

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**ADAPTACE KE STRESU U PATOGENNÍ
BAKTERIE *Listeria monocytogenes***

Michal Černý

Vedoucí práce: **RNDr. Ivo Konopásek, CSc.**
Katedra genetiky a mikrobiologie
Přírodovědecká fakulta UK

České Budějovice 2008

Černý, M., 2008: Adaptace ke stresu u patogenní bakterie *Listeria monocytogenes*. [Adaptation to the stress in pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes*]. Bachelor Thesis, in Czech. 32 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: The aim of this study is to describe mechanisms of adaptation *Listeria monocytogenes* to adverse conditions. These conditions are: low temperature, acid conditions, bile, osmotic stress and antibiotics. Understanding of these mechanisms is important for flawless processing of food and for protection against listeriosis.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30.4.2008

.....

Michal Černý

Na tomto místě bych rád poděkoval RNDr. Ivu Konopáskovi za pomoc při psaní této bakalářské práce. Děkuji také své rodině a všem, kteří se mnou a mým studiem mají ještě trpělivost.

Děkuji

Obsah:

1.	Úvod	1
2.	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
3.	Adaptace ke stresům	2
3.1.	Přežívání v nízkých teplotách.....	2
3.1.1.	Změny membránové fluidity	3
3.1.2.	Role osmolytů v toleranci k nízkým teplotám.....	4
3.1.3.	Indukce proteinů při nízkých teplotách	6
3.2.	Mechanismy tolerance kyselých stresů	7
3.2.1.	Adaptace k nízkému pH (ATR).....	7
3.3.2.	Indukce proteinů v nízkém pH	9
3.3.3.	GAD systém	9
3.3.4.	F ₁ F ₀ -ATPáza	10
3.3.	Rezistence ke žluči	11
3.3.1.	Efekt žluči a žlučových kyselin	11
3.3.2.	Geny v toleranci ke žluči	14
3.3.3.	Protein BSH	14
3.3.4.	BilE systém	15
3.3.5.	Kolonizace žlučníku	15
3.4.	Osmotolerance.....	16
3.4.1.	Akumulace osmolytů	16
3.4.2.	Indukce proteinů v důsledku osmotického stresu.....	17
3.5.	Rezistence k antibiotikům	18
3.5.1.	Listerióza a její projevy	18
3.5.2.	Rezistence k antibiotikům	20
4.	Statistická hodnocení výskytu listeriózy v ČR	22
5.	Závěr	25
6.	Seznam použité literatury	28

1. Úvod

Všudypřítomná bakterie *Listeria monocytogenes* se na přelomu roku 2006 a 2007 začala objevovat především na titulních stránkách českých periodik. V tomto období došlo ke zvýšenému výskytu listerióz a v médiích přibývalo informací nejen o této nemoci a bakterii, ale především o narůstajícím počtu nemocných a zemřelých. U mnoha obyvatel pak tyto zprávy vyvolaly zbytečnou paniku - nebezpečnost této bakterie je totiž u zdravých jedinců minimální. Zvláštností *Listeria monocytogenes* je především schopnost přežívat a růst v širokém rozpětí nepříznivých podmínek. Tato vlastnost napomáhá rozšíření bakterie do potravin, popřípadě i do celého organismu. Na cestě od kolonizace potravin ke vzniku infekce se *Listeria monocytogenes* setkává s velkým počtem stresů. Mechanismy adaptace k těm nejzásadnějším jsou popsány v této práci. Jednotlivé kapitoly jsou uspořádány do pořadí, v jakém jsou jednotlivé stresy, se kterými se patogen cestou trávicím traktem setkává. Výjimkou je kapitola první, ve které popisují adaptaci k nízkým teplotám, tedy k prostředí, ve kterém se *Listeria monocytogenes* nachází často před transportem lidským organismem. Pochopení těchto systémů je nesmírně důležité, neboť se dá využít při výrobě, skladování a zpracovávání potravin. Tato práce by dále měla identifikovat prostředí, které je pro tohoto patogena nejméně příznivé, a také odpovědět na otázku, jaké nebezpečí hrozí zdravému člověku při konzumaci kontaminovaných potravin.

2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je malá, grampozitivní, tyčinkovitá bakterie s malým obsahem G+C (36-42%), kterou lze objevit v široké paletě míst. Můžeme ji nalézt např. v půdě, hnilých rostlinách, vodě, mléku, krmivu zvířat a potravinách člověka. Tyto bakterie mohou také kolonizovat inertní povrchy a vytvářet biofilmy (Roberts and Wiedman, 2003). *Listeria monocytogenes* je fakultativně anaerobní bakterie, netvoří pouzdra ani spory. Při teplotách okolo 20°C tvoří bičíky a stává se pohyblivou. (Khelef et al., 2006). Pro její růst jsou potřebné cukry, aminokyseliny (cystein, glutamin, isoleucin, leucin a valin) a vitamíny (biotin, riboflavin a thiamin) (Seelinger and Jones, 1986). Železo a ostatní aminokyseliny (arginin, histidin, methionin a tryptofan) stimulují růst bakterie.

Listeria monocytogenes je fakultativním intracelulárním patogenem. Vyvinula si spoustu virulentních faktorů, které využívá k důležitým buněčným procesům během infekce. Jsou jimi například adaptace k prostředí lidského těla během transportu organismem, syntéza listeriolyzinu při lýze fagozómu, či schopnost použít aktin lyzovaného fagozómu k vlastnímu transportu hostitelkou buňkou. (Cossart et al., 2003). Bakterie vyvolává nemoc listeriózu, o které se vědci dlouho domnívali, že je přenosná ze zvířat na člověka. Až v 80. letech 20. století bylo zjištěno, že se jedná o nemoc alimentární, způsobenou kontaminovanými potravinami. Izolace listerie a identifikace z klinického materiálu nebývá zvláště obtížná. *Listeria monocytogenes* je na krevním agaru obklopená zónou hemolýzy. Produkuje katalázu, hydrolyzuje eskulin, má pozitivní CAMP test a patří tedy do skupiny B streptokoků. Podle typu tělových O-antigenů a H- antigenů dělíme tuto bakterii do sérotypů. 90% listerióz u člověka je vyvoláno sérotypy 1/2a, 1/2b a 4b (Jančová and Škapová, 2007). Jednou z hlavních vlastností této bakterie je ovšem schopnost přežívat v extrémních podmínkách. Mechanismy adaptace k nízkým teplotám, kyselým prostředím, žluči, zvýšené osmolaritě a antibiotikům jsou popsány v této práci.

3. Adaptace ke stresům

3.1. Přežívání v nízkých teplotách

Chlazení je běžně používanou metodou, jak prodloužit dobu trvanlivosti potravin. *Listeria monocytogenes* dokáže růst v teplotách od 2 do 45°C. Je důležité porozumět mechanismům vedoucím k této schopnosti, abychom mohli vyvinout lepší strategie ochrany před tímto patogenem. *Listeria monocytogenes* dokáže růst až do teploty 45°C, což jí umožňuje být patogenem i teplotokrevných zvířat (Seeliger et al., 1986). Různí autoři prezentovali různé nejnižší teploty, za kterých byla bakterie schopna růstu. U vzorků v kuřecím bujónu byla bakterie schopná přežívat i teploty nižší než 0°C (Walker et al., 1990). Mezi dva nejběžnější typy adaptace k nízkým teplotám patří úprava membránové fluidity díky změnám ve složení membránových mastných kyselin

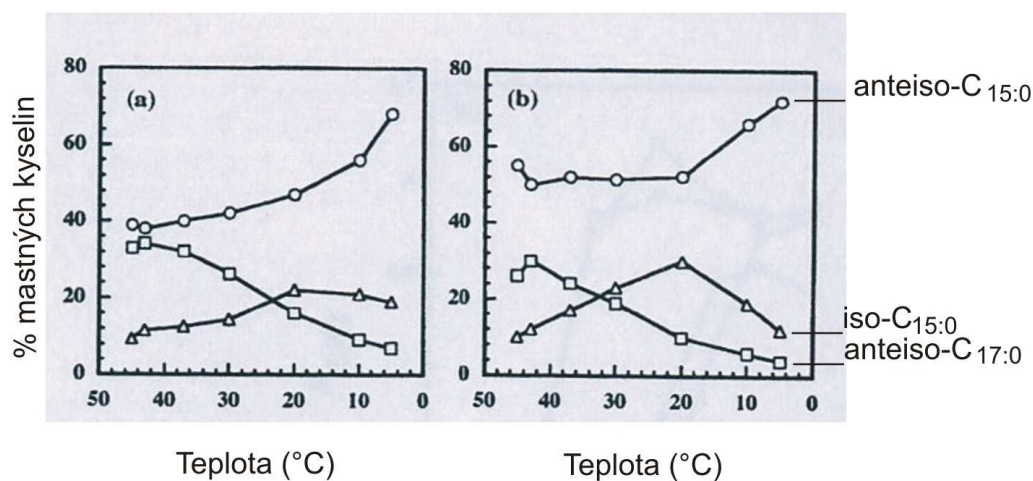
(Annous et al., 1997) a akumulace osmolytů, kterými jsou glycin betain, karnitin a prolin, z prostředí (Beumer et al., 1994). Akumulace osmolytů je běžnou odpovědí na nárůst osmolarity. Při nízkých teplotách je také syntetizováno velké množství nových, chladem indukovaných, proteinů (Bayles et al., 1996).

3.1.1. Změny membránové fluidity

Mastným kyselinám v membráně *Listeria monocytogenes* dominují rozvětvené mastné kyseliny. Hlavními jsou anteiso-C_{15:0}, anteiso-C_{17:0} a iso-C_{15:0} (Annous et al., 1997). Pokud bakterie prodělá chladový šok, potom se fosfolipidy buněčné membrány stanou rigidnějšími a mění tak normální funkci buněčné membrány a proteinů, které jsou s ní spojeny. Při chladové adaptaci modifikuje *Listeria monocytogenes* svou plazmatickou membránu, aby tak udržela její tekutost i při nízkých teplotách (Tasara et al., 2006). Tento proces je nazýván homeoviskózní adaptace (Sinensky, M., 1974). Růst při nízkých teplotách navozuje mnoho adaptací v buněčné membráně. Nízká teplota způsobuje nárůst množství mastných kyselin s lichým počtem uhlíků a rozvětvených mastných kyselin, dále způsobuje zvýšenou syntézu anteiso forem větvení a také zkracování délky rozvětvených mastných kyselin (Annous et al., 1997; Mastronicolis et al., 2005; Mazzotta and Montville, 1997; Püttmann and Hof, 1992). Několik studií použilo pro lepší pochopení změn mutanty, kteří byli senzitivní k nízkým teplotám (Annous et al., 1997, Farber et al., 1991), a mutanty rezistentní k nisinu (Crandall et al., 1998, Vadyvaloo., 2002). Nisin je bakteriocin používaný v potravinářském průmyslu. Působí zejména na grampozitivní bakterie, což je způsobeno dostatečnou propustností buněčné stěny pro nisin. Buněčné membrány mutantů, kteří byli senzitivní k chladu, postrádaly rozvětvené mastné kyseliny, kyseliny s lichým počtem uhlíků i anteiso formy mastných kyselin. Membrány nisin-rezistentních mutantů měly více rovných řetězců a méně větvení.

