

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΠΜΣ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ»**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΗΣ *LISTERIA*
MONOCYTOGENES ΚΑΤΑ ΜΗΚΟΣ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΟΕΙΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ**

ΑΝΕΣΤΗΣ Γ. ΤΣΙΤΣΟΣ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ ΑΠΘ

ΛΑΡΙΣΑ 2023

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ (Αναπλ. Καθηγητής Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης – Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ., Επιβλέπων).

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΟΥΛΤΟΣ (Αφ. Καθηγητής Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης – Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ., Μέλος).

ΧΡΗΣΤΟΣ ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ (Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Π.Θ., Μέλος).

***Στην οικογένειά μου,
Γιώργο, Ελένη, Εριφίλη
και Μαρία***

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Διερεύνηση της παρουσίας της *Listeria monocytogenes* κατά μήκος της αλυσίδας παραγωγής βόειου κρέατος

Λέξεις-Κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, βόειο κρέας, δέρμα, περιβάλλον, σφαγείο, εκτροφή, επιπολασμός, εποχικότητα, μικροβιακή αντοχή, βιοϋμένια, λοιμογονικότητα, MALDI-TOF

Η *Listeria monocytogenes*, ως αιτιολογικός παράγοντας της λιστερίωσης, έχει απασχολήσει κατά καιρούς την επιστημονική κοινότητα, δεδομένου ότι είναι ένα από τα συχνότερα αίτια θανάτου από τροφιμογενή παθογόνο μικροοργανισμό. Το συγκεκριμένο Gram θετικό βακτήριο χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ικανότητα επιβίωσης στο περιβάλλον που οφείλεται, μεταξύ άλλων, στην αντοχή του στην ξήρανση καθώς και στην ικανότητά του να σχηματίζει βιοϋμένια. Ειδικότερα η μόλυνση των επιφανειών και των χώρων στη βιομηχανία τροφίμων με το συγκεκριμένο παθογόνο είναι αρκετά δύσκολο να εξαλειφθεί με τις συνήθεις διαδικασίες καθαρισμού και απολύμανσης. Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η ανίχνευση της *L. monocytogenes* κατά μήκος της αλυσίδας παραγωγής βόειου κρέατος, από τις εκτροφές των βοοειδών έως και τον τελικό τεμαχισμό μετά τη σφαγή. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες το φθινόπωρο του 2022 και την άνοιξη του 2023 σε μονάδα εκτροφής βοοειδών και στο συνεργαζόμενο σφαγείο. Ελήφθησαν δείγματα κρέατος, δέρματος και περιβάλλοντος. Σε αυτά τα δείγματα έγινε προσπάθεια απομόνωσης *L. monocytogenes* σύμφωνα με την μέθοδο ISO 11290-1. Τα απομονωθέντα στελέχη ταυτοποιήθηκαν μοριακά και χαρακτηρίστηκαν με μοριακή οροτυποποίηση. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε πρωτεομική ανάλυση με MALDI-TOF για εύρεση πιθανών συγγενειών μεταξύ των στελεχών, προκειμένου να διερευνηθούν οι οδοί μόλυνσης. Επιπλέον, έγινε έλεγχος της ευαισθησίας των στελεχών σε αντιβιοτικά, αξιολόγηση της δυνατότητάς τους να παράγουν βιοϋμένια και ανίχνευση σημαντικών γονιδίων παθογονικότητας στα στελέχη. Συνολικά απομονώθηκαν 230 στελέχη *Listeria* spp., εκ των οποίων τα 24 χαρακτηρίστηκαν ως *L. monocytogenes* (10,4%). Ο επιπολασμός της *L. monocytogenes* στα σφάγια, στο δέρμα και το περιβάλλον του σφαγείου ήταν 21,7% (95% CI = 12,1% – 34,2%), 6,7% (95% CI = 1,8% - 16,2%) και 8,8% (95% CI = 3,6% – 17,2%) αντίστοιχα. Δεν απομονώθηκαν στελέχη *L. monocytogenes* από το περιβάλλον της εκτροφής (95% CI = 0% - 5,1%). Τα περισσότερα στελέχη *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν ανήκαν στο μοριακό ορότυπο IIc, ακολουθούμενος από τους ορότυπους IIa, IIb, και IVb. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς τον επιπολασμό της *L. monocytogenes* στα σφάγια, το δέρμα και το περιβάλλον ανά εποχή. Ωστόσο, το φθινόπωρο επικράτησε η απομόνωση στελεχών μοριακού ορότυπου IIa από το περιβάλλον του σφαγείου και τα σφάγια, σε αντίθεση με την άνοιξη όπου κυριάρχησε ο μοριακός ορότυπος IIc. Τα περισσότερα στελέχη (14 από τα 24 στελέχη) παρουσίασαν μέτρια ικανότητα παραγωγής βιοϋμένων, ενώ περίπου ένα στα τρία στελέχη (9 από τα 24 στελέχη) είχε την ικανότητα να παράξει ισχυρά βιοϋμένια. Δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ του ορότυπου στελεχών *L. monocytogenes* και της ικανότητάς τους να

σχηματίζουν βιοϋμένια. Σχεδόν όλα τα στελέχη *L. monocytogenes* επέδειξαν αντοχή σε τουλάχιστον έναν αντιμικροβιακό παράγοντα. Τα μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής παρατηρήθηκαν στην κλινδαμυκίνη, στην βανκομυκίνη και την τετρακυκλίνη, ακολουθούμενα από τη σιπροφλοξασίνη και την τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη. Τρία στελέχη έχουν χαρακτηριστεί ως πολυανθεκτικά, καθώς εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην κλινδαμυκίνη, την τετρακυκλίνη και τη βανκομυκίνη, ενώ ένα από αυτά τα στελέχη ήταν επιπλέον ανθεκτικό και στη σιπροφλοξασίνη. Όλα τα στελέχη *L. monocytogenes* διέθεταν τα γονίδια λοιμογονικότητας *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *hlyA* και *iap*, αλλά μερικά στελέχη δε διέθεταν τα γονίδια *plcA*, *prfA* ή *inlB*. Κατά τη διερεύνηση των πιθανών συγγενειών μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών προέκυψε πως τα στελέχη μπορούν να οργανωθούν σε τρία διαφορετικά συμπλέγματα, με τιμή διαχωρισμού (cut-off value) στα 650 distance level. Οι κυριότερες εστίες του μικροοργανισμού στο σφαγείο είναι το νερό πλυσίματος σφάγιων, το δέρμα και ο εξοπλισμός του σφαγείου που έρχεται σε επαφή με το νερό και το δέρμα, όπως σιφόνια, μαχαίρια και κύλινδρος εκδοράς. Η μόλυνση των σφάγιων οφείλεται τόσο σε εισαγόμενα στελέχη από την εκτροφή μέσω του δέρματος των ζώων όσο και σε στελέχη που εμμένουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο περιβάλλον του σφαγείου. Η εξακρίβωση των οδών μετάδοσης της *L. monocytogenes* κατά μήκος της αλυσίδας παραγωγής κρέατος συμβάλλει στην πρόληψη της μετάδοσής της στον άνθρωπο και της πρόκλησης τροφιμογενούς νοσήματος.

ABSTRACT

Investigation of the presence of *Listeria monocytogenes* along the beef production chain

Keywords: *Listeria monocytogenes*, beef meat, hide, environment, slaughterhouse, farm, prevalence, seasonality, antimicrobial resistance, biofilms, virulence, MALDI-TOF

Listeria monocytogenes, the causative agent of listeriosis, is of interest to the scientific community, since it is the most common cause of death among foodborne pathogens. This Gram-positive bacterium is characterised by its excellent ability to survive in the environment, due to its resistance to dry conditions and its ability to form biofilms. In particular, the contamination with this pathogen of surfaces and premises in the food industry is quite difficult to eliminate by standard cleaning and disinfection procedures. The aim of this study is to detect *L. monocytogenes* along the beef production chain, from cattle farms to the fabrication of carcasses after slaughter. For this purpose, sampling was carried out in the autumn and spring at a cattle unit and at the partner slaughterhouse, and it involved meat, hide and environmental samples. The samples were examined for the presence of *L. monocytogenes* according to ISO 11290-1. The isolates were molecularly identified and characterised by molecular serotyping testing. Subsequently, MALDI-TOF proteomic analysis was performed to find possible relationships between the strains in order to investigate the most probable pathways of contamination. In addition, the strains analyses involved antimicrobial susceptibility testing, their ability to produce biofilms and the investigation of the most important virulence genes. A total of 230 *Listeria* spp. strains were isolated, of which 24 were identified as *L. monocytogenes* (10.4%). The prevalence of *L. monocytogenes* in carcasses, hide and slaughterhouse environment was 21.7% (95% CI = 12.1% - 34.2%), 6.7% (95% CI = 1.8% - 16.2%) and 8.8% (95% CI = 3.6% - 17.2%) respectively. No *L. monocytogenes* strains were isolated from the farm environment (95% CI = 0% - 5.1%). Most *L. monocytogenes* strains isolated belonged to molecular serogroup IIc, followed by serogroups IIa, IIb, and IVb. No statistically significant differences were observed in the prevalence of *L. monocytogenes* in carcasses, hide, and environment depending on the season. However, strains of molecular serogroup IIa from the slaughterhouse environment and carcasses prevailed in the autumn, in contrast to the spring when molecular serogroup IIc was predominant. Most strains (14 out of 24 strains) showed a moderate ability to produce biofilms, while approximately one in three strains (9 out of 24 strains) produced strong biofilms. No correlation was observed between *L. monocytogenes* serogroups and their ability to produce biofilms. Almost all *L. monocytogenes* strains showed intermediate or high resistance to at least one antimicrobial. The highest rates of resistance were observed with clindamycin, vancomycin and tetracycline, followed by ciprofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole. Three strains were characterized as multidrug-resistant, since they exhibited resistance to clindamycin, tetracycline and vancomycin, whereas one of those strains showed additional resistance to ciprofloxacin. All *L. monocytogenes* strains possessed the virulence genes *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *hlyA* and *iap*, but some strains

did not harbour the *plcA*, *prfA* or *inlB* genes. The investigation of possible relationships between the isolated strains revealed three clusters when cut-off value was set at 650 distance level. The main sources of the microorganism in the slaughterhouse are the carcass washing water, the hides and the slaughterhouse equipment that came in contact with the contaminated water and hides, such as drains, knives and dehiding cylinder. The contamination of carcasses can be attributed to newly introduced strains that came from the farm to the slaughterhouse via the hides of animals, as well as to strains that persist for a long time in the slaughterhouse environment. The elucidation of the transmission pathways of *L. monocytogenes* along the meat production chain contributes to the prevention of its transmission to humans and the emergence of foodborne disease.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	xv
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xvii
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	xix
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
A.1. Γενικά χαρακτηριστικά του είδους <i>Listeria monocytogenes</i>	1
A.1.1. Ιστορική ανασκόπηση.....	1
A.1.2. Ταξινόμηση.....	2
A.1.3. Βιολογία.....	2
A.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του μικροοργανισμού	4
A.1.5. Μηχανισμοί επιβίωσης της <i>L. monocytogenes</i>	7
A.1.5.1. Μηχανισμοί απόκρισης σε συνθήκες καταπόνησης	7
A.1.5.2. Παραγωγή βιοϋμενίων	8
A.1.5.3. Αντοχή στους αντιμικροβιακούς παράγοντες και τις απολυμαντικές ουσίες.....	10
A.1.6. Μέθοδοι ανίχνευσης της <i>L. monocytogenes</i>	12
A.2. <i>Listeria monocytogenes</i> και άνθρωπος	15
A.2.1. Επιδημιολογία	15
A.2.2. Παθογένεια - ανοσία.....	17
A.2.3. Κλινική εικόνα	20
A.2.4. Διάγνωση	23
A.2.5. Θεραπεία.....	24
A.2.6. Πρόληψη	25
A.3. <i>Listeria monocytogenes</i> και ενιαία υγεία.....	27
A.3.1. <i>L. monocytogenes</i> και ζώα.....	27
A.3.2. <i>L. monocytogenes</i> και περιβάλλον	28
A.3.3. <i>L. monocytogenes</i> και τρόφιμα	30
A.3.4. Η <i>L. monocytogenes</i> στη διεπαφή ζώων, περιβάλλοντος, τροφίμων και ανθρώπων.....	32
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	35
B.1. Σκοπός της εργασίας	35
B.2. Υλικά και μέθοδοι	37
B.2.1. Δειγματοληψία.....	37
B.2.2. Μικροβιολογική ανάλυση και οροτυποποίηση στελεχών <i>L. monocytogenes</i>	38

B.2.3. Διερεύνηση πιθανών συγγενειών μεταξύ των στελεχών <i>L. monocytogenes</i> .	41
B.2.4. Αξιολόγηση παραγωγής βιοϋμενίων από τα στελέχη <i>L. monocytogenes</i>	42
B.2.5. Έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών <i>L. monocytogenes</i> στα αντιβιοτικά.....	43
B.2.6. Ανίχνευση γονιδίων λοιμογονικότητας στα στελέχη <i>L. monocytogenes</i>	45
B.2.7. Στατιστική ανάλυση.....	45
B.3. Αποτελέσματα.....	47
B.3.1. Απομόνωση στελεχών, προσδιορισμός επιπολασμού και οροτυποποίηση της <i>L. monocytogenes</i>	47
B.3.2. Διερεύνηση πιθανών συγγενειών μεταξύ των στελεχών <i>L. monocytogenes</i> .	48
B.3.3. Αξιολόγηση παραγωγής βιοϋμενίων από τα στελέχη <i>L. monocytogenes</i>	49
B.3.4. Έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών <i>L. monocytogenes</i> στα αντιβιοτικά.....	49
B.3.5. Ανίχνευση γονιδίων λοιμογονικότητας στα στελέχη <i>L. monocytogenes</i>	50
B.4. Συζήτηση.....	55
B.5. Συμπεράσματα	69
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71
Διεθνής	71
Ελληνική.....	88

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος της στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης – Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευάγγελου Οικονόμου. Ένα μέρος της πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Βιοπαθολόγου – Μικροβιολόγου κ. Μαρίας Κυρίτση.

Επιθυμώ να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευάγγελο Οικονόμου για την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης, για τις πολύτιμες υποδείξεις του, την αέναη καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθειά του σε όλα τα στάδια της έρευνας. Οι επιστημονικές του συμβουλές, η ψυχολογική του υποστήριξη, η ενθάρρυνσή του και η πίστη του στις δυνατότητές μου αποτέλεσαν πυξίδα καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέρη της Τριμελούς μου Επιτροπής:

Τον Αφ. Καθηγητή κ. Νικόλαο Σούλτο, για την εμπιστοσύνη που μου δείχνει ήδη από προπτυχιακό φοιτητή, για τις πολύτιμες συμβουλές του, την καθοδήγησή του και την αμέριστη συμπαράστασή του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Τον Καθηγητή κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου, για το ενδιαφέρον που επέδειξε και την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής.

Επίσης, ευχαριστίες εκφράζω και στη Βιοπαθολόγο-Μικροβιολόγο κ. Μαρία Κυρίτση για τη βοήθεια που μου προσέφερε στην εκμάθηση και λειτουργία του MALDI-TOF, καθώς και στη δημιουργία των δενδρογραμμάτων.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στους κτηνιάτρους Παντελή Περατικό και Αλέξανδρο Δαμιανό για τη στήριξή τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου και για όλη τη βοήθεια που μου παρείχαν κατά την πραγματοποίηση των δειγματοληψιών και των αναλύσεων στο εργαστήριο.

Στη σύντροφό μου και γιατρό κ. Μαρία – Αγγελική Μπουτέλ εκφράζω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου για την ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχε και για τη βοήθειά της καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου.

Η εργασία μου δε θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση της οικογένειάς μου, στην οποία οφείλω ευγνωμοσύνη.

Τέλος, ευχαριστώ όλους που με οποιονδήποτε τρόπο με βοήθησαν κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής.

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των γενεαλογικών ομάδων της <i>L. monocytogenes</i>	3
Πίνακας 2. Περιγραφή των δειγμάτων που έχουν ληφθεί.	38
Πίνακας 3. Εκκινητές για τη μοριακή ταυτοποίηση και οροτυποποίηση της <i>L. monocytogenes</i>	40
Πίνακας 4. Δισκία αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν και όρια ευαισθησίας της <i>L. monocytogenes</i>	44
Πίνακας 5. Εκκινητές για την ανίχνευση γονιδίων λοιμογονικότητας της <i>L. monocytogenes</i>	46
Πίνακας 6. Προέλευση και εποχή απομόνωσης των απομονωθέντων στελεχών <i>L. monocytogenes</i>	48
Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά των απομονωθέντων στελεχών <i>L. monocytogenes</i>	52

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Α) Σχηματική αναπαράσταση της μόλυνσης ανθρώπινου ξενιστή από <i>Listeria monocytogenes</i> . Β) Ο ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής της <i>Listeria monocytogenes</i>	19
Διάγραμμα 1. Μετάδοση της <i>L. monocytogenes</i> μεταξύ των ανθρώπων, των ζώων, και του περιβάλλοντος.	33
Εικόνα 2. Υγρά και στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση στελεχών <i>L. monocytogenes</i>	39
Εικόνα 3. α) Ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> σε Full Fraser (αριστερά), β) Κυανοπράσινες αποικίες <i>L. monocytogenes</i> με αδιαφανή άλω σε ALOA (μέση), γ) Αποικίες <i>L. monocytogenes</i> σε TSYEA (δεξιά).....	41
Εικόνα 4. α) Παραγωγή βιοϋμενίων από στελέχη (αριστερά), β) Ζώνες αναστολής σε αντιβιογράμμο (δεξιά).....	44
Εικόνα 5. α) Μοριακή οροτυποποίηση των στελεχών <i>L. monocytogenes</i> (αριστερά), β) Ανίχνευση γονιδίων λοιμογονικότητας (<i>inlA</i> και <i>actA</i>) στα στελέχη <i>L. monocytogenes</i> (δεξιά).	50
Διάγραμμα 2. Δενδρόγραμμα κύριων φασμάτων (main spectra dendrogram) των στελεχών <i>L. monocytogenes</i>	51
Διάγραμμα 3. Κυριότερες πηγές μετάδοσης της <i>L. monocytogenes</i> κατά μήκος της αλυσίδας παραγωγής βόειου κρέατος.	67

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Γενικά χαρακτηριστικά του είδους *Listeria monocytogenes*

A.1.1. Ιστορική ανασκόπηση

Η *L. monocytogenes* απομονώθηκε για πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα ως ένας Gram-θετικός βάκιλλος από δείγματα ιστών μολυσμένων ανθρώπων και ζώων. Το 1919, ο Hulphers απομόνωσε τον μικροοργανισμό από νεκρωτικές εστίες ήπατος κονίκλου και τον ονόμασε τότε *Bacillus hepatitis* (Fsihi και συν., 2001). Αργότερα, το 1926 οι Murray και συν. απομόνωσαν έναν νέο βάκιλλο από ινδόχοιρο και κόνικλο και τον ονόμασαν *Bacterium monocytogenes* (Murray και συν., 1926). Το 1927, ο Pirie ονόμασε *Listerella hepatolytica*, προς τιμήν του Λόρδου Joseph Lister, τον βάκιλλο που ήταν υπεύθυνος για την επιζωοτία τρωκτικών ζώων του Τίγρη ποταμού, στην περιοχή της Μεσοποταμίας (Fsihi και συν., 2001). Το 1940, ο ίδιος ερευνητής επανονόμασε τον μικροοργανισμό ως *Listeria monocytogenes*, όνομα που διατηρείται ακόμα και σήμερα (Pirie, 1940).

Παρόλο που η *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί αρκετές φορές από δείγματα μολυσμένων ζώων και ανθρώπων ήδη από τη δεκαετία του 1920, δεν θεωρούνταν σημαντικός λοιμογόνος παράγοντας μέχρι το 1952, οπότε και χαρακτηρίστηκε από τον Potel ως ένας σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας νεογνικών λοιμώξεων και σήψης στην Ανατολική Γερμανία (Potel, 1952). Ακόμα και τότε, η *L. monocytogenes* δεν είχε συσχετισθεί με τροφιμογενή μετάδοση νόσου και χρειάστηκε να περάσουν περίπου 30 χρόνια μέχρι να διαπιστωθεί η ικανότητα μόλυνσης του ανθρώπου μέσω της κατανάλωσης τροφίμων. Το 1981 συνέβη επιδημική έξαρση κρουσμάτων λιστερίωσης στο Halifax, της επαρχίας Nova Scotia του Καναδά, με 41 περιστατικά και 18 θανάτους, κυρίως σε έγκυες γυναίκες και νεογνά. Η συγκεκριμένη έξαρση συνδέθηκε επιδημιολογικά με την κατανάλωση σαλάτας λάχανου, όπου το λάχανο βρέθηκε να έχει μολυνθεί από *L. monocytogenes* λόγω χρήσης κοπριάς προβάτου (Schlech και συν., 1983). Από τότε, άρχισαν να πληθαίνουν οι αναφορές τροφιμογενών νόσων από *L. monocytogenes*, ενώ σήμερα θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους παθογόνους μικροοργανισμούς της βιομηχανίας τροφίμων (EFSA & ECDC, 2022).

A.1.2. Ταξινόμηση

Η *Listeria monocytogenes* ανήκει στο γένος *Listeria*, στην οικογένεια *Listeriaceae*, στην τάξη *Bacillales*, στην κλάση *Bacilli* του φύλου *Bacillota* (Parte, 2020). Στην ίδια οικογένεια με τη *Listeria* ανήκει και το γένος *Brochothrix*, ενώ στην ίδια τάξη με τη *Listeria* ανήκει και το γένος *Staphylococcus* (Parte, 2020).

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει μέχρι στιγμής 27 είδη: *Listeria aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. cossartiae*, *L. costaricensis*, *L. farberi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. goaensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. ilorinensis*, *L. immobilis*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. newyorkensis*, *L. portnoyi*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. rustica*, *L. seeligeri*, *L. thailandensis*, *L. valentina*, *L. weihenstephanensis* και *L. welshimeri* (Parte, 2020). Το είδος *L. denitrificans*, το οποίο παλαιότερα ανήκε στο γένος *Listeria*, μεταφέρθηκε πλέον στο γένος *Jonesia* και μετονομάστηκε ως *Jonesia denitrificans* (Nwaiwu, 2020). Επίσης, επειδή παρατηρήθηκαν πολλές ομοιότητες μεταξύ των ειδών *L. grayi* και *L. murrayi*, τα ονόματά τους συγχωνεύτηκαν σε ένα κοινό όνομα και πλέον ονομάζονται ως *Listeria grayi* (Nwaiwu, 2020).

Από όλα τα είδη *Listeria*, η *L. ivanovii* και η *L. monocytogenes* είναι παθογόνοι μικροοργανισμοί των ζώων, ενώ μόνο η *L. monocytogenes* θεωρείται παθογόνος για τον άνθρωπο (Batt, 2014). Έχουν περιγραφεί 14 ορότυποι της *L. monocytogenes* που προκαλούν νόσο στον άνθρωπο (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 4h, 7) (Batt, 2014; Feng και συν., 2020). Ωστόσο, η συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών που απομονώθηκαν από τα ζώα και τους ανθρώπους ανήκουν στους ορότυπους 1/2a, 1/2b και 4b (Batt, 2014). Οι ορότυποι της *L. monocytogenes* εντάσσονται σε τέσσερις γενεαλογικές ομάδες (I, II, III και IV), οι οποίες εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά (Πίνακας 1).

A.1.3. Βιολογία

Η *L. monocytogenes* είναι ένας θετικός κατά Gram κοκκοβάκιλλος, με διαστάσεις 0,4 – 0,5 µm επί 0,5 – 2 µm και στρογγυλευμένα άκρα (Magalhães και συν., 2014). Αν και με τη χρώση Gram χρωματίζεται συνήθως μπλε, είναι δυνατόν να φαίνεται και ως Gram αρνητικό βακτήριο, ανάλογα με την ηλικία της καλλιέργειας (Batt, 2014). Διατάσσεται σε μικρά αθροίσματα, σε ζεύγη ή σε σειρά σαν πάσσαλοι φράκτη, ενώ ενίοτε μπορεί να σχηματίσει V ή L μορφές (Bennett και συν., 2020). Η *L. monocytogenes* συχνά μπερδεύεται με πνευμονιόκοκκους ή στρεπτόκοκκους, λόγω της ιδιαιτερότητας της μορφολογίας, της χρώσης και των σχηματισμών διάταξής της (Bennett και συν., 2020).

Πινάκας 1. Χαρακτηριστικά των γενεαλογικών ομάδων της *L. monocytogenes* [Orsi και συν. (2011), με τροποποιήσεις].

Γενεαλογική ομάδα	Ορότυπος	Γενικά χαρακτηριστικά	Κατανομή
I	1/2b, 3b, 3c, 4b, 4d, 4e	Μικρότερη ποικιλομορφία μεταξύ των γενεαλογικών ομάδων. Οι ορότυποι της ομάδας αυτής συνδέονται περισσότερο με την πρόκληση ανθρώπινης λιστερίωσης και με επιδημίες λόγω της μεγάλης παθογονικότητάς τους	Διάφορες πηγές (π.χ. ανθρώπινα δείγματα, τρόφιμα, περιβαλλοντικά δείγματα)
II	1/2a, 1/2c, 3a	Μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των γενεαλογικών ομάδων	Κυρίως σε τρόφιμα και περιβαλλοντικά δείγματα
III	4a, 4b, 4c	Πολύ διαφορετική ποικιλομορφία μεταξύ των γενεαλογικών ομάδων I και II	Κυρίως μηρυκαστικά
IV	4a, 4b, 4c	Λίγες απομονώσεις έχουν αναλυθεί μέχρι σήμερα	Κυρίως μηρυκαστικά

Η *L. monocytogenes* είναι κινητή σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 20 και 25°C, με τη βοήθεια των περίτριχων βλεφαρίδων που φέρει (Batt, 2014). Η κίνησή της είναι χαρακτηριστική και εξαρτάται πλήρως από τη θερμοκρασία, καθώς σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 25°C δεν παράγει τις υπεύθυνες για την κίνησή της βλεφαρίδες και κατά συνέπεια δεν εμφανίζει κινητικότητα (Magalhães και συν., 2014). Επιπλέον, είναι προαιρετικώς αναερόβιος και μη σπορογόνος μικροοργανισμός (Batt, 2014). Αναφορικά με τη θερμοκρασία ανάπτυξης χαρακτηρίζεται ως ψυχρότροφος μικροοργανισμός, με ιδανική θερμοκρασία πολλαπλασιασμού τους 30 - 37°C και θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξης τους -1,5 – 45°C (Magalhães και συν., 2014). Η επί τοις % περιεκτικότητα του DNA της *L. monocytogenes* σε μόρια γουανίνης + κυτοσίνης είναι 36 – 42 % (Batt, 2014; Magalhães και συν., 2014).

Όσον αφορά τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της, η *L. monocytogenes* είναι καταλάση θετική και οξειδάση αρνητική. Δεν παράγει ινδόλη και δεν υδrolύει την ουρία και την ζελατίνη. Διασπά τη γλυκόζη και τη σαλικίνη προς παραγωγή οξέος, αλλά δεν παράγει αέριο και υδρόθειο. Επιπλέον, δεν ανάγει τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη. Η *L. monocytogenes* μπορεί να ζυμώσει την ραμνόζη, αλλά δεν ζυμώνει την ξυλόζη και την μαννιτόλη. Προκαλεί ασθενή β-αιμόλυση, όταν αναπτύσσεται σε αιματούχο άγαρ, καθώς και συνεργική αιμόλυση όταν συγκαλλιεργείται σε αιματούχο άγαρ με τον *Staphylococcus aureus* (CAMP test) (Batt, 2014; Magalhães και συν., 2014).

Η *L. monocytogenes* θεωρείται ένα από τα πιο ανθεκτικά Gram – θετικά μη σπορογόνα βακτήρια στο περιβάλλον. Έχει παγκόσμια εξάπλωση και επιβιώνει τόσο σε φυσικά (χερσαία και υδάτινα) όσο και σε ανθρώπινα οικοσυστήματα (Batt, 2014). Επιπλέον, προσβάλλει τον άνθρωπο και τα ζώα και μπορεί να προκαλέσει νόσο (Bennett και συν., 2020). Η ικανότητα επιβίωσής της σε βιομηχανίες τροφίμων, η μετάδοσή της μέσω της κατανάλωσης τροφίμων και η πρόκληση νόσου στον άνθρωπο την καθιστούν ως ένα ιδιαίτερα σημαντικό πεδίο έρευνας για τη Δημόσια Υγεία και τη Μικροβιολογία Τροφίμων (Magalhães και συν., 2014).

A.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του μικροοργανισμού

Η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του μικροοργανισμού είναι η θερμοκρασία, το pH, ο συντελεστής ενεργού ύδατος, το χλωριούχο νάτριο, οι ιονίζουσες ακτινοβολίες και οι ατμοσφαιρικές συνθήκες.

Όπως αναφέρθηκε, η *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες από -1,5 °C έως 45°C. Δεν θεωρείται θερμοανθεκτικός μικροοργανισμός, καθώς αδρανοποιείται σε θερμοκρασίες >50°C με την θερμική παστερίωση να την καταστρέφει (Matthews και

συν., 2021). Η θερμοανθεκτικότητά της *L. monocytogenes* αυξάνεται καθώς μειώνεται ο συντελεστής ενεργού ύδατος του τροφίμου, φαινόμενο που παρατηρείται και σε άλλους μικροοργανισμούς (Liu, 2008). Ωστόσο, υπάρχουν διαφορές μεταξύ των στελεχών ως προς την απόκρισή τους στους θερμικούς παράγοντες καταπόνησης (Adrião και συν., 2008). Αναφορικά με το ψύχος, η *L. monocytogenes* είναι ένας ψυχρότροφος μικροοργανισμός που μπορεί να πολλαπλασιαστεί με βραδύ ρυθμό σε θερμοκρασίες ψυγείου και σε τρόφιμα που συντηρούνται υπό ψύξη, γεγονός που μπορεί να συμβάλει στην εκδήλωση τροφιμογενούς νοσήματος (Hamon και συν., 2006). Παραδείγματα υπό ψύξη τροφίμων από όπου έχει απομονωθεί ο παθογόνος μικροοργανισμός είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, τα αλιεύματα, το κρέας, το γάλα και τα προϊόντα τους (Magalhães και συν., 2014). Η κατάψυξη δεν μειώνει σημαντικά το μικροβιακό πληθυσμό. Η επιβίωση και η πρόκληση βλαβών κατά τη συντήρηση στην κατάψυξη εξαρτώνται από το τρόφιμο και το ρυθμό κατάψυξης (Matthews και συν., 2021). Στελέχη Scott A της *L. monocytogenes* απομονώθηκαν ακόμα και από παγωτό, και μάλιστα ο πληθυσμός τους παρέμεινε αμετάβλητος στο τρόφιμο αυτό ακόμα μετά από πέντε μήνες στους -18°C (Magalhães και συν., 2014).

Η *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε εύρος pH 4,4 – 9,6, με το ιδανικό pH για τον πολλαπλασιασμό της να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 8 (Magalhães και συν., 2014). Σε τιμές pH <4,3, η *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει, αλλά δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί (Liu, 2008). Ωστόσο, η ικανότητα πολλαπλασιασμού σε χαμηλό pH εξαρτάται από το είδος των οξέων και από τη θερμοκρασία επώασης. Σε *in vitro* συνθήκες, η παρουσία 0,1% γαλακτικού, 0,1% κιτρικού και 0,1% οξικού οξέος σε ζωμό τρυπτόνης αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό της *L. monocytogenes*, και μάλιστα η αναστολή του πολλαπλασιασμού της είναι ακόμα μεγαλύτερη όσο μειώνεται η θερμοκρασία επώασης (Matthews και συν., 2021). Η δράση των οργανικών οξέων έναντι της *L. monocytogenes* εξαρτάται από το βαθμό διάστασής τους, καθώς μόνο η αδιάστατη μορφή τους αναστέλλει την ανάπτυξή της. Έτσι, το οξικό οξύ είναι περισσότερο αποτελεσματικό στην αδρανοποίηση της *L. monocytogenes* συγκριτικά με το κιτρικό και το γαλακτικό οξύ, σε αντίστοιχα pH (Matthews και συν., 2021). Αναφορικά με την επίδραση της θερμοκρασίας, μελέτες έδειξαν πως όταν χυμός πορτοκαλιού (pH 3,6 – 3,8) με ενοφθαλμισμένη *L. monocytogenes* συντηρείται στους 7°C για 4 ημέρες, παρατηρείται μείωση του πληθυσμού της κατά 0,5 – 1 log, ενώ αν συντηρείται στους 30°C για 2 – 5 ημέρες, ο πληθυσμός της μειώνεται κατά 4 -5 log (Magalhães και συν., 2014). Προηγούμενη προσαρμογή της *L. monocytogenes* σε μετρίως όξινες συνθήκες ευνοεί την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό της σε τρόφιμα με χαμηλό pH (Lado & Yousef, 2007).

Η *L. monocytogenes* αναπτύσσεται καλύτερα σε τιμές συντελεστή ενεργού νερού (a_w) μεγαλύτερες από 0,97. Η ελάχιστη τιμή a_w για τον πολλαπλασιασμό των περισσότερων στελεχών είναι 0,93, αλλά ορισμένα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές a_w μέχρι και 0,9. Το βακτήριο μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ακόμα χαμηλότερες τιμές a_w που φτάνουν μέχρι και το 0,83 (Liu, 2008; Matthews και συν., 2021). Το βακτήριο έχει απομονωθεί από άλμη τυριού με a_w = 0,75 έπειτα από μεγάλο χρονικό διάστημα, γεγονός ενδεικτικό της αντοχής του σε μικρές τιμές a_w (Magalhães και συν., 2014). Η θερμοανθεκτικότητα του βακτηρίου αυξάνεται καθώς μειώνεται η τιμή a_w του τροφίμου που βρίσκεται. Συνεπώς, ο συνδυασμός χαμηλών τιμών a_w και θερμικών χειρισμών, που σε μερικά τρόφιμα εφαρμόζεται κατά αποκλειστικότητα, όπως τα

αλλαντικά, δεν εγγυάται την ασφάλεια του τροφίμου από *L. monocytogenes* (Matthews και συν., 2021). Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της απομόνωσης του βακτηρίου από σαλάμι αέρος ξηράς ωρίμανσης, με τιμές a_w μεταξύ 0,79 και 0,86, έως και την 12^η εβδομάδα της συντήρησής του στους 5°C (Magalhães και συν., 2014).

Η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται ικανοποιητικά όταν βρίσκεται σε μέτριες συγκεντρώσεις αλάτων (μέχρι 6,5%), ενώ μπορεί να αναπτυχθεί και σε ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (10-12%) (Liu, 2008). Επιπλέον, το βακτήριο μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου που φτάνουν μέχρι και το 40% (Liu και συν., 2005). Η επιβίωσή του σε περιβάλλον μεγάλης αλατότητας ευνοείται με τη μείωση της θερμοκρασίας. Συνεπώς, αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας και ωρίμανσης, όπως είναι το ζαμπόν, το σαλάμι αέρος και η μορταδέλα, αποτελούν ευνοϊκό περιβάλλον για τον πολλαπλασιασμό της *L. monocytogenes* (Matthews και συν., 2021). Για αυτό τον λόγο, στα συγκεκριμένα τρόφιμα κρίνεται απαραίτητη η χρήση πολλαπλών εμποδίων για τον έλεγχο της *Listeria* σε αυτά (Jiang & Xiong, 2015).

Αν και τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη ραδιοαντοχή της *L. monocytogenes* είναι περιορισμένα, είναι γενικά αποδεκτό πως εμφανίζει αντοχή στην υπερϊώδη ακτινοβολία και στις ιονίζουσες ακτινοβολίες παρόμοια με τα άλλα Gram θετικά βακτήρια και μεγαλύτερη από τα Gram αρνητικά βακτήρια (Niemira, 2010). Δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας 0,27-1 kGy και 0,52-1,3 kGy σε νωπά και κατεψυγμένα τρόφιμα αντίστοιχα μειώνουν τον πληθυσμό του μικροοργανισμού κατά ένα δεκαδικό λογάριθμο (Decimal Reduction Dose, D_{10}) (Καραϊωάννογλου, 2016). Δόση 2-4 kGy μπορεί να προκαλέσει μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου κατά 6-7 log (Magalhães και συν., 2014). Όπως και με τα υπόλοιπα παθογόνα βακτήρια, έτσι και με την *L. monocytogenes* οι ιονίζουσες και οι μη ιονίζουσες ακτινοβολίες έχουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε τρόφιμα συσκευασμένα υπό αερόβιες συνθήκες, συγκριτικά με τα τρόφιμα που συσκευάζονται υπό κενό ή υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες (Liu, 2008).

