



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ
ΜΕ ΤΟ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ**

**Διερεύνηση της παρουσίας βακτηρίων *Listeria spp.* σε
ψάρια του γλυκού νερού καθώς και στο περιβάλλον των
καταστημάτων πώλησης ψαριών στους νομούς Φλώρινας
και Κοζάνης.**

**Θεόφιλος Θ. Παπαδόπουλος
Κτηνίατρος**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Α. Αμπραχίμ, Επίκουρος Καθηγητής, Επιβλέπων
Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Κτηνιατρική Σχολή Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης

Φ. Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας & Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Α. Γκόβαρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Διπλωματική εργασία που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της
Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης**

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2008



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ
ΜΕ ΤΟ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ**

**Διερεύνηση της παρουσίας βακτηρίων *Listeria spp.* σε
ψάρια του γλυκού νερού καθώς και στο περιβάλλον των
καταστημάτων πώλησης ψαριών στους νομούς Φλώρινας
και Κοζάνης.**

**Θεόφιλος Θ. Παπαδόπουλος
Κτηνίατρος**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Α. Αμπραχίμ, Επίκουρος Καθηγητής, Επιδέπων
Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Κτηνιατρική Σχολή Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης

Φ. Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας & Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Α. Γκόβαρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Διπλωματική εργασία που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της
Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης**

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2008



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7510/1
Ημερ. Εισ.: 10-09-2009
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
639.31
ΠΑΠ



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ
ΜΕ ΤΟ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ**

**Διερεύνηση της παρουσίας βακτηρίων *Listeria spp.* σε
ψάρια του γλυκού νερού καθώς και στο περιβάλλον των
καταστημάτων πώλησης ψαριών στους νομούς Φλώρινας
και Κοζάνης.**

**Θεόφιλος Θ. Παπαδόπουλος
Κτηνίατρος**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Α. Αμπραχίμ, Επίκουρος Καθηγητής, Επιδέπων
Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Κτηνιατρική Σχολή Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης

Φ. Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας & Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Α. Γκόβαρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Διπλωματική εργασία που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της
Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης**

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2008



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE MASTER OF PHILOSOPHY,
POSTGRADUATE PROGRAM ORGANIZED BY FACULTY OF
VETERINARY MEDICINE IN COOPERATION
WITH TEI OF EPIRUS.**

*Incidence of Listeria spp. in fresh water fish and environment of fish
markets in Florina and Kozani prefectures.*

Theofilos T. Papadopoulos
Veterinarian

Laboratory of Food Hygiene of Animal Origin, School of Veterinary Medicine,
Aristotle's University of Thessaloniki

KARDITSA 2008

Στην ιερή μνήμη του πατέρα μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προσβολή των ψαριών του γλυκού νερού από βακτήρια του γένους *Listeria* spp, που πωλούνται στους νομούς Φλώρινας και Κοζάνης και αλιεύονται εν μέρει σε λίμνες των νομών αυτών, καθώς και η μόλυνση του περιβάλλοντος πώλησης των ψαριών αυτών διερευνήθηκαν σε εργαστηριακές συνθήκες. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η βακτηριακή μόλυνση, από *Listeria monocytogenes*, τόσο της επιφάνειας και της σάρκας των ψαριών πέστροφας και πεταλούδας, όσο και του περιβάλλοντος πώλησης των ψαριών αυτών καθώς και να εκτιμηθεί ο τρόπος με τον οποίο μολύνονται τα ψάρια. Μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τη Λιστέρια σε σχέση με τα ψάρια του γλυκού νερού, πραγματοποιήθηκε πειραματικό πρωτόκολλο κατά το οποίο εξετάστηκαν, για την παρουσία του μικροοργανισμού, 30 ψάρια του είδους *Carassius auratus gibelio* (πεταλούδες) και 30 ψάρια του είδους *Oncorhynchus mykiss* (ιριδίζουσες πέστροφες) καθώς και 70 δείγματα από το περιβάλλον πώλησης τους και στη συνέχεια έγινε η απαραίτητη στατιστική ανάλυση. Η βιβλιογραφική ανασκόπηση αφορούσε τα χαρακτηριστικά του βακτηρίου, τη λιστερίωση ως νόσο, τις μεθόδους απομόνωσης, τον ρόλο των ψαριών στην επιδημιολογία της νόσου και την παρουσία του μικροβίου στα ψάρια, τα ιχθυοσκευάσματα, στο περιβάλλον των καταστήματα πώλησης και των εργοστασίων επεξεργασίας των αλιευμάτων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν ότι το ποσοστό μόλυνσης των ψαριών που εξετάστηκαν είναι σχετικά μικρό αφού δεν ανιχνεύθηκε λιστέρια στη σάρκα από τις πέστροφες ενώ στις πεταλούδες βρέθηκε μόνο ένα θετικό δείγμα. Σημαντικό εύρημα ήταν η πολύ μεγαλύτερη μόλυνση της επιφάνειας των ψαριών σε ποσοστό 20% στις πεταλούδες και 3.33% στις πέστροφες. Σε σχέση με το περιβάλλον πώλησης των ψαριών, διαπιστώθηκε ότι

μόλυνση με Λιστέρια εμφανίστηκε σε δάπεδα (16,67%), μαχαίρια (16,67%), χέρια (15,38%), επιφάνειες κοπής (20%) και ιχθυοκιβώτια (5,56%). Συμπερασματικά με βάση τα παραπάνω ευρήματα διαπιστώνεται ότι στη σάρκα των ψαριών δε φαίνεται να υπάρχει ιδιαίτερα μεγάλο πρόβλημα με βακτήρια του γένους *Listeria spp.*, ενώ η αύξηση της παρουσίας βακτηρίων στην επιφάνεια των ψαριών φαίνεται να είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης από τις διαδικασίες σύλληψης, χειρισμού και συντήρησης των ψαριών, κάτι που ενισχύεται και από το γεγονός πως το περιβάλλον πώλησης των ψαριών βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα μολυσμένο. Η παρούσα μελέτη θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω με χρήση μοντέρνων μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης του μικροβίου καθώς και να εμπλουτιστεί με νέα δείγματα από τόσο από τα δίκτυα συλλογής των ψαριών όσο και από το νερό των λιμνών έτσι ώστε να διευκρινιστεί επακριβώς η πηγή και ο τρόπος μόλυνσης των ψαριών με το μικρόβιο της Λιστέριας.

ABSTRACT

The level of bacterial contamination by *Listeria spp.*, of fresh water fish that are being sold in the areas of Florina and Kozani and being caught partially in lakes of these areas, and also the contamination of the environment of retail fish markets, have been investigated under laboratory conditions. Aim of this project was to evaluate the level of bacterial contamination by *Listeria spp.*, on the surface and the flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and gibel carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1782) and also of the selling points of these fish, and finally to assess the way of contamination for fish. Following the literature review in relation to *Listeria* and the fresh water fish, an experimental protocol has been carried out (that included 30 fish gibel carp and 30 fish rainbow trout, 70 environmental samples from fish markets), in order to isolate *Listeria spp.* in fish samples, environmental samples from fish retail markets and statistical analysis. The literature review referred to the *Listeria spp* characteristics, Listeriosis as a disease, the methods of detection, the role of the fish in the epidemiology of the disease and finally the microbe prevalence on fish and fishery products and also in the environment of the fish markets and the fish processing plant. The results obtained indicate that the level of fish contamination from *Listeria spp.* was relatively low. *Listeria spp.* was not detected on the rainbow trout flesh , only one positive sample was detected on gibel carp. An important finding was the higher contamination of the fish surface, 20% for gibel carp and 3.33% for rainbow trout. In relation to the environment of selling points, it was ascertained that *Listeria* contamination was detected on floors (16.67%), knives (16.67%), hands (15.38%), cutting surfaces (20%) and fish boxes (5.56%). As a conclusion based on the above findings it is indicated that fish flesh does not seem to have a serious problem with *Listeria spp.*, whether the increase of bacterial presence

on the fish surface seems to be a result of cross-contamination during fish catching, handling and storing processes. A fact that is supported by the environment of fish retail markets having being found highly contaminated. This study could be further investigated by the use of modern methods for the detection and identification of the microbe and also to expand with new samples from the fish catching nets and the fresh water of the lakes, in order determine the source and the way of contamination of fish by *Listeria* spp..

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντά μου Επίκουρο Καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής Σχολής Α.Π.Θ., κύριο Αμίν Αμπραχίμ για την πολύτιμη βοήθεια του στην προετοιμασία και οργάνωση της διπλωματικής μου διατριβής, την προσωπική παρουσία κατά τη διάρκεια των πειραματισμών (που έγιναν κυρίως σε μέρες αργιών και τα σαββατοκύριακα), την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόησή του, την κριτική ανάγνωση του κειμένου καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του, αποτέλεσμα της πολυετούς εμπειρίας του στη μικροβιολογία των τροφίμων.

Θερμές ευχαριστίες στο Λέκτορα Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. κύριο Δανιήλ Σεργκενλίδη για τη βοήθειά του κατά την εκτέλεση του πειράματος (σε μέρες και ώρες αργίας), τις χρήσιμες παρατηρήσεις στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου της διπλωματικής μου διατριβής, τις συνεχείς υποδείξεις του κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς και για την ηθική συμπαράσταση του σε όλο το διάστημα της συγγραφής αυτής της εργασίας.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στο Διευθυντή του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ., καθηγητή Παύλο-Ρωμύλο Κοϊδώνη για την παραχώρηση του εργαστηρίου, όπου εκπονήθηκε το πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής.

Πολλές ευχαριστίες στην Καθηγήτρια και Πρόεδρο του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κυρία Φωτεινή Αθανασοπούλου και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για την καθοδήγησή της στην διαδικασία επιλογής του θέματος, την κριτική ανάγνωση του κειμένου, καθώς και για την κάλυψη μέρους των δαπανών για το πειραματικό μέρος.

Πολλές ευχαριστίες στον Αναπληρωτή Καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Αλέξανδρο Γκόβαρη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την κριτική ανάγνωση του κειμένου.

Θα ήταν παράλειψή μου αν δεν ευχαριστούσα όλους τους συναδέλφους μου από τη Ν.Α. Φλώρινας και ιδιαίτερα τους Σωκράτη Ηλιάδη, κτηνίατρο, Φωτεινή Τζουμανίκα, κτηνίατρο (M.Sc.), καθώς και τον Διευθυντή Κτηνιατρικής της Ν.Α. Φλώρινας Χρήστο Κατσιλάκη κτηνίατρο, για τη βοήθεια στη συλλογή των δειγμάτων από τον ακριτικό νομό Φλώρινας και την ανοχή τους για τις συχνές απουσίες από την εργασία μου κατά τη διετή διάρκεια του μεταπτυχιακού. Επίσης ευχαριστώ το συνάδελφο κτηνίατρο από την Ν.Α. Κοζάνης Γιώργο Λεωνίδα, για τη βοήθεια στη συλλογή των δειγμάτων από το νομό Κοζάνης

Τέλος από ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς στους φίλους Κωνσταντίνα Κυριάζογλου, περιβαλλοντολόγο (M.Sc.), Ηλία Χαληγιάννη κτηνίατρο, υποψήφιο διδάκτορα Α.Π.Θ., Δημήτρα Παρδάλη κτηνίατρο, υποψήφια διδάκτορα Α.Π.Θ., Ελένη Μαλισσιόβα κτηνίατρο (M.Sc.) και Κώστα Παπαδόπουλο κτηνίατρο, για τη βοήθεια, την προσωπική δουλειά και την ηθική στήριξη που είχα από τον καθένα ξεχωριστά σε όλη την περίοδο εκπόνησης αυτής της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σελ. 1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.ΓΕΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	σελ. 4
1.ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	σελ. 5
2.ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ	
2.1 Ταξινόμηση	σελ. 8
2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά	σελ. 10
2.3 Χαρακτηριστικές ιδιότητες	σελ. 12
2.4 Αντιγονική σύσταση	σελ. 12
2.5 Καλλιεργητικοί χαρακτήρες	σελ. 14
2.6 Βιοχημικές ιδιότητες	σελ. 16
3. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	
3.1 Παρουσία των λιστεριών στο περιβάλλον	σελ. 18
4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	σελ. 21
4.1 Εισαγωγή	σελ. 21
4.2 Μηχανισμός προσβολής	σελ. 21
4.3 Πρόκληση λοίμωξης	σελ. 23

5. ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ ΤΩΝ ΖΩΩΝ	σελ.26
5.1 Εισαγωγή	σελ.26
5.2 Τρόπος μετάδοσης	σελ.26
5.3 Εκδήλωση της νόσου	σελ.28
6. ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	σελ.29
6.1 Εισαγωγή	σελ.29
6.2 Τρόπος μετάδοσης	σελ.30
6.3 Παθογόνος δράση	σελ.31
6.4 Επιδημίες και περιστατικά λιστερίωσης στον άνθρωπο	σελ.33
7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ	σελ.36
7.1 Εισαγωγή	σελ.36
7.2 Κλασσικές μέθοδοι απομόνωσης	σελ.36
7.3 Απομόνωση	σελ.37
7.4 Ταυτοποίηση	σελ.38
8. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ ΚΑΙ ΤΑ ΙΧΘΥΟΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ	σελ.41
9.ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ ΣΤΟΥΣ ΧΩΡΟΥΣ ΑΛΙΕΥΣΗΣ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΩΛΗΣΗΣ ΨΑΡΙΩΝ	σελ.45
10. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΙΧΘΥΟΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ	σελ.47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Η ΔΙΚΗ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ	σελ.49
11.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	σελ.50
11.1 Δειγματοληψία ωμών ψαριών	σελ.50
11.2 Δειγματοληψίες του περιβάλλοντος	σελ.52
11.3 Απομόνωση και ταυτοποίηση λιστεριών	σελ.54
11.4 Συσκευές και γυάλινο υλικό	σελ.55
11.5 Στάδια απομόνωσης της <i>Listeria monocytogenes</i>	σελ.56
11.5.1 Προεμπλουτισμός	σελ.56
11.5.2 Εμπλουτισμός	σελ.56
11.5.3 Απομόνωση σε στερεά θρεπτικά και ταυτοποίηση	σελ.56
11.5.4 Επιβεβαίωση	σελ.57
11.6 Υλικά καλλιέργειας και επιβεβαίωσης	σελ.58
11.6.1 Προεμπλουτιστικό υλικό	σελ.58
11.6.2 Εμπλουτιστικό υλικό	σελ.58
11.6.3. Στερεό εκλεκτικό υπόστρωμα OXFORD agar	σελ.59
11.6.4 Χρωμογόννο στερεό υπόστρωμα ALOA agar	σελ.59
11.7 Επιβεβαίωση	σελ.60
11.7.1 Επιλογή αποικιών για ταυτοποίηση	σελ.60
11.7.2 Αντίδραση καταλάσης	σελ.60
11.7.3 Χρώση Gram	σελ.61
11.7.4 Δοκιμή κινητικότητας	σελ.61
11.7.5 Δοκιμή οξειδάσης	σελ.63
11.7.6 API <i>Listeria</i>	σελ.63
11.10 Μεθοδολογία	σελ.65

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	
12. Αποτελέσματα- Συζήτηση- Προτάσεις	σελ.68
12.1 Αποτελέσματα	σελ.68
12.2 Συζήτηση	σελ.73
12.3 Προτάσεις	σελ.78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ.80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (ξενόγλωσση)	σελ.80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (Ελληνική)	σελ.105

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

	Σύνθεση υποστρωμάτων	
1	HALF FRASER BROTH	σελ 106
2	FULL FRASER BROTH	σελ 107
3	LISTERIA ISOLATION MEDIUM - OXFORD	σελ 108
4	ALOA AGAR	σελ 110
5	TSYE	σελ 112
6	OXIDASE TEST REAGENT	σελ 112
7	MOTILITY TEST MEDIUM	σελ 113
8	Δελτίο μικροβιολογικής εξέτασης επιφάνειας	σελ 114
9	Δελτίο μικροβιολογικής εξέτασης σάρκας	σελ 115

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

2.1	Είδη <i>Listeria spp.</i>	σελ. 10
2.2	Ορότυποι <i>Listeria spp.</i>	σελ. 13
2.3	Βιοχημικές δοκιμές για τα διάφορα είδη <i>Listeria</i>	σελ. 17
7.1	Διαφοροποίηση στελεχών <i>Listeria spp.</i>	σελ. 39
7.2	Δοκιμή CAMPS για τη διαφοροποίηση στελεχών <i>Listeria spp.</i>	σελ. 39
12.1	Ανίχνευση <i>Listeria spp.</i> στη σάρκα ψαριών	σελ. 68
12.2	Ανίχνευση <i>Listeria spp.</i> στην επιφάνεια ψαριών	σελ. 69
12.3	Ανίχνευση <i>Listeria spp.</i> σε δείγματα περιβάλλοντος σημείων λιανικής πώλησης	σελ. 70
12.4	Ανίχνευση <i>Listeria spp.</i> σε δείγματα περιβάλλοντος σημείων λιανικής πώλησης ανάλογα με τον τόπο προέλευσης του δείγματος	σελ. 71
12.5	Ανίχνευση <i>Listeria spp.</i> σε δείγματα σάρκας και επιφάνειας ψαριών ανάλογα με τον τόπο προέλευσης του δείγματος	σελ. 72

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

2.1	<i>Listeria monocytogenes</i> σε οπτικό μικροσκόπιο	Σελ..11
2.2	<i>Listeria monocytogenes</i> σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	Σελ..11
2.3	<i>Listeria monocytogenes</i> σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	Σελ..11
2.4	Ανάπτυξη <i>Listeria spp</i> σε αιματούχο άγαρ	Σελ 15
2.5	Ανάπτυξη <i>Listeria spp</i> σε Plate Count Agar	Σελ. 15
7.1	Δοκιμή CAMPS	Σελ 40
11.1	Διαδικασία απόμαξης επιφανειών	Σελ 53
11.2	Ζωμός Fraser half concentration	Σελ 58
11.3	Ζωμός Fraser full concentration	Σελ 58
11.4	<i>Listeria</i> isolation medium (Oxford)	Σελ 59
11.5	<i>Listeria</i> isolation medium (Oxford)	Σελ 59
11.6	ALOA agar	Σελ 59
11.7	ALOA agar	Σελ 59
11.8	Δοκιμή καταλάση αρνητικό	Σελ 61
11.9	Δοκιμή καταλάση θετικό	Σελ 61
11.10	Τέστ κινητικότητας	Σελ 62
11.11	API <i>Listeria</i> Kit	Σελ 64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

3.1	Τρόποι με τους οποίους γίνεται η διασπορά στο περιβάλλον, στα ζώα, στον άνθρωπο, στα τρόφιμα.	Σελ 19
7.1	Δοκιμή CAMPS	Σελ 40

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, παρά την αύξηση των κανονισμών για την ασφάλεια των τροφίμων και την εφαρμογή συστημάτων διαχείρισης της ασφάλειας, όπως το HACCP, οι πολυάριθμοι θάνατοι και οι εκατοντάδες τροφιμογενείς λοιμώξεις που έχουν αποδοθεί στη *Listeria monocytogenes*, έχουν αυξήσει την ανησυχία και τις απαιτήσεις των καταναλωτών για την παραγωγή τροφίμων αυξημένης ποιότητας και εγγυημένης ασφάλειας. Ωστόσο, η *Listeria monocytogenes* είναι ένας μικροοργανισμός, ο οποίος μέχρι σχετικά πρόσφατα, δεν θεωρούνταν ως σημαντικός παθογόνος και συνεπώς, δεν είχε γίνει επαρκής έρευνα. Τα επίπεδα της λιστερίωσης στον άνθρωπο επισκιάζονταν έως τώρα από άλλες τροφιμογενείς ασθένειες, και από το γεγονός ότι τα ξεσπάσματά της ήταν σπάνια και μη καταγράψιμα. Παρόλα αυτά, στις αρχές της δεκαετίας του 1980 αποδείχθηκε η σοβαρότητα της ασθένειας, με σημαντικά ποσοστά θνησιμότητας, ιδιαίτερα σε ευπαθή άτομα, και αυτό προκάλεσε το φόβο του καταναλωτικού πληθυσμού για το παθογόνο και συνετέλεσε στην εφαρμογή προγραμμάτων από τις αρχές της δημόσιας υγείας για τον έλεγχο του μικροοργανισμού και της ασθένειας.

Η λιστερίωση είναι μια σοβαρή λοίμωξη (ζωνόσος), η οποία προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμων μολυσμένων από το βακτηρίδιο *Listeria monocytogenes* και προκαλεί σοβαρή κλινική εικόνα στα νεογνά, στους ενήλικες με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα και σοβαρές επιπλοκές στα έμβρυα (οι έγκυες γυναίκες εκδηλώνουν ήπια νόσο). Το βακτηρίδιο της *Listeria monocytogenes* είναι διαδεδομένο στη φύση και αποικίζει το χώμα, τα φυτά και το

έντερο των θηλαστικών από όπου είναι δυνατόν να μεταδοθεί σε τροφές προς κατανάλωση. Η νόσος εμφανίζεται συνήθως σποραδικά. Έχουν περιγραφεί μικροεπιδημίες που προήλθαν από μολυσμένες τροφές, όπως το γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα (τυριά), προϊόντα κρέατος και νωπά λαχανικά. Μολύνσεις που οφείλονταν σ' αυτό το βακτήριο αναφέρονται για ένα μεγάλο εύρος ζώων, συμπεριλαμβανόμενων, αγελάδων, προβάτων, πτηνών, τρωκτικών και αλιευμάτων, όπως επίσης και για τους ανθρώπους.

Η επικινδυνότητα αυτού του μικροοργανισμού βασίζεται στην ικανότητά του να επιβιώνει και να αναπτύσσεται κάτω από αντίξοες συνθήκες, όπως έχει αποδειχθεί από πολλές έρευνες. Έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, έως και -1.5°C , όπως επίσης και σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, να επιβιώνει σε συνθήκες κατάψυξης και να αναπτύσσεται σε τιμές pH κάτω από 5. Η εκτεταμένη παρουσία της *Listeria monocytogenes* στη φύση, η ικανότητα της να αναπτύσσεται σε δυσμενείς συνθήκες και η υψηλή θνησιμότητα που σχετίζεται με τη λιστερίωση, ειδικά σε ομάδες ανθρώπων με αυξημένο κίνδυνο, είχαν ως αποτέλεσμα να πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός ερευνών, διαλέξεων και μονογραφιών, από την δεκαετία του '80, που η επιστήμη ασχολήθηκε πιο ενδελεχώς με την *Listeria*.

Η παρούσα μελέτη έχει σαν στόχο τη διερεύνηση της συχνότητας μόλυνσης των νωπών ψαριών του γλυκού νερού τα οποία αγοράστηκαν από καταστήματα πώλησης ψαριών των Νομών Φλώρινας και Κοζάνης, όπως επίσης και τη διερεύνηση της παρουσίας του μικροοργανισμού στο περιβάλλον των καταστημάτων αυτών και του τρόπου μόλυνσης των ψαριών. Τα ψάρια της παρούσας μελέτης πεταλούδες (*Carassius auratus gibelio*) αλιεύθηκαν από τις λίμνες του νομού Φλώρινας (Μικρή και Μεγάλη Πρέσπα, Βεγορίτιδα, Πετρών,

Χειμαδίτιδα, Ζάζαρη) και του νομού Κοζάνης (Πολυφύτου) και διάφορους χείμαρρους της περιοχής. Οι πέστροφες (*Oncorhynchus mykiss*) πάρθηκαν από καταστήματα πώλησης ψαριών από τις παραπάνω περιοχές. Η συλλογή των δειγμάτων περιβάλλοντος έγινε από καταστήματα και πάγκους πώλησης ψαριών των Δήμων Αμυνταίου, Φλώρινας, Πτολεμαΐδας και Κοζάνης. Συνολικά εξετάσθηκαν εξήντα (60) δείγματα ψαριών (ξεχωριστά η σάρκα και ξεχωριστά το δέρμα) και εβδομήντα (70) δείγματα από το περιβάλλον καταστημάτων πώλησης ψαριών (επιφάνειες μαχαιριών, δαπέδου, χεριών, χώρου κοπής και ιχθυοκιβωτίων) στην ίδια περιοχή.