Annous et al., (1997) studoval efekt růstové teploty na složení mastných kyselin kmenů *Listeria monocytogenes* 10403S a SLCC 53. Při teplotě 5°C byl hlavní změnou velký pokles obsahu anteiso-C_{17:0} a významný nárůst anteiso-C_{15:0} mastných kyselin. Také bylo běžné zkracování mastných kyselin. Při teplotě 5°C vzrostlo množství C_{12:0} a C_{15:0} na úkor C_{16:0} a C_{18:0} mastných kyselin. Změny u tří hlavních mastných kyselin v závislosti na teplotě jsou vidět na grafu č. 1. Při poklesu teploty ze 45°C na 20°C, vzrostlo množství iso-C_{15:0} a množství anteiso-C_{15:0} mastných kyselin se příliš nezměnilo. Nicméně procentuální zastoupení anteiso-C_{15:0} se při poklesu teploty pod

20°C významně zvětšilo a množství iso-C_{15:0} mírně kleslo. Tudíž v teplotním rozmezí od 45°C do 5°C se objevily dva typy změn mastných kyselin. Od 45°C do 20°C to bylo zkracování mastných kyselin, ale od 20°C do 5°C to bylo zkracování následované převažující syntézou anteiso forem mastných kyselin. Zkracování řetězců mastných kyselin snižuje interakce mezi uhlíky sousedních řetězců buněčné membrány, což pomáhá udržovat optimální stupeň tekutosti membrány při růstu v nízkých teplotách (Beales 2004).



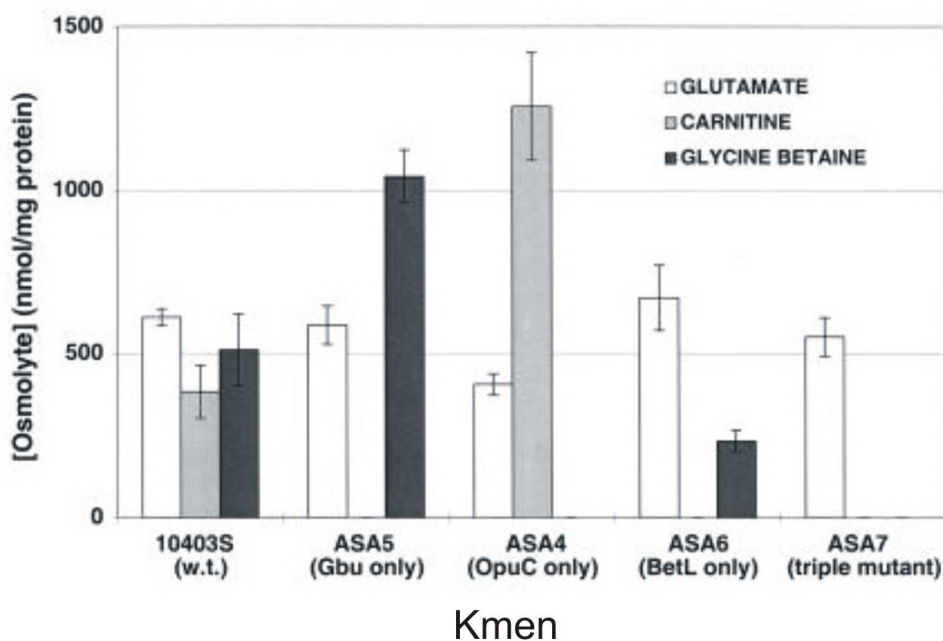
Graf č. 1. Závislost zastoupení jednotlivých mastných kyselin na teplotě u kmenů *Listeria monocytogenes* 10403S (a) a SLCC 53 (b). Převzato z Annous et al., (1997).

3.1.2. Role osmolytů v toleranci k nízkým teplotám

Kromě funkce v osmotoleranci fungují glycin betain a karnitin také jako efektivní kryoprotektanty, které usnadňují růst při nízkých teplotách. Ko and Smith et al., (1994) zaznamenali dvojnásobné zvýšení míry bakteriálního růstu, pokud byla *Listeria monocytogenes* pěstována v definovaném mediu s glycin betainem při teplotě 4°C a redukci doby zdvojení populace v přítomnosti 1mM karnitinu a teploty 7°C z 51 hodin na 38 hodin.

V *Listeria monocytogenes* operují tři systémy transportu kompatibilních osmolytů: transportér glycin betainu I (BetL), transportér glycin betainu II (Gbu) a transportér

karnitinu (OpuC). Transport betainu je za nízkých teplot primárně zprostředkován Gbu. BetL a OpuC mohou sloužit jako méně významné transportní systémy, jejich činnost je zodpovědná za zajištění malého stupně kryotolerance. Karnitin se v buňce za nízkých teplot objevuje primárně díky OpuC a jeho přítomnost vede k velkému stupni kryoprotekce. Slabý transport se děje také pomocí Gbu a BetL. Ten ale uděluje bakterii pouze slabou kryoprotekci (Angelidis and Smith, 2003). Angelidis a Smith (2003) pěstovali pět kmenů *Listeria monocytogenes* v definovaném mediu při 7°C a přítomnosti 0.5mM koncentrace glycin betainu a karnitinu. Studovanými kmeny byly *Listeria monocytogenes* 10403S a z ní odvození mutanti: ASA4, ASA5, ASA6 a ASA7. Kmen ASA4 vlastnil OpuC, ale neměl BetL a Gbu. ASA5 vlastnil pouze Gbu, ASA6 BetL a ASA7 neměl ani jeden z těchto systémů. Akumulace osmolytů včetně glycinu u těchto kmenů je znázorněna v grafu č. 2.



Graf č. 2. Závislost akumulace osmolytů na druhu kmenu *Listeria monocytogenes*. Kmeny pěstovány při teplotě 7°C a 0.5mM glycin betainu a karnitinu. Převzato z Angelidis and Smith (2003).

Wemekamp-Kamphuis et al. (2004) dokázali, že absence těchto transportérů osmolytů, snížila růst *Listeria monocytogenes* v nízkých teplotách.

3.1.3. Indukce proteinů při nízkých teplotách

Jako odpověď na chladový šok jsou ve velkém množství syntetizovány proteiny, které ulehčují tento stres. Bayles et al., (1996) je studovali a rozdělili do dvou skupin. Proteiny produkované jako odpověď na šok z ochlazení nazvali Csps (Cold shock proteins). Proteiny, které vykazovaly zvýšenou syntézu během vyváženého růstu v nízkých teplotách, byly nazvány Caps (Cold acclimation proteins). Když byly kultury *Listeria monocytogenes* 10403S vystaveny šoku ze snížení teploty z 37°C na 10°C, vstoupily před pokračováním růstu do přibližně dvouhodinové lag fáze. Pokud byly kultury vystaveny šoku ze snížení teploty z 37°C na 5°C, byla lag fáze prodloužena a rychlost růstu byla nižší. Při tomto druhém snížení teploty bylo nalezeno 12 Csps, které vykazovali zvýšenou syntézu. Během snižování teploty, byla syntéza většiny buněčných proteinů nižší, než při teplotě 37°C. Při vyváženém růstu v teplotě 5°C byly produkovány 4 Caps. Počet dvanácti Csps byl podobný počtům identifikovaným u jiných bakterií. Identita a funkce většiny z proteinů však zůstává nejasná. Podobné proteiny byly studovány u *E.coli* a *B.subtilis* a zjistilo se, že fungují jako RNA chaperony, antiterminátory transkripce, či aktivátory transkripce (Etchegaray and Inouye, 1999; Graumann et al., 1996; Grauman et al., 1997; Jiang and Inouye, 1997).

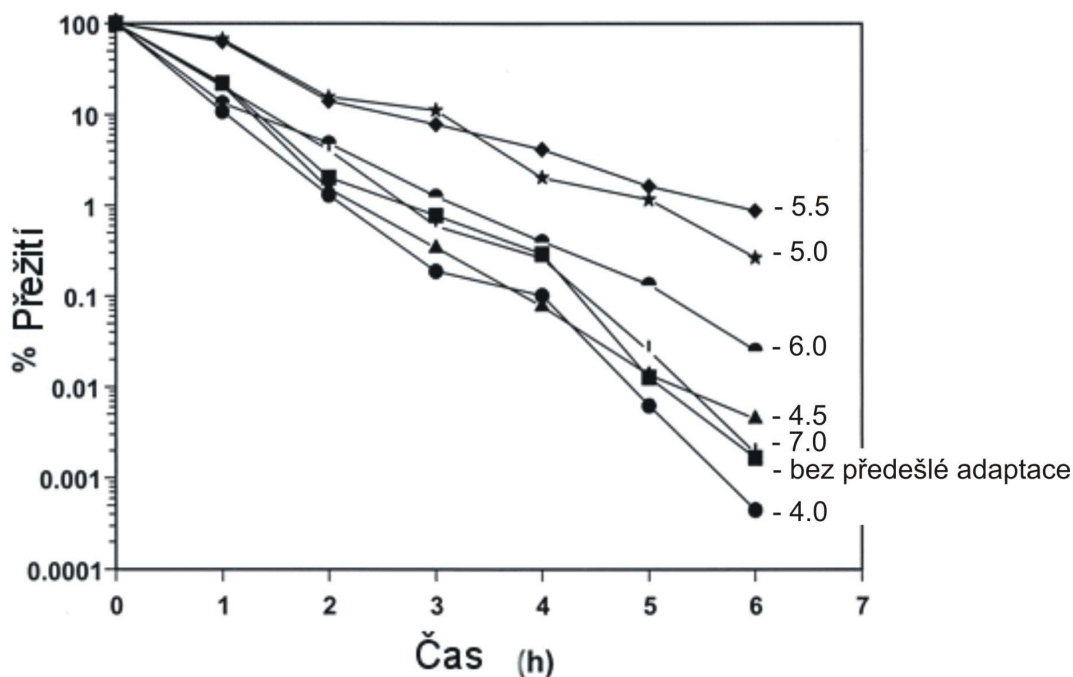
Množství mechanismů, které si *Listeria monocytogenes* osvojila, jasně svědčí o její schopnosti přežít v nízkých teplotách. Tyto vloh je třeba mít na paměti zvláště při konzumaci jídel, které nejsou dále tepelně zpracovávány. Tyto bakterie nepřežívají pasterizační ani sterilizační teploty a bezpečná teplota k jejich likvidaci je 72°C po dobu 10 minut. Nebezpečí nakažení listerií tak hrozí například u měkkých sýrů, zrajících sýrů, uzených ryb a samozřejmě u potravin, které byly sekundárně kontaminovány a nebudou již tepelně upraveny.

3.2. Mechanismy tolerance kyselých stresů

Schopnost bakterie *Listeria monocytogenes* tolerovat nízká pH má mimořádnou důležitost, neboť kyselá prostředí patří mezi nepříznivé podmínky, se kterými se tato bakterie setkává nejčastěji. S nízkým pH se může setkat ať již ve volné přírodě (kyselé deště, hnůj, siláž, krmiva), nebo v systémech, které sama napadá (žaludeční sekrety, vakuoly fagocytů). Potravinoví výrobci používají jako jednu z hlavních bariér, která zabraňuje bakteriálnímu růstu v potravinách, organické kyseliny. *Listeria monocytogenes* však reaguje a přežívá i při nízkých hodnotách pH. K tomu využívá mnoho adaptačních mechanismů.

