). V programu BioNumerics pa je bila primerjava med izolati narejena le na podlagi encima *Apal*.

Prevladajoče pulzoskupine in podtipe smo našli pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz različnih okolij (preglednica 32). V nekaterih večjih pulzoskupinah so izolati, ki so kazali homologijo v serološkem tipu in podtipu, izhajali iz različnih okolij (priloga B). To se je pokazalo že v nekaterih prejšnjih študijah (Gray M. J. in sod., 2004; Saunders in sod., 2004), kjer so ugotovili, da izolati *L. monocytogenes*, ki izhajajo iz različnih virov, predstavljajo posebno, a hkrati prekrivajočo populacijo.

Nekatere pulzoskupine so bile dokaj homogene glede prevladajočega serotipa in vrste okolja. V pulzoskupini A, ki je vključevala največje število izolatov (26) in 16 podtipov, so bili

prisotni izolati *L. monocytogenes* izolirani iz vzorcev tkiva živali (8), živil (7), naravnega okolja (3), klavnic (3) in človeškega tkiva (5). Prevlaudovali so izolati iz tkiv živali in iz živil. Vsi izolati niso pripadali enakemu serološkemu tipu. Serotipu 4b je pripadal 24 izolatov, 2 pa sta pripadala serotipu 1/2b.

V pulzoskupini **B**, ki je vključevala 25 izolatov, so bili zajeti izolati iz vseh okolij, z izjemo humanih izolatov. Vsi izolati so imeli enak serotip (1/2a). Prevlaudovali pa so živalski (6) in živilski (17) izolati.

Pulzoskupina **C** je vključevala 18 izolatov, od tega pa jih je kar 11 izhajalo iz vzorcev živil. Tudi tu so imeli vsi izolati enak serotip (1/2a).

Pulzoskupina **D** je edina, kjer so bili vključeni izolati kar treh različnih seroloških tipov. Večina (13) izolatov je sicer pripadala serotipu 4b, po en izolat pa je pripadal serotipu 1/2a in 1/2b. Pulzoskupina je vključevala izolate iz vseh okolij razen živil.

Pulzoskupine **E**, **F** in **G** so vključevale po 13, 12 in 11 izolatov in v vsaki so močno prevlaudovali izolati iz enega okolja. V pulzoskupini E so bili izolati *L. monocytogenes* iz klavnic, v primeru pulzoskupine F izolati iz živil, v pulzoskupini G pa izolati iz živalskega tkiva.

V nekaterih študijah (Gilbreth in sod., 2005; Nadon in sod., 2001) so ugotovili, da je na podlagi PFGE izolate mogoče razvrstiti v filogenetske linije oz. skupine. V filogenetsko skupino I so uvrstili izolate s serotipi 1/2b, 3b, 4b, 4d in 4e, v filogenetsko skupino II pa izolate s serotipi 1/2a, 1/2c in 3a. Redko pa so prisotni izolati 4a in 4c, ki sodijo v filogenetsko skupino III. Z našo raziskavo tega sicer nismo uspeli pokazali. Razlog za to pa je bil, da je bila naša raziskava drugače zastavljena. Nismo namreč načrtno vzorčili in zato so bili naši vzorci zelo razpršeni, poleg tega smo vključili vzorce iz petih različnih okolijih, za razliko od ostalih študij.

Omeniti še velja, da smo v naši raziskavi za PFGE uporabljali restrikcijske encime *ApaI* treh različnih proizvajalcev. Na začetku dela smo uporabljali restrikcijski encim *ApaI* proizvajalca Roche Diagnostics (Mannheim, Nemčija). Ta ima založno koncentracijo 40U/µl in optimalno inkubacijsko temperaturo restrikcije 30 °C. Uporaba tega encima je priporočena s strani EURL (European Union Reference Laboratory) in z njegovo uporabo smo dobili zadovoljive rezultate oziroma dobro ločljivost podtipov. Nato smo uporabljali restrikcijski encim *ApaI* proizvajalca Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, ZDA, kupljenega pod nekdanjo zaščitno znamko Fermentas, Vilna, Litva) z založno koncentracijo 10U/µl in optimalno inkubacijsko temperaturo restrikcije 37 °C. Tudi ob uporabi encima tega proizvajalca je bila kvaliteta podtipov zadovoljiva, vendar je bil volumen porabe encima za pripravo restrikcijske mešanice bistveno višji od encima *ApaI* proizvajalca Roche Diagnostics, saj je bila njegova založna koncentracija manjša. Uporaba večje količine encima ima dve slabosti. V shranjevalnem pufru encimov je prisoten glicerol in večja poraba encimske raztopine vodi do večje koncentracije glicerola v restrikcijski mešanici, kar ima lahko za posledico slabe rezultate restrikcije. Poleg tega so zaradi večje porabe encima potrebne tudi večje zaloge tega v laboratoriju. Zaradi tega smo se odločili za restrikcijo uporabiti encim *ApaI* proizvajalca New England Biolabs (Ipswich, MA, ZDA), z založno koncentracijo 50 U/µl in optimalno inkubacijsko temperaturo restrikcije 25 °C. Presenečeno smo ugotovili, da je bila kvaliteta

podtipov slaba. Kvaliteta podtipov se je bistveno izboljšala, če smo po restrikciji, restriktijsko mešanico odstranili in jo zamenjali z enako količino TE pufra ter inkubirali čez noč v hladilniku (pri temperaturi 4 °C) in nato elektroforezo izvedli šele naslednji dan. Uporaba restriktijskih encimov različnih proizvajalcev ima torej vpliv na kvaliteto *Apal* podtipov *L. monocytogenes*, kot smo že opisali v literaturi (Kušar in sod., 2013).

Iz analize dendrograma PFGE (priloga B in preglednica 32) sicer težko sklepamo o bistvenih povezavah med podtipi *L. monocytogenes* iz različnih okolij. V nedavnih primerih listerioze pri živalih in ljudeh v Sloveniji pa smo z metodo PFGE lahko potrdili ali ovrgli identičnost povzročitelja, kar potrjuje našo hipotezo, da bodo imele uporabljeni tipizacijske metode zadostno moč razlikovanja za določitev različnih podtipov, ki se pojavljajo v okolju. Problem se pojavi le v primerih, ko so izolati zelo podobni (vendar ne enaki) in je interpretacija odvisna od kriterijev, ki jih določimo za razlikovanje med izolati.

Na podlagi subtipizacije s PFGE smo ugotovili veliko raznolikost izolatov, ki pa so bili le v posameznih primerih značilni za določeno vrsto vzorca, zato hipoteze, da bodo podtipi, ki jih najpogosteje odkrijemo v živilih identični s tistimi, ki najpogosteje povzročajo klinična obolenja pri ljudeh, nismo mogli v celoti potrditi. Verjetno je razlog tudi v tem, da so bili številni izolati *L. monocytogenes* krajevno in časovno zelo oddaljeni, pri številnih pa so nam manjkali tudi ključni epidemiološki podatki. Zaradi tega je bilo s pomočjo metode PFGE zelo težko najti podobnost in povezave med posameznimi podtipi. Za potrditev te hipoteze bi bila potrebna skrbno načrtovana epidemiološka študija, ki bi zajela vse tipe vzorcev v določenem časovnem obdobju.