Η παρούσα διατριβή χωρίζεται σε 3 κεφάλαια.

Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται μια βιβλιογραφικά ανασκόπηση όπου παρουσιάζονται η ταξινόμηση και τα κυριότερα χαρακτηριστικά του βακτηρίου, η λιστερίωση ως νόσος του ανθρώπου και των ζώων, οι μέθοδοι απομόνωσης και ταυτοποίησης των λιστεριών, η παρουσία του μικροοργανισμού στο περιβάλλον και τέλος η παρουσία των λιστεριών στα ψάρια και τα ιχθυοσκευάσματα.

Στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του βακτηρίου, οι δειγματοληψίες που έγιναν, οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση καθώς και οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν για την επιβεβαίωση.

Στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφονται τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, γίνεται συζήτηση επί των αποτελεσμάτων σε σχέση με παρελθούσες έρευνες στο ίδιο πεδίο και διατυπώνονται συμπεράσματα-προτάσεις σε σχέση με την παρούσα μελέτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΓΕΝΙΚΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Από ιστορικούς έχει αναφερθεί πως οι 17 εγκυμοσύνες της βασίλισσας Άννας της Αγγλίας κατά τον 17^ο αιώνα, που κατέληξαν σε αποβολή του εμβρύου, μπορεί να οφείλονται στη *Listeria spp.* και να αποτελούν την πρώτη αναφορά για την παθογόνο δράση του στον άνθρωπο (Saxbe, 1972). Από το 1891 αναφέρεται πως Gram αρνητικά βακτηρίδια είναι υπεύθυνα για νοσολογικές καταστάσεις που πιθανώς σχετίζονται με τη λιστερίωση (Gray, 1960).

Η πρώτη απομόνωση και περιγραφή του οργανισμού έγινε το 1924 στα εργαστήρια του πανεπιστημίου του Cambridge, κατά τη διάρκεια μιας επιδημίας που αφορούσε πειραματόζωα. Συγκεκριμένα απομόνωσαν ένα θετικό κατά Gram, μη σπορογόνο βάκιλο, ο οποίος ήταν υπεύθυνος για τη μόλυνση των εργαστηριακών κουνελιών, στις εγκαταστάσεις της ζωικής αναπαραγωγής, του τμήματος Παθολογίας του Πανεπιστημίου Cambridge (Murray και συν., 1926). Ο νέος μικροοργανισμός ονομάστηκε *Bacterium monocytogenes*, επειδή η μονοκυττάρωση ήταν ένα από τα τυπικά συμπτώματα της νόσου που προκαλούσε.

Ένα χρόνο αργότερα, το 1925, ο Pirie απομόνωσε στη Ν. Αφρική ανάλογο μικροοργανισμό από γερβίλλους *Tatera lobengulae*, και τον ονόμασε *Listerella hepatolytika* (Pirie, 1927). Όταν διαπιστώθηκε ότι το *Bacterium monocytogenes* ήταν ο ίδιος μικροοργανισμός με τη *Listerella hepatolytika*, το όνομά του τροποποιήθηκε σε *Listerella monocytogenes*. Αυτή η ονομασία χρησιμοποιήθηκε μέχρι που το 1939 διαπιστώθηκε πως έχει δοθεί ήδη το όνομα αυτό το 1906 από τον Jahn σε μια ομάδα μυξομυκήτων. Για το λόγο αυτό το 1940 ο Pirie πρότεινε

το όνομα *Listeria monocytogenes* (Pirie 1940), το οποίο έγινε αποδεκτό από τη Διεθνή Επιστημονική Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Βακτηρίων (Anonymous 1954).

Η νόσος εμφανίζονταν κυρίως σε παραγωγικά ζώα. Τα περιστατικά στον άνθρωπο ήταν σπάνια και παρουσιάζονταν κυρίως μετά από επαφή με μολυσμένα ή άρρωστα ζώα. Μέχρι τότε η λιστερίωση θεωρούνταν ως ζωοανθρωπονόσος δίχως να έχουν εντοπιστεί περιστατικά σιτιογενούς αιτιολογίας.

Η πρώτη αναφορά περιστατικού στην οποία διαπιστώνεται η παθογόνος δράση της λιστέριας στον άνθρωπο έγινε στη Δανία το 1929, όπου απομονώθηκε το βακτηρίδιο, που τότε είχε την ονομασία *Listerella hominis*, από το αίμα 13 ασθενών με συμπτώματα μονοκυττάρωσης (Nyfeldt, 1929). Άλλες αναφορές για πρόκληση λοιμώξεων από λιστέρια έγιναν το 1935 που αναφέρθηκε πρόκληση κοκκιωματώδους σηψαιμίας σε νεογνά και το 1936 με πρόκληση μηνιγγίτιδας σε ενήλικες αλλά και σε άλλες μελέτες (Burn, 1935) (Burn, 1936) (Reiss και συν., 1951).

Η πρώτη σύγχρονη επιδημία που καταγράφηκε είναι αυτή της Βοστόνης στα 1979, στην οποία σημειώθηκαν 23 περιστατικά και θνητότητα ανήλθε στο 15%. Υπεύθυνα τρόφιμα για την εκδήλωση της επιδημίας θεωρήθηκαν κάποια λαχανικά τα οποία καταναλώθηκαν ωμά από νοσηλευόμενους μαζί με το συσσίτιο (Ho και συν., 1986).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών αναζωπυρώθηκε το ενδιαφέρον των ερευνητών για τη λιστέρια, επειδή αυτή ενοχοποιήθηκε για την πρόκληση πολλών σιτιογενών επιδημιών και αυξήθηκε η συχνότητα της νόσου. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες στις αναπτυγμένες χώρες έχουν αυξηθεί οι περιπτώσεις σιτιογενούς

λιστερίωσης, τόσο οι ενδημικές, όσο και τα μεμονωμένα περιστατικά. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως σε 4 λόγους:

A) Η ανάπτυξη της αγροτικής βιομηχανίας και της βιομηχανίας των τροφίμων είχε ως αποτέλεσμα τη δυνατότητα μόλυνσης με λιστέρια μεγάλων ποσοτήτων τροφίμων. Επιπρόσθετα, η χρήση χαμηλών θερμοκρασιών για τη συντήρηση των τροφίμων, στις οποίες η λιστέρια είναι δυνατόν να αναπτυχθεί και μάλιστα σε αντίθεση με άλλους μικροοργανισμούς που περιέχονται στα τρόφιμα, κατέστησε δυνατή την ανάπτυξη λιστεριών σε αυτά.

B) Η προτίμηση των καταναλωτών σε τρόφιμα τα οποία καταναλώνονται ως έχουν, χωρίς καμιά προηγούμενη θερμική επεξεργασία, με αποτέλεσμα όπου υπάρχουν λιστέριες να μη θανατώνονται με τη θέρμανση.

Γ) Η νόσος προσβάλλει κυρίως άτομα ανοσοκατεσταλμένα. Η πρόοδος της επιστήμης, που επιμήκυνε τη ζωή αυτών των ατόμων, οδήγησε και στη αύξηση των περιστατικών.

Δ) Τα τελευταία χρόνια έχουν βελτιωθεί οι μέθοδοι απομόνωσης και ταυτοποίησης του μικροοργανισμού, έχουν μελετηθεί δε σε μεγάλο βαθμό η επιδημιολογία, επιζωοτιολογία και η παθογόνος δράση της (McLauchlin, 1996).

Θα πρέπει να αναφερθεί πάντως πως σε πολλές αναπτυγμένες χώρες, όπως οι Η.Π.Α., κατά τα τελευταία έτη φαίνεται να μειώνονται τα περιστατικά σιτιογενούς λιστερίωσης. Το γεγονός αυτό φαίνεται να οφείλεται στην δραστηριοποίηση των εμπλεκόμενων μερών (επιστημόνων, πολιτείας, βιομηχανίας τροφίμων, καταναλωτών) σε σχέση με την πρόληψη της νόσου (McLauchlin, 1990).

2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ.

2.1 Ταξινόμηση

Από το 1961 το γένος *Listeria* είχε μόνο ένα είδος τη *Listeria monocytogenes*. Η *Listeria denitrificans*, η *Listeria grayi* και η *Listeria murrayi* προστέθηκαν το 1961 (Prevot, 1961), το 1966 (Larsen και Seeliger, 1966) και το 1971 (Welshimer και Meredith, 1971) αντίστοιχα. Μέχρι το έτος 1974 το γένος *Listeria* ανήκε στη οικογένεια των *Corynebacteriaceae*. Οι Stuart και Welshimer (1974) μελετώντας τη *Listeria* με μεθόδους μοριακής βιολογίας απέδειξαν πως δεν ήταν σωστή η ένταξή της στην παραπάνω οικογένεια. Προτάθηκε λοιπόν η δημιουργία μιας νέας οικογένειας αυτής των *Listriaceae*.

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται όλο και νεότερες τεχνικές για την ταξινόμηση των βακτηρίων, χωρίς όμως να εγκαταλείπεται η χρώση Gram και οι κλασσικές βιοχημικές δοκιμασίες. Την αρχή πάντως στη χρησιμοποίηση γενετικών μεθόδων για την ταξινόμηση της λιστέριας έκαναν οι Stuart και Welshimer και οι Rocourt και συν. (Stuart και Welshimer, 1973; Stuart και Welshimer, 1974; Rocourt και συν., 1983; Rocourt και συν., 1985; Rocourt, 1987 και Rocourt, 1989). Η λιστέρια κατατάσσεται στα Gram θετικά, ασπορογόνα βακτήρια (Seeliger και Welshimer, 1974).

Στα 1977 παρουσιάστηκε ένα νέο είδος λιστέριας, η *Listeria innocua*, η οποία σε αντίθεση με την *Listeria monocytogenes* δεν είναι παθογόνος για τον άνθρωπο και τα ζώα, όπως επίσης δεν προκαλεί αιμόλυση στα ερυθρά αιμοσφαίρια του προβάτου (Seeliger και Schoofs, 1979). Δύο άλλα είδη λιστεριών η *Listeria seeligeri* και η *Listeria welshimeri*, διαφοροποιήθηκαν από το είδος της

Listeria monocytogenes, με βάση μελέτες υβριδισμού του DNA (Rocourt και Grimont, 1983). Το τελευταίο είδος που αναφέρθηκε είναι ο ορότυπος 5 της *Listeria monocytogenes*. Έχει απομονωθεί στη Βουλγαρία και ονομάστηκε *Listeria ivanovii* (Seeliger και συν., 1984).

Τελικά, το γένος *Listeria*, στην 9η έκδοση του *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, τοποθετήθηκε μαζί με τα γένη *Lactobacillus*, *Brochothrix* και *Erysipelothrix*, στο κεφάλαιο με τον τίτλο "Συμμετρικά, μη σπορογόνα, θετικά κατά Gram, ραβδοειδή βακτήρια" (Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods) (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1986)

Σύμφωνα με νεότερες έρευνες οι οποίες βασίστηκαν στην αλληλουχία DND/DNA και την ανεύρεση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του ριβοσωμικού RNA το γένος *Listeria* χωρίζεται σε δύο ομάδες. Η πρώτη περιλαμβάνει τα είδη *monocytogenes*, *innocua*, *ivanovii*, *seeligeri*, και *welshimeri* ενώ η δεύτερη την *grayi*. Η *Listeria ivanovii* περιλαμβάνει τα υποείδη *Listeria ivanovii* υποείδος *ivanovii* και *Listeria ivanovii* υποείδος *Londoniensis* (Rocourt, 1991).

Σήμερα το γένος *Listeria* θεωρείται πως περιλαμβάνει τα εξής είδη: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii*, *Listeria ivanovii* subsp. *Londoniensis*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* και *Listeria grayi* subsp. *murrayi*, *Listeria grayi* subsp. *grayi* (Rocourt, 1999).

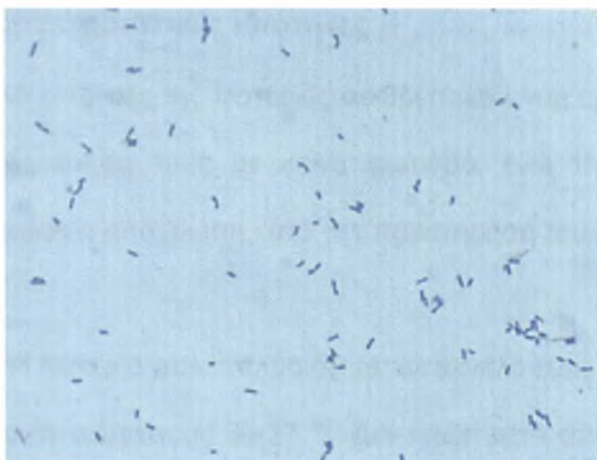
Στον πίνακα 2.1 δίνονται τα είδη του γένους *Listeria*.

Πίνακας 2.1
Είδη <i>Listeria</i>
<i>L. monocytogenes</i>
<i>L. ivanovii</i>
<i>L. innocua</i>
<i>L. welshimeri</i>
<i>L. seeligeri</i>
<i>L. grayi</i>
Περιλαμβάνει δύο υποείδη - <i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> & <i>L. ivanovii</i> subsp. <i>Londiniensis</i> .
Περιλαμβάνει δύο υποείδη - <i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i> & <i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i> (Rocourt, 1999)

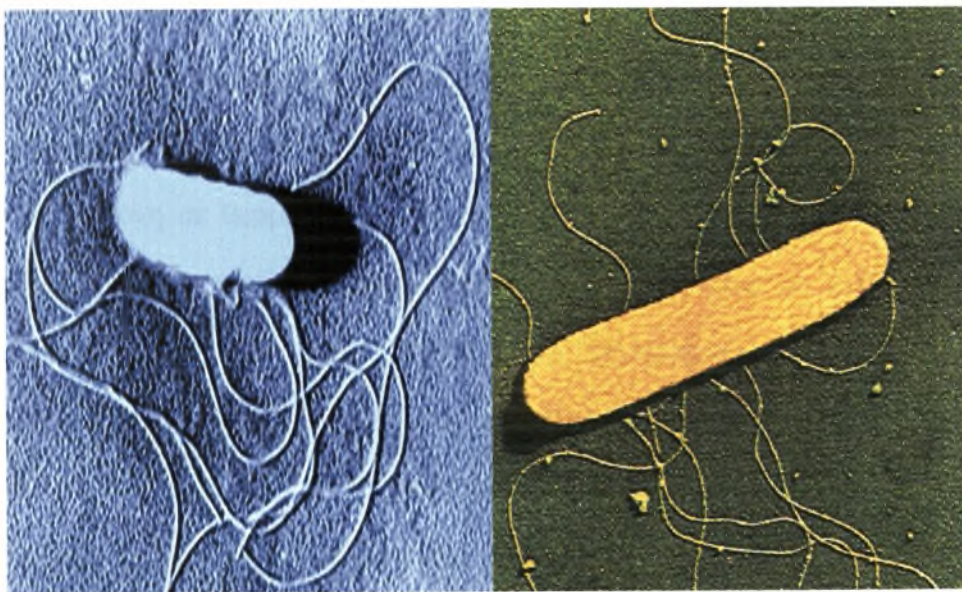
2.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Η λιστέρια είναι Gram θετικό και μικροαερόφιλο, ασπορογόνο, κοκκοειδές βακτηρίδιο, το οποίο παράγει καταλάση και δεν παράγει οξειδάση (Seeliger και Jones, 1986). Οι νεαρές καλλιέργειες λιστεριών αποτελούνται από κυρίως από κοκκοειδείς μικροοργανισμούς μήκους 0,5-2,0 μm και πλάτους 0,4-0,5 μm, με στρογγυλεμένα άκρα που είναι δυνατόν να σχηματίζουν και μικρές αλυσίδες, παράλληλες ή σε σχήμα V ή Y, ή ομάδες παράλληλες προς τον επιμήκη άξονά τους (εικόνα 2.1). Σε παλαιότερες ή "ανώμαλες" μορφές σχηματίζονται νημάτια μήκους 6-20 μm ή και μακρύτερα (Seeliger και Jones, 1986).

Έχει περίτριχες βλεφαρίδες (εικόνες 2.2 και 2.3) στις οποίες οφείλεται και η χαρακτηριστική περιστροφική της κίνηση. Αυτό συμβαίνει μόνο όταν η καλλιέργεια του μικροοργανισμού γίνει στους 20-25^oC, ενώ όταν γίνει στους 37^oC ο αριθμός των βλεφαρίδων μειώνεται σημαντικά (Peel και συν., 1988).



Εικόνα 2.1 *Listeria monocytogenes* σε οπτικό μικροσκόπιο X400 (από www.ilustrados.com)



Εικόνες 2.2, 2.3 *Listeria monocytogenes* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (από www.wales.nhs.uk).

2.3. Χαρακτηριστικές ιδιότητες

Οι αποικίες της λιστέριας σε θρεπτικό άγαρ έχουν κυανόφαιο χρώμα κατά την παρατήρηση τους με κοινό φωτισμό, ενώ παίρνουν μία χαρακτηριστική κυανοπράσινη απόχρωση κατά την παρατήρησή τους με πλάγιο φωτισμό. (Henry, 1933).

Η λιστέρια πολλαπλασιάζεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (1-45 °C), με άριστη ανάπτυξη στους 30-37 °C. Δεν επιζεί μετά από θέρμανση στους 60 °C για 30 λεπτά. Αναπτύσσεται σε τιμές pH από 5,6 έως 9,5, με άριστη ανάπτυξη στο ουδέτερο και ελαφρά αλκαλικό pH. (Seeliger και Jones, 1986). Είναι ανθεκτική σε υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών αλάτων και χλωριούχου νατρίου. Προκαλεί ζύμωση διαφόρων υδατανθράκων, παράγοντας οξύ χωρίς αέριο. Όλα τα στελέχη της λιστέριας που απομονώνονται από φυσικές πηγές είναι κινητά. Η κίνηση είναι περισσότερο έντονη σε θερμοκρασίες 20-22 °C, ενώ ελαττώνεται στους 37 °C. Η κίνηση επιβεβαιώνεται ενοφθαλμίζοντας λιστέρια σε σωληνάριο με κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Η ανάπτυξη συμβαίνει κατά μήκος της γραμμής ενοφθαλμισμού και εξαπλώνεται σε απόσταση 3-5mm κάτω από την επιφάνεια του υλικού, έχει δε χαρακτηριστικό ακτινωτό σχήμα. Κάποιες φορές ορισμένα στελέχη της *Listeria monocytogenes* αν και έχουν βλεφαρίδες παραμένουν ακίνητα (Seeliger και Jones, 1986).

2.4. Αντιγονική σύσταση

Τα πέντε πιο συχνά είδη λιστέριας μπορούν να υποδιαιρεθούν σε 16 ορότυπους με βάση 15 σωματικά (O) και 5 βλεφαριδικά (H) αντιγόνα. Η *Listeria grayi* και η *Listeria murrayi* δεν ανήκουν σε αυτό το σύστημα γιατί αν και έχουν

ορισμένα κοινά σωματικά αντιγόνα με άλλους ορότυπους έχουν μόνο Ε βλεφαριδικά αντιγόνα. Στα 1940 αναγνωρίστηκαν 4 ορότυποι χρησιμοποιώντας τις ορολογικές μεθόδους ταυτοποίησης σαλμονελλών των Kauffmann και White (Paterson, 1940).

Με βάση τα σωματικά αντιγόνα (Ο) αναγνωρίστηκαν οι ορότυποι 1,3,4 και με βάση το βλεφαριδικό (Η) ο ορότυπος 2. Στη συνέχεια ο ορότυπος 4 διαχωρίστηκε σε 4a και 4b, 4c, 4d, 4e (Seeliger, 1961; Donker-Voet, 1957). Επίσης αναγνωρίστηκαν οι ορότυποι 1a, 1b, 3a, 3b με βάση διαφορές στα βλεφαριδικά αντιγόνα (Donker-Voet, 1957). Η *Listeria monocytogenes* υποδιαιρείται σε 4 ομάδες και 13 ορότυπους. Πάντως οι περισσότερες περιπτώσεις λιστερίωσης στον άνθρωπο και στα ζώα οφείλονται σε έναν από τους τρεις συνηθέστερους ορότυπους της *Listeria monocytogenes* τους 1/2a, 1/2b, 4b. Στην Ευρώπη εμφανίζεται συχνότερα ο ορότυπος 4b ενώ στην Αμερική ο ορότυπος 1/2 (Rocourt, 1991).

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι γνωστοί ορότυποι για τα διάφορα είδη λιστέριας

Πίνακας 2.2 Ορότυποι του γένους <i>Listeria</i>	
Είδη λιστέριας	Ορότυποι
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, Un ^a
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, Un
^a Un, undefined (Seeliger και Jones, 1986)	

2.5. Καλλιεργητικοί χαρακτήρες

Η λιστέρια αναπτύσσεται καλά στα διάφορα θρεπτικά υλικά όπως είναι το Buffered peptoned water, Nutrient agar, Nutrient broth, Tryptose broth, Tryptose agar, Brain Heart infusion broth, Tryptic Soy broth, Tryptic Soy agar, Columbia broth, Columbia agar, αιματούχο άγαρ (Ralovich, 1993). Οι λιστέριες είναι προαιρετικώς αναερόβια βακτήρια, τα οποία αναπτύσσονται εύκολα σε κοινά καλλιεργητικά υποστρώματα. Όταν οι συνθήκες είναι άριστες, αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 1 °C και 45 °C. Ανάπτυξη του βακτηρίου παρατηρείται σε τιμές pH μεταξύ 5,5 και 9,6. Όλα τα στελέχη αναπτύσσονται σε συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου 10%, αντέχουν δε και σε συγκεντρώσεις 20%. Αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες, με την προϋπόθεση το υπόστρωμα να περιέχει σίδηρο ενώ η ιδανική ατμόσφαιρα ανάπτυξης επιτυγχάνεται με τη μερική αντικατάσταση του οξυγόνου του ατμοσφαιρικού αέρα με διοξείδιο του άνθρακα (Seeliger και Jones, 1986). Στα στερεά θρεπτικά υλικά όπως το θρεπτικό άγαρ, οι αποικίες εμφανίζονται μικρές, στρογγυλές, ημιδιαφανείς, με κυανόφαιο χρώμα σε κανονικό φωτισμό, ενώ όταν παρατηρηθούν με πλάγιο φωτισμό με μια διαδικασία η οποία περιγράφηκε από το Henry (1933) παρουσιάζουν μια χαρακτηριστική κυανοπράσινη απόχρωση (Gray, 1957). 24-48 ώρες επώασης στους 37 °C δίνουν αποικίες λιστέριας με διάμετρο 0,5-1,5 mm, ενώ μετά από 3-5 ημέρες επώασης έχουν διάμετρο περίπου 3-5 mm.

Κάποιες φορές οι αποικίες αυτές είναι κολλώδεις. Σε καλλιέργειες σε αιματούχο άγαρ οι αποικίες μετά από επώαση 48 ωρών είναι γκριζοπράσινες και ημιδιαφανείς (Seeliger και Jones, 1986). Κάποια από τα είδη των λιστεριών προκαλούν β-αιμόλυση σε άγαρ από αίμα προβάτου, αγελάδας, κουνελιού και

ανθρώπου. Οι *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri* και η *Listeria ivanovii*, προκαλούν αιμόλυση στο αιματούχο άγαρ στο οποίο, το αίμα που χρησιμοποιήθηκε, προέρχεται από διάφορα θηλαστικά. Τα είδη αυτά παράγουν διάφορης έκτασης ζώνες β-αιμόλυσης. Τα υπόλοιπα είδη δεν προκαλούν αιμόλυση (Seeliger και Jones, 1986).

