

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Výskyt a aktivita *Listeria monocytogenes* v sýrech

Bakalářská práce

Andrea Rosová

Výživa a potraviny

Prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Hana Salmonová, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Výskyt a aktivita *Listeria monocytogenes* v sýrech" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8.5.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost, ochotu a věnovaný čas při zpracování této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu nejen při psaní mé bakalářské práce, ale i v průběhu celého studia.

Výskyt a aktivita *Listeria monocytogenes* v sýrech

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá výskytem a aktivitou *Listeria monocytogenes* v sýrech. *L. monocytogenes* je grampozitivní, tyčinkovitá, nesporulující bakterie, která může být původcem alimentárního onemocnění listeriózy. Listérie jsou hojně rozšířené v přírodě, v potravinách pak zejména v zelenině, mléce, zrajících sýrech, rybách, hovězím masem, vejcích a produktech určených k přímé spotřebě. Na zařízeních potravinářských provozů může vytvářet odolné biofilmy a může tak kontaminovat řadu výrobků. Přežívá v extrémních podmínkách prostředí, včetně širokého rozsahu pH (4,6-9,5) a obsahu soli (10 %). Je psychrotrofní a roste v širokém teplotním rozmezí (1-45 °C).

Listerióza není příliš časté onemocnění, ale mnohdy může být fatální. Rizikovými skupinami jsou převážně novorozenci, osoby vyššího věku (nad 60 let), těhotné ženy a osoby s oslabenou imunitou. Klinické příznaky listeriózy jsou gastroenteritida, infekce CNS nebo endokarditida. Bakterie postihuje také játra a slezinu. Může způsobit poškození plodu, potraty, předčasné porody nebo se rozvinout u novorozenců při transplacentárním přenosu. Léčba listeriózy je prováděna pomocí antibiotik.

Případy listeriózy způsobené konzumací kontaminovaného mléka a mléčných výrobků byly hlášeny po celém světě. *L. monocytogenes* se vyskytuje v čerstvých sýrech (Burrata, Mozzarella, Cottage, Quesco-Fresco), v měkkých zrajících sýrech (Camembert, De Brie) a sýrech zrajících pod mazem (Romadur). Tyto sýry jsou díky vlastnostem, jako je relativně vysoké pH, vysoká vodní aktivita, nedostatečný obsah soli, vhodné pro růst listerií.

Listérie lze z potravin spolehlivě odstranit zejména tepelným ošetřením, účinné je také snížení pH přidáním kyselin, snížení vodní aktivity, využití bakteriocinů nebo bakteriofágů. Dodržování hygieny a sanitace v potravinářských provozech jsou velmi důležité pro zamezení kontaminace potravin nežádoucími mikroorganismy, včetně *L. monocytogenes*.

Klíčová slova: *Listeria monocytogenes*; alimentární onemocnění; potraviny; sýry; toxiny; patogenita

***Listeria monocytogenes* in cheese**

Summary

This bachelor thesis is focused on the *Listeria monocytogenes* in cheese. *L. monocytogenes* is a gram positive, rod shaped, non-spore-forming bacterium and may cause alimentary listeriosis. Listeria is abundant in nature, in food especially in vegetables, milk, ripened cheeses, fish, beef and ready-to-eat food. Listeria form resistant biofilms on food processing equipment and contaminate many products. Listeria survives in extreme environment conditions including a wide range of pH (4,6-9,5) and high content of salt (10 %). The bacterium is psychrotrophic growing at a wide temperature range (1-45 °C).

Listeriosis is not a very common disease but it can often be fatal. Newborn babies, seniors, pregnant women and people with weakened immunity are mainly in danger. Clinical symptoms of listeriosis are gastroenteritis, CNS infections or endocarditis. The bacterium also affects the liver and spleen. It may cause fetal harm, miscarriage, preterm childbirths or newborn infections transplacental transmission. Listeriosis is treated by antibiotics.

There have been cases of listeriosis after the consumption of contaminated milk and dairy products worldwide. *L. monocytogenes* occurs in fresh cheeses (Burrata, Mozzarella, Cottage, Quesco-Fresco), in soft ripened cheeses (Camembert, De Brie) and in smear-ripened cheeses (Romadur). These cheeses are suitable for listeria growth, because of properties such as relatively high pH, high water activity and low content of salt.

Listeria is sensitive to heat treatment, low pH by addition of acids, low water activity, for cheese preservation are often used bacteriocins or bacteriophages. Hygiene and sanitation in food processing plants are very important for preventing contamination of food by undesirable microorganisms, including *Listeria monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; alimentary disease; food; cheeses; toxins; pathogenicity

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíl práce	9
3. Literární rešerše	10
3.1. Historie	10
3.2. Rod <i>Listeria</i>	11
3.2.1. Klasifikace rodu.....	11
3.2.2. Sérotypy	12
3.2.3. Charakteristika rodu	12
3.2.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	12
3.3. Listerióza.....	14
3.3.1. Rizikové skupiny	16
3.3.2. Faktory virulence	16
3.4. Klinické příznaky.....	18
3.4.1. Gastroenteritida	18
3.4.2. Infekce v těhotenství a novorozenecká infekce	18
3.4.3. Infekce CNS.....	18
3.4.4. Endokarditida	19
3.5. Léčba	20
3.6. <i>Listeria monocytogenes</i> v potravinách a potravinářských zařízeních.....	21
3.6.1. Výskyt v potravinářských zařízeních	21
3.6.2. Výskyt v potravinách.....	22
3.7. Prevence	24
3.7.1. Doporučení pro spotřebitele a rizikové skupiny	24
3.7.2. Doporučení pro výrobce	25
3.7.3. Doporučení pro prodejce	26
3.8. Epidemiologická data	27
3.8.1. Listerióza v EU	27
3.8.2. Výskyt listeriózy v České republice	32

3.9. Výskyt <i>L. monocytogenes</i> v mléce a sýrech.....	34
4. Závěr	40
5. Seznam zkratk	41
6. Reference.....	42

1. Úvod

V potravinách se vyskytuje řada mikroorganismů, které je znehodnocují. Některé z nich mohou být patogenní a způsobovat alimentární onemocnění. Příkladem jsou patogenní bakterie, které jsou velmi odolné vůči extrémním podmínkám prostředí. Tyto organismy jsou schopny přežívat v podobě biofilmů v potravinářských závodech. Ulpívají na zařízeních a následně může docházet ke kontaminaci produktů. Mezi bakterie, které způsobují alimentární onemocnění je řazena *Listeria monocytogenes*. Tato patogenní bakterie způsobuje nepříliš časté, ale velmi vážné onemocnění zvané listerióza. Listeriόza může mít velmi závažný průběh a u 30 % pacientů končí smrtí. Toto infekční onemocnění se projevuje převážně u jedinců patřících do rizikových skupin (novorozenci, těhotné ženy, senioři, lidé s oslabenou imunitou). Hlavním zdrojem nákazy bývá kontaminovaná potrava.

2. Cíl práce

Listeria monocytogenes není až tak častou příčinou alimentárních onemocnění v Evropské unii, ale způsobuje onemocnění, které může mít velmi závažný průběh a u 30 % pacientů končí smrtí. Jedním z nejdůležitějších zdrojů nálezů jsou tepelně neošetřené mléko a sýry vyrobené jak z nepasterovaného, tak pasterovaného mléka. Cílem bakalářské práce bylo vytvořit ucelený literární přehled o výskytu a aktivitě *Listeria monocytogenes* v sýrech různého typu. Dále byly popsány cesty šíření této bakterie v prostředí a potravním řetězci.

3. Literární rešerše

3.1. Historie

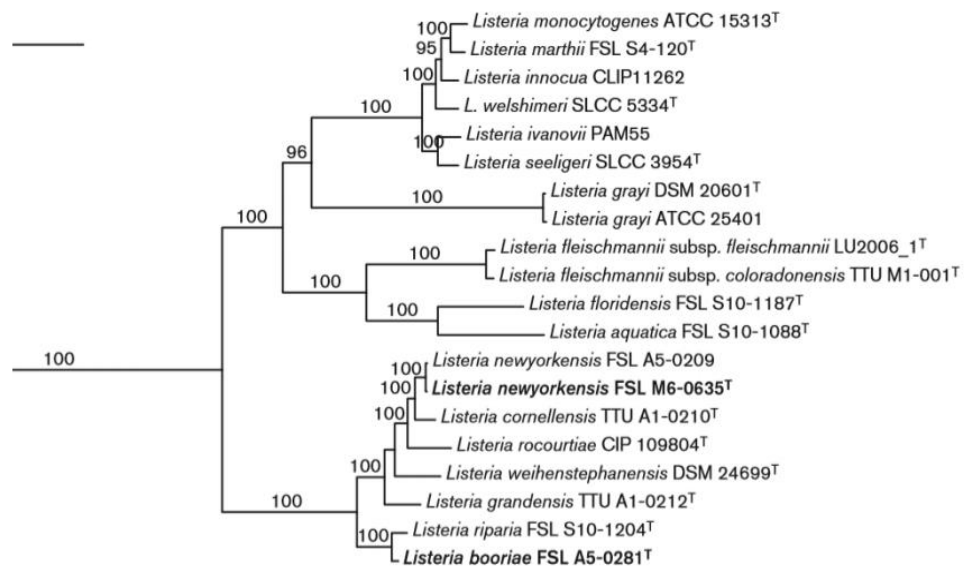
Jako první izoloval listerie E. G. D. Murray v roce 1926 z králíka, bakterii nazval *Bacterium monocytogenes*. V roce 1940 Harvey Pirie změnil jméno této bakterie na *Listeria monocytogenes*, na počest pana Josepha Listera. Původně byly listerie popisovány jako zvířecí patogeny infikující převážně přežvýkavce (skot, ovce, kozy), dále prasata, psy a kočky. Nemoc se u zvířat projevuje nekoordinovaným pohybem. Postižené zvíře chodí v kruhu a není schopno udržet se bez podpory. Díky těmto projevům se nemoc často označuje jako „kruhová nemoc“.

Až později bylo prokázáno, že *L. monocytogenes* může být patogenní i pro člověka. V roce 1950 byly hlášeny lidské infekce zahrnující novorozeneckou sepsi a meningitidu. V pozdních 70. letech a na začátku 80. let bylo zjištěno, že se *L. monocytogenes* přenáší i potravinami. Nyní je celosvětově známa jako původce invazivního a fatálního onemocnění zvaného listerióza (Bhunia 2018).

3.2. Rod *Listeria*

3.2.1. Klasifikace rodu

Rod *Listeria* se v současné době skládá ze 17 druhů. Můžeme ho rozdělit na dvě skupiny. První skupina se nazývá „*Listeria sensu stricto*¹“. Na základě genetické příbuznosti a stejných fenotypových vlastnostech byly do skupiny zařazeny druhy *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. seeligeri*, *L. innocua* a *L. welshimeri*. Tyto druhy se vyskytují v gastrointestinálním traktu zvířat, v potravinách živočišného původu a ve stolici. *L. monocytogenes* je spolu s *L. ivanovii* patogenní druh. *L. monocytogenes* infikuje především člověka. *L. ivanovii* často způsobuje listeriózu u přežvýkavců, u člověka málokdy. Všechny ostatní jsou považovány za nepatogenní. Druhou skupinou je „*Listeria sensu lato*²“. Do této skupiny byly zařazeny druhy, které se liší fylogeneticky od druhů „*Listeria sensu stricto*“. Vykazují jiné vlastnosti navenek, z tohoto důvodu byla vytvořena tato samostatná skupina. Do skupiny řadíme *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. gradensis*, *L. booriae*, *L. rocourtiae*, *L. newyorkensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmanni* a *L. grayi* (Schardt et al. 2017). Na obrázku číslo 1 je znázorněn fylogenetický strom rodu *Listeria* sestavený na základě analýzy genu pro 16S rRNA. Listérie se rozdělily do dvou větví na základě podobnosti v sekvencích analyzovaného genu. Můžeme zde vidět větev zahrnující druhy listerií, u nichž byly potvrzeny fenotypové podobnosti a patří do skupiny „*Listeria sensu stricto*“. Z obrázku je patrné, že ostatní druhy patří do skupiny „*Listeria sensu lato*“, vykazují oproti první větvi fenotypové rozdíly. Z tohoto důvodu nejsou jejich větve ucelené v jednu větev a jsou viditelně odděleny od větve skupiny „*Listeria sensu stricto*“.



Obrázek 1 Fylogenetický strom rodu *Listeria* sestavený na základě analýzy genu pro 16S rRNA (Weller et al. 2015).

¹ sensu stricto- v přesném smyslu slova

² sensu lato- v širším smyslu slova

3.2.2. Sérotypy

Stejně jako u ostatních patogenů je zařazení na úroveň druhu nedostatečné. Z toho důvodu jsou kmeny tříděny podle sérotypů, kdy jsou analyzovány reakce antigenů se specifickými antiséry. Antigeny jsou cizí molekuly, které jsou rozeznávány imunitním systémem organismu. Podle antigenů je imunitní systém schopen rozlišovat struktury tělu vlastní a struktury tělu cizí. Antigeny se od sebe mohou lišit velikostí i chemickým složením. Obvykle se jedná o proteiny nebo polysacharidy. Mezi nejběžnější antigeny patří virové částice, buněčné stěny, bičíky, fimbrie. Při sérologické identifikaci bakterií se prokazuje přítomnost somatických O (tělních) a flagelárních H (bičíkových) antigenů na základě jejich reakce se specifickými antiséry. Díky prokázaným antigenům můžeme *L. monocytogenes* zařadit do příslušných sérotypových skupin, kterých je celkem 13. Konkrétně se jedná o sérotypy 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab, 7 (Bhunias 2018).