V analizo smo vključili tudi sedem izolatov *L. monocytogenes* iz surovega mleka (priloga B). Kljub temu, da so bili izolati istega izvora, so se uvrstili v dve pulzoskupini, znotraj vsake pa so imeli izolati identičen restriktijski vzorec. V pulzoskupino B smo poleg izolatov iz surovega mleka uvrstili še sedem izolatov *L. monocytogenes* iz mleka krav ene izmed slovenskih kmetij. Štirje izmed teh izolatov so imeli enak restriktijski vzorec kot izolati iz surovega mleka, z ostalimi tremi pa je bila sorodnost 96,8 %. Zaradi tega obstaja velika verjetnost, da je izvor vseh vzorcev mleka enak. Vsi izolati so imeli tudi enak serotip (1/2a).

Med živilske izolate smo vključili tudi izolate, pri katerih smo predvidevali, da bodo imeli enak oz. zelo podoben restriktijski vzorec (priloga B). Takih je bilo osem vzorcev, kjer je šlo za mesni pripravek istega proizvajalca. Ugotovili smo, da so se vsi izolati uvrstili v isto pulzoskupino (B), vendar pa med seboj niso bili popolnoma identični. Pet izolatov je imelo enak restriktijski vzorec, in le ta se je v 96,8 % ujemal še z izolatom iz mešanega mletega mesa. Obstaja možnost, da je tudi mešano meso izviralo od istega proizvajalca. Ostali trije so imeli enak restriktijski vzorec kot izolat iz tkiva bezgavk srne. Slednje je nekoliko nenavadno, saj nismo našli nobene povezave med izolati. Analizirali smo tudi dva izolata (L173, L193) iz mesnih pripravkov istega proizvajalca, ki nista imela identičnih restriktijskih vzorcev, a sta se uvrstila v isto pulzoskupino (F). Vsi izolati pa so imeli enak serotip (1/2a).

5.1 EPIDEMIOLOŠKE POVEZAVE KLINIČNIH IZOLATOV

Z metodo PFGE ugotavljam sorodnost med posameznimi izolati bakterij. V primerih, ko so vzorci zelo časovno in prostorsko razpršeni pa težko najdemo kakšno povezavo. Metodo je zato najbolje uporabiti v primeru izbruhov ali epidemij, saj tako najlažje spremljamo širjenje okužb in neposredno povezavo med izolati. Leta 2013 je prišlo na eni izmed slovenskih kmetij do več primerov pojava listerioze pri živalih, od katerih jih je nekaj tudi poginilo. Zbolelo je več koz in ovac. Poleg vzorcev različnih živalskih tkiv so bili odvzeti tudi vzorci naravnega okolja, med drugim tudi voda iz domačega zajetja in silaža. Kar 11 vzorcev je bilo pozitivnih na *L. monocytogenes*. Vsi izolati *L. monocytogenes* so pripadali serotipu 1/2a in uvrstili smo jih v svojo pulzoskupino G (preglednica 32 in priloga B). Izmed enajstih izolatov jih je imelo osem enak restriktijski vzorec, restriktijski vzorci ostalih treh izolatov pa so se le malo razlikovali. Podobnost med njimi je bila 95,2 % oz. 97,7 %.

V poletnih mesecih 2013 so v Sloveniji za listeriozo zboleli tudi trije ljudje. Zaradi tega je bila izvedena epidemiološka preiskava, v kateri so sodelovali tudi delavci medicinske in veterinarske stroke. Med drugim je bilo izvedeno tudi poizvedovanje v zvezi z zgodovino prehrane okuženih ljudi. Na prisotnost *L. monocytogenes* je bilo testiranih nekaj izdelkov živil iz trgovin, kjer so bolniki kupovali hrano. Prisotnost listerij je bila ugotovljena v enem izmed mesnih izdelkov, ki ga sicer noben izmed bolnikov ni kupil, a ugotovljeno je bilo, da so v isti trgovini kupovali različne narezane salame. *L. monocytogenes* je bila izolirana tudi iz brisov površin. S pomočjo metode PFGE smo lahko ugotovili, da so nekateri izolati *L. monocytogenes* povezani (priloga B). Vsi izolati *L. monocytogenes* so pripadali serotipu 1/2a. Uvrstili pa smo jih v dve pulzoskupini (Q in C). V pulzoskupino C smo uvrstili kar sedem od skupaj osmih izolatov. Ugotovili smo, da imata dva humana izolata (L595, L596) enak restriktijski vzorec, ki se le v manjši meri razlikuje od izolatov iz živil (L590, L591) in brisov salamoreznic (L592, L593). Podobnost med obema genetskima skupinama je bila 96,2 %. V primerih, kjer je podobnost zelo velika, je odločitev o tem, ali gre za isti tip zelo težka in je odvisna od merit, ki jih določimo za interpretacijo. Po kriterijih, ki jih je opisal Tenover s sod. (1995), razlika v enim pasu restriktijskega vzorca pomeni tesno povezanost izolatov. Po novejših priporočilih (Barrett in sod., 2006; Felix in sod., 2012) pa je razlika v enim pasu dovolj za razlikovanje med izolati. Tretji humani izolat (L594) se je uvrstil v drugo pulzoskupino (Q).

V analizo je bil vključen tudi izolat *L. monocytogenes* (L491) iz gnojnih sprememb na koži veterinarja, ki so se razvile po tem, ko je ta pomagal pri porodu mrtvorojenega telička. *L. monocytogenes* pa je bila izolirana tudi iz posteljice krave (102/07). Izolata smo s pomočjo PFGE uvrstili v pulzoskupino A (preglednica 32 in priloga B). Izolata imata enak serološki tip (4b), med restriktijskima vzorcema pa obstaja 99,3 % podobnost. Zanimivo pa je, da se restriktijski vzorec izolata iz sprememb na koži ujema z restriktijskim vzorcem iz možganskega tkiva goveda (L230) in vzorcem izolata *L. monocytogenes* iz potoka Globovnica (L365). Restriktijski vzorec izolata iz abortiranega plodu goveda pa se ujema z restriktijskimi vzorci več različnih izolatov: možganskega tkiva koze (L199, L210), možganskega tkiva ovce (L202, L209), zaseke (L270) in hemokulture človeka (L509). Kot že

zgoraj omenjeno je podobnost med obema genetskima skupinama 99,3 % (Zelenik in sod., 2013).