3.2.1. Adaptace k nízkému pH (ATR, acid tolerance response)

Jednotlivé studie prezentují rozdílná rozmezí hodnot pH, ve kterých je *Listeria monocytogenes* schopna přežít. Nejnižší pH, kterému může listerie odolávat, je závislé na složení média, na druhu bakterie, na jejím fyziologickém stavu a na druhu použité kyseliny. Tolerance ke kyselinám je rovněž závislá na růstové fázi (Phan-Thanh et al., 2000). Phan-Thanh et al., (2000) studovali, v jakém nejnižším pH přežívají dva kmeny *Listeria monocytogenes* (LO28 a EDG). Nejnižší pH limit u druhu LO28 byl 4.0, u druhu EDG pak 3.5. Při těchto hodnotách pozastavily bakterie svůj růst. Hustota buněk byla po několik hodin konstantní. Poté, co byly jednotlivé hodnoty pH dále sníženy pod výše uvedenou hladinu, začaly bakterie umírat. Pokud jsou však bakterie před působením letálního pH vystaveny středně kyselému, neletálnímu stresu (pH 4.8 pro EDG a pH 5.5 pro LO28), jejich rezistence k letálnímu stresu významně vzroste. Tolerance k nízkému pH tedy může být u *Listeria monocytogenes* indukována díky předcházejícímu vystavení tohoto organismu subletálnímu pH (Kroll et al., 1992). Tento fenomén je znám jako ATR (acid tolerance response). Rozsah ATR je závislý na délce adaptace k prvotnímu kyselému prostředí. Maximální tolerance ke kyselinám byla získána po 2-3 hodinové adaptaci (pH 4.8 u EDG a 5.5 u LO28). Prodloužení doby adaptace na 24 hodin vyústilo ve slabší toleranci. Získaná tolerance vydržela u bakterie uchovávané v teplotě 4°C po dobu několika týdnů (Phan-Thanh et al., 2000).



Graf č.3. Závislost doby působení letálního pH 3.5 na procento přeživších buněk. Před působením pH 3.5 byly jednotlivé vzorky vystaveny rozdílným hodnotám pH (hodnoty uvedeny v pravé části grafu u jednotlivých vzorků) při teplotě 30°C po dobu 90min. Převzato z Koutsoumanis et al., (2003)

Schopnost navození ATR je důležitá v mnoha bodech během infekčního cyklu *Listeria monocytogenes* - například při okyselování potravin během jejich zpracování, při transportu bakterie žaludkem, či ve fagozómu makrofágu. Kromě toho, indukce ATR vede ke vzniku rezistencí proti jiným stresům (cross-protection) - proti stresu vyvolanému vysokými teplotami, ethanolem, či proti osmotickému stresu (O'Driscoll et al., 1996), což budí značné znepokojení. Gahan et al., (1996) zkoumali schopnosti přežití *Listeria monocytogenes* v široké paletě kyselých potravinových produktů. Využili k tomu ke kyselinám neadaptovaný kmen, dále pak adaptovaný kmen a mutantní kmen, který byl tolerantní ke kyselinám. Adaptovaný kmen a tolerantní mutant vykazovali lepší schopnosti přežití v přírodním jogurtu a také v domácím sýru. Kmen tolerantní ke kyselinám pak vykazoval lepší přežívání během zrání tvrdých sýrů (čedar). Autoři dále zkoumali přežití těchto kmenů *Listeria monocytogenes* během mléčného kvašení, bakterie *Streptococcus thermophilus*. Adaptované kmeny vykazovaly zvýšenou schopnost přežití ve srovnání s kmeny neadaptovanými. Ke kyselinám tolerantní mutanti během prvních 4 hodin fermentace přežívali podobně jako

ke kyselinám adaptované buňky. Je tedy zřejmé, že navození ATR během zpracování surovin v potravinářském průmyslu zvyšuje schopnost *Listeria monocytogenes* přežít následné acidické stresy, což může mít nebezpečný dopad pro člověka.

3.2.2. Indukce proteinů v nízkém pH

Odpověď bakterie na nízké pH zahrnuje množství změn uvnitř buňky. Phan-Thanh et al., (2000) zkoumali proteiny, které jsou tvořeny, pokud je buňka vystavena kyselému prostředí. Při pH 3.5 a 5.5 bylo indukováno 47, respektive 37 proteinů, z nichž 23 bylo společných pro obě hodnoty pH. Tyto bílkoviny zahrnovaly základní proteiny, u nichž byla zvýšena jejich exprese, a nové proteiny, které nebyly syntetizovány při neutrálním pH. Tyto výsledky naznačují, že se *Listeria monocytogenes*, čelící kyselým podmínkám, brání zvýšenou syntézou proteinů. Mezi nimi byly identifikovány ATP syntáza, thioredoxin reduktáza, alkohol dehydrogenáza, chaperonin, GroEL, či regulátory transkripce. Protein GroEL se taktéž objevuje při růstu *Listeria monocytogenes* v nízkých teplotách (Foster and Hall, 1992).

3.2.3. GAD systém

Listeria monocytogenes je jednou z mála bakterií, o nichž je známo, že vlastní GAD systém (glutamate decarboxylase acid resistance system). Je prokázáno, že tento systém významně přispívá k přežití v nízkém pH (Cotter et al., 2001). GAD systém je složen ze tří genů *gadA*, *gadB* a *gadC*. *GadA* a *gadB* kódují dvě glutamát-dekarboxylázy a *gadC* kóduje antiport glutamát / γ -aminobutyrát. Glutamát prochází antiportem a v cytoplasmě je dekarboxylován. Touto reakcí je glutamát přeměněn na γ -aminobutyrát (GABA). Dekarboxylace má za následek spotřebu intracelulárního protonu. γ -aminobutyrát je pak exportován z buňky opět antiportem. Konečným výsledkem je zvýšení pH cytoplazmy (díky ztrátě protonů) a malý nárůst extracelulárního pH (díky výměně extracelulárního glutamátu za více alkalický GABA). Cotter et al., (2001) studovali roli GAD systému v rezistenci ke kyselinám během tranzitu bakterie žaludkem. Použili uměle připravenou lidskou a prasečí žaludeční šťávu a zjistili, že po přidání glutamátu vzrůstá u nekultivovaného druhu schopnost přežití v žaludečních šťávách. To naznačuje, že přítomnost velkého množství glutamátu v potravinách může zvyšovat toleranci *Listeria monocytogenes* ke kyselým prostředím. Dále byly sledovány výsledky delecí v genech *gadA*, *gadB* a *gadC*. Relativní rezistence ke kyselým prostředím u těchto mutantů pak byla seřazena v pořadí: nekultivovaný druh

> $\Delta gadA$ > $\Delta gadB$ = $\Delta gadC$ > $\Delta gadAB$. Dokazuje to, že funkční GAD systém je u *Listeria monocytogenes* nepostradatelný pro rezistenci ke kyselinám, pro úspěšné překonání nepříznivého prostředí v žaludku a pro následné infikování tenkého střeva (Cotter et al., 2001).

3.2.4. F₁F₀-ATPáza

Nízké pH slabých organických kyselin je pro *Listeria monocytogenes* škodlivější než stejné pH silných anorganických kyselin, např. HCl. Při působení pH 3.8 po dobu 30 minut přeživalo 96% buněk v přítomnosti HCl, v přítomnosti směsi mastných kyselin, které napodobovaly prostředí lidského střeva přeživalo 42% buněk (90mM kyselina octová, 30mM n-máselná kyselina a 37mM propionová kyselina a HCl, které bylo použito pro úpravu pH) a v přítomnosti kyseliny octové přeživalo 31% buněk. Při působení pH 3.8 byly taktéž naměřeny rozdílné hodnoty pH uvnitř cytoplazmy buněk (pH_i). V přítomnosti HCl to bylo pH 4.46, v přítomnosti směsi mastných kyselin 3.75 a 3.58 při působení kyseliny octové. Tyto výsledky potvrzují znalosti o rozdílných způsobech průchodu kyselin buněčnou membránou. Slabé organické kyseliny pronikají do buňky jako nedisociované molekuly skrz permeázy. Jakmile jsou uvnitř buňky disociovány, nemohou difundovat ven a snižují tak intracelulární pH_i až k dramatickým hodnotám, čímž narušují metabolismus buňky. Silné minerální kyseliny jsou úplně disociovány na H⁺ a anionty. Buněčné membrány mají velmi nízkou permeabilitu k H⁺. Protony vstupují a vystupují z buňky díky interakcím s buněčnými systémy, které zprostředkují transport H⁺. Tímto systémem je např. F₁F₀-ATPáza (Phan-Thanh et al., 2000).

Mikroorganismy udržují své pH_i díky pH homeostáze, které je dosahováno transportem protonů přes buněčnou membránu. U aerobních organismů je aktivní transport H⁺ do buňky spojen s elektronovým transportem v dýchacím řetězci. Naproti tomu anaerobní bakterie uskutečňují transport H⁺ z buňky přes molekuly H⁺-ATPázy využívaje energie z hydrolýzy ATP. *Listeria monocytogenes* je fakultativně anaerobní bakterie a může tak využít oba procesy (Shabala et al., 2002). F₁F₀-ATPáza je enzym složený z mnoha podjednotek, který slouží jako kanál pro přemístění protonů skrz buněčnou membránu. Část F₁ je katalytickou částí tohoto enzymu a skládá se z 5 podjednotek: α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ . Tyto podjednotky mohou syntetizovat nebo hydrolyzovat ATP. Část F₀ je integrální membránovou jednotkou a skládá se z podjednotek a, b₂ a c₁₀, které fungují jako membránový kanál pro přemístění protonů. Rolí F₁F₀-ATPázy v organismu, který je

schopný oxidativní fosforylace, je syntéza ATP za aerobních podmínek. Proudění protonů do buňky způsobuje otáčivý pohyb F_0 , což následně u části F_1 vede k syntéze ATP. Při anaerobních podmínkách se ATP naopak hydrolyzuje a protony jsou vylučovány ven z buňky. V důsledku toho může F_1F_0 -ATPáza zvýšit intracelulární pH především v situacích, kdy se bakterie dostává do kyselých prostředí. Kmeny s mutací v tomto komplexu byli citliví ke kyselinám a nebyli schopní růstu při nízkých pH (Suzuki et al., 2003). Cotter et al., (2000) provedli experiment, při němž použili N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCCD), který inhibuje transport protonů F_1F_0 -ATPázou, aby tak zjistili roli enzymu v ATR u *Listeria monocytogenes*. Působení DCCD inhibitoru na bakterie před a během acidické zátěže vyústilo ve zvýšenou senzitivitu ke kyselinám u buněk, které již byly dříve ke kyselinám adaptované. Snížení schopnosti přežít ukazuje na zapojení F_1F_0 -ATPázy do adaptace ke kyselinám. (Cotter et al., 2000).