Η διαπίστωση της αιμολυτικής ικανότητας είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση του είδους *Listeria*. Η δοκιμή CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson) δίνει πολλές πληροφορίες ιδιαίτερα όταν η αιμόλυση είναι αμφίβολη. Εκτελείται σε άγαρ, που περιέχει 5% v/v απινιδωμένο αίμα προβάτου, ίππου, κονίκλου ή ανθρώπου (Seeliger και Jones, 1986).



Εικόνα 2.4 Ανάπτυξη *Listeria* spp. σε αιματούχο άγαρ.
(από www.microbelibrary.com)



Εικόνα 2.5 *Listeria* spp σε Plate Count Agar
(από www.chromocult.info)

2.6. Βιοχημικές ιδιότητες

Όλα τα είδη του γένους λιστέρια δίνουν θετικές δοκιμασίες του ερυθρού του μεθυλίου, δεν παράγουν ινδόλη, δεν παράγουν ουρεάση δεν ανάγουν τα νιτρικά άλατα, δεν μπορούν να αξιοποιήσουν τα κιτρικά άλατα και δεν ρευστοποιούν τη ζελατίνη. Υδρολύουν την αργινίνη παράγοντας αμμωνία, παράγουν καταλάση και υδρόθειο και ανάγουν το κυανούν του μεθυλενίου. Παράγουν β-D-γαλακτοσιδάση και αλκαλική φωσφατάση. Διασπούν τη χολή και την εσκουλίνη και παρουσιάζουν αντοχή στο χλωριούχο νάτριο (Seeliger και Jones, 1986).

Η *Listeria monocytogenes* παράγει οξύ αλλά όχι και αέριο από διάφορα σάκχαρα κύρια από τη γλυκόζη. Ο καταβολισμός της γλυκόζης αερόβια και αναερόβια γίνεται με τη μεταβολική οδό των Embden-Meyerhof. Τελικό προϊόν της αναερόβιας διάσπασης της γλυκόζης είναι το γαλακτικό οξύ, ενώ της αναερόβιας διάσπασης είναι το πυροσταφυλικό οξύ, η ακετοΐνη το γαλακτικό οξύ κ.α. Όλα τα είδη της λιστέριας παράγουν οξύ εντός 48 ωρών από την εσκουλίνη, τη φρουκτόζη, τη γλυκόζη, τη μαννόζη, την αμυγδαλίνη, την κελλοβιόζη και τη σαλικίνη. Επίσης παράγεται οξύ κατά τη διάσπαση της μαλτόζης, της δεξτρίνης, της α-μεθυλ-D-μαννοσίδης, και τις γλυκερόλης (Seeliger και Jones, 1986). Υπάρχουν πάντως πολλές διαφορές μεταξύ των ειδών που ανήκουν στο γένος *Listeria*, διαφορές υπάρχουν ακόμα και σε στελέχη που ανήκουν στο ίδιο είδος (Seeliger, 1961).

Οι κυριότερες βιοχημικές ιδιότητες του μικροοργανισμού δίνονται στον πίνακα 2.3

Παθολογικά προβλήματα εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών

Βιοχημικές Εξετάσεις	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria Welshimeri</i>	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	<i>Listeria grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>
Διάσπαση δεξτρόζης	+	+	+	+	-	-	-
Διάσπαση εσουλίνης	+	+	+	+	-	-	-
Διάσπαση μαλτόζης	+	+	+	+	-	-	-
Διάσπαση ραμνόζης	+	-	N	N	-	-	N
Διάσπαση Ξυλόζης	-	+	-	+	+	-	-
Διάσπαση μαννιτόλης	-	-	-	-	-	+	-
Υδρόλυση ιππουρικού	+	+	+	+	+	-	-
Αντίδραση Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+
Αντίδραση Methyl-red	+	+	+	+	+	+	+
B-Αιμόλυση	+	+	-	-	+	-	-
Υδρόλυση Ουρίας	-	-	-	-	-	-	-
Αναγωγή Νιτρικών	-	-	-	-	-	-	+
Αντίδραση καταλάσης	+	+	+	+	+	+	+
Παραγωγή υδροθείου σε TSI	-	-	-	-	-	-	-
Παραγωγή υδρόθειου Σε ταινία οξεικού μολύβδου	-	-	-	-	-	+	+
Δοκιμασία CAMP σε <i>S. aureus</i>	+	-	-	-	+	-	-
Δοκιμασία CAMP σε <i>R. equi</i>	-	+	-	-	-	-	-
N = διαφέρει							

Πίνακας 2.3. Βιοχημικές δοκιμές για τα διάφορα είδη λιστέριας (Gray 1960)

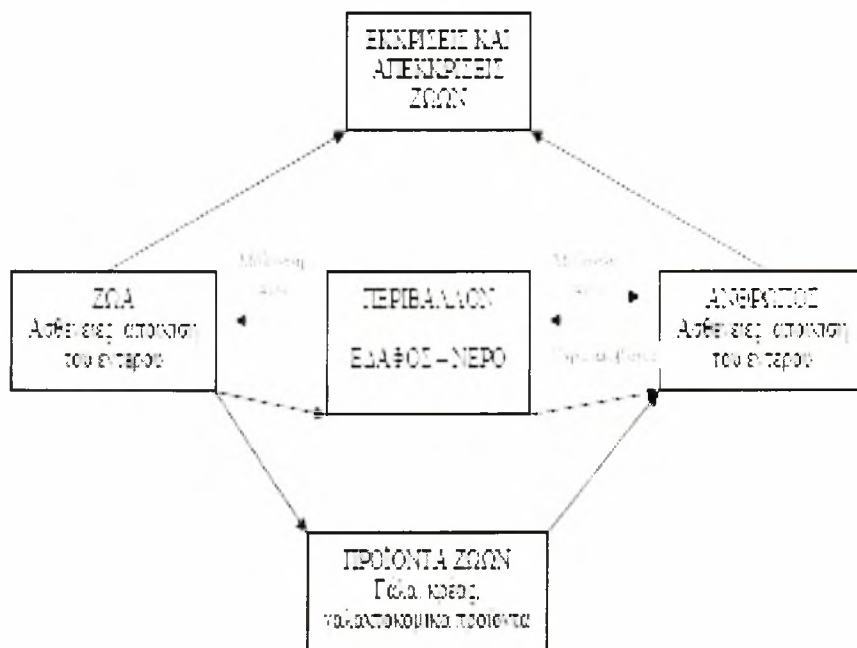
3. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

3.1 Παρουσία λιστεριών στο περιβάλλον

Οι λιστέριες είναι σαπρόφυτοι μικροοργανισμοί που διαβιούν στο έδαφος. Η αποδομούμενη φυτική ύλη προσφέρει τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες για την επιβίωση και των πολλαπλασιασμό τους (Welshimer, 1960). Είναι ικανές να αντέξουν δυσμενείς συνθήκες, κυρίως σε ότι αφορά το pH, πολλαπλασιάζονται δε ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες και τιμές ενεργού ύδατος (Seeliger και Jones, 1986).

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένας μικροοργανισμός ευρύτατα διαδεδομένος στη φύση. Αυτό βασίζεται στην ικανότητα της να επιβιώνει κάτω από τις δυσμενείς συνθήκες του φυσικού περιβάλλοντος (Welshimer, 1960). Η διασπορά της στο περιβάλλον, στα τρόφιμα, τον άνθρωπο και τα ζώα μπορεί να γίνει πολύ εύκολα, γεγονός που εξηγεί την ευρεία επικράτηση της (Jay, 2000).

Ο μικροοργανισμός απαντάται με μεγάλη συχνότητα στο έδαφος, στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα, στα κόπρανα των ζώων και των ανθρώπων, στις ενσιρωμένες ζωοτροφές καθώς και στα απόβλητα των αποχετεύσεων. Έχει απομονωθεί από τα λύματα, το χορτάρι, τα ζωικά περιττώματα, και το γάλα των μαστοφόρων ή των υγιών ζώων (Mc Carthy, 1990). Παράλληλα, έχει απομονωθεί από το εντερικό κομμάτι των υγιών ανθρώπων (Farber και Peterkin, 1991).



Σχήμα 3.1 Τρόποι με τους οποίους η *Listeria monocytogenes* διασπείρεται στο περιβάλλον, στα ζώα, στα τρόφιμα και στον άνθρωπο. (Jay, 2000)

Το γεγονός πως το βακτήριο είναι ευρέως διαδεδομένο στο φυσικό περιβάλλον, σηματοδοτεί την παρουσία του μικροοργανισμού σε προϊόντα τροφίμων φυτικής και ζωικής προέλευσης (Fenlon και συν., 1996). Η ευρεία διάδοση του μικροοργανισμού στη φύση, σε συνδυασμό με τις ειδικές ικανότητες ανάπτυξης του, φαίνεται πως είναι ο κύριος λόγος για την απομόνωση του από διαφορετικούς τύπους τροφίμων. Αν και *Listeria monocytogenes* είναι συχνά παρούσα στα συστατικά προϊόντων, συνήθως δεν επιζεί των θερμικών επεξεργασιών, επομένως η κύρια πηγή μόλυνσης των τροφίμων φαίνεται να είναι το περιβάλλον επεξεργασίας. Σε μια έρευνα που έγινε (Harvey and Gilmour 1992) διαπιστώθηκε πως η συχνότητα της στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας γάλακτος

ήταν πολύ υψηλότερη (33,3%) από ότι στα δείγματα από τα αγροκτήματα (5,3%). Πρόσθετα, σε κάποια άλλη μελέτη που έγινε για τα επίπεδα της *Listeria* σε μια βιομηχανία κρέατος, βρέθηκε πως ήταν υψηλότερη η συχνότητα εμφάνισης της στο λεπτοτεμαχισμένο κρέας, έναντι των σφάγιων ή των τεμαχίων κρέατος, υποδεικνύοντας μόλυνση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας (Lowry and Tiong, 1988).

Βακτήρια του γένους *Listeria spp.* έχουν βρεθεί σε γαλακτοκομικά προϊόντα, σε νωπό ή παστεριωμένο γάλα, σε φρούτα και λαχανικά, σε φρέσκο ή κατεψυγμένο κρέας και σε διάφορα προϊόντα κρέατος, σε προϊόντα πουλερικών, και σε θαλασσινά (Jay, 2000).

4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

4.1. Εισαγωγή

Από τα διάφορα είδη της λιστέριας μόνο η *Listeria monocytogenes* θεωρείται παθογόνος για τον άνθρωπο. Μεταξύ των στελεχών της *Listeria monocytogenes* υπάρχουν διαφορές σε σχέση με την παθογονικότητα, βασικό στοιχείο για τη διαπίστωση της παθογονικότητας είναι η παραγωγή αιμολυσίνης και η διαφορετικότητα στην δομή του κυτταρικού τοιχώματος (Hof και Hefner, 1988). Έχουν όμως κατά καιρούς αναφερθεί περιστατικά λιστερίωσης στον άνθρωπο που οφείλονται στην *Listeria ivanovii* (Rocourt και Seeliger, 1985). Τέτοια περιστατικά έχουν αναφερθεί και για τη *Listeria seeligeri* (Rocourt και συν., 1985).

4.2. Μηχανισμός προσβολής

Ο μηχανισμός με τον οποίο η λιστέρια προκαλεί νόσο περιλαμβάνει τρία στάδια.

1. **Είσοδος στον ξενιστή**
2. **Επιβίωση και πολλαπλασιασμός του μικροοργανισμού στον ξενιστή**
3. **Είσοδος στα κύτταρα των ιστών που αποτελούν στόχο του μικροοργανισμού (Κ.Ν.Σ. και πλακούντα).**

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί πολλές επιδημίες λιστερίωσης στον άνθρωπο που σχετίζονται με κάποιο τρόφιμο, το οποίο δείχνει πως ο πεπτικός σωλήνας αποτελεί πύλη εισόδου του μικροοργανισμού. Η μετάδοση γίνεται με την διείσδυση του μικροοργανισμού στο τοίχωμα του εντέρου (Berche, 1995). Η πύλη εισόδου του μικροβίου είναι οι πλάκες του Peyer, μέσω των οποίων εισέρχεται στα κύτταρα του εντέρου. Στη συνέχεια ο μικροοργανισμός φθάνει στο ήπαρ όπου και πολλαπλασιάζεται εντός των ηπατοκυττάρων. Λύση των ηπατοκυττάρων προκαλεί απελευθέρωση των βακτηριδίων και βακτηριαιμία. Οι ιστοί στόχοι είναι ο πλακούντας και ο εγκέφαλος (Berche, 1995).

Ενδοκυττάριος πολλαπλασιασμός μπορεί να συμβεί σε διάφορα είδη κυττάρων. Η λιστέρια μπορεί να επιζήσει και να πολλαπλασιαστεί μέσα στα μακροφάγα (Mackanness, 1962). Το ίδιο αποδείχθηκε και για τον ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό της λιστέριας εντός των πλακών του Peyer (MacDonald και Carter, 1980). Κατά τη διαδικασία του ενδοκυττάριου πολλαπλασιασμού συμβαίνει και το φαινόμενο του πολυμερισμού της ακτίνης. Τα νημάτια της ακτίνης διαπλέκονται και σχηματίζουν ένα είδος ουράς στην άκρη του μικροοργανισμού με αποτέλεσμα να μπορεί να κινείται η λιστέρια μέσα στο κυτταρόπλασμα του μακροφάγου με φορά αντίθετη από αυτήν της ουράς (Tilney και Tilney 1993).

Όταν η λιστέρια έρθει σε επαφή με τη μεμβράνη του μακροφάγου τότε στην κυτταροπλασματική του μεμβράνη σχηματίζεται ένα είδος ψευδοπόδιου, με το μικροοργανισμό εντός της προεκβολής αυτής. Όταν αυτό το ψευδοπόδιο έρχεται σε επαφή με γειτονικό μακροφάγο φαγοκυτταρώνεται από αυτό, με αποτέλεσμα να περνάει ο μικροοργανισμός στο γειτονικό μακροφάγο και λύοντας το διπλό κυτταροπλασματικό περίβλημα που τον περιβάλλει να ξεκινά τον κύκλο από την αρχή. Με τον τρόπο αυτό η λιστέρια διασπείρεται από κύτταρο σε

κύτταρο διαφεύγοντας την εξουδετέρωση από τα αντισώματα του ξενιστή (Tilney και Tilney 1993).

Κατά το τελευταίο στάδιο της λοίμωξης η *Listeria monocytogenes* λύει το φαγοκύτταρο ή το μακροφάγο και περνώντας στη συνέχεια το επιθήλιο των τριχοειδών αγγείων προκαλεί σηψαιμία.

4.3. Πρόκληση λοίμωξης

Σύμφωνα με τον Scuchat και συν., 1991 οι παράγοντες που μπορούν να συντελέσουν στην πρόκληση ενεργού λοίμωξης είναι:

- 1) Η μολυσματικότητα του μικροοργανισμού
- 2) Η δεκτικότητα του ξενιστή
- 3) Το ποσό του ενοφθαλμίσματος

Η μολυσματικότητα του μικροοργανισμού είναι στενά συνδεδεμένη με την αιμολυτική δράση της λιστέριας. Βρέθηκε πως όλα τα παθογόνα στελέχη της *Listeria monocytogenes* συνθέτουν και εκκρίνουν αιμολυσίνη, ενώ τα μη αιμολυτικά στελέχη της λιστέριας δεν είναι παθογόνα. Υπάρχουν αρκετά είδη αιμολυσινών, χωρίς πάντα όμως να συνδέεται η σύνθεση και έκκρισή τους με παθογόνο δράση. Η *Listeria ivanovii* για παράδειγμα προκαλεί ισχυρότερη αιμόλυση από αυτήν της *Listeria monocytogenes*, δεν προκαλεί όμως συχνά παθογόνο δράση στον άνθρωπο (Seeliger και συν., 1984). Στην παθογόνο



δράση παίζουν ρόλο διάφορα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η πεπτιδογλυκάνη, τα λιποτειχοϊκά οξέα καθώς και τα τειχοϊκά οξέα (Ralovich, 1984).

Η μόλυνση του ξενιστή εξαρτάται κυρίως από την κυτταρική ανοσία, από τα Τα-κυτταροτοξικά κύτταρα δηλαδή. Τα περιστατικά λιστερίωσης συμβαίνουν κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα όπως τους ηλικιωμένους, τα νεογνά, άτομα που λαμβάνουν στεροειδή αντιφλεγμονώδη (κορτιζόνη), εγκύους, ασθενείς με AIDS κ.α. Η αντίσταση του οργανισμού στη λοίμωξη γίνεται με τη μεσολάβηση των μακροφάγων τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί από τα T-κύτταρα και εξαρτάται από τον αριθμό των μακροφάγων που υπάρχουν στην περιοχή της λοίμωξης και από τη δραστηριότητά τους. Για να παραχθούν τα μακροφάγα αυτά θα πρέπει να διεγερθεί η μιτωτική δραστηριότητα των πρόδρομων μονοκυττάρων του μυελού των οστών, να παραχθούν και να κυκλοφορήσουν νέα μονοκύτταρα, από τα τελευταία εξαρτάται ο αριθμός των μακροφάγων που θα κυκλοφορήσουν στην περιοχή (Furth van και συν., 1988).

Κατά την εγκυμοσύνη αλλάζει η χυμική ανοσία και η κυτταρική ανοσία και ελαττώνεται η αντίσταση του οργανισμού στη λιστέρια, καθώς και η ικανότητα του οργανισμού να αναπτύξει ανοσία έναντι της λιστέριας (Luft και Remington, 1982). Τα νεογνά που έχουν προσβληθεί από *Listeria monocytogenes* δεν ενεργοποιούν κανένα από τους μηχανισμούς της κυτταρικής ή και της χυμικής ανοσίας και έτσι καθίστανται πιο ευαίσθητα στη λοίμωξη σε σχέση με τη μητέρα τους (Issekutz και συν., 1984).

Το ποσό του ενοφθαλμίσματος που μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη στον άνθρωπο δεν είναι ακριβώς γνωστό. Πάντως πιστεύεται πως η κατανάλωση τροφίμου που περιέχει παθογόνες λιστέριες σε αριθμό τουλάχιστον 1000 ανά

γραμμάριο τροφίμου μπορεί να καταστεί επικίνδυνη για ένα υγιές άτομο.

Μικρότεροι αριθμοί λιστεριών μπορούν να προκαλέσουν νόσο σε έγκυες γυναίκες ή σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Ralovich, 1984).

5. ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ ΤΩΝ ΖΩΩΝ

5.1. Εισαγωγή

Οι λιστέριες προσβάλλουν διάφορα είδη θηλαστικών, πτηνών και υδρόβιων σπονδυλωτών. Πρώτη αναφορά για τη νόσο έγινε στα 1922 στην Ισλανδία όπου μια νόσος που ονομάστηκε νόσος του ενσιρώματος προσέβαλε μηρυκαστικά που τρέφονταν με ενσιρωμένες τροφές. Αργότερα αποδείχθηκε πως η κατανάλωση του μολυσμένου ενσιρώματος αποτελεί το συνηθέστερο τρόπο μόλυνσης ζώων (Perry και συν., 1990). Η νόσος εκδηλώνεται κυρίως με συμπτώματα εγκεφαλίτιδας, μηνιγγοεγκεφαλίτιδας, σηψαιμίας καθώς και με αποβολές εμβρύων. Η εγκεφαλίτιδα είναι η πιο συχνή μορφή της νόσου (Rocourt και Seeliger, 1985). Παθογόνος για τα ζώα είναι κυρίως η *Listeria monocytogenes*, έχουν όμως αναφερθεί και περιπτώσεις λιστερίωσης οφειλόμενες στις *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii* (Rocourt και Seeliger, 1985).

5.2. Τρόπος μετάδοσης

Στα γαλακτοπαραγωγά ζώα η νόσος μεταδίδεται κύρια μέσω των μολυσμένων ζωοτροφών. Τα ενσιρώματα τα οποία δεν έχουν υποστεί κανονική ζύμωση είναι η κύρια πηγή μόλυνσης των ζώων (Sanaa και συν., 1993). Η τιμή του pH είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου μέσα στο ενσίρωμα. Εάν το pH πάρει τιμή μικρότερη από 4,2 τότε

ο μικροοργανισμός δεν πολλαπλασιάζεται στο ενσίρωμα, στην περίπτωση όμως που η διαδικασία ενσίρωσης δε γίνει με το σωστό τρόπο και η τιμή του pH υπερβεί το 4,5 ο μικροοργανισμός πολλαπλασιάζεται ακόμα και στη φάση της ωρίμανσης του ενσιρώματος (Perry και Donnelly, 1990).

Η νόσος επίσης μεταδίδεται μέσω λύσεων συνέχειας του ρινικού και του οφθαλμικού βλεννογόνου, καθώς και του βλεννογόνου των χειλέων, του στόματος που προκαλούνται από την κατανάλωση θάμνων και πρίνου κατά την περίοδο του χειμώνα κυρίως στις αίγες και λιγότερο στα πρόβατα. Μεταδίδεται επίσης με την τροφή όταν κοπάδια από αιγοπρόβατα βόσκουν σε περιοχές από τις οποίες πέρασαν άλλα ποίμνια τα οποία έφεραν τη νόσο, (Παπαδόπουλος, 1992). Οποιοιδήποτε παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν stress όπως το ψύχος, ο απογαλακτισμός, ο παρασιτισμός, η κακή διατροφή συντελούν στην εμφάνιση της νόσου (Φραγκόπουλος, 1973). Στη συνηθέστερη κατάσταση κατά την οποία η μόλυνση γίνεται από τη στοματική κοιλότητα, το μικρόβιο μέσω των νεύρων τριδύμου και γλωσσοφαρυγγικού, φτάνει στο στέλεχος του εγκεφάλου (Τσαγγάρης και συν., 1998)

Υπάρχουν όμως και ασυμπτωματικοί φορείς της νόσου οι οποίοι διασπείρουν το μικρόβιο με τα κόπρανά τους και το γάλα τους. Οι ασυμπτωματικοί αυτοί φορείς συμβάλλουν καθοριστικά στη μόλυνση τόσο των ζώων της ίδιας εκτροφής, πολύ δε περισσότερο μεταφέρουν τη νόσο και σε άλλες γειτονικές. (Seeliger, 1961).

5.3. Εκδήλωση της νόσου

Σύμφωνα με τον Παπαδόπουλο και συν.,1992 η νόσος προσβάλλει διάφορα είδη ζώων και χαρακτηρίζεται από εγκεφαλίτιδα, σηψαιμία και αποβολές:

- 1) **Εγκεφαλίτιδα ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα στα ενήλικα μηρυκαστικά.**
- 2) **Σηψαιμία με εστιακές νεκρώσεις στο ήπαρ στα μικρά μηρυκαστικά και τα μονογαστρικά.**
- 3) **Σηψαιμία που συνοδεύεται από εκφύλιση του μυοκαρδίου ή από εστιακές νεκρώσεις στο ήπαρ στα πτηνά.**
- 4) **Αποβολές και λοιμώξεις νεογεννήτων σε όλα τα είδη των ζώων.**

Ο μικροοργανισμός προσβάλλει τον εγκέφαλο και προκαλεί παράλυση των μυών του προσώπου, σιελόρροια και κυκλική κίνηση του ζώου. Το τελευταίο σύμπτωμα μπορεί να παραπλανήσει τη διάγνωση, γιατί αφενός δεν το παρουσιάζουν όλα τα προσβεβλημένα ζώα, αφετέρου συγχέεται με άλλες παθολογικές καταστάσεις που προκαλούν αυτό το σύμπτωμα όπως π.χ. η κοινουρίαση. Η εγκεφαλίτιδα είναι υπεροξεία στα γιδοπρόβατα με κατάληξη εντός 8 ωρών των προσβεβλημένων ζώων, στα βοοειδή δε η νόσος είναι οξεία και τα περισσότερα επιζούν για 4-14 ημέρες (Παπαδόπουλος, 1992).

6. ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

6.1. Εισαγωγή

Η λιστερίωση είναι ασθένεια η οποία προκαλείται από τα βακτήρια του γένους *Listeria*, με τη *Listeria monocytogenes* να αποτελεί το σοβαρότερο παθογόνο είδος τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο (McLauchlin, 1991), η οποία τα τελευταία χρόνια συνδέθηκε με την κατανάλωση τροφίμων μολυσμένα με το παθογόνο. Αν και πολλά άτομα έρχονται σε επαφή με το παθογόνο, μόνο σε μερικά παρουσιάζεται λιστερίωση. Η λιστερίωση εμφανίζεται συνήθως ως ασθένεια που εισβάλλει στους ευαίσθητους πληθυσμούς, συμπεριλαμβανομένων των εγκύων γυναικών, των νεογνών, των ηλικιωμένων και των ανοκατεσταλμένων ατόμων (Jay, 2000). Παρόλα αυτά, είναι πιθανό και υγιή άτομα, χωρίς καμία προδιάθεση, να νοσήσουν με λιστερίωση (Slutsker και Schuchat, 1999).

Στις Η.Π.Α. εμφανίζουν την ασθένεια περίπου 2500 άτομα το χρόνο, από τα οποία χάνουν τη ζωή τους τα 500. Στην Ευρώπη η συχνότητα νόσησης κυμαίνεται μεταξύ 0,2-1,5 κρούσματα το χρόνο ανά 100.000 πληθυσμού ενώ στην Ελλάδα ανέρχεται σε 0,3 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού (Κ.Ε.Ε.Λ., 2007). Αν και τα κρούσματα λιστερίωσης είναι σχετικά σπάνια (περίπου επτά περιστατικά αν εκατομμύριο πληθυσμού στην Νότιο Αμερική και Δυτική Ευρώπη), εντούτοις ο δείκτης θνητότητας κυμαίνεται περίπου στο 30%, με αποτέλεσμα να συγκαταλέγεται ανάμεσα στις πιο σοβαρές αιτίες θανάτου από τροφιμογενείς

λοιμώξεις στις βιομηχανοποιημένες χώρες.(Food Safety and Inspection Service FSIS., 2003).

Όπως αναφέρθηκε στην Ελλάδα τα ποσοστά της νόσου είναι χαμηλά. Αυτό οφείλεται στη δυσκολία διάγνωσης της νόσου στην Ελλάδα και στο γεγονός πως σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στις Η.Π.Α. μέχρι και ως πρόσφατα δεν ήταν νόσος υποχρεωτικής δήλωσης (Παπά, 1986). Σήμερα ανήκει μεν στα νοσήματα υποχρεωτικής δήλωσης, με την υποχρέωση όμως η γνωστοποίηση να γίνεται εντός 7 ημερών από τη διαπίστωση του κρούσματος (Κ.Ε.Ε.Λ., 2007) Από το σύνολο του γένους μόνο η *Listeria monocytogenes* είναι παθογόνος για τον άνθρωπο. Διαφορετικά είδη τροφίμων έχουν αναφερθεί να είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά της *Listeria monocytogenes* (McLauchlin, 1990), παρόλα αυτά η ελάχιστη μολυσματική δόση είναι άγνωστη για τους ανθρώπους, αν και διαφορετικές μελέτες έχουν δείξει πως οι εμπλεκόμενες περιπτώσεις λιστερίωσης, είχαν να κάνουν με υψηλά επίπεδα παθογόνου στο τρόφιμο (Hitchins, 1996).

6.2. Τρόπος μετάδοσης

Η νόσος σήμερα προκαλείται σχεδόν αποκλειστικά σιτιογενώς (WHO, 1986). Πολλά τρόφιμα έχουν ενοχοποιηθεί για τη μόλυνση του ανθρώπου, συχνότερα όμως το γάλα και τα προϊόντα του, ορισμένα είδη αλλαντικών, οι σαλάτες ή άλλα τρόφιμα, τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί ήπια θερμική επεξεργασία, συντηρούνται στην ψύξη επί μακρόν και καταναλώνονται χωρίς θερμική επεξεργασία (WHO, 1988; Rigby, 1992; Schofield, 1992).

Η *Listeria monocytogenes* είναι δυνατόν να μολύνει τον άνθρωπο μέσω λύσεων συνεχείας του δέρματος αλλά και των βλεννογόνων, σπανιότερα δε από άτομο σε άτομο, εκτός της περίπτωσης μόλυνσης του εμβρύου από τη μητέρα του (Barza, 1985).

6.3. Παθογόνος δράση

Η λιστερίωση είναι μία ασθένεια η οποία εμφανίζεται στους ηλικιωμένους (άνω των 65 ετών), στα βρέφη, τις έγκυες γυναίκες και στα έμβρυα, στα άτομα που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή εξαιτίας λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων (λευχαιμία και λέμφωμα), κακοηθών όγκων ή ανοσοκατασταλτικών θεραπειών (πχ. μεταχείριση με κορτικοστεροειδή, αζαθειοπρίνη ή ακτινοβολία), στους ασθενείς του AIDS (Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοποιητικής Ανεπάρκειας), στους αλκοολικούς, στους καρδιοπαθείς, στους διαβητικούς, στους καπνιστές κτλ. (Gellin και Broome, 1989).

Παρόλα αυτά και οι ασθενείς οι οποίοι δεν ανήκουν σε αυτές τις ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού μπορούν να νοσήσουν. Η σοβαρότητα και το είδος των συμπτωμάτων διαφέρουν ανάλογα με την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή και τη μολυσματική δόση του παθογόνου. Στις ήπιες περιπτώσεις, τα συμπτώματα μπορεί να μοιάζουν με αυτά της γρίπης, αλλά στις σοβαρότερες περιπτώσεις μπορούν να είναι εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα και σηψαιμία (Slutsker και Schuchat, 1999; Bacon και Sofos, 2003).

Τα πιο κοινά συμπτώματα της λοίμωξης του κεντρικού νευρικού συστήματος περιλαμβάνουν τον πυρετό, τον πονοκέφαλο, την ναυτία, τον εμετό, τη δυσφορία, την αταξία και την αλλαγμένη διανοητική κατάσταση (Farber και

Peterkin, 1991). Το πιο κοινό σύμπτωμα που συνδέεται με τη βακτηριαιμία είναι ο πυρετός, εντούτοις όμως μπορεί επίσης να παρουσιαστεί η δυσφορία, η κούραση και ο κοιλιακός πόνος. Η δερματική μορφή της ασθένειας, που φανερώνεται ως λύση της επιδερμίδας, μπορεί επίσης να εμφανιστεί ως αποτέλεσμα της άμεσης επαφής με τον πλακούντιο ιστό ενός μολυσμένου ζώου (Cain και McCann, 1986).

Σε κανονικούς, υγιείς ενήλικους η επιτυχής μόλυνση είναι ασυνήθιστη και συνήθως εμφανίζεται ως μη εισβολική, γαστροεντερική ασθένεια μετά από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων με το παθογόνο. Εντούτοις, η ασθένεια μπορεί, επίσης, να εκδηλωθεί σε υγιή άτομα (Farber και Peterkin 1991).

Η λιστερίωση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης εκδηλώνεται συνήθως σαν μια ήπια ασθένεια που μοιάζει με γρίπη, με γαστρεντερικά συμπτώματα, πυρετό, πονοκέφαλο και μυαλγία (Slutsker και Schuchat, 1999; Bacon και Sofos 2003). Η μητρική λιστερίωση συνήθως οδηγεί στην μόλυνση του εμβρύου, μέσω της μετάδοσης του παθογόνου από τον πλακούντα, ή σε μερικές περιπτώσεις μέσω της κολπικής αποίκισης, η οποία καταλήγει σε αυτόματη αποβολή, σε ενδομήτριο θάνατο, σε πρόωρο τοκετό ή σε πρώιμη νεογνική λοίμωξη (Slutsker και Schuchat, 1999).

Τα νεογνά είναι η ομάδα πληθυσμού που μολύνεται συνήθως με την *Listeria monocytogenes*. Η μόλυνση των νεογνών είναι μια σοβαρή και συνήθως μοιραία ασθένεια, η οποία μπορεί να εμφανιστεί στη γέννηση ή σύντομα κατόπιν (πρόωρος μορφή) ή αρκετές ημέρες με εβδομάδες μετά από τη γέννηση (καθυστερημένη μορφή). Η ασθένεια πρόωρης μορφής εμφανίζεται από ενδομητριάκη μόλυνση και φανερώνεται με αναπνευστικές δυσκολίες, τη σηψαιμία και σε μερικές περιπτώσεις, με ένα σύνδρομο αποκαλούμενο βρεφικής κοκκιωματικής σηψαιμίας (granulomatosis infantiseptica), το οποίο χαρακτηρίζεται

από ευρεία διασπορά κοκκιωμάτων στα εσωτερικά όργανα (Slutsker και Schuchat, 1999).

6.4. Επιδημίες και περιστατικά λιστερίωσης στον άνθρωπο

Από την αρχική περιγραφή του, το βακτήριο αυτό έχει καθιερωθεί ως παθογόνο στα ζώα, αλλά και στους ανθρώπους. Ωστόσο, η λιστερίωση, συχνά περιγράφονταν ως ζωνόσος, δηλαδή ως μια ασθένεια η οποία μεταδίδεται από τα ζώα στον άνθρωπο. Η μετάδοση της *Listeria monocytogenes* από τα τρόφιμα στον άνθρωπο έγινε γνωστή στις αρχές της δεκαετίας του 1980, όταν παρουσιάστηκαν πέντε μεγάλα ξεσπάσματα λιστερίωσης στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική.

Το πρώτο εκδηλώθηκε στις παραθαλάσσιες επαρχίες του Καναδά το 1981 (Schlech και συν, 1983), όπου αναφέρονται 34 περιπτώσεις προσβολής σε εγκύους και 7 ενηλίκων, με ποσοστό θνησιμότητας 28%. Η λαχανοσαλάτα ήταν αυτή που ενοχοποιήθηκε, από μικροβιολογικής και επιδημιολογικής άποψης, και εξακριβώθηκε πως η αιτία της μόλυνσης ήταν το χωράφι που καλλιεργήθηκαν τα λάχανα, στο οποίο είχαν ρίξει ως λίπασμα κοπριά ζώων, που είχαν πεθάνει από λιστερίωση.

Ένα άλλο ξέσπασμα συνέβη το 1979 (Ho και συν., 1986) όπου εμπλέκονται 20 ασθενείς σε 8 νοσοκομεία της Βοστόνης. Σ' αυτή την περίπτωση δεν ενοχοποιήθηκε κάποιο τρόφιμο, αλλά οι έρευνες έδειξαν πως ακατέργαστα λαχανικά, όπως το σέλινο, η τομάτα και το μαρούλι, ήταν πιθανόν η αιτία προσβολής.

Το 1983 στη Μασαχουσέτη ένα άλλο ξέσπασμα λιστερίωσης αναφέρεται σε 42 ενήλικους και 7 έγκυες γυναίκες, όπου υπήρξαν 14 θάνατοι. Σ' αυτήν την περίπτωση θεωρήθηκε πως πηγή μόλυνσης ήταν το παστεριωμένο γάλα, που προήλθε από ζώα τα οποία νοσούσαν από λιστερίωση. Επειδή κατά τη διαδικασία της παστερίωσης αποδείχθηκε πως δεν υπήρξε κανένα σφάλμα, γεννήθηκε η υποψία πως η *Listeria monocytogenes* είναι θερμοανθεκτική και επιβιώνει μετά την παστερίωση. Τελικά, το ξέσπασμα που πιθανόν χτύπησε τον κώδωνα του κινδύνου τόσο στους ερευνητές, όσο και στους καταναλωτές, ήταν αυτό που συνέβη στην Καλιφόρνια το 1985, με 142 περιπτώσεις (93 εγκύων και 49 ενηλίκων), οι 48 των οποίων κατέληξαν σε θάνατο. Το είδος της *Listeria monocytogenes* ήταν αυτό που ανιχνεύθηκε και απομονώθηκε από τυρί τύπου Mexican και από επεξεργασμένα λαχανικά (Linnan και συν., 1988).

Στην Ευρώπη από το 1983 έως το 1987 αναφέρονται 122 περιπτώσεις λιστερίωσης, μισές από τις οποίες παρατηρήθηκαν σε έγκυες γυναίκες, με 31 θανάτους (Bille, 1990). Το τρόφιμο που θεωρήθηκε υπεύθυνο ήταν ένα μαλακό τυρί, που κατασκευάστηκε από έναν συνδυασμό ακατέργαστου και παστεριωμένου γάλακτος. Τα μαλακά τυριά περιλήφθηκαν επίσης σε 37 περιπτώσεις το 1995 και 14 περιπτώσεις το 1997 στη Γαλλία (Goulet και συν., 1998). Τα προϊόντα κρέατος περιλήφθηκαν σε διάφορα ξεσπάσματα: ένα πατέ προκάλεσε επιδημία στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1989-1990 και αφορούσε 300 ασθενείς. (McLauchlin και συν., 1991) , μια μολυσμένη γλώσσα χοιρινού κρέατος στη Γαλλία ήταν η πηγή 279 περιπτώσεων σε 10 μήνες το 1992 και ένα σε δοχείο χοιρινό κρέας ενοχοποιήθηκε σε 39 περιπτώσεις το 1993 (Goulet και συν., 1998).

Όσον αφορά τα ψάρια και τα προϊόντα ψαριών, έξι έως εννέα περιπτώσεις (συμπεριλαμβανομένων δύο θανάτων) συνδέθηκαν με την κατανάλωση «gravad»

πέστροφας στη Σουηδία. Η πέστροφα Gravad γίνεται από τις ακατέργαστες λωρίδες που τρίβονται με αλάτι, πιπέρι, καλύπτονται με τον άνηθο και που αφήνονται για να ωριμάσουν στη θερμοκρασία ψύξης για 2 ημέρες. Συσκευάζονται έπειτα υπό κενό και αποθηκεύονται για 2-3 εβδομάδες. Τα δείγματα τροφίμων λήφθηκαν από ψυγεία των ασθενών και από τις κλειστές συσκευασίες ήταν μολυσμένα σε επίπεδα που κυμαίνονται από <100 το cfu /g ως 2.5×10^6 cfu/g (Ericsson και συν., 1997). Επίσης σε ότι αφορά τα ψάρια και το ρόλο του στη λιστερίωση έχουν αναφερθεί πέντε περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας που συνδέθηκαν με κατανάλωση αεροστεγώς συσκευασμένης καπνιστής πέστροφας η οποία μολύνθηκε από *Listeria monocytogenes* (Miettinen και συν., 1999).

Όλες αυτές οι περιπτώσεις ξεσπασμάτων της λιστερίωσης, καθώς και άλλες που ακολούθησαν, αύξησαν το ενδιαφέρον των παραγωγών τροφίμων, των υπεύθυνων υπηρεσιών για τα τρόφιμα, των επιστημόνων και των καταναλωτών, με αποτέλεσμα να γίνει μια εκτενής έρευνα για τη *Listeria monocytogenes* και την παθογένεση που προκαλεί.

7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ Κ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ

7.1. Εισαγωγή

Υπάρχουν πολλοί λόγοι για τους οποίους θα πρέπει να ανιχνεύεται και μάλιστα ταχύτατα η *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα. Οι κυριότεροι όμως, πέραν της ερευνητικής δραστηριότητας, είναι η προστασία της δημόσιας υγείας και η διερεύνηση των αιτίων σιτιογενών δηλητηριάσεων. Στα τρόφιμα τα βακτήρια είναι λίγα και συνήθως τραυματισμένα εξαιτίας των διαφόρων μορφών επεξεργασίας που τυγχάνει το τρόφιμο μέχρι να φτάσει στον καταναλωτή. Επιπλέον τα κύτταρα των λιστεριών έχουν να ανταγωνιστούν και την πολυάριθμη χλωρίδα του ίδιου του τροφίμου. Για τους παραπάνω λόγους έχουν μελετηθεί διάφορες μέθοδοι απομόνωσης και ταυτοποίησης του μικροοργανισμού από κλασσικές έως και πιο σύγχρονες όπως αυτές με βάση το ανασυνδυασμένο DNA (Rocourt, 1999).

7.2. Κλασσικές μέθοδοι απομόνωσης

Οι πρώτες μέθοδοι απομόνωσης της *L. monocytogenes* συμπεριλάμβαναν την τεχνική του κρύου εμπλουτισμού (cold enrichment), η οποία βασιζονταν στην δυνατότητα της *L. monocytogenes* να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Gray και συν. 1966). Η τεχνική αυτή ήταν πολύ χρονοβόρα (απαιτούσε μέχρι και

έξι μήνες) και δεδομένης της ανησυχίας για τη δυνατότητα του μικροοργανισμού να λειτουργεί ως παθογόνο, αναπτύχθηκαν νέες γρήγορες τεχνικές για την απομόνωση και ταυτοποίηση του. Οι σύγχρονες μέθοδοι απομόνωσης της *Listeria monocytogenes* βασίζονται στην προσθήκη αντιβιοτικών ή επιλεκτικών παραγόντων (π.χ. LiCl, ανυδρίτη της γλυκίνης, φαινυλαιθανόλη) στα εμπλουτιστικά υλικά, καθώς και στην επώαση τους σε θερμοκρασίες κοντά στις άριστες συνθήκες ανάπτυξης. Ο εμπλουτισμός μπορεί να βασίζεται σε παράγοντες επιλογής και να είναι μιας ή δύο φάσεων. Κατά τον εμπλουτισμό σε μία φάση χρησιμοποιούνται υποστρώματα όπως το *Listeria* Enrichment Broth και το University of Vermont Medium (Lovett, 1987). Κατά τον εμπλουτισμό σε δύο φάσεις χρησιμοποιούνται κυρίως το *Listeria* Enrichment Broth (Lovvet και συν., 1987), ο ζωμός Fraser (Fraser και Sperber, 1988) και ο τροποποιημένος ζωμός Fraser.

7.3. Απομόνωση

Αρκετές διεθνείς πρότυπες μέθοδοι εφαρμόζονται για την απομόνωση και την ταυτοποίηση της *Listeria monocytogenes* από τα τρόφιμα, όπως τα πρότυπα του Διεθνούς Οργανισμού Πιστοποίησης (International Standardization Organization, ISO, 1996), και περιλαμβάνουν εμπλουτισμό σε ένα ή δυο στάδια, ο οποίος ακολουθείται από επιφανειακή εξάπλωση σε δυο επιλεκτικά υλικά. Αυτά τα υλικά είναι το PALCAM και το OXFORD, τα οποία περιέχουν εσκουλίνη και εναμμώνιο κιτρικό σίδηρο, επιτυγχάνοντας έτσι το διαχωρισμό των αποικιών του

γένους *Listeria*, χάρη στην ικανότητα τους να υδρολύουν την εσκουλίνη, οπότε οι αποικίες τους εμφανίζονται με μαύρο ή σκούρο καφέ χρώμα (Adams και Moss, 1995)

Άλλα στερεά υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του μικροοργανισμού είναι το MacBridge *Listeria* Agar (MacBridge και Girard 1960), το τροποποιημένο MacBridge *Listeria* Agar (Lovvet, 1987), το Lithium chloride-Phenylethanol-Moxalactam agar (Lee και McClain, 1986) και τελευταία το ALOA agar (Willis και συν., 2006)

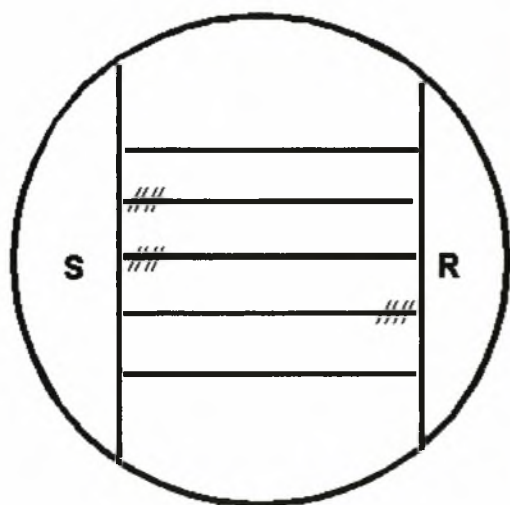
7.4. Ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση του γένους *Listeria* βασίζεται σε κάποιες δοκιμές, όπως τη χρώση Gram και δοκιμές οξειδάσης, καταλάσης και κινητικότητας. Η περαιτέρω ταυτοποίηση των ειδών πραγματοποιείται με τις αιμολυτικές δοκιμές, τις δοκιμές CAMP και τη ζύμωση σακχάρων. Επαρκή στοιχεία για την ταυτοποίηση με βάση την αποδόμηση ουσιών δίνει ο συνδυασμός των υδατανθράκων D-ξυλόζης, L-ραμνόζης και μαννιτόλης και της α-μέθυλο-d-μαννοσίδης (Seeliger και Jones, 1986). Εναλλακτικές μέθοδοι ταυτοποίησης της *L. monocytogenes*, ώστε να μπορεί να διακριθεί από τα άλλα *Listeria* spp., αποτελούν κάποια εμπορικά βιοχημικά τεστ, όπως τα API *Listeria*, API Coryne, API 50CH και Mast-ID (Batt, 1999). Άλλες γρήγορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση της *Listeria monocytogenes* είναι η μέθοδος ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), ο υβριδισμός του DNA, η χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας και η μέθοδος PCR (Polymerase Chain Reaction) (Adams και Moss, 1995; Baylis, 2000; AOAC, 2000).

Στους πίνακες 7.1 και 7.2 δίνονται οι βιοχημικές δοκιμές διαφοροποίησης της *Listeria spp.* και στο σχήμα 7.1 και την εικόνα 7.1 το CAMPS test.

Πίνακας 7.1. Διαφοροποίηση στελεχών του είδους <i>Listeria</i> .					
Είδη	β -Hemolysis ^A	Mannitol	Rhamnose	Xylose	Virulence
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	+-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	+-	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+	-
<i>L. grayi</i>	-	+	+-	-	-
^A Αιματούχο άγαρ προβάτου					
http://www.fda.org (2003)					

Πίνακας 7.2 Δοκιμή Camps για τη διάκριση των στελεχών <i>Listeria spp.</i>		
Δοκιμή αιμόλυσης με	<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	<i>Rhodococcus equi</i> (R)
<i>L. monocytogenes</i>	+	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-
http://www.fda.org (2003)		



Σχήμα 7.1 Δοκιμή Camps (www.fda.org)



Εικόνα 7.1 Δοκιμή Camps (www.fda.org)

Στο σχήμα 7.1 φαίνεται υπόδειγμα ενοφθαλμισμού της *Λιστερια spp.* σε τρυβλίο που περιέχει το υπόστρωμα εμπλουτισμένο με αίμα προβάτου. Οι οριζόντιες γραμμές συμβολίζουν λωρίδες ενοφθαλμισμού 5 υπό δοκιμή στελεχών, ενώ οι κάθετες γραμμές παριστάνουν λωρίδες ενοφθαλμισμού των *Staphylococcus aureus* (S) and *Rhodococcus equi* (R).

8. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ ΣΕ ΨΑΡΙΑ ΚΑΙ ΙΧΘΥΟΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

Αν και πολλά είδη τροφίμων έχουν εμπλακεί σε περιπτώσεις λιστερίωσης ή περιπτώσεις λιστερίωσης από ψάρια και προϊόντα ψαριών είναι εξαιρετικά σπάνιες. Η *Listeria* spp. είναι ένας μικροοργανισμός ευρέως διαδεδομένος στη φύση (Jones και Seeliger, 1992). Η *Listeria monocytogenes* έχει απομονωθεί ακόμη και από το νερό ποταμών και το ίζημα (Colburn και συν., 1990), τα κανάλια και τις λίμνες (Dijkstra, 1982) και τα παράκτια νερά της θάλασσας (Colburn και συν., 1990). Επομένως, θα ήταν φυσικό να αναμένεται ότι τα βακτήρια αυτά συνδέονται με τα υδρόβια ζώα.