S rozvojem nových metod dochází k dalšímu upřesňování genotypu a fenotypu bakterií a následné nové kategorizaci. Na základě ribotypizace byly bakterie rodu *L. monocytogenes* rozděleny do 3 linií. Sérotypy zařazené do linie I mají nejvyšší patogenní potenciál a jsou nejčastější příčinou onemocnění vyvolaných bakterií *L. monocytogenes*. Konkrétně se jedná o 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e. Linie II má střední patogenní potenciál. Sérotypy 1/2a, 1/2c, 3c, 3a, patří do této linie, sporadicky vyvolávají listeriózy. Nalézáme je především v kontaminovaných potravinách. Linie III má nízké patogenní riziko a jen zřídka způsobuje infekci člověka. Zahrnuje sérotypy 4a a 4c, které vyvolávají onemocnění zvířat (Brychta J 2018).

3.2.3. Charakteristika rodu

Rod *Listeria* jsou grampozitivní pravidelné tyčinky o velikosti 0,4-0,5 x 1-3 μm . Vyskytují se samostatně, ve dvojicích nebo tvoří dlouhé řetězky v závislosti na podmínkách kultivace. Listérie nevytvářejí spory. Některé druhy mají bičík, díky němuž se mohou pohybovat. Pohyblivost je ovlivněna teplotou. Při teplotě nad 25 °C se pohyblivost snižuje a při teplotě těla (37 °C) bičíky zcela vymizí (Bhunias 2018).

Bakterie rodu *Listeria* patří mezi fakultativní anaeroby. Jsou schopny růst za nízkých hladin kyslíku a za podmínek vysokého obsahu oxidu uhličitého (Gandhi & Chikindas 2007; Lungu et al. 2009). Tolerance vůči soli, teplotě, nízkým koncentracím kyslíku, pH a aktivitě vody (a_w) se mění mezi kmeny (Gandhi & Chikindas 2007).

3.2.4. *Listeria monocytogenes*

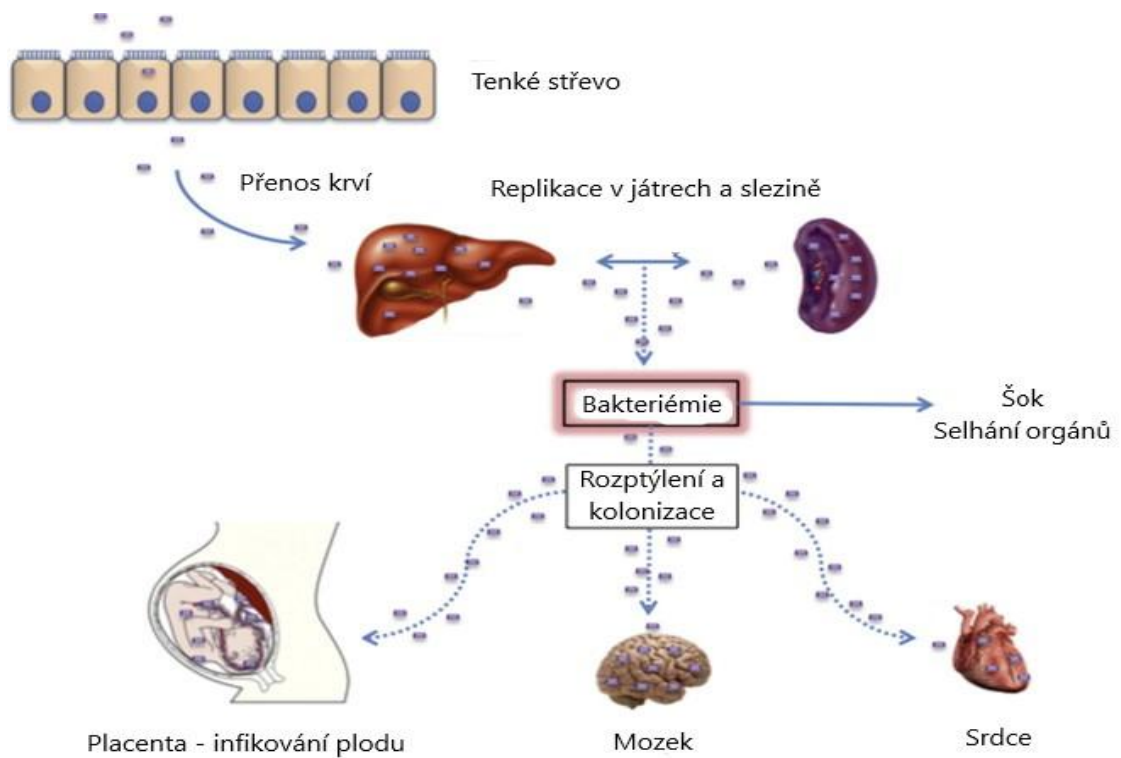
L. monocytogenes je hojně rozšířená v přírodě. Nalézáme ji v půdě, v různých vegetacích, hnilým rostlinným materiálu, vodě, výkalech nebo silážích. Může se vyskytovat jako saprofyt, živí se tedy rozkládáním odumřelé organické hmoty. Bakterie může zvolit parazitický způsob života. V tomto případě využívá hostitele jako vhodné prostředí pro život a jako zdroj výživy (Schardt et al. 2017).

Optimální teplota pro růst *L. monocytogenes* je v rozmezí 30 a 37 °C. Bakterie je známá jako psychrotrofní, to znamená, že je schopna zpomaleného růstu i při teplotách pod 7 °C (Carpentier & Cerf 2011). Na druhé straně je patogen schopen množit se při teplotách dosahujících až 45 °C (Saltijeral et al. 1999). Toleruje široký rozsah pH, může růst v prostředí s pH mezi 4,6-9,5 (Carpentier & Cerf 2011). Tolerance na pH je také spojena s aktivitou vody (a_w). Při a_w menší než 0,92 neroste (Nolan et al. 1992). Listérie roste i v koncentraci soli do 10% (Ferreira et al. 2014). *L. monocytogenes* patří mezi kataláza pozitivní a oxidáza negativní organismy (Bhunja 2018). Svými vlastnostmi a schopnostmi přežít různé podmínky prostředí a díky prokázané patogenitě, představuje *L. monocytogenes* organismus, který může být pro člověka nebezpečný.

3.3.Listeri3za

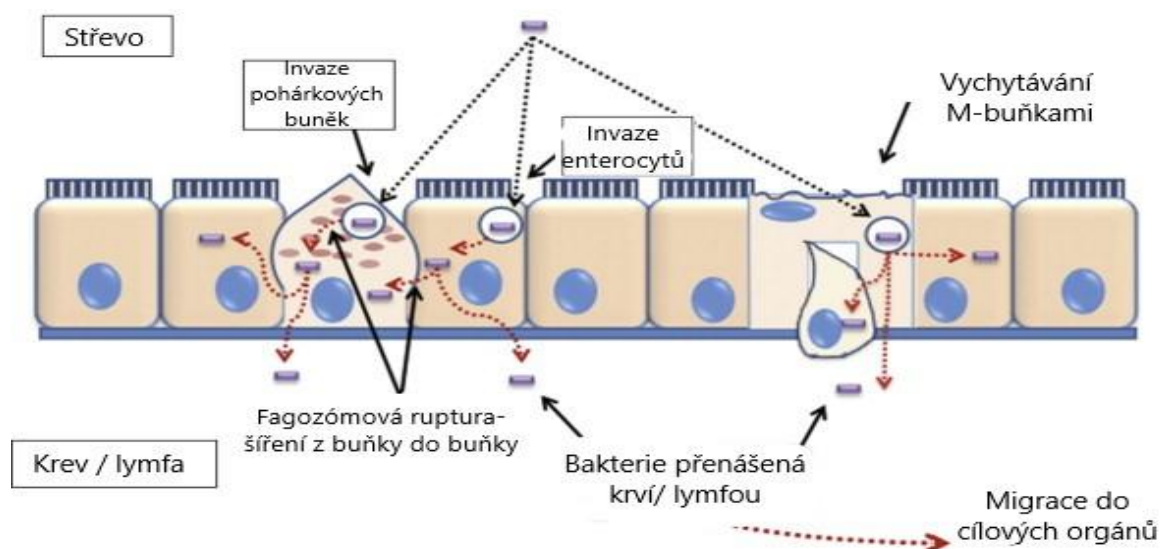
Listeri3za je infekční onemocn3ní zp3soben3 patogenn3 bakterii *Listeria monocytogenes*. Patří mezi zoon3zy (infekční onemocn3ní zvířat přenosné na člov3ka). Nejčast3ji po pozř3ní kontaminované potravy dochází k vyvolání infekce. Bakterie se přemnoží v trávicím traktu a dojde k rozvoji onemocn3ní. Listeri3za představuje jednu z mén3 častých nemocí přenášených potravinami, ale velmi často bývá fatální. Úmrtí spojená s tímto onemocn3ním se vyskytují přibližně u 20-30 % případů osob, zejména se jedná o pacienty patřící do rizikových skupin (lid3 s oslabenou imunitou, malé děti nebo naopak senioři). Vyskytuje se v zelenin3, ml3ku, zrajících sýrech, rybách, hovězím mase, vajíčkách, paštikách a produktech určených k přím3 spotřeb3, jako jsou uzeniny a lahůdky (Bortolussi 2008). Velmi zřídka m3že být infekce přenášena přím3 z infikovaných zvířat na člov3ka. Dále m3že dojít k přenosu z matky na dítě v děloze nebo během průchodu infikovaným porodním kanálem. Existují také zprávy o přenosu v nemocničním prostředí ze zdravotnického personálu na pacienty (Allerberger & Wagner 2010).

Na obrázku číslo 2 je schéma znázorňující proces infekce v živém organismu. K rozvoji listeri3zy dochází za předpokladu, že jedinec pozře potravu kontaminovanou *L. monocytogenes* nebo bakterií samotnou. Následně list3rie překoná střevní bari3ru hostitele a dále proniká do t3la. Infekční dávka pro zdravého člov3ka činí 10^6 buněk, u rizikových osob m3že činit pouze 1000 bakteriálních buněk (Brychta J 2018). List3rie se z trávicího traktu dostávají do lymfatického systému a do krevního řečiště. Stav, kdy jsou bakterie přítomny v krvi, se nazývá bakteri3mie. Bakteri3mie m3že vyvolat šok a zp3sobit orgánové selhání. Z krve list3rie m3žou napadnout jakýkoliv orgán a rozvinout lokální infekci. Nejčast3ji napadenými orgány jsou játra a slezina. Při průchodu přes placentu m3že dojít k infikování plodu, jak již bylo zmín3no výše. V některých případech se *L. monocytogenes* dostává přes hematoencefalickou bari3ru a napadá mozek. Bakterie m3že napadnout i srdce (Cossart & Lebreton 2014).



Obrázek 2 Proces infekce v živém organismu (McMullen & Freitag 2014).

Pro upřesnění přechodu bakterie z tenkého střeva do krve je na obrázku číslo 3 mechanismus translokace *L. monocytogenes* přes střevní bariéru. Epitel vystýlající tenké střevo je jednovrstevný cylindrický. V epitelu se nachází několik typů buněk. Nejvíce jsou zastoupeny enterocyty, jejichž hlavní funkcí je vstřebávání látek z obsahu tenkého střeva. Mezi enterocyty jsou pohárkové buňky, které vylučují mucin tvořící ochrannou vrstvu na povrchu střeva. Listérie jsou schopny navázat se pomocí povrchových proteinů na enterocyty či pohárkové buňky. V epitelu se také nacházejí M-buňky, které jsou součástí imunitního systému. Jejich úkolem je vychytávat patogeny. Pokud M-buňky a další buňky imunitního systému (makrofágy, lymfocyty) nezachytí listérie, dostávají se tyto bakterie do krve a lymfy. Následně jsou tyto bakterie přeneseny do cílových orgánů (McMullen & Freitag 2014).



Obrázek 3 Mechanismus translokace *L. monocytogenes* přes střevní epitel (Lecuit & Cossart 2001).

3.3.1. Rizikové skupiny

U zdravých jedinců většinou způsobuje *L. monocytogenes* neinvazivní formu listeriózy v podobě gastroenteritidy (zánět trávicího traktu, postihující žaludek i tenké střevo). V tomto případě většinou není potřeba odborná pomoc, infekce za pár dní odezní. Pokud bakterie překoná střevní bariéru, může způsobit závažnější systémové onemocnění. Toto je velmi pravděpodobné u jedinců, kteří patří do tzv. rizikových skupin.

Podle věku rozlišujeme 3 hlavní rizikové skupiny. Novorozenci, těhotné ženy a osoby vyššího věku (nad 60 let). Dalšími rizikovými jedinci jsou osoby s oslabenou imunitou. Konkrétně jsou to pacienti s nádorovým onemocněním, jedinci nakažení virem HIV nebo žloutenkou. Listerióza může též postihnout osoby podstupující dlouhodobě léčbu imunosupresivy (látky potlačující funkci imunitního systému) nebo antacidy (léčiva snižující kyselost žaludečního obsahu) (Brychta J 2018).

3.3.2. Faktory virulence

Virulentní faktory, které pomáhají bakterii při vstupu do hostitelské buňky, pohybu a rozšíření do dalších buněk, budou tématem následujících řádků. Obecně, aby došlo k vyvolání onemocnění, jsou zapotřebí faktory virulence, které zahájí infekci a ovlivní její následný průběh.

Jak již bylo několikrát zmíněno, *L. monocytogenes* se dostává do trávicího traktu hostitele nejčastěji kontaminovanou potravou. Bakterie musí odolávat vlivu proteolytických enzymů hostitele, kyselému žaludečnímu prostředí a žlučovým solím (Sleator et al. 2003).