Iz dendrograma (priloga B) in preglednice 32 je razvidno tudi, da je bila pri naših izolatih prisotna zelo velika raznolikost, saj je večina pulzoskupin (17) zelo majhnih in vsebujejo pet ali manj izolatov. Veliko (9) je tudi izolatov, ki jih nismo uspeli uvrstiti v nobeno izmed pulzoskupin. Za bolj homologne rezultate bi morali vzorčiti bolj načrtno. Problem pa predstavlja tudi pomanjkljivi podatki o izolatih. Pri izolatih *L. monocytogenes* iz humanih kliničnih in patoloških vzorcev nas je omejevala anonimnost pacientov, saj kar za 9 od 28 izolatov nismo poznali mesta odvzema vzorca oziroma njegovega porekla. Poleg tega o bolnikih ne poznamo nobenih drugih informacij, npr: kraj bivanja, spol in predispozicijske dejavnike tveganja za okužbo. Ne vemo tudi, če so morda imeli stik z okuženo živaljo.

V klavnicih je bila večina izolatov *L. monocytogenes* izoliranih iz vzorcev zraka. Zanimivo bi bilo istočasno vzorčiti še brise določenih površin in primerjati izolirane tipe listerij. Pri izolatih *L. monocytogenes* iz naravnega okolja imamo največ podatkov, vendar tudi ti niso vedno popolni. Poleg tega so bili nekateri vzorci odvzeti iz mest, v bližini katerih ni kmetij in zato težko iščemo povezavo med izolati iz naravnega okolja in iz živali. Pri izolatih iz kliničnih in patoloških vzorcev živali so nam manjkali predvsem podatki o lokaciji obolelih živali. Smiselno bi bilo na isti kmetiji odvzeti še vzorce zemlje, vode in gnoja in iskatи morebitno povezanost med izolati. Pri vzorcih živil pa so nam manjkali predvsem podatki o proizvajalcu živila in pri vzorcih mesnih izdelkov tudi morebitna povezava s klavnicami.

Poleg pomanjkljivih podatkov o vzorcih, ne smemo zanemariti tudi dejstva, da so bili izolati zbrani v časovnem razponu več let. Zaradi tega je tudi težje najti povezave med izolati *L. monocytogenes*.

Za boljši pregled stanja bi bilo potrebno izvesti študijo, kjer bi izbirali vzorce le v določenem časovnem obdobju in bi tudi načrtno in čim bolj podrobno zbirali podatke o poreklu vzorca in lokaciji vzorčenja. Glavni problem tega pa je, da so take študije zelo drage in zahtevne za izvedbo. Poleg tega pa je v Sloveniji letno zelo malo primerov listerioze pri ljudeh in pri živalih, zato bi verjetno pridobili zelo malo kliničnih izolatov *L. monocytogenes*.

6 SKLEPI

- Vse uporabljene tipizacijske metode imajo zadostno moč razlikovanja za določitev različnih podtipov, ki se pojavljajo v posameznih okoljih.
- Za serotipizacijo *L. monocytogenes* lahko uporabimo tako klasično metodo s pomočjo komercialnih antiserumov, kot tudi metodo verižne reakcije s polimerazo, saj sta metodi primerljivi.
- Metoda PCR je hitrejša in bolj objektivna, zato bi lahko nadomestila klasično metodo, serotipizacije *L. monocytogenes*.
- Metoda pulzne gelske elektroforeze (PFGE) ima visoko ločljivost in ponovljivost, zato je ključna za epidemiološko spremeljanje *L. monocytogenes*.
- Uporaba metode PFGE ob izbruhih listerioze je zelo uspešna, saj omogoča ugotovitev vira kontaminacije oz. okužbe in spremeljanja poti širjenja okužbe.
- Tipi *L. monocytogenes*, ki jih najpogosteje odkrijemo v živilih niso vedno identični tistim, ki povzročajo obolenja pri ljudeh.
- Pri izolatih *L. monocytogenes*, ki so krajevno in časovno zelo razpršeni, je s pomočjo metode PFGE zelo težko najti podobnost in povezave med posameznimi podtipi.
- Za boljši pregled stanja bi bilo potrebno izvesti študijo z bolj načrtnim vzorčenjem z ožjem časovnim in krajevnim razponom.

7 POVZETEK

V zadnjih petnajstih letih je postala listerioza ena izmed najbolj aktualnih, s hrano povezanih okužb ter velik problem zdravstvenih organov in živilske industrije. Listerioza je oportunistična okužba. Za okužbo so bolj dovezni predvsem starejši od 65 let, nosečnice, še nerojeni otroci, novorojenčki, ljudje po transplantaciji in ljudje, ki prebolevajo kakšno drugo bolezen. Okužba sicer ni pogosta, vendar je bolezen lahko izjemno huda in smrtnost visoka. Prav zaradi tega *Listeria monocytogenes* obravnavamo kot zelo resno patogeno bakterijo in enega izmed najpomembnejših vzrokov smrti, povezanih z okužbo s kontaminirano hrano v industrializiranih državah.

Za pomoč pri ugotavljanju širjenja okužb uporabljamo različne metode tipizacije bakterijskih sevov. Hitro in učinkovito razlikovanje med sorodnimi bakterijskimi izolati je namreč izjemnega pomena za epidemiološki nadzor nalezljivih bolezni. V času epidemije je hitro ukrepanje nujno, s pomočjo tipizacije pa lahko identificiramo epidemiološko povezane izolate ter določimo rezervoar in poti širjenja okužbe.

V naši raziskavi smo uporabili genotipizacijske metode (verižna reakcija s polimerazo, ang. polymerase chain reaction - PCR in pulzna gelska elektroforeza, ang. pulsed-field gel electrophoresis - PFGE) skupaj s klasičnimi metodami serotipizacije za določitev genskega profila, ki je bil osnova za analizo poti in načinov prenosa *L. monocytogenes*. Skupno smo analizirali 185 izolatov, ki smo jih izolirali iz petih različnih okolij: živali, živil, naravnega okolja, klavnic in ljudi.

Za serotipizacijo listerij smo uporabili klasično metodo s pomočjo komercialnih antiserumov in molekularno metodo PCR. Ugotovili smo, da sta metodi med sabo dobro primerljivi, saj je pri vseh serotipiziranih izolatih *L. monocytogenes* prišlo do ujemanja seroloških tipov ugotovljenih s klasično serotipizacijsko metodo in z metodo tipizacije s PCR, vendar pa je metoda PCR bistveno hitrejša in bolj objektivna od klasične serotipizacije. Prav zaradi tega bi lahko ta počasi zamenjala klasično metodo. Za vsak vzorec smo izvedli dva različna PCR pomnoževanja, z enim smo dobili šest produktov, z drugim pa enega, za interpretacijo rezultatov sta pomembna oba.

Glavni problem serotipizacijskih metod pa je njihova omejena vrednost za epidemiološko poizvedovanje. Večina humanih kliničnih in živilskih sevov vrste *L. monocytogenes* namreč sodi v 4 serološke tipe 1/2a, 1/2b, 1/2c in 4b. Prav zaradi tega nam serološke metode dajo preveč ohlapne podatke za iskanje poti širjenja okužb. To smo ugotovili tudi v naši raziskavi. S pomočjo serotipizacije namreč nismo uspeli determinirati večje raznolikosti med 185 izolati *L. monocytogenes*, saj smo med vsemi izolati odkrili le štiri najpogostejše serološke tipe: 1/2a (64,3%), 4b (23,8%), 1/2b (10,3%) in 1/2c (1,6%).