Οι αερόβιες συνθήκες είναι ευνοϊκές για τον πολλαπλασιασμό της *L. monocytogenes*. Όμως, ως προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός, δεν επηρεάζεται σημαντικά από την απουσία ατμοσφαιρικού αέρα (Liu, 2008). Η *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί από κρεατοσκευάσματα συσκευασμένα υπό κενό και μάλιστα σε πληθυσμούς μεγαλύτερους από 3 log cfu/g (Καραϊωάννογλου, 2016). Επίσης, το βακτήριο μπορεί να αναπτυχθεί σε συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) μέχρι και 20%. Ωστόσο, συγκεντρώσεις CO₂ μεγαλύτερες από 50% θεωρούνται ανασταλτικές για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του μικροοργανισμού (Magalhães και συν., 2014).

A.1.5. Μηχανισμοί επιβίωσης της *L. monocytogenes*

A.1.5.1. Μηχανισμοί απόκρισης σε συνθήκες καταπόνησης

Η *L. monocytogenes* είναι ικανή να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται ακόμα και σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως σε χαμηλές θερμοκρασίες, σε χαμηλό pH και σε έντονο φωσφοτικό στρες. Προκειμένου να το επιτύχει αυτό, έχει αναπτύξει μια σειρά από προσαρμοστικούς μηχανισμούς, έτσι ώστε να ξεπεράσει αυτά τα περιβαλλοντικά εμπόδια και να καταφέρει να μολύνει τον ξενιστή της.

Οι μηχανισμοί προσαρμογής της *L. monocytogenes* στις χαμηλές θερμοκρασίες που έχουν αναφερθεί περιλαμβάνουν την παραγωγή πρωτεϊνών ψυχρής καταπόνησης (cold-shock proteins), τη διατήρηση της ρευστότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μέσω της αλλαγής της σύνθεσης των λιπαρών της οξέων, την ενδοκυτταρική πρόσληψη διαλυμένων ουσιών και ολιγοπεπτιδίων και την παραγωγή πρωτεϊνών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* στις χαμηλές θερμοκρασίες (Mattila και συν., 2011). Με τη μείωση της θερμοκρασίας κάτω από τους 7°C, το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών οξέων, των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλυσίδας και των C_{15:0} στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αυξάνεται, ενώ το ποσοστό των C_{17:0} και των κορεσμένων λιπαρών οξέων μειώνεται, διατηρώντας έτσι τη βέλτιστη δυνατή ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης για τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου σε χαμηλές θερμοκρασίες (Beales, 2004). Επιπλέον, σε χαμηλές θερμοκρασίες ευνοείται η έκκριση πρωτεασών, μοριακών συνοδών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών ψυχρής καταπόνησης, οι οποίες συμβάλλουν στην αποδόμηση των τραυματισμένων πολυπεπτιδίων που παρατηρούνται λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών (Liu και συν., 2002). Τέλος, σε χαμηλές θερμοκρασίες ρυθμίζεται η έκφραση γονιδίων που συμβάλλουν στην ενεργητική μεταφορά κρυοπροστατευτικών ουσιών από το περιβάλλον, όπως είναι η γλυκινική βεταΐνη και η καρνιτίνη (Angelidis & Smith, 2003).

Όσον αφορά το pH, οι κυριότεροι μηχανισμοί προσαρμογής του βακτηρίου σε όξινες συνθήκες είναι η συντήρηση της ρευστότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μέσω της αλλαγής της σύνθεσης των λιπαρών της οξέων, η αποκαρβοξυλίωση του γλουταμικού, το σύστημα της απαμίνωσης της αργινίνης και το σύστημα του F₁F₀-ATPase (Wiktorczyk-Kapischke και συν., 2021). Κατά το σύστημα της αποκαρβοξυλίωσης του γλουταμικού, η *L. monocytogenes* αποκαρβοξυλιώνει ενδοκυτταρικά ένα μόριο γλουταμικού από το περιβάλλον σε γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) καταναλώνοντας ένα ενδοκυτταρικό πρωτόνιο και μειώνοντας το ενδοκυτταρικό pH. Παράλληλα, αποβάλλει το GABA παθητικά μέσω μιας κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης και το ανταλλάσσει με ένα καινούριο μόριο γλουταμικού, προκειμένου να επαναληφθεί η προηγούμενη διαδικασία. Το GABA, όντας λιγότερο όξινο από το γλουταμικό, συμβάλλει στην αλκαλοποίηση του περιβάλλοντος (Cotter και συν., 2001). Αντίστοιχα, με το σύστημα της απαμίνωσης της αργινίνης, η εξωκυττάρια αργινίνη

μετατρέπεται ενδοκυτταρικά σε ορνιθίνη, αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα. Η ορνιθίνη που παράγεται αποβάλλεται παθητικά από το κύτταρο και ανταλλάσσεται με ένα νέο μόριο αργινίνης. Για κάθε ένα μόριο αργινίνης που απαμινώνεται, παράγονται δύο μόρια αμμωνίας και ένα μόριο ATP. Η αμμωνία αντιδρά με πρωτόνια που βρίσκονται ενδοκυτταρικά και παράγεται αμμώνιο, συμβάλλοντας στην μείωση του ενδοκυττάριου pH (Thakur και συν., 2018). Το ATP που παράγεται χρησιμοποιείται μεταξύ άλλων και στο σύστημα του F_1F_0 -ATPase, το οποίο αποβάλλει ενεργητικά πρωτόνια από το κυτταρόπλασμα στο περιβάλλον (Cotter και συν., 2000). Πέρα από τους παραπάνω μηχανισμούς διατήρησης του ενδοκυττάριου pH (pH homeostasis), η *L. monocytogenes* μειώνει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης σε κατιόντα υδρογόνου (H^+), μέσω της σύνθεσης λιπαρών οξέων κυκλοπροπανίου, και επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών όξινης καταπόνησης (acid-shock proteins) που επιτελούν παρόμοιες λειτουργίες με τις cold-shock proteins (Liu, 2008).

Οι μηχανισμοί απόκρισης της *L. monocytogenes* στο οσμωτικό στρες περιλαμβάνουν την διατήρηση της ενδοκυτταρικής πίεσης του βακτηρίου και την επαγωγή σύνθεσης πρωτεϊνών οσμωτικής καταπόνησης (osmotic shock proteins) (Hill και συν., 2002). Η διατήρηση της ενδοκυτταρικής πίεσης του βακτηρίου διασφαλίζεται μέσω της συσσώρευσης K^+ και της de novo βιοσύνθεσης ή ενεργητικής μεταφοράς οσμωπροστατευτικών ουσιών από το περιβάλλον (Thakur και συν., 2018). Οι πιο αντιπροσωπευτικές οσμωπροστατευτικές ουσίες είναι η γλυκινική βεταΐνη και η καρνιτίνη, ενώ παραδείγματα άλλων τέτοιων ουσιών είναι η προλίνη, η προλινική βεταΐνη, η ακετυλκαρνιθίνη, η γ -βουτυροβεταΐνη και το 3-διμεθυλσουλφονιοπροπιονικό (Bayles & Wilkinson, 2000). Οι ουσίες αυτές χαρακτηρίζονται από τις ακόλουθες ιδιότητες: α) είναι διαλυτές σε μεγάλες συγκεντρώσεις και μπορούν να συσσωρευτούν σε υψηλά επίπεδα σε οσμωτικά καταπονημένα κύτταρα, β) είναι ουδέτερες ή ελαφρώς οξικές χημικές ενώσεις, και γ) δεν διαπερνούν γρήγορα την κυτταρική μεμβράνη χωρίς τη συμβολή του συστήματος μεταφοράς (Liu, 2008). Παράλληλα με τις οσμωπροστατευτικές ουσίες, η *L. monocytogenes* παράγει και πρωτεΐνες οσμωτικής καταπόνησης (osmotic shock proteins), οι οποίες επάγουν ή αναστέλλουν τη σύνθεση ορισμένων πρωτεϊνών του κυττάρου, προκειμένου να προσαρμοστεί σε συνθήκες οσμωτικού στρες (Duché και συν., 2002).

A.1.5.2. Παραγωγή βιοϋμενίων

Ένας σημαντικός μηχανισμός επιβίωσης της *L. monocytogenes* σε δυσμενή περιβάλλοντα είναι η δημιουργία βιοϋμενίων. Τα βιοϋμένια είναι οργανωμένες κοινότητες μικροβιακών κυττάρων που περιβάλλονται από έναν όξινο πολυσακχαρίτη ινώδους φύσης που παράγεται από τα κύτταρα. Αυτό το βιολογικά ενεργό δίκτυο κυττάρων και εξωκυτταρικών ουσιών βρίσκεται σε συνάφεια με τη στερεή επιφάνεια (Donlan, 2002). Τα βιοϋμένια περιβάλλουν και συγκρατούν στενά μεταξύ τους τα βακτήρια και την οργανική ή ανόργανη ύλη, ενώ επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων εντός αυτών, την αποβολή των προϊόντων μεταβολισμού τους και τη δράση των ενζύμων τους (Colagiorgi και συν., 2017). Επιπλέον, τα βιοϋμένια προστατεύουν τη *L. monocytogenes*

από αντίξοους παράγοντες του περιβάλλοντος, όπως θέρμανση, υπεριώδη ακτινοβολία, μεταβολές του pH και οσμωτικό στρες, ενώ συγχρόνως την προστατεύουν από βακτηριοφάγους, λυτικά βακτήρια και απολυμαντικές ουσίες (Ferreira και συν., 2014). Τα βιοϋμένια προσφύονται ισχυρά στην επιφάνεια και για αυτό το λόγο δύσκολα απομακρύνονται από αυτήν, ενώ συγχρόνως αποτελούν εστίες μόλυνσης που μειώνουν τη λειτουργικότητα των επιφανειών (Reis-Teixeira και συν., 2017).

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη δημιουργία βιοϋμενίων από τη *L. monocytogenes* είναι η θερμοκρασία και η φύση των επιφανειών που προσφύεται. Η παραγωγή βιοϋμενίων είναι σημαντικά μεγαλύτερη στους 37°C, θερμοκρασία που αποτελεί την άριστη και για τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου (Colagiorgi και συν., 2017). Ωστόσο, το βακτήριο είναι ικανό να παράξει βιοϋμένια ακόμα και σε θερμοκρασίες ψυγείου. Το υλικό της επιφάνειας επηρεάζει σημαντικά το βαθμό παραγωγής βιοϋμενίων σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Για παράδειγμα, οι Di Bonaventura και συν. (2008) αναφέρουν πως η *L. monocytogenes* είναι ικανή να παράξει βιοϋμένια στους 4, 12 και 22°C κυρίως στο γυαλί και σε μικρότερο βαθμό στο ανοξείδωτο ατσάλι και το πολυστυρένιο. Αντίστοιχα, οι Bonsaglia και συν. (2014) σημειώνουν πως τα υψηλότερα επίπεδα παραγωγής βιοϋμενίων από το βακτήριο στους 4°C ήταν στο γυαλί και στο ανοξείδωτο ατσάλι, ενώ μικρότερα ήταν τα επίπεδα στο πολυστυρένιο. Παρόλα αυτά, το βακτήριο είναι ικανό να παράξει βιοϋμένια σε μια μεγάλη ποικιλία υλικών επιφανειών, όπως Teflon, Nylon, Buna-N, χυτοσίδηρο, πολυεστέρα, γυαλί και ανοξείδωτο ατσάλι (Chavant και συν., 2002; Min και συν., 2006). Η τραχιά μορφολογία της επιφάνειας και οι οπές βοηθούν τη δημιουργία βιοϋμενίων (Colagiorgi και συν., 2017). Από τα κοινότερα σημεία εμφάνισης βιοϋμενίων είναι τα πατώματα, οι σωλήνες λυμάτων, οι στροφές σε σωλήνες, οι ταινίες μεταφοράς, τα στεγανοποιητικά και οι επιφάνειες που δεν καθαρίζονται επιμελώς (Di Ciccio και συν., 2012). Τέλος, εκτός από τη θερμοκρασία και το υλικό των επιφανειών, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την πρόσφυση της *L. monocytogenes* στις επιφάνειες και τη δημιουργία βιοϋμενίων είναι η ύπαρξη θρεπτικών συστατικών στην επιφάνεια και οι μεταβολές του pH και της αλατότητας του περιβάλλοντος (Møretro & Langsrud, 2004).

Η αρχιτεκτονική των βιοϋμενίων που παράγει η *L. monocytogenes* ποικίλλει μεταξύ των στελεχών. Τα βιοϋμένια που παράγονται μπορεί να είναι απλοί σχηματισμοί, όπως πολλαπλές επίπεδες στοιβάδες κυττάρων, ή και πιο πολύπλοκοι σχηματισμοί, όπως σχηματισμοί που μοιάζουν με κυψέλες. Οι σχηματισμοί που μοιάζουν με κυψέλες είναι οι συχνότερα απαντώμενοι, παρέχουν μεγαλύτερη προστασία και ευνοούν περισσότερο τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του βακτηρίου (Guilbaud και συν., 2015). Αν και υπάρχουν βιοϋμένια που αποτελούνται μόνο από ένα είδος βακτηρίου, τις περισσότερες φορές στα βιοϋμένια της *L. monocytogenes* απαντώνται πολλαπλά είδη βακτηρίων. Μάλιστα, τα βιοϋμένια που αποτελούνται από πολλαπλά είδη βακτηρίων είναι πιο ανθεκτικά στις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (Colagiorgi και συν., 2017). Οι μικροοργανισμοί που συμβιώνουν στο ίδιο περιβάλλον με τη *L. monocytogenes* επηρεάζουν την ικανότητά της να παράξει βιοϋμένια (Carpentier & Chassaing, 2004). Οι συνηθέστεροι μικροοργανισμοί που συνυπάρχουν μαζί με τη *L. monocytogenes* στα βιοϋμένια είναι άλλα είδη *Listeria* spp., *Flavobacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. και *Pseudomonas* spp. (Ferreira και συν., 2014; Colagiorgi και συν., 2017). Τα βακτήρια που βρίσκονται

εντός των βιοϋμενίων παρουσιάζουν κάποιες φυσιολογικές μεταβολές. Η πιο χαρακτηριστική μεταβολή που υφίστανται είναι η αλλαγή της σύνθεσης των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση των κορεσμένων λιπαρών οξέων και μείωση των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλυσίδας της κυτταρικής μεμβράνης (Dubois-Brissonnet και συν., 2016). Οι μεταβολές αυτές αυξάνουν τη σταθερότητα των βακτηρίων εντός των βιοϋμενίων (Denich και συν., 2003).

Όσον αφορά το πολυμερές υλικό των βιοϋμενίων, αυτό αποτελείται από εξωπολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και eDNA (Flemming & Wingender, 2010). Σε αντίθεση με τα βιοϋμένια άλλων βακτηρίων, όπου οι εξωπολυσακχαρίτες αποτελούν την κυρίαρχη ουσία του πολυμερούς υλικού των βιοϋμενίων, στα βιοϋμένια της *L. monocytogenes* οι πρωτεΐνες αποτελούν την κυρίαρχη ένωση στο πολυμερές υλικό (Combrousse και συν., 2013). Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να είναι είτε εξωκυτταρικές είτε πρωτεΐνες επιφανείας, όπως οι ιντερναλίνες *inlA*, *inlL* και η *biofilm associated protein* *BapL* (Franciosa και συν., 2009; Porowska και συν., 2017). Οι εξωπολυσακχαρίτες των βιοϋμενίων αποτελούνται κυρίως από τειχοϊκό οξύ που μαζί με τις πρωτεΐνες και το eDNA διαδραματίζουν στηρικτικό ρόλο στα βιοϋμένια (Brauge και συν., 2016). Το eDNA αποτελεί επιπλέον και πηγή ενέργειας για τα βακτήρια εντός των βιοϋμενίων (Harmsen και συν., 2010).

A.1.5.3. Αντοχή στους αντιμικροβιακούς παράγοντες και τις απολυμαντικές ουσίες

Σε γενικές γραμμές, τα στελέχη *L. monocytogenes* εμφανίζουν σπάνια αντοχή στους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Ωστόσο, έχουν απομονωθεί στελέχη που είναι ανθεκτικά σε ένα ή και περισσότερα αντιβιοτικά. Πιο συγκεκριμένα, στελέχη του βακτηρίου εμφάνισαν αντοχή στις β-λακτάμες (πενικιλίνη, αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, κεφαλοσπορίνες), αμινογλυκοσίδες, μακρολίδια, αμφαινικόλες (χλωραμφαινικόλη, φλορφαινικόλη), τετρακυκλίνες, λινκοσαμίδες, κλινδαμυκίνη, φωσφομυκίνη, ριφαμπικίνη, κινολόνες, νιτροφουράνια, τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη και βανκομυκίνη (Lungu και συν., 2011). Πολυανθεκτικά στελέχη (στελέχη που παρουσιάζουν αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό τριών διαφορετικών αντιμικροβιακών ομάδων) αναφέρονται μόνο περιστασιακά (Srinivasan και συν., 2005; Magiorakos και συν., 2012). Τα ανθεκτικά στελέχη έχουν απομονωθεί από ανθρώπους, ζώα, τρόφιμα και το περιβάλλον. Η αντοχή στους αντιμικροβιακούς παράγοντες οφείλεται στη μη ορθή χρήση αντιβιοτικών ή στην παρουσία χαμηλών επιπέδων αντιβιοτικών στο περιβάλλον που επιτρέπουν την προσαρμογή του βακτηρίου και την ανάπτυξη αντοχής σε αυτά (Lungu και συν., 2011). Αυτή μπορεί να προκληθεί από σημειακές μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα του βακτηρίου, από οριζόντια γονιδιακή μεταφορά γενετικών στοιχείων που προσδίδουν αντοχή στους αντιμικροβιακούς παράγοντες ή με υπερέκφραση αντλιών εκροής. Η *L. monocytogenes* εμφανίζει φυσική αντοχή στις κεφαλοσπορίνες που οφείλεται σε γονίδια που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου (Φωκάς & Φωκάς, 2017). Η οριζόντια γονιδιακή μεταφορά μπορεί να γίνει μέσω πλασμιδίων ή μεταθετόνιων (transposons). Παραδείγματα γενετικών στοιχείων που έχουν απομονωθεί από το βακτήριο είναι τα πλασμίδια *pIP501* (προσδίδει αντοχή σε χλωραμφαινικόλη, μακρολίδια, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνες), το *pAMβ1*

(προσδίδει αντοχή στην ερυθρομυκίνη) και το rIP823, καθώς και τα μεταθετόνια Tn916 (προσδίδει αντοχή στις τετρακυκλίνες) και το Tn1545 (Lungu και συν., 2011). Η οριζόντια γονιδιακή μεταφορά μπορεί να γίνει μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους αλλά και μεταξύ διαφορετικών ειδών του γένους *Listeria* και κυρίως μεταξύ της *L. innocua* και της *L. monocytogenes* (Li και συν., 2007). Βακτήρια του γένους *Enterococcus* και *Streptococcus* αποτελούν δεξαμενή γονιδίων αντοχής στους αντιμικροβιακούς παράγοντες που μπορούν να μεταφερθούν και σε στελέχη *L. monocytogenes* (Lungu και συν., 2011). Ο γαστρεντερικός σωλήνας των ανθρώπων και των ζώων αποτελεί ένα από τα πιο συχνά σημεία μεταφοράς γονιδίων αντοχής από στελέχη των γενών *Enterococcus* και *Streptococcus* προς τη *L. monocytogenes* (Sleator και συν., 2009). Τέλος, έχουν αναφερθεί δύο αντλίες εκροής στη *L. monocytogenes* που σχετίζονται με αντοχή στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, οι *mdrL* και *lde*. Η αντλία *MdrL* εξωθεί από το κύτταρο μακρολίδια, κεφοταξίμη, βαρέα μέταλλα και βρωμιούχο αιθίδιο, ενώ η αντλία *Lde* παρέχει αντοχή στις φλουοροκινολόνες, το βρωμιούχο αιθίδιο και την πορτοκαλόχρουν αρκιδίνη (Mata και συν., 2000; Godreuil και συν., 2003).

Εκτός από τα αντιβιοτικά, η *L. monocytogenes* έχει εμφανίσει επίκτητη αντοχή και σε απολυμαντικές ουσίες. Οι πιο κοινές απολυμαντικές ουσίες στις οποίες έχει αναφερθεί αντοχή του βακτηρίου είναι οι ενώσεις χλωρίου και οι τεταρτοταγείς βάσεις αμμωνίου (Duze και συν., 2021). Η ανεπαρκής καθαριότητα πριν την απολύμανση, η υπέρμετρη χρήση απολυμαντικών ουσιών και το ανεπαρκές πλύσιμο μετά την απολύμανση εκθέτουν τα βακτήρια σε μικρές συγκεντρώσεις απολυμαντικών ουσιών που συμβάλλουν στην ανάδυση ανθεκτικών στελεχών σε αυτά (Rodriguez-Lopez και συν., 2018). Οι μηχανισμοί απόκτησης αντοχής σε απολυμαντικές ουσίες περιλαμβάνουν τη μετάβαση στην κατάσταση Viable but not Culturable (VBNC), την τροποποίηση της κυτταρικής μεμβράνης, τη δημιουργία βιοϋμενίων και την υπερέκφραση αντλιών εκροής. Η χρήση ενώσεων χλωρίου και ο συνδυασμός μη ιονικών επιφανειοδραστικών ενώσεων με ανόργανα άλατα μπορούν να προκαλέσουν το βακτήριο να μεταπέσει στην κατάσταση VBNC, κατά την οποία το βακτήριο δεν σχηματίζει αποικίες σε κοινά θρεπτικά υποστρώματα, αλλά διατηρεί τη μεταβολική του δραστηριότητα και μπορεί να επιστρέψει στην αρχική του κατάσταση όταν οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές (Lin και συν., 2017; Robben και συν., 2018; Noll και συν., 2020). Επιπλέον, το βακτήριο είναι ικανό να τροποποιήσει την κυτταρική του μεμβράνη αυξάνοντας τον αριθμό των λιπαρών οξέων που υπάρχουν σε αυτήν, εμποδίζοντας έτσι την είσοδο των απολυμαντικών ουσιών στο εσωτερικό του κυττάρου (Bisbiroulas και συν., 2011). Η τροποποίηση της κυτταρικής μεμβράνης σχετίζεται με αντοχή στις ενώσεις χλωρίου και τις τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου (Mereghetti και συν., 2000; Kostaki και συν., 2012). Όσον αφορά τις αντλίες εκροής, έχουν περιγραφεί συνολικά έξι αντλίες που σχετίζονται με την αντοχή σε απολυμαντικές ουσίες, από τις οποίες οι δύο είναι ενδογενείς και οι τέσσερις οφείλονται σε οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Οι ενδογενείς αντλίες είναι οι *mdrL* και *lde*, ενώ οι υπόλοιπες αντλίες κωδικοποιούνται από τη γονιδιακή κασέτα *bcrABC* και τα γονίδια *qacH*, *emrE* και *emrC* (Duze και συν., 2021). Η γονιδιακή κασέτα *bcrABC* βρίσκεται στο πλασμίδιο pLM80 και προκαλεί αντοχή στις ενώσεις χλωρίου, ενώ το γονίδιο *qacH* βρίσκεται στο μεταθετόνιο Tn6188 και προκαλεί αντοχή στις τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου (Müller και συν., 2014; Minarovičová και συν., 2018). Αντίστοιχα, το γονίδιο *emrE* εντοπίζεται στο γονιδιακή νησίδα (genomic island) LGI1 και σχετίζεται με αντοχή στις τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου, ενώ το γονίδιο *emrC* εντοπίζεται στο πλασμίδιο

pLMST6 και σχετίζεται με αντοχή τόσο στις ενώσεις χλωρίου όσο και στις τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου (Kovacevic και συν., 2016; Kremer και συν., 2017).

Τα στελέχη *L. monocytogenes* που εμφανίζουν αντοχή σε απολυμαντικές ουσίες είναι πιθανό να παρουσιάσουν διασταυρούμενη αντοχή και σε αντιβιοτικά. Η διασταυρούμενη αντοχή οφείλεται στην υπερέκφραση αντλιών εκροής, που μπορούν να απομακρύνουν από το κύτταρο τόσο απολυμαντικές ουσίες όσο και αντιβιοτικά, όπως οι αντλίες *mdrL* και *lde*, καθώς και στην οριζόντια μεταφορά γενετικών στοιχείων που φέρουν παράγοντες αντοχής για απολυμαντικές ουσίες και αντιβιοτικά (Yu και συν., 2018). Επιπλέον, η εκτεταμένη χρήση απολυμαντικών ουσιών προκαλεί τη φυσική επιλογή πιο ανθεκτικών στελεχών σε μια μεγάλη ποικιλία αντιμικροβιακών παραγόντων (Olaimat και συν., 2018). Για παράδειγμα, οι Noll και συν. (2020) αναφέρουν πως η υπέρμετρη χρήση ενώσεων χλωρίου οδήγησε στην ανάδυση στελεχών που εμφάνισαν αντοχή στις ενώσεις χλωρίου και μειωμένη ευαισθησία στην κεφτριαζόνη, τη γενταμυκίνη, τη λινεζολίδη, την τετρακυκλίνη και την τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη. Επιπλέον, οι Kremer και συν. (2017) σημειώνουν πως έπειτα από χρήση απολυμαντικών ουσιών απομονώθηκαν στελέχη που είχαν το πλασμίδιο pLMST6 και το γονίδιο *emrC*. Τα στελέχη αυτά εμφάνισαν επιπλέον μεγαλύτερες τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) στην αμοξικιλίνη και την γενταμυκίνη, συγκριτικά με τα στελέχη που δεν έφεραν το πλασμίδιο. Μεταξύ των υπόλοιπων απολυμαντικών ουσιών, οι τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου εμπλέκονται συχνότερα στην ανάδυση στελεχών με διασταυρούμενη αντοχή σε αντιβιοτικά (Duze και συν., 2021).

A.1.6. Μέθοδοι ανίχνευσης της *L. monocytogenes*

Οι μέθοδοι ανίχνευσης της *L. monocytogenes* διακρίνονται στις συμβατικές και τις εναλλακτικές μεθόδους. Οι συμβατικές μέθοδοι περιλαμβάνουν καλλιεργητικές μεθόδους. Οι μέθοδοι αυτές μπορεί να είναι είτε μέθοδοι ανίχνευσης (παρουσία ή απουσία του βακτηρίου στο δείγμα) είτε μέθοδοι αρίθμησης (αριθμός των βακτηριακών κυττάρων στο δείγμα) (Välimaa και συν., 2015). Οι μέθοδοι ανίχνευσης περιλαμβάνουν συνήθως δύο επιπλέον στάδια εμπλουτισμού από τις μεθόδους αρίθμησης. Το πρώτο στάδιο εμπλουτισμού (προεμπλουτισμός) συμβάλλει στην επιδιόρθωση των δομών τυχόν τραυματισμένων κυττάρων του βακτηρίου, στη μετάβαση του βακτηρίου από την VBNC κατάσταση σε καλλιεργήσιμη κατάσταση, στην αραίωση ανασταλτικών παραγόντων που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα και στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων του βακτηρίου (Dwivedi & Jaykus, 2011). Το δεύτερο στάδιο εμπλουτισμού (εκλεκτικός εμπλουτισμός) αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό άλλων ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και ευνοεί τον πολλαπλασιασμό της *L. monocytogenes* σε μεγάλους αριθμούς (Jasson και συν., 2010). Μετά τον εμπλουτισμό, ακολουθεί η εκλεκτική απομόνωση σε εκλεκτικά στερεά υποστρώματα. Σε περίπτωση απομόνωσης χαρακτηριστικών αποικιών ακολουθούν οι μορφολογικές, βιοχημικές, φυσιολογικές ή/και ορολογικές αναλύσεις για την ταυτοποίηση του απομονωθέντος στελέχους. Ο χρόνος που απαιτείται είναι περίπου 4-5 ημέρες για την απομόνωση του βακτηρίου ή την έκδοση αρνητικού αποτελέσματος

και επιπλέον 7 ημέρες για τον χαρακτηρισμό του στελέχους (Jasson και συν., 2010; Dwivedi & Jaykus, 2011). Το όριο ανίχνευσης του βακτηρίου είναι της τάξεως του 1-5 CFU / 25 g δείγματος (Jasson και συν., 2010). Μεταξύ άλλων, πρότυπες μέθοδοι ανίχνευσης και αρίθμησης παρέχονται από την ISO και τον FDA, οι οποίες προτείνονται από την νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης και των Η.Π.Α. αντίστοιχα (Zunabovic και συν., 2011). Παραδείγματα υποστρωμάτων που προτείνονται από την ISO και τον FDA αντίστοιχα είναι για τα στάδια εμπλουτισμού το Fraser broth (Half Fraser broth / Fraser broth) και το Buffered Listeria Enrichment Broth, ενώ για την εκλεκτική απομόνωση προτείνονται το Oxford Medium, Palcam Agar και το Agar Listeria Ottaviani & Agosti (ALOA) (Välimaa και συν., 2015).

Οι εναλλακτικές μέθοδοι αποτελούν ταχείες μεθόδους ανίχνευσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου και διακρίνονται στις ανοσολογικές δοκιμασίες, τους βιοαισθητήρες, στις μεθόδους που βασίζονται σε βακτηριοφάγους, στον φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό και τις μοριακές μεθόδους. Οι ανοσολογικές μέθοδοι βασίζονται στην ειδική σύνδεση μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων με αντιγόνα του βακτηρίου. Αυτές οι μέθοδοι συνήθως χρειάζονται ένα προηγούμενο στάδιο εμπλουτισμού. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων είναι η ELISA, η ELFA και η IMS (Välimaa και συν., 2015). Οι βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές συσκευές που μετατρέπουν ένα βιολογικό ερέθισμα σε ηλεκτρικό ερέθισμα. Αποτελούνται από έναν βιολογικό υποδοχέα (bioreceptor), που μπορεί να ανιχνεύει μικροοργανισμούς, κύτταρα, ένζυμα, αντισώματα και νουκλεϊκά οξέα, και έναν μετατροπέα, που μετατρέπει τα βιολογικά ερεθίσματα σε οπτικά, ηλεκτροχημικά, θερμικά ή σχετικά με τη μάζα ερεθίσματα (Velusamy και συν., 2010). Οι βακτηριοφάγοι μπορούν να ανιχνεύσουν με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στελέχη του βακτηρίου και να διαφοροποιήσουν τα ζωντανά από τα νεκρά κύτταρα (Singh και συν., 2013). Κατά τον φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό, χρησιμοποιούνται ανιχνευτές που στοχεύουν το ριβοσωμικό RNA της *L. monocytogenes* (16S RNA), με το οποίο και υβριδίζονται. Ο υβριδισμός γίνεται αντιληπτός με εμφάνιση φθορισμού κατά τη μικροσκοπηση σε κατάλληλο μικροσκόπιο (Rohde και συν., 2015). Οι μοριακές μέθοδοι αποσκοπούν στην ανίχνευση ενός συγκεκριμένου στόχου στο γονιδίωμα του βακτηρίου και τον πολλαπλασιασμό του. Για τη *L. monocytogenes* έχουν σχεδιαστεί πολυάριθμες μέθοδοι απλής PCR, multiplex PCR, real-time PCR και Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) (Settanni & Corsetti, 2007; Postollec και συν., 2011; Craw & Balachandran, 2012). Το όριο ποσοτικοποίησης των εναλλακτικών μεθόδων είναι αρκετά υψηλό και κυμαίνεται μεταξύ 10-1000 CFU/g δείγματος, χωρίς προηγούμενο εμπλουτισμό (Välimaa και συν., 2015). Ωστόσο, μετά από εμπλουτισμό, το όριο ποσοτικοποίησης κατεβαίνει στα 1-5 CFU/25 g δείγματος (Zeng και συν., 2006), τιμή που είναι παρόμοια με αυτή των πρότυπων μεθόδων.

Οι συμβατικές και οι εναλλακτικές μέθοδοι διαθέτουν πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Οι συμβατικές μέθοδοι είναι απλές, ευαίσθητες, φθηνές και εφαρμόσιμες σε δείγματα τροφίμων. Ωστόσο, παρουσιάζουν μειωμένη ειδικότητα και απαιτούν αρκετό χρόνο και εντατική εργαστηριακή δουλειά (Yeni και συν., 2014; Law και συν., 2015). Επιπλέον, όταν το δείγμα περιέχει άλλα είδη *Listeria* spp. και κυρίως *L. innocua*, μπορούν να αναπτυχθούν ταχύτερα από τη *L. monocytogenes* και να επισκιάσουν την ανάπτυξη της, οδηγώντας σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Gnanou Besse και συν., 2010). Παρόλα αυτά, όταν ανιχνεύονται στελέχη *Listeria* spp. σε ένα δείγμα τροφίμου, υπάρχει

μεγάλη πιθανότητα παρουσίας και *L. monocytogenes* (Välimaa και συν., 2015). Οι ανοσολογικές μέθοδοι εμφανίζουν μεγαλύτερη ειδικότητα από τις συμβατικές μεθόδους, ενώ είναι γρήγορες, αναπαραγώγιμες, ευαίσθητες, αρκετά αυτοματοποιημένες και δεν επηρεάζονται από τους αναστολείς που υπάρχουν στα τρόφιμα (Jasson και συν., 2010). Ωστόσο, είναι ακριβότερες από τις συμβατικές μεθόδους, έχουν μικρότερη ευαισθησία και ειδικότητα από τις μοριακές μεθόδους, δεν καταλήγουν σε ζωντανές καλλιέργειες και συχνά δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα (ιδίως η ELISA) (Yeni και συν., 2014; Välimaa και συν., 2015). Οι μοριακές μέθοδοι είναι εξαιρετικά ευαίσθητες, ειδικές, αναπαραγώγιμες και αυτοματοποιημένες και απαιτούν λιγότερο χρόνο για την ανάλυση. Μπορούν να ανιχνεύσουν ταυτόχρονα πολλαπλούς στόχους, όπως συγκεκριμένους ορότυπους, γονότυπους, ατυπικές μορφές ή μόνο παθογόνα στελέχη. Είναι ανεξάρτητες της μικροβιακής χλωρίδας του δείγματος και ανεξάρτητες του πολλαπλασιασμού και της κατάστασης του μικροοργανισμού (τραυματισμένα κύτταρα ή VBNC). Επομένως, οι μοριακές μέθοδοι είναι η μέθοδος εκλογής για την ανίχνευση μικροοργανισμών που δεν καλλιεργούνται *in vitro* (Jasson και συν., 2010; Ceuppens και συν., 2014; Yeni και συν., 2014). Ωστόσο, οι μοριακές μέθοδοι είναι ακριβότερες από τις υπόλοιπες μεθόδους και επηρεάζονται από τους αναστολείς που υπάρχουν στα τρόφιμα. Επιπλέον, δεν καταλήγουν σε ζωντανές καλλιέργειες και δεν μπορούν να διαφοροποιήσουν αν το γενετικό υλικό που ανιχνεύουν ανήκει σε ζωντανό ή νεκρό κύτταρο. Τα όρια ποσοτικοποίησης των εναλλακτικών μεθόδων είναι αρκετά υψηλά χωρίς εμπλουτισμό (Jasson και συν., 2010; Ceuppens και συν., 2014; Yeni και συν., 2014). Ανεξάρτητα από τη μέθοδο ανίχνευσης, η απόδοση των μεθόδων επηρεάζεται από το είδος του τροφίμου, τα συνυπάρχοντα μικρόβια στο δείγμα και την κατάσταση του μικροοργανισμού στόχου. Για αυτό το λόγο, οι περισσότερες μέθοδοι περιλαμβάνουν ένα στάδιο εμπλουτισμού, προκειμένου να μειωθεί το όριο ποσοτικοποίησης και να αντιμετωπιστούν τα αναφερθέντα προβλήματα (Jasson και συν., 2010; Välimaa και συν., 2015).

A.2. *Listeria monocytogenes* και άνθρωπος

A.2.1. Επιδημιολογία

Η *L. monocytogenes* είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη φύση. Απομονώνεται από το έδαφος, τη βλάστηση, τα ενσιρώματα, την κοπριά, τα λύματα, τα επιφανειακά νερά, τις υδατοσυλλογές και τα νερά των ποταμών, των λιμνών και των θαλασσών (Vivanti και συν., 2013). Οι υγιείς άνθρωποι, τα υγιή θηλαστικά και τα πτηνά είναι δυνατό να φιλοξενούν τον μικροοργανισμό στο έντερό τους (Καραϊωάννογλου, 2016). Η φορεία στα κόπρανα εκτιμάται ότι συμβαίνει στο 1-5% των υγιών ανθρώπων (Murray και συν., 2012). Επιπλέον, μικροί πληθυσμοί του παθογόνου ανευρίσκονται συχνά σε νωπά τρόφιμα, όπως κρέας, νωπό γάλα, νωπά αλιευτικά προϊόντα και νωπά λαχανικά, ενώ συχνά απομονώνονται και από το περιβάλλον μονάδων επεξεργασίας τροφίμων (δάπεδα, φρεάτια, εξοπλισμός) (da Silva και συν., 2013; Μάντης και συν., 2015).