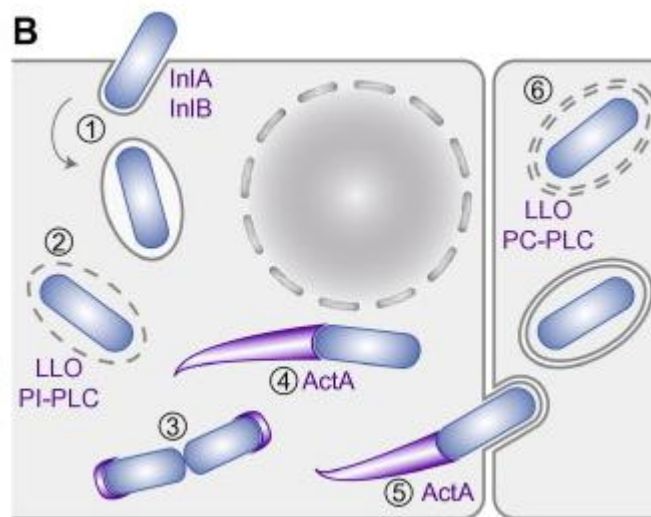
Poté, co *L. monocytogenes* projde horními částmi trávicího traktu, adereje k epiteliálním hostitelským buňkám a dostává se z jejich povrchu do nitra. Do nitra buňky proniká za pomoci povrchových proteinů zvaných internaliny. Nejvýznamnější jsou Internalin A (InIA) a Internalin B (InIB). Internaliny představují virulentní faktory, které zajišťují rozpoznání buněčných receptorů hostitele. Pomáhají při vstupu patogenu do hostitelských buněk. Hlavní rolí InIA je jeho interakce s transmembránovým proteinem E-kadherinem, za účelem zprostředkování vstupu bakterie do epiteliálních buněk. InIB usnadňuje vstup do širšího spektra typů hostitelských buněk, včetně hepatocytů, fibroblastů a epiteliálních buněk. Po interakci Internalinu s receptorem je *L. monocytogenes* obklopena cytoplazmatickou membránou buňky a uzavřena do nově vzniklé vakuoly zvané fagozom (Liu 2006).

K tomu aby listérie unikla z fagozomu je zapotřebí faktor virulence, kterým je listeriolysin O (LLO), toxin produkovaný bakterií *L. monocytogenes*. Tento toxin vytváří póry a ve spolupráci s fosfatidylinositol-fosfolipázou C (PI-PLC) a fosfatidylcholin-fosfolipázou C (PC-PLC) zprostředkovává únik bakterie. *L. monocytogenes* se uvolní do cytosolu, kde dochází k jejímu růstu a množení. Aby se mohla bakterie pohybovat, tak je vyžadován další povrchový protein, ActA (Actin-assembly inducing protein). Tento protein zajišťuje polymeraci buněčného aktinu, to vede ke vzniku kometového ocasu, který umožňuje intracelulární motilitu a šíření bakterie z buňky do buňky. Listérie jsou pohlceny sousedními

buňkami, což vede k tvorbě zdvojených membránových vakuol. Opuštění těchto vakuol napomáhá již zmiňovaný listeriolysin O a fosfatidylcholin-fosfolipáza C. Úspěšné překonání zdvojené membrány vakuoly signalizuje začátek nového infekčního cyklu.

Výše zmiňované faktory virulence jsou řízeny geny. Regulace exprese těchto genů je zajištěna pozitivním regulačním faktorem A (PrfA). Signál, který indukuje aktivaci PrfA není známý. Byly izolovány kmeny *L. monocytogenes*, které obsahují mutace v genu *PrfA*, což má za následek konstitutivní aktivaci PrfA (Bruno Jr & Freitag 2010). Pozitivní regulační faktor je velmi důležitý řídicí mechanismus, který zodpovídá za celý proces infekce buňky. Bez tohoto faktoru by bakterie nebyla schopna šířit se z buňky do buňky, adherovat k cytoplazmatické membráně dalších buněk, uniknout z fagozomu a replikovat se v cytosolu (Vázquez-Boland et al. 2001).

Pro lepší pochopení průběhu šíření listérií v hostiteli je na obrázku číslo 4 znázorněn intracelulární životní cyklus *L. monocytogenes*.



Obrázek 4 Intracelulární životní cyklus *Listeria monocytogenes* (Cossart & Lebreton 2014). Listerie vstupuje do hostitelské buňky pomocí interakce InlA a InlB s příslušnými receptory. Pomocí LLO a PI-PLC bakterie uniká z fagozomu. *L. monocytogenes* se může replikovat v cytosolu. Protein ActA stimuluje polymeraci buněčného aktinu, vzniká kometový ocas, umožňující intracelulární motilitu a šíření bakterií z buňky do buňky. Překonání zdvojené membrány vakuoly zprostředkováno působením LLO a PC-PLC.

3.4. Klinické příznaky

3.4.1. Gastroenteritida

L. monocytogenes může způsobit febrilní gastroenteritidu u zdravých osob. Listerie se vyskytuje pouze v buňkách epitelu tenkého střeva, nikam dál se nešíří. Nemoc se obvykle objevuje 24 hodin po požití kontaminované potravy. Většinou trvá 2 dny. Mezi běžné příznaky patří horečka, vodnatý průjem, nevolnost, bolest hlavy, kloubů a svalů. Většinou není třeba zahájit léčbu, infekce postupně sama odezní (Lorber 2005).

3.4.2. Infekce v těhotenství a novorozenecká infekce

Během těhotenství je imunita zprostředkovaná T-buňkami mírně narušena. Z tohoto důvodu jsou těhotné ženy náchylné k rozvoji listeriální infekce. Ačkoliv se onemocnění může objevit ve všech stádiích těhotenství, nejčastěji je pozorováno během třetího trimestru. Nejčastěji se nemoc v těhotenství projevuje jako bakteriémie (přítomnost bakterií v krvi). Mezi běžné projevy nemoci patří horečka, bolest hlavy, myalgie (bolest svalstva), artralgie (bolest kloubů), malátnost. Gastrointestinální příznaky, včetně bolesti břicha a průjmu, jsou méně časté. U žen nakažených listeriózou jsou běžné předčasné porody. Často dochází ke spontánním potratům nebo je nutné podstoupit terapeutický potrat plodu.

Pokud listerie překoná placentární bariéru, dochází k infikování plodu *in utero*. Tato listeriální infekce vede k narození mrtvých jedinců nebo k novorozeneckým úmrtím. Při infikování novorozence v děloze, dochází k novorozenecké listerióze časného nástupu. Onemocnění se projeví při narození nebo krátce poté, obvykle během prvního týdne života. Primárním klinickým obrazem je těžká sepse s multiorgánovým postižením. Míra úmrtnosti narozených dětí se blíží 20 %. Pokud k míře úmrtí během prvního týdne života přiřadíme i frekvenci potratů a mrtvě narozených, zvýší se celková úmrtnost na více jak 50 %.

Listerióza pozdního nástupu má typické rysy novorozenecké meningitidy. V tomto případě není zcela známo, zda dochází k infikování novorozence při průchodu porodními cestami matky nebo z nemocničního prostředí. Vyskytuje se 7-20 dní po porodu. Kojenci s tímto typem listeriózy vykazují podrážděnost a nechutenství. Úmrtnost spojená s pozdním nástupem nemoci je méně než 10 %. Může docházet k pozdějšímu neurologickému poškození, jako u jiných forem novorozenecké bakteriální meningitidy (Schlech 2000; Doganay 2003).

3.4.3. Infekce CNS

Klinickými syndromy způsobenými *L. monocytogenes* v CNS jsou meningitida (zánět mozkových blan), meningoencefalitida (zánět mozku a mozkových blan) a tvorba abscesů. Meningitida je nejčastěji rozpoznávanou listeriální infekcí. *L. monocytogenes* je pátým nejčastějším původcem této nemoci. Další bakterie způsobující meningitidu jsou například *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*. Příznaky meningitidy jsou ze začátku podobné chřipkovému onemocnění. Pacient trpí vysokými horečkami, bolestmi hlavy, zad a kloubů, zvracením. Hlavním příznakem, díky němuž

můžeme rozpoznat meningitidu, je svalová ztuhlost šířící se z krční páteře. Dalšími příznaky mohou být záchvaty, třes nebo špatná koordinace pohybu. Listérie může napadnout samotný mozek. Pokud k tomu dojde, tak hovoříme o tzv. encefalidě (zánět v mozku). Při kombinaci meningitidy a encefalidity se setkáváme s onemocněním zvaným meningoencefalitida (Bartt 2000).

3.4.4. Endokarditida

Infekční endokarditida je zánět vnitřního povrchu srdce neboli endokardu, postihuje zejména srdeční chlopuň. Toto onemocnění je vzácné, ale velmi závažné. Často vede k dysfunkci chlopně a srdečnímu selhání. Listeriální endokarditida je pozorována přibližně u 8 % infikovaných dospělých jedinců. Míra úmrtnosti činí téměř 50 % (Doganay 2003).

3.5.Léčba

Léčba listeriózy je prováděna pomocí antibiotik. Nejčastěji užívanými antibiotiky jsou penicilin a ampicilin. Při léčbě ampicilinem se přidává gentamycin a to zejména při bakteriémii, meningitidě a endokarditidě. *L. monocytogenes* je citlivá i k dalším antibiotikům. Patří mezi ně erytromycin, vankomycin, tetracykliny nebo aminoglykosidy. V případě, že je pacient alergický na penicilin může mu být podán trimethoprim-sulfamethoxazol v kombinaci s amoxicilinem. Cefalosporiny představují neúčinná antibiotika, bakterie rodu *Listeria* jsou vůči nim rezistentní (Fernández Guerrero et al. 2012; Donovan 2015; McNeill et al. 2017).

Bez ohledu na to, jaké antibiotikum je zvoleno při léčbě listeriózy, rozhodujícím faktorem je jeho dávkování. Při bakteriémii, meningitidě a endokarditidě se podává ampicilin v dávce 6 g/den s možným přídatkem gentamycinu. Větší dávky ampicilinu jsou třeba v případech jako je mozkový absces, kdy dávka činí 14 g/den. Délka trvání léčby se liší dle různého typu listeriální infekce. V případě bakteriémie léčba trvá 14 dní. Meningitida se léčí 21 dní, endokarditida 6 týdnů a mozkový absces 4 – 6 týdnů (Janakiraman 2008).

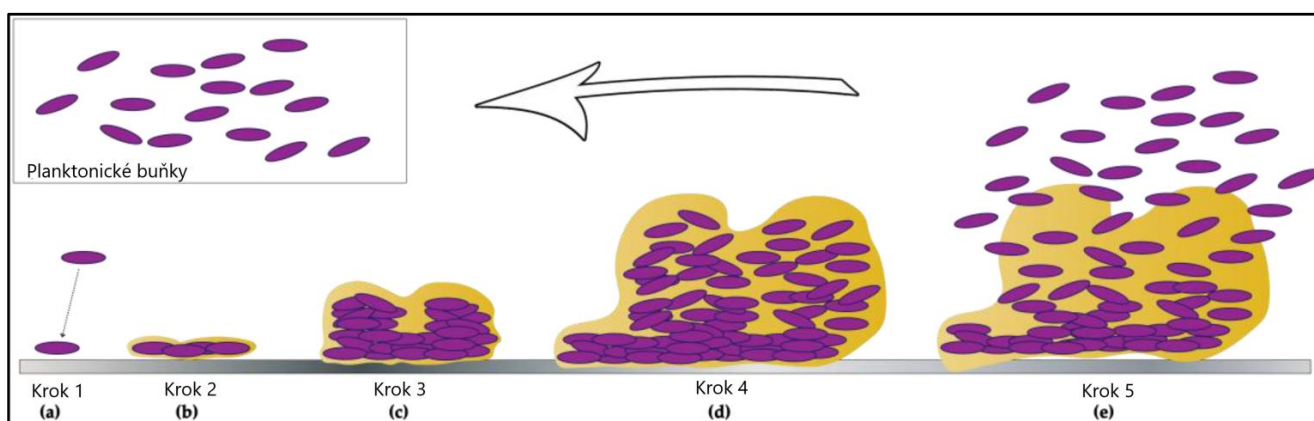
3.6. *Listeria monocytogenes* v potravinách a potravinářských zařízeních

Nyní budou podrobněji přiblíženy informace o výskytu *L. monocytogenes* v potravinářských zařízeních a v potravinách samotných.

3.6.1. Výskyt v potravinářských zařízeních

Listérie se mohou vyskytovat v prostředí potravinářských výroben, a to především díky jejich schopnosti tolerovat široký rozsah pH a růst při nízkých teplotách. Listérie se udržují v potravinářských výrobnách a provozovnách mimo jiné i proto, že jsou schopny vytvářet biofilmy. Biofilm může být široce definován jako společenství různých druhů mikroorganismů ulpívajících na povrchu (O'Toole et al. 2000). Biofilmy jako takové se mohou tvořit na široké škále povrchů, příkladem jsou zdravotnické zařízení, vodovodní potrubí, průmyslová zařízení a také zařízení pro zpracování potravin. Základní podmínkou pro vznik biofilmu je, aby byl povrch zdrsňelý. Na mechanicky narušených površích se usazují organické nečistoty, na kterých rostou bakterie a tvoří biofilm. Obecně lze říci, že se biofilmy vytváří v místech, které se špatně čistí, příkladem jsou spoje a ohyby u potravinářských zařízení (Donlan 2002).

Bakteriální buňky v rámci biofilmu jsou zabudované do matrice extracelulárních polymerních látek, jež samy produkují. Extracelulární matrice je tvořena exopolysacharidy, proteiny a extracelulární DNA, tyto látky tvoří obalovou vrstvu nazývanou matrix. Extracelulární polymerní látky jsou odpovědné za adhezenci k povrchům, soudržnost a komunikaci v biofilmu a odolnost vůči odstranění. Potenciální zdroj kontaminace představuje oddělení mikrobiálních buněk od biofilmu a jejich následné rozptýlení do prostředí (Colagiorgi et al. 2017). Na obrázku číslo 5 je schematické znázornění fází vývoje biofilmu.