Kot epidemiološko orodje je zato bistveno boljša metoda PFGE. Je ena izmed najbolj ponovljivih molekularnih tipizacijskih metod z visoko ločljivostjo med posameznimi izolati, zato jo uporabljamo tudi za subtipizacijo listerij. Z njenom pomočjo namreč lahko ocenimo

razlike oz. spremembe v genomih bakterijskih izolatov in tako določimo njihovo medsebojno podobnost oziroma sorodnost. Prav to pa je ključno pri odkrivanju vira izbruha in poti širjenja okužbe pri pojavu epidemij. Rezultate, ki smo jih pridobili z metodo PFGE smo analizirali s pomočjo računalniškega programa BioNumerics; primerjava med izolati je narejena le na podlagi encima *Apal*. Program omogoča izdelavo dendrogramov, na podlagi katerih smo izolate *L. monocytogenes* razvrstili v preglednico. Naš kriterij za razvrščanje izolatov v podtipe je bila 80 % skladnost med pulzotipi. Večino živalskih izolatov *L. monocytogenes* smo uvrstili v pulzoskupine A, B in G, večino živilskih izolatov v pulzoskupine B, C in F, večino izolatov iz naravnega okolja v pulzoskupino D, večino izolatov iz klavnic v pulzoskupino E in večino humanih izolatov v pulzoskupine A, C, D in J.

Z metodo PFGE smo uspeli potrditi hipotezo, da bodo imele naše uporabljeni tipizacijske metode zadostno moč razlikovanja za določitev različnih podtipov, ki se pojavljajo v okolju. Problem se je pojavil le v primerih, ko so izolati zelo podobni (vendar ne enaki) in je bila interpretacija odvisna od kriterijev, ki smo jih določili za razlikovanje med izolati. S pomočjo PFGE smo ugotovili veliko raznolikost izolatov, ki pa so bili le v posameznih primerih značilni za določeno vrsto vzorca, zato hipoteze, da bodo podtipi, ki jih najpogosteje odkrijemo v živilih identični s tistimi, ki najpogosteje povzročajo klinična obolenja pri ljudeh, nismo mogli v celoti potrditi. Verjetno je razlog tudi v tem, da so bili številni izolati *L. monocytogenes* krajevno in časovno zelo oddaljeni, pri številnih pa so nam manjkali tudi ključni epidemiološki podatki. Zaradi tega je bilo s pomočjo metode PFGE zelo težko najti podobnost in povezave med posameznimi podtipi. Za potrditev te hipoteze bi bila potrebna skrbno načrtovana epidemiološka študija, ki bi zajela vse tipe vzorcev v določenem časovnem obdobju.

Za boljši pregled stanja bi bilo potrebno izvesti načrtno študijo, kjer bi izbirali vzorce le v določenem časovnem obdobju in bi tudi čim bolj podrobno zbirali podatke o poreklu vzorca in lokaciji vzorčenja.

8 VIRI

- Al-Ghazali M. R., Al-Azawi S. K. 1988. Effects of sewage treatment on the removal of *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Bacteriology, 65: 203-208
- Audits International/FDA. 1999. U.S. food temperature evaluation: Design and summary pages. Maryland, Audits International U.S. Food and Drug Administration: 13 str.
http://foodrisk.org/default/assets/File/Audits-FDA_temp_study.pdf (maj, 2013)
- Barrett T. J., Gerner-Smidt P., Swaminathan B. 2006. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. Foodborne Pathogens and Disease, 3: 20-31
- Borucki M. K., Call D. R. 2003. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 41, 12: 5537-5540
- Botzler R. G., Cowan A. B., Wetzler T. F. 1974. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil and water. Journal of Wildlife Diseases, 10: 204-212
- Brown T. A. 2010. Gene cloning and DNA analysis: an introduction. 6th ed. West Sussex, Wiley-Blackwell: 320 str.
- Burfoot D., Reavell S., Tuck C., Wilkinson D. 2003. Generation and dispersion of droplets from cleaning equipment used in the chilled food industry. Journal of Food Engineering, 58: 343–353
- Carriere C., Allardet-Servent A., Bourg G., Audurier A., Ramuz M. 1991. DNA polymorphism in strains of *Listeria monocytogenes*. Journal of Clinical Microbiology, 29: 1351-1355
- CDC. 2013. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes*. Atlanta, PulseNet ZDA, Centers for disease control and prevention: 11 str.
<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf> (avgust 2013)
- Chasseignaux E., Géralt P., Toquin M. T., Salvat G., Colin P., Ermel G. 2002. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. FEMS Microbiology Letters, 210: 271-275
- Colburn K. G., Kaysner C. A., Abeyta Jr C., Wekell M. M. 1990. *Listeria* species in a California coast estuarine environment. Applied and Environmental Microbiology, 56: 2007-2011
- D'Agostino M., Wagner M., Vazquez-Boland J. A., Kuchta T., Karpiskova R., Hoorfar J., Novella S., Scortti M., Ellison J., Murray A., Fernandes I., Kuhn M., Pazlarova J.,

- Heuvelink A., Cook N. 2004. A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model - Towards an international standard - DTU Orbit. Journal of Food Protection, 67, 8: 1646-1655
- De Luca G., Zanetti F., Fateh-Moghadm P., Stampi S. 1998. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in sewage sludge. Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin, 201: 269-277
- den Bakker H. C., Cummings C. A., Ferreira V., Vatta P., Orsi R. H., Degoricija L., Barker M., Petruskene O., Furtado M. R., Wiedmann M. 2010. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. BioMedCentral Genomics, 11: 688, doi:10.1186/1471-2164-11-688: 20 str.
- Dijkstra R. G. 1982. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents and canals of a sewage treatment plant. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Serie B, 176: 202-205
- Djordjevic D., Wiedmann M., McLandsborough L. A. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology, 68, 6: 2950-2958
- Dobeic M., Kenda E., Mićunović J., Zdovc I. 2011. Airborne *Listeria* spp. in the red meat processing industry. Czech Journal of Food Sciences, 29, 4: 441-447
- Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 42, 8: 3819-3822
- EFSA. 2008. Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness, Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. EFSA Journal, 6, 1: 599, doi: 10.2903/j.efsa.2008.599: 42 str.
- EFSA. 2012. The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA Journal, 10, 3: 2597, doi: 10.2903/j.efsa.2012.2597: 442 str.
- Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2012. 2013. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 107 str.
http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=attName.png&_5_MediaId=7727&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3. (januar 2014)

Farber J. M., Peterkin P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiological Reviews, 55, 3: 476-511

Félix B., Brisabois A., Dao T. T., Lombard B., Asséré A., Roussel S. 2012. The use of pulsed field gel electrophoresis in *Listeria monocytogenes* sub-typing: harmonization at the European Union level. V: Gel electrophoresis: Principles and basics. Sameh M. (ed.). Rijeka, InTech: 241-254

Fenlon D. R., Wilson J., Donachie W. 1996. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. Journal of Applied Bacteriology. 81: 641-650.