Η *L. monocytogenes* στον άνθρωπο, στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων (99%), μεταδίδεται με την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν μεγάλους πληθυσμούς του παθογόνου (Αρβανιτίδου-Βαγιωνά, 2013). Η παστερίωση είναι επαρκής για να αδρανοποιήσει τους πληθυσμούς του βακτηρίου που συνήθως βρίσκονται στα νωπά τρόφιμα. Ωστόσο, η μόλυνση των τροφίμων μετά την παστερίωση κατά τους χειρισμούς, ή με τη διασταυρούμενη μόλυνση από μολυσμένες επιφάνειες, εξοπλισμό ή υλικά συσκευασίας, αποτελεί τη συνηθέστερη οδό μόλυνσης των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων (Μάντης και συν., 2015). Η ικανότητα του βακτηρίου να πολλαπλασιάζεται σε ορισμένες κατηγορίες τροφίμων που συντηρούνται για μεγάλο διάστημα υπό ψύξη αποτελεί το συνηθέστερο αίτιο τροφικών λοιμώξεων. Άλλα αίτια τροφικών λοιμώξεων αποτελούν η παρατεταμένη συντήρηση των τροφίμων και το ανεπαρκές μαγείρεμα του τροφίμου πριν την κατανάλωσή του (Murray και συν., 2012; Matthews και συν., 2021). Η *L. monocytogenes* είναι ικανή να πολλαπλασιαστεί σε ευρεία ποικιλία τροφίμων, δεδομένου ότι επιβιώνει και πολλαπλασιάζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος, σε χαμηλές τιμές pH και σε χαμηλές θερμοκρασίες (Cartwright και συν., 2013). Στα τρόφιμα που έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση περιστατικών λιστερίωσης είναι το παστεριωμένο γάλα, τα μαλακά τυριά, τα τυριά από απαστερίωτο γάλα, το βούτυρο, το παγωτό, τα αλλαντικά, τα καπνιστά ψάρια, το λάχανο τουρσί, οι έτοιμες σαλάτες, τα πεπόνια, τα καταψυγμένα λαχανικά, τα καραμελωμένα μήλα, τα άπλυτα ωμά λαχανικά, το ατελώς μαγειρεμένο κρέας και τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα κρέατος, όπως διάφορα είδη ντελικάτσεν, τα χοτ ντογκ και πατέ (Murray και συν., 2012; McCollum και συν., 2013; Μάντης και συν., 2015; Bennett και συν., 2020). Η μεγάλη περίοδος επώασης της λιστερίωσης δυσκολεύει την ιχνηλάτιση και τον εντοπισμό του υπεύθυνου τροφίμου που προκάλεσε τροφική λοίμωξη (Cartwright και συν., 2013).

Η μολύνουσα δόση της *L. monocytogenes* δεν είναι επακριβώς καθορισμένη. Μελέτες έδειξαν πως όσο μειώνονται οι πληθυσμοί έκθεσης, τόσο μειώνεται η πιθανότητα

εκδήλωσης και η σοβαρότητα της κλινικής ασθένειας (Matthews και συν., 2021). Οι πληθυσμοί του βακτηρίου στα τρόφιμα που είναι υπεύθυνοι για την εκδήλωση τροφικής λοίμωξης είναι συνήθως >100 cfu/g. Ωστόσο, σε κρούσματα λιστερίωσης που εκδηλώθηκαν το 1998 και το 1999 στις ΗΠΑ και που το υπεύθυνο τρόφιμο ήταν τα λουκάνικα Φρανκφούρτης, ο πληθυσμός του βακτηρίου σε αυτά ήταν μικρότερος από 0,3 cfu/g (Ferreira και συν., 2014; Matthews και συν., 2021). Επίσης, σε υγιή άτομα που η λιστερίωση εμφανίζεται με τη μορφή ήπιας νόσου (εμπύρετη γαστρεντερίτιδα), η μολύνουσα δόση είναι αρκετά μεγαλύτερη ($5-9 \log$ cfu/g) (Pouillot και συν., 2016; Matthews και συν., 2021). Επομένως, η μολύνουσα δόση του βακτηρίου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το υπεύθυνο τρόφιμο, το στέλεχος του μικροοργανισμού και η ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή. Όπως και σε άλλα παθογόνα, έτσι και στη *L. monocytogenes* το τρόφιμο παρέχει προστασία δεδομένου ότι ο βλωμός διευκολύνει τη δίοδο μέσω του γαστρικού φραγμού προς το όργανο στόχος που είναι το έντερο (Garner & Kathariou, 2016). Επίσης, η μολυσματικότητα του βακτηρίου διαφέρει μεταξύ των στελεχών. Για παράδειγμα, η *L. monocytogenes* Scott A εμφανίζει εντονότερη παθογόνο δράση συγκριτικά με άλλα στελέχη (Briers και συν., 2011). Μάλιστα, η πλειοψηφία των στελεχών που ενοχοποιούνται για επιδημίες λιστερίωσης ανήκουν στους ορότυπους 1/2a, 1/2b και 4b (Bennett και συν., 2020). Τέλος, η επίπτωση και σοβαρότητα της νόσου είναι μεγαλύτερη στις ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως τα νεογνά, οι ηλικιωμένοι, οι έγκυες γυναίκες και οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς (π.χ. μεταμοσχεύσεις οργάνων, κακοήθειες νεοπλασίες, σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας, ανοσοκατασταλτική θεραπεία) (Murray και συν., 2012).

Αν και η λιστερίωση αποτελεί μια σποραδική ασθένεια, ανήκει στα σημαντικότερα τροφιμογενή νοσήματα του ανθρώπου. Η *L. monocytogenes* ανήκει στα πέντε συχνότερα απομονωμένα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια στην Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ συγχρόνως ανήκει στα τρία κυριότερα αίτια θανάτου μεταξύ των τροφιμογενών νοσημάτων (Matthews και συν., 2021; EFSA & ECDC, 2022). Έχει παγκόσμια εξάπλωση και παρατηρείται καθόλη τη διάρκεια του έτους, αλλά η επίπτωση του νοσήματος κορυφώνεται τους θερινούς μήνες (Goulet και συν., 2008; de Noordhout και συν., 2014). Εκτιμάται ότι κάθε χρόνο καταγράφονται 1600-2500 περιστατικά λιστερίωσης παγκοσμίως, με περίπου 200-300 θανάτους και απώλεια 4000 ποιοτικών χρόνων ζωής (quality-adjusted life years, QALYs), ενώ συγχρόνως η βιομηχανία τροφίμων χάνει ετησίως δισεκατομμύρια δολάρια εξαιτίας της μόλυνσης των τροφίμων από *L. monocytogenes* (Murray και συν., 2012; Matthews και συν., 2021). Ενδεικτικά αναφέρεται πως μέχρι το 2010 η λιστερίωση προκάλεσε περίπου 23.150 ασθένειες, 54.463 θανάτους και 172.823 DALYs (disability-adjusted life years) παγκοσμίως (de Noordhout και συν., 2014). Οι παραπάνω δείκτες είναι υψηλότεροι στις αναπτυγμένες χώρες, λόγω των ιδιαίτερων διατροφικών συνηθειών που παρατηρούνται σε αυτές τις χώρες, την μεγαλύτερη κατανάλωση επεξεργασμένων τροφίμων και την εκτενέστερη αναφορά επιδημιών τροφιμογενών νοσημάτων (Rocourt και συν., 2003).

A.2.2. Παθογένεια - ανοσία

Η *L. monocytogenes* είναι ένα δυνητικό ενδοκυτταρικό βακτήριο (Freitag και συν., 2009). Μετά από κατανάλωση τροφίμου μολυσμένου με *L. monocytogenes*, το βακτήριο διέρχεται του γαστρικού φραγμού, λόγω της αντοχής του στο όξινο γαστρικό υγρό και την παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων (ιδιαίτερα σε τιμές pH μεγαλύτερες από 3,5), και φτάνει στο δωδεκαδάκτυλο (Bennett και συν., 2020). Η ικανότητα του βακτηρίου να επιβιώνει σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και να παράγει υδρολάσες χολικών αλάτων το καθιστά ικανό να επιβιώνει στο δυσμενές περιβάλλον του λεπτού εντέρου (Becattini & Pamer, 2018). Ωστόσο, η φυσική ανοσία του οργανισμού με την παραγωγή βακτηριοκτόνων πεπτιδίων από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και το εντερικό μικροβίωμα, εμποδίζει την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό της *L. monocytogenes* στον ξενιστή (Becattini και συν., 2017). Για να αντιμετωπίσει τα παραπάνω εμπόδια, η *L. monocytogenes* είναι ικανή να παράξει βακτηριοσίνες όπως η λιστεριολυσίνη S και να διαταράξει το εντερικό μικροβίωμα, δημιουργώντας ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την επιβίωσή της κατά τη διάρκεια μιας λοίμωξης (Quereda και συν., 2016). Επιπλέον, σε περίπτωση εντερικής δυσβίωσης, λόγω της χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων ή λόγω συνυπαρχόντων νοσημάτων, η *L. monocytogenes* είναι δυνατό να εγκατασταθεί στο έντερο και να εισέλθει ενδοκυτταρικά στο εντερικό επιθήλιο (Bennett και συν., 2020).

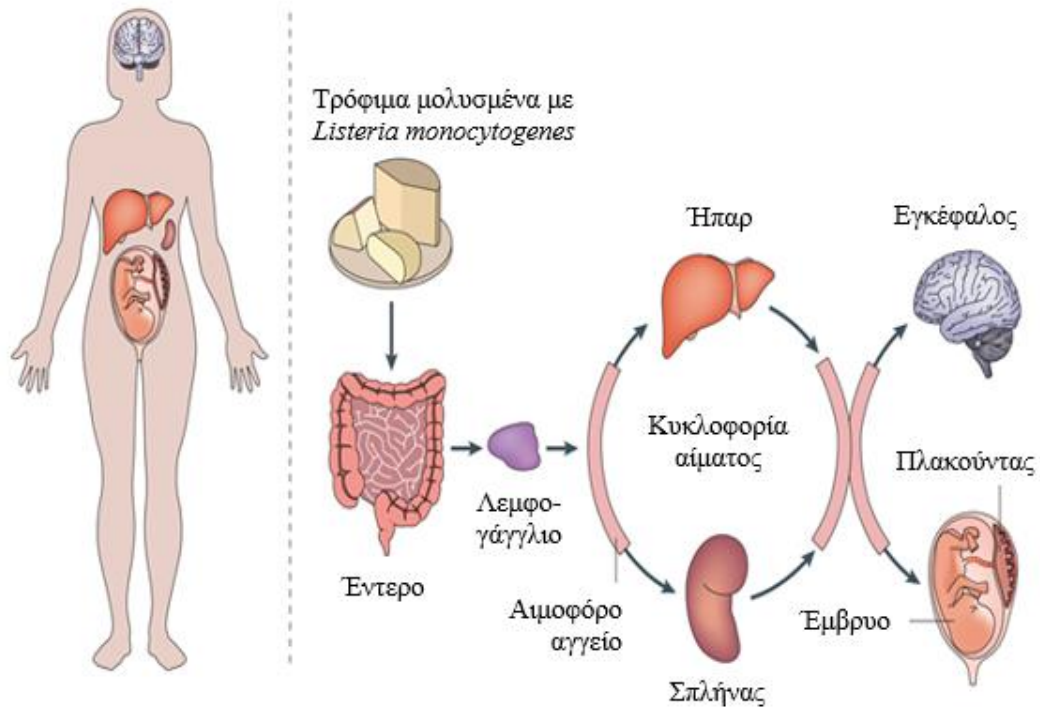
Στη συνέχεια, η *L. monocytogenes* προσκολλάται στα κύτταρα ξενιστές μέσω της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών που βρίσκονται στην επιφάνεια του βακτηρίου (ιντερναλίνη A, *inlA*, και ιντερναλίνη B, *inlB*) με τους υποδοχείς γλυκοπρωτεΐνης της επιφάνειας του κυττάρου ξενιστή (επιθηλιακή καδχερίνη, E-καδχερίνη, και Met) και εισέρχεται στα κύτταρα μέσω ενδοκυττάρωσης με μεσολάβηση υποδοχέα (receptor-mediated endocytosis) (Radoshevich & Cossart, 2018). Έρευνες με πειραματόζωα έχουν δείξει πως η λοίμωξη ξεκινά στα εντεροκύτταρα ή στα Μ κύτταρα που βρίσκονται στις πλάκες Peyer. Άλλες ιντερναλίνες (π.χ. *InlC*, *InlJ*) μπορούν να αναγνωρίσουν τους υποδοχείς σε ευρύτερο φάσμα κυττάρων του ξενιστή (Murray και συν., 2012). Μια άλλη σημαντική πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στη διείσδυση του βακτηρίου στα κύτταρα του ξενιστή και που έχει ικανότητα υδρόλυσης της πεπτιδογλυκάνης είναι η πρωτεΐνη p60, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *iap* και εκκρίνεται από το παθογόνο ή βρίσκεται στο κυτταρικό του τοίχωμα (Liu, 2008). Μετά τη διείσδυση στα κύτταρα, το όξινο pH του φαγολυσσοσώματος που περιβάλλει τα βακτήρια ενεργοποιεί μια βακτηριακή εξωτοξίνη (λιστεριολυσίνη O, LLO), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *hly*, και δύο διαφορετικές φωσφολιπάσες C (*PlcA* και *PlcB*), οδηγώντας στη δημιουργία πόρων, στη λύση του φαγολυσσοσώματος και στην απελευθέρωση των βακτηρίων στο κυτταρόπλασμα (Mostowy & Cossart, 2012). Τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται και στη συνέχεια μετακινούνται προς την κυτταρική μεμβράνη. Στην κίνηση αυτή μεσολαβεί μια βακτηριακή πρωτεΐνη, η ActA, η οποία εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια του ενός άκρου του βακτηρίου και συμβάλλει στην πρόσληψη ακτίνης από το κύτταρο ξενιστή (συσσώρευση της ακτίνης) (Bennett και συν., 2020). Τα άπω άκρα της ακτινικής ουράς παραμένουν σταθερά ενώ η συσσώρευση λαμβάνει χώρα παρακειμένως στο άκρο του βακτηρίου. Έτσι, σχηματίζεται μια προεκβολή που βοηθάει το βακτήριο να κινείται μέσα στο κυτταρόπλασμα και να προωθείται προς την κυτταρική μεμβράνη. Μόλις φτάσει στην

κυτταρική μεμβράνη του μολυσμένου κυττάρου, αποβάλλεται από αυτό και φαγοκυτταρώνεται από γειτονικό κύτταρο του ξενιστή (Murray και συν., 2012). Αφού το γειτονικό βακτήριο παραλάβει το βακτήριο, όλη η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται εκ νέου. Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη λύση της μεμβράνης, την ενδοκυττάρια αντιγραφή και την κατευθυνόμενη κίνηση είναι συσσωρευμένα και ρυθμιζόμενα από ένα μεμονωμένο γονίδιο, το *prfA* ή θετικό ρυθμιστικό παράγοντα (positive regulatory factor) (Bennett και συν., 2020).

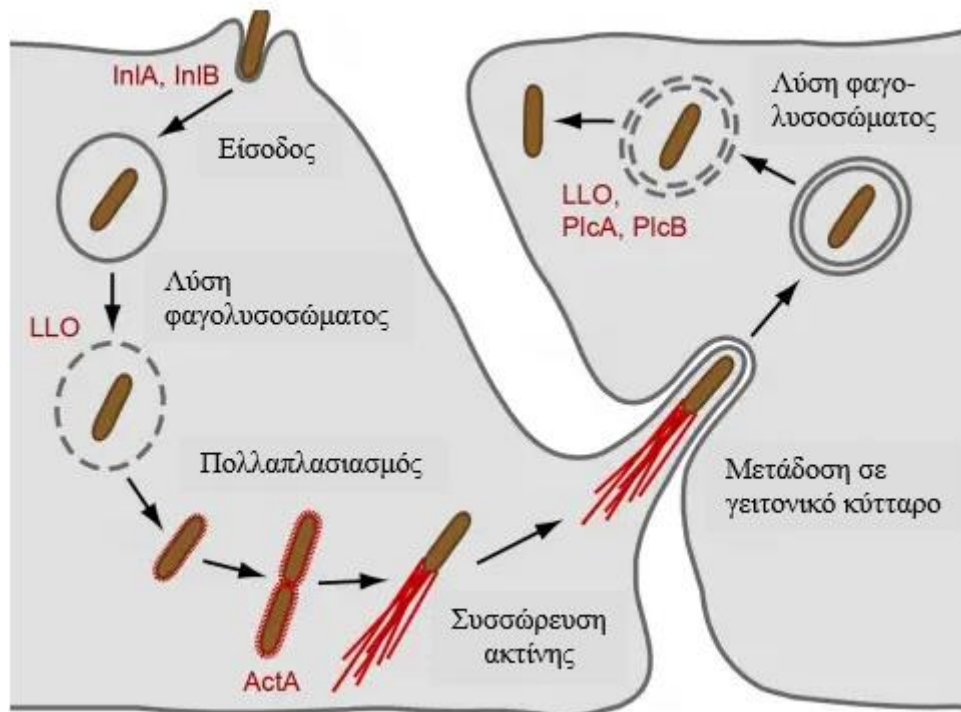
Μετά από τη διόδο από το εντερικό επιθήλιο, το βακτήριο εισέρχεται στα μακροφάγα και διαμέσου της λέμφου μεταφέρεται αρχικά στον σπλήνα και το ήπαρ και έπειτα αιματογενώς στα υπόλοιπα όργανα του σώματος, οδηγώντας σε διάσπαρτη νόσο (Radoshevich & Cossart, 2018). Τα σημαντικότερα όργανα που προσβάλλονται είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και ο πλακούντας (Εικόνα 1). Η είσοδος του βακτηρίου στο ΚΝΣ μπορεί να γίνει μέσω ενδοκυττάρωσης με μεσολάβηση υποδοχέα (ιντερναλίνη), νευρογενώς από περιφερειακούς νευρώνες σε κεντρικούς νευρώνες ή μέσω μολυσμένων μονοκυττάρων που εισέρχονται στο ΚΝΣ ως άλλος δούρειος ίππος (Radoshevich & Cossart, 2018). Η διαπλακουντιακή λοίμωξη λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω ενδοκυττάρωσης με μεσολάβηση υποδοχέα (ιντερναλίνη) και μεταφοράς της λοίμωξης από κύτταρο σε κύτταρο και λιγότερο συχνά μέσω διαμεσολαβούμενης φλεγμονής και αιματογενούς διασποράς (Bennett και συν., 2020).

Παρά το γεγονός πως η *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση και πως διαθέτει μια ευρεία ποικιλία παθογενετικών μηχανισμών, η λοίμωξη από το συγκεκριμένο βακτήριο είναι σχετικά σπάνια. Καταλυτικό ρόλο διαδραματίζει η κυτταρική ανοσία του οργανισμού (Pamer, 2004). Κατά την έξοδο της *L. monocytogenes* από το φαγόσωμα ενός μολυσμένου μακροφάγου, η λιστεριολυσίνη O που παράγεται από το βακτήριο ενεργοποιεί τουλάχιστον τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς ανοσιακής αντίδρασης. Ο πρώτος μηχανισμός πυροδοτεί την απόπτωση των μολυσμένων κυττάρων του ξενιστή (Witte και συν., 2012). Επιπλέον, τα μικροβιακά προϊόντα που απελευθερώνονται από τα μολυσμένα μακροφάγα προσελκύουν άλλα μακροφάγα και προωθούν τη διαφοροποίησή τους σε δένδριτικά κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν iNOS (inducible nitric oxide synthase) και TNF (tumor necrosis factor) που προκαλούν βακτηριακό θάνατο (Pamer, 2004). Τέλος, τα φυσικά φονικά κύτταρα παράγουν ιντερφερόνη-γ η οποία μαζί με τον TNF ενεργοποιούν περαιτέρω μακροφάγα που μαζί με τα ουδετερόφιλα, ως κύτταρα του αμυντικού συστήματος, θανατώνουν άμεσα τη *L. monocytogenes* (Bennett και συν., 2020).

Σε αντίθεση με την κυτταρική ανοσία, η χυμική ανοσία είναι σχετικώς ασήμαντη, καθώς δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων από *L. monocytogenes* (Murray και συν., 2012). Τα βακτήρια αυτά μπορούν να πολλαπλασιάζονται μέσα στα μακροφάγα και να μετακινούνται μέσα στα κύτταρα, αποφεύγοντας έτσι την κάθαρση μέσω αντισωμάτων. Για αυτό το λόγο, οι ασθενείς με ελαττωματική κυτταρική αλλά ακέραιη χυμική ανοσία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε σοβαρές λοιμώξεις λιστερίωσης (Zenewicz & Shen, 2007).



A



B

Εικόνα 1. Α) Σχηματική αναπαράσταση της μόλυνσης ανθρώπινου ξενιστή από *Listeria monocytogenes* [Radoshevich & Cossart (2018), με τροποποιήσεις]. Β) Ο ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής της *Listeria monocytogenes* [Pizarro-Cerdá και συν. (2012), με τροποποιήσεις].

A.2.3. Κλινική εικόνα

Η *L. monocytogenes* προκαλεί μια ευρεία ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων. Τα σημαντικότερα σύνδρομα που προκαλεί είναι η λιστερίωση των νεογνών, η λιστερίωση των εγκύων και η λιστερίωση των ενηλίκων.

- Λιστερίωση των νεογνών (νεογνική νόσος)

Έχουν περιγραφεί δύο μορφές νεογνικής νόσου: η νόσος πρώιμης έναρξης, όταν η μόλυνση γίνεται ενδομητρίως διαμέσου του πλακούντα, και η νόσος όψιμης έναρξης, όταν η μόλυνση γίνεται κατά τη διάρκεια του τοκετού ή λίγο μετά από αυτόν (Mylonakis και συν., 2002).

Στην νόσο πρώιμης έναρξης (1^η εβδομάδα), τα νεογνά είναι συμπτωματικά από τη γέννησή τους ή συνηθέστερα από τη 2^η ημέρα (Mylonakis και συν., 2002). Η λοίμωξη εκδηλώνεται με αναπνευστική δυσχέρεια, σηψαιμία (πυρετός, λήθαργος), μηνιγγίτιδα, δερματικές βλάβες (ίκτερος, κηλιδοβλατιδώδες ή βλατιδοφλυκταινώδες εξάνθημα, χρώση μυκόνιου) και το σύνδρομο granulomatosis infantiseptica (σηπτική κοκκιωματώδης νόσος του νεογνού) (Bennett και συν., 2020). Το σύνδρομο αυτό είναι μια πολύ σοβαρή μορφή λιστερίωσης που χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό διάσπαρτων αποστημάτων και κοκκιωμάτων σε πολλαπλά όργανα (ήπαρ, σπλήνα, επινεφρίδια, πνεύμονες κ.ά.) και από υψηλή θνητότητα, εκτός αν αντιμετωπιστεί άμεσα (Murray και συν., 2012). Η νόσος πρώιμης έναρξης συνδυάζεται με αποβολές, γέννηση θνησιγενών εμβρύων, πρόωρο τοκετό, χοριοαμνιονίτιδα και άλλες επιπλοκές (Lamont και συν., 2011).

Η νόσος όψιμης έναρξης εμφανίζεται συνήθως 5-14 ημέρες μετά τον τοκετό (έως και 3 εβδομάδες) (Mylonakis και συν., 2002). Τα νεογνίδια κατά τη γέννησή τους είναι υγιή, ενώ συνήθως γεννήθηκαν από ασυμπτωματικές μητέρες που δεν εμφάνισαν επιπλοκές κατά την εγκυμοσύνη. Το νεογνό μολύνεται καταπίνοντας μολυσμένο αμνιακό υγρό, κατά τη δίοδο από τη γεννητικό οδό της μητέρας, από άμεση επαφή με τη γαστρεντερική οδό της μητέρας ή ενδονοσοκομειακά (Lamont και συν., 2011). Η νόσος εκδηλώνεται με τη μορφή μηνιγγίτιδας ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδας με σηψαιμία. Τα κλινικά σημεία δεν είναι παθογνωμονικά και πρέπει να αποκλειστούν άλλα αίτια νεογνικής νόσου του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως η νόσος από στρεπτόκοκκο ομάδας B (Murray και συν., 2012). Οι επιπλοκές που εμφανίζονται μετά το πέρας της νόσου είναι αρκετά επιβαρυντικές, καθώς το 40% των νεογνών που επιβίωσαν της νόσου είναι πιθανό να εμφανίσουν νευρολογικές ή νευροεκφυλιστικές βλάβες (Bennett και συν., 2020).

- Λιστερίωση των εγκύων

Οι έγκυες γυναίκες έχουν 17 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εκδηλώσουν λιστερίωση (12 περιστατικά / 100000) συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό (0,7 περιστατικά / 100000) και περίπου 6 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να νοσήσουν συγκριτικά με τους ηλικιωμένους ηλικίας μεγαλύτερης των 70 ετών (2,1 περιστατικά / 100000) (Bennett και συν., 2020). Η μόλυνση μπορεί να γίνει οποτεδήποτε, αν και οι περισσότερες λοιμώξεις παρατηρούνται το 3^ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, λόγω της καταστολής της κυτταρικής ανοσίας που παρατηρείται εκείνη την περίοδο (Mylonakis και συν., 2002). Οι περισσότερες γυναίκες που εκδηλώνουν λιστερίωση είναι γενικώς υγιείς και δεν εμφανίζουν κάποιον προδιαθετικό παράγοντα. Τα συμπτώματα εμφανίζονται περίπου 23 μέρες μετά τη μόλυνση (0-67 ημέρες) και είναι ασαφή, με τον πυρετό να αποτελεί το πιο κοινό σύμπτωμα (Angelo και συν., 2016). Η λοίμωξη εκδηλώνεται με συμπτώματα ιογενούς συνδρομής (πυρετός, μυαλγίες, πονοκέφαλο, κακουχία που μπορεί να συνοδεύεται από διάρροια, εμέτους και κοιλιακό άλγος) (Charlier και συν., 2017). Ακολουθεί βακτηριαμία κατά την οποία το μικρόβιο μπορεί να μεταδοθεί μέσω του πλακούντα στο έμβρυο και να εκδηλωθούν και συμπτώματα μαιευτικής φύσεως, όπως συσπάσεις, μη φυσιολογικός καρδιακός ρυθμός του εμβρύου, χοριοαμνιονίτιδα, πρόωρος τοκετός, λοίμωξη του εμβρύου και αποβολή (Φωκάς & Φωκάς, 2017). Περίπου 20% των περιστατικών λιστερίωσης οδηγούν στη γέννηση θνησιγενούς εμβρύου ή σε αποβολή (Mylonakis και συν., 2002). Από τα υπόλοιπα περιστατικά που δεν κατέληξαν σε κάτι από τα παραπάνω, το 68% των νεογνών μολύνεται και εκδηλώνει λοίμωξη, ενώ το υπόλοιπο 32% δεν μολύνεται από το βακτήριο (Bennett και συν., 2020). Αξιοσημείωτο είναι πάντως πως για αδιευκρίνιστους λόγους η εκδήλωση μηνιγγίτιδας στις έγκυες γυναίκες είναι εξαιρετικά σπάνια, ακόμα και στην περίπτωση βακτηριαμίας (Mylonakis και συν., 2002).

- Λιστερίωση των ενηλίκων

Ανάλογα με την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος των ενηλίκων, η λιστερίωση εκδηλώνεται διαφορετικά στους υγιείς και στους ανοσοκατασταλμένους ενήλικες. Οι περισσότερες λοιμώξεις από *L. monocytogenes* στους υγιείς ενήλικες είναι ασυμπτωματικές ή έχουν τη μορφή ήπιας νόσου που μοιάζει με γρίπη, με ή χωρίς γαστρεντερίτιδα (Murray και συν., 2012). Αυτή η μορφή της νόσου εκδηλώνεται συνηθέστερα στα υγιή παιδιά και στους νεαρούς ενήλικες και κατά κανόνα αυτοπεριορίζεται. Τα συμπτώματα συνήθως διαρκούν 1-3 ημέρες, όμως μπορεί να επιμείνουν μέχρι και για 1 εβδομάδα. Τα πιο κοινά συμπτώματα είναι πυρετός, πονοκέφαλος, κόπωση, αρθραλγίες, ναυτία και μη αιματηρή διάρροια (Ooi & Lorber, 2005; Bennett και συν., 2020). Η περίοδος επώασης είναι μικρή, με τα συμπτώματα να εκδηλώνονται συνήθως εντός μιας ημέρας μετά την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου, αν και η περίοδος επώασης μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 10 ημέρες (Goulet και συν., 2013). Τα συμπτώματα είναι τις περισσότερες φορές ήπια, με πολύ χαμηλά ποσοστά θνητότητας, ωστόσο η νόσος σε ασθενείς με ελαττωματική κυτταρική ανοσία είναι πιο σοβαρή (Murray και συν., 2012). Επιπλέον, υπολογίζεται παροδική ασυμπτωματική φορεία και αποβολή του μικροοργανισμού στα κόπρανα στο 1-5% των ανθρώπων (Φωκάς & Φωκάς, 2017).

Στους ανοσοκατασταλμένους ενήλικες η λιστερίωση εκδηλώνεται με πρωτοπαθή βακτηριαιμία ή/και με μηνιγγοεγκεφαλίτιδα (νευρολιστερίωση). Όσον αφορά την πρωτοπαθή βακτηριαιμία, τα περισσότερα περιστατικά είναι σποραδικά (Cartwright και συν., 2013). Με εξαίρεση τις έγκυες γυναίκες, το 97% των ανθρώπων που εκδηλώνουν πρωτοπαθή βακτηριαιμία έχουν υποκείμενη ανοσοκαταστολή (Charlier και συν., 2017). Οι πιο συχνοί παράγοντες κινδύνου που ευνοούν την εκδήλωση της πρωτοπαθούς βακτηριαιμίας είναι κακοήθειες νεοπλασίες, κίρρωση ήπατος, νεφροπάθειες, σακχαρώδης διαβήτης, κορτιζονοθεραπεία, γιγαντοκυτταρική αρτηριίτιδα, μεταμόσχευση οργάνων, σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) και ηλικία μεγαλύτερη των 65 ετών (Fernández – Sabé και συν., 2009; Guevara και συν., 2009). Η επίπτωση της πρωτοπαθούς βακτηριαιμίας σε ηλικιωμένους ηλικίας μεγαλύτερης των 75 ετών είναι 20 φορές μεγαλύτερη (0,98 περιστατικά / 100000) από αυτή των ενηλίκων ηλικίας μικρότερης των 65 ετών (0,05 περιστατικά / 100000) (Goulet και συν., 2012). Οι ασθενείς με βακτηριαιμία έχουν συνήθως κλινικό ιστορικό με ρίγη και πυρετό (συνηθέστερα στις έγκυες γυναίκες) ή πιο οξεία κλινική εικόνα με υψηλό πυρετό, υπόταση και ταχυκαρδία (Murray και συν., 2012). Τα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως 5 ημέρες μετά τη μόλυνση (0-29 ημέρες) (Angelo και συν., 2016). Μόνο οι σοβαρά ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς και τα νεογνά εγκύων γυναικών με σήψη φαίνεται ότι διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο θανάτου, όπου η θνητότητα φτάνει μέχρι και το 46% (Bennett και συν., 2020).

Η νευρολιστερίωση είναι η δεύτερη πιο συχνή μορφή λοίμωξης από *L. monocytogenes* στους ανοσοκατασταλμένους ενήλικες, έπειτα από την πρωτοπαθή βακτηριαιμία. Προσβάλλεται κυρίως το ΚΝΣ (μηνιγγίτιδα, λοίμωξη εγκεφαλικού παρεγχύματος, παρεγκεφαλίτιδα, αποστήματα κ.ά.), με την μηνιγγοεγκεφαλίτιδα να αποτελεί την πιο κοινή μορφή εκδήλωσης (Φωκάς & Φωκάς, 2017). Αν και οι παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση νευρολιστερίωσης είναι οι ίδιοι με αυτούς της πρωτοπαθούς βακτηριαιμίας, 14-37% των ενηλίκων εμφανίζουν νευρολιστερίωση χωρίς να έχουν κάποιο υποκείμενο παράγοντα (Maertens De Noordhout και συν., 2016). Αυτό μπορεί να σχετίζεται με μια γενετική ευαισθησία αυτού του ποσοστού των ενηλίκων ή με έκθεση σε υψηλή μολύνουσα δόση. Αν και τα κλινικά σημεία της νευρολιστερίωσης δεν είναι ειδικά, πρέπει πάντοτε να τίθεται υποψία λιστερίωσης σε ασθενείς με μεταμοσχεύσεις οργάνων, με καρκίνο ή σε έγκυες γυναίκες, καθώς η *L. monocytogenes* συγκαταλέγεται στους τρεις πιο κοινούς παθογόνους μικροοργανισμούς παγκοσμίως που προκαλούν λοίμωξη του ΚΝΣ σε αυτές τις ομάδες ατόμων. Είναι χαρακτηριστικό πως το 20% των μηνιγγοεγκεφαλίτιδων σε άτομα ηλικίας μεγαλύτερης των 50 ετών οφείλεται σε *L. monocytogenes* (Amaya-Villar και συν., 2010; Bennett και συν., 2020). Η μέση περίοδος επώασης είναι 10 μέρες (0-3 εβδομάδες) (Angelo και συν., 2016). Το πιο συχνό σύμπτωμα είναι ο πυρετός, ακολουθούμενος από διαταραχές συνείδησης και πονοκέφαλο (Brouwer και συν., 2006). Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν επιληπτικές κρίσεις, κρανιακές νευροπάθειες ή άλλες μονονευροπάθειες και πολυνευροπάθειες, ενώ μέχρι και τα 2/3 των ασθενών εμφανίζουν αυχενική δυσκαμψία (Charlier και συν., 2017). Το ποσοστό θνητότητας είναι της τάξεως του 30%, με τους ενήλικες που δεν έχουν κάποιον παράγοντα κινδύνου να εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά θνητότητας από αυτούς που έχουν υποκείμενα νοσήματα (Bennett και συν., 2020). Από τους ασθενείς που επιβιώνουν, το 40% αναρρώνει πλήρως και το 45% εμφανίζει εμμένουσες νευρολογικές διαταραχές, όπως διαταραχές κινήσεων των άκρων, συμπτώματα εγκεφαλικού συνδρόμου και παράλυση του 8^{ου} κρανιακού νεύρου. Οι εμμένουσες νευρολογικές διαταραχές

εμφανίζονται κυρίως στους ασθενείς που εκδήλωσαν σοβαρή εγκεφαλίτιδα κατά τη νευρολιστερίωση (Charlier και συν., 2017).

- Άλλα σύνδρομα λιστερίωσης

Εκτός από τα παραπάνω σύνδρομα, έχουν περιγραφεί και άλλα σπανιότερα σύνδρομα λιστερίωσης, όπως η δερματική λιστερίωση. Το συγκεκριμένο σύνδρομο εκδηλώνεται συνήθως σε υγιή άτομα που έρχονται σε επαφή με παραγωγικά ζώα, όπως κτηνοτρόφοι και κτηνίατροι παραγωγικών ζώων. Η μόλυνση των ατόμων αυτών γίνεται με άμεση επαφή με μια μολυσματική πηγή, κυρίως σε περιπτώσεις αποβολών των ζώων (Godshall και συν., 2013). Ένα βλατιδοφλυκταινώδες εξάνθημα εμφανίζεται στο σημείο ενοφθαλμισμού 1-7 ημέρες μετά την έκθεση, ενώ σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις το εξάνθημα συνοδεύεται και με πυρετό. Τα χέρια είναι το συνηθέστερο σημείο του σώματος όπου εμφανίζονται τα συμπτώματα. Τις περισσότερες φορές τα συμπτώματα αυτοπεριορίζονται, ενώ σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να χρειαστεί θεραπεία με αντιβιοτικά για την πλήρη υποχώρηση των συμπτωμάτων (Bennett και συν., 2020).

Η *L. monocytogenes* προκαλεί επίσης ποικίλες εστιακές λοιμώξεις, όπως ενδοκαρδίτιδα, ενδοαγγειακές λοιμώξεις, σηπτική αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα, περιτονίτιδα, λεμφαδενίτιδα, ουρολοιμώξεις, πνευμονία, πλευρίτιδα, ενδοφθαλμίτιδα, ενδοκοιλιακά αποστήματα και χολοκυστίτιδα. Η διασπορά του μικροοργανισμού σε αυτές τις εστίες γίνεται αιματογενώς και αφορά κυρίως ανοσοκατασταλμένα άτομα. Παρόλα αυτά, σπάνια έχουν αναφερθεί υποτροπές της νόσου λόγω ανεπαρκούς αντιμετώπισης της αρχικής λοίμωξης ή λόγω επαναμόλυνσης (Charlier και συν., 2017; Bennett και συν., 2020).