Obrázek 5 Fáze vývoje biofilmu (Colagiorgi et al. 2017). (a) Bakteriální buňky adherují na povrch. (b) Adherované buňky vytvoří jednu vrstvu. Podmíní se spuštění genu pro tvorbu extracelulárních polymerů. Vytvoří se extracelulární matrice. (c) Buňky pokračují v růstu a vytváří vícevrstvé mikrokolonie. (d) Buňky jsou nevratně připojeny k povrchu a uloženy v matrici, biofilm je zralý. (e) V poslední fázi jsou buňky schopné oddělit se od biofilmu a uvolnit se do prostředí v podobě tzv. planktonických buněk a kolonizovat jiná místa.

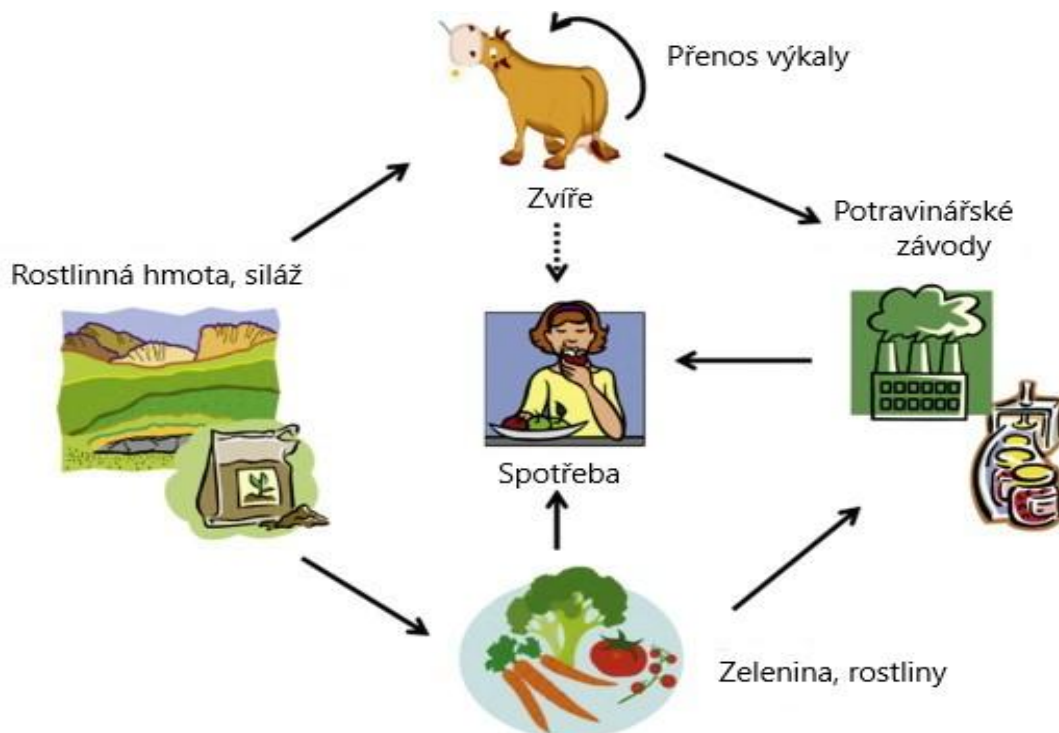
V zařízeních pro zpracování potravin se biofilmy vyskytují především v místech, kde dochází k manipulaci nebo zpracování potravin. Konkrétně se jedná o dopravní pásy a zařízení z nerezové oceli (Lee Wong 1998). Z hlediska přežití a růstu mikroorganismů v potravinářském průmyslu je přilnutí k povrchům velmi důležité. Mikroorganismy vytvářející biofilmy jsou chráněny před čištěním a dezinfekcí a je obtížné je eliminovat. Biofilmy se odstraňují obtížněji než jednotlivé buňky *L. monocytogenes*, jsou odolnější vůči dezinfekci, právě díky již zmiňované ochranné vrstvě, matrix. I přes pravidelně prováděnou sanitaci se listérie udržují v provozovnách měsíce až roky (Møretreth & Langsrud 2004).

Tvorba biofilmů ve výrobních a zpracovatelských zařízeních potravin je velice znepokojivá, protože může dojít k přenosu bakterií z kontaminovaných přístrojů a povrchů na potravinářské výrobky. Pokud se dostanou kontaminované plochy do styku s potravinami, hrozí kontaminace těchto potravin a následné zvýšení rizika nakažení listeriózou. *L. monocytogenes* je běžně izolována zejména v zařízeních pro zpracovávání masa, masných výrobků a mléka (Pritchard et al. 1995; Midelet & Carpentier 2002).

3.6.2. Výskyt v potravinách

L. monocytogenes se často nachází v různých surovinách a potravinách. Vyskytuje se v mase, mléce, sýrech, rybách, vejcích, paštikách, zelenině a dalších produktech. Tyto potraviny lze souhrnně nazvat jako rizikové potraviny (Bortolussi 2008).

Na obrázku číslo 6 je znázorněno šíření patogenu v prostředí. *L. monocytogenes* se nachází v půdě, rostlinném materiálu, výkalech nebo silážích. Právě výkaly a siláže mohou představovat zdroj infekce pro zvířata. Produkty zvířat (mléko, maso) se přímo dostávají ke spotřebitelům, případně jsou dále zpracovávány v potravinářských závodech. V potravinářských zařízeních může také dojít ke kontaminaci produktů, které jsou následně určené ke spotřebě. Stejně tomu je i v případě zeleniny a ostatních produktů patřících mezi rizikové potraviny (McMullen & Freitag 2014).



Obrázek 6 Šíření *L. monocytogenes* v prostředí (McMullen & Freitag 2014).

Z masných výrobků je touto bakterií nejčastěji kontaminováno syrové maso vepřové či hovězí, mleté maso nebo paštiky. Ryby a mořské plody patří též mezi potraviny, ve kterých se *L. monocytogenes* může vyskytovat, konkrétním příkladem je uzený losos, který patří mezi ryby uzené studeným kouřem. Dalšími potravinami jsou například syrová krájená zelenina, zeleninové saláty a lahůdkářské výrobky. Obecně k nejrizikovějším potravinám patří potraviny s vysokým stupněm opracování a potraviny určené k přímé spotřebě, které jsou po dlouhou dobu skladovány při chladírenských teplotách, což může vést k nárůstu bakterie až do infekční dávky. Tak jako pro ostatní patogenní bakterie v potravinách, i v případě listérií je velmi důležitá prevence (Coillie et al. 2004; Kramarenko et al. 2013; Jami et al. 2014). Výskytu *L. monocytogenes* v syrovém a pasterovaném mléce, v mléčných výrobcích, zvláště v sýrech se podrobněji věnuje kapitola 3.9.

3.7.Prevence

Proti listerióze neexistuje žádné očkování. Lze pouze doporučit určitá preventivní opatření. Listeriíza je relativně vzácné onemocnění, o němž většina spotřebitelů nemá dostatečné informace. V rámci prevence proti tomuto onemocnění je třeba, aby spotřebitelé znali základní informace a preventivní opatření. Na webových stránkách Státní zemědělské a potravinářské inspekce byl zveřejněn článek, který obsahuje informace a doporučení pro spotřebitele ve vztahu k nebezpečí výskytu *Listeria monocytogenes* v potravinách a současně doporučení výrobcům a prodejcům.

3.7.1. Doporučení pro spotřebitele a rizikové skupiny

Dostatečnou prevencí je dodržování základních požadavků osobní hygieny a bezpečné manipulace s potravinami. Velmi důležité je udržování čistoty, zahrnující mytí rukou před přípravou pokrmů, mezi jednotlivými činnostmi a po ukončení práce. V rámci udržování čistoty se musí pracovní plochy a povrchy v kuchyni oplachovat vodou a dezinfekčním prostředkem. Dalším krokem, pro úspěšnou prevenci, je zabránění tzv. křížové kontaminaci. Křížová kontaminace je činnost, při které dochází k přenosu škodlivých mikroorganismů, jako je *L. monocytogenes*, z „nečistých“ potravin např. ze syrového masa, z pracovních ploch, z rukou nebo náčiní na potraviny určené k přímé spotřebě, případně pokrmy. Aby nedošlo k této kontaminaci, je nutné dodržovat následující pokyny:

- používat jiné krájecí prkénko a náčiní pro syrové maso a drůbež a jiné pro ostatní potraviny nebo je důkladně mezi činnostmi omývat horkou vodou a mycím prostředkem
- omývat pracovní plochy a nezapomínat na mytí rukou po každé manipulaci se syrovým masem
- ovoce a zeleninu před konzumací důkladně omýt
- nikdy nedávat hotové pokrmy do nádob, ve kterých předtím bylo syrové maso nebo drůbež, aniž by tato nádoba byla důkladně omyta
- zmrazené maso a drůbež rozmrazovat v chladničce, proudu studené vody nebo v mikrovlnné troubě a po rozmrazení začít co nejrychleji s tepelnou úpravou, protože při rozmrazování masa při pokojové teplotě se vytváří ideální podmínky pro pomnožení mikroorganismů
- oddělovat nakoupené suroviny během jejich přepravy a následného uskladnění od hotových výrobků (např. prosakující šťáva z balíčku masa kontaminuje jiné potraviny uložené společně v chladničce)
- nakoupené potraviny ihned odvézt domů, a co nejrychleji uložit chlazené a zmrazené potraviny do chladničky či mrazničky
- nenechávat měkké zrající sýry „dozrát“ při pokojových teplotách

Zchlazování a zmrazování potravin by se mělo provádět bez zbytečných prodlev. Studené pokrmy je třeba udržovat při teplotě do 4 °C. Na druhé straně je též velmi důležitá

důkladná tepelná úprava pokrmů. Těmito doporučeními by se měli řídit především jedinci z rizikových skupin. Tito spotřebitelé by se měli vyvarovat konzumaci rizikových potravin. Například těhotné ženy by neměly jíst měkké zrající sýry (SZPI 2015).

3.7.2. Doporučení pro výrobce

Doporučení pro výrobce ve vztahu k nebezpečí výskytu *L. monocytogenes* zahrnuje hlavní zásady, kterými jsou:

- prověření a revize postupů založených na principech HACCP stanovených pro výrobu potravin z hlediska výskytu *L. monocytogenes*
- v souladu s požadavky nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ověřovat, zda výrobky, které představují riziko výskytu *L. monocytogenes* pro veřejné zdraví, odpovídají předepsaným mikrobiologickým kritériím
- v souladu s nařízením Komise (ES) č. 2073/2005 analyzovat trendy ve výsledcích vyšetření
- vyloučení možnosti sekundární kontaminace hotových výrobků

Každý výrobce by měl ze svého vyráběného sortimentu vybrat ty potraviny, u nichž se dá očekávat vyšší výskyt bakterie *L. monocytogenes*, tzv. rizikové potraviny. K výrobě, zejména rizikových potravin, by měli výrobci používat suroviny od prověřených dodavatelů. Výrobci by měli od dodavatele rizikových surovin požadovat výsledky mikrobiologických vyšetření dodávaných surovin. Je nutné organizovat pořadí výroby tak, aby riziko mikrobiální kontaminace výrobku bylo co nejmenší. Pokud jsou vyráběny výrobky na stejném výrobním zařízení, měly by být vzaty v úvahu následující zásady:

- zpracovávat nejprve suroviny s nižším stupněm rizika a následně suroviny rizikovější
- výrobky, které nejsou v dalším procesu podrobeny ošetření, jež omezuje přítomnost *L. monocytogenes* vyrábět dříve než ty, které takovému ošetření podrobeny budou

Výrobce musí kontrolovat důsledné dodržování osobní hygieny zaměstnanců pracujících v bezprostředním kontaktu s nebalenými potravinami, surovinami. Měl by vést zaměstnance k plnění povinnosti, neprodleně ohlásit příznaky onemocnění, které může být přenášeno potravinami. V rámci prevence je zapotřebí ověřovat účinnost sanitačních postupů ve vztahu k eliminaci *L. monocytogenes*. Příkladem je ověřování, zda jsou dezinfekční prostředky používány v doporučených koncentracích. Účinnost sanitace lze ověřovat pomocí stěrů. Další důležitou kontrolou je kontrola dodržování předepsaných teplot úchovy potravin a surovin již při přejímce zboží a též při uskladnění v zázemí výroby.

Výrobci vyrábějící potraviny, které mohou představovat riziko *L. monocytogenes* pro veřejné zdraví, musí odebrat vzorky z míst a zařízení pro zpracování a získané vyšetření musí analyzovat. Zjistí-li trend směrem k nevyhovujícím výsledkům, podniknou bez zbytečného odkladu příslušná opatření k nápravě situace. Za účelem minimalizace rizika kontaminace *L. monocytogenes* by si měli výrobci v rámci analýzy nebezpečí výskytu projít nejen celý

vyráběný sortiment, ale i všechny prováděné činnosti. Měli by hledat, co se může stát a co učiní, aby nenastala chyba, a nedošlo tak k narušení bezpečnosti potravin.

Vzhledem k tomu, že v prostředí provozoven přežívají bakterie *L. monocytogenes* ve výrobním zařízení, na podlahách, stěnách, stropech, v kanalizačním systému, ve výrobních a manipulačních prostorách provozovny, na dopravních prostředcích apod., je zapotřebí vytipovat staro/nová místa v procesu zacházení s potravinami, zejména tam, kde by mohla *L. monocytogenes* znamenat ohrožení bezpečnosti potravin, především s ohledem na jejich sekundární kontaminaci. Například zavlečení bakterie do výrobních provozoven vstupními surovinami, zaměstnanci, případně jinými cestami (SZPI 2015).