Η αναφερόμενη παρουσία της *Listeria monocytogenes* στα προϊόντα αλιείας και τα ιχθυοσκευάσματα από διάφορα μέρη του κόσμου ποικίλλει από πολύ χαμηλή σε 50% (Weagant, 1998; Dillon και Pattel, 1992; Fuchs και Reilly, 1992; Ben, 1994). Οι Fuchs και Surendran (1989) αναφέρουν ανίχνευση *Listeria* spp. σε ποσοστό 33% των δειγμάτων φρέσκων ψαριών, αλλά απουσία *Listeria monocytogenes*. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και πάλι από την Ινδία, για ψάρια του θαλασσινού νερού και γαρίδες, με ποσοστά μόλυνσης 10.5% σε *Listeria* spp. και απουσία *Listeria monocytogenes* (Manoj και συν., 1991).

Ποσοστά 2% προσβολής με *Listeria monocytogenes* σε δείγματα ψαριών του θαλασσινού νερού από το Τρινιτάντ αναφέρεται σε εργασία του Adesiyun (1993) ενώ ο Jeyasekaran και συν. (1996) κατέγραψαν προσβολή 13.8% από *Listeria monocytogenes* και 57% από *Listeria* spp. σε ψάρια και οστρακόδερμα στην Ινδία.

Άλλες μελέτες έδειξαν μάλλον χαμηλή προσβολή από *Listeria monocytogenes* στα ψάρια του θαλασσινού νερού (1.5%) και τα οστρακόδερμα (3.3%) (Dhanashree και συν., 1999).

Μελέτη που αφορούσε την αυστριακή αγορά και έγινε σε 261 δείγματα ψαριών τόσο του γλυκού όσο και του θαλασσινού νερού, έδειξε παρουσία *Listeria monocytogenes* σε ποσοστό 13% (Hellstrom και συν., 2007).

Σε μελέτη που έγινε σε εγκατάσταση φιλετοποίησης ψαριών του γλυκού νερού στις Σκανδιναβικές χώρες έδειξε πως το 13.5% των ψαριών που έφθαναν για επεξεργασία ήταν μολυσμένα με *Listeria* spp., στο ίδιο ποσοστό και με *Listeria monocytogenes*. Το επίπεδο της μόλυνσης από *Listeria* spp. και *Listeria monocytogenes* στο τελικό προϊόν ήταν 39.0% (Gudbjörnsdóttir και συν., 2004).

Υψηλό ποσοστό παρουσίας των *Listeria* spp. 73% και 50% σε μαριναρισμένη πέρκα και σολωμό ανιχνεύθηκε στην Ισλανδία ενώ αντίστοιχα τα ποσοστά σε σαλάτες ψαριών κυμάνθηκαν από 25-80%. Δεν ανιχνεύθηκε σε οστρακοειδή, καπνιστά ψάρια και πάστες ψαριών (Hartemink και Georgsson, 1990).

Σε μελέτη που για τα έτη 2001, 2002, και 2003 αφορούσε καπνιστό σολωμό έδειξε πως τα ποσοστά προσβολής από *Listeria monocytogenes* ήταν 10.20% το 2001, 9.04% το 2002 και 1.03% το 2003 (Decastelli και συν., 2004).

Διάφορα περιστατικά λιστερίωσης, που αποδόθηκαν σε αεροστεγώς συσκευασμένα μαριναρισμένα ψάρια, με 8 τουλάχιστον ασθενείς σε 11 μήνες, έχει αναφερθεί στη Σουηδία (Tham και συν., 2000). Πιθανές περιπτώσεις μόλυνσης με *Listeria monocytogenes* καπνιστού σολωμού (*Salmo salar*) και μαριναρισμένης πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) έχουν στρέψει έρευνες προς την κατεύθυνση αυτών των ψαριών. Αυτές έχουν δείξει πως μέχρι 10% της

λιανικής πώλησης των συσκευασμένων υπό κενό αέρος προϊόντων περιέχουν τη *Listeria monocytogenes* (Ericsson και συν., 1997).

Σε εργοστάσια επεξεργασίας και μεταποίησης ψαριών στη Τουρκία αναφέρεται παρουσία λιστεριών (50-57%) στο περιβάλλον των εργοστασίων καθώς και στον εξοπλισμό που έρχεται σε επαφή με τα ψάρια όχι όμως στην πρώτη ύλη. Στο τελικό προϊόν (καπνιστό ψάρι) πάντως, ανιχνεύθηκε το βακτήριο σε μικρότερο ποσοστό (Kisla και συν., 2007).

Σε έρευνα που έγινε στην Ινδία από τα 164 δείγματα που ελέγχθηκαν (132 φρέσκα ψάρια και 32 αποξηραμένα ψάρια), 62 (37.8%) των φρέσκων δειγμάτων ψαριών ήταν θετικά για *Listeria spp.*, αλλά κανένα από τα αποξηραμένα δείγματα ψαριών. Η *Listeria monocytogenes* απομονώθηκε από τρία (1.83%) δείγματα των φρέσκων ψαριών (Moharem και συν., 2007).

Σε έρευνα που έγινε σε εργοστάσιο επεξεργασίας ψαριών στη Φινλανδία αναφέρεται ποσοστό μόλυνσης της πρώτης ύλης από *Listeria monocytogenes* σε ποσοστό 20% και έφτανε δε ως και 50% σε ορισμένες φάρμες (Johansson και συν., 1999).

Σε επίπεδο ιχθυαγορών ανάλογη έρευνα στην Ισπανία έδειξε πως το ποσοστό μόλυνσης των θαλασσινών ψαριών κυμαίνονταν στο 10%. (Herrera και συν., 2005).

Σε ότι αφορά την Ελλάδα σε έρευνα που έγινε στη Θεσσαλονίκη αναφέρεται πως 5 από τα 120 δείγματα ψαριών του θαλασσινού νερού ήταν θετικά σε *Listeria spp.* και από αυτά 1 σε *L.monocytogenes* (Soultos και συν., 2007).

Στην Ήπειρο σε εργασία στην οποία εξετάστηκαν συνολικά 360 δείγματα, συμπεριλαμβανομένων 105 θαλασσίων ψαριών, 25 γαρίδων, 50 καλαμαριών, 50

χαταποδιών, 30 μυδιών και 100 ψαριών του γλυκού νερού, έδειξε παρουσία λιστεριών σε ποσοστό 1-3.3% (Papadopoulou και συν., 2007)

9. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ ΣΤΟΥΣ ΧΩΡΟΥΣ

ΑΛΙΕΥΣΗΣ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΩΛΗΣΗΣ ΨΑΡΙΩΝ.

Έχει αποδειχθεί πως η μόλυνση των ψαριών κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας συμβαίνει σε μεγάλο ποσοστό, υπάρχουν πολλές μελέτες που δείχνουν πως τα βακτήρια αυτά τα οποία ανήκουν στη χλωρίδα των εγκαταστάσεων επεξεργασίας ψαριών επιμολύνει τα ιχθυοσκευάσματα (Autio και συν., 1999)

Όπως προαναφέρθηκε σε έρευνα που έγινε σε εργοστάσιο επεξεργασίας ψαριών στη Φινλανδία αναφέρεται ποσοστό μόλυνσης από *Listeria monocytogenes* σε ποσοστό 20% και έφτανε δε έως και 50% σε ορισμένες φάρμες. Στα ίδια εργοστάσια οι ορότυποι της *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκαν από το περιβάλλον των εργοστασίων επεξεργασίας ψαριών ήταν ίδιοι με αυτούς που απομονώθηκαν από τα έτοιμα προϊόντα στην αγορά. Αυτό φανερώνει την διασταυρούμενη μόλυνση του έτοιμου προϊόντος από την εγκατάσταση επεξεργασίας (Johansson και συν., 1999)

Σε έρευνα στη Δανία αναφέρεται πως σε ότι αφορά την παρουσία της *L.monocytogenes* στους χώρους διαβίωσης και επεξεργασίας των ψαριών αυτή αυξανόταν όσο αυξανόταν και η ανθρώπινη δραστηριότητα: 2% θαλάσσια ιχθυοτροφεία, 10% σε ιχθυοτροφεία ψαριών του γλυκού νερού, 16% σε εγκαταστάσεις φιλετοποίησης, και 68% σε εγκαταστάσεις κάπνισης ψαριών (Hansen, 2006)

Αντίστοιχα σε μελέτη που αφορούσε 4 εργοστάσια κάπνισης ψαριών στις Η.Π.Α. απομονώθηκε *Listeria spp* από το 16.7% των δειγμάτων ακατέργαστων

ψαριών, 9.0% των δειγμάτων έτοιμων καπνιστών προϊόντων, και 27.3% των περιβαλλοντικών δειγμάτων. Η *Listeria monocytogenes* απομονώθηκε από 3.8% των δειγμάτων ακατέργαστων ψαριών (0 -10%, ανάλογα με τις εγκαταστάσεις), 1.3% των δειγμάτων έτοιμων καπνιστών ψαριών (0-3.3%), και από το 12.8% των περιβαλλοντικών δειγμάτων (0-29.8%). Μεταξύ των περιβαλλοντικών δειγμάτων, η *Listeria monocytogenes* βρέθηκε σε 23.7% των δειγμάτων που λήφθηκαν από τους αγωγούς, 4.8% των δειγμάτων που λήφθηκαν από τις επιφάνειες επαφής με τρόφιμα, 10.4% των δειγμάτων που λήφθηκαν από υπαλλήλους (ποδιές, χέρια, και λαβές πορτών), και 12.3% των δειγμάτων που λήφθηκαν από άλλες επιφάνειες οι οποίες δεν έρχονταν σε επαφή με ψάρια. Η *Listeria spp.* απομονώθηκε από τα περιβαλλοντικά δείγματα σε κάθε μια από τις τέσσερις εγκαταστάσεις, ενώ η *Listeria monocytogenes* όχι σε όλα (Thimothé, 2004).

Στην Ελλάδα σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε και εξετάστηκαν δείγματα από 4 ποτάμια και μια λίμνη της Βορείου Ελλάδας, απομονώθηκε *Listeria monocytogenes* στο 6% των δειγμάτων των ποταμών. (Παπά και συν., 1996).

Σε έρευνα που έγινε στη Θεσσαλονίκη και αφορά το περιβάλλον των ιχθυοπωλείων αναφέρεται πως 18 από τα 100 δείγματα από επιφάνειες, μαχαίρια, δάπεδα και ιχθυοκιβώτια ήταν θετικά σε *Listeria spp.* και από αυτά 5 σε *Listeria monocytogenes* (Soultos και συν., 2007).

10. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΙΧΘΥΟΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

Πολλές κατηγορίες τροφίμων έχουν συνδεθεί με τις σποραδικές και επιδημικές περιπτώσεις λιστερίωσης. Τέτοια τρόφιμα είναι το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, το κρέας και τα προϊόντα κρέατος, τα λαχανικά και τα ψάρια και τα ιχθυοσκευάσματα. Από τα στοιχεία που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των προηγούμενων ετών σχετικά με τις πηγές περιπτώσεων λιστερίωσης, φαίνεται ότι μερικά τρόφιμα είναι περισσότερο δυνητικά επικίνδυνα από άλλα. Τα τρόφιμα υψηλού κινδύνου είναι συχνά έτοιμα για κατανάλωση, και αποθηκεύονται στη θερμοκρασία ψύξης για μεγάλο χρονικό διάστημα, που επιτρέπει στις λιστέριες να αναπτυχθούν και να φθάσουν στις μολυσματικές δόσεις. Η ασφάλεια των διάφορων ιχθυοσκευασμάτων ποικίλλει αρκετά και επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η προέλευση των ψαριών, η μικροβιολογική κατάσταση του προϊόντος, η διαδικασία παραγωγής και συντήρησης και η ενδεχόμενη επεξεργασία πριν από την κατανάλωση (Huss και συν., 1999).

Τα ψάρια συνήθως μαγειρεύονται πριν καταναλωθούν. Η θερμική επεξεργασία η οποία συνήθως είναι έντονη αδρανοποιεί τα βακτήρια και έτσι δεν είναι δυνατή η μόλυνση του τελικού καταναλωτή. Ανάλογα με το είδος του ψαριού έχουμε διάφορες κατηγορίες σε σχέση με τον ενδεχόμενο κίνδυνο. Ωστόσο, η κύρια ταξινόμηση γίνεται ανάλογα με το βαθμό επεξεργασίας του ψαριού, κυρίως δε με άξονα τη θερμική επεξεργασία.

Σύμφωνα με τους Huss και συν. (1999) τα αλιεύματα ταξινομούνται ανάλογα με το βαθμό επικινδυνότητας στις εξής κατηγορίες:

1. Υψηλού κινδύνου

- Μαλάκια, συμπεριλαμβανομένων των φρέσκων και κατεψυγμένων μυδιών και στρείδια με ή χωρίς το όστρακο.
- Ψάρια (που καταναλώνονται ακατέργαστα χωρίς οποιαδήποτε επεξεργασία).
- Ελαφριά συντηρημένα προϊόντα ψαριών (δηλ., NaCl<6%) στην υγρή φάση, pH>5.0). Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει αλατισμένο, μαριναρισμένο και καπνιστό σολωμό.
- Ελαφρά θερμικά επεξεργασμένα προϊόντα αλιευμάτων και καρκινοειδή.

2. Χαμηλού κινδύνου

- Ημισυντηρημένα αλιεύματα, δηλ., NaCl> 6% στην υγρή φάση, ή pH<5.0, συντηρητικά. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τα παστά ή και μαριναρισμένα αλιεύματα και το χαβιάρι .
- Προϊόντα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία (Κονσέρβες).
- Αφυδατωμένα, αφυδατωμένα-αλατισμένα και αφυδατωμένα-καπνιστά αλιεύματα.
- Φρέσκα ή κατεψυγμένα αλιεύματα και καρκινοειδή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

11. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

11.1 Δειγματοληψία των νωπών ψαριών.

Η δειγματοληψία των νωπών ψαριών διεξήχθη στα καταστήματα λιανικής πώλησης αλιευμάτων στη Δυτική Μακεδονία και συγκεκριμένα στους νομούς Φλώρινας και Κοζάνης στο διάστημα από 1-10-2007 ως και 15-1-2008. Τα δείγματα πάρθηκαν σε άσηπτες συνθήκες, φορώντας πλαστικά γάντια μιας χρήσης, τοποθετήθηκαν σε ειδικές αποστειρωμένες σακούλες μιας χρήσης, και μεταφέρθηκαν σε φορητό ισοθερμικό δοχείο το οποίο περιείχε πάγο. Τα ψάρια πάρθηκαν πρωινές ώρες και το αργότερο μέχρι τις 11 π.μ.

Εξετάστηκαν δύο είδη ψαριών 60 δείγματα συνολικά. 30 ψάρια ανήκουν στο είδος πεταλούδα (*Carassius auratus gibelio*) και αλιεύθηκαν από τις λίμνες του νομού Φλώρινας (Μικρή και Μεγάλη Πρέσπα, Βεγορίτιδα, Πετρών, Χειμαδίτιδα, Ζάζαρη) και του νομού Κοζάνης (Πολυφύτου) και διάφορους χείμαρρους της περιοχής. Άλλα 30 ψάρια, που ανήκουν στο είδος ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), πάρθηκαν από καταστήματα πώλησης ψαριών από τις παραπάνω περιοχές. Οι πέστροφες προέρχονταν από ιχθυοτροφεία της Ηπείρου.

Τα σημεία δειγματοληψίας ψαριών διαχωρίστηκαν σε 4 κατηγορίες ανάλογα με το είδος της εγκατάστασης λιανικής πώλησης.

- Υπεραγορά
- Ιχθυοπωλείο
- Υπαίθριο ιχθυοπωλείο-Λαϊκή
- Πλανόδιοι

Η μεταφορά τους στο εργαστήριο γίνονταν εντός το πολύ 3 ωρών από τη στιγμή συλλογής πάντα χρησιμοποιώντας ισοθερμικό δοχείο με πάγο.

Στην αρχή γίνονταν μια μακροσκοπική εξέταση των ψαριών σε σχέση με την εξωτερική τους εμφάνιση, το μέγεθος, το βάρος και τα χαρακτηριστικά νωπότητας του δείγματος. Με χρήση αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στυλεού (Surface Swab Kit, SKC, U.S.A.), ο οποίος είχε υγρανθεί προηγουμένως σε υπόστρωμα *Listeria Fraser Broth Half Concentration* (LABM) απομάσσονταν επιφάνεια 100cm² του ψαριού καθώς και η περιοχή των βραγχίων. Στη συνέχεια ακολουθούσε δεύτερη απόμαξη, με στεγνό αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό (cotton wool) αυτή τη φορά, της ίδια περιοχής έτσι ώστε να ληφθούν υπολείμματα υγρών που έμειναν. Και οι δύο βαμβακοφόροι στυλεοί μεταφέρονταν σε φιαλίδια, που περιείχαν 10 ml του ίδιου υποστρώματος.

Έπειτα σκουπίζονταν η επιφάνεια του ψαριού με αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί και μετά με απορροφητικό χαρτί εμποτισμένο με αιθυλική αλκοόλη έτσι ώστε να απομακρυνθούν η βλέννη και διάφορα άλλα υγρά της επιφάνειας και να γίνει απολύμανση της. Μετά αφαιρούνταν άσηπτα το δέρμα και λαμβάνονταν τεμάχιο σάρκας 25gr το οποίο μεταφέρονταν σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher ("BagLight 400", 400ml, 19x30cm) στην οποία προστίθεντο 225ml υποστρώματος *Listeria Fraser Broth Half Concentration* και ακολουθούσε ομογενοποίηση των δειγμάτων για 2 λεπτά με τη βοήθεια συσκευής Stomacher (Seward Medical, London, UK).

11.2 Δειγματοληψίες του περιβάλλοντος των σημείων λιανικής πώλησης ψαριών.

Τα δείγματα που προέρχονται από το περιβάλλον των σημείων λιανικής πώλησης ψαριών πάρθηκαν με τη μέθοδο των βυσμάτων. Η απόμαξη αφορούσε επιφάνεια 100cm^2 . Απομάσσονταν σημεία των επιφανειών τα οποία έρχονταν σε άμεση επαφή με την επιφάνεια των ψαριών. Τα δείγματα των χεριών του προσωπικού, ελήφθησαν με απόμαξη και των δύο χεριών.

Πριν την απόμαξη τα βύσματα υγραίνονταν σε υπόστρωμα Listeria Fraser Broth Half Concentration (LABM) και μετά από αυτήν, μεταφέρονταν σε φιαλίδια που περιείχαν 10 ml του ίδιου υποστρώματος. Ακολουθούσε δεύτερη απόμαξη της ίδιας επιφάνειας με στεγνό αποστειρωμένο βύσμα, το οποίο μεταφέρονταν στο ίδιο φιαλίδιο.

Τα σημεία δειγματοληψίας διαχωρίστηκαν σε 6 κατηγορίες ανάλογα με το πώς έρχεται η συγκεκριμένη επιφάνεια σε επαφή με τα ψάρια.

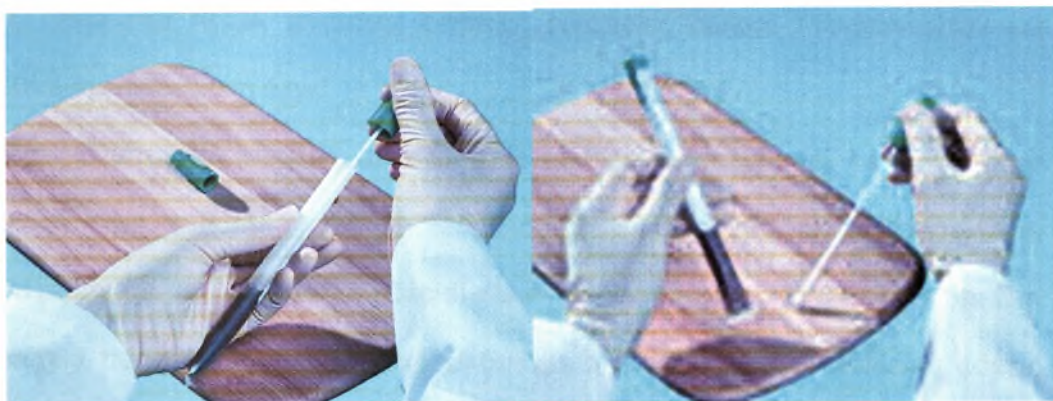
- Πλαστικοί κιβώτια ψαριών (πλαστικά ιχθυοκιβώτια).
- Ξύλινα κιβώτια ψαριών (κασέλες).
- Πάγκοι κοπής και καθαρίσματος αλιευμάτων.
- Μαχαίρια και εργαλεία καθαρίσματος αλιευμάτων.
- Χέρια προσωπικού που ασχολείται με το καθάρισμα ή με

την πώληση αλιευμάτων.

Τα σημεία δειγματοληψίας επιφανειών διαχωρίστηκαν σε 4 κατηγορίες ανάλογα με το είδος της εγκατάστασης λιανικής πώλησης.

- Υπεραγορά
- Ιχθυοπωλείο
- Υπαίθριο ιχθυοπωλείο-Λαϊκή
- Πλανόδιοι

Καταβλήθηκε προσπάθεια ώστε οι δειγματοληψίες, αφενός να διαμορφώνουν μια αντιπροσωπευτική εικόνα του καταστήματος λιανικής πώλησης αλιευμάτων, και αφετέρου να παρουσιάζουν επαναληψιμότητα, έτσι ώστε τα αποτελέσματα διαφορετικών δειγματοληψιών από διαφορετικά καταστήματα να είναι το δυνατόν συγκρίσιμα.



Εικόνα 11.1 Διαδικασία απόμαξης επιφανειών

11.3 Απομόνωση και ταυτοποίηση των λιστεριών.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι αυτή κατά ISO 11290:1996 όπως έχει αναθεωρηθεί το 2004.

Σε ότι αφορά τα δείγματα σάρκας ψαριών ακολούθησε την ομογενοποίηση, επώαση στους 30°C για 24h (Φάση προεμπλουτισμού). Στη συνέχεια 0.1 ml από το προηγούμενο φιαλίδιο μεταφερόταν σε φιαλίδια που περιείχαν 10ml υποστρώματος *Listeria Fraser Broth Full Concentration (LABM)* με χρήση αυτόματης πιπέτας. Ακολουθούσε επώαση στους 30°C για 24h. (Φάση εκλεκτικού εμπλουτισμού).

Στη συνέχεια γινόταν επιφανειακή σπορά σε *Oxford Listeria Agar (LABM)* και σε *Harlequin Listeria Agar Agosti and Ottaviani (LABM)* τα οποία επωάζονταν στους 37°C για 24-48h και μετά γίνονταν η ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Στα θετικά δείγματα στο *Oxford Listeria Agar* σχηματίζονταν μαύρες αποικίες με μαύρη άλω, ενώ στο *ALOA* πράσινες αποικίες οι οποίες άλλοτε περιβάλλονταν και άλλοτε όχι από λευκή άλω.

5 ύποπτες αποικίες από το κάθε τρυβλίο μεταφέρονταν σε *TSYE agar (Oxoid)* για καθαροποίηση σε θερμοκρασία 37°C. Μετά την καθαροποίηση μεταφέρονταν σε *TSYE Broth (Oxoid)* και επωάζονταν στους 20-25°C για 8h. Στη συνέχεια παρατηρούμενες σε μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου ή αντίθετης φάσης εξετάζονταν για κινητικότητα (*motility test*). Η κίνηση είναι χαρακτηριστική, και μοιάζει με την περιστροφή έλικας ελικοπτέρου. Επίσης ταυτόχρονα έγινε χρώση *Gram* και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο, καθώς και τα τεστ οξειδάσης και καταλάσης.