Freitag N. E., Port G. C., Miner M. D. 2009. *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. Nature Reviews Microbiology, 7, 9: 623-8, doi: 10.1038/nrmicro2171: 15 str.

Garrec N., Picard-Bonnaud F., Pourcher A. M. 2003. Occurrence of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: Effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 35: 275-283

Gasanov U., Hughes D., Hansbro P. M. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiology Reviews, 29: 851-875

Gerner-Smidt P., Hise K., Kincaid J., Hunter S., Rolando S., Hyattia-Trees E., Ribot E.M., Swaminathan B. 2006. PulseNet USA: a five-year update. Foodborne Pathogens and Disease, 3: 9-19

Geuenich H. H., Muller H. E. 1984. Isolation and germ count of *Listeria monocytogenes* in raw and biologically treated waste water. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Serie B, 179: 266-273

Gianfranceschi M. V., D'Ottavio M. C., Gattuso A., Bella A., Aureli P. 2009. Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002–2005). Food Microbiology, 26: 520-526

Gilbreth S. E., Call J. E., Wallace F. M., Scott V. N., Chen Y., Luchansky J. B. 2005. Relatedness of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from selected ready-to-eat foods and listeriosis patients in the United States. Applied and Environmental Microbiology, 71, 12: 8115–8122

Graves L. M., Helsel L. O., Steigerwalt A. G., Morey R. E., Daneshvar M. I., Roof S. E., Orsi R. H., Fortes E. D., Milillo S. R., den Bakker H. C., Wiedmann M., Swaminathan B.,

- Saunders B. D. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 60: 1280-1288
- Graves L. B., Swaminathan B. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. International Journal of Food Microbiology, 65: 55–62
- Gray M. L., Singh C., Thorp F. 1956. Abortion and pre- or post-natal death of young due to *Listeria monocytogenes*. III. Studies in ruminants. American Journal of Veterinary Research, 17: 510-516
- Gray M. J., Zadoks R. N., Fortes E. D., Dogan B., Cai S., Chen Y., Scott V. N., Gombas D. E., Boor K. J., Wiedmann M. 2004. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. Applied and Environmental Microbiology, 70: 5833–5841
- Grif K., Heller I., Wagner M., Dierich M., Wurzner R. 2006. A comparison of *Listeria monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin in Austria by automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. Foodborne Pathogens and Disease, 3: 138–141
- Griffiths M. W. 2003. Listeria properties and occurrence. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 6. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 3562–3573
- Hoelzer K., Pouillot R., Dennis S. 2012. Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned. Veterinary Research, 43, 8: 1-27
- Hof H. 2003. History and epidemiology of listeriosis. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 35: 199-202
- Hunter S.B., Vauterin P., Lambert-Fair M.A., Van Duyne M.S., Kubota K., Graves L., Wrigley D., Barrett T., Ribot E. 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. Journal of Clinical Microbiology 43, 1045-1050
- Huss H. H., Jørgensen L. V., Vogel B. F. 2000. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. International Journal of Food Microbiology, 62: 267-274
- ILSI research foundation. 2005. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis - A risk-based approach. Journal of Food Protection, 68, 9: 1932-1994

Interpretive summary: Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. 2003. Washington, Center for Food Safety and Applied Nutrition/FDA: 27 str.
<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM197329.pdf> (junij 2013)

ISO 11290-2:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method. 1998: 28 str.

Ivanek R., Gröhn Y. T., Wiedmann M. 2006. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: Review of available data for mathematical modeling. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3, 4: 319-336

Jacquet C., Gouin E., Jeannel D., Cossart P., Rocourt J. 2002. Expression of ActA, Ami, InlB, and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2: 616-622

Jadhav S., Bhave M., Palombo A. 2012. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 88: 327–341

Jeyaletchumi P., Tunung R., Margaret S. P., Son R., Farinazleen M. G., Cheah Y. K. 2010. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Food Research Journal*, 17: 1-11

Jinneman K. C., Wekell M. M., Eklund M. V. 2007. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in fish and seafood. V: *Listeria, listeriosis and food safety*. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.). 3rd ed. Boca Raton, CRC Press: 617-654

Kabuki D. Y., Kuaye A. Y., Wiedmann M., Boor K. J. 2004. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-style fresh cheese processing plants. *Journal of Dairy Science*, 87: 2803-2812

Kalmokoff M. L., Austin J. W., Wan X. D., Sanders G., Banerjee S., Farber J. M. 2001. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 725-734

Kérouanton A., Marault M., Petit L., Grout J., Dao T. T., Brisabois A. 2010. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods*, 80: 134-137

Khelef N., Lecuit M., Buchrieser C., Cabanes D., Dussurget O., Cossart P. 2006. *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. V: *The Prokaryotes: A handbook on the biology*

of bacteria: Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer Science Business Media: 404-476

Kocks C., Gouin E., Tabouret M., Berche P., Ohayon H., Cossart P. 1992. *Listeria monocytogenes* -induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell*, 68: 521–531

Kornacki J. L., Gurtler J. B. 2007. Incidence and control of *Listeria* in food processing facilities. V: *Listeria, listeriosis and food safety*. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.). 3rd ed. Boca Raton, CRC Press: 681-766

Kuhn M., Goebel W. 2007. Molecular virulence determinants of *Listeria monocytogenes* V: *Listeria, listeriosis and food safety*. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.) 3rd ed. Boca Raton, CRC Press: 111-155

Kušar D., Kavalič M., Ocepek M., Zdovc I. 2013. Report on overcoming the poor quality of *Apal* pulsotypes with a short review on PFGE for *Listeria monocytogenes*. Polish Journal of Microbiology, 62, 3: 307-309

Leclercq A., Clermont D., Bizet C., Grimont P. A. D., Le Flèche-Matéos A., Roche S. M., Buchrieser C., Cadet-Daniel V., Le Monnier A., Lecuit M., Allerberger F. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 60: 2210-2214

Lado B. H., Yousef A. E. 2007. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. V: *Listeria, listeriosis and food safety*. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.). 3rd ed. Boca Raton, CRC Press: 305-356

Lahuerta A., Westrell T., Takkinen J., Boelaert F., Rizzi V., Helwigh B., Borck B., Korsgaard H., Ammon A., Mäkelä P. 2011. Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics - the EFSA-ECDC summary report 2009. Euro Surveillance, 16, 13: 1-4

Lamont R. F., Sobel J., Mazaki-Tovi S., Kusanovic H. P., Vaisbuch E., Kim S. K., Uldbjerg N., Romero R. 2011. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. Journal of Perinatal Medicine, 39, 3: 227–236