A.2.4. Διάγνωση

Στη διάγνωση της λιστερίωσης συμβάλλουν το ιστορικό, η κλινική εικόνα και τα εργαστηριακά ευρήματα. Υποψία για λιστερίωση θα πρέπει να τίθεται στις ακόλουθες περιπτώσεις: αναπνευστική δυσχέρεια, σήψη ή μηνιγγίτιδα στα νεογνά, μηνιγγίτιδα ή εγκεφαλίτιδα σε ενήλικες ηλικίας μεγαλύτερης των 50 ετών ή ενήλικες που έχουν αιματολογικές κακοήθειες, νεοπλασίες, μεταμόσχευση οργάνου, AIDS ή ενήλικες που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική θεραπεία (χημειοθεραπεία, ανοσοκατασταλτικά, κορτιζόνη), ταυτόχρονη εμφάνιση μηνιγγίτιδας και εγκεφαλίτιδας, υποφλοιώδης εγκεφαλοπάθεια, πυρετός κατά την εγκυμοσύνη και ιδιαίτερα στο τρίτο τρίμηνο, καθώς και εμπύρετη γαστρεντερίτιδα (διάρροια χωρίς αίμα) με αρνητική καλλιέργεια κοπράνων (Bennett και συν., 2020). Οι ασθενείς εμφανίζουν συνήθως πυρετό και λευκοκυττάρωση με κυριαρχία των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων. Σε μη περιγεννητικές περιπτώσεις, περίπου το 80% των ασθενών (79-84%) εμφανίζουν λεμφοπενία, γεγονός όμως που είναι σπάνιο στις περιγεννητικές περιπτώσεις. Παρά το όνομα του μικροοργανισμού, στη λιστερίωση σπάνια παρατηρείται μονοκυττάρωση (Charlier και συν., 2017).

Η εργαστηριακή διάγνωση της λιστερίωσης γίνεται με την απομόνωση του μικροοργανισμού στο αίμα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), το αμνιακό υγρό, τον πλακούντα, τον εμβρυικό ιστό, το υδατοειδές υγρό και το υαλοειδές σώμα. Επιπλέον, η απομόνωσή του από περιφερειακές εστίες, όπως από κοιλιακό υγρό, κόπρανα, τράχηλο μήτρας και υλικό δερματικής βλάβης στους ενήλικες ή από γαστρική αναρρόφηση, αυτή, πρωκτό και φάρυγγα σε νεογνά, μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση της λιστερίωσης (Charlier και συν., 2017). Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού γίνεται σε αιματούχο άγαρ ή άλλα εκλεκτικά υποστρώματα, με ή χωρίς κρυσταλλοπλουτισμό (Murray και συν., 2012). Ωστόσο, η απομόνωση του βακτηρίου στα κόπρανα, το κοιλιακό υγρό, τα ούρα και υλικό πληγών δεν είναι πάντοτε αποδεικτική λοίμωξης, λόγω της ασυμπτωματικής φορείας (Φωκάς & Φωκάς, 2017). Σε αυτήν την περίπτωση συστήνεται η συνεκτίμηση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων με τα ευρήματα της κλινικής εξέτασης. Οι καλλιέργειες μπορεί να βγαίνουν αρνητικές, όταν πριν τη λήψη δείγματος έχει προηγηθεί εμπειρική αντιμικροβιακή θεραπεία (Φωκάς & Φωκάς, 2017). Οι μοριακές εξετάσεις, όπως η PCR, είναι γρηγορότερες και περισσότερο ευαίσθητες και ειδικές από την καλλιέργεια, για αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επιβεβαίωση σε περιπτώσεις όπου η καλλιέργεια βγαίνει αρνητική αλλά η κλινική εικόνα συνάδει έντονα με λιστερίωση (Bennett και συν., 2020).

Η νευρολιστερίωση μπορεί να διαγνωστεί με θετική καλλιέργεια αίματος και νευρολογικά συμπτώματα που χαρακτηρίζουν την μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα (Bennett και συν., 2020). Στα παρασκευάσματα χρώσης Gram του ENY είναι δύσκολο να παρατηρηθεί η *L. monocytogenes*, επειδή το παθογόνο είναι παρόν σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από το όριο ανίχνευσης ($<10^4$ cfu/mL ENY). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα περισσότερα άλλα βακτηριακά παθογόνα του ΚΝΣ, τα οποία είναι παρόντα σε εκατονταπλάσιες έως και χιλιαπλάσιες συγκεντρώσεις (Murray και συν., 2012). Αν με την Gram χρώση παρατηρηθούν μικροοργανισμοί, πρόκειται για ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια κοκκοβακτηρίδια και για αυτό πρέπει να δοθεί προσοχή να διαφοροποιηθεί από άλλα βακτήρια, όπως τα *Corynebacterium* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus* spp. και *Enterococcus* spp (Φωκάς & Φωκάς, 2017).

A.2.5. Θεραπεία

Σε περίπτωση τοπικών φλεγμονών ή οξείας εμπύρετης γαστρεντερίτιδας, οι λοιμώξεις συνήθως αυτοπεριορίζονται και σπάνια απαιτείται θεραπεία (Olsen και συν., 2005). Σε περίπτωση όμως που η λοίμωξη είναι σοβαρή, η θεραπεία με αντιβιοτικά κρίνεται απαραίτητη. Λόγω του ότι τα περισσότερα αντιβιοτικά είναι βακτηριοστατικά για τη *L. monocytogenes*, ο συνδυασμός πενικιλίνης ή αμπικιλίνης με γενταμυκίνη είναι η θεραπεία εκλογής (Thønnings και συν., 2016). Ειδικά στις έγκυες γυναίκες, ακόμα και στην περίπτωση της εμπύρετης γαστρεντερίτιδας, συστήνεται η θεραπεία με πενικιλίνη ή αμπικιλίνη (Bennett και συν., 2020). Εναλλακτικά αντιβιοτικά που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν είναι ο συνδυασμός τριμεθοπρίμης - σουλφαμεθοξαζόλης, ο συνδυασμός πιπερακιλλίνης - ταξοβακτάμης και η μεροπενέμη (Arslan και συν., 2015).

Ο συνδυασμός τριμεθοπρίμης - σουλφαμεθοξαζόλης πρέπει να αποφεύγεται στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, καθώς συνδέεται με βλάβες στον νευρικό σωλήνα και το καρδιαγγειακό σύστημα του εμβρύου (Bennett και συν., 2020). Οι κεφαλοσπορίνες πρέπει να αποφεύγονται, καθώς το βακτήριο εμφανίζει φυσική αντίσταση σε αυτές (Φωκάς & Φωκάς, 2017). Αυξημένα ποσοστά αντοχής κλινικών στελεχών έχουν επίσης παρατηρηθεί στην κλινδαμυκίνη και τα μακρολίδια (Murray και συν., 2012). Η θεραπεία πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 2 εβδομάδες, ενώ στην περίπτωση σοβαρών λοιμώξεων και στους ανοσοκατασταλμένους η θεραπεία μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 8 εβδομάδες (Arslan και συν., 2015).

A.2.6. Πρόληψη

Η ευρεία διάδοση της *L. monocytogenes* και η σποραδικότητα των λοιμώξεων καθιστούν την πρόληψη της λιστερίωσης ιδιαίτερα δύσκολη. Δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο για την *L. monocytogenes* (Murray και συν., 2012). Επομένως, για την πρόληψη της λιστερίωσης απαιτείται μια πολύπλευρη προσέγγιση που περιλαμβάνει προληπτικά μέτρα, από τη βιομηχανία τροφίμων μέχρι και το τραπέζι των καταναλωτών (Ray & Bhunia, 2008).

Η πρόληψη στη βιομηχανία τροφίμων περιλαμβάνει τους αυτοελέγχους που ενεργεί η ίδια η επιχείρηση και τους επίσημους ελέγχους. Η επιχείρηση, στα πλαίσια των συστημάτων διασφάλισης της ασφάλειας των τροφίμων (HACCP), οφείλει να αξιολογεί την επικινδυνότητα επιμόλυνσης των τροφίμων που παράγει με *L. monocytogenes* και να υιοθετεί προληπτικά μέτρα ή και διορθωτικές ενέργειες, σε περίπτωση υπέρβασης των κρίσιμων ορίων στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (Κανονισμός 853/2004). Επιπλέον, οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων οφείλουν να αποδεικνύουν αν τα προϊόντα που παράγουν, υποστηρίζουν ή όχι τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου (Κανονισμός 2073/2005). Η διεξαγωγή δοκιμών προσομοίωσης (challenge tests) αποτελεί έναν από τους τρόπους με τους οποίους παρέχονται δεδομένα σχετικά με τη συμπεριφορά του βακτηρίου στο προς εξέταση τρόφιμο. Εναλλακτικά, μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης της συμπεριφοράς του βακτηρίου, σε συνάρτηση με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τροφίμου και της θερμοκρασίας συντήρησής του, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν (Μάντης και συν., 2015). Προκειμένου να επαληθευτεί η αποτελεσματικότητα των αυτοελέγχων των επιχειρήσεων, οι αρμόδιες αρχές εκτελούν επίσημους ελέγχους στην επιχείρηση. Στα πλαίσια αυτών, γίνονται μεταξύ άλλων δειγματοληψίες τροφίμων και εργαστηριακή ανάλυσή τους, προκειμένου να διαπιστωθεί αν πληρούνται οι απαιτήσεις της νομοθεσίας (Κανονισμός 2017/625). Σύμφωνα με τα κριτήρια ασφάλειας του Κανονισμού (ΕΚ) 2073/2005, απαιτείται απουσία του παθογόνου σε 25g τροφίμου (n=10, c=0) σε τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς. Σε τρόφιμα ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του βακτηρίου που δεν προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς, απαιτείται απουσία του παθογόνου σε 25g τροφίμου (n=5, c=0) πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης τροφίμων, ενώ σε τρόφιμα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους, οι πληθυσμοί του παθογόνου δεν μπορούν να ξεπερνούν τα 100 cfu/g. Τέλος, σε τρόφιμα μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* που

δεν προορίζονται για βρέφη και ειδικούς ιατρικούς σκοπούς, οι πληθυσμοί του παθογόνου δεν πρέπει να ξεπερνούν τα 100 cfu/g ($n=5$, $c=0$) κατά τη διάρκεια διατήρησής τους στην αγορά. Ως τρόφιμα που δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη του βακτηρίου χαρακτηρίζονται αυτά με $pH \leq 4,4$ ή $a_w \leq 0,92$, τα τρόφιμα με $pH \leq 5,0$ και $a_w \leq 0,94$, τα τρόφιμα με διάρκεια διατήρησης μικρότερη από πέντε ημέρες ή τρόφιμα που δεν ανήκουν στις παραπάνω κατηγορίες, αλλά αποδεικνύεται επιστημονικά πως δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* (Κανονισμός 2073/2005).

Πέρα από την πρόληψη στη βιομηχανία τροφίμων, εξίσου σημαντικά είναι και τα προληπτικά μέτρα που πρέπει να λαμβάνονται σε επίπεδο καταναλωτών. Κρίνεται καθοριστικής σημασίας η εκπαίδευση των καταναλωτών ως προς βασικά μέτρα υγιεινής, με σκοπό τη μείωση της επίπτωσης των τροφιμογενών νοσημάτων (Silk και συν., 2012). Παραδείγματα τέτοιων μέτρων υγιεινής αποτελούν τα εξής: σχολαστικό μαγείρεμα νοπών προϊόντων ζωικής προέλευσης, καλό πλύσιμο των φρούτων και των λαχανικών πριν την κατανάλωση, διαχωρισμός των μαγειρεμένων ή έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων από τα ωμά, αποφυγή κατανάλωσης απαστερίωτου γάλακτος ή προϊόντων από απαστερίωτο γάλα και σχολαστικό πλύσιμο των χεριών και του εξοπλισμού πριν και μετά τον χειρισμό νοπών τροφίμων (Ray & Bhunia, 2008; Bennett και συν., 2020). Για τις ομάδες υψηλού κινδύνου προτείνονται επιπλέον μέτρα, όπως αποφυγή κατανάλωσης μαλακών τυριών (π.χ. φέτα, μπρι, καμαμπέρ, μπλε τυριά, αλοιφώδη τυριά και τυριά cottage), επαναθέρμανση έτοιμων προς κατανάλωση ή υπολειμμάτων τροφίμων που συντηρήθηκαν υπό ψύξη πριν την κατανάλωσή τους, αποφυγή κατανάλωσης καπνιστών ψαριών και αποφυγή κατανάλωσης προϊόντων από ντελικάτσεν (Ray & Bhunia, 2008; Bennett και συν., 2020).

A.3. *Listeria monocytogenes* και ενιαία υγεία

A.3.1. *L. monocytogenes* και ζώα

Πέρα από τον άνθρωπο, η *L. monocytogenes* απομονώνεται πολύ συχνά και από τα ζώα. Τα ζώα προσλαμβάνουν το βακτήριο από μολυσμένη ζωοτροφή (κυρίως ενσίρωμα) και μολυσμένο νερό. Η *L. monocytogenes* είναι ικανή να προκαλέσει νόσο τόσο στα κατοικίδια όσο και στα άγρια ζώα που μολύνονται από το βακτήριο. Τα μολυσμένα ζώα με τη σειρά τους διασπείρουν τον μικροοργανισμό στο περιβάλλον και συμβάλλουν έτσι στη συνέχιση της μόλυνσης περιβάλλοντος και ζώων (Liu, 2008).

Η λιστερίωση στα ζώα εκδηλώνεται με δύο κύριες μορφές, τη νευρική και τη σηψαιμική. Η νευρική μορφή του νοσήματος, που εκδηλώνεται κυρίως με τη μορφή εγκεφαλίτιδας ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδας, είναι η πιο συχνή στα μηρυκαστικά (Wesley, 2007). Οι αίγες είναι περισσότερο ευαίσθητες από τα πρόβατα και τα βοοειδή, ενώ όλες οι ηλικίες θεωρούνται ευπαθείς (Liu, 2008). Στη νευρική μορφή, η είσοδος του μικροοργανισμού γίνεται κυρίως από το φάρυγγα. Στη συνέχεια, η λοίμωξη επεκτείνεται κατά μήκος του τρίδυμου ή/και του προσωπικού νεύρου, τα οποία και παραλύουν, με κατεύθυνση το κεντρικό νευρικό σύστημα (Wesley, 2007). Εκτός από τα γενικά συμπτώματα, τα πιο χαρακτηριστικά νευρικά συμπτώματα που παρατηρούνται είναι οι κινήσεις ποδηλατιστή και η σιαλόρροια, ενώ παρατηρείται και διαυγές ρινικό έκκριμα (Bagatella και συν., 2022). Όσον αφορά τη σηψαιμική μορφή, αυτή παρατηρείται κυρίως σε ζώα νεαρής ηλικίας. Η βασική θύρα εισόδου του μικροοργανισμού είναι το πεπτικό και το αναπνευστικό σύστημα, το δέρμα και οι βλεννογόνοι (Liu, 2008). Από το σημείο εισόδου, το βακτήριο παραλαμβάνεται από τα φαγοκύτταρα μέσα στα οποία επιζεί και μεταφέρεται στον υπόλοιπο οργανισμό, προκαλώντας σηψαιμία. Αποτέλεσμα είναι η ανεύρεση πολλαπλών εστιών νέκρωσης κυρίως στο ήπαρ και τον σπλήνα, αλλά και σε άλλα εσωτερικά όργανα (Schlech, 2019). Επιπλέον, από το σημείο εισόδου μπορεί να μεταφερθεί και στον πλακούντα με αποτέλεσμα τις αποβολές, συνήθως στο τελευταίο στάδιο της κυοφορίας. Το αποβληθέν έμβρυο παρουσιάζει αυτόλυση ενώ στο ήπαρ εντοπίζονται νεκρωτικές εστίες (Bagatella και συν., 2022). Άλλες μορφές λιστερίωσης περιλαμβάνουν την κερατοεπιπεφυκίτιδα και οφθαλμίτιδα, ενώ συχνή είναι η παρουσία του παθογόνου στο γάλα λόγω πρόκλησης μαστίτιδας (Winter και συν., 2004; Wesley, 2007). Όλες οι παραπάνω μορφές της λιστερίωσης έχουν περιγραφεί σε διάφορα είδη παραγωγικών ζώων και ζώων συντροφιάς, όπως τα βοοειδή, τα πρόβατα, οι αίγες, οι χοίροι, τα ιπποειδή, οι σκύλοι, οι γάτες και τα πτηνά (Liu, 2008). Στα οικόσιτα πτηνά (ορνίθια και γαλοπούλες) εκδηλώνεται κυρίως με τη σηψαιμική μορφή, όπου παρατηρείται εκφύλιση του μυοκαρδίου και νεκρωτικές εστίες στο ήπαρ, ενώ στα κρεοπαραγωγά ορνίθια έχει αναφερθεί και η νευρική μορφή (Kurazono και συν., 2003). Στα άγρια ζώα, όπως τα άγρια πτηνά και τα τρωκτικά, εκδηλώνεται κυρίως με την σηψαιμική μορφή (Wesley, 2007). Τέλος, εκτός από τη *L. monocytogenes*, και η *L. ivanovii* προκαλεί σηψαιμία, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, εντερίτιδα και αποβολές κυρίως στα πρόβατα, τις αίγες και τα βοοειδή (Bagatella και συν., 2022).

Τα μολυσμένα ζώα διασπείρουν τον μικροοργανισμό σε μεγάλες ποσότητες στο περιβάλλον. Η *L. monocytogenes* απεκκρίνεται στο περιβάλλον με το ρινικό έκκριμα, το γάλα, τα κόπρανα και τα λόγια των μολυσμένων ζώων και μολύνει το έδαφος, τα φυτά και το νερό, από τα οποία μολύνονται άλλα ζώα (Bagatella και συν., 2022). Εκτός από τα μολυσμένα ζώα, πηγή μόλυνσης και διασποράς στο περιβάλλον αποτελούν και οι ασυμπτωματικοί φορείς, με υγιή βοοειδή, μικρά μηρυκαστικά, χοίροι, ιπποειδή, κρεοπαραγωγά ορνίθια, σκύλοι και γάτες να απεκκρίνουν τον μικροοργανισμό με τα κόπρανά τους. Ο επιπολασμός της *L. monocytogenes* σε κόπρανα υγιών ζώων είναι της τάξεως του 0,3-46% (Schoder και συν., 2022). Το φαινόμενο της διασποράς του μικροοργανισμού από ασυμπτωματικούς φορείς παρατηρείται έντονα και στα άγρια ζώα. Η *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί από κόπρανα ασυμπτωματικών άγριων πτηνών, τρωκτικών, μη οικόσιτων μηρυκαστικών (π.χ. ελάφια) και μονογαστρικών ζώων (π.χ. αγριόχοιροι, αρκούδες), με ποσοστά επιπολασμού παρόμοια με εκείνα των υγιών οικόσιτων ζώων (Schoder και συν., 2022). Επιπλέον, πολλά εξωπαράσιτα, όπως αυτά της οικογένειας Ixodidae και της τάξης των δίπτερων, μπορούν να φιλοξενήσουν το μικροοργανισμό, να τον μεταφέρουν στα ζώα και να τον διασπείρουν στο περιβάλλον (Kulesh και συν., 2022). Η κυριότερη δεξαμενή του μικροοργανισμού στη φύση είναι τα τρωκτικά (Liu, 2008). Τα τρωκτικά εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας από τη λιστερίωση και μπορούν να μεταδώσουν τον παθογόνο μικροοργανισμό μέσω των κοπράνων τους σε άλλα ζώα (Wang και συν., 2017; Adeshina & Emikpe, 2020). Τα ποσοστά απομόνωσης του μικροοργανισμού από τα τρωκτικά είναι ακόμα μεγαλύτερα, όταν αυτά βρίσκονται σε εγγύτητα με μηρυκαστικά ζώα (Wang και συν., 2017).

A.3.2. *L. monocytogenes* και περιβάλλον

Η *L. monocytogenes* είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη φύση, καθώς απομονώνεται από μια ποικιλία ενδιαιτημάτων, όπως χερσαία, υδάτινα οικοσυστήματα και βλάστηση. Το βακτήριο επιστρέφει στο περιβάλλον μέσω των περιττωμάτων ασθενών ή υγιών ανθρώπων και ζώων και από εκεί μπορεί να μολύνει και πάλι τα ζώα και τους ανθρώπους. Η *L. monocytogenes* έχει αναπτύξει μια ποικιλία μηχανισμών που την επιτρέπουν να επιβιώνει ακόμα και στις πιο αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως σε εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων, καθιστώντας έτσι το περιβάλλον τη μεγαλύτερη δεξαμενή του βακτηρίου (Liu, 2008).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναφέρει την απομόνωση στελεχών *L. monocytogenes* από το νερό, το έδαφος και τα φυτά. Το βακτήριο έχει απομονωθεί τόσο από γλυκό όσο και από αλμυρό νερό (Economidou και συν., 2013). Ανεύρεται συχνότερα σε ποτάμια, λίμνες, λύματα και θαλασσινό νερό κλειστών κόλπων (Milillo και συν., 2012). Ωστόσο, το βακτήριο απομονώνεται σπάνια από υπόγεια νερά, πηγές και μη ρυπασμένο θαλασσινό νερό (Schaffter & Parriaux, 2002). Ο επιπολασμός του βακτηρίου στο νερό αυξάνεται σε περίπτωση που αναπτύσσεται ζωική ή ανθρώπινη δραστηριότητα κοντά σε αυτό, καθώς το ρυπασμένο νερό και τα λύματα από αυτές τις δραστηριότητες παρέχουν θρεπτικό υλικό

για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Hansen και συν., 2006; Economou και συν., 2013). Επιπλέον, το παθογόνο βακτήριο έχει απομονωθεί και από διάφορα χειρσαία οικοσυστήματα, όπως χωράφια με αγρωστώδη, μηδική και δημητριακά, από καλλιεργημένα και ακαλλιεργήτα εδάφη, λειμώνες και δάση (Sauders & Wiedmann, 2007). Οι συχνότεροι ορότυποι που απομονώνονται στο έδαφος είναι ο 1/2b, 4b και 1/2a, ενώ η απομόνωσή τους εξαρτάται από το είδος του χειρσαίου οικοσυστήματος όπου ανευρίσκονται (Liu, 2008). Η *L. monocytogenes*, καθώς και άλλα βακτήρια του γένους *Listeria* spp. που απομονώνονται από το έδαφος, όπως η *L. innocua*, ζούνε σε αυτό ως σαπροφυτικοί μικροοργανισμοί (Moshtaghi και συν., 2003). Μελέτες έδειξαν πως στελέχη *Listeria* spp. απομονώνονται από το έδαφος κατά μέσο όρο σε ποσοστό 20% (Liu, 2008). Από εκεί, το βακτήριο είναι δυνατό να μεταδοθεί και στα φυτά. Μάλιστα, τα περισσότερα φυτά που αναπτύχθηκαν σε έδαφος μολυσμένο με *L. monocytogenes* ήταν φορείς του μικροοργανισμού και συνέχισαν να παραμένουν φορείς του μέχρι και 3 μήνες αργότερα (Matthews και συν., 2021). Επιπλέον, το βακτήριο είναι δυνατό να απομονωθεί και σε ενσιρωμένες ζωοτροφές, καθώς μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε αυτές παρά το χαμηλό pH που εμφανίζουν (Sauders & Wiedmann, 2007). Η αποσύνθεση του φυτικού ιστού συμβάλλει στην παρουσία του βακτηρίου στο έδαφος, καθώς παρέχει τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την επιβίωση του βακτηρίου στο έδαφος (Matthews και συν., 2021).

Εκτός από τα φυσικά οικοσυστήματα, η *L. monocytogenes* είναι δυνατό να επιβιώσει και στο περιβάλλον των εργοστασίων επεξεργασίας τροφίμων. Το βακτήριο εισέρχεται στη βιομηχανία μέσω των οχημάτων και των ανθρώπων που φέρουν τον μικροοργανισμό στα υποδήματα και τα ρούχα τους. Επιπλέον, το βακτήριο μπορεί να εισαχθεί στο εργοστάσιο μέσω μολυσμένου ζωικού ή φυτικού ιστού, καθώς και μέσω κοπράνων ή μολυσμένου δέρματος από φορείς ανθρώπους και ζώα (Matthews και συν., 2021). Μετά την είσοδό του στη βιομηχανία, το βακτήριο εντοπίζεται σε πολυάριθμα σημεία, όπως δάπεδα, σιφόνια αποχέτευσης, στάσιμο νερό, λύματα, επιφάνειες και εξοπλισμό (Liu, 2008; Matthews και συν., 2021). Τα υψηλά επίπεδα υγρασίας και θρεπτικών ουσιών ευνοούν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο περιβάλλον της βιομηχανίας τροφίμων (Milillo και συν., 2012). Οι συχνότεροι ορότυποι που απομονώνονται από το περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων είναι οι 1/2a, 1/2b και 1/2c (Autio και συν., 2002). Για να αντιμετωπίσει τις δυσμενείς συνθήκες που μπορεί να παρατηρηθούν στο περιβάλλον, το βακτήριο είναι ικανό να σχηματίσει ιδιαίτερα ανθεκτικά βιοϋμένια. Τα βιοϋμένια δημιουργούνται κυρίως σε επιφάνειες που είναι δύσκολα προσβάσιμες, όπως επιφάνειες με φυσικές οπές, ρωγμές ή σπασίματα (Colagiorgi και συν., 2017). Αυτές οι περιοχές είναι δύσκολο να καθαριστούν και έτσι καθιστούν τα μέτρα υγιεινής αναποτελεσματικά ως προς την αντιμετώπιση του μικροοργανισμού. Για αυτό το λόγο η εκκρίωση του μικροοργανισμού από το περιβάλλον της βιομηχανίας τροφίμων είναι πρακτικά αδύνατη (Jordan και συν., 2018). Επιπλέον, το παθογόνο ανιχνεύεται συχνά και σε πρώτες ύλες που χρησιμοποιεί η βιομηχανία, με αποτέλεσμα νέοι πληθυσμοί του βακτηρίου να εισέρχονται συνεχώς στις επιχειρήσεις (Matthews και συν., 2021). Έτσι, η *L. monocytogenes* έχει πάρα πολλές ευκαιρίες να επαναμολύνει το περιβάλλον μιας βιομηχανίας τροφίμων η οποία προηγουμένως την είχε εξαλείψει.

A.3.3. *L. monocytogenes* και τρόφιμα

Η *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί από μεγάλη ποικιλία τροφίμων. Η μόλυνση των τροφίμων με το βακτήριο γίνεται από τους ανθρώπους που χειρίζονται τα τρόφιμα, αλλά κυριότερα από το περιβάλλον των βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων. Τα τρόφιμα αποτελούν την κυριότερη οδό μόλυνσης του ανθρώπου με το βακτήριο. Τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης έχουν εμπλακεί περισσότερο στην έξαρση τροφιμογενών κρουσμάτων στον άνθρωπο (Liu, 2008; Matthews και συν., 2021).

Το κρέας αποτελεί από τις σημαντικότερες κατηγορίες τροφίμων που απομονώνεται η *L. monocytogenes*. Η ανάπτυξη του παθογόνου στο κρέας εξαρτάται από το είδος του κρέατος, το pH και την παρουσία άλλων βακτηρίων. Το βακτήριο μπορεί να μολύνει όλα τα είδη κρέατος, όπως το βόειο, το πρόβειο, το αίγαιο, το χοίρειο κρέας, το κρέας κονίκλου και το κοτόπουλο. Ωστόσο, η ανάπτυξη του βακτηρίου ευνοείται περισσότερο στο κοτόπουλο συγκριτικά με τα άλλα είδη κρέατος (Farber και συν., 2007). Επιπλέον, το βακτήριο ανευρίσκεται σε μεγαλύτερους πληθυσμούς σε σπλάχνα των ζώων συγκριτικά με το κρέας, όπως στους νεφρούς, το ήπαρ, τον σπλήνα και τους λεμφαδένες (Autio και συν., 2000). Το βακτήριο αναπτύσσεται ταχύτερα σε προϊόντα κρέατος με pH περίπου 6,0. Παρόλα αυτά, είναι ικανό να πολλαπλασιάζεται ακόμα και σε pH 4,5, με αποτέλεσμα ακόμα και η πτώση του pH που παρατηρείται κατά τη νεκρική ακαμψία του κρέατος (5,4-5,8) να αδυνατεί να εμποδίσει τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου (Καραϊωάννογλου, 2016). Ακόμα, προϊόντα με βάση το κρέας που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία ευνοούν περισσότερο την ανάπτυξη του παθογόνου, καθώς με τη θέρμανση εξαλείφεται η ανταγωνιστική χλωρίδα (Matthews και συν., 2021). Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα τροφιμογενούς νοσήματος από *L. monocytogenes* στη Νότια Αφρική το 2017, όπου νόσησαν 937 άνθρωποι και πέθαναν 193 άτομα. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν πως η συγκεκριμένη έξαρση κρουσμάτων παρατηρήθηκε εξαιτίας της κατανάλωσης μολυσμένης μορταδέλας (Thomas και συν., 2020).

Το απαστερίωτο γάλα αποτελεί πηγή της *L. monocytogenes*, καθώς αυτό μπορεί να μολυνθεί από το περιβάλλον της εκτροφής και μέσω της αποβολής του βακτηρίου με το γάλα των ζώων που πάσχουν από μαστίτιδα (Jordan και συν., 2016). Παρόλα αυτά, με την παστερίωση ο μικροοργανισμός αδρανοποιείται και κατά συνέπεια η παστερίωση θεωρείται επαρκής επεξεργασία εξυγίανσης (Μάντης και συν., 2015). Ωστόσο, η πιθανή μόλυνση του γάλακτος από το βακτήριο μετά την παστερίωση έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό του σε μεγάλους αριθμούς μέσα σε μία μόλις εβδομάδα μετά τη μόλυνση. Η ανάπτυξη του βακτηρίου στο παστεριωμένο γάλα ευνοείται από την απουσία ανταγωνιστικής χλωρίδας και τη συντήρηση του γάλακτος υπό ψύξη (Matthews και συν., 2021). Ένα άλλο πρόβλημα που παρατηρείται με τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι η επιβίωση του βακτηρίου στα τυριά. Η *L. monocytogenes* είναι ικανή να επιβιώσει κατά την ωρίμανση των τυριών εξαιτίας της σχετικά μεγάλης αντοχής της στη θερμότητα, της ανθεκτικότητάς της στο αλάτι και της ικανότητάς της να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Melo και συν., 2020). Κατά την παραγωγή του τυριού, το βακτήριο συγκεντρώνεται κυρίως στο τυρόπηγμα (Gérard και συν., 2018), με τη συμπεριφορά του

βακτηρίου σε αυτό να εξαρτάται από τον τύπο του τυριού. Για παράδειγμα, κατά την ωρίμανση η *L. monocytogenes* αναπτύσσεται στο καμαμπέρ ή στη φέτα, αλλά αδρανοποιείται σταδιακά στο τσένταρ (Matthews και συν., 2021). Η μόλυνση είναι συχνότερη κυρίως στα τυριά από απαστερίωτο γάλα. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα τροφιμογενούς κρούσματος λιστερίωσης στην Καλιφόρνια το 1985, όπου παρατηρήθηκαν 142 περιστατικά και 28 θάνατοι και το οποίο προκλήθηκε από κατανάλωση μολυσμένου μεξικάνικου μαλακού τυριού που επεξεργάστηκε έπειτα από ανάμειξη παστεριωμένου με απαστερίωτο γάλα (Linnan και συν., 1988).

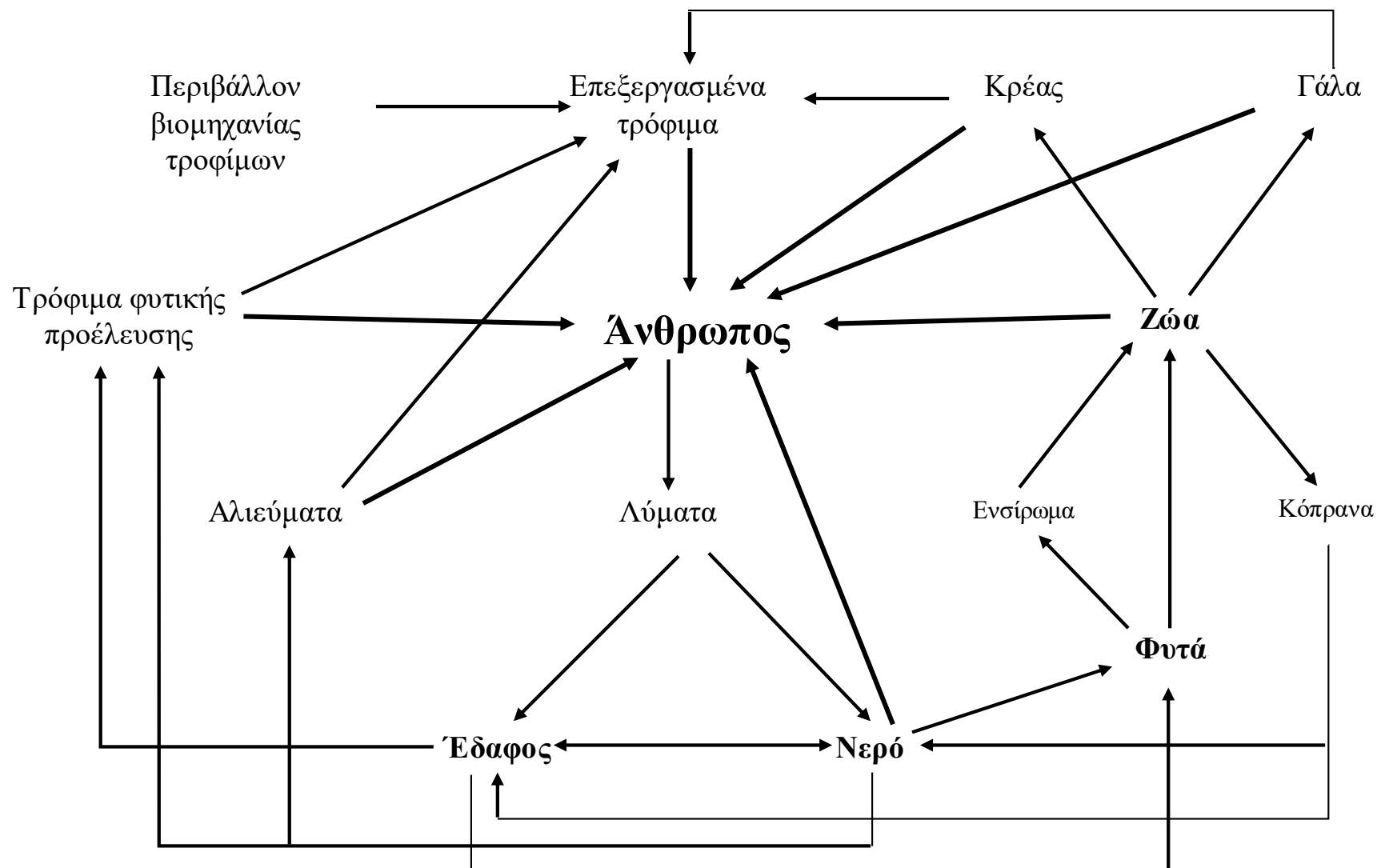
Αν και η *L. monocytogenes* απομονώνεται σπάνια από μη ρυπασμένο νερό, στελέχη του βακτηρίου απομονώνονται συχνά από ψάρια του γλυκού και αλμυρού νερού. Η πιθανότητα απομόνωσης αυξάνεται στην περίπτωση που τα ψάρια διαβιούσαν σε νερά με αυξημένη ανθρώπινη και ζωική δραστηριότητα (Liu, 2008). Για αυτό το λόγο, το βακτήριο ανευρίσκεται ιδιαίτερα στα ψάρια του γλυκού νερού, όπως η πέστροφα. Εκτός από φρέσκα ψάρια, το βακτήριο έχει απομονωθεί και από κατεψυγμένα και επεξεργασμένα αλιεύματα (επεξεργασμένα ψάρια, μαλακόστρακα, οστρακοειδή και μαλάκια) (Jinneman και συν., 2007). Η ανίχνευση του βακτηρίου στα επεξεργασμένα αλιεύματα οφείλεται είτε σε μολυσμένες πρώτες ύλες είτε κυριότερα στην επιμόλυνση των αλιευμάτων από το περιβάλλον της βιομηχανίας τροφίμων (Liu, 2008). Μερικά από τα αλιεύματα που αποτελούν τρόφιμα υψηλού κινδύνου για την εκδήλωση λιστερίωσης είναι το ωμό ψάρι, τα μαλάκια (π.χ. μύδια, στρείδια, χτένια) και τα ελαφρώς συντηρημένα προϊόντα ψαριών (π.χ. μαριναρισμένα, ζυμούμενα, αλατισμένα, καπνιστά) (Matthews και συν., 2021). Παραδείγματα τροφιμογενών νοσημάτων που οφειλόνταν σε μολυσμένα αλιεύματα είναι οι περιπτώσεις της Σουηδίας το 1996 και της Νέας Ζηλανδίας το 1992, όπου παρατηρήθηκαν 9 και 17 περιστατικά αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση το υπεύθυνο τρόφιμο ήταν μολυσμένη ιριδιζούσα πέστροφα, ενώ στη δεύτερη μολυσμένα καπνιστά μύδια (Ericsson και συν., 1997; Brett και συν., 1998).