11.4 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των *Listeria spp.* περιλαμβάνει:

- Κλίβανους ξηρής και υγρής αποστείρωσης
- Ομογενοποιητή Stomacher (Seward Medical, London, UK).
- Κλίβανο στεγνώματος θερμοκρασίας μεταξύ 25 +/- 1 °C
- Επωαστικούς κλίβανους θερμοκρασιών 30 +/- 1 και 37 +/- 1 °C.
- Υδατόλουτρο θερμοκρασίας 47 +/- 2 °C.
- Μικροβιολογικούς κρίκους
- pH-μετρο
- Δοκιμαστικούς σωλήνες ή φιάλες
- Ογκομετρικούς κύλινδρους
- Σωληνάρια υάλινα, 8ml - borosilicate, με βιδωτό πώμα αποστειρώσιμο, 100 x 13 mm
- Διαβαθμισμένα σιφώνια διαβαθμίσεων 0,1, 0,5, 1 και 10 ml.
- Τρυβλία Petri διαμέτρου 90 - 100, ή και 140 mm
- Μικροσκόπιο με δυνατότητα παρατήρησης αντίθετης φάσης.
- Βαμβακοφόρους στυλεούς (Surface Swab Kit, SKC, U.S.A.)
- Ηλεκτρονικούς Ζυγούς ακριβείας (EW 220-3NM)
- Ψαλίδια, λαβίδες και νυστέρια
- Απορροφητικό χαρτί
- Οινόπνευμα και άλλα απολυμαντικά υγρά
- Συσκευές Vortex, λυχνίες Bunsen κλπ.

11.5 Στάδια απομόνωσης της *Listeria monocytogenes*.

11.5.1 Προεμπλουτισμός

Ενοφθαλμισμός του δείγματος σε εκλεκτικό εμπλουτιστικό υπόστρωμα με μειωμένη συγκέντρωση εκλεκτικών παραγόντων. Είναι απαραίτητη διαδικασία προκειμένου να μπορέσουν τα τραυματισμένα κύτταρα να αναπτυχθούν. Επώαση στους 30°C για 24 ώρες.

11.5.2 Εμπλουτισμός

Ενοφθαλμισμός σε εκλεκτικό εμπλουτιστικό υπόστρωμα με κανονική συγκέντρωση εκλεκτικών παραγόντων. Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο προκειμένου να μπορέσει η Λιστέρια να αναπτυχθεί περισσότερο σε σχέση με την υπόλοιπη μικροβιακή χλωρίδα του δείγματος. Επώαση στους 37°C για 24-48 ώρες.

11.5.3 Απομόνωση σε στερεά θρεπτικά υλικά και ταυτοποίηση

Τα στερεά θρεπτικά υλικά χρησιμοποιούνται μετά τη φάση του εμπλουτισμού, προκειμένου να ανιχνευτούν και απομονωθούν οι χαρακτηριστικές αποικίες που είναι πιθανές *Listeria monocytogenes*. Έγινε ενοφθαλμισμός σε 2 στερεά εκλεκτικά υποστρώματα (OXFORD και ALOA) και επώαση στους 37°C για 24 -48 ώρες. Έλεγχος για την παρουσία χαρακτηριστικών αποικιών.

11.5.4 Επιβεβαίωση

Επειδή η παρουσία των χαρακτηριστικών αποικιών της *Listeria monocytogenes* στα στερεά υποστρώματα δεν τεκμηριώνει την παρουσία του μικροβίου, απαιτείται να γίνει ενοφθαλμισμός των ύποπτων αποικιών σε διαφορετικά υποστρώματα για μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές εξετάσεις.

Οι δοκιμές που έγιναν περιελάμβαναν την καλλιέργεια σε TSYE broth για κινητικότητα και στη συνέχεια Gram χρώση, η δοκιμή της οξειδάσης και η δοκιμή της καταλάσης.

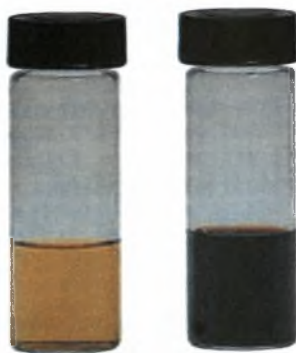
Με τη χρησιμοποίηση όλης αυτής της σειράς γίνεται η ταυτοποίηση του μικροοργανισμού σε επίπεδο γένους με μεγάλη ακρίβεια. Απαιτείται βέβαια μια σειρά βιοχημικών δοκιμών (API_LISTERIA) για να ταυτοποιηθεί το είδος.

Στο παράρτημα δίνονται τα υποστρώματα και οι τρόποι παρασκευής τους.

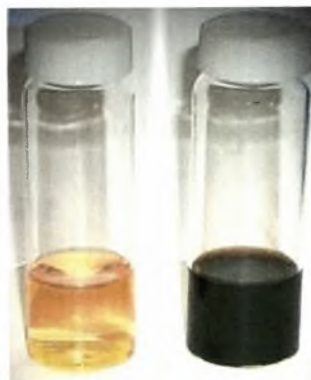
11.6 ΥΛΙΚΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ

11.6.1 Προεμπλουτιστικό υπόστρωμα: Half Fraser Broth (LAB164-LABM)

11.6.2 Εμπλουτιστικό υπόστρωμα. Full Fraser broth (LAB165-LABM)

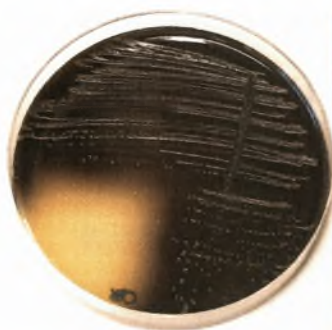


Εικόνα 11.2 Ζωμός Half Fraser (-) & (+)



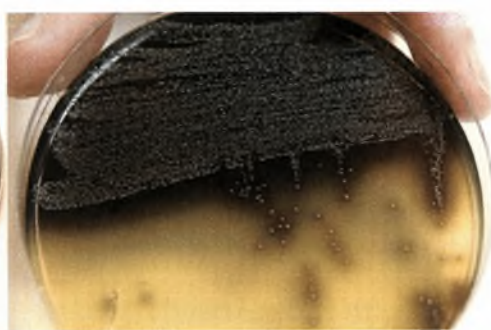
Εικόνα 11.3 Ζωμός Full Fraser (-) & (+)

11.6.3 Στερεό εκλεκτικό στερεό υπόστρωμα. *Listeria* Isolation Medium Oxford formulation (LAB122-LABM)



Εικόνα 11.4 Oxford-agar

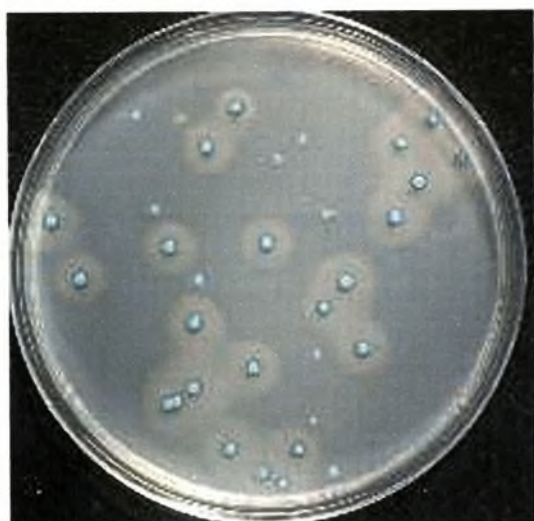
(από www.niedersachsende.com)



Εικόνα 11.5 *Listeria* isolation medium (Oxford)

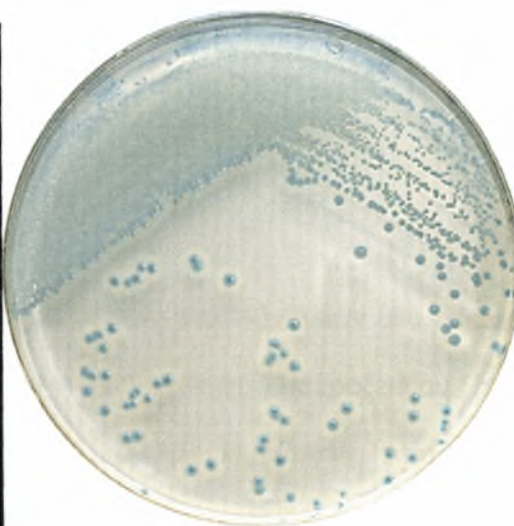
(από www.niedersachsende.com)

11.6.4 Χρωμογόννο στερεό εκλεκτικό υπόστρωμα ALOA AGAR (Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti LAB010-LABM)



Εικόνα 11.6 ALOA agar

(από www.rapidmicrobiology.com)



Εικόνα 11.7 ALOA agar

(από www.rapidmicrobiology.com)

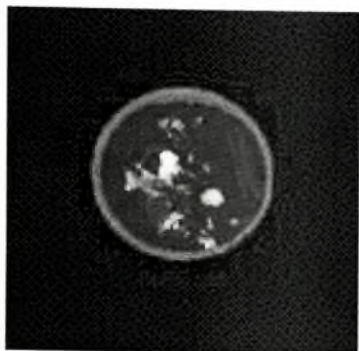
11.7.Επιβεβαίωση

11.7.1Επιλογή αποικιών προς ταυτοποίηση

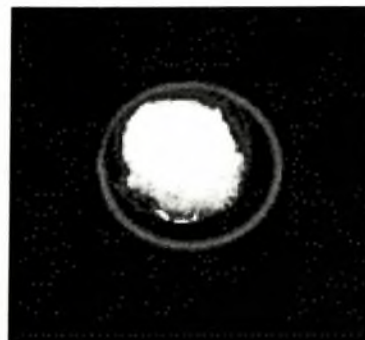
- Επιλέχθηκαν 5 αποικίες από κάθε τρυβλίο κάθε εκλεκτικού υποστρώματος, οι οποίες θεωρήθηκαν χαρακτηριστικές ή ύποπτες ως *Listeria* spp.
- Έγινε σπορά των επιλεγμένων αποικιών στην επιφάνεια τρυβλίων με θρεπτικό άγαρ (TSYEA) το οποίο προηγουμένως είχε “στεγνώσει”, κατά τρόπο ώστε να ληφθούν καλά απομονωμένες αποικίες.
- Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επωάστηκαν σε θερμοκρασία 37 °C επί 18 - 24 h.
- Οι χαρακτηριστικές αποικίες έχουν διάμετρο 1 - 2 mm, είναι κυρτές, άχρωμες και αδιαφανείς, με καλοσχηματισμένα άκρα. Εάν μια αποικία δεν είναι καλά απομονωμένη, ανασπεύρεται σε TSYEA.
- Για την επιβεβαίωση και τη βιοχημική ταυτοποίηση, πρέπει να χρησιμοποιούνται καθαρές καλλιέργειες.

11.7.2 Αντίδραση καταλάσης

Κάθε μια μεμονωμένη αποικία από αυτές που αναπτύχθηκαν στα στερεά υποστρώματα αραιώθηκε σε μια σταγόνα διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου 3%, πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η άμεση παραγωγή φυσαλίδων, είναι δείκτης θετικής αντίδρασης.



Εικόνα 11.8 Καταλάση αρνητικό
(από www.users.stlcc.edu)



Εικόνα 11.9 Καταλάση θετικό
(από www.users.stlcc.edu)

11.7.3 Χρώση κατά Gram

Η χρώση εκτελέστηκε σε μια μεμονωμένη αποικία που αναπτύχθηκε στα στερεά υποστρώματα. Οι λιστέριες είναι λεπτά Gram (+) βακτήρια, μικρού μήκους.

11.7.4 Δοκιμή κινητικότητας

- Λήφθηκε μια μεμονωμένη αποικία που αναπτύχθηκε στα στερεά υποστρώματα και διαλύθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα, που περιέχει TSYE broth.
- Επωάστηκε σε θερμοκρασία $25 \pm 1^\circ\text{C}$ επί 8 - 24 h, μέχρι να αναπτυχθεί θολερότητα στο υπόστρωμα. Παρασκευάστηκε ζωντανό παρασκεύασμα (αποθέτοντας μια σταγόνα της καλλιέργειας σε καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύπτοντάς την με καλυπτρίδα) και μικροσκοπήθηκε, σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης. Οι λιστέριες εμφανίζονται ως λεπτά, μικρού μήκους βακτήρια, με χαρακτηριστική κινητικότητα (περιστροφή με κέντρο το κέντρο του επιμήκους άξονά τους).
- Καλλιέργειες, που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ανώτερες των 25°C ,

είναι δυνατόν να μην εμφανίσουν κινητικότητα. Πρέπει πάντοτε να συγκρίνονται με καλλιέργεια γνωστής κινητικότητας. Κόκκοι, μεγάλα βακτήρια ή βακτήρια με έντονη κινητικότητα “κολύμβησης”, δεν είναι λιστέριες.

- Ως εναλλακτική δοκιμή της κινητικότητας, από μια μεμονωμένη αποικία που αναπτύχθηκε στα στερεά εκλεκτικά υποστρώματα, ενοφθαλμίστηκε, με νύξη υπόστρωμα κινητικότητας σε δοκιμαστικό σωλήνα σε βάθος 5 εκατοστών και επωάστηκε στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ επί 48 h. Εξετάστηκε η ανάπτυξη στη γραμμή ενοφθαλισμού. Η ανάπτυξη των λιστεριών έχει χαρακτηριστικό σχήμα ομπρέλας, αμέσως κάτω από την επιφάνεια του υποστρώματος.



Εικ.11.10.Τέστ κινητικότητας. Παρατηρείται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε σχήμα που θυμίζει “ομπρέλα ή χριστουγεννιάτικο δέντρο”. (από www.users.stlcc.edu)

11.7.5. Δοκιμή οξειδάσης

Τρυβλία petri με αποικίες ύποπτες για *Listeria spp.* κατακλύστηκαν με πρόσφατο διάλυμα αντιδραστηρίου οξειδάσης. Αποχύθηκε το επιπλέον αντιδραστήριο και παρατηρήθηκαν οι αποικίες. Οι θετικές στην οξειδάση αποικίες παίρνουν χρώμα σκοτεινό κόκκινο προς πορφυρό. Η σύνθεση του αντιδραστηρίου περιγράφεται στο παράρτημα.

11.7.6 Συστοιχία βιοχημικών δοκιμών API *LISTERIA* Kit (BioMerieux):

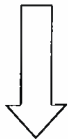
- α. Differentiation medium *L.innocua/L.monocytogenes*
- β. Esculin (Hydrolysis)
- γ. α-Mannosidase
- δ. D-Arabitol (Acidification)
- ε. D-Xylose (Acidification)
- στ. Rhamnose (Acidification)
- ζ. α-Methyl-D-Glucoside (Acidification)
- η. Ribose (Acidification)
- θ. Glucose-1-Phosphate (Acidification)
- ι. D-Tagatose (Acidification)

Εικόνα 11.11 API *LISTERIA* Kit

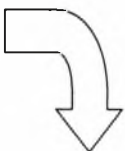
Το API λόγω του μεγάλου πλήθους των θετικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ελάχιστα λόγω οικονομικών περιορισμών.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Ενοφθαλμίστηκαν 25g δείγματος σε 225ml Half Fraser broth ή σε 10πλάσιο όγκο Half Fraser broth από τον όγκο του δείγματος. Τα βύσματα από τις επιφάνειες τοποθετήθηκαν σε 10 ml Half Fraser broth.



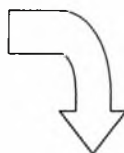
Επώαση στους $30^{\circ}\text{C} \times 24\text{h} \pm 2\text{h}$.



Μεταφέρθηκαν 0.1ml HFB σε 10 ml Fraser broth



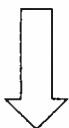
Επώαση στους $37^{\circ}\text{C} \times 48\text{h} \pm 2\text{h}$



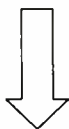
Μεταφέρθηκε 1 κρική από το FB σε ALOA agar και Oxford agar



Επώαση του ALOA agar αερόβια και του Oxford agar αερόβια στους $37^{\circ}\text{C} \times 48\text{h} \pm 3\text{h}$



Ανάγνωση αποτελεσμάτων.



Μεταφορά των ύποπτων αποικιών σε TSYE agar για καθαροποίηση





Λήψη αποικιών από το TSYE agar

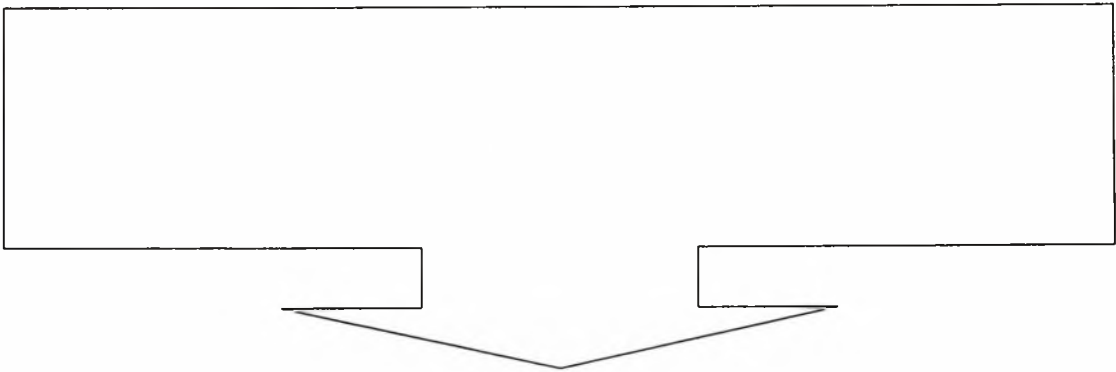


Δοκιμή της καταλάσης

Χρώση Gram

Δοκιμή οξειδάσης

Δοκιμή κινητικότητας



Listeria spp

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

12. Αποτελέσματα- Συζήτηση- Προτάσεις.

12.1 Αποτελέσματα

Στη δική μας έρευνα δεν απομονώσαμε όπως φαίνεται και στον πίνακα 12.1 *Listeria spp.* από τη σάρκα της πέστροφας (n=30) ενώ από τη σάρκα της πεταλούδας απομονώθηκε από ένα μόνο δείγμα (n=30). Η ανίχνευση πάντως του μικροοργανισμού σε ένα μόνο δείγμα δεν μπορεί να αποτελεί σαφή ένδειξη για την παρουσία της στη σάρκα των ψαριών γιατί ενδεχομένως να οφείλεται σε επιμόλυνση στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια των χειρισμών απομάκρυνσης του δέρματος από τη σάρκα. Η παρουσία πάντως των *Listeria spp.* στη σάρκα των εξετασθέντων ψαριών κυμάνθηκε στο 1.67% αν υπολογίσουμε και το παραπάνω θετικό δείγμα (n=60)

Πίνακας 12.1 Ανίχνευση των *Listeria spp.* σε δείγματα σάρκας ψαριών του γλυκού νερού

Είδος ψαριών	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός θετικών δειγμάτων για <i>Listeria spp.</i>	% ποσοστό θετικών δειγμάτων για <i>Listeria spp.</i>
Σάρκα Πεταλούδων (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	30	(?) 1	(?) 3.33%
Σάρκα Πεστρόφων (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	30	-	-
Σύνολο	60	(?)1	(?) 1.67%

Σε σχέση με την παρουσία των *Listeria spp.* στην επιφάνεια των εξετασθέντων ψαριών, όπως φαίνεται στον πίνακα 12.2, το βακτήριο βρέθηκε σε 1 δείγμα από επιφάνεια πέστροφας ($n=30$) και σε 6 δείγματα από επιφάνεια πεταλούδας ($n=30$). Το βακτήριο απομονώθηκε σε εξαπλάσιο ποσοστό από τις επιφάνειες της πεταλούδας σε σχέση με αυτές της πέστροφας 20% έναντι 3,33%.

Συνολικά η παρουσία των *Listeria spp.* βρέθηκε στο 11.67% των συνολικών δειγμάτων επιφάνειας ψαριών ($n=60$)

Πίνακας 12.2 Ανίχνευση των *Listeria spp.* σε δείγματα επιφάνειας ψαριών του γλυκού νερού

Είδος ψαριών	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός θετικών δειγμάτων για <i>Listeria spp</i>	% ποσοστό θετικών δειγμάτων για <i>Listeria spp.</i>
Επιφάνεια Πεταλούδων (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	30	6	20%
Επιφάνεια Πεστροφών (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	30	1	3.33%
Σύνολο	60	7	11.67%

Στα δείγματα επιφάνειας από χώρους λιανικής πώλησης ψαριών, όπως φαίνεται και στον πίνακα 12.3, ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από 1 ξύλινο κιβώτιο (11,11%, n=9), από 2 δείγματα δαπέδου (16.67%,n=12), από 3 πάγκους και επιφάνειες κοπής (20%, n=15). Επίσης ανιχνεύθηκε σε 2 δείγματα από τα μαχαίρια του προσωπικού (16.67%, n=12) και σε 2 δείγματα από τα χέρια του προσωπικού (15.38%, n=13), ενώ δεν ανιχνεύθηκε στα πλαστικά ιχθυοκιβώτια (n=9).

Πίνακας 12.3

Ανίχνευση *Listeria spp.* σε δείγματα περιβάλλοντος σημείων λιανικής πώλησης αλιευμάτων

Πρόελευση δειγματος	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός θετικών δειγμάτων για <i>Listeria spp.</i>	Ποσοστό θετικών δειγμάτων για <i>Listeria spp.</i>
Ξύλινα κιβώτια	9	1	11.11%
Πλαστικά κιβώτια	9	-	-
Δάπεδα	12	2	16.67%
Πάγκοι κοπής και επεξεργασίας	15	3	20%
Μαχαίρια	12	2	16.67%
Προσωπικό	13	2	15.38%
Σύνολο	70	10	14,29%

Ανάλογα με τον τόπο παραλαβής των δειγμάτων, όπως φαίνεται στον πίνακα 12.4 οι *Listeria spp.* απομονώθηκαν από 2 δείγματα περιβάλλοντος που προήλθαν από ιχθυοπωλεία (14.29%, n=14), από 8 δείγματα που λήφθηκαν από υπαίθρια ιχθυοπωλεία (16.67%, n=49), δεν απομονώθηκε όμως από κανένα δείγμα υπεραγοράς(n=7), ενώ δεν λήφθηκαν δείγματα περιβάλλοντος από πλανόδιους.