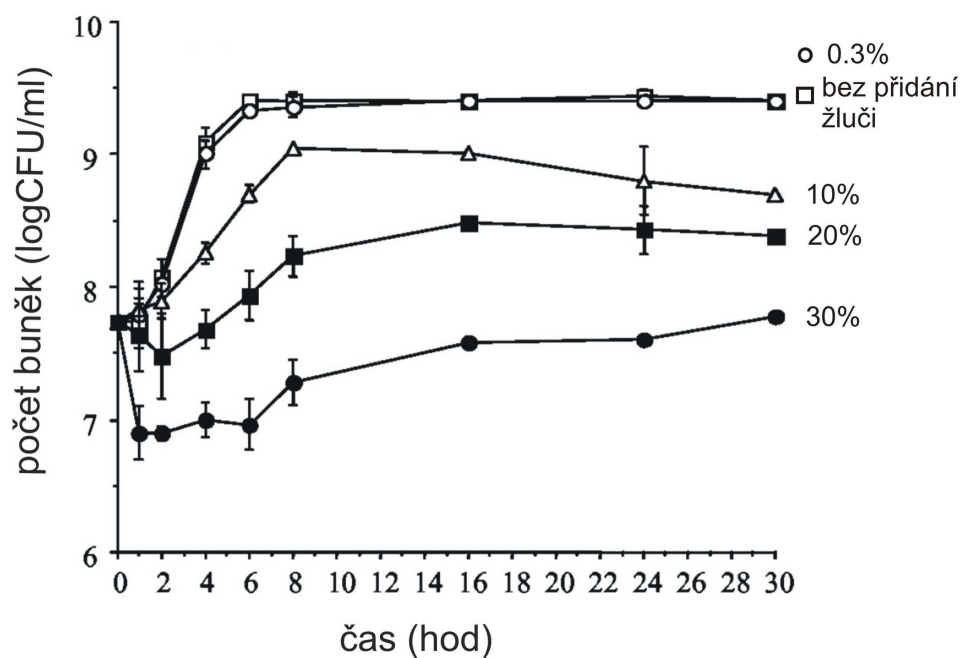
3.3. Rezistence ke žluči

Bakterie, které přežily nepříznivé prostředí žaludku, putují dále zažívacím traktem do tenkého střeva. Zde se setkávají s dalšími stresy, které jsou způsobeny například nízkým obsahem kyslíku, zvýšenou osmolaritou, kompeticí s přirozenou střevní mikroflórou, či kolísáním hodnot pH. Játra navíc každý den sekretují do zažívacího traktu 500-1000ml žluči, která se tak pro listerie stává dalším stresem. Bakterie dokáže tolerovat vysoké koncentrace žluči, o čemž svědčí i její schopnost kolonizovat lidský žlučník (Allerberger et al., 1989).

3.3.1. Efekt žluči a žlučových kyselin

Žluč je syntetizována v játrech, ale v intervalu mezi přijímáním potravy je skladována a koncentrována ve žlučníku. Žluč je složena ze sodných solí žlučových kyselin. Žlučové soli redukují povrchové napětí a ve spojení s fosfolipidy a monoglyceridy umožňují emulgaci tuků, čímž je připravují k trávení a vstřebávání v tenkém střevě. Tyto biologické detergenty jsou syntetizovány z cholesterolu tak, že je ke steroidnímu jádru připojen buď glycin, nebo taurin (konjugované kyseliny). Žlučové kyseliny mají silnou antimikrobiální aktivitu a jejich schopnost rozpouštět fosfolipidy, cholesterol a proteiny buněčné membrány, může vést až k lýzi.

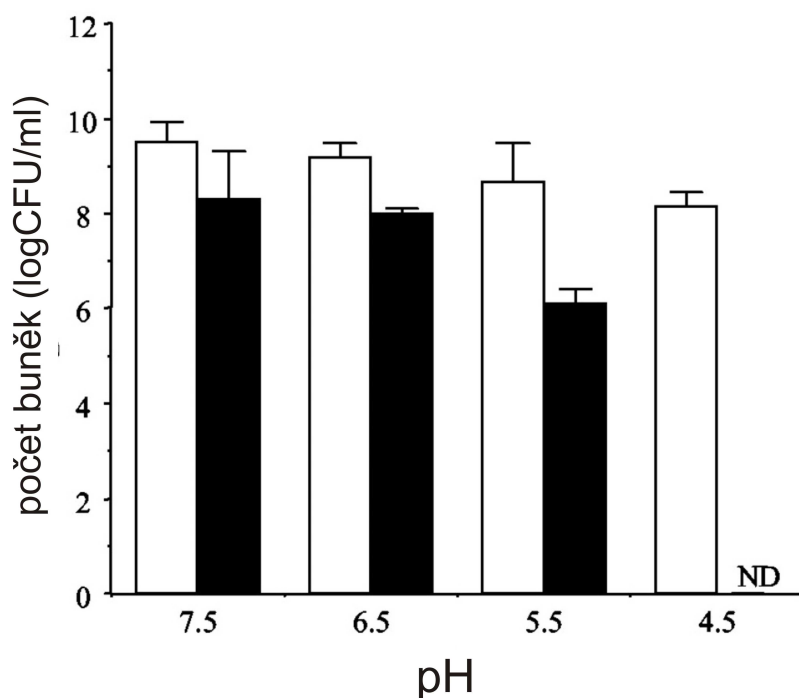
Begley et al., (2002) studovali efekt žluči a žlučových kyselin na přežívání a růst bakterie druhu *Listeria monocytogenes* LO28. Bakterie byla schopná růstu v hovězí, vepřové i lidské žluči a to v koncentracích žluči, které překonávají ty *in vivo*. V přítomnosti 0.3% hovězí žluči nebyla postihnuta, kultury dokázaly tolerovat i přítomnost 30% hovězí žluči a dokonce v ní byly schopné i růstu. *Listeria monocytogenes* rostla také v přítomnosti 0.3% lidské žluči a ani přidání 10% lidské žluči k bujónu neovlivnilo její růst.



Graf č. 4. Závislost doby působení hovězí žluči na počet buněk *Listeria monocytogenes* LO28. Kultury byly naočkovány do BHI bujónu, který obsahoval rozdílné koncentrace žluči (hodnoty jsou uvedeny v pravé části grafu). Kultury byly inkubovány za anaerobních podmínek při teplotě 37°C. Převzato z Begley et al., (2002).

Lidská žluč je směsí konjugovaných a nekonjugovaných žlučových kyselin, která je v tenkém střevě přítomná v koncentraci 5mM (De Boever et al., 1999). Begley et al., (2002) studoval vliv vybraných 5mM kyselin na růst bakterie. Těmito kyselinami byly: TCA – taurocholová kyselina, GCA – glykocholová kyselina, TDCA – taurodeoxycholová kyselina, GDCA – glykodeoxycholová kyselina,

taurochenodeoxycholová kyselina a glykochenodeoxycholová kyselina. Bylo zjištěno, že růst *Listeria monocytogenes* LO28 na agaru, který obsahoval jakoukoli z těchto kyselin, nebyl inhibován. Nekonjugované žlučové kyseliny (kyselina cholová), narozdíl od testovaných konjugovaných žlučových kyselin, významně omezovaly růst *Listeria monocytogenes* LO28. Dále bylo zkoumáno, zda-li je efekt působení 5mM GDCA a TDCA závislý na hodnotě pH. Tato otázka je důležitá, neboť bakterie se v trávicím traktu setkávají s širokým rozpětím hodnot pH. Bakterie byly v rozmezí pH 4.5–7.5 rezistentní k TDCA. Naopak kultury již nebyly schopné růstu v přítomnosti GDCA při pH 4.5 To je důkaz toho, že je inhibice u těchto glykokonjugovaných žlučových kyselin závislá na pH.



Graf č. 5. Závislost působení TDCA (bílé sloupce) a GDCA (černé sloupce) při různých hodnotách pH na počet buněk. Buňky byly po 18hodinové anaerobní inkubaci v BHI bujónu vystaveny 5mM TDCA a GDCA při rozdílných hodnotách pH. ND-not detected. Převzato z Begley et al., (2002).

3.3.2. Geny v toleranci ke žluči

Vysoká schopnost rezistence ke žluči u *Listeria monocytogenes* je funkcí širokého množství proteinů. Begley et al., (2002) identifikovali 12 genů, které mají úlohu v toleranci *Listeria monocytogenes* ke žluči. Většina z těchto genů kóduje proteiny, které mají roli v rezistenci ke stresům a v údržbě integrity buněčného obalu a proteiny, které jsou regulátory transkripce. Při vystavení bakterie stresu z přítomnosti žluči byla například zjištěna zvýšená transkripce operonu *groESL*. Ten je zodpovědný za syntézu proteinu GroEL, což je protein, který se objevuje při teplotních šocích (Gahan et al., 2001). Dalším genem byl homolog ke genu *Bacillus anthracis calA*, který kóduje membránový enzym, který zprostředkovává polymeraci D-glutamové kyseliny a je tak nezbytný pro tvorbu pouzdra buňky (Makino et al., 1989). Úlohu v rezistenci má gen *gadA*, který je součástí GAD systému (Cotter et al., 2000). Tento systém hraje roli v boji s nízkým pH, které vzniká intracelulární disociací žlučových solí. ZurR je pak proteinem, který je kódovaný genem *zurR*, a který hraje úlohu v rezistenci k bakteriocinům (Dalet et al., 1999). Gen *lytB* hraje úlohu v biosyntéze isoprenoidů (Rohdich et al., 2002), které se účastní metabolismu peptidoglykanů. Porucha v *lytB* většinou mění syntézu buněčné stěny, což může ovlivnit rezistenci ke žluči (Rohdich et al., 2002). Je zajímavé, že většina z těchto genů může být nalezena uvnitř samostatného 50kb regionu genomu *Listeria monocytogenes*, který obsahuje také *opuC* či *bilE* geny. Tento region tudíž může představovat shluk genů, které jsou zapojeny do mechanismů rezistence proti podmínkám, se kterými se bakterie setkává v gastrointestinálním traktu (Gahan and Hill, 2004).

3.3.3. Protein BSH

Jedním z mechanismů rezistence ke žluči je schopnost bakterie transformovat žlučové kyseliny. Tato transformace může být uskutečněna modifikací steroidního jádra žlučových kyselin, či hydrolýzou konjugovaných žlučových solí. Tato reakce je katalyzována hydrolázou žlučových solí (BSH – bile salt hydrolase). Předpokládá se, že BSH chrání komenzální bakterie před toxicitou žlučových solí a přispívá tak k přežití bakterií a kolonizaci střev (De Boever et al., 2000). BSH bakterie *Listeria monocytogenes* je virulenčním faktorem, který umožňuje přežívání bakterie v lumen střeva a jater. Gen pro BSH – *bsh* je regulován aktivátorem transkripce *PrfA*. Aktivita BSH vzrůstá při nízké koncentraci kyslíku, tedy už po přijmutí kontaminované potravy. Delece v genu *bsh* způsobuje *in vitro* sníženou rezistenci ke žluči, snižuje transport

bakterie střevem po naočkování pokusných králíků a snižuje virulenci a kolonizaci jater po intravenózním naočkování myší. To všechno svědčí o tom, že BSH je virulentním faktorem, který je zapojen do intestinální a hepatické fáze listeriózy (Dussurget, et al., 2002).

3.3.4. BilE systém

V genomu *Listeria monocytogenes* byl identifikován operon s významnou homologií k osmoprotekčnímu absorpčnímu systému (Opu-osmoprotectant uptake system) gram-pozitivních bakterií (Glaser et al., 2001). Lokus je umístěn ~2.4 kb směrem od *opuC*, nicméně produkty tohoto systému se dvěma geny (lmo1421 a lmo 1422) nefungují jako systém absorbující osmolyty, ale spíše jako systém vylučující žluč. Proto byl tento lokus přejmenován na *bilE* (bile exclusion). Bylo dokázáno, že mutace v tomto genu vedla, *in vitro*, k redukci rezistence k lidské žluči. V porovnání s nekultivovaným druhem vykazoval mutant menší schopnost kolonizovat zažívací trakt myší a napadat hlouběji uložené tkáně. *BilE* je tak mechanismem rezistence ke žluči, který je zapotřebí pro úplný potenciál virulence. (Sleator et al., 2005).