Εκτός από τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, η *L. monocytogenes* ανευρίσκεται και σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά. Η μόλυνση των φρούτων και των λαχανικών μπορεί να γίνει είτε μέσω του εδάφους είτε μέσω του περιβάλλοντος επεξεργασίας τους (Liu, 2008). Η πρώτη καταγεγραμμένη τροφιμογενής επιδημική έξαρση από κατανάλωση λαχανικών μολυσμένων με *L. monocytogenes* συνέβη το 1979 σε νοσοκομείο της Βοστώνης με 23 περιστατικά, η οποία οφειλόταν σε μόλυνση από το βακτήριο εντός του νοσοκομείου (Ho και συν., 1986). Λίγα χρόνια αργότερα, το 1981, αναφέρθηκαν 41 περιστατικά λιστερίωσης στον Καναδά, που οφειλόταν στην κατανάλωση μολυσμένης σαλάτας λάχανου. Η πιθανότερη πηγή μόλυνσης ήταν τα λάχανα που είχαν λιπανθεί με πρόβεια κοπριά, από ζώα στα οποία υπήρχε υπόνοια εκδήλωσης μηνιγγοεγκεφαλίτιδας από *L. monocytogenes* (Schlech και συν., 1983). Το 2011 εκδηλώθηκε επιδημική έξαρση λιστερίωσης με 146 περιστατικά, η οποία συσχετίστηκε με πεπόνια που μολύνθηκαν στο χωράφι (McCollum και συν., 2013). Αντίστοιχη επιδημική έξαρση λιστερίωσης που αφορούσε πολλά κράτη, συνέβη το 2014-2015, στην οποία παρατηρήθηκαν τουλάχιστον 35 περιστατικά. Η συγκεκριμένη έξαρση κρουσμάτων αποδόθηκε σε προσυσκευασμένα καραμελωμένα μήλα (Buchanan και συν., 2017).

Από όλες τις κατηγορίες τροφίμων, τα τρόφιμα όπου ανευρίσκεται συχνότερα η *L. monocytogenes* και που εμπλέκονται συχνότερα στην εκδήλωση νόσου είναι τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα. Τα προϊόντα αυτά είναι τρόφιμα τα οποία μπορούν να καταναλωθούν χωρίς να προηγηθεί κάποιος προηγούμενος χειρισμός, όπως θερμική επεξεργασία (Καραϊωάννογλου, 2016). Επομένως, σε περίπτωση παρουσίας του βακτηρίου σε αυτά τα τρόφιμα, δε θα μεσολαβήσει κάποια διεργασία που θα αδρανοποιούσε τον μικροοργανισμό, και έτσι το τρόφιμο παραμένει μολυσμένο έως την κατανάλωσή του από τον άνθρωπο (Churchill και συν., 2019). Η συντήρηση των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων στηρίζεται στην προσθήκη NaCl σε συγκέντρωση 2-5% και στην ψύξη (Liu, 2008). Ωστόσο, αυτοί οι τρόποι συντήρησης δεν αναστέλλουν την ανάπτυξη του βακτηρίου στα τρόφιμα. Επίσης, η συσκευασία υπό κενό ή υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα δεν επηρεάζουν σημαντικά τον πληθυσμό του βακτηρίου και δεν παρέχουν προστασία έναντι του πολλαπλασιασμού του (Matthews και συν., 2021). Για αυτό το λόγο, οι ομάδες υψηλού κινδύνου οφείλουν να είναι ιδιαίτερα προσεχτικές και να καταναλώνουν τα προϊόντα αυτά με σύνεση.

A.3.4. Η *L. monocytogenes* στη διεπαφή ζώων, περιβάλλοντος, τροφίμων και ανθρώπων

Σύμφωνα με την αρχή της ενιαίας υγείας, η υγεία του ανθρώπου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την υγεία των ζώων και του περιβάλλοντος στο οποίο ζουν. Για αυτό το λόγο, απαιτείται διεπιστημονική συνεργασία που στοχεύει στα βέλτιστα δυνατά αποτελέσματα για την υγεία και ευημερία του ανθρώπου και που αναγνωρίζει τις διασυνδέσεις μεταξύ ανθρώπων, ζώων, τροφίμων και του κοινόχρηστου περιβάλλοντος. Οι περισσότερες προκλήσεις που καλείται να αντιμετωπίσει η σύγχρονη ιατρική επιστήμη σχετίζονται με τη διεπαφή ζώων, περιβάλλοντος, τροφίμων και ανθρώπων (De Macedo Couto & Brandespim, 2020). Μια τέτοια πρόκληση είναι και η προστασία από την *L. monocytogenes*. Ο μικροοργανισμός αυτός είναι ευρύτατα διαδεδομένος στα χερσαία και τα υδάτινα οικοσυστήματα. Έτσι, άμεσα ή έμμεσα με την κατανάλωση τροφίμων φυτικής προέλευσης, ο μικροοργανισμός μπορεί να μεταδοθεί στα ζώα και τον άνθρωπο. Επιπλέον, λόγω της ικανότητάς του να επιβιώνει σε αντίξοες συνθήκες, μεταξύ άλλων και στο περιβάλλον των βιομηχανιών τροφίμων, μπορεί να επιμολύνει επεξεργασμένα ή / και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα και έτσι να μεταδοθεί μέσω και αυτής της οδού στον άνθρωπο. Τα ζώα με τη σειρά τους είναι φορείς του βακτηρίου και μέσω άμεσης επαφής ή κυριότερα μέσω των τροφίμων που παράγουν (κρέας, γάλα) μπορούν να μεταδώσουν τον μικροοργανισμό στον άνθρωπο. Τέλος, τα ζώα και ο άνθρωπος αποβάλλουν τον μικροοργανισμό στο περιβάλλον μέσω των κοπράνων και των λυμάτων, με αποτέλεσμα να επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία και να συνεχίζεται ο κύκλος της μόλυνσης (Διάγραμμα 1) (Matthews και συν., 2021). Ωστόσο, ο μικροοργανισμός αυτός προκαλεί ασθένεια σε ένα ποσοστό ανθρώπων ή ζώων που προσβάλλει, η οποία εκδηλώνεται με σοβαρή κλινική εικόνα και χαρακτηρίζεται με υψηλά ποσοστά θνητότητας ιδίως στις ομάδες υψηλού κινδύνου. Επομένως, για τον περιορισμό της επίπτωσης της λιστερίωσης απαιτείται μια ολιστική προσέγγιση της υγείας του ανθρώπου, των ζώων και του περιβάλλοντος, η οποία υιοθετείται από την πρωτοβουλία της ενιαίας υγείας.



Διάγραμμα 1. Μετάδοση της *L. monocytogenes* μεταξύ των ανθρώπων, των ζώων, και του περιβάλλοντος. [Matthews και συν. (2021), με τροποποιήσεις].

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. Σκοπός της εργασίας

Αν και ο επιπολασμός της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον βιομηχανιών τροφίμων έχει μελετηθεί εκτενώς, οι αναφορές στην διεθνή και ιδίως στην ελληνική βιβλιογραφία για την παρουσία της *L. monocytogenes* κατά μήκος της αλυσίδας παραγωγής βόειου κρέατος και για τις οδούς μόλυνσης από τις εκτροφές των βοοειδών έως και τον τελικό τεμαχισμό μετά τη σφαγή, είναι λίγες. Η δυνατότητα πρόκλησης λιστερίωσης μέσω της κατανάλωσης ατελώς μαγειρεμένου κρέατος και κυρίως η σοβαρότητα της νόσου, υπαγορεύουν την αναγκαιότητα για τον έλεγχο της *L. monocytogenes* στο βόειο κρέας, δεδομένου ότι το βόειο κρέας και τα προϊόντα του έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση λιστερίωσης στον άνθρωπο (Little και συν., 2010; Smith και συν., 2011; Maurella και συν., 2018). Κατά συνέπεια, σκοπός της εργασίας είναι:

- η απομόνωση στελεχών *L. monocytogenes* και ο προσδιορισμός του επιπολασμού της στο περιβάλλον της εκτροφής κρεοπαραγωγών βοοειδών, το περιβάλλον του σφαγείου, το βόειο σφάγιο και το δέρμα βοοειδών
- ο χαρακτηρισμός των απομονωθέντων στελεχών της *L. monocytogenes* (οροτυποποίηση, αξιολόγηση παραγωγής βιοϋμενίων, έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, ανίχνευση γονιδίων λοιμογονικότητας)
- η εύρεση πιθανών συγγενειών μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών και η διερεύνηση των πιθανότερων οδών μόλυνσης των χώρων και των σφάγιων από το συγκεκριμένο βακτήριο.

Η πρωτοτυπία της μελέτης και η αναμενόμενη συμβολή της στην προαγωγή της επιστήμης συνάγεται από:

- την απουσία επαρκών δεδομένων στη διεθνή και ελληνική βιβλιογραφία για τον χαρακτηρισμό των στελεχών *L. monocytogenes* που απομονώνονται από το περιβάλλον της εκτροφής κρεοπαραγωγών βοοειδών, το περιβάλλον του σφαγείου, το βόειο σφάγιο και το δέρμα βοοειδών. Ειδικότερα στην Ελλάδα, η βιβλιογραφία που αφορά την επιδημιολογία της *Listeria monocytogenes* είναι εξαιρετικά περιορισμένη.
- τον μικρό αριθμό μελετών προσδιορισμού του επιπολασμού της *L. monocytogenes* στο βόειο σφάγιο, το δέρμα βοοειδών και το περιβάλλον της εκτροφής και του σφαγείου.
- τη διερεύνηση των πιθανότερων οδών μετάδοσης της *L. monocytogenes* κατά μήκος της αλυσίδας παραγωγής κρέατος, έτσι ώστε να προληφθεί η μετάδοσή της στον άνθρωπο και η πρόκληση τροφιμογενούς νόσου.

B.2. Υλικά και μέθοδοι

B.2.1. Δειγματοληψία

Η μελέτη διεξήχθη σε μία εκτροφή βοοειδών και ένα σφαγείο στην Βόρεια Ελλάδα το φθινόπωρο του 2022 και την άνοιξη του 2023. Η φάρμα βρίσκεται στην Κεντρική Μακεδονία, όπου εκτρέφονται ως επί το πλείστον κρεοπαραγωγές φυλές βοοειδών. Η συγκεκριμένη μονάδα στέλνει τα ζώα προς σφαγή στο σφαγείο της μελέτης, το οποίο επιλέχθηκε επίσης με βάση τον αριθμό των βοοειδών που σφάζεται ετησίως. Το σφαγείο βρίσκεται στην Κεντρική Μακεδονία, εντός 10 χιλιομέτρων από την εκτροφή. Έχει άδεια σφαγής μηρυκαστικών και χοίρων με τρεις γραμμές σφαγής (βοοειδή, μικρά μηρυκαστικά και χοίροι). Η γραμμή σφαγής βοοειδών είναι εντελώς ξεχωριστή, ενώ η σφαγή μικρών μηρυκαστικών και χοίρων πραγματοποιείται παράλληλα. Η ωριαία δυναμικότητα του σφαγείου είναι 20 βοοειδή, 100 χοίροι και 100 μικρά μηρυκαστικά, με ετήσια παραγωγή κρέατος περίπου 3000 τόνων.

Συνολικά ελήφθησαν 270 δείγματα. Τα δείγματα αφορούσαν 70 περιβαλλοντικά δείγματα από την εκτροφή (ταΐστρες, ποτίστρες, πάτωμα κελιών και τοίχοι κελιών βοοειδών), 80 δείγματα από το περιβάλλον του σφαγείου (μαχαίρια, σιφόνια, κύλινδρος εκδοράς, πλατφόρμα εκσπλαχνισμού, πριόνι διχοτόμησης, νερό πλυσίματος σφάγιων), 60 δείγματα δέρματος και 60 δείγματα βόειων σφάγιων (Πίνακας 2). Τα 130 δείγματα λήφθηκαν το φθινόπωρο του 2022 και τα υπόλοιπα λήφθηκαν την άνοιξη του 2023, προκειμένου να ελεγχθεί αν παρατηρείται εποχιακή διακύμανση ως προς τα ποσοστά απομόνωσης της *L. monocytogenes* στα δείγματα αυτά. Τα περιβαλλοντικά δείγματα λήφθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένων γαζών και βαμβακοφόρων στυλεών. Πιο συγκεκριμένα, για τη δειγματοληψία επιφανείας χρησιμοποιήθηκε ζεύγος αποστειρωμένου στυλεού ή γάζας εμποτισμένων σε 5 mL Half Fraser (HF, Oxoid, Basingstoke, UK) και στεγνού αποστειρωμένου στυλεού ή γάζας σε επιφάνεια 100 cm². Στη συνέχεια, και οι δύο στυλεοί ή γάζες τοποθετήθηκαν σε ένα κοινό δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 5 mL HF. Για τη δειγματοληψία νερού συλλέχθηκε 1 L νερού πλυσίματος σφάγιων σε αποστειρωμένη φιάλη με βιδωτό πώμα, που περιείχε 18 mg/L θειοθειικό νάτριο. Ακόμα, λήφθηκε δείγμα από τις προσαρτημένες συσκευές και τα εξαρτήματα της βρύσης με βαμβακοφόρους στυλεούς, όπως ήδη περιεγράφηκε. Όσον αφορά τα μαχαίρια, δείγματα λήφθηκαν από την αρχή, τη μέση και το τέλος της διαδικασίας σφαγής, προκειμένου να ελεγχθεί αν κάποια χρονική στιγμή της διαδικασίας σφαγής επηρεάζει περισσότερο την πιθανότητα απομόνωσης *L. monocytogenes*. Η δειγματοληψία των δειγμάτων δέρματος και σφάγιων έγινε με τη χρήση σπόγγων κυτταρίνης. Εν συντομία, χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένοι σπόγγοι εμποτισμένοι σε 50 mL HF και στεγνοί αποστειρωμένοι σπόγγοι σε συνολική επιφάνεια 1000 cm² από το δέρμα και το πρόσθιο τεταρτημόριο, το οπίσθιο τεταρτημόριο και την περιοχή της κοιλιάς του σφαγίου. Στη συνέχεια, ο υγρός και στεγνός σπόγγος τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη που περιείχε 50 mL HF. Όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν με φορητό ψυγείο (<4°C) στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης και Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας (Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή

Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης) εντός εικοσιτετραώρου από τη λήψη τους για περαιτέρω ανάλυση.

Πίνακας 2. Περιγραφή των δειγμάτων που έχουν ληφθεί.

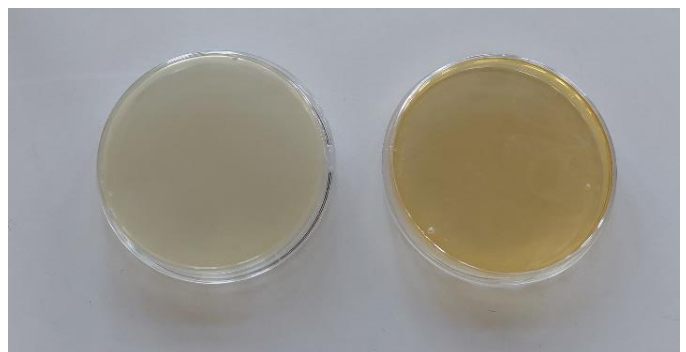
	Δείγμα	Αριθμός
Περιβάλλον εκτροφής	Ταΐστρες	20
	Ποτίστρες	20
	Τοίχοι	20
	Πάτωμα	10
	Σύνολο	70
Περιβάλλον σφαγείου	Μαχαίρια ακάθαρτου τμήματος (αρχή)	8
	Μαχαίρια ακάθαρτου τμήματος (μέση)	8
	Μαχαίρια ακάθαρτου τμήματος (τέλος)	8
	Μαχαίρια καθαρού τμήματος (αρχή)	8
	Μαχαίρια καθαρού τμήματος (μέση)	8
	Μαχαίρια καθαρού τμήματος (τέλος)	8
	Σιφώνια ακάθαρτου τμήματος	8
	Σιφώνια καθαρού τμήματος	8
	Κύλινδρος εκδοράς	4
	Πλατφόρμα εκσπλαχνισμού	4
	Πριόνι διχοτόμησης	4
	Νερό πλυσίματος σφάγιων	4
	Σύνολο	80
Δείγματα από ζώα	Δέρμα	60
	Σφάγια	60
	Σύνολο	120

B.2.2. Μικροβιολογική ανάλυση και οροτυποποίηση στελεχών *L. monocytogenes*

Η εξέταση των δειγμάτων νερού έγινε με διήθηση 1 L νερού μέσω μικροβιοκρατών μεμβρανών 0,45 μm (CHMLAB GROUP, Barcelona, Spain). Οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 50 mL HF, μαζί με τους βαμβανοφόρους στυλεούς που χρησιμοποιήθηκαν για τη δειγματοληψία προσαρτημένων συσκευών και εξαρτημάτων βρύσης. Η ανίχνευση της *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρότυπο ISO 11290-1/2017. Συγκεκριμένα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το HF επώαστηκαν στους 30°C για 18 h. Στη συνέχεια, 0,1 mL από το επωασθέν HF μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL Fraser Broth (FB, Oxoid, Basingstoke, UK), οι οποίοι επώαστηκαν στους 37° C για 24-48 h. Στη συνέχεια, 10 μL του εναιωρήματος FB ενοφθαλμίστηκαν επιφανειακά σε Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA, Oxoid, Basingstoke, UK), το οποίο επώαστηκε στους 37° C για 24-48 h. Μετά την επώαση οι αποικίες που εμφανίζουν τα τυπικά χαρακτηριστικά των *L. monocytogenes* (κυανοπράσινες αποικίες με αδιαφανή άλω)

ενοφθαλμίστηκαν σε Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSYEA) και ακολούθησε επώαση στους 37° C για 24 h. Τα τρυβλία που εμφάνιζαν έναν αποικιακό τύπο (καθαρές καλλιέργειες) χρησιμοποιήθηκαν για τις περαιτέρω δοκιμές ταυτοποίησης.

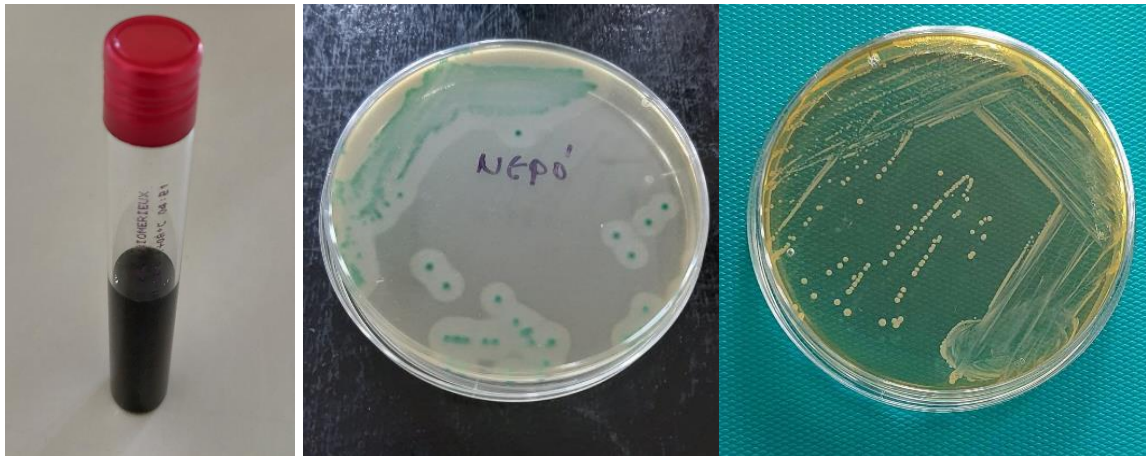
Για την ταυτοποίηση των αποικιών και την περαιτέρω μοριακή οροτυποποίηση πραγματοποιήθηκε εκχύλιση DNA από τις καθαρές καλλιέργειες, σύμφωνα με τους Lawrence και Gilmour (1994), με την εναιώρηση μιας καθαρής αποικίας σε 50 μ L αποστειρωμένου νερού Milli-Q σε eppendorf. Το εναιώρημα θερμάνθηκε στους 100° C για 10 λεπτά, ψύχθηκε στον πάγο και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm για 5 λεπτά. Έπειτα, συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό και τοποθετήθηκε σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο, το οποίο και αποθηκεύτηκε στους -20° C. Τα δείγματα DNA υποβλήθηκαν σε multiplex PCR για τη μοριακή ταυτοποίηση και οροτυποποίηση της *L. monocytogenes*, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Doumith και συν. (2004) με τροποποιήσεις, το οποίο στοχεύει τα γονίδια *prs*, *ORF 2819*, *ORF 2110*, *lmo 0737* και *lmo 1118*. Αρχικά προετοιμάστηκε το μείγμα αντίδρασης σε τελικό όγκο 25 μ L που περιείχε 2U OneTaq™ DNA Polymerase (M0273S, NEB), 2,5 μ L 10 $\times$ OneTaq Standard Reaction Buffer (B9014S, NEB), 200 μ M dNTPs (N0447S, NEB), 0,25-1,875 μ L των εκκινητών και 2 μ L δείγματος DNA (Πίνακας 3). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *L. monocytogenes* IS 1951, CIP 105448 και Scott A. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή (LabCycler Gradient, SensoQuest GmbH, Göttingen, Germany) με αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 180 sec, 35 κύκλους PCR με αποδιάταξη στους 94°C για 24 sec, υβριδοποίηση στους 53°C για 69 sec και επιμήκυνση στους 72°C για 69 sec, και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Τα προϊόντα της PCR ανιχνεύτηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές αгарόζης 1,5% με βρωμιούχο αιθίδιο. Οι επιβεβαιωμένες αποικίες *L. monocytogenes* καλλιεργήθηκαν σε Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) στους 37°C για 24 h και συντηρήθηκαν σε κρυοφιαλίδια με 15% γλυκερόλη στους -80°C για μελλοντικές αναλύσεις.



Εικόνα 2. Υγρά και στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση στελεχών *L. monocytogenes*. Από τα αριστερά προς τα δεξιά: Half Fraser, Full Fraser, ALOA, TSYEA.

Πίνακας 3. Εκκινητές για τη μοριακή ταυτοποίηση και οροτυποποίηση της *L. monocytogenes*.

Γονίδιο	Εκκινητές	Επιθυμητή συγκέντρωση	Προϊόν (bp)	Στόχος
<i>prs</i>	For: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	0,2 μ M	370	<i>Listeria</i> spp.
	Rev: CAAAGAAACCTTGGATTTGCG	0,2 μ M		
ORF 2819	For: AGCAAAATGCCAAAACTCGT	1 μ M	471	<i>L. monocytogenes</i> ορότυποι 1/2b, 3b, 4b, 4d και 4e
	Rev: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	1 μ M		
ORF 2110	For: AGTGGACAATTGATTGGTGAA	1 μ M	597	<i>L. monocytogenes</i> ορότυποι 4b, 4d και 4e
	Rev: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	1 μ M		
<i>lmo 0737</i>	For: AGGGCTTCAAGGACTTACCC	1 μ M	691	<i>L. monocytogenes</i> ορότυποι 1/2a, 1/2c, 3a και 3c
	Rev: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	1 μ M		
<i>lmo 1118</i>	For: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	1,5 μ M	906	<i>L. monocytogenes</i> ορότυποι 1/2c και 3c
	Rev: CGGCTTGTTTCGGCATACTTA	1,5 μ M		



Εικόνα 3. α) Ανάπτυξη *L. monocytogenes* σε Full Fraser (αριστερά), β) Κυανοπράσινες αποικίες *L. monocytogenes* με αδιαφανή άλω σε ALOA (μέση), γ) Αποικίες *L. monocytogenes* σε TSYEA (δεξιά).

B.2.3. Διερεύνηση πιθανών συγγενειών μεταξύ των στελεχών *L. monocytogenes*

Ο έλεγχος των πιθανών συγγενειών μεταξύ των στελεχών *L. monocytogenes* έγινε με τη χρήση του matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), με ανιχνευτή μάζας time-of-flight (TOF) analyzer (MALDI-TOF MS). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματομέτρο μάζας Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Πιο συγκεκριμένα, για την εξαγωγή πρωτεϊνών επιλέχθηκαν χαρακτηριστικές αποικίες *L. monocytogenes* σε TSYEA. Σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή για την ταυτοποίηση των *Listeria* spp., χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο εξαγωγής των ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο του φορμικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, καθαρή αποικία του στελέχους τοποθετούνταν σε erppendorf με 300 μ L υπερκάθαρο νερό και ομογενοποιούνταν. Στη συνέχεια, προσθέτονταν 900 μ L καθαρής αιθανόλης και ακολουθούσε ομογενοποίηση, φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού. Αφού επαναλήφθηκαν τα παραπάνω βήματα άλλη μια φορά (προσθήκη αιθανόλης, ομογενοποίηση, φυγοκέντρωση, αφαίρεση υπερκείμενου), τα erppendorf αφέθηκαν με ανοικτό καπάκι για 5 λεπτά προκειμένου να αφυδατωθεί η περίσσεια της αιθανόλης. Έπειτα, προσθέτονταν 30 μ L 70% ένυδρου φορμικού οξέος και ακολουθούσε ανάδευση. Το τελευταίο βήμα της εκχύλισης των ολικών πρωτεϊνών περιελάμβανε την προσθήκη ίσης ποσότητας ακετονιτρίλιου (30 μ L), ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, 1 μ L από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα τοποθετούνταν στην ειδική πλάκα αναλύσεων του MALDI-TOF MS. Κάθε σημείο της πλάκας επικαλύπτονταν με 1 μ L διαλύματος matrix [κορεσμένο διάλυμα cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (Bruker Daltonics) σε 50% ακετονιτρίλιο (SigmaAldrich, St. Louis, MO) με 25% trifluoroacetic acid (SigmaAldrich)] και αφήνονταν να στεγνώσει στον αέρα. Τα πρωτεϊνικά προφίλ συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση linear positive mode με συχνότητα laser στα 20 Hz. Τα ανεπεξέργαστα πρωτεϊνικά φάσματα συλλέχθηκαν αυτόματα με τη χρήση του λογισμικού AutoXecute control (Flex control 3.4; Bruker Daltonics) και τα φάσματα καταγράφηκαν

εντός του εύρους 2000 – 20000 Da. Η μέθοδος βαθμονομήθηκε με τη χρήση του Bruker Bacterial Test Standard (BTS), το οποίο είναι ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το βακτήριο *Escherichia coli* DH5 ενοφθαλμισμένο με δύο επιπλέον πρωτεΐνες (RNAase A και μυοσφαιρίνη), προκειμένου να επεκταθεί το ανώτερο όριο του εύρους μάζας που καλύπτει το BTS.

Η ταυτοποίηση της *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MALDI Biotyper ver. 4.0, με προεπιλεγμένες παραμέτρους, και τα συλλεγμένα φάσματα συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιοθήκης φασμάτων μαζών (v6.093 MSPs). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το MBT Subtyping Module για τις *Listeria* spp., το οποίο υποστηρίζει την ταυτοποίηση των πιο κοινών στελεχών *Listeria* spp. σε δείγματα τροφίμων, ζωοτροφών και περιβάλλοντος. Τα αποτελέσματα ταξινομήθηκαν με τη χρήση των τροποποιημένων score values (modified score values), όπως προτείνεται από τον παρασκευαστή. Προκειμένου να ομαδοποιηθούν τα απομονωθέντα στελέχη *L. monocytogenes*, δημιουργήθηκε ένα δενδρόγραμμα κύριων φασμάτων (MSP, Main Spectra dendogram) με βάση το πρωτεϊνικό τους προφίλ. Κάθε ένα από τα φάσματα που ανακτήθηκαν υποβλήθηκε σε τεχνική εξομάλυνσης (smoothing) και αφαίρεσης του επιπέδου βάσης (baseline) και επεξεργάστηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό MALDI Biotyper Offline Classification 4.0 με προεπιλεγμένες παραμέτρους, για τη δημιουργία του δενδρογράμματος MSP. Προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή διακριτική ικανότητα μεταξύ των κλάδων του δενδρογράμματος MSP, η τιμή διαχωρισμού (cut-off value) ορίστηκε στα 650 distance level, με βάση τους Papatzimos και συν. (2021) με τροποποιήσεις.

B.2.4. Αξιολόγηση παραγωγής βιοϋμενίων από τα στελέχη *L. monocytogenes*

Ο έλεγχος της δυνατότητας των στελεχών να παράγουν βιοϋμένια (biofilm) έγινε με βάση το πρωτόκολλο των Chachlioutaki και συν. (2022) με τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, στελέχη *L. monocytogenes* ενοφθαλμίστηκαν σε Tryptic Soy Broth (TSB) με 1% γλυκόζη και επώαστηκαν στους 37° C για 24 h. Στη συνέχεια, έγινε ρύθμιση της καλλιέργειας σε βαθμό θολερότητας 0.5 McFarland με τη χρήση νεφελόμετρου (Grant Instruments, Cambridge, UK) και πραγματοποιήθηκε αραιώση 1/100 σε TSB με 1% γλυκόζη, έτσι ώστε ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* να είναι ~ 10⁶ CFU/mL. Έπειτα, 100 μL από την αραιώση μεταφέρθηκαν σε βοθρία μικροπλακών πολυστυρενίου με επίπεδο πυθμένα (Boettger, Bodenmais, Germany) που περιείχαν 100 μL TSB με 1% γλυκόζη (συνολική ποσότητα 200 μL σε κάθε βοθρίο), έτσι ώστε ο τελικός πληθυσμός της *L. monocytogenes* να είναι ~ 5*10⁵ CFU/mL. Για κάθε στέλεχος *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον οκτώ επαναλήψεις, ενώ σε κάθε πλάκα συγκεκριμένα βοθρία αποτελούσαν τον αρνητικό μάρτυρα, που αποτελούνταν μόνο από 200 μL στείρου TSB με 1% γλυκόζη. Στη συνέχεια, η πλάκα σφραγιζόταν ερμητικά με παραφίλμ, προκειμένου να περιοριστεί η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο, και επωαζόταν στους 37 °C για 24 ώρες. Μετά την επώαση, μετρούνταν η οπτική απορρόφηση (OD) της πλάκας με αυτόματο φασματοφωτόμετρο (MicroDigital Co., Seongnam-si, South Korea) στα 600 nm, προκειμένου να προσδιοριστεί η συνολική ανάπτυξη της *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά κύτταρα και

βιοϋμένια). Στη συνέχεια, ακολουθούσε έκπλυση των βοθρίων τρεις φορές με 200 μL στείρου διαλύματος 0,9% NaCl με προσεκτικούς χειρισμούς, προκειμένου να μην αποκολληθούν τα βιοϋμένια από τα τοιχώματα της πλάκας. Ακολούθως, οι μικροπλάκες ξηραίνονταν στους 60°C για 1 ώρα, προκειμένου να μονιμοποιηθούν τα βιοϋμένια. Έπειτα, προσθέτονταν 50 μL διαλύματος 0,06% w/v κρυσταλλικού ιώδους, το οποίο παρέμενε στα βοθρία για τουλάχιστον 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η έκπλυση της ελεύθερης ποσότητας κρυσταλλικού ιώδους έγινε με φυσιολογικό ορό εις τριπλούν, ενώ η δεσμευμένη στο βιοϋμένιο ποσότητα κρυσταλλικού ιώδους απελευθερωνόταν με προσθήκη 200 μL διαλύματος 33% οξικού οξέος για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, μετρούνταν η οπτική απορρόφηση (OD) της πλάκας με αυτόματο φασματοφωτόμετρο στα 600 nm. Ανάλογα με το μέγεθος του OD κάθε στελέχους και του OD των μαρτύρων (OD_c), χαρακτηρίστηκε το μέγεθος παραγωγής βιοϋμένων από τα απομονωθέντα στελέχη. Ανάλογα με τις τιμές της οπτικής απορρόφησης των βοθρίων των στελεχών (OD) έναντι των μαρτύρων (OD_c) τα στελέχη εμφάνισαν αδυναμία παραγωγής βιοϋμένων ($\text{OD} \leq \text{OD}_c$), ασθενή παραγωγή βιοϋμένων ($\text{OD}_c < \text{OD} \leq 2 \cdot \text{OD}_c$), μέτρια παραγωγή βιοϋμένων ($2 \cdot \text{OD}_c < \text{OD} \leq 4 \cdot \text{OD}_c$) και ισχυρή παραγωγή βιοϋμένων ($\text{OD} > 4 \cdot \text{OD}_c$).

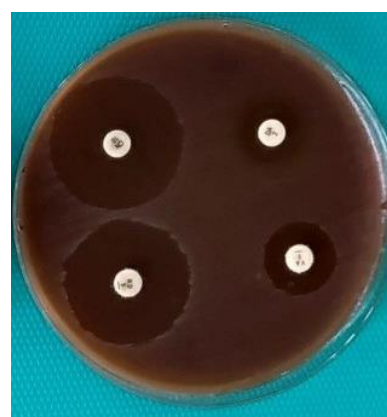
B.2.5. Έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών *L. monocytogenes* στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος της ευαισθησίας των στελεχών *L. monocytogenes* στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (disk-diffusion method) σύμφωνα με τις οδηγίες του Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023). Αναλυτικότερα, τρεις αποικίες *L. monocytogenes* από TSYEA μεταφέρονταν σε φυσιολογικό ορό και δημιουργούνταν εναιώρημα 0.5 McFarland με τη χρήση νεφελόμετρου (Grant Instruments, Cambridge, UK). Στη συνέχεια, τρυβλία Mueller Hinton agar, cation adjusted (MHA, Oxoid, Basingstoke, UK) με 5% πρόβειο αίμα (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) ενοφθαλμίζονταν με το εναιώρημα (συγκέντρωση μικροοργανισμών της τάξεως 10^8 CFU/mL) με τη χρήση αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στυλεού. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37°C για 24 h. Τα στελέχη *L. monocytogenes* ελέγχθηκαν για την ευαισθησία τους έναντι ενός πάνελ δεκατριών αντιβιοτικών (Oxoid, Basingstoke, UK) που χρησιμοποιούνται ευρέως στην Ιατρική και την Κτηνιατρική θεραπευτική. Τα αντιβιοτικά αυτά και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι η αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ (A/C, 20/10 μg), αμπικιλίνη (AMP, 10 μg), σιπροφλοξασίνη (CIP, 5 μg), χλωραμφαινικόλη (C, 30 μg), κλινδαμυκίνη (CLI, 2 μg), ερυθρομυκίνη (ERY, 15 μg), γενταμυκίνη (G, 10 μg), μεροπενέμη (MER, 10 μg), πενικιλίνη (P, 10 IU), σουλφामεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (SXT, 1.25/23.75 μg), τετρακυκλίνη (TET, 30 μg), ριφαμικίνη (RIF, 5 μg) και βανκομυκίνη (VAN, 30 μg). Ο *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Οι ζώνες αναστολής μετρήθηκαν με τη βοήθεια παχύμετρου. Επειδή στις σχετικές οδηγίες του CLSI δεν υπάρχουν τιμές αναφοράς (breakpoints) ειδικές για την *L. monocytogenes*, με εξαίρεση την πενικιλίνη, την αμπικιλίνη και την τριμεθοπρίμη – σουλφामεθοξαζόλη, για τα περισσότερα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές αναφοράς των *Staphylococcus* spp., σύμφωνα με τους Angelidis και συν. (2023). Για την αμπικιλίνη και την βανκομυκίνη χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές αναφοράς των *Enterococcus* spp. και

για την αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ και την μεροπενέμη χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές αναφοράς των Enterobacterales, όπως προτείνεται από τους Kawacka και συν. (2023), καθώς δεν υπάρχουν από το CLSI τιμές αναφοράς ειδικές για τους *Staphylococcus* spp. για τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά (Πίνακας 4). Ως πολυανθεκτικά (multidrug resistant, MDR) χαρακτηρίστηκαν τα στελέχη που εμφάνισαν αντοχή σε τουλάχιστον έναν αντιμικροβιακό παράγοντα τριών ή περισσότερων κατηγοριών αντιμικροβιακών φαρμάκων, σύμφωνα με τα κριτήρια των Magiorakos και συν. (2012).

Πίνακας 4. Δισκία αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν και όρια ευαισθησίας της *L. monocytogenes*, σύμφωνα με το CLSI.