Πίνακας 12.4
Ανίχνευση *Listeria spp.* στο περιβάλλον των καταστημάτων πώλησης ανάλογα με τον τόπο παραλαβής του δείγματος

Τόπος παραλαβής δείγματος	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός θετικών δειγμάτων σε <i>Listeria spp.</i>	Ποσοστό θετικών δειγμάτων σε <i>Listeria spp.</i>
Υπεραγορά	7	-	-
Ιχθυοπωλείο	14	2	14.29%
Λαϊκή-Υπαίθριο ιχθυοπωλείο	49	8	16.67%
Σύνολο	70	10	14.29%

Ανάλογα με τον τόπο παραλαβής των δειγμάτων και σε σχέση με τη σάρκα των ψαριών, όπως φαίνεται στον πίνακα 12.5 οι *Listeria spp.* απομονώθηκαν από 1 δείγμα ψαριού από πλανόδιο ενώ δεν απομονώθηκε σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα που πάρθηκαν από τις υπόλοιπες κατηγορίες σημείων πώλησης. Το στοιχείο αυτό δίνεται με την επιφύλαξη να είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης κατά τη διάρκεια των χειρισμών στο εργαστήριο. Ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από 1 δείγμα επιφάνειας ψαριού που πάρθηκε από ιχθυοπωλεία (7.14%,n=14), από 3 δείγματα επιφάνειας ψαριών που πάρθηκαν από υπαίθρια ιχθυοπωλεία-λαϊκή αγορά (12%,n=25) και από 3 δείγματα επιφάνειας ψαριών που πάρθηκαν από πλανόδιους(27.27%,n=11) ενώ δεν ανιχνεύθηκε σε επιφάνειες ψαριών που πάρθηκαν από υπεραγορές

Πίνακας 12.4
Ανίχνευση *Listeria spp.* στη σάρκα και την επιφάνεια των ψαριών ανάλογα με τον τόπο παραλαβής του δείγματος

Τόπος παραλαβής δείγματος	Αριθμός δειγμάτων επιφάνειας	Αριθμός και ποσοστό θετικών δειγμάτων σε <i>Listeria spp.</i> από την επιφάνεια των ψαριών	Αριθμός δειγμάτων σάρκας	Αριθμός και ποσοστό θετικών δειγμάτων σε <i>Listeria spp.</i> από τη σάρκα των ψαριών
Υπεραγορά	10	-	10	-
Ιχθυοπωλείο	14	1 (7.14%)	14	-
Λαϊκή- Υπαίθριο ιχθυοπωλείο	25	3 (12%)	25	-
Πλανόδιος	11	3 (27.27%)	11	? 1 (9.09%)
Σύνολο	60	7 (11.67%)	60	1 (1.67%)

12.2 Συζήτηση.

Από μελέτες που έχουν γίνει σε ψάρια του γλυκού και του θαλασσινού νερού έχει αποδειχθεί η παρουσία των *Listeria spp.* σε ψάρια. Η παρουσία των *Listeria monocytogenes* στις ίδιες μελέτες φαίνεται να είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

Οι Fuchs και Surendran (1989) αναφέρουν ποσοστό μόλυνσης 33% αλλά απουσία της *Listeria monocytogenes* σε φρέσκα ψάρια από την Ινδία. Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρονται και πάλι από την Ινδία, αλλά με ποσοστά μόλυνσης 10.5% σε *Listeria spp.* και 0% σε *Listeria monocytogenes* (Manoj και συν., 1991).

Σε μελέτη που έγινε σε εγκατάσταση φιλετοποίησης ψαριών του γλυκού νερού στις Σκανδιναβικές χώρες αποδείχθηκε πως το 13.5% των ψαριών ήταν μολυσμένα με *Listeria spp.* (Gudbjörnsdóttir και συν., 2004).

Έρευνα στην Ισπανία, σε επίπεδο αγορών αλιευμάτων, έδειξε πως το ποσοστό μόλυνσης των θαλασσινών ψαριών κυμαίνονταν στο 10%. (Herrera και συν., 2005).

Γενικά, από διάφορες μελέτες φαίνεται πως η παρουσία της *Listeria monocytogenes* στα αλιεύματα είναι χαμηλή και κυμαίνεται μεταξύ 0-1% (Autio και συν., 1999; Johansson και συν., 1999) έως 10% (Jemmi και Keusch, 1994).

Σε εργοστάσιο επεξεργασίας ψαριών στην Τουρκία αναφέρεται παρουσία των *Listeria spp.* σε ποσοστό 50-57% δειγμάτων από το περιβάλλον των εργοστασίων επεξεργασίας αλιευμάτων και στον εξοπλισμό που έρχεται σε επαφή με αυτά, όχι όμως στην πρώτη ύλη (Kisla και συν., 2007).

Στα Ιωάννινα η Παπαδοπούλου και συν., (2004) απομόνωσαν *Listeria spp.* σε 3 από τα 360 δείγματα αλιευμάτων του γλυκού και του θαλασσινού νερού.

Ένα θετικό δείγμα προέρχονταν από πέστροφα που αλιεύθηκε στην περιοχή, ενώ τα δύο άλλα ήταν από μύδια. Σε μελέτη που έγινε στη Θεσσαλονίκη (Soultos και συν., 2007), κατά την οποία εξετάστηκαν 120 ψάρια του θαλασσινού νερού και 100 δείγματα από επιφάνειες των καταστημάτων πώλησης, η παρουσία της *Listeria spp.* κυμάνθηκε στο 4% με το ποσοστό της *Listeria monocytogenes* να είναι <1%. Σε ότι αφορά το περιβάλλον των καταστημάτων πώλησης εκεί η παρουσία των *Listeria spp.* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό δειγμάτων 15% από τα ξύλινα κιβώτια, 35% από το δάπεδο των ιχθυοπωλείων, 45% από τις ξύλινες επιφάνειες κοπής και επεξεργασίας των ψαριών, ενώ δεν ανιχνεύθηκε στα χέρια και τα μαχαίρια των εργαζομένων.

Τα αποτελέσματα της δικιάς μας μελέτης συμβαδίζουν με προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει στην Ελλάδα και αφορούν ψάρια κυρίως του θαλασσινού νερού.

Γενικά τα βακτήρια του γένους *Listeria spp.* δεν ανιχνεύονται σε αλιεύματα της θάλασσας. Το ίδιο συμβαίνει σε μικρότερο βαθμό με αλιεύματα του γλυκού νερού. Η ενδεχόμενη μόλυνση μπορεί να προκύπτει ακόμα και πριν φθάσουν στα σημεία λιανικής πώλησης. Πιθανές πηγές μόλυνσης φαίνεται πως θα μπορούσαν να είναι τα δίκτυα, το νερό, ο πάγος συντήρησης, οι επιφάνειες των ιχθυοκιβωτίων.

Επίσης πηγές μόλυνσης θα μπορούσαν να είναι η δραστηριότητα του προσωπικού που ασχολείται με την πώληση και την επεξεργασία και τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται. Από τη στιγμή που τα βακτήρια του γένους *Listeria spp.* βρίσκονται στο θαλασσινό νερό αλλά και στα επιφανειακά νερά, τα ψάρια που

αλιεύονται ή εκτρέφονται εκεί πιθανά είναι φορείς του μικροοργανισμού (FAO,1999).

Οι γνώσεις μας σε επίπεδο μόλυνσης από *Listeria spp.* των αλιευμάτων που πωλούνται σε ιχθυαγορές είναι περιορισμένες. Η μόλυνση μπορεί να προέλθει από τα διάφορα εργαλεία και εξοπλισμό που χρησιμοποιείται κατά τη λιανική πώληση.

Η έρευνα μας έδειξε πως η σάρκα των ψαριών δεν είναι ουσιαστικά μολυσμένη με το βακτήριο. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τις επιφάνειες των ψαριών φαίνεται πως είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης από το προσωπικό ή από τα εργαλεία και τον εξοπλισμό του κάθε σημείου πώλησης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός που πως η επιφάνειες των πεταλούδων είναι σε εξαπλάσιο ποσοστό πιο μολυσμένες από αυτές των πεστρόφων. Το γεγονός αυτό θα μπορούσαμε να πούμε πως οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες σύλληψης και διακίνησης του κάθε είδους αφού οι μεν πέστροφες που εξετάστηκαν είναι ιχθυοτροφείου, οι πεταλούδες προέρχονται από τις λίμνες της περιοχής.

Οι πέστροφες αλιεύονται με επαγγελματικό τρόπο σε βιομηχανικό επίπεδο, διακινούνται σε πλαστικά κιβώτια με πάγο, και φθάνουν στον πάγκο του σημείου πώλησης στο ίδιο πλαστικό κιβώτιο από το οποίο πρωτοσυσκευάστηκαν. Τα νερά μέσα στα οποία γίνεται η εκτροφή της πέστροφας είναι συνήθως γεώτρησης ή τρεχούμενα, η πέστροφα απαιτεί για την εκτροφή της ιδιαίτερα καθαρά νερά.

Οι πεταλούδες αλιεύονται είτε με δίχτυα ή παραγάδια, τοποθετούνται στη βάρκα και μετά σε ξύλινα ιχθυοκιβώτια. Μεταφέρονται στα σημεία πώλησης συνήθως χωρίς πάγο και παραμένουν μέχρι να πωληθούν. Τα νερά στα οποία αλιεύονται οι πεταλούδες είναι συνήθως στάσιμα.

Στα σημεία πώλησης των ψαριών η μόλυνση των επιφανειών φαίνεται πως είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτή των ψαριών. Αυτό αποτελεί και μια ένδειξη πως τελικά η μόλυνση δεν προϋπάρχει στην πρώτη ύλη αλλά εππισυμβαίνει κατά τη διαδικασία πώλησης. Η παρουσία των μικροβίων σε όλα τα είδη επιφανειών των σημείων που εξετάστηκαν υποδηλώνει την παρουσία του μικροοργανισμού στα σημεία πώλησης και τη διασταυρούμενη μόλυνση των ψαριών που πωλούνται. Η παρουσία του μικροοργανισμού στο περιβάλλον των σημείων πώλησης δείχνει επίσης και την απουσία ή την πλημμελή διαδικασία καθαρισμού τόσο των χώρων των σημείων λιανικής πώλησης, όσο και των εργαλείων αλλά και του ίδιου του προσωπικού που ασχολείται με την πώληση των αλιευμάτων.

Φαίνεται δε πως η κατάσταση του χώρου των σημείων πώλησης χειροτερεύει όσο κινούμαστε από επίπεδο υπεραγοράς, σε επίπεδο ιχθυοπωλείου και στη συνέχεια σε επίπεδο υπαίθριο ιχθυοπωλείου και πλανόδιου ψαρά. Στην υπεραγορά για παράδειγμα η απουσία θετικών δειγμάτων φαίνεται να οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό στους κανόνες καθαριότητας που εφαρμόζονται, η τήρηση των οποίων γίνεται λιγότερο σχολαστική όσο περνάμε σε ιχθυοπωλεία, λαϊκή αγορά και πλανόδιους.

Η χρήση των πλαστικών κιβωτίων με βάση τα αποτελέσματα της έρευνά μας δεν μπορεί συστηθεί ως τρόπος συσκευασίας αλιευμάτων έναντι των ξύλινων αφού ο μικροοργανισμός βρέθηκε σε ένα μόνο δείγμα κιβωτίου. Το συγκεκριμένο σημείο θα πρέπει να παραμείνει προς διερεύνηση.

Η παρουσία πάντως του μικροοργανισμού στο περιβάλλον των σημείων πώλησης θα πρέπει να οδηγήσει στο προσωπικό τους στην εφαρμογή των κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής έτσι ώστε να μειωθεί η παρουσία του.

Ο καταναλωτής δεν πρέπει να ανησυχεί ιδιαίτερα για την παρουσία του μικροοργανισμού στο περιβάλλον των σημείων πώλησης, αλλά και στην επιφάνεια των ψαριών. Τα αλιεύματα σύμφωνα με τις Ελληνικές διαιτητικές συνήθειες καταναλώνονται ψημένα. Αυτό αρκεί για να εξυγιάνει το τρόφιμο και να το καταστήσει ουσιαστικά ακίνδυνο. Όμως μεγάλο πρόβλημα αποτελεί η μεταφορά του μικροβίου στο σπίτι, η επιμόλυνση των επιφανειών και κυρίως η μεταφορά και εγκατάστασή του στο οικιακό ψυγείο. Εκεί, σε συνθήκες μάλιστα στις οποίες ο μικροοργανισμός μπορεί και αναπτύσσεται, αποτελεί πηγή μόλυνσης όλων των τροφίμων που συντηρούνται σε αυτό. Έτσι μεγάλοι κίνδυνοι προκύπτουν από την κατανάλωση των τροφίμων τα οποία δεν επεξεργάζονται θερμικά πριν καταναλωθούν όπως τα τυροκομικά, τα αλλαντικά κ.α.

12.3 Προτάσεις.

Σε ένα πλέγμα συνεργασίας η πολιτεία, ως ελεγκτικός μηχανισμός, οι επιστήμονες, οι άνθρωποι που εμπλέκονται στην αλίευση-εμπορία-διακίνηση των αλιευμάτων, αλλά και οι καταναλωτές θα πρέπει να:

- Η πολιτεία να ενημερώσει το καταναλωτικό κοινό για τους κινδύνους από τα βακτήρια του γένους *Listeria spp.*, να οργανώσει επιμορφωτικά σεμινάρια για τους επαγγελματίες των τροφίμων και να εντατικοποιήσει τους ελέγχους στους χώρους διακίνησης των τροφίμων.
- Οι επαγγελματίες που ασχολούνται με τα αλιεύματα θα πρέπει να ευαισθητοποιηθούν για τους κινδύνους μόλυνσης των προϊόντων τους να εκπαιδευτούν στους κανόνες ορθής υγιεινής πρακτικής και να δείχνουν συνεχές ενδιαφέρον και ζήλο στην τήρηση αυτών των κανόνων.
- Οι επιστήμονες θα πρέπει να συνεχίσουν την έρευνα στο πεδίο αυτό έτσι ώστε να συμπληρωθούν στοιχεία που αφορούν τον κύκλο μετάδοσης του μικροοργανισμού στα αλιεύματα.
- Το καταναλωτικό κοινό θα πρέπει να ενημερωθεί για τους κινδύνους που προκύπτουν από τη μόλυνση με το βακτήριο και τους τρόπους προφύλαξης από μια ενδεχόμενη μόλυνση.

Η συγκεκριμένη μελέτη θα πρέπει να συνεχιστεί. Θα πρέπει να εμπλουτιστεί με νέα δείγματα ψαριών όπως επίσης και με νέα δείγματα περιβάλλοντος. Θα πρέπει να εξεταστούν δείγματα νερού από τα σημεία αλίευσης των ψαριών, όπως επίσης και δείγματα διχτυών πριν και μετά την αλίευση. Το ίδιο πρέπει να γίνει και με δείγματα από τον πάγο με τον οποίο συντηρούνται τα ψάρια, καθώς και με περισσότερα δείγματα από ιχθυοκιβώτια (πλαστικά και ξύλινα), για να διαπιστωθεί η συχνότητα μόλυνσης σε καθένα από αυτά.

Χρήσιμο επίσης θα ήταν να ταυτοποιηθούν σε επίπεδο είδους τα βακτήρια του γένους *Listeria spp.* που απομονώθηκαν αλλά και να συνεχιστεί και σε επίπεδο στελέχους με χρήση σύγχρονων μεθόδων, όπως PCR, για να μπορέσει να διακριβωθεί επακριβώς οι τρόποι με τους οποίους μολύνονται τα αλιεύματα, έτσι ώστε να αναζητηθούν τρόποι προστασίας του καταναλωτικού κοινού αλλά και της Δημόσιας Υγείας από τους κινδύνους που σχετίζονται με τα βακτήρια του γένους *Listeria spp.*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ)

1. A.O.A.C. (2000) Official Method 993.09. *Listeria* in dairy products, seafoods, and meats. Colorimetric deoxyribonucleic acid hybridization method (GENE-TRAK *Listeria* Assay). In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 17th Edition. W. Horwitz, Volume 1. Agricultural Chemicals, Contaminants and Drugs. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD.
2. Adams M.R., and Moss M.O., (1995) Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. UK.
3. Adesiyun A.A., (1993) Prevalence of *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and toxigenic *Escherichia coli* on meat and seafoods in Trinidad. Food Microbiol. 10, 395–403.
4. Anonymus (1954) Judicial Commission on Bacteriological Nomenclature and Taxonomy, Opinion 12 Intern Bull Bacteriol Nomencl Taxon 4, 150-151

5. AOAC Official Method (2000) 995.22. *Listeria* in foods. Colorimetric polyclonal enzyme immunoassay screening method (TECRA *Listeria* Visual Immunoassay [TLVIA]). In: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 17th Edition. W. Horwitz, Volume 1. Agricultural Chemicals, Contaminants and Drugs. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD.
6. Autio T., Hielm S., Miettinen M., Sjoberg A.M., Aarnisalo K., Bjorkroth, J., Mattila-Sandholm T. and Korkeala H., (1999) Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. Applied and Environmental Microbiology 65, 150-155
7. Bacon R. T. and Sofos J.N. (2003) Characteristics of biological hazards in foods. Food Safety Handbook. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken N.J.,
8. Barza M. (1985) Listeriosis and milk. N Engl J Med 312, 438-440
9. Batt C. A. (1999) Encyclopedia of food microbiology. Academic Press, 2, 1195-1198
10. Baylis C. (2000). The Catalogue of Rapid Microbiological Methods, Fourth Edition, Review No. 1, Campden & Chorleywood Food Research Association, Chipping Campden, Gloucestershire, UK.

11. Bemrah N., Sanaa M., Cassin M.H., Griffiths M.W. and Cerf O., (1998) Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Prevent. Vet. Med.* 37, 129–145
12. Ben Embarek P.K. (1994) Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *Int J Food Microbiol* 23, 17–34.
13. Berche P., (1995) Pathophysiology of *Listeria monocytogenes* infection. *Med Man Infect.* 25,197-209
14. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (1934) 4th edition. (Bergey, D.H.). Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
15. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (1948) 6th edition (Breed, R.D., Murray, E.G.D., and Hitchens, A.P.). Williams & Wilkins Co., Baltimore,MD.
16. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (1957) 7th edition (Breed, R.D., Murray, E.G.D., and Smith, N.R.). Williams & Wilkins Co., Baltimore,MD.
17. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (1974) 8th edition (Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E.). Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.

18. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, (1986) (Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, N.E., and Holt, J.G.). Williams & Wilkins Co, Baltimore, MD.
19. Beumer, R.R. and Hazeleger, W.C. (2007) Chromogenic media for the detection and/or enumeration of *Listeria monocytogenes* Results of trials performed by a working group of the International Organization for Standardization - ISO/TC 34/SC 9. *Archiv fur Lebensmittelhygiene* 58 (2), 47-50
20. Bibb, W.F., Gellin, B.G., Weaver, R., Schwartz, B., Plikaytis, B.D., Reeves, M.W., Pinner, R.W. and Broome, C.V. (1990) Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2133–2141
21. Bille, J. (1989) Anatomy of a foodborne listeriosis outbreak. In: *Foodborne Listeriosis (Proceedings of a Symposium on September 7, 1988, Wiesbaden, Germany)*, B. Behr, Hamburg, 29–36.
22. Bille, J. (1990) Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In Miller A.J., Smith J.L., Somkuti G.A., Foodborne Listeriosis. Topics in Industrial Microbiology. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford

23. Bille, J. and Rocourt, J., (1996) WHO International Multicenter *Listeria monocytogenes* Subtyping Study: Rationale and set-up of the study. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 251–262.
24. Boerlin, P. and Piffaretti, J.C., (1991) Typing of human, animal, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1624–1629.
25. Boerlin, P., Boerlin-Petzold, F., Bannerman, E., Bille, J. and Jemmi, T. (1997) Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1338–1343
26. Borgdorff, M.W. and Motarjemi, Y. (1997) Surveillance of foodborne diseases: what are the options? Food Safety Issues. WHO/FSF/FOS/97, 7, 187-193
27. Brett, M.S.Y., Short, P. and McLauchlin, J. (1998) A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 223–229.
28. Brosch, R., Brett, M., Catimel, B., Luchansky, J.B., Ojeniyi, B. and Rocourt, J. (1996) Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Int. J. Food Microbiol.* 32, 343–355

29. Brosch, R., Catimel, B., Milon, G., Buchrieser, C., Vindel, E. and Rocourt, J. (1993) Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food, human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. *J. Food Prot.* 56, 301–312.
30. Buchanan, R.L., Damert, W.G., Whiting, R.C. and VanSchothorst, M. (1997) Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. *J. Food Prot.* 60, 918–922
31. Buchrieser, C., Brosch, R., Catimel, B. and Rocourt, J. (1993) Pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Can. J. Microbiol.* 39, 395–401
32. Büla, C.J., Bille, J. and Glauser, M.P. (1995) An epidemic of food-borne listeriosis in Western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clin. Infect. Dis.* 20, 66–72.
33. Burn C.G. (1935) Characteristics of a new species of the genus *Listerella* obtained from human sources. *J Bacteriol* 30, 373-376
34. Burn C.G. (1936) Clinical and pathological features of an infection caused by a new pathogen of the genus *Listerella*. *Amer J Path* 12,341-348

35. Cain, D.B. and McCann V.L. (1986) An unusual case of cutaneous listeriosis. J. Clin. Microbiol. 23, 976-977.
36. Caugant, D.A., Ashton, F.E., Bibb, W.F., Boerlin, P., Donachie, W., Low, C., Gilmour, A., Harvey, J. and Norrung, B. (1996) Multilocus enzyme electrophoresis for characterization of *Listeria monocytogenes* isolates: results of an international comparative study. *Int. J. Food Microbiol.* 32 (3), 301–311
37. Chakraborty, T., Ebel, F., Wehland, J., Dufrenne, J. and Notermans, S. (1994) Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. *Immunol. Med. Microbiol.* 10, 1–10.
38. Dalton, C.B., Med, B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B. and Proctor, M.E. (1997) An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New Engl. J. Med.* 336, 100-105
39. Datta, A.R., Moore, M.A., Wentz, B.A. and Lane, J. (1993) Identification and enumeration of *Listeria monocytogenes* by non-radioactive DNA probe colony hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 144-149

40. Decastelli, L., Adriano, D., Gallina, S., Barbaro, A., Ferrari, A. and Marinella, G. (2004) Presence of *Listeria monocytogenes* in fish preparations. *Industrie Alimentari* 43 (437), 644-647
41. Del Corral, F., Buchanan, R.L., Bencivengo, M.M. and Cooke, P.H., (1990) Quantitative comparison of selected virulence associated characteristics in food and clinical isolates of *Listeria*. *J. Food Protect.* 53, 1003–1009.
42. Destro, M.T., Leitao, M.F.F. and Farber, J.M. (1996) Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Appl. Envir. Microbiol.* 62, 705–711
43. DeValk , H.M., Vaillant, V., Pierre, V., Rocourt, J., Jacquet, Ch., Lequerrec, F., Thomas, J.-C. and Goulet, V. (1998) Risk factors for sporadic listeriosis in France. ISOPOL XIII, Halifax, Canada, 28 June–2 July 1998.
44. Dhanashree, B., Karunasagar, I.K. and Karunasagar, I.M (1999) Incidence of *Listeria* spp. in fish and shellfish around Mangalore. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 177-181
45. Dillon, R.M. and Patel, T.R. (1992) *Listeria* in seafoods: a review. *J. Food Prot.* 55, 1009–1015.

46. Donker-Voet J. (1957). Serological studies on some strains of *Listeria monocytogenes*. Tijdschr Diergeneesk 82, 341-350
47. Ericsson, H., Eklöw, W., Danielson-Tham, M.L., Loncarevic, S., Mentzing, L.O., Person, I., Unnerstad, H. and Tham, W. (1997) An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2904–2907
48. F.A.O. (1999) Fisheries Report No. 604. Expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products. Amherst, MA, USA.
49. Facinelli, B., Varaldo, P.E., Toni, M., Casolari, C. and Fabio, U. (1989) Ignorance about *Listeria*. *Br. Med. J.* 299, 738
50. Farber, J.M. (1991) *Listeria monocytogenes* in fish products. *J. Food Protect.* 54, 922–934.
51. Farber, J.M. and Peterkin, P.I., (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55, 476–511.
52. Farber, J.M., and Peterkin, P.I. (1999) Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. In: Ryser, E.T., and E.H. Marth, *Listeria, listeriosis and food safety*. Marcel Dekker Inc., NY.

53. Farber, J.M., Coates, E.D.F., Beausoleil, N. and Fournier, J. (1991) Feeding trials of *Listeria monocytogenes* with a nonhuman primate model. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2606–2608.
54. Farber, J.M., Daley, E., Mackie, M.T. and Limerick, B. (1997) A small outbreak of listeriosis linked to the consumption of imitation crab meat. *J. Food Protect. Program Abstr. Book* 60, 55.
55. Farber, J.M., Ross, W.H. and Harwig, J. (1996) Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 145–156
56. Fenlon, D.R., Wilson, J. and Donachie, W. (1996) The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 641–650
57. Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V. and Reingold, A.L. (1985) Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Engl. J. Med.* 312, 404–407.
58. Food Safety and Inspection Service (FSIS) (2003) Control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-meat and poultry products; Final Rule. Fed. Regist. 68, 34208- 34254.