3.7.3. Doporučení pro prodejce

V první řadě by prodejci měli uvádět do oběhu pouze potraviny od prověřených výrobců. Měli by v rámci odběratelsko-dodavatelských vztahů vyžadovat od svých dodavatelů relevantní důkazy v dostatečné četnosti o tom, že dodávané potraviny jsou bezpečné.

Musí být dodržovány chladicí podmínky. Chladicí a mrazicí zařízení se nesmí přepřínovat a je třeba provádět kontrolu teplot. Z důvodu možné křížové kontaminace je nutné striktně dodržovat povinnost odděleného uchovávání potravin určených k přímé spotřebě a potravin určených k tepelnému ošetření. Prodejce musí zamezit riziku sekundární kontaminace nebalených potravin správnou manipulací s nimi:

- precizním čištěním a následnou dezinfekcí nástrojů, chladících vitrín, nádob na studenou kuchyni, krájecího, porcovacího a balícího zařízení
- nezasunováním cenovek do potravin
- krájením rizikových potravin po dávkách, čištěním a dezinfikováním kráječe po různých druzích
- dodržováním doporučených koncentrací, teplot a doby působení použitých dezinfekčních prostředků
- ověřováním účinnosti sanitačních postupů ve vztahu k eliminaci *L. monocytogenes*

Dodržování zásad osobní hygieny je základním předpokladem pro dostatečnou prevenci. Zaměstnanci pracující v potravinářství musí pečovat o tělesnou čistotu. V souvislosti s možným výskytem *L. monocytogenes* právě ruce vyžadují největší péči, neboť jejich prostřednictvím lze nejnáze přenést tuto bakterii na potraviny. Ruka představuje univerzální prostředek k přenosu škodlivých mikroorganismů, protože se někdy v rychlém sledu dotýká znečištěných a čistých předmětů, surovin či hotových výrobků. Z tohoto důvodu si zaměstnanci musí důkladně mýt ruce po jednotlivých úkonech, jež v práci vykonávají. Případně mohou nosit rukavice, které si budou pravidelně měnit (SZPI 2015).

3.8.Epidemiologická data

3.8.1. Listeriόza v EU

Následující řádky budou zaměřeny na ohniska a případy listeriόzy v zemích Evropské unie (EU). Součástí této kapitoly bude co nejaktuálnější souhrnný přehled případů v jednotlivých zemích, sestavený na základě informací od organizací EFSA (European Food Safety Authority) a ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Přestože listeriόza není příliš časté onemocnění, z hlediska úmrtnosti na nemoc z potravin, zaujímá první místo.

EFSA je Evropský úřad pro bezpečnost potravin. Tato organizace má za úkol shromažďovat a analyzovat data na úrovni EU, sledovat a charakterizovat možná rizika, která mají přímý či nepřímý vliv na bezpečnost potravin a krmiv, zajišťovat přístup veřejnosti k objektivním informacím. Státy EU mají zákonnou povinnost oznamovat organizaci EFSA případy listeriόzy. ECDC je centrum pro kontrolu a prevenci nemocí. Cílem této organizace je převážně monitorování a prevence infekčních onemocnění.

Obecně můžeme říci, že výskyt listeriόzy v rámci EU vykazuje od roku 2008 rostoucí trend. Tabulka 1 zobrazuje potvrzené případy listeriόzy a četnost na 100 000 obyvatel. V tabulce je uvedeno 28 členských států a u každého z nich je zaznamenaný vývoj výskytu listeriόzy od roku 2014 do roku 2018 (údaje za rok 2019 nebyly v době zpracování bakalářské práce k dispozici). Z údajů v tabulce je patrné, že v některých státech za posledních 5 let došlo k nárůstu onemocnění. Na druhé straně v některých zemích počty případů každým rokem kolísají. V několika případech dochází rok od roku k zaznamenávání poklesu případů. Celkový počet případů ze všech 28 členských států EU v roce 2018 dosáhl nejvyšší hodnot za posledních 5 let.

Tabulka 1 Potvrzené případy listeriózy a četnost na 100 000 obyvatel, EU, 2014 – 2018 (EFSA, 2019).

Země	2018		2017		2016		2015		2014	
	případ y	n/100000 obyvatel	případy	n/100000 obyvatel	případy	n/100000 obyvatel	případy	n/100000 obyvatel	případy	n/100000 obyvatel
Belgie	74	0,81	73	0,80	103	1,14	83	0,74	84	0,75
Bulharsko	9	0,13	13	0,18	5	0,07	5	0,07	10	0,14
Česká republika	31	0,29	30	0,28	47	0,45	36	0,34	38	0,36
Dánsko	49	0,85	58	1,01	40	0,70	44	0,78	92	1,64
Estonsko	27	2,05	4	0,30	9	0,68	11	0,84	1	0,08
Finsko	80	1,45	89	1,62	67	1,22	46	0,84	65	1,19
Francie	338	0,51	370	0,55	375	0,56	412	0,62	373	0,57
Chorvatsko	4	0,10	8	0,19	4	0,10	2	0,05	4	0,09
Itálie	178	0,29	164	0,27	179	0,30	153	0,25	132	0,22
Irsko	21	0,43	14	0,29	13	0,28	19	0,41	15	0,33
Kypr	1	0,12	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Litva	20	0,71	9	0,32	10	0,35	5	0,17	7	0,24
Lotyšsko	15	0,78	3	0,15	6	0,30	8	0,40	3	0,15
Lucembursko	5	0,83	5	0,85	2	0,35	0	0,00	5	0,91
Maďarsko	24	0,25	36	0,37	25	0,25	37	0,38	39	0,40
Malta	1	0,21	0	0,00	1	0,22	4	0,93	1	0,24
Německo	683	0,82	725	0,88	665	0,81	557	0,69	573	0,71
Nizozemsko	69	0,40	108	0,63	89	0,52	71	0,42	90	0,54
Polsko	128	0,34	116	0,31	101	0,27	70	0,18	87	0,23
Portugalsko	64	0,62	42	0,41	31	0,30	28	0,27	-	-
Rakousko	27	0,31	32	0,36	46	0,53	38	0,44	49	0,58
Rumunsko	28	0,14	10	0,05	9	0,05	12	0,06	5	0,03
Řecko	19	0,18	20	0,19	20	0,19	31	0,29	10	0,09
Slovensko	17	0,31	12	0,22	10	0,18	18	0,33	29	0,54
Slovinsko	10	0,48	13	0,63	15	0,73	13	0,63	18	0,87
Španělsko	370	0,89	284	-	362	-	206	-	161	-
Švédsko	89	0,88	81	0,81	68	0,69	88	0,90	125	1,30
Spojené království	168	0,25	160	0,24	201	0,31	186	0,29	201	0,31
EU celkem	254	0,47	2479	0,48	2503	0,47	2183	0,43	2217	0,46

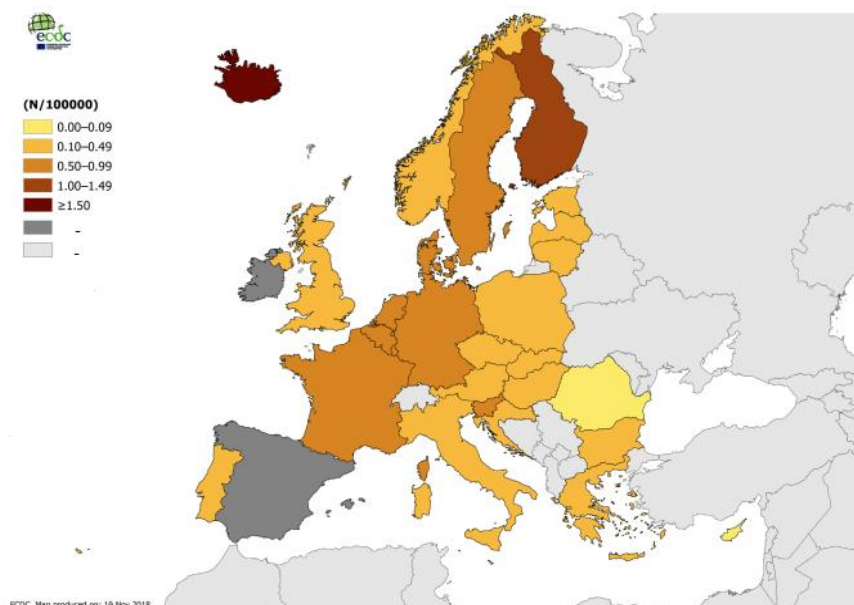
Nyní budou podrobněji rozebrány informace o výskytu listeriózy za rok 2017 a 2018. V roce 2017 uvedlo 28 členských států 2480 potvrzených případů listeriózy. Nejvíce případů v přepočtu na 100 000 obyvatel bylo zaznamenáno ve Finsku (1,62), Dánsku (1,01), Německu (0,88), Lucembursku (0,85), Švédsku (0,81) a Belgii (0,80). Nejméně případů bylo v Bulharsku, Chorvatsku, Rumunsku, na Kypru a Maltě. Četnost činila méně než 0,2 na 100 000 obyvatel.

Ze všech zoonóz, které jsou pod dohledem EU, bylo z důvodu nákazy listeriózou hospitalizováno nejvíce případů. V roce 2017 oznámilo 16 členských států 225 úmrtí v důsledku listeriózy. Počet úmrtí lehce klesl oproti roku 2016, kdy onemocnění podlehl 247 osob. Mezi rokem 2008 a 2016 došlo k stálému nárůstu počtu úmrtí za rok. Celková úmrtnost za rok 2017 činila 13,8 %. Francie byla zemí s nejvyšším počtem smrtelných případů, konkrétně 59, následovalo Německo s 27 případy.

Infekce způsobené *L. monocytogenes* byly nejčastěji hlášeny ve věkové skupině nad 64 let. V EU se podíl případů v této věkové skupině neustále zvyšuje. V roce 2008 představoval 54,8 % ze všech případů, v roce 2017 67,2 %.

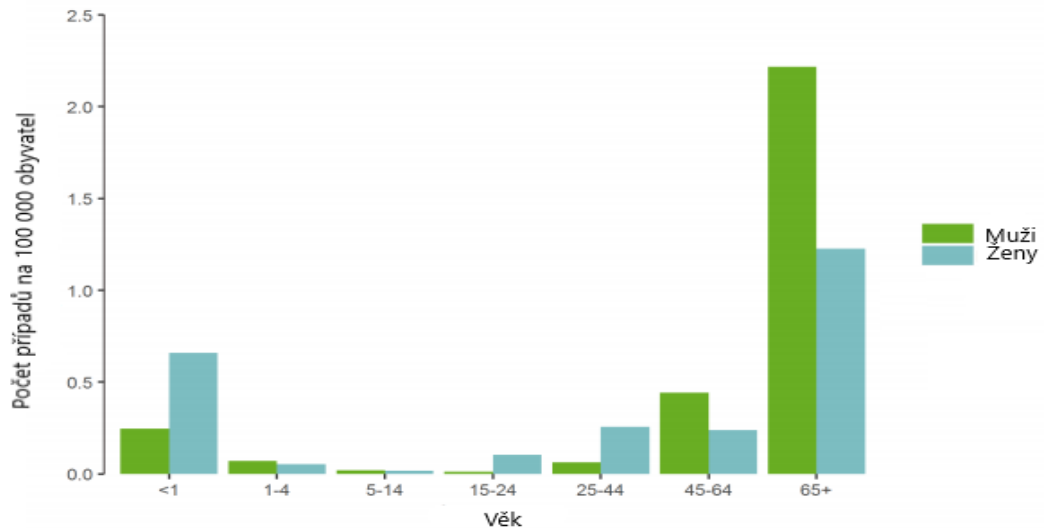
Většina případů byla způsobena konzumací potravin z domácího trhu, několik bylo spojeno s cestováním v rámci EU nebo mimo ni. Zdrojem šíření patogenu nebyly jen rizikové potraviny, jako jsou maso, masné výrobky, ryby a sýry. V posledních letech byly příčinou ohnisek listeriózy jiné potraviny. Příkladem můžou být zmražená kukuřice, melouny, zmrzliny nebo klíčky. V roce 2017 celková prevalence u ryb a rybích výrobků byla 6 %, u masa a masných výrobků 1,8 %, u měkkých a poloměkkých sýrů 2,4 %, u tvrdých sýrů < 1 %, u ovoce a zeleniny 0,6 % (EFSA & ECDC 2018).

Na obrázku číslo 7 jsou barevně rozděleny potvrzené případy listeriózy přepočtené na 100 000 obyvatel v zemích Evropské unie pro rok 2017.



Obrázek 7 Potvrzené případy listeriózy na 100 000 obyvatel v zemích EU, 2017 (ECDC 2020).

Obrázek číslo 8 graficky znázorňuje rozdělení potvrzených případů listeriózy na 100 000 obyvatel, podle věku a pohlaví. Z grafu je patrné, že nejvíce případů postihuje muže ve věkové kategorii 65 let a více, následují ženy v téže kategorii. Druhou výraznější kategorií je věková skupina do 1 roku.



Obrázek 8 Rozdělení případů listeriózy na 100 000 obyvatel, podle věku a pohlaví v EU, 2017 (ECDC 2020).

Počet případů v roce 2018 oproti roku 2017 mírně stoupl. Celkový počet případů činil 2549, což odpovídá 0,47 na 100 000 obyvatel. Estonsko (2,05), Finsko (1,45), Švédsko (0,88) a Dánsko (0,85) patřily mezi státy s nejvíce případy. Nejméně případů bylo v Bulharsku, Chorvatsku, Rumunsku a na Kypru. Četnost byla menší než 0,15 na 100 000 obyvatel. V roce 2018 oznámilo 19 členských států 229 úmrtí v důsledku listeriózy. Celková úmrtnost v EU činila 15,6 %, což je o 2 % více než v roce 2017. Zemí s nejvyšším počtem smrtelných případů bylo Polsko s 56 případy, následovala Francie s 42 případy. V roce 2018 celková prevalence u ryb a rybích výrobků byla 2,7 %, u masa a masných výrobků 1,4 %, u měkkých a poloměkkých sýrů < 0,8 %, u tvrdých sýrů < 0,5 % (ECDC & EFSA 2019).