Αντιβιοτικό	Συγκέντρωση / δισκίο	Όριο ευαισθησίας
Αμοξικιλίνη / κλαβουλανικό οξύ	20/10 µg	18 mm
Αμπικιλίνη	10 µg	17 mm
Σιπροφλοξασίνη	5 µg	21 mm
Χλωραμφαινικόλη	30 µg	18 mm
Κλινδαμυκίνη	2 µg	21 mm
Ερυθρομυκίνη	15 µg	23 mm
Γενταμυκίνη	10 µg	15 mm
Μεροπενέμη	10 µg	18 mm
Πενικιλίνη	10 IU	29 mm
Σουλφαμεθοξαζόλη / τριμεθοπρίμη	1.25/23.75 µg	16 mm
Τετρακυκλίνη	30 µg	19 mm
ΡΙφαμπικίνη	5 µg	20 mm
Βανκομυκίνη	30 µg	17 mm



Εικόνα 4. α) Παραγωγή βιοϋμενίων από στελέχη (αριστερά), β) Ζώνες αναστολής σε αντιβιογράμμο (δεξιά).

B.2.6. Ανίχνευση γονιδίων λοιμογονικότητας στα στελέχη *L. monocytogenes*

Για την ανίχνευση των γονιδίων λοιμογονικότητας στα στελέχη *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκαν εννέα simplex PCR, με σκοπό την ανίχνευση των γονιδίων *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ* (γονίδια ιντερναλινών), *plcA* (γονίδιο φωσφολιπάσης C), *prfA* (ρυθμιστικό γονίδιο), *actA* (γονίδιο ακτίνης), *hlyA* (γονίδιο αιμολυσίνης) και *iap* (γονίδιο πρωτεΐνης p60). Για την ανίχνευση των γονιδίων *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inlJ* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές και οι συνθήκες PCR των Liu και συν. (2007) με τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, προετοιμάστηκε το μείγμα αντίδρασης σε τελικό όγκο 25 μ L που περιείχε 0,8U OneTaq™ DNA Polymerase (M0273S, NEB), 2,5 μ L 10 $\times$ OneTaq Standard Reaction Buffer (B9014S, NEB), 200 μ M dNTPs (N0447S, NEB), 1 μ M εκκινητές και 2 μ L δείγματος DNA (Πίνακας 5). Η PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή (LabCycler Gradient, SensoQuest GmbH, Göttingen, Germany) με αρχική αποδιάταξη (120 s στους 94° C), 30 κύκλους PCR (αποδιάταξη στους 94° C για 20 s, υβριδοποίηση στους 55° C για 20 s και επιμήκυνση στους 72° C για 50 s) και τελική επιμήκυνση στους 72° C για 2 λεπτά. Όσον αφορά τα γονίδια *plcA*, *prfA*, *actA*, *hlyA* και *iap*, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές και οι συνθήκες PCR των Rawool και συν. (2007) με τροποποιήσεις. Αναλυτικότερα, προετοιμάστηκε το μείγμα αντίδρασης σε τελικό όγκο 25 μ L που περιείχε 1U OneTaq™ DNA Polymerase (M0273S, NEB), 2,5 μ L 10 $\times$ OneTaq Standard Reaction Buffer (B9014S, NEB), 200 μ M dNTPs (N0447S, NEB), 0,1 μ M εκκινητές και 2 μ L δείγματος DNA (Πίνακας 5). Η PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή (LabCycler Gradient, SensoQuest GmbH, Göttingen, Germany) με αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 120 sec, 35 κύκλους PCR με αποδιάταξη στους 95°C για 15 sec, υβριδοποίηση στους 60°C για 30 sec και επιμήκυνση στους 72°C για 90 sec, και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min. Τα προϊόντα της PCR ανιχνεύτηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές αгарόζης 1,5% με βρωμιούχο αιθίδιο. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *L. monocytogenes* IS 1951, CIP 105448 και Scott A.

B.2.7. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού IBM SPSS Statistics (v.29.0., IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Για τον υπολογισμό των διαστημάτων εμπιστοσύνης των επιπολασμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Clopper-Pearson (Binomial test), ενώ για τη σύγκριση των επιπολασμών της *L. monocytogenes* ανά εποχή και για τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ του ορότυπου των απομονωθέντων στελεχών και της ικανότητάς τους να παράγουν βιοϋμένια χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Fisher's exact test. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% (p -value ≤ 0.05).

Πίνακας 5. Εκκινητές για την ανίχνευση γονιδίων λοιμογονικότητας της *L. monocytogenes*.

Γονίδιο	Εκκινητές	Προϊόν (bp)
<i>inlA</i>	For: ACGAGTAACGGGACAAATGC Rev: CCCGACAGTGGTGCTAGATT	800
<i>inlB</i>	For: TGGGAGAGTAACCCAACCAC Rev: GTTGACCTTCGATGGTTGCT	884
<i>inlC</i>	For: AATTCCCACAGGACACAACC Rev: CGGGAATGCAATTTTTCATA	517
<i>inlJ</i>	For: TGTAACCCCGCTTACACAGTT Rev: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	238
<i>plcA</i>	For: CTGCTTGAGCGTTCATGTCTCATCCCC Rev: CATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC	1484
<i>prfA</i>	For: CTGTTGGAGCTCTTCTTGGTGAAGCAATCG Rev: AGCAACCTCGGTACCATATACTAACTC	1060
<i>hlyA</i>	For: GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA Rev: GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	456
<i>iap</i>	For: ACAAGCTGCACCTGTTGCAG Rev: TGACAGCGTGTGTAGTAGCA	131
<i>actA</i>	For: CGCCGCGGAAATTAAAAAAGA Rev: ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG	839

B.3. Αποτελέσματα

B.3.1. Απομόνωση στελεχών, προσδιορισμός επιπολασμού και οροτυποποίηση της *L. monocytogenes*

Συνολικά απομονώθηκαν 230 στελέχη *Listeria* spp., εκ των οποίων τα 24 χαρακτηρίστηκαν ως *L. monocytogenes* (10,4% των στελεχών). Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκαν 13 στελέχη από σφάγια (21,7%, 95% CI = 12,1% – 34,2%), τέσσερα στελέχη από δέρμα (6,7%, 95% CI = 1,8% - 16,2%) και επτά στελέχη από το περιβάλλον του σφαγείου (8,8%, 95% CI = 3,6% – 17,2%). Τα περιβαλλοντικά στελέχη αφορούσαν δύο στελέχη από σιφώνια του καθαρού τμήματος του σφαγείου (25% των δειγμάτων), ένα στέλεχος από τον κύλινδρο εκδοράς (25% των δειγμάτων), ένα στέλεχος από μαχαίρι του καθαρού τμήματος στο τέλος της διαδικασίας σφαγής (12,5% των δειγμάτων) και τρία στελέχη από το νερό πλυσίματος των σφάγιων (75% των δειγμάτων). Δεν απομονώθηκαν στελέχη *L. monocytogenes* από το περιβάλλον της εκτροφής (95% CI = 0% - 5,1%). Επιπλέον, δεν απομονώθηκαν στελέχη *L. monocytogenes* από τα μαχαίρια στην αρχή και τη μέση της διαδικασίας σφαγής, αλλά απομονώθηκε ένα στέλεχος από μαχαίρια του καθαρού τμήματος στο τέλος της διαδικασίας σφαγής. Τέλος, εκτός των στελεχών *L. monocytogenes*, απομονώθηκαν επιπλέον 47 στελέχη *Listeria* spp. από τα σφάγια (78,3% των δειγμάτων), 54 στελέχη *Listeria* spp. από το δέρμα (90% των δειγμάτων), 63 στελέχη *Listeria* spp. από τα περιβαλλοντικά δείγματα του σφαγείου (78,8% των δειγμάτων) και 42 στελέχη *Listeria* spp. από το περιβάλλον της εκτροφής (60% των δειγμάτων). Συνεπώς, στελέχη του γένους *Listeria* απομονώθηκαν από το σύνολο των σφάγιων (60/60 δείγματα, 100%), από το 96,7% των δειγμάτων δέρματος (58/60 δείγματα) και από το 87,5% των περιβαλλοντικών δειγμάτων του σφαγείου (70/80 δείγματα).

Τα στελέχη *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν ανήκαν στους μοριακούς ορότυπους IIa, IIb, IIc και IVb. Εν συντομία, τέσσερα στελέχη από τα σφάγια, ένα στέλεχος από τα σιφώνια του καθαρού τμήματος του σφαγείου, ένα στέλεχος από το δέρμα βοοειδών και ένα στέλεχος από το νερό πλυσίματος των σφάγιων χαρακτηρίστηκαν ως μοριακός ορότυπος IIa (29,2% των στελεχών), ενώ δύο στελέχη από το δέρμα και ένα στέλεχος από τον κύλινδρο εκδοράς χαρακτηρίστηκαν ως μοριακός ορότυπος IIb (12,5% των στελεχών). Επιπλέον, εννέα στελέχη από τα σφάγια, δύο στελέχη από το νερό πλυσίματος των σφάγιων, ένα στέλεχος από τα σιφώνια του καθαρού τμήματος του σφαγείου και ένα στέλεχος από το μαχαίρι του καθαρού τμήματος στο τέλος της διαδικασίας σφαγής χαρακτηρίστηκαν ως μοριακός ορότυπος IIc (54,2% των στελεχών). Στο μοριακό ορότυπο IVb ανήκε ένα στέλεχος που απομονώθηκε από το δέρμα (4,1% των στελεχών).

Όσον αφορά την εποχή, 10 στελέχη *L. monocytogenes* απομονώθηκαν το φθινόπωρο και τα υπόλοιπα 14 στελέχη απομονώθηκαν την άνοιξη. Γενικά, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές σημαντικές διαφορές ως προς τον επιπολασμό της *L. monocytogenes* στα

σφάγια, το δέρμα και το περιβάλλον ανά εποχή (p-value = 0,515 > 0,05). Το ίδιο παρατηρήθηκε και όταν εξετάστηκε το κάθε ενδιαίτημα ξεχωριστά (p-value = 0,105 > 0,05 για τα σφάγια, p-value = 0,306 > 0,05 για το δέρμα και p-value = 0,5 > 0,05 για το περιβάλλον του σφαγείου). Το φθινόπωρο επικράτησε η απομόνωση στελεχών μοριακού ορότυπου Πα από το περιβάλλον του σφαγείου και τα σφάγια, σε αντίθεση με την άνοιξη όπου κυριάρχησε ο μοριακός ορότυπος Πς. Τα στελέχη *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν, η προέλευσή τους και η εποχή απομόνωσής τους παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Προέλευση και εποχή απομόνωσης των απομονωθέντων στελεχών *L. monocytogenes*.

A/a	Στέλεχος	Προέλευση	Εποχή
1	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Φθινόπωρο
2	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Φθινόπωρο
3	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Φθινόπωρο
4	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Φθινόπωρο
5	<i>L. monocytogenes</i>	Σιφώνι καθαρού τμήματος σφαγείου	Φθινόπωρο
6	<i>L. monocytogenes</i>	Νερό πλυσίματος σφάγιων	Φθινόπωρο
7	<i>L. monocytogenes</i>	Κύλινδρος εκδοράς βοοειδών	Φθινόπωρο
8	<i>L. monocytogenes</i>	Δέρμα βοοειδούς	Φθινόπωρο
9	<i>L. monocytogenes</i>	Δέρμα βοοειδούς	Φθινόπωρο
10	<i>L. monocytogenes</i>	Δέρμα βοοειδούς	Φθινόπωρο
11	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Άνοιξη
12	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Άνοιξη
13	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Άνοιξη
14	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Άνοιξη
15	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Άνοιξη
16	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Άνοιξη
17	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Άνοιξη
18	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Άνοιξη
19	<i>L. monocytogenes</i>	Σφάγιο βοοειδούς	Άνοιξη
20	<i>L. monocytogenes</i>	Νερό πλυσίματος σφάγιων	Άνοιξη
21	<i>L. monocytogenes</i>	Νερό πλυσίματος σφάγιων	Άνοιξη
22	<i>L. monocytogenes</i>	Σιφώνι καθαρού τμήματος σφαγείου	Άνοιξη
23	<i>L. monocytogenes</i>	Μαχαίρι καθαρού τμήματος (τέλος διαδικασίας σφαγής)	Άνοιξη
24	<i>L. monocytogenes</i>	Δέρμα βοοειδούς	Άνοιξη

B.3.2. Διερεύνηση πιθανών συγγενειών μεταξύ των στελεχών *L. monocytogenes*

Η εξέταση του δένδρογράμματος κύριων φασμάτων των στελεχών *L. monocytogenes* (Διάγραμμα 2) με τιμή διαχωρισμού (cut-off value) στα 650 distance level, αποκάλυψε την ύπαρξη τριών συμπλεγμάτων. Το σύμπλεγμα Α περιλαμβάνει τέσσερα στελέχη, δύο

στελέχη από σφάγια και δύο από δέρμα. Το σύμπλεγμα Β περιλαμβάνει τρία στελέχη, ένα στέλεχος από τον κύλινδρο εκδοράς, ένα στέλεχος από σφάγιο και ένα στέλεχος από δέρμα. Αντίστοιχα, το σύμπλεγμα Γ περιλαμβάνει 17 στελέχη (10 στελέχη από σφάγια, τρία στελέχη από νερό πλυσίματος σφάγιων, δύο στελέχη από σιφόνια καθαρού τμήματος του σφαγείου, ένα στέλεχος από μαχαίρι καθαρού τμήματος του σφαγείου και ένα στέλεχος από δέρμα). Και στα τρία συμπλέγματα παρατηρήθηκε μεγάλου βαθμού συγγένεια μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από δείγματα τόσο της ίδιας ημέρας δειγματοληψίας όσο και διαφορετικών εποχών. Η μεγαλύτερου βαθμού συγγένεια μεταξύ στελεχών (<100 distance level) παρατηρήθηκε σε στελέχη του συμπλέγματος Γ που απομονώθηκαν το φθινόπωρο και την άνοιξη από σφάγια, νερό πλυσίματος σφάγιων και σιφόνια του καθαρού τμήματος που παροχέτευαν το νερό πλυσίματος των σφάγιων.

B.3.3. Αξιολόγηση παραγωγής βιοϋμενίων από τα στελέχη *L. monocytogenes*

Από τα 24 απομονωθέντα στελέχη *L. monocytogenes*, τα εννέα εμφάνισαν ισχυρή ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων, τα 14 μέτρια ικανότητα και ένα στέλεχος ασθενή ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων (Πίνακας 7). Τα στελέχη που παρουσίασαν ισχυρή ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων απομονώθηκαν από σφάγια βοοειδών (πέντε στελέχη, εκ των οποίων τα δύο απομονώθηκαν το φθινόπωρο και τα τρία την άνοιξη), από δέρμα βοοειδών (ένα στέλεχος που απομονώθηκε το φθινόπωρο) και από το περιβάλλον του σφαγείου (τρία στελέχη, απομονωθέντα το φθινόπωρο από ένα σιφόνι του καθαρού τμήματος του σφαγείου, τον κύλινδρο εκδοράς και το νερό πλυσίματος των σφάγιων). Από τα παραπάνω στελέχη, τέσσερα ανήκουν στον μοριακό ορότυπο IIa, τρία στον μοριακό ορότυπο IIc και από ένα στέλεχος ανήκει στους μοριακούς ορότυπους IIb και IVb. Αντίστοιχα, τα στελέχη που παρουσίασαν μέτρια ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων απομονώθηκαν από σφάγια (οκτώ στελέχη, εκ των οποίων τα δύο απομονώθηκαν το φθινόπωρο και τα έξι απομονώθηκαν την άνοιξη), από δέρμα βοοειδών (τρία στελέχη, εκ των οποίων τα δύο απομονώθηκαν το φθινόπωρο και το ένα την άνοιξη) και από το περιβάλλον του σφαγείου (τρία στελέχη απομονωθέντα την άνοιξη, εκ των οποίων το ένα προερχόταν από το νερό πλυσίματος των σφάγιων, το ένα από σιφόνι του καθαρού τμήματος του σφαγείου και το τελευταίο από μαχαίρι του καθαρού τμήματος του σφαγείου στο τέλος της διαδικασίας σφαγής). Εννέα, τρία και δύο από αυτά τα στελέχη ανήκουν στους μοριακούς ορότυπους IIc, IIa και IIb αντίστοιχα. Ένα στέλεχος που απομονώθηκε την άνοιξη από νερό πλυσίματος σφάγιων και που ανήκει στο μοριακό ορότυπο IIc παρουσίασε ασθενή ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων. Δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ του ορότυπου των απομονωθέντων στελεχών και της ικανότητάς τους να παράγουν βιοϋμενία ($p\text{-value} = 0,56 > 0,05$).

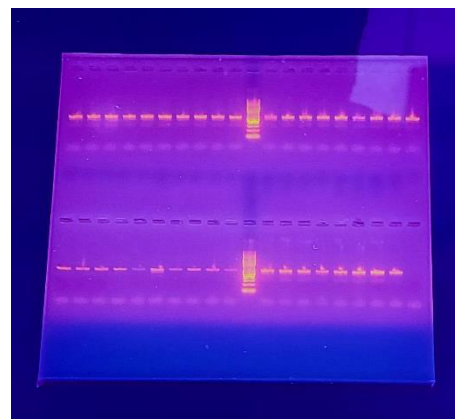
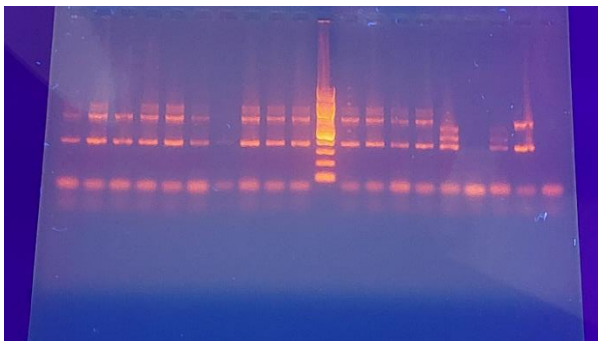
B.3.4. Έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών *L. monocytogenes* στα αντιβιοτικά

Τα περισσότερα στελέχη, εκτός από ένα, εμφάνισαν αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό. Συνολικά παρατηρήθηκαν έξι διαφορετικά προφίλ μικροβιακής αντοχής

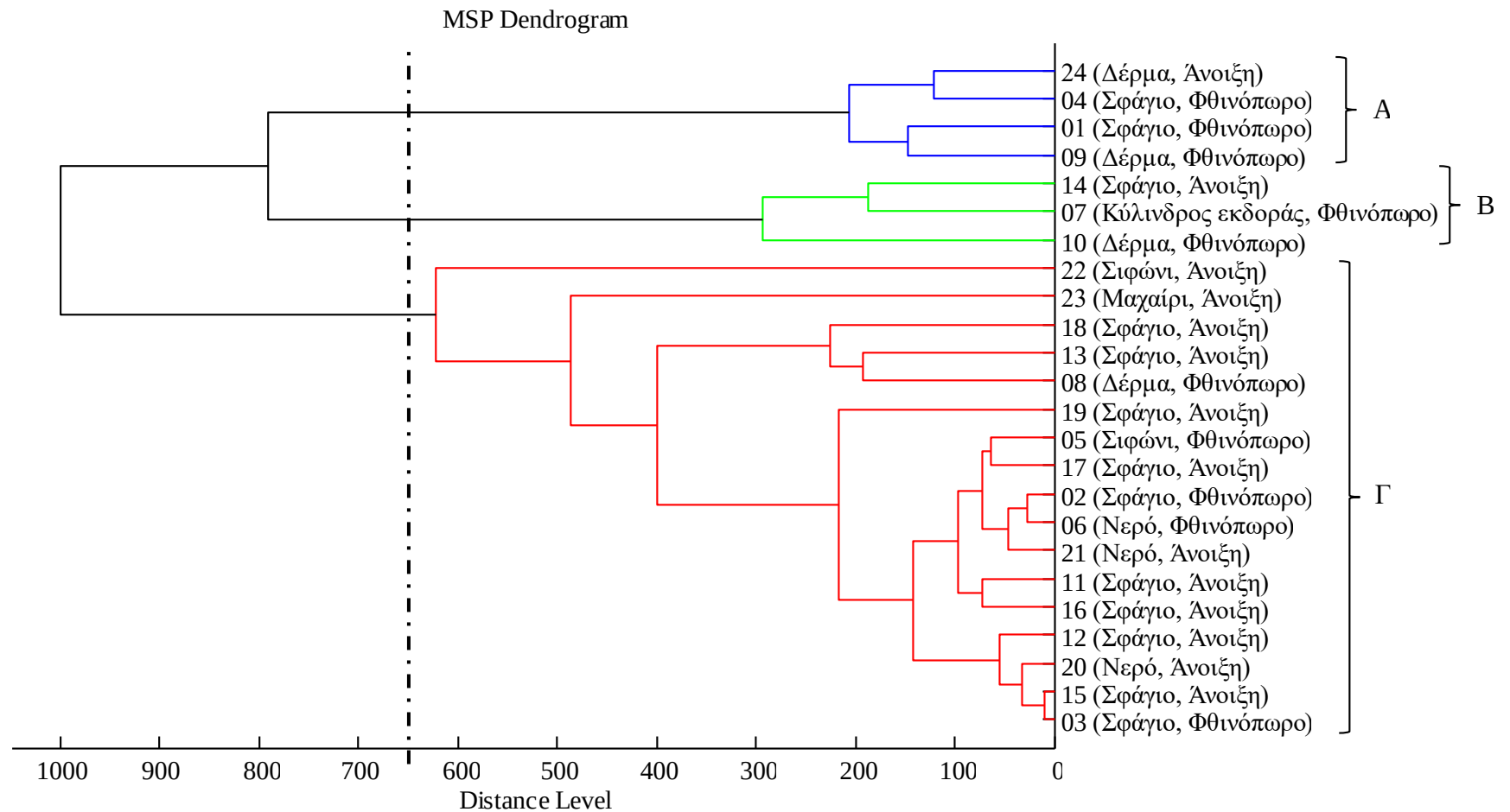
(Πίνακας 7). Αντοχή στην κλινδαμυκίνη παρατηρήθηκε στα 23 από τα 24 στελέχη, ενώ μεγάλα ποσοστά αντοχής παρατηρήθηκαν επίσης στην βανκομυκίνη (10 στελέχη) και στην τετρακυκλίνη (έξι στελέχη). Από ένα στέλεχος εμφάνισε επιπλέον αντοχή στην σιπροφλοξασίνη και στην τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη. Όλα τα στελέχη είναι ευαίσθητα στην αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, την αμπικιλλίνη, τη χλωραμφαινικόλη, την ερυθρομυκίνη, τη γενταμυκίνη, τη μεροπενέμη, την πενικιλλίνη και τη ριφαμπικίνη. Τρία στελέχη χαρακτηρίζονται ως πολυανθεκτικά, καθώς εμφάνισαν αντοχή σε τουλάχιστον τρεις κατηγορίες αντιμικροβιακών φαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα, δύο στελέχη που απομονώθηκαν από σιφώνια του καθαρού τμήματος του σφαγείου επιδεικνύουν αντοχή σε τρία αντιβιοτικά (κλινδαμυκίνη, τετρακυκλίνη, βανκομυκίνη) και ένα στέλεχος από το νερό πλυσίματος των σφάγιων επιδεικνύει αντοχή σε τέσσερα αντιβιοτικά (σιπροφλοξασίνη, κλινδαμυκίνη, τετρακυκλίνη, βανκομυκίνη).

B.3.5. Ανίχνευση γονιδίων λοιμογονικότητας στα στελέχη *L. monocytogenes*

Όλα τα στελέχη *L. monocytogenes* διέθεταν τα γονίδια *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *hlyA* και *iap*. Ωστόσο, δύο, πέντε και επτά στελέχη δε διέθεταν το γονίδιο *plcA*, *prfA* και *inlB* αντίστοιχα. Σε τέσσερα στελέχη ανιχνεύτηκαν οκτώ από τα εννέα γονίδια (τρία στελέχη απομονωμένα από σφάγια και ένα στέλεχος απομονωμένο από τον κύλινδρο εκδοράς), σε δύο στελέχη ανιχνεύτηκαν επτά από τα εννέα γονίδια (απομονωμένα από δέρμα) και σε δύο στελέχη ανιχνεύτηκαν έξι από τα εννέα γονίδια λοιμογονικότητας (το ένα στέλεχος απομονωμένο από δέρμα και το άλλο από σιφώνι του καθαρού τμήματος του σφαγείου). Τα υπόλοιπα 16 στελέχη διέθεταν όλα τα γονίδια λοιμογονικότητας που αναζητήθηκαν. Αναλυτικότερα στοιχεία για τα γονίδια λοιμογονικότητας που ανιχνεύτηκαν ανά στέλεχος παρατίθενται στον Πίνακα 7.



Εικόνα 5. α) Μοριακή οροτυποποίηση των στελεχών *L. monocytogenes* (αριστερά), β) Ανίχνευση γονιδίων λοιμογονικότητας (*inlA* και *actA*) στα στελέχη *L. monocytogenes* (δεξιά).



Διάγραμμα 2. Δενδρόγραμμα κύριων φασμάτων (main spectra dendrogram) των στελεχών *L. monocytogenes* (αριθμός στελέχους, προέλευση και εποχή απομόνωσης).

Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά των απομονωθέντων στελεχών *L. monocytogenes*.

Στέλεχος	Μοριακός ορότυπος ¹	Γονίδια λοιμογονικότητας	Προφίλ μικροβιακής αντοχής	Παραγωγή βιοϋμενίων ²
1	IIa	<i>inlA, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI	++
2	IIa	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI, VAN	+++
3	IIa	<i>inlA, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI, TET	+++
4	IIa	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI	++
5	IIa	<i>inlA, inlC, inlJ, actA, hlyA, iap</i>	CLI, TET, VAN	+++
6	IIa	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI	+++
7	IIb	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, actA, hlyA, iap</i>	CLI, VAN	+++
8	IIb	<i>inlA, inlC, inlJ, plcA, actA, hlyA, iap</i>	CLI, SXT	++
9	IIb	<i>inlA, inlC, inlJ, actA, hlyA, iap</i>	CLI, VAN	++
10	IVb	<i>inlA, inlC, inlJ, plcA, actA, hlyA, iap</i>	CLI	+++
11	IIc	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI	+++
12	IIc	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI	++
13	IIc	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI, VAN	+++
14	IIc	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI	++
15	IIc	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI, VAN	++
16	IIc	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI, TET	++
17	IIc	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	-	++
18	IIc	<i>inlA, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI, VAN	+++
19	IIc	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI	++
20	IIc	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI	+
21	IIc	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CIP, CLI, TET, VAN	++
22	IIc	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI, TET, VAN	++
23	IIc	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI, TET	++
24	IIa	<i>inlA, inlB, inlC, inlJ, plcA, prfA, actA, hlyA, iap</i>	CLI, VAN	++

¹ Ο μοριακός ορότυπος IIa περιλαμβάνει τους ορότυπους 1/2a και 3a, ο μοριακός ορότυπος IIb περιλαμβάνει τους ορότυπους 1/2b και 3b, ο μοριακός ορότυπος IIc περιλαμβάνει τους ορότυπους 1/2c, 3c και 7, ενώ ο μοριακός ορότυπος IVb περιλαμβάνει τους ορότυπους 4b, 4d και 4e.

² + = ασθενής παραγωγή βιοϋμενίων, ++ = μέτρια παραγωγή βιοϋμενίων, +++ = ισχυρή παραγωγή βιοϋμενίων.

B.4. Συζήτηση

Η *L. monocytogenes* είναι ένας παθογόνος μικροοργανισμός που προκαλεί σοβαρό τροφιμογενές νόσημα, ιδιαίτερα σε άτομα που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου. Το ατελώς μαγειρεμένο βόειο κρέας έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση λιστερίωσης στον άνθρωπο. Το βακτήριο έχει αναπτύξει μια πληθώρα μηχανισμών προσαρμογής σε αντίξοες συνθήκες. Για παράδειγμα, η ψύξη, η οποία αποτελεί το συχνότερο μέτρο ελέγχου της αλλοίωσης και του μικροβιακού πληθυσμού στο κρέας, δεν αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό της *L. monocytogenes* καθώς αυτή μπορεί να πολλαπλασιασθεί σε θερμοκρασίες μικρότερες των 7°C. Για αυτό το λόγο απαιτούνται συμπληρωματικά μέτρα για τον έλεγχο της ανάπτυξης της στα τρόφιμα (Econoμου και συν., 2022). Επιπλέον, το βακτήριο μέσω της παραγωγής βιοϋμενίων είναι ικανό να επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα και στο περιβάλλον εκτροφών ή βιομηχανικών τροφίμων. Έτσι, το περιβάλλον καθίσταται δεξαμενή του μικροοργανισμού και μέσω αυτού μπορεί να μολύνει το κρέας με *Listeria*. Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η επιδημιολογία του μικροοργανισμού, κρίνεται απαραίτητος ο προσδιορισμός του επιπολασμού και ο χαρακτηρισμός στελεχών *L. monocytogenes* που απομονώνονται από το βόειο κρέας και το περιβάλλον «από τον στάβλο στο πιάτο» (from farm to fork), η εύρεση πιθανών συγγενειών μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών και η διερεύνηση των πιθανότερων οδών μόλυνσης του περιβάλλοντος και του κρέατος από το συγκεκριμένο βακτήριο.

Στην παρούσα μελέτη, απομονώθηκαν 13 στελέχη *L. monocytogenes* από σφάγια βοοειδών (21,7%, 95% CI = 12,1% – 34,2%). Τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνούν με αυτά άλλων ερευνών. Πιο συγκεκριμένα, οι Barros και συν. (2007) επιχείρησαν να προσδιορίσουν την επίπτωση της *L. monocytogenes* σε σφάγια βοοειδών από 11 βιομηχανίες τυποποίησης κρέατος στην πολιτεία Paraná στη Βραζιλία. Οι ερευνητές ανίχνευαν τον μικροοργανισμό σε επτά σφάγια, καταγράφοντας ποσοστό επίπτωσης 25,9%. Οι Peccio και συν. (2003) συνέλεξαν δείγματα από 26 σφάγια βοοειδών με μη καταστρεπτική μέθοδο από σφαγείο στη βορειοανατολική Ιταλία. Θετικά στον μικροοργανισμό βρέθηκαν τέσσερα σφάγια (15,38% των δειγμάτων). Αντίστοιχα, οι Khen και συν. (2015) ανίχνευαν το βακτήριο στο 14% των δειγμάτων (56 από τα 400 σφάγια) που συνέλεξαν από μεγάλο βιομηχανικό σφαγείο της Ιρλανδίας. Παρομοίως, οι Zhao και συν. (2021) απομόνωσαν τον μικροοργανισμό σε 11 από τα 71 δείγματα σφάγιων βοοειδών (15,5%) που συνέλεξαν σε πέντε διαφορετικά σφαγεία της βορειοανατολικής Κίνας. Σε άλλες περιοχές της νοτιοδυτικής, βορειοδυτικής και βορειοανατολικής Κίνας, οι Zhu και συν., (2012) συνέλεξαν με τη χρήση σπόγγων κυτταρίνης δείγματα από την επιφάνεια βόειων σφάγιων σε τρία διαφορετικά σφαγεία. Ο συνολικός επιπολασμός του βακτηρίου ήταν 31,3% (21 στα 67 δείγματα), ωστόσο παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των τριών σφαγείων. Στο πρώτο σφαγείο δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος από τα σφάγια (μεταξύ 22 δειγμάτων), στο δεύτερο σφαγείο απομονώθηκε σε 19 από 20 σφάγια βοοειδών (95%) ενώ στο τρίτο σφαγείο απομονώθηκε σε δύο από τα 25 δείγματα σφάγιων (8%).

Ωστόσο, άλλες μελέτες αναφέρουν μεγαλύτερα ή μικρότερα ποσοστά επιπολασμού της *L. monocytogenes* στα βόεια σφάγια. Για παράδειγμα, οι Demaître και συν. (2020) αναφέρουν ότι το 45,6% των βόειων σφάγιων ήταν θετικό στη *L. monocytogenes*. Οι ερευνητές συνέλεξαν δείγματα από οκτώ διαφορετικά σημεία των σφάγιων σε τρία διαφορετικά σφαγεία στο Βέλγιο. Διαφορές στον επιπολασμό παρατηρήθηκαν μεταξύ των σφαγείων, καθώς στο πρώτο σφαγείο ο επιπολασμός του βακτηρίου στα βόεια σφάγια ήταν 73,3%, στο δεύτερο σφαγείο ο επιπολασμός ήταν 40,0% και στο τρίτο σφαγείο ο επιπολασμός ήταν 23,3%. Τα μεγαλύτερα ποσοστά απομόνωσης του μικροοργανισμού παρατηρήθηκαν σε δείγματα από το οπίσθιο άκρο (13,3%) και το στήθος (11,1%), ακολουθούμενα από αυτά του πρόσθιου άκρου, της λάπας, της χώρας της πνέλου και του τραχήλου (10% έκαστο). Ένα χρόνο αργότερα, οι Demaître και συν. (2021) συγκέντρωσαν δείγματα από βόεια σφάγια σε τέσσερα διαφορετικά σφαγεία του Βελγίου. Παρομοίως, ο επιπολασμός του βακτηρίου στα βόεια σφάγια ήταν 43%, με διαφορές ωστόσο μεταξύ των σφαγείων. Συγκεκριμένα ο επιπολασμός του μικροοργανισμού στα βόεια σφάγια από τα τέσσερα σφαγεία ήταν 77%, 50%, 17% και 27% αντίστοιχα. Επιπλέον, το οπίσθιο άκρο ήταν και πάλι το συχνότερα μολυσμένο σημείο του σφάγιου (29%), ακολουθούμενο από το στήθος (22%) και το πρόσθιο άκρο (13%). Αντίθετα, οι Ayaz και συν. (2018) συνέλεξαν δείγματα από τρία σφαγεία της Τουρκίας και σημειώνουν πως ο επιπολασμός του βακτηρίου στα βόεια σφάγια ήταν μόλις 3,4%. Παρομοίως αναφέρεται ότι ο επιπολασμός του μικροοργανισμού σε σφάγια βοοειδών από την Πολωνία ήταν 2,5% (Wieczorek και συν., 2012). Οι Madden και συν. (2001) αναφέρουν πως δεν ανιχνεύτηκε ο μικροοργανισμός σε 200 δείγματα σφάγιων που συλλέχτηκαν με καταστρεπτική μέθοδο από 10 σφαγεία της Βόρειας Ιρλανδίας. Οι διαφορετικοί επιπολασμοί που παρατηρήθηκαν συγκριτικά με την παρούσα μελέτη, οφείλονται πιθανότατα στις διαφορετικές τεχνικές δειγματοληψίας και απομόνωσης του μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκαν, στον μεγαλύτερο αριθμό σημείων δειγματοληψίας ανά σφάγιο, καθώς και στις διακυμάνσεις που εμφανίζουν οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* στα σφάγια των βοοειδών ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή (Guerini και συν., 2007; Khen και συν., 2015; Demaître και συν., 2021).

Σε αυτή τη μελέτη απομονώθηκαν από το δέρμα των βοοειδών συνολικά τέσσερα στελέχη *L. monocytogenes* (6,7%, 95% CI = 1,8% - 16,2%). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και σε άλλες μελέτες. Οι Takahashi και συν. (2007) συνέλεξαν 60 δείγματα δέρματος βοοειδών από ένα σφαγείο στην Ιαπωνία. Τρία από αυτά τα δείγματα (5%) βρέθηκαν θετικά στον μικροοργανισμό. Αντίστοιχα, οι Wieczorek και συν. (2012) απομόνωσαν τον μικροοργανισμό σε 44 από 406 δείγματα δέρματος βοοειδών (10,8%) που συλλέχθηκαν με τη χρήση σπόγγων κυτταρίνης σε ένα σφαγείο στην Πολωνία. Τέλος, οι Zhao και συν. (2021) συνέλεξαν δείγματα δέρματος από γαλακτοπαραγωγά και κρεοπαραγωγά βοοειδή σε 10 εκτροφές και πέντε σφαγεία της Κίνας. Ο επιπολασμός του μικροοργανισμού στο δέρμα βοοειδών στα σφαγεία ήταν 10,5%, παρότι σε επίπεδο εκτροφής δεν απομονώθηκε *L. monocytogenes* από τα δείγματα δέρματος.