3.3.5. Kolonizace žlučníku

Listeria monocytogenes je z velké části intracelulárním patogenem. Bylo zjištěno, že tento patogen může růst také extracelulárně v lumen žlučníku. Význam tohoto extracelulárního růstu, s ohledem na patogenezí, závisí především na schopnosti bakterie opustit tento orgán, aby se pak dále mohla rozšířit do ostatních tkání a prostředí. *Listeria monocytogenes* nebyla ve žlučníku asociována ani s buňkami žlučnickové stěny ani nebyla objevena uvnitř buněk (Hardy et al., 2005). Její přítomnost mimo buňky nebyla očekávaná, neboť klíčovou rolí v patogenezí listeriózy má intracelulární výskyt. Růst *Listeria monocytogenes* ve žlučníku může mít několik podob. Přítomnost listerií může vyvolat pouze malé nebo žádné změny, ovšem bakterie také mohou, za účelem rychlejšího množení, modifikovat strukturu tkáně. (Hardy et al., 2005). Žlučník může, díky vytrvalosti bakterie v tomto prostředí, sloužit jako nebezpečný rezervoár. *Listeria monocytogenes* využívá žlučník také jako ochranu před imunitní odpovědí, neboť v koncentrované žluči nejsou žádné buňky.

3.4. Osmotolerance

Používání soli pro snížení vodní aktivity je jednou z metod ochrany potravin v potravinářském průmyslu. Kromě toho, lumen gastrointestinálního traktu má vysokou koncentraci solí (0.3M NaCl) (Chowdhury et al., 1996). Přítomnost *Listeria monocytogenes* ve slaných potravinách, či průchod této bakterie tenkým střevem spouští řadu procesů, díky kterým se vypořádává s těmito nepříznivými podmínkami. Schopnost přežívání ve vysokých koncentracích solí tak ztěžuje ochranu potravin před tímto patogenem a napomáhá rozšíření v organismu.

3.4.1. Akumulace osmolytů

Většina bakterií se vypořádává se zvýšenou osmolaritou v prostředí akumulací osmolytů (Sleator and Hill, 2002). Osmolyty jsou malé vysoce rozpustné molekuly, které nemají za fyziologického pH žádný náboj. Mohou být v buňce nahromaděny ve velkých koncentracích, aniž by působily nepříznivě na nezbytné buněčné procesy (Galinski and Trüper, 1994). Zpočátku byly za osmolyty zúčastněné v toleranci k solím považovány pouze glycin betain, karnitin a prolin (nebo peptidy obsahující prolin). Nicméně seznam osmolytů, které kromě osmotolerance podporují také toleranci k nízkým teplotám, se rozšířil o prolin betain, acetylkarnitin, γ -butyrobetain a 3-dimethylsulfoniopropionát (Bayles and Wilkinson, 2000). Nejprostudovanějšími systémy však stále zůstává absorpce glycin betainu, karnitinu a prolinu. Celý proces akumulace osmolytů má dva stupně. V tom prvním, méně prostudovaném, který předchází samotné absorpci osmolytů, dochází k poklesu hladiny K^+ v buňce. Tento proces je následován dramatickým nárůstem koncentrace mnoha osmolytů v cytoplazmě ($>1\text{mol/kg}$ vody [Galinski and Trüper, 1994]). Ty slouží jako účinné stabilizátory enzymových funkcí, vyvažují turgor a předcházejí ztrátám vody z cytoplazmy (Sleator and Hill, 2002). Genetickou analýzou bylo zjištěno, že membránové transportéry BetL (Sleator et al., 1999) a Gbu (Ko and Smith, 1999) jsou zodpovědné za transport glycin betainu. Další transportní systém OpuC je také schopný transportu betainu, ale jeho primární funkcí je transport karnitinu (Fraser et al., 2000; Sleator et al., 2001a). U mutantů v genech *betL* a *gbu* byla významně ovlivněna schopnost akumulace glycin betainu a tyto mutanti nebyli schopni snášet takové koncentrace solí jako jejich rodičovské kmeny, které těmito koncentracím odolávaly (Ko and Smith, 1999; Sleator et al., 1999). Podobně mutant s inaktivací *opuC* byl defektní v transportu karnitinu a měl narušený růst ve vysoké

osmolaritě (Fraser et al., 2000; Sleator et al., 2001a). Mechanismus transportu prolinu zůstává nejasný, ačkoli byl identifikován operon *proBA*, který kóduje enzymy katalyzující dva první kroky biosyntézy prolinu. Narušení tohoto operonu významně redukuje růst těchto mutantů ve vysokých koncentracích solí (Sleator et al., 2001b). V osmotoleranci také pomáhá absorpce krátkých polypeptidů. Ukázalo se, že produkt genu *oppA* funguje jako peptidový transportní systém a je zapotřebí pro efektivní systémovou infekci myši (Borezee et al., 2000). Jak je vidět, k akumulaci osmolytů využívá *Listeria monocytogenes* poměrně mnoho mechanismů. Všechny však umožňují zvládnout osmotický stres za podmínek, že jsou osmolyty volně k dispozici v prostředí, ve kterém se bakterie momentálně nalézá.

3.4.2. Indukce proteinů v důsledku osmotického stresu

Dalším mechanismem tolerance ke slaným stresům u *Listeria monocytogenes* je syntéza proteinů. Duché et al., (2002) identifikovali 12 takových proteinů a rozdělili je do dvou skupin: Ssp (Salt shock proteins) a Sap (Stress acclimation proteins). Experimenty Duché et al., (2002) odhalily, že je u *Listeria monocytogenes* indukováno šest proteinů Ssp. Mezi těmito proteiny byly identifikovány dva všeobecné stresové proteiny DnaK a Ctc. DnaK je protein objevující se u šoku z vysokých teplot. Roli Ctc v osmotoleranci studoval Gardan et al. v roce 2002. Zjistili, že je tento protein zapojen do rezistence k vysoké osmolaritě při absenci osmolytů v prostředí. Mutant *ctc* rostl v kondicích vysoké osmolarity (0.6M NaCl nebo xylózy) dvakrát pomaleji, než kmen LO28. Při tomto růstu byla také poškozena morfologie mutovaného kmenu. Bakterie získaly tvar ohnutých a zakroucených tyček. Když byl do média přidán glycin betain, nebo karnitin, začal mutant růst a prospívat stejně jako nepozměněný rodičovský kmen. Dalšími proteiny byly alanin dehydrogenáza, u které se předpokládá, že není zapojena do žádných dalších stresových odpovědí (Siranosian et al., 1993), protein CysK, který je třeba pro biosyntézu cysteinu a posledním identifikovaným proteinem byl glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza (Gap), který je enzymem glykolýzy. Z 20 objevených proteinů Sap jich bylo identifikováno pouze 7. Prvním byl GbuA, který je podjednotkou glycin betainového transportního systému GbuABC. Druhým byl elongační faktor EF-Tu. Stres vyvolaný solí také navozuje syntézu vyšších hladin GuaB, Sap, CcpA, IAB a dvou pyruvát-dehydrogenázových podjednotek. Je zajímavé, že mezi proteiny, které byly indukovány stresem ze slaného prostředí, se čtyři proteiny (DnaK, CysK, CcpA a Gap) objevují také u ostatních bakterií při stresu vyvolaném

nízkými teplotami (Salotra et al., 1995). Tyto výsledky podporují hypotézu podobných mechanismů regulace v adaptacích na slaná a studená prostředí.

Faleiro et al., (2003) dokázal, že ke kyselinám adaptované kmeny *Listeria monocytogenes* izolované ze sýrů vykazovali ve srovnání s neadaptovanými kmeny zvýšené přežívání ve slaném stresu (20% NaCl). Adaptace k vysokým koncentracím solí naopak vyústila v indukci ATR a buňky byly schopné přežít i letální kyselé podmínky. Je tedy zřejmé, že hlavní nebezpečí adaptace k solím spočívá v schopnosti navození dalších adaptací a tolerancí.

3.5. Rezistence k antibiotikům

Pokud bakterie *Listeria monocytogenes* přežije všechny nástrahy, které potkává při cestě trávicím traktem, začne se množit a rozšiřovat v organismu, což vede ke vzniku nemoci, zvané listerióza. Ta je potom léčena antibiotiky. Všeobecně je *Listeria monocytogenes* citlivá na široké rozpětí antibiotik, ovšem i u ní se vyvinula rezistence k některým druhům léků.

3.5.1. Listeriόza a její projevy

Listeria monocytogenes infikuje člověka konzumací kontaminované potraviny. Bakterie doputuje až do střev, kde překoná intestinální bariéru, a rozšíří se dále z mezenterických lymfatických uzlin do sleziny a jater. Odtud se pak může rozšířit dále do mozku, či placenty, což u osob s oslabenou imunitou vede ke vzniku zánětu mozkových blan, encefalitidě, u těhotných žen k potratům a u novorozenců k celkové infekci. Pokud není nákaza patřičně regulována imunitním systémem, může *Listeria monocytogenes* způsobit i sepsi. Potraviny, které jsou vysoce kontaminované, mohou u zdravých jedinců způsobit gastroenteritidu (Aureli, et al 2000).

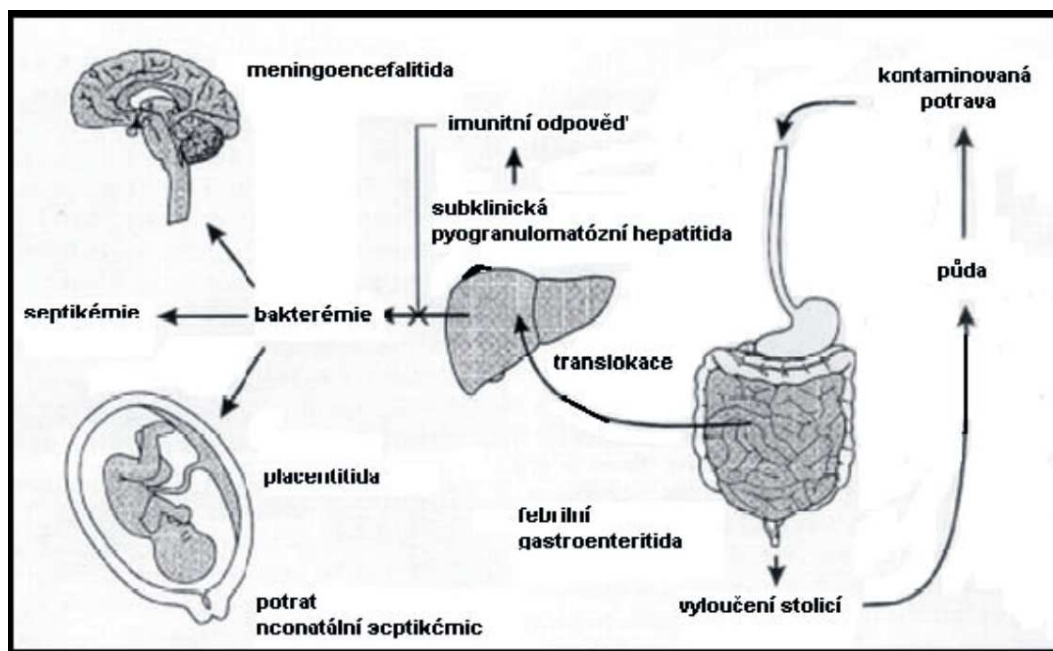
První krok procesu infekce, tedy konzumace potravin, které obsahují bakterii *Listeria monocytogenes*, obvykle vede ke vzniku gastroenteritid (s příznaky jakými jsou: nevolnost, vodnatý či krvavý průjem, abdominální bolesti a horečka). Tyto klinické příznaky jsou způsobeny buď toxickým efektem bakterie na střevní tkáň, nebo průchodem a invazí přes mukózní bariéru. Tyto příznaky v zažívání obvykle spontánně mizí (Khelef et al., 2006).