Liu D., Lawrence M. L., Ainsworth A. J., Austin F. J. 2007. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. International Journal of Food Microbiology, 118: 101–115

Loncarevic S., Tham W., Danielsson-Tham M. L. 1998. Changes in serogroup distribution among *Listeria monocytogenes* human isolates in Sweden. V: Proceedings of XIII

international symposium on problems of listeriosis. Halifax, Nova Scotia, Canada June 28-July 21. 1998: 20-20

Lukinmaa S., Aarnisalo K., Suihko M. L., Siitonen A. 2003a. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed field gel electrophoresis. Clinical Microbiology and Infection, 10: 562–568

Lukinmaa S., Miettinen M., Nakari U. M., Korkeala H., Siitonen A. 2003b. *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections: variation of sero- and genotypes during an 11-year period in Finland. Journal of Clinical Microbiology, 41: 1694–1700

MacGowan A. P., Bowker K., McLauchlin J., Bennett P. M., Reeves D. S. 1994. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human feces, sewage and soil from urban sources. International Journal of Food Microbiology, 21: 325-334.

Madigan M. T., Martinko J. M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. San Francisco, Pearson Benjamin Cummings: 378-379

McCollum J. T., Cronquist A. B., Silk B. J., Jackson K. A., O'Connor K. A., Cosgrove S., Gossack J. P., Parachini S. S., Jain N. S., Ettestad P., Ibraheem M., Cantu V., Joshi M., DuVernoy T., Fogg N. W. Jr, Gorny J. R., Mogen K. M., Spires C., Teitel P., Joseph L. A., Tarr C. L., Imanishi M., Neil K. P., Tauxe R. V., Mahon B. E. 2013. Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. New England Journal of Medicine, 369: 944-953

McLauchlin J., Mitchell R. T., Smerdon W. J., Jewell K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. International Journal of Food Microbiology, 92: 15-33

Mook P., O'Brien S. J., Gillespie I. A. 2011. Concurrent conditions and human listeriosis, England and Wales, 1999–2009. Emerging Infectious Diseases, 17: 38-43

Moors M. A., Levitt B., Youngman P., Portnoy D. A. 1999. Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. Infection and Immunity, 67: 131–139

Müller-Premru M. 2002. Nesporogeni po gramu pozitivni bacili. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihn A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 260-263

- Nadon C.A., Woodward D.L., Young C., Rodgers F.G., Wiedmann M. 2001. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 7: 2704–2707
- Nicholson F. A., Groves S. J., Chambers B. J. 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, 96: 135–143
- Nightingale K., Bovell L., Grajczyk A., Wiedmann M. 2007. Combined *sigB* allelic typing and multiplex PCR provide improved discriminatory power and reliability for *Listeria monocytogenes* molecular serotyping. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 52-59
- Nightingale K. K., Windham K., Wiedmann M. 2005. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *Journal of Bacteriology*, 187, 16: 5537-5551
- Norton D. M. in Braden C. R. 2007. Foodborne listeriosis. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.). 3rd ed. Boca Raton, CRC Press: 305-356
- Okwumabua O., O'Connor M., Shull E., Strelow K., Hamacher M., Kurzynski T., Warshauer D. 2005. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from food animal clinical cases: PFGE pattern similarity to strains from human listeriosis cases. *FEMS Microbiology Letters*, 249: 275–281
- Ooi S. T., Lorber B. 2005. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases*, 40: 1327–1332
- Orsi R. H., den Bakker H. C., Wiedmann M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301: 79-96
- Painter J., Slutsker L. 2007. Listeriosis in humans. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.). 3rd ed. Boca Raton. CRC Press: 85-110
- Pak S.I., Spahr U., Jemmi T., Salman M. D. 2002. Risk factors for *Listeria monocytogenes*: contamination of dairy products in Switzerland, 1990–1999. *Preventive Veterinary Medicine*, 53: 55–65
- Pandiripalli V. K. , Westbrook D. G., Sunki G. R., Bhunia A. K. 1999. Surface protein p104 is involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to human intestinal cell line, Caco-2. *Journal of Medical Microbiology*, 48: 117-124
- Poljak M. 2007. Molekularno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 129-142

Poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2010. 2011. Ljubljana,
Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava RS: 79 str.

Pritchard T. J., Flanders K. J., Donnelly C. W. 1995. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. International Journal of Food Microbiology, 26: 375-384

QIAxcel® DNA handbook. 2013. 4th ed. Hilden, Germany, QIAGEN: 56 str.

<http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=f6158498-a857-4a2f-b40b-569fba3793e2>

Quinn P. J., Markey B. K., Leonard F. C., Hartigan P., Fanning S., Fitz Patrick E. S. 2011. Pathogenic bacteria. V: Microbiology and microbial disease. Sayers M. (eds.). 2nd ed. West Sussex, Wiley-Blackwell: 179-411

Ramaswamy V., Cresence V. M., Rejitha J. S., Lekshmi M. U., Dharsana K. S., Prasad S. P., Vijila H. M. 2007. Listeria - review of epidemiology and pathogenesis. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 40: 4-13

Rapley R. 2010. Molecular biology, bioinformatics and basic techniques. V: Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. Wilson K. Walker J. (eds.). 7th ed. New York, Cambridge University Press: 138-194

Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary. 2004. Microbiological risk assessment series. Switzerland, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization: 78 str.

<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra4.pdf?ua=1> (junij 2013)

Sauders B. D., Mangione K., Vincent C., Schermerhon J., Farchione C. M., Dumas N. B., Bopp D., Kornstein L., Fortes E. D., Windham K., Wiemann M. 2004. Distribution of *Listeria monocytogenes* molecular subtypes among human and food isolates from New York State shows persistence of human disease-associated *Listeria monocytogenes* strains in retail environments. Journal of Food Protection, 67: 1417–1428

Sauders B. D. in Wiedmann M. 2007. Ecology of *Listeria* Species and *L. monocytogenes* in the natural environment. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.). 3rd ed. Boca Raton, CRC Press: 21-54

Schijnberg A., Bannerman E., Courtieuc A. L., Kissd E., McLauchlin J., Shah S., Wilhelms D. 1996. Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 32: 279-287

- Schuppler M., Loessner M. J. 2010. The opportunistic pathogen *Listeria monocytogenes*: pathogenicity and interaction with the mucosal immune system. International Journal of Inflammation, 2010, doi: 10.4061/2010/704321: 13 str.
- Schmitt-Kopplin P. 2008. Capillary electrophoresis: Methods and protocols V: Methods in molecular biology. Walker J. M. (eds.). Neuherberg, Humana Press: 415-428
- Singh A., Goering R.V., Simjee S., Foley S. L., Zervos M. J. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clinical Microbiology Reviews, 19, 3: 512-530
- Sleator R. D., Gahan C. G. M., Hill C. 2003. A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 69: 1-9
- Smith G. A., Marquis H., Jones S., Johnston N. C., Portnoy D. A., Goldfine H. 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. Infection and Immunity, 63: 4231–4237
- Smith K. A., Brewer A. J., Dauven A., Wilson D. W. 2001. A survey of the production and use of animal manures in England and Wales. III. Cattle manures. Soil Use and Management, 17: 77-87
- Swaminathan B., Gerner-Smidt P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection, 9: 1236–1243
- Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. Journal of Clinical Microbiology, 33: 2233-2239
- Tompkin R. B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. Journal of Food Protection, 65, 4: 709-725
- van Belkum A., Tassios P. T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N. K., Fussing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S., Struelens M. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 13, 3: 1-46
- Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical Microbiology Reviews, 14, 3: 584–640
- Walker J. K., Morgan J. H. 1993. Ovine ophthalmitis associated with *Listeria monocytogenes*. Veterinary Record, 132: 636, doi: 10.1136/vr.132.25.636: 7 str.