Άλλες μελέτες αναφέρουν διαφορετικά ποσοστά επιπολασμού της *L. monocytogenes* στο δέρμα των βοοειδών. Για παράδειγμα, οι Demaître και συν. (2021) αναφέρουν επιπολασμό 93% σε 120 δείγματα δέρματος που συνέλεξαν μη καταστρεπτικά από τέσσερα διαφορετικά σφαγεία του Βελγίου. Τα ποσοστά ήταν ιδιαίτερα μεγάλα και στα τέσσερα σφαγεία με τον επιπολασμό του βακτηρίου στα δύο σφαγεία να είναι 100%, στο

τρίτο σφαγείο 90%, ενώ στο τέταρτο σφαγείο ο επιπολασμός ήταν 83%. Αντίστοιχα, μεγάλα ποσοστά επιπολασμού του παθογόνου στο δέρμα βοοειδών ανέφεραν και οι Khen και συν. (2015), οι οποίοι, μετά την εξέταση 400 δειγμάτων δέρματος βοοειδών από σφαγείο της Ιρλανδίας, ανέφεραν ότι ο μικροοργανισμός απομονώθηκε σε 106 δείγματα (27%). Ο μεγαλύτερος επιπολασμός που παρατηρήθηκε στις αναφερθείσες μελέτες συγκριτικά με την παρούσα μελέτη, οφείλεται, όπως και στην περίπτωση των σφάγιων, στον μεγαλύτερο αριθμό σημείων δειγματοληψίας ανά δέρμα, καθώς και στις διακυμάνσεις του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στο δέρμα των βοοειδών ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή (Guerini και συν., 2007; Khen και συν., 2015; Demaître και συν., 2021). Ωστόσο, μερικές μελέτες σημειώνουν πως παρατηρούνται διαφορές στον επιπολασμό του βακτηρίου στο δέρμα μεταξύ των σφαγείων, ακόμα και αν αυτά βρίσκονται στην ίδια χώρα. Οι Zhu και συν. (2012) πραγματοποίησαν δειγματοληψία σε δέρματα βοοειδών από τρία διαφορετικά σφαγεία της Κίνας. Παρότι σε δύο από αυτά δεν απομονώθηκε ο μικροοργανισμός στο δέρμα, στο τρίτο σφαγείο ανιχνεύτηκε σε 16 από 21 δείγματα δέρματος (76,2%). Αντίστοιχα, οι Rivera-Betancourt και συν. (2004) συνέλεξαν δείγματα από το δέρμα βοοειδών σε δύο απομακρυσμένα γεωγραφικά σφαγεία των ΗΠΑ. Στο πρώτο σφαγείο ο επιπολασμός του μικροοργανισμού στο δέρμα ήταν 18,7%, ενώ στο δεύτερο σφαγείο ο επιπολασμός ήταν μόλις 0,8%. Οι διακυμάνσεις αυτές αποδίδονται στο διαφορετικό βαθμό ρυπαρότητας του δέρματος των βοοειδών που δέχεται προς σφαγή το εκάστοτε σφαγείο, καθώς και στην ανεπαρκή εφαρμογή των κανόνων ορθής βιομηχανικής και υγιεινής πρακτικής από μερικά σφαγεία.

Στην παρούσα έρευνα ανιχνεύτηκαν επτά στελέχη *L. monocytogenes* από το περιβάλλον του σφαγείου (8,8%, 95% CI = 3,6% – 17,2%), τα οποία απομονώθηκαν από σιφόνια του καθαρού τμήματος του σφαγείου, από τον κύλινδρο εκδοράς, από μαχαίρι του καθαρού τμήματος στο τέλος της διαδικασίας σφαγής και από το νερό πλυσίματος των σφάγιων. Οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας. Πιο συγκεκριμένα, οι Demaître και συν. (2021) συγκέντρωσαν 252 περιβαλλοντικά δείγματα από το περιβάλλον τεσσάρων σφαγείων του Βελγίου και απομόνωσαν 17 στελέχη *L. monocytogenes* (7%) από μαχαίρια, πλατφόρμες εκσπλαχνισμού και κυλίνδρους εκδοράς. Οι Jang και συν. (2021) απομόνωσαν οκτώ στελέχη *L. monocytogenes* από γάντια εργατών, πριόνια διχοτόμησης και σιφόνια από σφαγεία στην Κορέα, σημειώνοντας επιπολασμό 14,8% στο περιβάλλον του σφαγείου. Επιπλέον, οι Barros και συν. (2007) συνέλεξαν δείγματα από το περιβάλλον (πάτωμα, σιφόνια, τοίχοι) και τον εξοπλισμό (μαχαίρια, πριόνια, γάντζοι, κιβώτια, επιφάνειες) από σφαγεία και βιομηχανίες τροφίμων στην Βραζιλία. Οι ερευνητές αναφέρουν πως ο επιπολασμός του βακτηρίου στο περιβάλλον ήταν 8,7%, ενώ στον εξοπλισμό ήταν 9,2%. Αντίστοιχα, οι Akkaya και συν. (2008) συγκέντρωσαν δείγματα από το περιβάλλον (πάτωμα, τοίχοι, πάτωμα και τοίχοι ψυγείων, πάτωμα και τοίχοι κελιών μεταφοράς), τον εξοπλισμό (γάντζοι, επιφάνειες κοπής, μαχαίρια), τους εργάτες (χέρια, ενδύματα) και το νερό πλυσίματος των σφάγιων από πέντε σφαγεία στην Τουρκία. Τα ποσοστά απομόνωσης του μικροοργανισμού στο περιβάλλον, τον εξοπλισμό, τους εργάτες και το νερό ήταν 4,37%, 15%, 5,71% και 0% αντίστοιχα. Τέλος, οι Zhao και συν. (2021) συνέλεξαν 149 δείγματα από το περιβάλλον πέντε σφαγείων στην Κίνα (μαχαίρια, νερό πλυσίματος, επιφάνειες κοπής και άλλα αντικείμενα εξοπλισμού). Στελέχη απομονώθηκαν μόνο από τα μαχαίρια και τις επιφάνειες κοπής, με τον επιπολασμό του βακτηρίου στο περιβάλλον να διαμορφώνεται στο 6%. Σύμφωνα με τον γράφοντα, η παρούσα έρευνα είναι η πρώτη έρευνα, τουλάχιστον στην Ελλάδα, που αναφέρει την απομόνωση στελεχών *L.*

monocytogenes από το νερό πλυσίματος σφάγιων, υπογραμμίζοντας έτσι την επικινδυνότητα μόλυνσης των σφάγιων από αυτό.

Αν και οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν παρόμοια με την παρούσα μελέτη ποσοστά επιπολασμού του μικροοργανισμού στο περιβάλλον του σφαγείου, παρατηρούνται κάποιες διαφορές αναφορικά με το είδος του περιβαλλοντικού δείγματος όπου απομονώνεται το παθογόνο. Οι Zhu και συν. (2012) αναφέρουν πως ο επιπολασμός της *L. monocytogenes* σε δείγματα του περιβάλλοντος ενός σφαγείου στην Κίνα, όπως πάτωμα, γάντζοι, επιφάνειες κοπής και κιβώτια, ήταν 100%. Ωστόσο, το ποσοστό αυτό μπορεί να είναι υπερεκτιμημένο, καθώς συλλέχθηκαν μόλις έξι δείγματα. Οι σημαντικότερες διαφορές παρατηρήθηκαν ως προς την επίδραση της διαδικασίας σφαγής στα ποσοστά απομόνωσης στελεχών *L. monocytogenes* από τα μαχαίρια. Στην παρούσα μελέτη δεν απομονώθηκαν στελέχη *L. monocytogenes* από τα μαχαίρια στην αρχή και τη μέση της διαδικασίας σφαγής, αλλά απομονώθηκε ένα στέλεχος από μαχαίρια του καθαρού τμήματος στο τέλος της διαδικασίας σφαγής. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με συγκεκριμένες μελέτες, που απομόνωσαν στελέχη του μικροοργανισμού σε περιβαλλοντικά δείγματα ακόμα και πριν την έναρξη της διαδικασίας σφαγής. Για παράδειγμα, οι Demaître και συν. (2021) και οι Peccio και συν. (2003) απομόνωσαν στελέχη του μικροοργανισμού στην αρχή, τη μέση και το τέλος της διαδικασίας σφαγής βοοειδών σε τέσσερα σφαγεία του Βελγίου και ένα σφαγείο της Ιταλίας αντίστοιχα. Παρομοίως, οι Rivera-Betancourt και συν. (2004) ανίχνευσαν στελέχη του βακτηρίου σε πριόνι διχοτόμησης πριν την έναρξη της διαδικασίας σφαγής και σε σιφώνι στο τέλος της σφαγής σε δύο σφαγεία των ΗΠΑ, ενώ οι Camargo και συν. (2015) απομόνωσαν στελέχη από επιφάνειες κοπής και χέρια εργατών στην αρχή και το τέλος της διαδικασίας σφαγής από ένα σφαγείο της Βραζιλίας. Η απομόνωση στελεχών *L. monocytogenes* σε περιβαλλοντικά δείγματα πριν από την έναρξη της σφαγής υποδηλώνει ανεπαρκή μέτρα υγιεινής και καθαρισμού του εξοπλισμού ή επιβίωση του μικροοργανισμού στο περιβάλλον. Αν και στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν στελέχη *L. monocytogenes* από τα μαχαίρια μόνο στο τέλος της διαδικασίας σφαγής, απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των μέτρων υγιεινής και καθαρισμού έναντι του συγκεκριμένου μικροοργανισμού.

Σε αντίθεση με το περιβάλλον του σφαγείου, στην παρούσα μελέτη δεν απομονώθηκαν στελέχη *L. monocytogenes* από το περιβάλλον της εκτροφής (ποτίστρες, ταΐστρες, τοίχοι, πατώματα). Αντίστοιχα, οι Zhao και συν. (2021) ανέφεραν μόλις 0,5% επιπολασμό της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον βόειων εκτροφών της Κίνας. Τα περισσότερα στελέχη απομονώθηκαν από κόπρανα και νωπό γάλα, ενώ δύο στελέχη (1%) απομονώθηκαν από ταΐστρες και ένα στέλεχος (0,8%) απομονώθηκε από ποτίστρες. Αντίστοιχα, οι Hasegawa και συν. (2014) συνέλεξαν 1738 δείγματα κοπράνων κρεοπαραγωγών βοοειδών από 130 εκτροφές σε τρεις διαφορετικές περιοχές στην Ιαπωνία. Ο επιπολασμός του μικροοργανισμού ήταν της τάξεως του 6%, με διαφορές ωστόσο μεταξύ των περιοχών. Πιο συγκεκριμένα, στη βόρεια, κεντρική και νότια Ιαπωνία ο επιπολασμός του βακτηρίου στα κόπρανα ήταν 11,4%, 2,8% και 2,9% αντίστοιχα. Ακόμα μεγαλύτερα ποσοστά επιπολασμού της *L. monocytogenes* αναφέρθηκαν στο περιβάλλον εκτροφών γαλακτοπαραγωγών βοοειδών στην Νέα Υόρκη (Charin και συν., 2014). Οι ερευνητές συγκέντρωσαν 588 δείγματα από το έδαφος, το νερό και τα κόπρανα πέντε εκτροφών της πολιτείας της Νέας Υόρκης στις ΗΠΑ. Ο συνολικός επιπολασμός του μικροοργανισμού

στο περιβάλλον ήταν 28%. Τα μεγαλύτερα ποσοστά απομόνωσης του παθογόνου παρατηρήθηκαν στο νερό (51%), ακολουθούμενο από το έδαφος (17%) και τα κόπρανα (16%). Επιπλέον, οι Varsaki και συν. (2022) συνέλεξαν 424 δείγματα από το περιβάλλον 14 εκτροφών γαλακτοπαραγωγών αγελάδων στην Ισπανία. Τα δείγματα αφορούσαν ζωοτροφές, κόπρανα, νωπό γάλα, ταΐστρες, πατώματα και δεξαμενές με λύματα. Συνολικά απομονώθηκαν 211 στελέχη *L. monocytogenes* (49,7%), εκ των οποίων τα 79 στελέχη ανιχνεύτηκαν στα κόπρανα (65%), 36 στελέχη ανιχνεύτηκαν στις ζωοτροφές (29%), έξι στελέχη απομονώθηκαν από το νωπό γάλα (10%) και τα υπόλοιπα 90 στελέχη απομονώθηκαν από τις ταΐστρες, τα πατώματα και τις δεξαμενές με λύματα (79%). Η διαφορετική παραγωγική κατεύθυνση των βοοειδών, ο μεγαλύτερος αριθμός σημείων δειγματοληψίας από το περιβάλλον των εκτροφών και ο υψηλότερος αριθμός δειγμάτων εξηγούν τις διαφορές στα αποτελέσματα συγκριτικά με την παρούσα μελέτη.

Εκτός από την *L. monocytogenes*, από την πλειονηφία των δειγμάτων απομονώθηκαν και στελέχη *Listeria* spp.. Πιο συγκεκριμένα, στελέχη του γένους *Listeria* ανιχνεύτηκαν στο σύνολο των σφάγιων, στο 96,7% των δειγμάτων δέρματος, στο 87,5% των περιβαλλοντικών δειγμάτων του σφαγείου και στο 60% των δειγμάτων της εκτροφής. Αν εξαιρέσουμε τη *L. monocytogenes*, άλλα είδη *Listeria* spp. απομονώθηκαν από το 78,3% των σφάγιων, από το 90% των δειγμάτων δέρματος, από το 78,8% των περιβαλλοντικών δειγμάτων του σφαγείου (78,8% των δειγμάτων) και από το σύνολο των δειγμάτων της εκτροφής που ανιχνεύτηκαν στελέχη. Με εξαίρεση το περιβάλλον της εκτροφής, τα υπόλοιπα ποσοστά επιπολασμού των *Listeria* spp. είναι από τα υψηλότερα που έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία. Οι Varsaki και συν. (2022) αναφέρουν πως ο επιπολασμός των *Listeria* spp. σε περιβαλλοντικά δείγματα εκτροφών γαλακτοπαραγωγών αγελάδων, καθώς και σε δείγματα ζωοτροφών, νωπού γάλακτος και κοπράνων ήταν 97%, 94%, 69% και 94% αντίστοιχα. Στα περιβαλλοντικά δείγματα και στα δείγματα κοπράνων υπερτερούσε η *L. monocytogenes*, ενώ στα δείγματα ζωοτροφών και νωπού γάλακτος άλλα είδη του γένους *Listeria* εμφάνισαν μεγαλύτερα ποσοστά. Ωστόσο, οι Zhao και συν. (2021) αναφέρουν πολύ μικρότερα ποσοστά επιπολασμού των *Listeria* spp. στο περιβάλλον των εκτροφών (5,3%), με τα περισσότερα απομονωθέντα στελέχη να ανήκουν στο είδος *L. innocua*. Επιπλέον, οι ερευνητές σημειώνουν πως ο επιπολασμός των *Listeria* spp. στο δέρμα βοοειδών, τα βόεια σφάγια και το περιβάλλον του σφαγείου ήταν 38,2%, 39,4% και 42,3% αντίστοιχα, με τη *L. innocua* να καταλαμβάνει τα μεγαλύτερα ποσοστά. Αντίστοιχα, οι Takahashi και συν. (2007) απομόνωσαν *Listeria* spp. στα μισά δείγματα δέρματος βοοειδών που συνέλεξαν, ενώ οι Camargo και συν. (2015) αναφέρουν πως ο επιπολασμός των *Listeria* spp. στο περιβάλλον ενός σφαγείου στη Βραζιλία ήταν μόλις 19,7%. Το κυρίαρχο είδος και στις δύο μελέτες ήταν η *L. innocua*. Οι Zhu και συν. (2012), οι οποίοι πραγματοποίησαν δειγματοληψία δέρματος και σφάγιων βοοειδών σε τρία διαφορετικά σφαγεία στην Κίνα, υπογράμμισαν πως παρατηρούνται διαφορές ακόμα και σε σφαγεία της ίδιας χώρας. Για παράδειγμα, ενώ σε ένα σφαγείο της Κίνας απομονώθηκαν *Listeria* spp. από το σύνολο των δειγμάτων δέρματος και σφάγιων που συνέλεξαν, στα άλλα δύο σφαγεία ο επιπολασμός των *Listeria* spp. στο δέρμα και τα σφάγια ήταν 70% / 83,3% και 24% / 45,5% αντίστοιχα. Όπως και με τη *L. monocytogenes*, έτσι και με τα υπόλοιπα είδη του γένους *Listeria*, οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των μελετών μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική μεθοδολογία δειγματοληψίας και ανίχνευσης των μικροοργανισμών που εφαρμόστηκε, καθώς και στις διακυμάνσεις που εμφανίζουν οι πληθυσμοί των *Listeria* spp. ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή (Guerini και συν., 2007; Khen και συν., 2015; Demaître και συν., 2021).

Αναφορικά με την οροτυποποίηση των στελεχών *L. monocytogenes*, στην παρούσα μελέτη τα στελέχη που απομονώθηκαν ανήκαν στους μοριακούς ορότυπους IIa, IIb, IIc και IVb. Υπενθυμίζεται ότι σύμφωνα με την μοριακή οροτυποποίηση αναφέρονται οι μοριακοί ορότυποι IIa (ορότυποι 1/2a και 3a), IIb (ορότυποι 1/2b και 3b), IIc (ορότυποι 1/2c, 3c και 7) και IVb (ορότυποι 4b, 4d και 4e). Πιο συγκεκριμένα, τα περισσότερα στελέχη που απομονώθηκαν από τα σφάγια και το περιβάλλον του σφαγείου ανήκαν στο μοριακό ορότυπο IIc, ακολουθούμενος από τον ορότυπο IIa και στην περίπτωση του περιβάλλοντος και τον IIb, ενώ στα στελέχη από το δέρμα δεν κυριάρχησε κάποιος συγκεκριμένος ορότυπος (IIb, IVb, IIa). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται ποικίλα αποτελέσματα σχετικά με τον επικρατέστερο ορότυπο του βακτηρίου. Η κυριαρχία του μοριακού ορότυπου IIc στο δέρμα, τα σφάγια βοοειδών και το περιβάλλον του σφαγείου σημειώνεται και σε άλλες μελέτες (Zhu και συν., 2012; Camargo και συν., 2015). Οι Demaître και συν. (2020) αναφέρουν πως τα περισσότερα στελέχη που απομόνωσαν από σφάγια βοοειδών σε τρία σφαγεία του Βελγίου ανήκουν στον ορότυπο 1/2c (58%), ακολουθούμενος από τους ορότυπους 4b (23,2%), 1/2a (10,1%), 1/2b (5,8%) και 4a (1,4%). Επιπλέον, σε νεότερη έρευνά τους, οι Demaître και συν. (2021) επαληθεύουν πως ο συχνότερα ευρισκόμενος μοριακός ορότυπος *L. monocytogenes* στα σφάγια βοοειδών στο Βέλγιο είναι ο IIc (51%), με τους ορότυπους IIa (18%), IVb (17%) και IIb (13%) να ακολουθούν. Επίσης, οι ερευνητές αναφέρουν πως στο δέρμα των βοοειδών επικρατούν οι μοριακοί ορότυποι IVb, IIb και IIa (36%, 32% και 29% αντίστοιχα), όπως ακριβώς και στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο, στο περιβάλλον του σφαγείου σημειώνουν πως κυριαρχούν περισσότερο οι μοριακοί ορότυποι IIa και IIb (35% έκαστος) και λιγότερο οι ορότυποι IVb (18%) και IIc (12%). Ακόμα, υπάρχουν έρευνες που αναφέρουν πως ο επικρατέστερος μοριακός ορότυπος στο δέρμα, τα βόεια σφάγια και το περιβάλλον του σφαγείου είναι ο IIa (Takahashi και συν., 2007; Ayaz και συν., 2018). Οι Zhao και συν. (2021) σημειώνουν πως τα στελέχη *L. monocytogenes* που απομόνωσαν από τα σφάγια και το περιβάλλον πέντε σφαγείων στην Κίνα ανήκαν στους ορότυπους 1/2a (70,1%) και 1/2c (29,9%). Αντίστοιχα, οι Khen και συν. (2014) αναφέρουν πως ο πιο συχνά ευρισκόμενος ορότυπος *L. monocytogenes* στο δέρμα και τα βόεια σφάγια ήταν ο 1/2a (58%), ακολουθούμενος από τους ορότυπους 4b (12%), 1/2b (10%) και 1/2c (6%). Η βιβλιογραφία αναφέρει πως ο ορότυπος 1/2a είναι αυτός που απομονώνεται συχνότερα στα τρόφιμα (Zhang και συν., 2007; Papatzimos και συν., 2021). Ο συγκεκριμένος ορότυπος είναι ανθεκτικότερος στις βακτηριοσίνες, συγκριτικά με τους άλλους ορότυπους, και μπορεί να προσαρμοστεί και να επιβιώσει στο δυσμενές περιβάλλον του σφαγείου, καθώς συχνά διαθέτει γενετικά στοιχεία που του προσφέρουν αντοχή σε μέταλλα, απολυμαντικές ουσίες ή άλλα κυτταροτοξικά στοιχεία του περιβάλλοντος (Orsi και συν., 2011). Στην παρούσα εργασία ο μοριακός ορότυπος IIa ήταν ο δεύτερος συχνότερα ευρισκόμενος ορότυπος και απομονώθηκε από αρκετά δείγματα δέρματος, σφαγίων και περιβάλλοντος. Επιπλέον, όλοι οι ορότυποι που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία είναι δυνατό να προκαλέσουν νόσο στον άνθρωπο, ιδιαίτερα οι ορότυποι 4b, 1/2a και 1/2b (Bennett και συν., 2020).

Η εποχικότητα είναι πιθανό να επηρεάζει τις διακυμάνσεις των πληθυσμών της *L. monocytogenes* στο δέρμα, τα σφάγια και το περιβάλλον. Οι Demaître και συν. (2021) αναφέρουν την εποχικότητα ως έναν πιθανό παράγοντα που μπορεί να ευθύνεται για τους πολύ μεγάλους επιπολασμούς του μικροοργανισμού που βρήκαν συγκριτικά με άλλες μελέτες στο δέρμα βοοειδών, τα σφάγια τους και το περιβάλλον των σφαγείων, καθώς οι

δειγματοληψίες τους πραγματοποιήθηκαν ως επί το πλείστον τον χειμώνα και την άνοιξη. Ακόμα, οι Ayaz και συν. (2018) απομόνωσαν έξι στελέχη του μικροοργανισμού από βόεια σφάγια στην Τουρκία τον χειμώνα, αλλά δεν απομόνωσαν κανένα στέλεχος το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Οι Rivera-Betancourt και συν. (2004) πραγματοποίησαν δειγματοληψία δέρματος βοοειδών σε δύο σφαγεία των ΗΠΑ τους μήνες Απρίλιο – Οκτώβριο. Ενώ στο ένα σφαγείο δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τον επιπολασμό του βακτηρίου μεταξύ των διαφορετικών μηνών, στο δεύτερο σφαγείο οι περισσότερες απομονώσεις στελεχών παρατηρήθηκαν τον Μάιο, με τα ποσοστά επιπολασμού του μικροοργανισμού στο δέρμα να είναι 48,6%, 16,2%, 15,4%, 9,5% και 3,8% τους μήνες Μάιο, Απρίλιο, Οκτώβριο, Ιούλιο και Αύγουστο αντίστοιχα. Τέλος, οι Guerini και συν. (2007) συνέλεξαν δείγματα δέρματος βοοειδών από τέσσερα σφαγεία των ΗΠΑ ανά εποχή. Οι ερευνητές ανέφεραν πως το χειμώνα παρατηρήθηκαν σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά επιπολασμού του μικροοργανισμού και στα τέσσερα σφαγεία (6,3 - 41,6%) συγκριτικά με το καλοκαίρι (0,0% - 14,2%). Μάλιστα, στα δύο σφαγεία που βρίσκονταν σε ψυχρότερες περιοχές της χώρας παρατηρήθηκαν ακόμα μεγαλύτερα ποσοστά επιπολασμού του παθογόνου συγκριτικά με τα άλλα δύο σφαγεία (κατά μέσο όρο είχαν διαφορά 6°C στη θερμοκρασία τους). Τα μεγαλύτερα ποσοστά επιπολασμού της *L. monocytogenes* στο δέρμα, τα σφάγια και το περιβάλλον τους χειμερινούς μήνες αποδίδονται στην ικανότητα του μικροοργανισμού, όντας ψυχρότροφος, να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον, οι χαμηλές θερμοκρασίες περιορίζουν την ανταγωνιστική χλωρίδα, γεγονός που διευκολύνει την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* (Guerini και συν., 2007). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς τον επιπολασμό της *L. monocytogenes* στα σφάγια, το δέρμα και το περιβάλλον ανά εποχή. Η διαφορά αυτή με τις άλλες μελέτες μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στην συγκεκριμένη μελέτη δεν πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία το χειμώνα, αλλά μόνο το φθινόπωρο και την άνοιξη. Επιπλέον, το φθινόπωρο επικράτησε η απομόνωση στελεχών μοριακού ορότυπου Πα από το περιβάλλον του σφαγείου και τα σφάγια, σε αντίθεση με την άνοιξη όπου κυριάρχησε ο μοριακός ορότυπος Πς. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με μελέτες όπως των Guerini και συν. (2007), οι οποίοι σημειώνουν πως όλες τις εποχές κυριάρχησε ο ορότυπος 1/2a. Περαιτέρω έρευνα με κύριο στόχο τη διερεύνηση της πιθανής εποχικότητας του συχνότερου ορότυπου θα μπορούσε να αποσαφηνίσει αυτή την τάση.

Αναφορικά με την ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων από τη *L. monocytogenes*, τα περισσότερα στελέχη παρουσίασαν μέτρια ικανότητα παραγωγής, ενώ περίπου ένα στα τρία στελέχη είχε την ικανότητα να παράξει ισχυρά βιοϋμενία. Τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνούν με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών. Οι Galvão και συν. (2012) απομόνωσαν 29 στελέχη *L. monocytogenes* από βόεια σφάγια και το περιβάλλον πέντε βιομηχανιών επεξεργασίας κρέατος. Από αυτά τα στελέχη, τα 17 είχαν μέτρια ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων, τα επτά είχαν ασθενή και τα τελευταία πέντε είχαν ισχυρή ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων. Αντίστοιχα, οι Jang και συν. (2021) ανίχνευαν οκτώ στελέχη από το περιβάλλον σφαγείων στην Κορέα, από τα οποία τα περισσότερα παρήγαγαν μέτρια ή ασθενή βιοϋμενία και μόλις δύο στελέχη παρήγαγαν ισχυρά βιοϋμενία. Οι Di Ciccio και συν. (2022) αξιολόγησαν την ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων 57 στελεχών *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα κρέατος και το περιβάλλον βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων στην Ιταλία και ανέφεραν ότι τα περισσότερα στελέχη είχαν μέτρια ή ασθενή ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων. Ωστόσο, τα στελέχη που απομονώθηκαν από το κρέας ήταν

ισχυρότεροι παραγωγείς βιοϋμενίων από τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η παραγωγή βιοϋμενίων προσδίδει στη *L. monocytogenes* τη δυνατότητα να επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο περιβάλλον σφαγείων και βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων, να αποκτά αντοχή έναντι απολυμαντικών ουσιών ή άλλων αντίξοων περιβαλλοντικών συνθηκών και κατ' επέκταση να επιμολύνει τα παραγόμενα τρόφιμα (Reis-Teixeira και συν., 2017). Αντικρουόμενες απόψεις έχουν εκφραστεί για τη συσχέτιση μεταξύ του ορότυπου στελεχών *L. monocytogenes* και της ικανότητάς τους να παράξουν βιοϋμένια. Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε μια τέτοια συσχέτιση. Παρομοίως, οι Doijad και συν. (2015) σημειώνουν πως δεν παρατηρήθηκε σύνδεση του ορότυπου με την ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων σε στελέχη που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα και δείγματα τροφίμων. Ωστόσο, οι Meloni και συν. (2012) απομόνωσαν στελέχη *L. monocytogenes* από τρόφιμα ζωικής προέλευσης και το περιβάλλον βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων και αναφέρουν πως στελέχη των ορότυπων 1/2b και 4b παρουσίασαν *in vitro* μεγαλύτερη ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων, συγκριτικά με τους ορότυπους 1/2a και 1/2c. Παρόλα αυτά, ακόμα και στελέχη που ανήκουν γενεαλογικά στον ίδιο κλώνο παρουσιάζουν διαφορές ως προς την ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων και για αυτό η παραγωγή τους εξαρτάται από το ίδιο το στέλεχος, το είδος της επιφάνειας που προσκολλώνται τα στελέχη, την ύπαρξη και σύνθεση των θρεπτικών συστατικών στην επιφάνεια και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των στελεχών (Doijad και συν., 2015).

Σχετικά με τη μικροβιακή αντοχή, σχεδόν όλα τα στελέχη *L. monocytogenes* στην παρούσα μελέτη εμφάνισαν αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό. Τα μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής παρατηρήθηκαν στην κλινδαμυκίνη, στην βανκομυκίνη και την τετρακυκλίνη, ακολουθούμενα από τη σιπροφλοξασίνη και την τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, ενώ όλα τα στελέχη εμφάνισαν ευαισθησία στην αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, την αμπικιλλίνη, τη χλωραμφαινικόλη, την ερυθρομυκίνη, τη γενταμυκίνη, τη μεροπενέμη, την πενικιλλίνη και τη ριφαμικίνη. Στη βιβλιογραφία παρατηρείται μια ποικιλία όσον αφορά τα μικροβιακά προφίλ της *L. monocytogenes* που έχουν καταγραφεί. Οι Khen και συν. (2013) απομόνωσαν στελέχη από δέρμα και σφάγια βοοειδών στην Ιρλανδία και αναφέρουν πως τα μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής παρατηρήθηκαν στη δαπτομυκίνη, την οξακιλλίνη και την κλινδαμυκίνη, ακολουθούμενα από τη γενταμυκίνη, την πενικιλλίνη, τη ριφαμικίνη, την αμπικιλλίνη, τη βανκομυκίνη και την τετρακυκλίνη. Κανένα στέλεχος δεν εμφάνισε αντοχή στη σιπροφλοξασίνη, την ερυθρομυκίνη και τη κινουπριστίνη/δαλφοπριστίνη. Αντίστοιχα, τα στελέχη που απομόνωσαν οι Wieczorek και συν. (2007) από δέρμα και βόεια σφάγια στην Πολωνία εμφάνισαν υψηλά ποσοστά αντοχής στην οξακιλλίνη (72,2%), την κλινδαμυκίνη (37,0%) και την κεφτριαξόνη (13%), ενώ όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην αμπικιλλίνη, την γατιφλοξασίνη, τη λεβοφλοξασίνη, την πενικιλλίνη, την ριφαμικίνη, τη στρεπτομυκίνη, τη τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη και τη βανκομυκίνη. Σε μια άλλη μελέτη, τα περισσότερα στελέχη που απομονώθηκαν από το περιβάλλον σφαγείου στην Κορέα ήταν ευαίσθητα στα αντιβιοτικά, με εξαίρεση μερικά στελέχη που εμφάνισαν αντοχή στην πενικιλλίνη και την τετρακυκλίνη (Jang και συν., 2021). Οι Zhao και συν. (2021), οι οποίοι ανέλυσαν στελέχη *L. monocytogenes* από το δέρμα βοοειδών, τα σφάγια τους και το περιβάλλον εκτροφών και σφαγείων στην Κίνα, σημειώνουν πως τα μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής παρατηρήθηκαν στην κλινδαμυκίνη (71,8%), τη στρεπτομυκίνη (71,8%), την αμικασίνη (65,8%) και την κεφουροξίμη

(61,5%), ενώ όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην πενικιλίνη και την ιμιπενέμη. Η αναφορά μεγάλων ποσοστών αντοχής στην βανκομυκίνη και την κλινδαμυκίνη, όπως και στην παρούσα μελέτη, είναι αρκετά ανησυχητική, καθώς τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά έχουν χαρακτηριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως κρίσιμης και υψηλής σημασίας αντίστοιχα αντιβιοτικά για την ιατρική του ανθρώπου (WHO, 2018). Επιπλέον, η ανάδυση πολυανθεκτικών στελεχών αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις της σύγχρονης ιατρικής. Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν τρία πολυανθεκτικά στελέχη, τα οποία ήταν ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη, την τετρακυκλίνη και τη βανκομυκίνη, ενώ ένα από αυτά τα στελέχη ήταν επιπλέον ανθεκτικό και στη σιπροφλοξασίνη. Οι Ayaz και συν. (2018) ανέφεραν πως απομόνωσαν ένα στέλεχος *L. monocytogenes* από βόειο σφάγιο στην Τουρκία που ήταν ανθεκτικό σε πέντε διαφορετικές κατηγορίες αντιμικροβιακών φαρμάκων (αμικασίνη, αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, αζτρεονάμη, σουλφαμεθοξαζόλη). Οι Papatzimos και συν. (2021) σημειώνουν πως και τα 12 στελέχη *L. monocytogenes* που απομόνωσαν από προϊόντα κρέατος, χειριστές τροφίμων και το περιβάλλον βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων στην Ελλάδα ήταν πολυανθεκτικά. Αν και γενικά τα ποσοστά πολυανθεκτικών στελεχών *L. monocytogenes* παραμένουν μικρά, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια αύξηση στην ανάδυση ανθεκτικών στελεχών *L. monocytogenes* από τα τρόφιμα και το περιβάλλον βιομηχανιών τροφίμων (Olaimat και συν., 2018).

Όσον αφορά τα γονίδια λοιμογονικότητας, όλα τα στελέχη *L. monocytogenes* διέθεταν τα γονίδια *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *hlyA* και *iap*, αλλά μερικά στελέχη δε διέθεταν τα γονίδια *plcA*, *prfA* ή *inlB*. Αν και η *L. monocytogenes* θεωρείται δυνητικά παθογόνος σε επίπεδο είδους, αποτελείται από στελέχη τα οποία παρουσιάζουν ποικίλου βαθμού λοιμογονικότητα. Οι Ayaz και συν. (2018) αναφέρουν πως όλα τα στελέχη που απομόνωσαν από βόεια σφάγια στην Τουρκία είχαν τα γονίδια λοιμογονικότητας *hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *plcB*, *fbpA* και *fri*, ενώ τα περισσότερα από αυτά διέθεταν επίσης και το γονίδιο *vip*. Αντίστοιχα, όλα τα στελέχη που απομόνωσαν οι Wiczorek και συν. (2007) από δέρματα βοοειδών και σφάγια στην Πολωνία είχαν τα γονίδια *inlA*, *inlC*, *inlJ* και *lmo2672*, ενώ μερικά από αυτά έφεραν και το γονίδιο *lssX*, το οποίο παράγει τη λιστεριολυσίνη S. Οι Papatzimos και συν. (2021) σημειώνουν πως τα στελέχη που απομόνωσαν από προϊόντα κρέατος, χειριστές τροφίμων και το περιβάλλον βιομηχανιών τροφίμων διέθεταν τα γονίδια *inlA*, *inlB*, *inlC*, *plcA*, *prfA*, *actA*, *hlyA* και *iap*, αλλά μερικά από αυτά δεν έφεραν το γονίδιο *actA*. Παρόμοια αποτελέσματα ανέφεραν και οι Zhao και συν. (2021) για τα γονίδια λοιμογονικότητας των στελεχών *L. monocytogenes* που απομόνωσαν από το δέρμα, τα βόεια σφάγια και το περιβάλλον εκτροφών και σφαγείων στην Κίνα. Όλα τα στελέχη είχαν τα γονίδια *inlC* και *inlJ*, ενώ μερικά διέθεταν επιπλέον και τα γονίδια *lssX* και *ptsA*, το οποίο παράγει μια φωσφο-τρανσφεράση που αυξάνει τη λοιμογονικότητα του μικροοργανισμού. Ωστόσο, το 15,4% των στελεχών έφεραν και ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης (PMSC) στο γονίδιο *inlA*, γεγονός που υποδηλώνει μείωση της λοιμογονικότητας αυτών των στελεχών. Παρόλα αυτά, η απομόνωση στελεχών *L. monocytogenes* από τρόφιμα και το περιβάλλον βιομηχανιών τροφίμων που διαθέτουν μια ευρεία ποικιλία γονιδίων λοιμογονικότητας, όπως στην παρούσα μελέτη, εγκυμονεί σημαντικό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία.