V populacích, které jsou ohrožené listeriózou, se znaky, považované za celkovou infekci, objevují nejčastěji po inkubační době, která může být velice dlouhá (10-70 dní). Následná septikémie může být zodpovědná za horečky, podobné chřipkovým, doprovázené bolestmi svalů, kloubů, hlavy a zad. Klinicky se také nemusí vůbec projevit. (Goulet and Marchetti, 1996).

Během těhotenství, obzvláště v třetím trimestru, kdy je imunosuprese nejintenzivnější, mohou být běžně neškodné symptomy nachlazení léčeny jako listerióza kvůli závažnosti možných porodních a novorozeneckých komplikací. Nebezpečí listeriózy během těhotenství spočívá ve schopnosti *Listeria monocytogenes* překonat maternofetální bariéru, což může vyústit v placentární abscesy, chorioamnionitidy a nakonec i v infekce plodu. Tyto infekce jsou pak zodpovědné za předčasné porodní bolesti, za narození mrtvého dítěte, potraty a infekce novorozenců, které jsou spojeny s vysokou mortalitou. Rozšířená infekce u plodů je nazývána granulomatosis infantiseptica a je charakteristická přítomností mikroabscesů a granulomů v játrech, slezině a kůži. S nejvyšší koncentrací *Listeria monocytogenes* se setkáváme ve střevech a v plicích a infekce se může šířit spíše polknutím kontaminované amniové tekutiny, než jako důsledek cesty krví přes placentu (Lorber, 1997; Schlech, 2000). Ke kontaminaci novorozence může také dojít při porodu a infekce může vyústit v hnisavý zánět spojivek, pupínkovitou vyrážku či meningitidu. Meningitida způsobená *Listeria monocytogenes* je jednou ze tří nejběžnějších meningitid u novorozenců (Lorber et al 1997).

Kromě schopnosti překonat intestinální a maternofetální bariéru, dokáže *Listeria monocytogenes* překonat bariéru krev-mozek a může se tak dostat do CNS (centrální nervový systém). Bakterie může způsobit akutní meningitidy či infekci mozkového parenchymu. Mezi všemi bakteriemi, které způsobují meningitidu, má právě *Listeria monocytogenes* největší míru mortality (22%). Meningitida způsobená touto bakterií se objevuje v 11% všech bakteriálních meningitid a u pacientů nad 50 let je po *Streptococcus pneumoniae* druhou nejběžnější bakterií, která způsobuje toto onemocnění (Lecuit and Cossart, 2001). Meningitida *Listeria monocytogenes* se liší od ostatních bakteriálních meningitid. Objevují se také dva rozdílné typy rozšíření bakterie v mozkovém parenchymu. Prvním je encefalitida a druhým jsou intraparenchymální mozkové abscesy. Oba jsou spojeny s vysokou neurologickou nemocností a mírou mortality. (Khelef et al., 2006).

Byly zaznamenány také vzácné případy infekcí v dalších částech těla. *Listeria monocytogenes* tak může způsobit zánět endokardu, spojivek, infekci kůže, zánět lymfatických uzlin, zánět pobřišnice, žlučníku. Dále byly nalezeny abscesy v játrech, slezině, kloubech, perikardu, myokardu či v tepnách tepnách.



Obr. č. 1. Schéma možného průběhu listeriové infekce. Převzato z (Jančová and Škapová, 2007)

3.5.2. Rezistence k antibiotikům

Díky velkému rozpětí druhů antibiotik nepředstavovaly infekce způsobené bakteriemi, které byly na léky rezistentní, až do 80. let 20. století žádný lékařský problém. Nicméně evoluce rezistentních bakterií byla značně urychlena především díky nadměrnému a někdy neopodstatněnému předepisování antibiotik v klinických prostředích a také díky jejich užívání v zemědělství, kde slouží jako urychlovače růstu hospodářských zvířat. A jelikož mají bakterie pozoruhodnou schopnost vyvinout si rezistenci ke všem antibiotikům, dá se očekávat, že si i druhy *Listeria*, které jsou stále považovány za

druhy náchylné k působení antibiotik, vyvinou silnou multirezistenci (Charpentier and Courvalin, 1999).

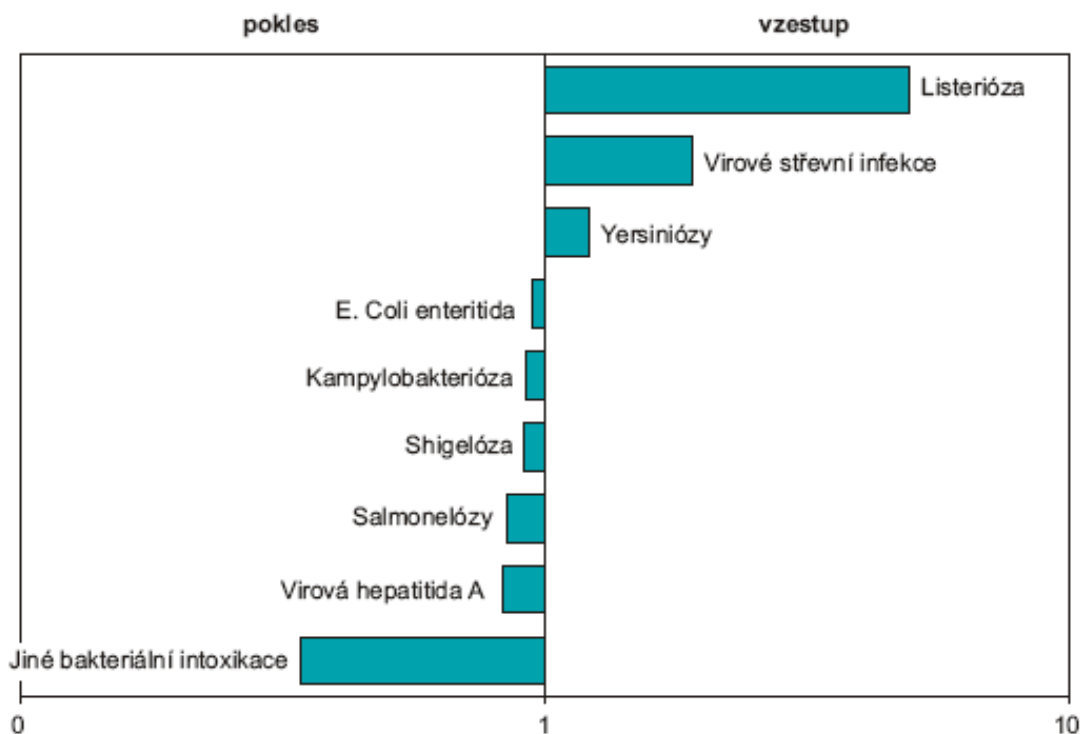
Listerióza se léčí ampicilinem (Omnipen) nebo penicilinem G v kombinaci s aminoglykosidy, především gentamicinem (Gellin and Broome, 1999). Chemoterapeutikem druhé volby je pak sulfamethoxazol-trimethoprim (Bactrim, Septra). Protože bakterie žijí většinou uvnitř makrofágů, může být léčení obtížné a doba léčení se může lišit. Těhotné ženy jsou obvykle léčeny dva týdny, novorozenci od dvou do třech týdnů, dospělí s mírnými příznaky od dvou do čtyř týdnů, osoby s meningitidou tři týdny, osoby s abscesy na mozku šest týdnů a čtyři až šest týdnů se léčí pacienti se zánětem endokardu (www.healthatoz.com).

První kmen *Listeria monocytogenes*, který byl rezistentní k antibiotikům byl objeven v roce 1988. Tento druh byl rezistentní k $> 10\mu\text{g}$ tetracyklinu na ml. První multirezistentní kmen byl objeven v témže roce ve Francii. Mnohonásobná rezistence je spojována s přítomností konjugativního plasmidu, o kterém se předpokládá, že vznikl u *Enterococcus* a *Streptococcus* (Poyart-Salmeron, 1990). Rezistence k tetracyklinům vznikla získáním genů, přenesených konjugativním plasmidem nebo konjugativním transpozonem, který také pocházel z *Enterococcus* a *Streptococcus*. *Enterococcus* a *Streptococcus* tak tvoří rezervoár genů pro rezistenci k antibiotikům. Tetracyklin se užívá v léčbě a jeho použití jako doplňku stravy u zvířat zřejmě napomohlo rozšíření rezistence k tomuto antibiotiku. Byl také objeven kmen *Listeria monocytogenes*, který je rezistentní k trimethoprimu, což budí zvláštní pozornost, neboť pacienti, kteří jsou alergičtí k penicilinům se léčí sulfamethoxazol-trimethoprimem. Také již byla zaznamenána rezistence ke gentamicinu. Rozšíření těchto rezistencí by mohlo mít závažné terapeutické následky. Byla též zaznamenána rezistence k streptomycinu, erytromycinu, kanamycinu, sulfamethoxazolu, či rifampinu. Tyto případy jasně demonstrují, že jsou druhy *Listeria* schopné přijímat geny antibiotické rezistence z cizích zdrojů.

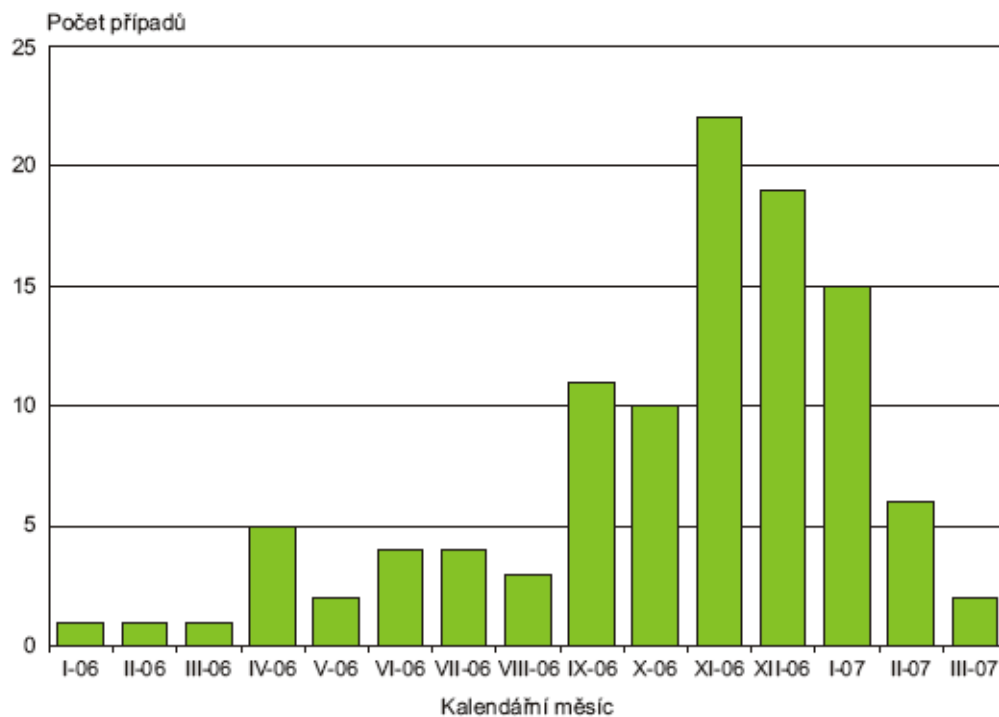
4. Statistická hodnocení výskytu listeriózy v ČR

Státní instituce a zdravotnické organizace každoročně prezentují výroční zprávy o alimentárních onemocněních za uplynulý rok. Jejich prostudováním se dá poměrně dobře odhadnout nebezpečí jednotlivých nemocí. V této práci překládám statistické údaje ze zpráv Státního zdravotnického ústavu a Ministerstva zdravotnictví České republiky. Zprávy pro rok 2007 nebyly při vypracování mé práce k dispozici, a proto zde prezentuji data z roku 2006. Nicméně právě rok 2006 byl rokem, kdy na území České republiky po mnoha letech opět propukla epidemie listeriózy. Ta probíhala na přelomu roku 2006 a 2007.