Jednou z aktuálních událostí je ohnisko, jež bylo identifikováno v Nizozemsku. Listerióza postihla 19 jedinců. Nemoc se u pacientů projevila mezi rokem 2017 a srpnem roku 2019. Pacienti byli nakaženi prostřednictvím masných výrobků, určených k přímé spotřebě. Nizozemská výrobní společnost tyto výrobky distribuovala do několika zemí EU i mimo ni. Společnost byla nucena zastavit výrobu a v říjnu roku 2019 dokončila stažení všech výrobků z míst, do nichž je distribuovala (ECDC & EFSA 2019).

Další událostí je ohnisko, které zasáhlo několik zemí. Celkový počet nahlášených případů činil 22. Devět případů bylo nahlášeno v Dánsku, šest v Estonsku, dva ve Finsku, jeden ve Francii a čtyři ve Švédsku. 5 pacientů zemřelo. První případ byl zaznamenán v červenci roku 2014 v Estonsku, poslední se vyskytl v únoru roku 2019 v Dánsku. Zjistilo se, že ke kontaminaci došlo konzumací rybích produktů uzených za studena. Konkrétním produktem byl uzený losos a pstruh. Předpokládá se, že ohnisko pocházelo z estonské společnosti, která zpracovává ryby a rybí produkty. Nadále je však nutné další šetření a identifikace zdroje infekce. Dokud nebude přesně identifikován zdroj infekce, mohou se stále vyskytovat nové invazivní případy listeriózy, spojené s touto událostí (ECDC & EFSA 2019).

Od roku 2015 je zaznamenáno ohnisko invazivních infekcí *L. monocytogenes* v Rakousku, Dánsku, Finsku, Švédsku a ve Spojeném království ohnisko. Zdrojem nákazy byla zmrazená kukuřice, případně zeleninová směs obsahující kukuřici. Celkem bylo nahlášeno 47 případů. Infekci podlehl 9 pacientů. Dostupné informace potvrzují původ kontaminace v maďarské továrně. Dne 29. června 2018 zakázal Maďarský úřad pro bezpečnost v potravinovém řetězci prodej všech mražených zeleninových produktů včetně zeleninových směsí produkovaných dotčeným závodem v období srpna 2016 do června 2018 a nařídil jejich okamžité stažení z trhu. Toto opatření pravděpodobně významně sníží riziko infekce u lidí a zabrání šíření listérií z tohoto zdroje. V postiženém závodě byly pozastaveny veškeré mrazící činnosti. Aby se snížilo riziko infekce, spotřebitelé by měli pečlivě tepelně zpracovat mraženou zeleninu, která není přímo určená k spotřebě, a to i přesto, že se tyto produkty běžně konzumují bez vaření. Toto doporučení platí zejména pro spotřebitele z rizikových skupin (EFSA & ECDC 2018).

3.8.2. Výskyt listeriózy v České republice

V porovnání s ostatními infekcemi představuje listerióza poměrně málo časté onemocnění vyskytující se v České republice. Ročně je nahlášováno pár desítek případů. Následující tabulka číslo 2 znázorňuje počty případů listeriózy a úmrtí na území ČR v období od ledna roku 2006 do prosince roku 2018.

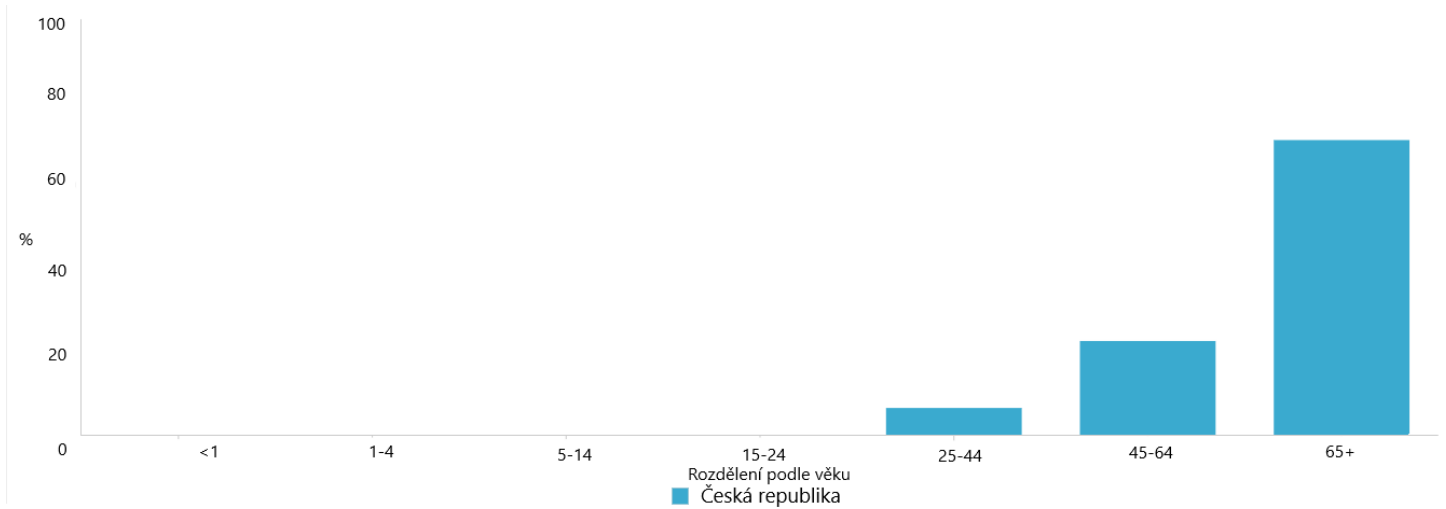
Tabulka 2 Počet případů listeriózy a úmrtí na území ČR v letech 2006-2018 (ECDC & EFSA 2019).

Rok	Počet případů listeriózy	Počet úmrtí
2006	78	12
2007	51	8
2008	37	8
2009	32	8
2010	26	5
2011	35	8
2012	32	5
2013	35	7
2014	37	5
2015	34	10
2016	46	11
2017	30	4
2018	36	7

Z tabulky je patrné, že v průběhu těchto let došlo k několika viditelným výkyvům. První byl zaznamenán v letech 2006 a 2007. V roce 2006 bylo nahlášeno 78, z nichž zemřelo 12 pacientů. V roce 2007 počet případů činil 51 z toho 8 úmrtí. Došlo k rozšíření nemoci do 39 okresů. Pacienti se nakazili konzumací kontaminovaného zrajícího sýru, který byl v té době dostupný v distribuční síti (Beranová 2007; Gelbíčová et al. 2018).

Další ohnisko se vyskytlo v Jihočeském kraji v období mezi červencem 2008 a únorem 2009. Čtyři z nakažených pacientů zemřeli. Původcem nemoci byla vakuově balené vepřová šunka. V roce 2010 bylo nahlášeno oproti minulým rokům jen 26 případů. Poslední výkyv byl zaznamenán v roce 2016, kdy počet případů dosáhl hodnoty 46 případů, z nichž 11 pacientů zemřelo. V Moravsko-Slezském kraji se vyskytlo ohnisko, při němž bylo nakaženo 14 případů. Zdrojem listeriózy bylo krutí maso (Gelbíčová et al. 2018).

Na obrázku číslo 9 je graficky znázorněné procentuální zastoupení případů v jednotlivých věkových kategoriích v ČR za rok 2018. V roce 2018 bylo celkově nahlášeno 36 případů. Z toho 71 % případů patřilo do věkové skupiny 65 let, 22,6 % do skupiny 45-64 let a 6,5 % do skupiny 24-44 let.



Obrázek 9 Grafické zobrazení potvrzených případů listeriózy na základě věku v ČR za rok 2018. (ECDC & EFSA 2019).

3.9. Výskyt *L. monocytogenes* v mléce a sýrech

Výskytu listérií v mléce a mléčných výrobcích se věnuje značná pozornost. Případy listeriózy způsobené konzumací kontaminovaného mléka a mléčných výrobků byly hlášeny po celém světě. Mléko je produkt vylučovaný mléčnou žlázou savců, sloužící primárně k výživě jejich mláďat. Základními složkami jsou voda, bílkoviny, laktóza a mléčný tuk. Dále obsahuje řadu vitamínů a minerálů. Ve výživě člověka je významným zdrojem vápníku. Zejména díky téměř neutrálnímu pH a vysoké aktivitě vody představuje mléko vynikající kultivační médium pro mikroorganismy, včetně patogenů. Zdrojem kontaminace mléka mohou být mastitidy vyvolané *L. monocytogenes*. V tomto případě jsou listérie vylučovány přímo do mléka. Tento způsob kontaminace není příliš častý. Ke kontaminaci dochází především během dojení, konkrétně krmivem (zejména siláží), podestýlkou, výkaly nebo rukama dojičů. Fekální kontaminace mléka, v důsledku nedostatečné hygieny dojení, může vést k adhezi a růstu listérií na zařízení mléčnic (potrubí, filtry, tanky), které se následně podílí na znečištění mléka. Sezónní výskyt v syrovém mléce, s maximem v říjnu až březnu, má souvislost s vyšším počtem porodů krav v zimním období. V tomto období bývají zkrmovány i méně kvalitní siláže, ve kterých bývá *L. monocytogenes* často přítomna (Hunt et al. 2012; Quigley et al. 2013; Muthulakshmi et al. 2018).

Bylo zjištěno, že počet listérií v čerstvém mléce se snižuje během prvních dvou dní po nadojení, což je patrně způsobeno baktericidními vlastnostmi mléka. Teprve po třech dnech při skladování v 7 °C dochází k růstu *L. monocytogenes*. Je tedy pravděpodobné, že v čerstvém mléce (do tepelného opracování) uchovávaném při 4°C se listérie nepomnožují. Tepelné ošetření v podobě pasterace mléka při 71,7 °C po dobu 15 sekund ničí *L. monocytogenes*. Správně tepelně ošetřené a asepticky balené mléko nebývá zdrojem listérií. Přesto bylo pasterované mléko hlášeno jako zdroj listeriózy člověka. Jak již bylo zmíněno, listérie se vyskytují ve zpracovatelských závodech. Vytvářejí biofilmy na dojících strojích, zejména v oblastech s obtížným přístupem jako jsou těsnění a klouby. Právě kolonizace těchto zařízení může mít za následek křížovou kontaminaci pasterovaného mléka (Pantoja et al. 2012).

K výrobě sýrů se nejčastěji používá kravské mléko. Celosvětově asi 85 %. Méně často mléko od jiných druhů hospodářských zvířat, příkladem je mléko ovčí, kozí, buvolí. V Evropské unii se ve valné většině sýry vyrábí z pasterovaného mléka. Sýry vyrobené ze syrového mléka musí dle nařízení nést označení „ze syrového mléka“ (ES č. 853/2004).

Mikrobiologická kvalita sýrů je ovlivněna mnoha faktory. Jedním z nich je mikrobiologická kvalita mléka použitého k výrobě. Dle předpisů EU jsou stanoveny požadavky na jakost syrového mléka. Hygienická jakost je dána počtem somatických buněk a množstvím reziduí inhibičních látek. V mléce musí být počet somatických buněk nižší než 400 tisíc buněk v 1 ml a obsah reziduí inhibičních látek negativní. Mikrobiologická jakost mléka je dána celkovým počtem mikroorganismů, který musí být méně než 100 tisíc kolonií tvořících jednotek v 1 ml (Marth & Steele 2001; Kvapilík & Syrůček 2013). Mléko prochází během výrobního procesu sýrů pasterací, přesto v případě vysoce kontaminovaného mléka

nemusí být pasterace dostatečně účinná. Z tohoto důvodu je kvalita výchozí suroviny (mléka) při výrobě sýrů velmi důležitá. Neméně důležitá je hygiena výrobního zařízení a prostředí, v nichž může dojít ke kontaminaci. Nejčastěji kontaminovanými místy jsou podlahy, odtokové kanály, přepravní nádoby nebo tvarovací stroj (Gelbíčová et al. 2011).

Při výrobě sýrů jsou velmi důležité technologické vlastnosti mléka. Mezi technologické vlastnosti mléka jsou řazeny kysací schopnost, syřitelnost a termostabilita. Kysací schopnost je schopnost fermentace laktózy bakteriemi mléčného kvašení (schopnost přeměňovat laktózu na kyselinu mléčnou). Mléko nesmí obsahovat látky, které by tlumily nebo eliminovaly mlékařské kultury, například reziduální látky léčiv či zbytky dezinfekčních přípravků. Syřitelnost představuje schopnost mléka srážet se po přidání syřidla. Faktory, které ovlivňují syřitelnost jsou především obsah kaseinu a zastoupení jeho frakcí, velikost a stavba kaseinových micel, obsah a formy vápníku, fosforu a dalších minerálních látek v mléce, obsah tuku, pH, teplota a další. Termostabilita je schopnost mléka zachovat si původní koloidní vlastnosti při zahřevu. Ukazatelem termostability je relativní odolnost mléčných bílkovin proti koagulaci při zahřátí (Law & Tamime 2010).