59. Fraser J.A. and Sperber W.H. (1988) Rapid detection of *Listeria spp* in Food and Environmental Samples by Esquin Hydrolysis. J Food Prot. 51, 762-765
60. Frederiksen, B. and Samuelsson, S. (1992) Foeto-maternal listeriosis in Denmark 1981–1988. *J. Infect.* 24, 277–287.
61. Fuchs, R.S. and Reilly, P.J.A. (1992) The incidence and significance of *Listeria monocytogenes* in seafoods. In: Huss, H.H., Jakobsen, M. and Liston, J., *Quality Assurance in the Fish Industry*, Elsevier, Amsterdam.
62. Furth van R., Sluiter W. and Dissel van J.T. (1988) Roles of factor increasing monocytopoieses and macrophage activation in host resistance to *Listeria monocytogenes*. *Infection* 16,137-140
63. Gellin, B.G. and Broome C.V.(1989) Listeriosis J Am Med Assoc 261,1313-1320
64. Gellin, B.G., Broome, C.V., Bibb, W.F., Weaver, R.E., Gaventa, S., Mascola, L. and the listeriosis study group (1991) The epidemiology of listeriosis in the United States-1986, *The American Journal of Epidemiology*, 133 (4), 392-401.
65. Gerner-Smidt, P., Boerlin, P., Ischer, F. and Schmidt, J. (1996) High-frequency endonuclease (REA) typing: results from the WHO collaborative study group on subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 313–324.

66. Goday, A., Lozano, F., Santamaria, J., Gallard, T. and Tolosa, E. (1987) Transient immunologic defect, in a case of *Listeria rhombencephalitis*. *Arch. Neurol.* 44, 666–667.
67. Golnazarian, C.A., Donnelly, C.W., Pintauro, S.J. and Howard, D.B. (1989) Comparison of infectious dose of *Listeria monocytogenes* F5817 as determined for normal versus compromised C57B1/6J mice. *J. Food Prot.* 52, 696–701.
68. Gomez-Mampaso, E., Michaux, L., De Rafael, L., Pena, P., Carvajal, A. and Baquero, F. (1975) *Listeria monocytogenes*: faecal carriers and perinatal mortality. *Microbiol. Espan.* 117, 117–128.
69. Goulet, V., Lepoutre, A., Rocourt, J., Courtieu, A.L., Dehaumont, P. and Veit, P. (1993) Epidémie de listériose en France-Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. *Bull. Epidemiol. Hebdom.* 4, 13–14.
70. Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moyse, C., Dehaumont, P., Salvat, G. and Veit, P. (1998) Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. *J. Infect. Dis.* 177, 155–160.
71. Gray M.L. (1957) A rapid method for the detection of colonies of *Listeria monocytogenes*. *Zbtl Bact* 169, 373-377

72. Gray M.L., (1960) Isolation of *Listeria monocytogenes* from oat silage. *Science* 132,1767-1768
73. Gray, M.L., and Killinger, A.H. (1966) *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriology Review* 30, 309-382.
74. Gudbjornsdottir B, Suihkob M.-L., Gustavssonc P., Thorkelssona G., Salob S., Sjobergb A.-M., Niclasend O. and Bredholte S. (2004) The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology* 21, 217–225
75. Hansen, C.H., Vogel, B.F. and Gram, L. (2006) Prevalence and Survival of *Listeria monocytogenes* in Danish aquatic and fish-processing environments: *J. of Food Protection* 69 (9), 2113-2122
76. Harvey, J., and Gilmour, A. (1992) Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. *J. Appl. Bacteriol.* 72,119-125.
77. Hellström, S., Mayrhofer, S., Rippel-Rachlé, B., Smulders, F.J.M. and Korkeala, H. (2007) Prevalence and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* in foods marketed in Vienna, Austria . *Archiv fur Lebensmittelhygiene* 58 (4), 116-120
78. Henry B.S. (1933) Dissocation in the genus *Brucella*. *J Infect Dis.* 52,374-402

79. Hitchins, A.D. (1996) Assessment of alimentary exposure to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 71–85.
80. Ho, J.L., Shands, K.N., Friedland, G., Eckind, P., and Faster D.W. (1986) An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Archives of Internal Medicine.* 146, 520-524
81. Hof H. and Hefner P. (1988) Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison with other *Listeria species*. *Infection* 16, 141-144
82. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html> (25/1/2008)
83. Huss, H.H., Reilly, A. and Ben Embarek, P.K., (2000) Prevention and control of safety hazards in cold smoked salmon production. *Food Control* 11, 149–156.
84. ISO 11290-1:1997 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method. Incorporating Amendment 1.
85. Issekutz T.B., Evans J. and Bortolussi R. (1984) The immune response of human neonates to *Listeria monocytogenes* infection. *Clin Invest Med* 7, 281-284

86. Jay, M.J. (2000) Modern food microbiology, 6th edition. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD.
87. Jemmi, T., and Keusch, A. (1994) Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh water fish farms and fish smoking plants. *Food Microbiol.* 11, 309–316
88. Jeyasekaran, G., Karunasagar, I.K and Karunasagar, I.M. (1996) Incidence of *Listeria* spp. in tropical fish. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 333–340.
89. Johansson T., Rantala L., Palmu L., Honkanen-Buzalski T. (1999) Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in production plant : *Jnt. J. of Food Micribiology* 47, 111-119
90. Kışla, D., Üzgün, Y. and Demirhisar, M.A. (2007) Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in a traditional hot-smoked rainbow trout processing plant in Turkey. *Int. J. of Food Science & Technology* 42 (11), 1376-1381
91. Larsen E.H., Seeliger H.P.R. (1966) A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp.n., pp.35-39. In Proceedings of 3th International Symposium on Listeriosis, Bilttohoven, The Netherlands.
92. Lee, W.H. and McClain, D. (1986) Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. *Applied and Environmental Microbiology* 52 (5), 1215-1217

93. Lennon, D., Lewis, B., Mantell, C., Becroft, D., Dove, B., Farmer, K., Tonkin, S., Yeates, N., Stamp, R. and Mickleson, K. (1984) Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatr. Infect. Dis.* 3, 30–34.
94. Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, M.L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B.D., Fannin, S.L., Klecks, A. and Broome, C.V. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese, *New England Journal of Medicine*. 319(13), 823-828
95. Lovett J. (1987) *Listeria* Isolation. In FDA Bacteriological Analytical Manual. 5th ed. Assoc Off Anal Chem Washington DC.
96. Lowry, P.D. and Tjong I. (1988) The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat and meat products factors affecting distribution. In: Proc. 34th Int. Congress Meat Sci. Technol., part. B, pp. 528-530.
97. Luft B.J., and Remington J.S. (1986) Effect of pregnancy on resistance to *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* infections in mice. *Infect Immun* 38, 1164-1171
98. Macksness G.B. (1962) Cellular resistance to infection. *J Exp Med* 116, 381-406

99. Manoj, Y.B., Rosalind, G.M., Karunasagar, I.K. and Karunasagar, I.M. (1991) *Listeria* spp. in fish and fish handling areas, Mangalore, India. Asian Fish. Sci. 4, 119–122.
100. McBride M.E. and Girard K.F. (1960) A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. J Lab Clin Med 55, 153-157
101. McCarthy, S.A. (1990) *Listeria* in environment. In Miller A.J., Smith J.K., Somkuti G.A., Listeriosis. Society for Industrial Microbiology. Elsevier
102. McCowan A.P., Bowker K., McLauchlin J., Bennet P.M. and Reeves D. (1994) The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. In shop bought food stuffs, human feces, sewage and soil from urban sources. Int J Food Microbiol 21, 325-334
103. McDonald T.T. and Carter P.B. (1980) Cell-mediated immunity to intestinal infection. Infect Immun 28, 516-523
104. McLauchlin, J. (1987) A review-*Listeria monocytogenes*. Recent advances in the taxonomy and epidemiological listeriosis in humans. J Appl Bacteriol 63, 1-11

105. McLauchlin, J. (1990) Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. *Eur J Clin Microb* 9, 210-213
106. McLauchlin, J. (1996) The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control* 7, 187– 193.
107. McLauchlin, J., Hall, S.M., Velani, S.K. and Gilbert, R.J. (1991) Human listeriosis and pâté: a possible association. *Br. Med. J.* 303, 773–775.
108. Miettinen, M.K., Siitonen, A., Heiskanen, P., Haajanen, H., Björkroth, K.J. and Korkeala, H.J. (1999) Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2358–2360.
109. Moharem A.S., Raj A.P. and Janardhana G.R. (2007) Incidence of *Listeria species* in seafood products of Mysore, India. *J. of Food Safety* 27 (4), 362–372
110. Murray E.G.D., Webb R.A. and Swann M.B.R., (1926) A disease of rabbits characterized by a large nononuclear leucocytosis, caused by a hitherto underscribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.) *Journal Pathological Bacteriology* 29, 407-439

111. Nyfeldt A. (1929) Etiologie de la mononucleose infectieuse. C R Soc Biol 101, 590-592
112. Papadopoulou, C., Economou, E., Zakas, G., Salamoura, C., Dontorou, C., and Apostolou, J. (2007) Microbiological and pathogenic contaminants of seafood in Greece. J of Food Quality 30 (1), 28-42
113. Paterson J.S. (1940) Antigenic structure of organisms of the genus *Listerella*. J Pathol Bacteriol 51, 427-436
114. Peel M., Donachie W. and Swaw A. (1988) Physical and antigenic heterogeneity in the flagellins of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. J Gen Microbiol 134, 2593-2598
115. Perry C.M. and Donnelly C.W. (1990) Incidence of *Listeria monocytogenes* in silage and its subsequent control by specific and non specific antagonism. J Food Prot 3, 642-647
116. Pirie J.H.H. (1927) A new disease of veld rodents, <<Tiger River disease>>. Publ S Africa Inst Med Res 3, 163-186
117. Pirie J.H.H. (1940) *Listeria*. Change of name for genus of bacteria. Nature 145: 264

118. Prevot A.R. (1961) Traite de Systematique Bacterienne. Dumond, Paris
119. Ralovich B. (1984) Listeriosis research-present situation and prespective. Academiai Kiado. Budapest.
120. Ralovich B., (1993) Detection and epidemiological typing of *Listeria* strains diagnostic methods for *Listeria* infections. Acta Microbiol Hung 40, 3-38
121. Reiss H.J., Potel J. and Krebs A. (1951) Granulomatosis infantiseptica eine durch eine spzifischen Erreger hervorgerufene fetale Sepsis. Klin Wschr 29, 29
122. Rigby D. (1992) Foodbrone listeriosis- A review. Diet Intern Auckl Hosp 47, 24-27
123. Rocourt J. (1987) Identification of *Listeria* isolates. In A. Schornberg, Listeriosis- Joint WHO/ROI Consaltation on Prenention and Control, West Berlin, December 10-12, 1986, Institut fur Veterinarmedizin, Berlin
124. Rocourt J. (1989) Species of the genus *Listeria*. Acta Microbiol Hung 36, 285-288

125. Rocourt J. and Grimont P.A.D. (1983) *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 33, 866-869
126. Rocourt J. and Seeliger H.P.R. (1985) Distribution des especes du genre *Listeria*. Zbl Bact Microbiol Hyg Abt I Orig A 259, 317-330
127. Rocourt J., Audurier A., Courtieu A. L., Durst J., Ortel S., Schrettenbrunner A. and Taylor A.G. (1985) A multicenter study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*. Zbl Bacteriol. Hyg 259, 489-497
128. Rocourt, J. (1991) Human listeriosis 1989. WHO/HPP/FOS/91.3
129. Rocourt, J. (1999) The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. E. T. Ryser and E. H. Marth, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
130. Sanaa M., Poutrel B., Menard J.L. and Serieys F. (1993) Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in farms. J Dairy Sci 76, 2891-2898
131. Saxbe W.B. (1972) *Listeria monocytogenes* and Queen Anne. *Pediatrics* 49: 101

132. Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., and Broome, C.V. (1983) Epidemic listeriosis – Evidence for transmission by food, *New England Journal of Medicine*. 308(4), 203-208
133. Schofield G.M. (1992) Emerging food borne pathogens and their significance in chilled food – A review. *J Appl Bacteriol* 72, 267-273
134. Schuchat A., Swaminathan B. and Broome C.V. (1991) Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 4, 169-183
135. Seeliger, H.P.R. (1961) *Listeriosis*, Hafner Publishing Co., New York
136. Seeliger, H.P.R. and Jones D. (1986). *Listeria*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 9th ed. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
137. Seeliger, H.P.R. and Schoofs M. (1979) Serological analysis of non-hemolysing *Listeria*-strains belonging to a species different from *Listeria monocytogenes*. In Ivanov, Problems of Listeriosis, Proceedings of the 8th International Symposium, Varna, 1977. National Agroindustrial Union, Center for Scientific Information, Sofia, Bulgaria.

138. Seelinger, H.P.R. and Weshimer H.J. (1974) Genus *Listeria*. In Buchaman and Gibbons. Bergley's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD
139. Seelinger, H.P.R., Rocourt J., Schrettenbrunner A., Grimont P.A.D. and Jones D. (1984) Description of *Listeria ivanovii* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 34, 336-337
140. Slutsker, L., and A. Schuchat. (1999) Listeriosis in humans. In: Ryser, E.T., and E.H. Marth, *Listeria*, listeriosis and food safety. Marcel Dekker Inc., NY,
141. Soutos, N., Abraham, A., Papageorgiou, K. and Steris, V. (2007) _Incidence of *Listeria* spp. in fish and environment of fish markets in Northern Greece. *Food Control* 18 (5), 554-557
142. Stuart S.E. and Weishmer H.J. (1974) Taxonomic reexamination of *Listeria* Pirie and transfer *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a new genus, *Murraya*. Int J Syst Bacteriol 24, 177-185
143. Stuart S.E. and Weshimer H.J. (1973) Intrageneric relateness of *Listeria* Pirie. Int. J Syst Bacteriol. 23, 8-14



144. Tham W., Ericsson H., Loncarevic S., Unnerstad H. and Danielsson-Tham M.L. (2000) Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and coldsmoked fish. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 173–175
145. Thimothe, J., Nightingale, K.K., Gall, K., Scott, V.N. and Wiedmann, M. (2004) Tracking of *Listeria monocytogenes* in Smoked Fish Processing Plants . *Journal of Food Protection* 67 (2), 328-341
146. Tilney L.G. and Tilney M.S. (1993) The wily gays of a parasite: Introduction of actin assembly by *Listeria*. *Trends in Microbiology* 1,25-31
147. USDA/FSIS. (1999) Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. Ch. 8. Microbiology Laboratory Guidebook. 3rd Edition, Revision 2.
148. Weagant, S.D., Sado, P.N., Colburn, K.G., Torkelson, J.D., Stanley, F.A., Krane, M.H., Shields, S.C. and Thayer, C.F. (1988) The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *J. Food Prot.* 51, 655–657.
149. Weishimer H.J. (1960) Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *J Bacteriol* 80, 316

150. Weishimer H.J. and Meredith A.L. (1971) *Listeria murrayi* sp.n.:A nitrate-reducing mannitol-fermenting *Listeria*. Int J Syst Bacteriol 21,3-7
151. WHO (1988) Foodborne listeriosis- Report from the Informal Working Group, Geneva, 15-19 February 1988. WHO/EHE/88.5
152. Willis C., Baalham T., Greenwood M. and Presland F. (2006) Evaluation of a new chromogenic agar for the detection of *Listeria* in food. Lett Appl Microbiol. 43(3), 313-317.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

1. Παπά Α.,(1996) Συμβολή στη μελέτη διασποράς των λιστεριών. Διδακτορική διατριβή. Ιατρική Σχολή. Ιωάννινα.
2. Παπαδόπουλος Ο.Α. (1992) Λοιμώδη νοσήματα των ζώων. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη
3. Φραγκόπουλος Α., Παπαδόπουλος Χ., Σίμος Ε., Γεραλέξης Β., (1973) Επιζωοτία λιστεριώσεως αιγών εν Ηπείρω. Δελτ. Ελλ. Κτην. Εταιρ. 24, 216-224
4. Τσαγγάρης Θ., Καλδρυμίδου Ε., Βλέμμας Ι., Κανακούδης Γ. και Λέκκας Σ. (1999) Ειδική Παθολογική Ανατομική. Σύγχρονη Παιδεία. Θεσσαλονίκη

ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

1. Half Fraser Broth (LABM)

• Meat peptone	5,0 g
• Sodium chloride (NaCl)	20,0 g
• Disodium hydrogen phosphate dihydrate	12,0 g
• Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1,35 g
• Tryptone	5,0 g
• Beef extract	5,0 g
• Yeast extract	5,0 g
• Aesculin	1,0 g
• Water	900 ml

Διαλύθηκαν τα συστατικά σε αποσταγμένο νερό θερμαίνοντας μέχρι βρασμού. Ρυθμίστηκε το pH, ώστε μετά την αποστείρωση να είναι $7,2 \pm 0,2$ στους 25°C και διανεμήθηκε το υλικό μέσα σε γυάλινες φιάλες. Αποστειρώθηκε στους 121°C για 15'. Τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο 48°C και προστέθηκε 1 vial Half Fraser broth supplement για κάθε 450 ml ζυμού.

2. Full Fraser broth.

Το Fraser broth base διαφοροποιείται από το Half Fraser broth στο ότι η βάση περιέχει επιπλέον τα εξής:

- Lithium chloride 3,0 g
- Sodium salt of nalidixic acid 0,02 g

Σε κάθε 500 ml βάσης προστέθηκε 1 vial full fraser supplement.

Διανεμήθηκαν 10ml από το πλήρες υπόστρωμα σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες.

3. Υπόστρωμα *Listeria* Isolation Medium-OXFORD formulation (LAB 122-LABM)

Listeria Oxford Agar Base

- | | |
|---------------------------|---------|
| • Columbia Agar Base | 41.0 g |
| • Lithium Chloride | 15.0 g |
| • Aesculin | 1.0 g |
| • Ferric ammonium citrate | 0.5 g |
| • Water | 1000 ml |

Listeria Oxford Antimicrobial Supplement (vial contents for 500 ml of medium)

- | | |
|-------------------|----------|
| Cycloheximide | 200.0 mg |
| Colistin sulphate | 10.0 mg |
| Cefotetan | 1.0 mg |
| Fosfomicine | 5.0 mg |
| Acriflavine | 2.5 mg |

Listeria MOX-COL Antimicrobial Supplement (vial contents for 500 ml of medium)

- | | |
|--------------------|--------|
| • Moxalactam | 7.5 mg |
| • Colistin Sulfate | 5.0 mg |

Διαλύθηκαν τα συστατικά σε απεσταγμένο νερό θερμαίνοντας μέχρι βρασμού. Ρυθμίστηκε το pH, ώστε μετά την αποστείρωση να είναι $7,2 \pm 0,2$ στους 25°C και διανεμήθηκε το υλικό μέσα σε γυάλινες φιάλες. Αποστειρώθηκε στους 121°C για

15'. Ψύχθηκε η βάση στους 48⁰ C και προστέθηκε 1 vial OXFORD supplement για κάθε 500ml βάσης . Στη συνέχεια διανεμήθηκε σε τρυβλία.

4. Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA, Harelquin™ *Listeria* Chromogenic Agar, HAL010).

Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA)

• Meat peptone	18.00 g
• Tryptone	6.00 g
• Yeast extract	10.00 g
• Sodium pyruvate	2.00 g
• Glucose	2.00 g
• Magnesium glycerophosphate	1.00 g
• Magnesium sulphate	0.50 g
• Sodium chloride	5.0 g
• Lithium chloride	10.0 g
• Disodium hydrogen phosphate anhydrous	2.5 g
• 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside	0.05 g
• Agar	13.5 g
• Water	1000 ml

ALOA POLYMYXIN B, CEFTAZIDIME supplement για την απομόνωση***Listeria monocytogenes*. (vial contents for 500 ml of medium)(LABMX072)**

- Polymyxin B 5mg
- Ceftazidime 10mg

ALOA C.C.C.A.F. CEFOTETAN, CYCLOHEXIMIDE, COLISTIN, ACRIFLAVINE, FOSFOMYCIN, για την απομόνωση της *Listeria monocytogenes*.(LABM X122)

- Cefotetan 1mg
- Cycloheximide 200mg
- Colistin 10mg
- Fosfomycin 5mg
- Acriflavine 2.5mg

Διαλύθηκαν τα συστατικά σε απεσταγμένο νερό θερμαίνοντας ήπια. Ρυθμίστηκε το pH, ώστε μετά την αποστείρωση να είναι $7,2 \pm 0,2$ στους 25°C και μοιράστηκε το υλικό μέσα σε γυάλινες φιάλες. Αποστειρώθηκε στους 121°C για 15'. Ψύχθηκε η βάση στους 48°C και προστέθηκε 1 vial X122 supplement και 1 vial X072 για κάθε 500ml βάσης. Στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία.

5. Tryptone Soya Yeast Extract agar (Oxoid)

- | | |
|-------------------------|---------|
| • Tryptone | 17 g |
| • Soya peptone | 3 g |
| • Sodium chloride | 5 g |
| • Dipotassium phosphate | 2,5 g |
| • Glucose | 2,5 g |
| • Yeast extract | 6,0 g |
| • Agar | 15 g |
| • Water | 1000 ml |

Διαλύθηκαν τα συστατικά του υποστρώματος με θέρμανση μέχρι βρασμού.

Το τελικό pH μετά την αποστείρωση ρυθμίστηκε στο $7,3 \pm 0,2$ στους 25°C .

Αποστειρώθηκε στους 121°C για 15'. Μετά την παρασκευή του, το αφέθηκε να κρυώσει και το μοιράστηκε σε τρυβλία.

6. Oxidase Test Reagent (OXOID)

- | | |
|--|--------|
| • Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride | 1 gr |
| • Water | 100 ml |

7.Motility Test Medium (OXOID)

- Beef Extract 3 g
- Peptone 10 g
- Sodium Chloride 5 g
- Agar 4 g
- Water 1000 ml

Τα συστατικά του υποστρώματος διαλύθηκαν με βρασμό, ρυθμίστηκε το pH στο $7.4 \pm 0,2$, κατανεμήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες ανά 8 ml περίπου και αποστειρώθηκε στους 121°C για 15'. Στερεοποιήθηκε σε θέση υψηλής στήλης.



ΔΕΛΤΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ

Αρ. δείγματος

ΧΕΡΙΑ-ΓΑΝΤΙΑ	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΚΟΠΗΣ	ΔΑΠΕΔΟ	ΠΕΡΙΕΚΤΗΣ	ΑΛΛΟ
ΠΕΡΙΟΧΗ-ΠΟΛΗ				
ΚΑΤΑΣΤΗΜΑ	ΨΑΡΑΣ	ΛΑΪΚΗ	ΥΠΕΡΑΓΟΡΑ	

ΕΝΑΡΞΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ :/...../.....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	HALF FRASER	FULL FRASER	ΑΛΟΑ	OXFORD	API LISTERIA

ΣΥΝΕΧΕΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Ημερομηνία	

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ευρήματα	
----------	--

ΔΕΛΤΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΨΑΡΙΟΥ

Αρ. δείγματος

ΕΙΔΟΣ

ΠΕΡΙΟΧΗ-ΠΟΛΗ

ΚΑΤΑΣΤΗΜΑ

ΨΑΡΑΣ

ΛΑΪΚΗ

ΥΠΕΡΑΓΟΡΑ

ΕΝΑΡΞΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ :/...../.....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	HALF FRASER	FULL FRASER	ALOA	OXFORD	API LISTERIA

ΣΥΝΕΧΕΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Ημερομηνία	

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ευρήματα	
----------	--

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Τηλ.: ~~74.760.61~~

2441066080



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



0040000924 18