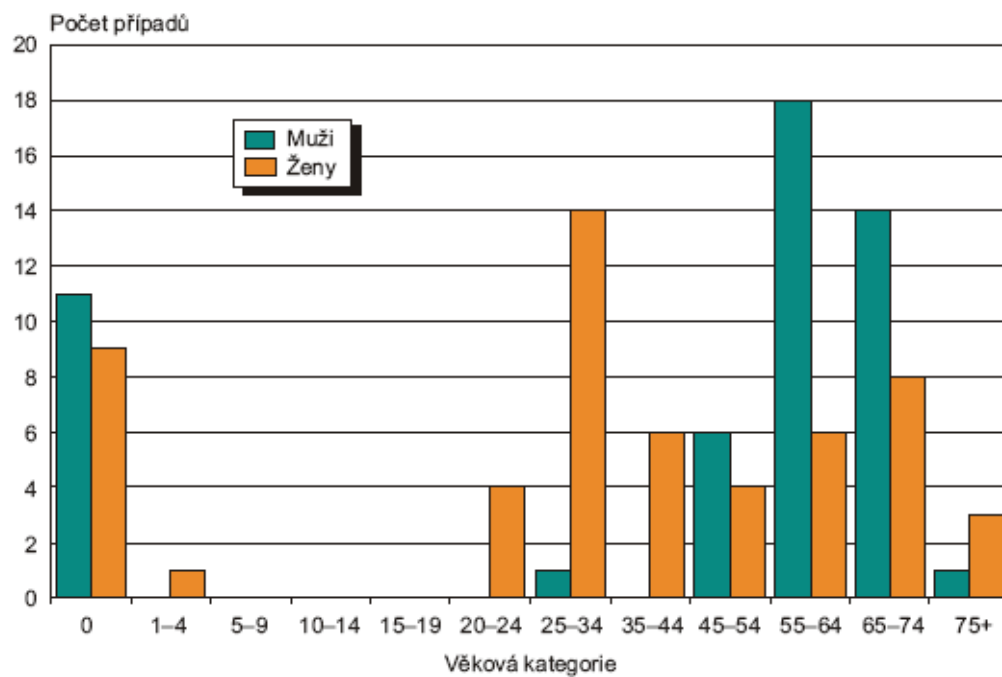
V roce 2006 bylo hlášeno 78 onemocnění listeriózou. Většina vyšetřených kmenů *Listeria monocytogenes* od nemocných osob vykazovala při laboratorním vyšetření shodné genetické znaky jako listerie zachycené ve zrajícím sýru z obchodní sítě.



Obr. č. 2. Porovnání hlášené nemocnosti alimentárními onemocněními v roce 2006 s průměrným rokem (období 2001-2005) Převzato od SZÚ (www.szu.cz/uploads/documents/chzp/souhrnna_zprava/szu_07cz.pdf).

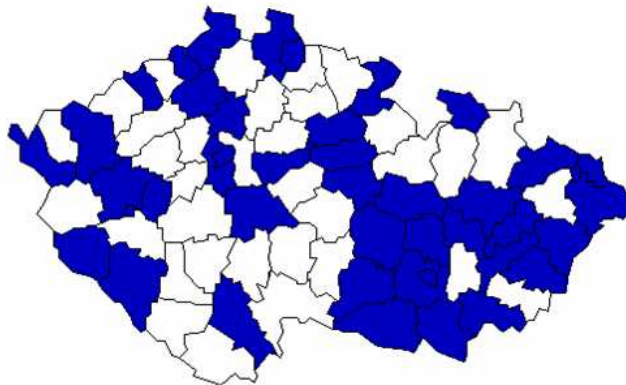


Obr. 3. Výskyt listeriózy v ČR za období leden 2006 až březen 2007. Převzato od SZÚ (www.szu.cz/uploads/documents/chzp/souhrnna_zprava/szu_07cz.pdf).



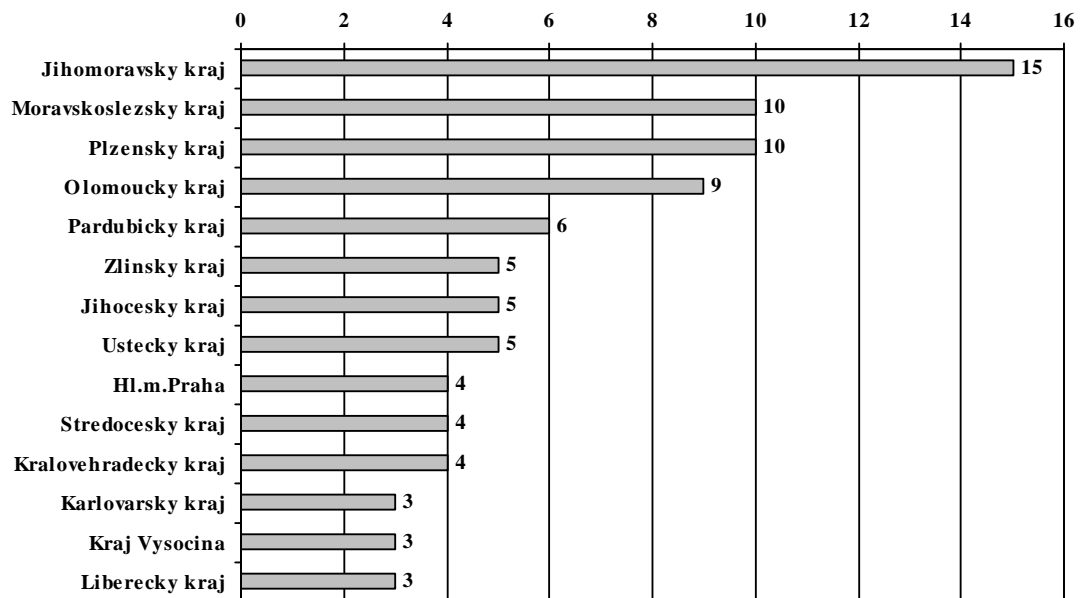
Obr. č. 4. Hlášené případy listeriózy v ČR podle věku a pohlaví za období leden 2006 až březen 2007. Převzato od SZÚ (www.szu.cz/uploads/documents/chzp/souhrnna_zprava/szu_07cz.pdf).

Epidemie vyvrcholila v listopadu a v prosinci. 13 nemocných v průběhu roku zemřelo, z toho 2 novorozenci a 11 osob s průměrným věkem 71 let. Smrtnost v roce 2006 byla 16.3%, tj. poloviční při srovnání s lety 2002-2003, kdy přesáhla 30%. Novorozenecká listerióza byla diagnostikována v 11 případech (v lednu 2007 zjištěny 3 další), u dvou žen došlo v důsledku infekce k předčasnému ukončení těhotenství (www.mzcr.cz/file.aspx?id=233&name=predbezna_zprava.rtf).



Obr. č. 5. Okresy s výskytem listeriózy, ČR, leden 2006- leden 2007. Převzato od MZČR (www.mzcr.cz/file.aspx?id=233&name=listerioza_tk.pdf)

Z hlediska roku 2006 lze konstatovat, že postižena byla prakticky celá polovina republiky, konkrétně osoby ve 39 okresech ze všech 14 krajů. Nemocnost na Moravě převýšila ve 4. čtvrtletí nemocnost v Čechách dvoj až trojnásobně. (www.mzcr.cz/file.aspx?id=233&name=predbezna_zprava.rtf).



Obr. č. 6. Listeriíza, leden 2006 - leden 2007, počet případů podle krajů. Převzato od MZČR (www.mzcr.cz/file.aspx?id=233&name=listerioza_tk.pdf).

Přítomnost *Listeria monocytogenes* v potravinách ještě neznamená bezprostřední akutní nebezpečí. Onemocnění vznikají až při velkém výskytu bakterie a to především u ohrožených osob. Na přelomu roku 2006 a 2007 vznikla díky epidemii listeriízy mediální panika, kvůli které se tímto onemocněním cítila být ohrožena velká část populace. Úkolem odborníků a novinářů by v těchto případech mělo být věcné informování o možných nebezpečích a zvyšování důvěry v přísné veterinární kontroly.

5. Závěr

Nebezpečnost *Listeria monocytogenes* je neoddiskutovatelná. Důkazem je především míra mortality, která se pohybuje mezi 20-40%. Při pohledu na tato čísla si je třeba uvědomit, že výskyt listeriízy je velmi nízký (2 -15 případů na milion) a že touto nemocí jsou ohroženy především lidé s oslabenou imunitou (starší lidé, lidé s AIDS, rakovinou, novorozenci) (www.mzcr.cz). U těchto osob je snižená schopnost T-

lymfocytů zprostředkovávat zabíjení bakterií pomocí neutrofilů a makrofágů. Pro těhotné ženy je nebezpečím především schopnost bakterie procházet přes maternofetální bariéru. Zdraví lidé však nemusí mít z *Listeria monocytogenes* žádné obavy. Konzumace kontaminovaných potravin většinou končí pouze trávicími problémy.

Epidemie listeriózy měla také ekonomický dopad. Z finančního výsledku vyplynulo, že obava z přítomnosti *Listeria monocytogenes* v potravinách snížila zisky výrobců potravin na přelomu roku 2006 a 2007 až o pětinu. Nastal i mezinárodní konflikt mezi slovenskými odběrateli sýrů a firmou Madeta a.s. Slovenská strana tvrdila, že jí byly z této firmy distribuovány kontaminované sýry Niva. Kontroly před exportem však žádné překročení limitů neobjevily. I kvůli vyvarování se podobným důsledkům je důležité porozumět schopnostem adaptace *Listeria monocytogenes* k nepříznivým podmínkám, kterým je vystavována při výrobě potravin. Je nepříjemným zjištěním, že je ve výrobních potravin neúmyslně navozována adaptivní odpověď ke stresům, které by neadaptovaná bakterie nepřežila. Bylo například dokázáno, že GAD systém zvyšuje schopnost přežívání v kyselých potravinách. Pokud se v těchto potravinách nachází glutamát, je schopnost tolerance nízkých pH ještě zvýšena a je pravděpodobnější, že bakterie přežije transport žaludkem. Je tedy nutné inhibovat vstup glutamátu do buňky, nebo snížit na minimum obsah glutamátu v potravinách. Jako preventivní kontrola nad růstem mikroorganismů se používá například nisin. (http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/cs/com/2007/com2007_0418cs01.pdf). Vhodnější je kombinace nisinu s dalšími činidly, například s oxidem uhličitým (Claveland et al., 2001), s thymolem (Ettayebi, et al., 2000), či s teplem (Modi et al., 2000). Vědci se snaží snížit množství nisinu při zpracovávání potravin, neboť kvůli nadměrnému používání by se mohla vyvinout rezistence proti tomuto bakteriocinu. Dalšími mechanismy na poli ochrany potravin by mohlo být balení potravin do fólií, které jsou napuštěny látkami, které zabíjejí *Listeria monocytogenes*, a v USA se již používá postřik s bakteriofágy proti této bakterii. Základním opatřením v potravinářských provozech je však dostatečná prevence. Tedy dodržování hygieny v místech výroby, bezpečné manipulace s potravinami a zabránění křížové kontaminaci.