Technologie výroby sýrů zahrnuje několik kroků. Pro výrobu kvalitních sýrů je zapotřebí kvalitní mléko s vysokým obsahem bílkovin. Prvním krokem ve výrobě sýrů je úprava mléka. Úprava mléka zahrnuje termizaci, při které se mléko zahřívá na 57-68 °C po dobu minimálně 15 sekund. Termizace zajišťuje prodloužení trvanlivosti suroviny. Spory termorezistentních sporulujících mikroorganismů v důsledku termizace vyklíčí a následná pasterace je zničí. Samotná pasterace by tyto termorezistentní sporulující mikroorganismy nezničila. Při výrobě sýrů se používá šetrná pasterace, při které se mléko zahřívá na 72 °C po dobu 15-20 sekund. Pro zvýšení bakteriologické kvality je možné místo termizace použít mechanické metody odstranění mikroorganismů, jako je baktofugace a mikrofiltrace. Baktofugace slouží především k odstranění spor *Clostridium butyricum*, které přežívají pasteraci a v případě, že se dostanou do sýra, tak v něm produkují kyselinu máselnou a plyny, které mají za následek nežádoucí duření sýrů. Významným krokem je také deaerace (odvzdušnění) mléka. Mléko se po tepelné úpravě standardizuje na požadovaný obsah tuku v sýru. Do mléka se přidávají aditiva. Příkladem je chlorid vápenatý, který zajišťuje lepší syřitelnost a zlepšení kvality syřeniny. Dalším aditivem může být dusičnan draselný, který potlačuje růst koliformních, sporotvorných anaerobních mikroorganismů. Dalším výrobním krokem je předkysání (fermentace). Do mléka jsou přidány startovací kultury (BMK), které mění strukturu sýru a zajišťují zvýšení ochrany před působením nežádoucích mikroorganismů produkcí kyselin (mléčné a octové). Základní kulturou, při výrobě sýrů, je smetanová kultura. Do smetanové kultury jsou řazeny bakterie rodu *Lactococcus* a *Leuconostoc*. Tyto bakterie kromě kyseliny mléčné a octové, které snižují pH, produkují také diacetyl, díky němuž je rozvíjena chuť a vůně sýrů. Přídavek čistých mlékařských kultur je pro správný průběh technologického procesu nezbytný. Pro výrobu sýrů se dále mohou používat doplňkové kultury. Příkladem je *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* nebo *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Následně je mléko vytemperováno na

teplotu sýření tj. 29-33 °C. Poté se přidává syřidlo (chymosin, pepsin), v případě sýrů vyráběných pomocí sladkého srážení. V případě kyselého srážení se syřidlo nepřidává a k vysrážení kaseinu dojde v důsledku snížení pH činností bakterií mléčného kvašení. Vytvořená sraženina se krájí na sýrová zrna a poté se míchá, aby došlo k odloučení syrovátky a vytužení zrn. Pro zlepšení odvodnění se syrovátka může zahřívat. Podle použité teploty se sýry rozdělují na sýry s vysokodohříváním a nízkodohříváním sýřeninou. Sýry se formují podle toho, jaký typ sýra se vyrábí. Dalším krokem je lisování a solení sýrů. Posledním velmi důležitou fází při výrobě sýrů je zrání. Zrání je souhrn procesů vedoucích k získání typických atributů (vzhled, vůně, chuť, konzistence, složení). Základními procesy jsou glykolýza (laktóza → kyselina mléčná), proteolýza (bílkoviny → aminokyseliny), lipolýza (mléčný tuk → volné mastné kyseliny). Na zrání se podílí nativní enzymy mléka (laktoperoxidáza), syřidlo, mikrobiální enzymy (mlékařské kultury, nestartérové kultury – propionová, plísňová, mazová), kontaminující mikroorganismy. Sýry zrají ve zracích sklepích (Marth & Steele 2001; Robinson 2002; Fernandes 2009; Law & Tamime 2010).

Sýry se dělí dle různých kritérií. Jedním z nich je dělení podle konzistence. Tato klasifikace je vyjádřena jako obsah vody v tukuprosté hmotě sýra. Dle obsahu dělíme sýry na měkké, u nichž procentuální obsah vody je vyšší než 67 %. Poloměkké sýry mají obsah vody 62-69 %, polotvrdé 54-63 %, tvrdé 49-56 % a extra tvrdé méně než 51 %. Měkké sýry můžeme rozdělit na sýry nezrající tedy čerstvé a zrající (Martinez-Rios & Dalgaard 2018).

Čerstvé (tvarohové) sýry jsou určeny k přímé konzumaci bez dalšího zrání. Vyznačují se jemnou texturou a mírně kyselou chutí. Díky fyzikálně-chemickým vlastnostem jsou vhodné pro růst listerií. Obsah vody těchto sýrů se pohybuje nad 50 %, pH je vyšší než 6 a obsah solí činí pouhých 0,85 %. Čerstvý sýr se obvykle vyrábí bez konzervačních látek, skladuje se při 4 °C. Relativně vysoké pH a aktivita vody umožňují růst listerií při této teplotě. Mezi čerstvé sýry patří například Burrata, Mozzarella, Cottage, Queso-Fresco, Mascarpone-Ricotta, smetanový sýr (Coelho et al. 2014; Gérard et al. 2018).

Měkké sýry zrající procházejí krátkým obdobím zrání ve sklepích. Doba zrání se liší podle typu a velikosti vyráběného sýra. Teplota a vlhkost ve zracích sklepích se také přizpůsobuje vyráběnému sýru. Teplota zrání by se měla pohybovat v intervalu 10-20 °C, vlhkost kolem 80 %. Obecně mají měkké sýry krémovou strukturu a jsou snadno roztíratelné. Do této skupiny se řadí i plísňové sýry. Konkrétně sýry s plísní na povrchu, sýry s plísní v těstě či dvouplísňové sýry. Mezi sýry s plísní na povrchu jsou řazeny sýry typu Camembert, De Brie či Hermelín. Povrch mají pokrytý bílou ušlechtilou plísní *Penicillium camemberti*. Obsah solí činí 3,5 % a pH se pohybuje v rozmezí 4,6-4,8. Francouzský Roquefort, italská Gorgonzola či česká Niva patří mezi sýry s plísní v těstě. Jsou protkané modrou nebo zelenou plísní *Penicillium roqueforti*. Jejich pH dosahuje hodnoty 4,9 a obsah solí 4 %. Proces zrání v přítomnosti těchto mikroorganismů rozvíjí charakteristickou vůni, chuť a strukturu těchto sýrů (Schvartzman et al. 2014; Gérard et al. 2018).

Mezi měkké sýry se řadí i sýry zrající pod mazem, příkladem může být Romadur nebo Olomoucké tvarůžky. U zrajících sýrů, především s mazem na povrchu, se listériím daří ve vrstvě pod mazem a povrchem sýrů. V této vrstvě má dostatek živin a vody a je zde chráněna před některými bakteriociny, které produkují startovací kultury (Brychta J 2018). Povrchovou mazovou kulturu tvoří bakterie mléčného kvašení spolu s kvasinkami. Příkladem bakterií mléčného kvašení náležících k mazové kultuře jsou *Brevibacterium linens* a bakterie rodu *Micrococcus*. Kvasinky zastupuje *Kluyveromyces marxianus* subsp. *lactis* a *Candida famata* nebo *Candida utilis* (Marth & Steele 2001).

Zrání a skladování představují kritické fáze, při nichž může docházet ke změnám (zvyšování) pH v jádře a v kůře sýru, a tím ke zvyšování výskytu listérií. Sýrová kůra a jádro se od sebe liší. Kůra je méně kyselá, tudíž příznivější pro množení patogenu. *L. monocytogenes* byla izolována na povrchu několika sýrů. Vzhledem k tomu, že ke kontaminaci dochází častěji po zpracování, je třeba dávat pozor, aby se listérie nedostaly například při krájení z kůry do jádra sýra. Někdy je doporučováno, aby byla kůra před konzumací sýra odstraněna (Gérard et al. 2018).

Přežití listérií v sýru závisí především na podmínkách pH, vlhkosti, obsahu soli a teplotě během výroby a skladování. Z tohoto hlediska jsou měkké sýry pro přežití a růst listérií nejpříznivější. Měkké sýry zrající jsou kontaminované *L. monocytogenes* mimo jiné kvůli vysokému množství manipulace po jejich zpracování (Linton et al. 2008; Gérard et al. 2018).

V současné době nejsou hlášeny případy listeriózy způsobené konzumací tvrdých sýrů. Polotvrdé a tvrdé sýry mají nižší aktivitu vody než sýry měkké a poloměkké. Snížení je způsobeno rychlým srážením a intenzivním lisováním sraženiny v kombinaci s prodlouženou dobrou zrání (Gérard et al. 2018). Polotvrdé sýry mají obsah soli na konci solení 2-2,5 %. pH se pohybuje kolem 5,2. Zrají ve zrácích sklepích při vhodném teplotním a vlhkostním režimu, který je přizpůsoben typu sýru. Mezi sýry polotvrdé jsou řazeny sýra, jako je Eidam, Gouda a Čedar. Tvrdé sýry se po lisování solí, poté se nechávají zrát v chladném sklepě při teplotě 12-14 °C a následně při teplotě 22-24 °C po dobu až 8 týdnů. Do skupiny tvrdých sýrů patří Ementál a Parmezán (Anděl et al. 2012).

Po celém světě byly hlášeny případy listeriózy způsobené konzumací sýrů kontaminovaných *L. monocytogenes*. Jednalo se o měkké sýry vyrobené ze syrového mléka, ale také sýry z pasterovaného mléka, zejména měkké zrající i nezrající a poloměkké sýry. Na základě toho vznikly studie, jež se zabývají faktory, které ovlivňují růst a přežití listérií v sýrech. Případy listeriózy byly mimo jiné spojovány s konzumací syrového mléka (Lundén et al. 2004).

Bakterie mléčného kvašení, které jsou přidávány do mléka při výrobě sýrů, produkují mimo jiné i bakteriociny. Bakteriociny jsou antimikrobiální peptidové látky. Používají se jako přírodní konzervační látky potravin. Inhibují růst potravinářských patogenů a zlepšují mikrobiální kvalitu a bezpečnost sýrů (Cleveland et al. 2001). Bakterie rodu

Lactococcus lactis produkují bakteriocin nisin, jehož inhibiční účinky na listérie byly prokázány v několika studiích. Bylo prokázáno, že nisin má antimikrobiální aktivitu při kyselém pH. U zrajících sýrů počet listérií v přítomnosti nisinu klesá na počátku zrání. V průběhu zrání dochází ke zvýšení pH a následné obnově růstu listérií. Celkový počet na konci zrání je díky inhibičním účinkům nisinu nižší (Kondrotiene et al. 2018). Dalším bakteriocinem produkovaným bakteriemi rodu *Lactococcus lactis* je lakticin. V rámci studie byly zkoumány inhibiční účinky lakticinu na *L. monocytogenes* v sýru zrajícím pod mazem. Bylo zjištěno, že aplikace bakteriocinu před kontaminací listériemi není tak účinná. Účinky lakticinu se výrazněji projevují až po přidání do již kontaminovaného sýru. Počty listérií po aplikaci klesají. Kvůli zvýšení pH v průběhu zrání dochází stejně jako u nisinu k obnově růstu listérií. Další studie zkoumala další aplikace živých kultur produkujících lakticin pro kontrolu a udržení nízkých hladin listérií po celou dobu zrání. Bylo prokázáno, že aplikace v průběhu zrání snižuje hladinu listérií v sýrech. Výraznější inhibiční účinky bakteriocinů, případná eliminace listérií byla pozorována při nízké úrovni počáteční kontaminace. Dalšími bakteriociny, u nichž byly prokázány inhibiční účinky proti listériím, jsou pediocin, produkovaný bakteriemi rodu *Pediococcus* a enterocin, který produkují bakterie rodu *Enterococcus* (Cleveland et al. 2001; O'Sullivan et al. 2005).

Dalším faktorem, který ovlivňuje přítomnost listérií v sýrech, je obsah soli. Sůl má účinky na vodní aktivitu. Během zrání se sůl z povrchu sýru dostává do jeho hmoty. Voda ze sýra přechází do solného roztoku, což způsobí snížení aktivity vody sýra. Při nízké aktivitě vody je pro bakterie volně k dispozici méně vody, což může vést k inhibici jejich růstu. K inaktivaci listérií dochází v případě, že vodní aktivita sýra klesne pod 0,92. Při této hodnotě aktivity vody *L. monocytogenes* neroste (Wemmenhove et al. 2014, Wemmenhove et al. 2016).

Standardní metody používané pro eliminaci *L. monocytogenes* z potravin zahrnující tepelné ošetření surovin pasterací, snížení pH přidavkem kyselin nebo fermentací, snížení aktivity vody přidavkem NaCl a využití bakteriocinů bakterií mléčného kvašení s antilisteriální aktivitou nemusí být vždy dostatečně účinné. Byla objevena možnost využívající přírodních antagonistů patogenních bakterií, kterými jsou specifické bakteriofágy. Využití bakteriofágů představuje způsob potlačování patogenních bakterií v potravinách bez ovlivnění důležitých parametrů, jako jsou organoleptické vlastnosti či nutriční hodnota (Plocková & Horáčková 2015). Bakteriofágy jsou nejčastěji vyskytující se viry v přírodním prostředí. Rozlišují se dva typy životních cyklů bakteriofágů, cyklus virulentní (lytický) a cyklus lysogenní. Fágy virulentní během virulentního cyklu napadají bakterie, vstupují do jejich cytoplasmy a využívají genetickou informaci hostitelské bakterie pro svou replikaci, což vede ke smrti bakteriální buňky a uvolnění množství zralých fágových částic schopných atakovat další bakteriální buňky do prostředí. V rámci lysogenního cyklu vstupují fágy do bakteriální buňky, integrují svou nukleovou kyselinu do bakteriálního chromozomu (vzniká tzv. profág) nebo zůstávají v bakteriální buňce ve formě plasmidu, ale nezpůsobují smrt hostitelské bakteriální buňky.

Pro účely eliminace nežádoucích patogenních bakterií z potravin, včetně listérií, se používají fágy virulentní (Chibani-Chennoufi et al. 2004).