- Watkins J., Sleath K. P. 1981. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. *Journal of Applied Bacteriology*, 50: 1-9
- Wehland J., Carl U. D. 1998. The sophisticated survival strategies of the pathogen *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Microbiology*, 1: 11-18
- Wesley I. V. 2007. Listeriosis in animals. V: *Listeria, listeriosis and food safety*. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.). 3rd ed. Boca Raton, CRC Press: 55-84
- Wiedmann M., Czajka J., Bsat N., Bodis M., Smith M. C., Divers T. J., Batt C. A. 1994. Diagnosis and epidemiological association of *Listeria monocytogenes* strains in two outbreaks of listerial encephalitis in small ruminants. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 991-996
- Zdovc I., Mijovič, A., Ocepek M., Pate M., Krt B. 2004. Ugotavljanje bakterije *Listeria monocytogenes* v odprtih vodah. V: Preventiva pred širjenjem zoonoz in drugih nalezljivih bolezni v okolju: zbornik referatov 2. interdisciplinarnega simpozija DDD, zdravje in okolje z mednarodno udeležbo. Berger, T., Dobeic M., Vudrag M. (ur.). Ljubljana, Slovenska veterinarska zveza, Sekcija za DDD in higieno okolja, Zavod za zdravstveno varstvo, Slovensko društvo za bolnišnično higieno: 23-28
- Zelenik K., Avbersek J., Pate M., Lusicky M., Krt B., Ocepek M., Zdovc I. 2013. Cutaneous listeriosis in a veterinarian with the evidence of zoonotic transmission – A case report. *Zoonoses and Public Health*: doi: 10.1111/zph.12075: 10 str. (v tisku)
- Zhang G., Ma L., Oyarzabal O., Doyle M. P. 2007. Aerosol studies with *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 70, 8: 1857-1865

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Katji Seme in somentorici doc. dr. Ireni Zdovc za vodenje, nasvete in pomoč pri nastajanju moje magistrske naloge. Iskrena hvala tudi prof. dr. Evi Ružić Sabljić za natančno in strokovno recenzijo.

Zahvalila bi se tudi vsem na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete, ki ste mi pomagali pri izdelavi magistrske naloge, še posebej pa Darji Kušar, Alenki Usenik in Petri Bandelj.

Posebno se zahvaljujem mojim staršem, za vso pomoč in podporo med študijem.

PRILOGE

Priloga A 1: Rezultati klasične serološke tipizacije in tipizacije s PCR pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz živali

oznaka vzorca	vrsta vzorca	serološka skupina po klasični serotipizaciji	serološka skupina po serotipizaciji s PCR
L 276	možgansko tkivo goveda	1/2b	IIb
L 312	možgansko tkivo goveda	1/2a	IIa
L 313	možgansko tkivo kozlička	4b	IVb
L 424	možgansko tkivo goveda	1/2a	IIa
L 343	feces krave	1/2b	IIb
L 346	feces telička	1/2b	IIb
L 347	feces krave	1/2a	IIa
L 350	feces krave	1/2a	IIa
L 351	feces krave	4b	IVb
L 353	feces telička	4b	IVb
L 355	feces krave	4b	IVb
L 288	mleko krave	1/2a	IIa
L 289	mleko krave	1/2a	IIa
L 291	mleko krave	1/2a	IIa
L 294	mleko krave	1/2a	IIa
L 295	mleko krave	1/2a	IIa
L 297	mleko krave	1/2a	IIa
L 300	mleko krave	1/2a	IIa
L 230	možgansko tkivo goveda	4b	IVb
L 219	možgansko tkivo koze	1/2b	IVb
L 209	možgansko tkivo ovce	4b	IVb
L 210	možgansko tkivo koze	4b	IVb
L 207	možgansko tkivo ovce	1/2a	IIa
L 202	možgansko tkivo ovce	4b	IVb
L 199	možgansko tkivo koze	4b	IVb
L 200	možgansko tkivo ovce	1/2a	IIa
L 122	tkivo bezgavk srne	1/2a	IIa
L 123	možgansko tkivo koze	1/2b	IIb
L 124	možgansko tkivo ovce	4b	IVb
L 125	možgansko tkivo goveda	4b	IVb
L 577	možgansko tkivo ovce	1/2a	IIa
L 578	možgansko tkivo koze	1/2a	IIa
L 579	jetrno tkivo kozlička	1/2a	IIa
L 580	rektalni bris koze	1/2a	IIa
L 581	rektalni bris koze	1/2a	IIa

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A 1: Rezultati klasične serološke tipizacije in tipizacije s PCR pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz živali

oznaka vzorca	vrsta vzorca	serološka skupina po klasični serotipizaciji	serološka skupina po serotipizaciji s PCR
L 582	rektalni bris koze	1/2a	IIa
L 587	možgansko tkivo ovce	1/2a	IIa
L 588	možgansko tkivo ovce	1/2a	IIa
L 585	feces krave	1/2a	IIa
102/07	abortiran plod goveda	4b	ni bil narejen

Priloga A 2: Rezultati klasične serološke tipizacije in tipizacije s PCR pri izolatih *L. monocytogenes*, izoliranih iz živil

oznaka vzorca	vrsta vzorca	serološka skupina po klasični serotipizaciji	serološka skupina po serotipizaciji s PCR
L 249	zaseka	1/2a	IIa
L 250	zaseka	1/2a	IIa
L 251	zaseka	1/2b	IIb
L 252	marinirani losos	1/2a	IIa
L 262	zaseka	1/2a	IIa
L 264	losos	1/2a	IIa
L 265	losos	1/2a	IIa
L 266	losos	1/2a	IIa
L 267	meso piščanca	1/2a	IIa
L 268	losos	1/2a	IIa
L 269	losos	1/2a	IIa
L 270	zaseka	4b	IVb
L 271	losos	1/2a	IIa
L 272	zaseka	1/2a	IIa
L 273	zaseka	4b	IVb
L 274	suha salama	1/2a	IIa
L 278	losos	1/2a	IIa
L 279	surovo mleko isti izvor	1/2a	IIa
L 280	surovo mleko isti izvor	1/2a	IIa
L 281	surovo mleko isti izvor	1/2a	IIa
L 282	surovo mleko isti izvor	1/2a	IIa
L 283	surovo mleko isti izvor	1/2a	IIa
L 284	surovo mleko isti izvor	1/2a	IIa
L 285	surovo mleko isti izvor	1/2a	IIa
L 286	kuhane bele kozice	1/2a	IIa
L 287	tatarski biftek	1/2c	IIc