Které podmínky jsou tedy pro bakterii nejméně příznivé? Na tuto otázku se nedá s přesností odpovědět, neboť klíčovou roli v toleranci nepříznivých podmínek hraje především předchozí adaptace. Velmi špatně bakterie snáší organické kyseliny a kyseliny anorganické, ke kterým nebyly adaptovány. Naopak při nízkých teplotách prospívá bakterie velmi dobře. Je pozitivní zprávou, že rezistence k antibiotikům není

častá a šance na vyléčení je tak velmi vysoká. Další studium mechanismů tolerance a především genů, které jsou do ní zapojeny, by mohlo pomoci nalézt efektivnější metody ochrany potravin a další léčiva pro případ vzniku multirezistencí proti antibiotikům.

6. Seznam použité literatury

- Allerberger, F., B. Langer, O. Hirsch, M. P. Dierich, and H. P. Seeliger. 1989. *Listeria monocytogenes* cholecystitis. *Z. Gastroenterol.* 27:145–147.
- Angelidis, A. S. and Smith, G. M. 2003. Role of glycine betaine and carnitine transporters in adaption of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* Dec. 2003, p. 7492-7498
- Annous, B. A., L. A. Becker, D. O. Bayles, D. P. Labeda, and B. J. Wilkinson. 1997. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3887-3894
- Aureli, P., G. C. Fiorucci, D. Caroli, G. Marchiaro, O. Novara, L. Leone, and S. Salmaso. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N. Engl. J. Med.* 342:1236–1241.
- Bayles, D. O., and B. J. Wilkinson. 2000. Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:23–27
- Bayles, D. O., Annous, B. A., Wilkinson, B. J. 1996. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* Mar. 1996, p. 1116–1119
- Beales, N., 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid reservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 3 (1), 1–20.
- Begley, M., Gahan, C. G. M., and Hill, C. 2002. Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: Adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* Dec. 2002, p. 6005-6012
- Beumer, R. R., M. C. Te Giffel, L. J. Cox, F. M. Rombouts, and T. Abee. 1994. Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1359-1363
- Borezee, E., Pellegrini, E. and Berche, P. 2000. OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infection and Immunity* 68, 7069–7077.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71 (1), 1–20.
- Cossart, P., J. Pizarro-Cerda, and M. Lecuit. 2003. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: Functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.* 13:23–31.
- Cotter, P. D., C. G. M. Gahan, and C. Hill. 2000. Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F0F1-ATPase operon in the acid tolerance response. *Int. J. Food Microbiol.* 60:137–146.
- Cotter, P.D., Gahan, C.G.M. and Hill, C. 2001 A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Molecular Microbiology* 40, 465–475.
- Crandall, A. D., and T. J. Montville. 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:231-237

- Dalet, K., Gouin, E., Cenatiempo, Y., Cossart, P. and Hechard, Y. 1999. Characterisation of a new operon encoding a Zur-like protein and an associated ABC zinc permease in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters* 174, 111–116.
- De Boever, P. and W. Verstraete. 1999. Bile salt deconjugation by *Lactobacillus plantarum* 80 and its implication for bacterial toxicity. *J. Appl. Microbiol.* 87:345–352.
- De Boever, P., Wouters, R., Verschaeve, L., Berckmans, P., Schoeters, G., and Verstraete, W. 2000 Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 709–714.
- Duché, O., F. Trémoulet, P. Glaser, J. Labadie. 2002. Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4): 1491-1498.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit M., the European *Listeria* Genome Consortium, Buchrieser, C., Glaser, P. and Cossart, P., *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis, *Molecular Microbiology* (2002) 45(4), 1095–1106
- Etchegaray, J.-P., and M. Inouye. 1999. CspA, CspB, and CspG, major cold shock proteins of *Escherichia coli*, are induced at low temperature under conditions that completely block protein synthesis. *J. Bacteriol.* 181:1827-1830.
- Ettayebi, K., El Yamani, J., Rossi-Hassani, B., 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183 (1), 191–195.
- Faleiro, M.L., Andrew, P.W., Power, D., 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 84 (2), 207–216.
- Farber, J. M., and P. I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55:476-511
- Foster, J.W., Hall, H.R. 1992. Adaptive acidification tolerance response. *J. Bacteriol.* 172, 771-778.
- Fraser, K.R., Harvie, D., Coote, P.J. and O’Byrne, C.P. 2000. Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4696–4704.
- Gahan, C. G. M., J. O’Mahony, and C. Hill. 2001. Characterization of the groESL operon in *Listeria monocytogenes*: utilization of two reporter systems (gfp and hly) for evaluating in vivo expression. *Infect. Immun.* 69:3924–3932.
- Gahan, C.G., O’Driscoll, B., Hill, C., 1996. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (9), 3128–3132.
- Gahan, C.G.M., Hill, C. 2004. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Applied Microbiology* 96, 1345-1353
- Galinski, E. A., and Trüper, H. G. 1994. Microbial behaviour in salt stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 15, 95–108.

- Gardan, R., Duché, O., Leroy-Sétrin, S., the European *Listeria* Genome Consortium and Labadie, J. 2002. Role of *ctc* from *Listeria monocytogenes* in Osmotolerance, Applied and Environmental Microbiology, January 2003, p. 154-161, Vol. 69, No. 1
- Gellin G.B., and C.V. Broome. 1989. Listeriosis. JAMA 261:1313-1320
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H. et al. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. Science 294, 849–852.
- Goulet, V., and P. Marchetti. 1996. Listeriosis in 225 nonpregnant patients in 1992: Clinical aspects and outcome in relation to predisposing conditions. Scand. J. Infect. Dis. 28:367–374.
- Graumann, P., K. Schroeder, R. Schmid, and M. A. Marahiel. 1996. Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 178:4611-4619.
- Graumann, P., T. M. Wendrich, M. H. W. Weber, K. Schroeder, and M. A. Marahiel. 1997. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. Mol. Microbiol. 25:741-756.
- Hardy, J., Margolis, J.J. and Contag, Ch.H. 2005. Induced Biliary Excretion of *Listeria monocytogene*. INFECTION AND IMMUNITY, Mar. 2006, p. 1819–1827
- Charpentier, E., and P. Courvalin. 1999. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2103–2108.
- Chowdhury, R., Sahu, G.K. and Das, J. 1996. Stress response in pathogenic bacteria. Journal of Biosciences 21, 149–160.
- Jančová, J. and Škapová, T. 2007. *Listeria monocytogenes* – Původce listeriózy. Zpravodaj centra MPI. 2007/3:2-4
- Jiang, W., Y. Hou, and M. Inouye. 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. J. Biol. Chem. 272:196-202.
- Khelef, N., Lecuit, M., Buchrieser, C., Cabanes, D., Dussurget, O and Cossart, P., 2006. *Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria*. Prokaryotes (2006) 4:404–476
- Ko, R. and Smith, L.T. 1999. Identification of an ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 65, 4040–4048.
- Ko, R., Smith, L. T., & Smith, G. M. 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. Journal of Bacteriology, 176(2), 426–431.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2003. Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. Dec.2003, 7514-7516
- Kroll, R. G., Patchett R. A., 1992. Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 14:224-227
- Lecuit, M., and C. Cossart. 2001. *Listeria monocytogenes*. In: S. Sussman (Ed.) Molecular Medical Microbiology. Academic Press. London, UK. 2:1437–1462.

- Lorber, B. 1997. Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 24:1–9.
- Makino, S., I. Uchida., N. Terakado, C. Sasakawa, and M. Yoshikawa. 1989. Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 171:722–730.
- Mastronicolis, S. K., N. Arvanitis, A. Karaliota, C. Litos, G. Stavroulakis, H. Moustaka, A. Tsakirakis, and G. Heropoulos. 2005. Cold dependence of fatty acid profile of different lipid structures of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 22:213-219
- Mazzotta, A. S., and T. J. Montville. 1997. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. *J. Appl. Microbiol.* 82:32-38
- Modi, K.D., Chikindas, M.L., Montville, T.J., 2000. Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 30 (3), 249–253.
- O'Driscoll, B., Gahan, C.G., Hill, C., 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (5), 1693–1698.
- Phan-Thanh, L., Mahouin, F., Aligé S., 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 55 (2000) 121-126
- Poyart-Salmeron C, Trieu-Cuot P, Carlier C, MacGowan A, McLauchlin J, Courvalin P. 1992. Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36:463–466
- Poyart-Salmeron, C., C. Carlier, P. Trieu-Cout, A.-L. Courtieu, and P. Courvalin. 1990. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet* 335: 1422-1426
- Püttmann, M., N. Ade, and H. Hof. 1993. Dependence of fatty acid composition of *Listeria* spp. on growth temperature. *Res. Microbiol.* 144:279-283
- Roberts, A. J., and M. Wiedman. 2003. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell. Molec. Life Sci.* 60:904–918.
- Rohdich, F., S. Hecht, K. Gärtner, P. Adam, C. Krieger, S. Amslinger, D. Arigoni, A. Bacher, and W. Eisenreich. 2002. Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1158–1163.
- Salotra, P., D. K. Singh, K. P. Seal, N. Krishna, H. Jaffe, and R. Bhatnagar. 1995. Expression of DnaK and GroEL homologs in *Leuconostoc mesenteroides* in response to heat shock, cold shock or chemical stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:57-62
- Seeliger, H., and D. Jones. 1986. Genus *Listeria*. In: M. Sneath, Sarpe, and Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, MD. 1235–1245.
- Shabala, L., Budde, B., Ross, T., Siegumfeldt, H., McMeekin, T., 2002. Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability monitored by

- measurements of intracellular pH and viable counts. *Int. J. Food Microbiol.* 75 (1–2), 89–97
- Schlech 3rd, W. F. 2000. Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 31:770–775.
- Sinensky, M. 1974. Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:522–525
- Siranosian, K. J., K. Ireton, and A. D. Grossman. 1993. Alanine dehydrogenase (ald) is required for normal sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175:6789–6796
- Sleator R. D., Wemekamp-Kamphuis H. H., Gahan C.G.M., Abee T. and Hill C. 2005. A PrfA-regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* (2005) 55 (4), 1183–1195
- Sleator, R. D., C. G. Gahan, and C. Hill. 2001b. Identification and disruption of the proBA locus in *Listeria monocytogenes*: role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2571–2577.
- Sleator, R.D. and Hill, C. (2002) Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS microbiology Reviews* 26, 49–71.
- Sleator, R.D., Gahan, C.G.M., Abee, T. and Hill, C. (1999) Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2078–2083.
- Sleator, R.D., Wouters, J., Gahan, C.G.M., Abee, T. and Hill, C. (2001a) Role of OpuC, an osmolyte transport system in the salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2692–2698.
- Suzuki, T., Murakami, T., Iino, R., Suzuki, J., Ono, S., Shirakihara, Y. and Yoshida, M. 2003. FoF₁-ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of ϵ subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance, *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M307165200
- Tasara, T., and R. Stephen. 2006. Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: a review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *J. Food Prot.* 69:1473-1484
- Vadyvaloo, V., J. W. Hastings, M. J. van der Merwe, and M. Rautenbach. 2002. Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5223-5230
- Walker, S. J., P. Archer, and J. G. Banks. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 68:157–162.
- Wemekamp-Kamphuis, H.H., Sleator, R.D., Wouters, J.A., Hill, C., Abee, T., 2004. Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (5), 912–2918.