Účinnost bakteriofágů je závislá na vnitřních a vnějších faktorech prostředí, na typu potraviny, v níž je požadovaná redukce počtu nebo úplná eliminace *L. monocytogenes*. Bylo prokázáno, že počet listérií v sýrech lze snížit až o 5 řádů. Dále závisí účinnost bakteriofágových preparátů na momentu aplikace a teplotě skladování potraviny ošetřené preparátem. Jestliže je bakteriofág aplikován příliš pozdě, je jeho účinnost snížena. Efektivní může být aplikace na povrch sekundárně zrajících sýrů s plísní nebo s mazem, zvláště v případech nižší počáteční koncentrace *L. monocytogenes*, kde je možné dosáhnout redukce listérií pod limit detekce ve srovnání s kontrolou bez použití bakteriofágů, kde za stejných podmínek zrání dochází ke zvýšení jejího počtu cca o 6 řádů (Plocková & Horáčková 2015; Henderson et al. 2019).

V dnešní době je především rizikovým skupinám doporučováno vyvarovat se konzumaci nepasterovaného mléka, sýrů vyrobených z nepasterovaného mléka, měkkých zrajících sýrů, které jsou svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi ideální pro růst a množení listérií. V polotvrdých a tvrdých sýrech *L. monocytogenes* byla izolována, ale tyto sýry nejsou z hlediska podmínek příliš vhodné pro růst a množení listérií. Z toho vyplývá, že *L. monocytogenes* se může v těchto sýrech vyskytovat, ale ne v takovém množství, které by bylo rizikové pro člověka (Gérard et al. 2018).

4. Závěr

Z údajů v literatuře vyplývá, že *L. monocytogenes* představuje patogenní bakterii způsobující vážná alimentární onemocnění. Její výskyt v potravinách není příliš častý, nicméně je třeba věnovat této problematice pozornost. Listérie se nachází v půdě, výkalech nebo silážích, které mohou představovat zdroj infekce pro zvířata. Produkty zvířat (mléko, maso) se dostávají ke spotřebitelům. Ke kontaminaci potravin může dojít i v potravinářských zařízeních, ve kterých *L. monocytogenes* přežívá v podobě biofilmů. Z tohoto důvodu je třeba výskyt listérií monitorovat a přijímat určitá preventivní opatření. Velmi důležité je upozorňovat rizikové skupiny. V rámci prevence by měli spotřebitelé, zejména z rizikových skupin, dodržovat základní požadavky osobní hygieny a bezpečné manipulace s potravinami. *L. monocytogenes* se vyskytuje v sýrech, které mají vhodné podmínky pro její růst a množení. Mezi takové sýry patří především sýry vyrobené z nepasterovaného mléka, měkké zrající sýry (Camembert, De Brie, Hermelín), čerstvé (tvarohové) sýry (Burrata, Mozzarella, Cottage, Quesco-Fresco) a sýry zrající pod mazem (Romadur, Olomoucké tvarůžky). Tyto sýry by neměly konzumovat těhotné ženy a ostatní jedinci rizikových skupin.

5. Seznam zkratek

ActA – Actin-assembly inducing protein (aktin-indukující protein)

BMK – Bakterie mléčného kvašení

EDCD – European Centre for Disease Prevention and Control (Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí)

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

EU – Evropská unie

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

InIA – Internalin A

InIB – Internalin B

LLO – listeriolysin O

PC-PLC – Fosfatidylcholin fosfolipáza C

PI-PLC – Fosfatidylinositol fosfolipáza C

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

6. Reference

- Allerberger F, Wagner M. 2010. Listeriosis: A resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection* **16**:16–23. European Society of Clinical Infectious Diseases. Available from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x>.
- Anděl M, Dostálová J, Dlouhý P, Drbohlav J. 2012. Sýry a tvarohy ve výživě.
- Bartt R. 2000. Listeria and Atypical Presentation of Listeria in the Central Nervous System. Page Seminars in Neurology. Georg Thieme Verlag KG, New York.
- Beranová E. 2007. Listeriόza – co všechno bychom o ní měli vědět. Available from <https://www.khshk.cz/khsdata/epi/clanky/listerioza.pdf>.
- Bhunia AK. 2018. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis, 2nd edition. Springer Science+ Business Media, New York.
- Bortolussi R. 2008. Public health: Listeriosis: A primer. *Cmaj* **179**:795–797.
- Bruno Jr JC, Freitag NE. 2010. Constitutive Activation of PrfA Tilts the Balance of Listeria monocytogenes Fitness Towards Life within the Host versus Environmental Survival **5**.
- Brychta J. 2018. Výskyt Listeria monocytogenes v potravinách a riziko onemocnění pro člověka.
- Carpentier B, Cerf O. 2011. Review - Persistence of Listeria monocytogenes in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* **145**:1–8. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>.
- Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann M, Brussow H. 2004. Phage-Host Interaction : an Ecological Perspective **186**:3677–3686.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins : safe , natural antimicrobials for food preservation. *Internatiol Journal of Food Microbiology* **71**.
- Coelho MC, Silva CCG, Ribeiro SC, Dapkevicius MLNE, Rosa HJD. 2014. Control of Listeria monocytogenes in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **191**:53–59. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029>.
- Coillie E van, Werbrouck H, Heyndrickx M, Herman L, Rijpens N. 2004. Prevalence and Typing of Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Food Products on the Belgian Market **67**:2480–2487.
- Colagiorgi A, Bruini I, Di Ciccio PA, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. 2017. Listeria monocytogenes Biofilms in the Wonderland of Food Industry.
- Cossart P, Lebreton A. 2014. A trip in the “new Microbiology” with the bacterial pathogen Listeria monocytogenes. *FEBS Letters* **588**:2437–2445.
- Doganay M. 2003. Listeriosis : clinical presentation **35**:173–175.
- Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* **8**:881–890.

- Donovan S. 2015. Listeriosis: A Rare but Deadly Disease. *Clinical Microbiology Newsletter* **37**:135–140. Elsevier Inc. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2015.08.001>.
- ECDC. 2020. Listeriosis Annual Epidemiological Report for 2017.
- ECDC, EFSA. 2019a. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 6 infections linked to ready-to-eat meat products. EFSA Supporting Publication **16**.
- ECDC, EFSA. 2019b. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products. EFSA Supporting Publication **16**.
- EFSA, ECDC. 2018a. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses , zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA JOURNAL **16**.
- EFSA, ECDC. 2018b. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb , multi-locus sequence type 6 , infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update. EFSA Supporting Publication **15**.
- ES č. 853/2004: Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu
- Fernandes R. 2009. *Microbiology handbook dairy products*. Leatherhead Food International Ltd.
- Fernández Guerrero ML, Torres R, Mancebo B, González-López JJ, Górgolas M, Jurdado JJ, Roblas RF. 2012. Antimicrobial treatment of invasive non-perinatal human listeriosis and the impact of the underlying disease on prognosis. *Clinical Microbiology and Infection* **18**:690–695.
- Ferreira V, Wiedmann M, Teixeira P, Stasiewicz MJ. 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection* **77**:150–170.
- Gandhi M, Chikindas ML. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* **113**:1–15.
- Gelbíčová T, Karpíšková R, Demnerová K. 2011. Mléko a prostředí mlékárenské výroby: Zdroje a cesty šíření *Listeria monocytogenes*. *Mlékařské listy*.
- Gelbíčová T, Zobaníková M, Tomáščíková Z, Van Walle I, Ruppitsch W, Karpíšková R. 2018. An outbreak of listeriosis linked to turkey meat products in the Czech Republic , 2012 – 2016. *Epidemiology and Infection* **146**:1407–1412.
- Gérard A, El-Hajjaji S, Niyonzima E, Daube G, Sindic M. 2018. Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese — A review. *Dairy Technology* **71**:825–843.
- Henderson LO, Skeens J, Kent D, Murphy S, Wiedmann M, Guariglia-Oropeza V. 2019. Environmental conditions and serotype affect *Listeria monocytogenes* susceptibility to phage treatment in a laboratory cheese model. *Journal of Dairy Science* **102**:9674–9688. American Dairy Science Association. Available from <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-16474>.

- Hunt K, Drummond N, Murphy M, Butler F, Buckley J, Jordan K. 2012. A case of bovine raw milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Irish Veterinary Journal* **65**:18–20.
- Jami M, Ghanbari M, Zunabovic M, Domig KJ, Kneifel W. 2014. *Listeria monocytogenes* in Aquatic Food Products — A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**.
- Janakiraman V. 2008. Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment, and prevention. *Reviews in obstetrics & gynecology* **1**:179–85. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19173022> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2621056>.
- Kondrotiene K, Kasnauskyste N, Serniene L, Golz G, Alter T, Kaskoniene V, Maruska AS, Malakauskas M. 2018. Characterization and application of newly isolated nisin producing *Lactococcus lactis* strains for control of *Listeria monocytogenes* growth in fresh cheese. *LWT- Food Science and Technology* **87**:507–514.
- Kramarenko T, Roasto M, Meremäe K, Kuningas M, Põltasama P, Elias T. 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* **30**:24–29.
- Kvapilík J, Syrůček J. 2013. Počet somatických buněk a další ukazatele jakosti mléka. *Mlékařské listy*.
- Law BA, Tamime AY. 2010. *Technology of Cheesemaking*, 2nd edition.
- Lecuit M, Cossart P. 2001. *L.monocytogenes*. *Molecular Medical Microbiology* **1**:1437–1455.
- Lee Wong AC. 1998. Biofilms in Food Processing Environments. *Journal of Dairy Science* **81**:2765–2770. Elsevier. Available from [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75834-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75834-5).
- Linton M, Mackle AB, Upadhyay VK, Kelly AL, Patterson MF. 2008. The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: A comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **9**:423–428.
- Liu D. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology* **55**:645–659.
- Lorber B. 2005. Gastroenteritis Due to *Listeria monocytogenes*. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **24**:854.
- Lundén J, Tolvanen R, Korkeala H. 2004. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *Journal of Dairy Science* **87**:6–12.
- Lungu B, Ricke SC, Johnson MG. 2009. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe* **15**:7–17. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.08.001>.
- Marth EH, Steele JL. 2001. *Applied dairy microbiology*, 2nd edition.

- Martinez-Rios V, Dalgaard P. 2018. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. *Food Control* **84**:205–214. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.020>.
- McMullen PD, Freitag NE. 2014. *Listeria monocytogenes*. Page Molecular Medical Microbiology: Second Edition. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00074-3>.
- McNeill C, Sisson W, Jarrett A. 2017. Listeriosis: A Resurfacing Menace. *Journal for Nurse Practitioners* **13**:647–654. Elsevier, Inc. Available from <https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2017.09.014>.
- Midelet G, Carpentier B. 2002. Transfer of Microorganisms, Including *Listeria monocytogenes* from various materials to beef. *Microbiology* **68**:4015–4024.
- Møretrø T, Langsrud S. 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* **1**:107–121.
- Muthulakshmi K, Uma C, Sivagurunathan P, Satheeshkumar S. 2018. Occurrence of *Listeria Monocytogenes* in Milk and Milk Products. *International Journal of Current Research in Life Science* **07**:1572–1574.
- Nolan DA, Chamblin DC, Troller JA. 1992. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology* **16**:323–335.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology* **54**:49–79.
- O'Sullivan L, O'Connor EB, Ross RP, Hill C. 2005. Evaluation of live-culture-producing lacticin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* **100**:135–143.
- Pantoja JCF, Rodrigues ACO, Hulland C, Reinemann DJ, Ruegg PL. 2012. Investigating contamination of bulk tank milk with *Listeria monocytogenes* on a dairy farm. *Food Protection Trends* **32**:512–521.
- Plocková M, Horáčková Š. 2015. Využití bakteriofágů k eliminaci *Listeria monocytogenes* z povrchu měkkých sekundárně zrajících sýrů. *Mlékařské listy*.
- Pritchard TJ, Flanders KJ, Donnelly CW. 1995. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. *International Journal of Food Microbiology* **26**:375–384.
- Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews* **37**:664–698.
- Robinson RK. 2002. *Dairy microbiology handbook - the microbiology of milk and milk products*. John Wiley and Sons.
- Saltijeral JA, Alvarez VB, Garcia B. 1999. Presence of *Listeria* in Mexican cheeses. *Journal of Food Safety* **19**:241–247.
- Schardt J, Jones G, Müller-Herbst S, Schauer K, D'Orazio SEF, Fuchs TM. 2017. Comparison between *Listeria sensu stricto* and *Listeria sensu lato* strains identifies novel determinants involved in infection. *Scientific Reports* **7**:1–14.

- Schlech WF. 2000. Special section: food safety. *Clinical Infectious Diseases* **31**:770–775. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913408>.
- Schvartzman MS, Gonzalez-Barron U, Butler F, Jordan K. 2014. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear- or mold-ripened cheese. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
- Sleator RD, Gahan CGM, Hill C. 2003. A Postgenomic Appraisal of Osmotolerance in. *Microbiology* **69**:1–9.
- SZPI. 2015. Prevence onemocnění z potravin: Listeriόza. Available from <https://www.szpi.gov.cz/clanek/prevence-onemocneni-z-potravin-listerioza.aspx>.
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews* **14**:584–640. Available from https://www.inetsoft.com/business/solutions/objectives_of_business_intelligence_project/.
- Weller D, Andrus A, Wiedmann M, den Bakker HC. 2015. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**:286–292.
- Wemmenhove E, Beumer RR, Hooijdonk ACM Van, Zwietering MH, Wells-Bennik MHJ. 2014. The fate of *Listeria monocytogenes* in brine and on Gouda cheese following artificial contamination during brining. *International Dairy Journal* **39**:253–258. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.06.002>.
- Wemmenhove E, Wells-Bennik M, Stara A, Hooijdonk A van, Zwietering M. 2016. How NaCl and water content determine water activity during ripening of Gouda cheese, and the predicted effect on inhibition of *Listeria monocytogenes* **99**:5192–5201.