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A 2: Rezultati klasične serološke tipizacije in tipizacije s PCR pri izolatih *L. monocytogenes*, izoliranih iz živil

oznaka vzorca	vrsta vzorca	serološka skupina po klasični serotipizaciji	serološka skupina po serotipizaciji s PCR
L 302	zaseka	4b	IVb
L 303	zaseka	4b	IVb
L 304	zaseka	4b	IVb
L 305	dimljeni losos	1/2a	IIa
L 306	dimljeni losos	1/2a	IIa
L 307	losos	4b	IVb
L 308	pašteta	1/2a	IIa
L 309	losos	1/2a	IIa
L 310	pašteta	1/2a	IIa
L 311	losos	1/2a	IIa
L 419	mleko	4b	IVb
L 421	meso piščanca	1/2c	1/2c
L 236	losos	1/2a	IIa
L 234	losos	1/2a	IIa
L 231	losos	1/2a	IIa
L 235	mesni izdelek riba	1/2b	IIb
L 221	mesni izdelek riba	1/2a	IIa
L 195	mesni pripravek, proizv. A	1/2a	IIa
L 194	mesni pripravek, proizv. A	1/2a	IIa
L 193	mesni pripravek, proizv. B	1/2a	IIa
L 192	mesni pripravek, proizv. A	1/2a	IIa
L 187	mesni pripravek, proizv. A	1/2a	IIa
L 186	mesni pripravek, proizv. A	1/2a	IIa
L 185	mesni pripravek, proizv. A	1/2a	IIa
L 180	mesni pripravek, proizv. A	1/2a	IIa
L 179	suho mesni izdelek	1/2a	IIa
L 174	mesni pripravek, proizv. A	1/2a	IIa
L 173	mesni pripravek, proizv. B	1/2a	IIa
L 168	prekajena polsuha klobasa	1/2a	IIa
L 377	mešano mleto meso	1/2a	IIa
L 378	začinjeno mleto meso	1/2a	IIa
L 389	meso iz tunke	1/2b	IIb
L 399	mešanica zmrznjene zelenjave	1/2a	IIa
L 400	meso iz tunke	1/2b	IIb
L 401	zaseka	1/2b	IIb
L 405	živilo	4b	IVb
L 590	mesni izdelek svinjski vrat	1/2a	IIa
L 591	mesni izdelek svinjski vrat	1/2a	IIa

Priloga A 3: Rezultati klasične serološke tipizacije in tipizacije s PCR pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz naravnega okolja

oznaka vzorca	vrsta vzorca	serološka skupina po klasični serotipizaciji	serološka skupina po serotipizaciji s PCR
L 324	gnoj	1/2a	IIa
L 365	površinska voda	4b	IVb
L 366	površinska voda	1/2b	IIb
L 426	gnoj	1/2a	IIa
L 428	krma prah	1/2a	IIa
L 439	gnoj	1/2a	IIa
L 441	gnoj	1/2a	IIa
L 444	gnoj	4b	IVb
L 456	gnoj	1/2a	II a
L 446	gnoj	1/2b	IIb
L 448	zemlja	4b	IVb
L 449	zemlja	4b	IVb
L 452	gnoj	4b	IVb
L 455	silaža	4b	IVb
L 536	površinska voda	4b	IVb
L 537	površinska voda	1/2a	IIa
L 538	površinska voda	1/2a	IIa
L 539	površinska voda	1/2a	IIa
L 540	površinska voda	4b	IVb
L 541	površinska voda	4b	IVb
L 542	površinska voda	1/2a	IIa
L 543	površinska voda	1/2a	IIa
L 544	površinska voda	1/2a	IIa
L 545	površinska voda	1/2a	IIa
L 546	površinska voda	1/2b	IIb
L 583	voda iz zajetja	1/2a	IIa
L 586	silaža	1/2a	IIa

Priloga A 4: Rezultati klasične serološke tipizacije in tipizacije s PCR pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz klavnic

oznaka vzorca	vrsta vzorca	serološka skupina po klasični serotipizaciji	serološka skupina po serotipizaciji s PCR
L 41	bris klavnice	1/2a	IIa
L 42	bris klavnice	4b	IVb
L 43	bris klavnice	4b	IVb
L 44	bris klavnice	4b	IVb
L 45	bris klavnice	4b	IVb
L 46	bris klavnice	4b	IVb
L 47	bris klavnice	1/2b	IIb
L 48	bris klavnice	1/2b	IIb
L 203	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 214	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 227	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 228	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 237	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 238	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 240	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 241	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 243	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 244	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 245	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 246	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 247	zrak v klavnici	1/2a	IIa
L 395	satelit za piščance	1/2a	IIa
L 397	bazen za kri	1/2a	IIa
L 592	bris salamoreznice	1/2a	IIa
L 593	bris salamoreznice	1/2a	IIa
L 398	filetirka	4b	IVb

Priloga A 5: Rezultati klasične serološke tipizacije in tipizacije s PCR pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz ljudi

oznaka vzorca	vrsta vzorca	serološka skupina po klasični serotipizaciji	serološka skupina po serotipizaciji s PCR
L 368	človeški izolat	4b	IVb
L 369	hemokultura	1/2a	IIa
L 370	hemokultura	4b	IVb
L 371	človeški izolat	4b	IVb
L 383	likvor	1/2a	IIa
L 384	hemokultura	1/2a	IIa
L 388	hemokultura	1/2a	IIa
L 403	hemokultura	1/2c	IIc
L 404	človeški izolat	4b	IVb
L 491	bris kože	4b	IVb
L 495	človeški izolat	1/2b	IIb
L 496	hemokultura	4b	IVb
L 497	človeški izolat	1/2a	IIa
L 498	človeški izolat	1/2c	IIc
L 500	človeški izolat	1/2a	IIa
L 501	hemokultura	1/2a	IIa
L 502	hemokultura	1/2b	IIb
L 503	hemokultura	1/2a	IIa
L 504	človeški izolat	4b	IVb
L 505	človeški izolat	4b	IVb
L 506	hemokultura	1/2a	IIa
L 507	hemokultura	1/2a	IIa
L 508	hemokultura	1/2b	IIb
L 594	abdominalni punktat	1/2a	IIa
L 595	hemokultura	1/2a	IIa
L 596	plevralni punktat	1/2a	IIa
L 597	hemokultura	1/2a	IIa
L 509	hemokultura	4b	IVb

Priloga A 6: Shema PFGE profilov pridobljenih z restrikcijo izolatov *L. monocytogenes* z encimom *Apal*