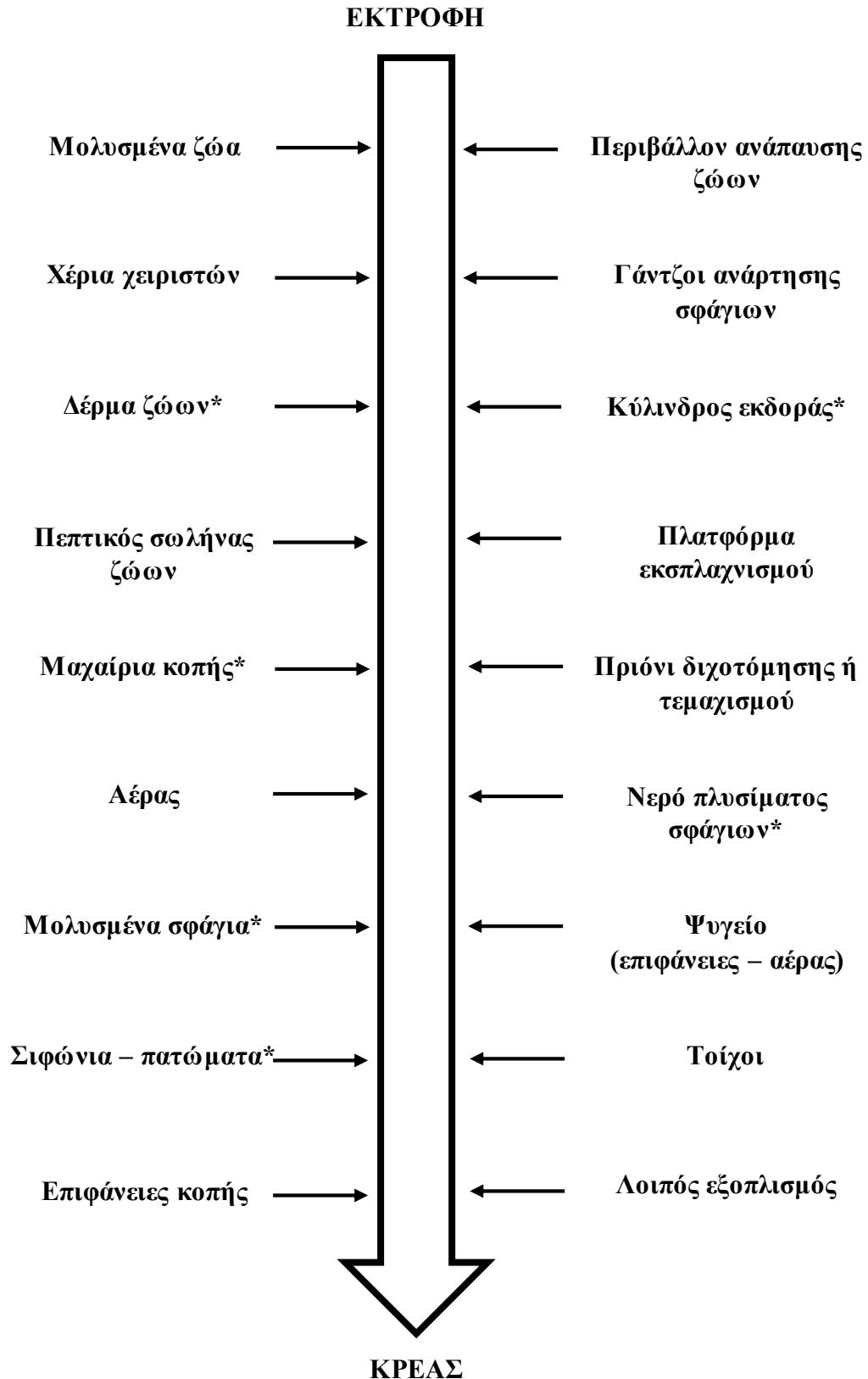
Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια διερεύνησης των πιθανών συγγενειών μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών *L. monocytogenes* με τη βοήθεια του MALDI-TOF, μέσω

της ανάλυσης και σύγκρισης των πρωτεϊνικών προφίλ των στελεχών. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν πως τα στελέχη μπορούν να οργανωθούν σε τρία διαφορετικά συμπλέγματα, όταν η τιμή διαχωρισμού (cut-off value) οριστεί στα 650 distance level. Στο κάθε ένα σύμπλεγμα περιλαμβάνεται μια ποικιλία στελεχών, που μπορεί να ανήκουν ακόμα και σε διαφορετικούς ορότυπους. Υψηλού βαθμού συγγένεια παρατηρήθηκε κυρίως σε στελέχη των μοριακών ορότυπων IIb και IVb, καθώς και σε στελέχη των ορότυπων IIa και IIc. Η ομοιότητα αυτή των στελεχών, ακόμα και αν ανήκουν σε διαφορετικούς ορότυπους, οφείλεται στο γεγονός ότι οι ορότυποι 1/2b και 4b ανήκουν στην ίδια γενετική ομάδα (lineage I), ενώ αντίστοιχα οι ορότυποι 1/2a και 1/2c ανήκουν στο lineage II (Orsi και συν., 2011). Στο σύμπλεγμα A παρατηρείται μεγάλου βαθμού συγγένεια μεταξύ στελεχών από σφάγια και δέρμα, γεγονός που υποδηλώνει πως τα συγκεκριμένα σφάγια πιθανότατα επιμολύνθηκαν από το δέρμα λόγω λανθασμένων χειρισμών κατά το στάδιο της εκδοράς. Το σύμπλεγμα B περιλαμβάνει στελέχη από τον κύλινδρο εκδοράς, τα σφάγια και το δέρμα. Αυτό υποδεικνύει πως εκτός από τα σφάγια, το δέρμα μπορεί να επιμολύνει και τον εξοπλισμό του σταδίου της εκδοράς και κατ' επέκταση ο κύλινδρος της εκδοράς μπορεί να επιμολύνει τα σφάγια με τα οποία έρχεται σε επαφή. Τέλος, το σύμπλεγμα Γ, το οποίο περιλαμβάνει τα περισσότερα απομονωθέντα στελέχη, αφορά στελέχη που απομονώθηκαν από το νερό πλυσίματος των σφάγιων, τα σφάγια, σιφώνια του καθαρού τμήματος του σφαγείου, μαχαίρια του καθαρού τμήματος του σφαγείου και το δέρμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το νερό πλυσίματος των σφάγιων αποτελεί πηγή διασποράς του μικροοργανισμού στα σφάγια και το περιβάλλον του σφαγείου που βρίσκεται σε εγγύτητα με το νερό, όπως σιφώνια απορροής του νερού και μαχαίρια που χρησιμοποιούνται στον καλλωπισμό των σφάγιων, ένα στάδιο πριν το πλύσιμό τους. Έτσι, τα σιφώνια και τα μαχαίρια μπορούν με τη σειρά τους να επιμολύνουν τα ίδια τα σφάγια είτε με άμεση επαφή είτε έμμεσα μέσω του αέρα ή των σταγονιδίων νερού που μεταφέρονται από τα σιφώνια στα σφάγια, όπως έχει περιγραφεί (Oswaldi και συν., 2022). Επίσης, η μεγάλου βαθμού συγγένεια μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από το δέρμα και το νερό δείχνει πως στελέχη *L. monocytogenes* μπορούν να εισέρχονται στο σφαγείο από την εκτροφή, μέσω του δέρματος των ζώων, και να επιβιώνουν στο περιβάλλον του σφαγείου. Επιπλέον, η μεγάλου βαθμού συγγένεια μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από δείγματα ακόμα και διαφορετικών εποχών υπογραμμίζει την εμμονή των στελεχών *L. monocytogenes* στο περιβάλλον του σφαγείου. Εκτός από την απομόνωση συγγενών στελεχών από το ίδιο σημείο ακόμα και έξι μήνες μετά (π.χ. νερό), η παρατεταμένη επιβίωση του μικροοργανισμού στο περιβάλλον υποδεικνύεται και από το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μεγάλου βαθμού συγγένεια μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από δείγματα που δε σχετίζονται άμεσα μεταξύ τους και δε θα μπορούσε να γίνει διασταυρούμενη μόλυνση άμεσα από το ένα στο άλλο (π.χ. συγγενή στελέχη που το ένα απομονώθηκε από σφάγιο το φθινόπωρο και το άλλο απομονώθηκε από σφάγιο την άνοιξη). Με βάση τα παραπάνω, συμπεραίνεται πως οι κυριότερες εστίες του μικροοργανισμού στο συγκεκριμένο σφαγείο είναι το νερό πλυσίματος σφάγιων, το δέρμα και ο εξοπλισμός του σφαγείου που έρχεται σε επαφή με το νερό και το δέρμα, όπως σιφώνια, μαχαίρια και κύλινδρος εκδοράς. Η μόλυνση των σφάγιων οφείλεται τόσο σε εισαγόμενα στελέχη από την εκτροφή μέσω του δέρματος των ζώων όσο και σε στελέχη που εμμένουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο περιβάλλον του σφαγείου. Στο διάγραμμα 3 απεικονίζονται οι κυριότερες πηγές μετάδοσης της *L. monocytogenes* κατά μήκος της αλυσίδας παραγωγής βόειου κρέατος.

Τα αποτελέσματα της μελέτης, όσον αφορά τη διερεύνηση των πιθανών συγγενειών μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών, βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως η μέθοδος MALDI-TOF μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση, ταξινόμηση, τυποποίηση, επιδημιολογική διερεύνηση και διάκριση των στελεχών *L. monocytogenes* που απομονώνονται από διάφορα τρόφιμα και το περιβάλλον βιομηχανιών επεξεργασίας τους (Barbuddhe και συν., 2008; Murray, 2010; Jadhav και συν., 2015). Οι Papatzimos και συν. (2021) αναφέρουν πως προέκυψαν τρία συμπλέγματα στελεχών *L. monocytogenes* από προϊόντα κρέατος, χειριστές τροφίμων και το περιβάλλον βιομηχανιών τροφίμων, μετά την ανάλυση του πρωτεϊνικού τους προφίλ με MALDI-TOF. Το πρώτο σύμπλεγμα περιελάμβανε στελέχη από περιβαλλοντικά δείγματα και χειριστές τροφίμων, ενώ το δεύτερο και τρίτο σύμπλεγμα περιελάμβαναν στελέχη από προϊόντα κρέατος και περιβαλλοντικά δείγματα αντίστοιχα. Έτσι, η μελέτη έδειξε ότι το περιβάλλον βιομηχανιών τροφίμων μέσω των χειριστών μπορεί να συμβάλλει στην επιμόλυνση των προϊόντων κρέατος με *L. monocytogenes*. Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρουν οι Peccio και συν. (2003), καθώς όλα τα στελέχη που απομόνωσαν από σφάγια βοοειδών και μαχαίρια σε ένα σφαγείο στην Ιταλία ανήκουν στον ίδιο παλσότυπο (pulsotype), υπονοώντας έτσι πιθανή μόλυνση των σφάγιων από τα μαχαίρια. Παρομοίως, οι Camargo και συν. (2015) σημειώνουν πως τα στελέχη που απομόνωσαν από προϊόντα κρέατος, χειριστές τροφίμων και το περιβάλλον βιομηχανιών τροφίμων (επιφάνειες κοπής) ομαδοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, με βάση την ανάλυση της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE). Οι ομάδες αυτές περιείχαν στελέχη από όλα τα παραπάνω σημεία δειγματοληψίας, επιβεβαιώνοντας τη διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ περιβάλλοντος, χειριστών και τροφίμων. Μάλιστα, μεγάλο βαθμό συγγένειας παρουσίασαν στελέχη που ανήκαν στην ίδια γενεαλογική ομάδα (lineage) αλλά σε διαφορετικούς ορότυπους, όπως ακριβώς στην παρούσα μελέτη. Οι Demaître και συν. (2021) κατέταξαν σε κλωνικά συμπλέγματα (clonal complexes) τα στελέχη που απομόνωσαν από δέρμα βοοειδών, σφάγια και το περιβάλλον σφαγείων από το Βέλγιο. Τα στελέχη από δέρμα οργανώθηκαν σε επτά κλωνικά συμπλέγματα και ένα sequence type, τα στελέχη από σφάγια κατατάχθηκαν σε 10 κλωνικά συμπλέγματα, ενώ τα στελέχη από το περιβάλλον ανήκαν σε επτά κλωνικά συμπλέγματα. Η απομόνωση στελεχών του ίδιου κλωνικού συμπλέγματος από το περιβάλλον του σφαγείου, το δέρμα και τα σφάγια επιβεβαιώνει τη διασταυρούμενη μόλυνση των σφάγιων από τις συγκεκριμένες πηγές. Τη σημασία του δέρματος στη μόλυνση των σφάγιων με *L. monocytogenes* τονίζουν και οι Khen και συν. (2014), οι οποίοι απομόνωσαν στελέχη από σφάγια και δέρμα βοοειδών που ανήκαν στον ίδιο παλσότυπο (pulsotype), μετά από ανάλυση με PFGE. Επιπλέον, οι αναλύσεις PFGE και πολυτοπικής ανάλυσης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (multilocus sequence typing) που έκαναν οι Zhao και συν. (2020) σε στελέχη από το περιβάλλον εκτροφών, σφαγείων και βόειων σφάγιων έδειξαν μεγάλα ποσοστά ομοιότητας μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών. Η ομοιότητα αυτή υποδεικνύει πως στελέχη *L. monocytogenes* μεταφέρονται σταδιακά από το περιβάλλον της εκτροφής στο περιβάλλον του σφαγείου, μέσω του δέρματος των ζώων, και από εκεί στη συνέχεια στα παραγόμενα σφάγια. Την εμμονή που επιδεικνύουν τα στελέχη *L. monocytogenes* στο περιβάλλον του σφαγείου επεσήμαναν πολυάριθμες μελέτες, στις οποίες ανιχνεύονται στελέχη παρόμοιου γενετικού προφίλ από σφάγια βοοειδών, δέρμα και προϊόντα κρέατος μέχρι και ένα εξάμηνο μετά την αρχική τους απομόνωση (Khen και συν., 2015; Ayaz και συν., 2018). Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα ενός σφαγείου στο Βέλγιο, όπου επί έναν χρόνο τα βόεια σφάγια μολύνονταν με *L. monocytogenes* κλωνικού συμπλέγματος CC9 από το πριόνι διχοτόμησης των σφάγιων, γεγονός που υποδεικνύει την ικανότητα των στελεχών

του συγκεκριμένου συμπλέγματος να επιβιώνουν στα δυσμενή περιβάλλοντα των βιομηχανιών τροφίμων και να επιμολύνουν τα παραγόμενα σφάγια (Demaître και συν., 2021).

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθούν και οι περιορισμοί της παρούσας μελέτης προκειμένου τα αποτελέσματά της να αξιολογηθούν ορθά. Ο μεγαλύτερος περιορισμός της μελέτης είναι ότι εξετάστηκαν μία εκτροφή και ένα σφαγείο της Βόρειας Ελλάδας. Η δειγματοληψία σε μεγαλύτερο αριθμό εκτροφών και σφαγείων στη Βόρεια Ελλάδα αλλά και στην υπόλοιπη επικράτεια θα μπορούσε να δώσει μια αντιπροσωπευτικότερη εικόνα του επιπολασμού της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον και τα τρόφιμα. Επιπλέον, η συλλογή δειγμάτων καθόλη τη διάρκεια του έτους θα μπορούσε να διευκρινίσει την επίδραση της εποχικότητας στη διακύμανση του πληθυσμού του παθογόνου στο περιβάλλον και τα τρόφιμα. Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό των στελεχών, ο προσδιορισμός των κλωνικών συμπλεγμάτων (clonal complexes) στα οποία ανήκουν τα απομονωθέντα στελέχη θα επέτρεπε την αποσαφήνιση των συγγενειών μεταξύ των στελεχών και τις πιθανότερες οδούς μόλυνσης των τροφίμων. Κατά συνέπεια υπάρχει ενδιαφέρουσα προοπτική για μελλοντικές μελέτες. Δεδομένων των χαρακτηριστικών της νόσου και του παθογόνου αιτίου της, η πραγματοποίηση ανάλογων μελετών καθίσταται επιτακτική. Η λιστερίωση είναι ένα τροφιμογενές νόσημα με υψηλά ποσοστά θνητότητας ιδιαίτερα στις ομάδες υψηλού κινδύνου, με το κρέας να αποτελεί ένα από τα συχνότερα εμπλεκόμενα τρόφιμα. Στην αλυσίδα παραγωγής κρέατος, η ικανότητα επιβίωσης της *L. monocytogenes* καθιστά το περιβάλλον ως ένα από τα σημαντικότερα αίτια επιμολύνσης των τροφίμων με τον μικροοργανισμό. Για αυτό το λόγο, ο προσδιορισμός του επιπολασμού της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα και το περιβάλλον, ο χαρακτηρισμός των απομονωθέντων στελεχών και η εύρεση των επιδημιολογικών οδών μόλυνσης των τροφίμων θα πρέπει να αποτελούν προτεραιότητα για τις αρμόδιες αρχές και τις βιομηχανίες τροφίμων, προκειμένου να προαχθεί η ασφάλεια των τροφίμων και η δημόσια υγεία.



Διάγραμμα 3. Κυριότερες πηγές μετάδοσης της *L. monocytogenes* κατά μήκος της αλυσίδας παραγωγής βόειου κρέατος. Με αστερίσκο σημειώνονται οι πηγές στις οποίες απομονώθηκαν στελέχη *L. monocytogenes* στην παρούσα μελέτη.

B.5. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

- Από τα 270 δείγματα δέρματος βοοειδών, βόειων σφάγιων και περιβάλλοντος της εκτροφής και του σφαγείου, απομονώθηκαν συνολικά 230 στελέχη *Listeria* spp., εκ των οποίων τα 24 χαρακτηρίστηκαν ως *L. monocytogenes* (10,4% των στελεχών).
- Πιο συγκεκριμένα, στελέχη του γένους *Listeria* ανιχνεύτηκαν στο σύνολο των σφάγιων, στο 96,7% των δειγμάτων δέρματος, στο 87,5% των περιβαλλοντικών δειγμάτων του σφαγείου και στο 60% των δειγμάτων της εκτροφής.
- Ο επιπολασμός της *L. monocytogenes* στα σφάγια, στο δέρμα και το περιβάλλον του σφαγείου ήταν 21,7% (95% CI = 12,1% – 34,2%), 6,7% (95% CI = 1,8% - 16,2%) και 8,8% (95% CI = 3,6% – 17,2%) αντίστοιχα.
- Δεν απομονώθηκαν στελέχη *L. monocytogenes* από το περιβάλλον της εκτροφής.
- Δεν απομονώθηκαν στελέχη *L. monocytogenes* από τα μαχαίρια στην αρχή και τη μέση της διαδικασίας σφαγής, αλλά απομονώθηκε ένα στέλεχος από μαχαίρια του καθαρού τμήματος του σφαγείου στο τέλος της διαδικασίας σφαγής.
- Αν εξαιρέσουμε τη *L. monocytogenes*, άλλα είδη των *Listeria* spp. απομονώθηκαν από το 78,3% των σφάγιων, από το 90% των δειγμάτων δέρματος, από το 78,8% των περιβαλλοντικών δειγμάτων του σφαγείου και από το σύνολο των δειγμάτων της εκτροφής που ανιχνεύτηκαν στελέχη.
- Τα περισσότερα στελέχη *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από τα σφάγια και το περιβάλλον του σφαγείου ανήκαν στο μοριακό ορότυπο IIc, ακολουθούμενος από τον ορότυπο IIa και στην περίπτωση του περιβάλλοντος και τον IIb, ενώ στα στελέχη από το δέρμα δεν κυριάρχησε κάποιος συγκεκριμένος ορότυπος (IIb, IVb, IIa).
- Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς τον επιπολασμό της *L. monocytogenes* στα σφάγια, το δέρμα και το περιβάλλον μεταξύ του φθινοπώρου και της άνοιξης. Ωστόσο, το φθινόπωρο επικράτησε η απομόνωση στελεχών μοριακού ορότυπου IIa από το περιβάλλον του σφαγείου και τα σφάγια, σε αντίθεση με την άνοιξη όπου κυριάρχησε ο μοριακός ορότυπος IIc.
- Τα περισσότερα στελέχη παρουσίασαν μέτρια ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων, ενώ περίπου ένα στα τρία στελέχη είχε την ικανότητα να παράξει ισχυρά βιοϋμένια.
- Δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ του ορότυπου στελεχών *L. monocytogenes* και της ικανότητάς τους να παράξουν βιοϋμένια.
- Σχεδόν όλα τα στελέχη *L. monocytogenes* επέδειξαν αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό. Τα μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής παρατηρήθηκαν στην κλινδαμυκίνη, στην βανκομυκίνη και την τετρακυκλίνη, ακολουθούμενα από τη σιπροφλοξασίνη και την τριμεθοπρίμη / σουλφαμεθοξαζόλη.
- Όλα τα στελέχη εμφάνισαν ευαισθησία στην αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, την αμπικιλίνη, τη χλωραμφαινικόλη, την ερυθρομυκίνη, τη γενταμυκίνη, τη μεροπενέμη, την πενικιλίνη και τη ριφαμυκίνη.

- Τρία στελέχη έχουν χαρακτηριστεί ως πολυανθεκτικά, καθώς εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην κλινδαμυκίνη, την τετρακυκλίνη και τη βανκομυκίνη, ενώ ένα από αυτά τα στελέχη ήταν επιπλέον ανθεκτικό και στη σιπροφλοξασίνη.
- Όλα τα στελέχη *L. monocytogenes* διέθεταν τα γονίδια λοιμογονικότητας *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *hlyA* και *iap*, αλλά μερικά στελέχη δε διέθεταν τα γονίδια *plcA*, *prfA* ή *inlB*.
- Κατά τη διερεύνηση των πιθανών συγγενειών μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών με MALDI-TOF προέκυψε πως τα στελέχη μπορούν να οργανωθούν σε τρία διαφορετικά συμπλέγματα.
- Και στα τρία συμπλέγματα παρατηρήθηκε μεγάλου βαθμού συγγένεια μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από δείγματα τόσο της ίδιας ημέρας δειγματοληψίας όσο και διαφορετικών εποχών, γεγονός που δείχνει εμμονή της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον του σφαγείου.
- Οι κυριότερες εστίες του μικροοργανισμού στο σφαγείο είναι το νερό πλυσίματος των σφάγιων, το δέρμα και ο εξοπλισμός του σφαγείου που έρχεται σε επαφή με το νερό και το δέρμα, όπως σιφόνια, μαχαίρια και κύλινδρος εκδοράς.
- Η μόλυνση των σφάγιων οφείλεται τόσο σε εισαγόμενα στελέχη από την εκτροφή μέσω του δέρματος των ζώων όσο και σε στελέχη που εμμένουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο περιβάλλον του σφαγείου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Λιεθνής

1. Adeshina, I., & Emikpe, B. O. (2020). “Pathogenicity, haematology and pathology of *Listeria monocytogenes* in rat”. **Comparative Clinical Pathology**, 29(2), 511–515. <https://doi.org/10.1007/s00580-019-03084-w>
2. Adrião, A., Vieira, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R. P., . . . Faleiro, M. L. (2008). “Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces”. **International Journal of Food Microbiology**, 123(1-2), 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.016>
3. Akkaya, L., Mustafa Alişarlı, Zafer Çetinkaya, Kara, R., & R. Telli. (2008). “Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7/O15, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Beef Slaughterhouse Environments, Equipment and Workers”. **Journal of Muscle Foods**, 19(3), 261–274. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2008.00108.x>
4. Amaya-Villar, R., García-Cabrera, E., Sulleiro-Igual, E., Fernández-Viladrich, P., Fontanals-Aymerich, D., Catalán-Alonso, P., . . . Prats-Pastor, G. (2010). “Three-year multicenter surveillance of community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults”. **BMC Infectious Diseases**, 10 <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-324>
5. Angelidis, A. S., Grammenou, A. S., Kotzamanidis, C., Giadinis, N. D., Zdragas, A. G., & Sergelidis, D. (2023). “Prevalence, Serotypes, Antimicrobial Resistance and Biofilm-Forming Ability of *Listeria monocytogenes* Isolated from Bulk-Tank Bovine Milk in Northern Greece”. **Pathogens**, 12(6), 837. <https://doi.org/10.3390/pathogens12060837>
6. Angelidis, A. S., & Smith, G. M. (2003). “Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium”. **Applied and Environmental Microbiology**, 69(12), 7492-7498. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7492-7498.2003>
7. Angelo, K. M., Jackson, K. A., Wong, K. K., Hoekstra, R. M., & Jackson, B. R. (2016). “Assessment of the incubation period for invasive listeriosis”. **Clinical Infectious Diseases**, 63(11), 1487-1489. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw569>
8. Arslan, F., Meynet, E., Sunbul, M., Sipahi, O. R., Kurtaran, B., Kaya, S., . . . Mert, A. (2015). “The clinical features, diagnosis, treatment, and prognosis of neuroinvasive listeriosis: A multinational study”. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 34(6), 1213-1221. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2346-5>
9. Autio, T., Lundén, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Björkroth, J., Sjöberg, A.-M., & Korkeala, H. (2002). “Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources”. **International Journal of Food Microbiology**, 77(1-2), 83–90. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00055-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00055-7)

10. Autio, T., Säteri, T., Fredriksson-Ahomaa, M., Rahkio, M., Lundén, J., & Korkeala, H. (2000). "Listeria monocytogenes Contamination Pattern in Pig Slaughterhouses". **Journal of Food Protection**, 63(10), 1438–1442. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.10.1438>
11. Ayaz, N. D., Onaran, B., Cufaoglu, G., Goncuoglu, M., Seda, F., & Erol, İ. (2018). "Prevalence and Characterization of Listeria monocytogenes Isolated from Beef and Sheep Carcasses in Turkey with Characterization of Locally Isolated Listeriophages as a Control Measure". **Journal of Food Protection**, 81(12), 2045–2053. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-18-310>
12. Bagatella, S., Tavares-Gomes, L., & Oevermann, A. (2022). "Listeria monocytogenes at the interface between ruminants and humans: A comparative pathology and pathogenesis review". **Veterinary Pathology**, 59(2), 186-210. <https://doi.org/10.1177/03009858211052659>
13. Barbuddhe, S. B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T., & Hain, T. (2008). "Rapid Identification and Typing of Listeria Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry". **Applied and Environmental Microbiology**, 74(17), 5402–5407. <https://doi.org/10.1128/aem.02689-07>
14. Barros, M. A. F., Nero, L. A., Silva, L. C., d'Ovidio, L., Monteiro, F. A., Tamanini, R., Fagnani, R., Hofer, E., & Beloti, V. (2007). "Listeria monocytogenes: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants". **Meat Science**, 76(4), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.01.016>
15. Batt, C. A. (2014). Listeria: Listeria monocytogenes. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology* (Second edition). Academic Press, Elsevier Ltd. pp. 490-493. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00191-9>
16. Bayles, D. O., & Wilkinson, B. J. (2000). "Osmoprotectants and cryoprotectants for Listeria monocytogenes". **Letters in Applied Microbiology**, 30(1), 23-27. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00646.x>
17. Beales, N. (2004). "Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low PH, and Osmotic Stress: A Review". **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 3(1), 1–20, <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x> .
18. Becattini, S., Littmann, E. R., Carter, R. A., Kim, S. G., Morjaria, S. M., Ling, L., . . . Pamer, E. G. (2017). "Commensal microbes provide first line defense against Listeria monocytogenes infection". **Journal of Experimental Medicine**, 214(7), 1973-1989. <https://doi.org/10.1084/jem.20170495>
19. Becattini, S., & Pamer, E. G. (2018). "Multifaceted defense against Listeria monocytogenes in the gastro-intestinal lumen". **Pathogens**, 7(1) <https://doi.org/10.3390/pathogens7010001>
20. Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. J. (2020). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Ninth Edition). Elsevier Inc., 206, pp. 2543-2549.
21. Bisbiroulas, P., Psylou, M., Iliopoulou, I., Diakogiannis, I., Berberi, A., & Mastronicolis, S. K. (2011). "Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen Listeria monocytogenes as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride". **Letters in Applied Microbiology**, 52(3), 275–280. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2010.02995.x>

22. Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J. P., Tsunemi, M. H., & Rall, V. L. M. (2014). "Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures". **Food Control**, 35(1), 386-391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.023>
23. Brauge, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Benezech, T., Maes, E., Guerardel, Y., & Midelet-Bourdin, G. (2015). "Teichoic acid is the major polysaccharide present in the *Listeria monocytogenes* biofilm matrix". **FEMS Microbiology Letters**, 363(2). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv229>
24. Brett, M., Short, P., & McLauchlin, J. (1998). "A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels". **International Journal of Food Microbiology**, 43(3), 223-229. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00116-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00116-0)
25. Briers, Y., Klumpp, J., Schuppler, M., & Loessner, M. J. (2011). "Genome sequence of *Listeria monocytogenes* Scott A, a clinical isolate from a food-borne listeriosis outbreak". **Journal of Bacteriology**, 193(16), 4284-4285. <https://doi.org/10.1128/JB.05328-11>
26. Brouwer, M. C., Van De Beek, D., Heckenberg, S. G. B., Spanjaard, L., & De Gans, J. (2006). "Community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults". **Clinical Infectious Diseases**, 43(10), 1233-1238. <https://doi.org/10.1086/508462>
27. Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). "A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments". **Food Control**, 75, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
28. Camargo, A. C., Dias, M. R., Cossi, M. V. C., Lanna, F. G. P. A., Cavicchioli, V. Q., Vallim, D. C., ... Nero, L. A. (2015). "Serotypes and Pulsotypes Diversity of *Listeria monocytogenes* in a Beef-Processing Environment". **Foodborne Pathogens and Disease**, 12(4), 323-326. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1875>
29. Carpentier, B., & Chassaing, D. (2004). "Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises". **International Journal of Food Microbiology**, 97(2), 111-122. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.031>
30. Cartwright, E. J., Jackson, K. A., Johnson, S. D., Graves, L. M., Silk, B. J., & Mahon, B. E. (2013). "Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008". **Emerging Infectious Diseases**, 19(1), 1-9. <https://doi.org/10.3201/eid1901.120393>
31. Ceuppens, S., Li, D., Uyttendaele, M., Renault, P., Ross, P., Ranst, M. V., ... Donaghy, J. (2014). "Molecular Methods in Food Safety Microbiology: Interpretation and Implications of Nucleic Acid Detection". **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 13(4), 551-577. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12072>
32. Chachlioutaki, K., Karavasili, C., Adamoudi, E., Tsitsos, A., Economou, V., Beltes, C., . . . Fatouros, D. G. (2022). "Electrospun nanofiber films suppress inflammation in vitro and eradicate endodontic bacterial infection in an *E. faecalis*-infected ex vivo human tooth culture model". **ACS Biomaterials Science and Engineering**, <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00150>
33. Chapin, T. K., Nightingale, K. K., Worobo, R. W., Wiedmann, M., & Strawn, L. K. (2014). "Geographical and meteorological factors associated with isolation of *Listeria* species in New York state produce production and natural environments".

- Journal of Food Protection**, 77(11), 1919-1928. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-132>
34. Charlier, C., Perrodeau, É., Leclercq, A., Cazenave, B., Pilmis, B., Henry, B., . . . Zumbo, C. (2017). "Clinical features and prognostic factors of listeriosis: The MONALISA national prospective cohort study". **The Lancet Infectious Diseases**, 17(5), 510-519. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30521-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30521-7)
 35. Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M. -, & Hebraud, M. (2002). "Listeria monocytogenes LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases". **Applied and Environmental Microbiology**, 68(2), 728-737. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.728-737.2002>
 36. Churchill, K. J., Sargeant, J. M., Farber, J. M., & O'Connor, A. M. (2019). "Prevalence of Listeria monocytogenes in Select Ready-to-Eat Foods - Deli Meat, Soft Cheese, and Packaged Salad: A Systematic Review and Meta-Analysis". **Journal of Food Protection**, 82(2), 344–357. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-18-158>
 37. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2023). "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd ed. CLSI supplement M100". Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA.
 38. Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2017). "Listeria monocytogenes biofilms in the wonderland of food industry". **Pathogens**, 6(3) <https://doi.org/10.3390/pathogens6030041>
 39. Combrouse, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Kol, O., Guérardel, Y., & Midelet-Bourdin, G. (2013). "Quantification of the extracellular matrix of the Listeria monocytogenes biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions". **Journal of Applied Microbiology**, 114(4), 1120-1131. <https://doi.org/10.1111/jam.12127>
 40. Cotter, P. D., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2000). "Analysis of the role of the Listeria monocytogenes F0F1-ATPase operon in the acid tolerance response". **International Journal of Food Microbiology**, 60(2-3), 137-146. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00305-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00305-6)
 41. Cotter, P. D., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2001). "A glutamate decarboxylase system protects Listeria monocytogenes in gastric fluid". **Molecular Microbiology**, 40(2), 465-475. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02398.x>
 42. Craw, P., & Balachandran, W. (2012). "Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review". **Lab on a Chip**, 12(14), 2469. <https://doi.org/10.1039/c2lc40100b>
 43. Da Silva, E. P., & De Martinis, E. C. P. (2013). "Current knowledge and perspectives on biofilm formation: The case of listeria monocytogenes". **Applied Microbiology and Biotechnology**, 97(3), 957-968. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4611-1>
 44. De Macedo Couto, R., & Brandespim, D. F. (2020). "A review of the One Health concept and its application as a tool for policy-makers". **International Journal of One Health**, 6(1), 83–89. <https://doi.org/10.14202/ijoh.2020.83-89>
 45. Demaître, N., De Reu, K., Haegeman, A., Schaumont, D., De Zutter, L., Geeraerd, A., & Rasschaert, G. (2021). "Study of the transfer of Listeria monocytogenes during the slaughter of cattle using molecular typing". **Meat Science**, 175. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108450>
 46. Demaître, N., Van Damme, I., De Zutter, L., Geeraerd, A. H., Rasschaert, G., & De Reu, K. (2020). "Occurrence, distribution and diversity of Listeria

- monocytogenes* contamination on beef and pig carcasses after slaughter”. **Meat Science**, 169. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108177>
47. Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., & Trevors, J. T. (2003). “Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes”. **Journal of Microbiological Methods**, 52(2), 149-182. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00155-0)
 48. de Noordhout, C. M., Devleeschauwer, B., Angulo, F. J., Verbeke, G., Haagsma, J., Kirk, M., . . . Speybroeck, N. (2014). “The global burden of listeriosis: A systematic review and meta-analysis”. **The Lancet Infectious Diseases**, 14(11), 1073-1082. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70870-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70870-9)
 49. Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D’Orio, V., Vergara, A., Conter, M., & Ianieri, A. (2008). “Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity”. **Journal of Applied Microbiology**, 104(6), 1552-1561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x>
 50. Di Ciccio, P., Conter, M., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Paludi, D., . . . Ianieri, A. (2012). “*Listeria monocytogenes*: Biofilms in food processing”. **Italian Journal of Food Science**, 24(3), 203-213.
 51. Di Ciccio, P., Rubiola, S., Panebianco, F., Lomonaco, S., Allard, M., Bianchi, D. M., Civera, T., & Chiesa, F. (2022). “Biofilm formation and genomic features of *Listeria monocytogenes* strains isolated from meat and dairy industries located in Piedmont (Italy)”. **International Journal of Food Microbiology**, 378, 109784. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109784>
 52. Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Garg, S., Poharkar, K. V., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., Rawool, D. B., & Chakraborty, T. (2015). “Biofilm-Forming Abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources”. **PLOS ONE**, 10(9), e0137046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137046>
 53. Donlan, R. M. (2002). “Biofilms: Microbial life on surfaces”. **Emerging Infectious Diseases**, 8(9), 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
 54. Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. (2004). “Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR”. **Journal of Clinical Microbiology**, 42(8), 3819-3822. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>
 55. Dubois-Brissonnet, F., Trotier, E., & Briandet, R. (2016). “The biofilm lifestyle involves an increase in bacterial membrane saturated fatty acids”. **Frontiers in Microbiology**, 7(OCT) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01673>
 56. Duché, O., Trémoulet, F., Glaser, P., & Labadie, J. (2002). “Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*”. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(4), 1491-1498. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1491-1498.2002>
 57. Duze, S. T., Marimani, M., & Patel, M. (2021). “Tolerance of *Listeria monocytogenes* to biocides used in food processing environments”. **Food Microbiology**, 97, 103758. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103758>
 58. Dwivedi, H. P., & Jaykus, L.-A. (2010). “Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions”. **Critical Reviews in Microbiology**, 37(1), 40–63. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2010.506430>
 59. Economou, V., Gousia, P., Kansouzidou, A., Sakkas, H., Karanis, P., & Papadopoulos, C. (2013). “Prevalence, antimicrobial resistance and relation to indicator and pathogenic microorganisms of *Salmonella enterica* isolated from surface waters within an agricultural landscape”. **International Journal of Hygiene**

- and Environmental Health, 216(4), 435–444. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.07.004>
60. Economou, V., Tsitsos, A., Theodoridis, A., Ambrosiadis, I., & Arsenos, G. (2022). “Effects of chitosan coatings on controlling *Listeria monocytogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in beef and mutton cuts”. **Applied Sciences (Switzerland)**, 12(22) <https://doi.org/10.3390/app122211345>
 61. EFSA & ECDC, 2022. “The European Union One Health 2021 Zoonoses Report”. **EFSA Journal** 2022, 20(12):7666, 273 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
 62. Ericsson, H., Annelie Eklöw, Marie-Louise Danielsson-Tham, Semir Loncarevic, Lars-Olof Mentzing, Persson, I., ... Tham, W. (1997). “An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout”. **Journal of Clinical Microbiology**, 35(11), 2904–2907. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.11.2904-2907.1997>
 63. Farber, J. M., Pagotto, F., & Scherf, C. (2007). Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Meat Products. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety* (Third edition). Boca Raton: CRC Press, FL. pp. 503–570. <https://doi.org/10.1201/9781420015188-20>
 64. Feng, Y., Yao, H., Chen, S., Sun, X., Yin, Y., & Jiao, X. (2020). “Rapid detection of hypervirulent serovar 4h *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR”. **Frontiers in Microbiology**, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01309>
 65. Fernández – Sabé, N., Cervera, C., López – Medrano, F., Llano, M., Sáez, E., Len, Ó., . . . Carratalà, J. (2009). “Risk factors, clinical features, and outcomes of listeriosis in solid-organ transplant recipients: A matched case-control study”. **Clinical Infectious Diseases**, 49(8), 1153–1159. <https://doi.org/10.1086/605637>
 66. Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). “*Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health”. **Journal of Food Protection**, 77(1), 150–170. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
 67. Flemming, H.C., & Wingender, J. (2010). “The biofilm matrix”. **Nature reviews Microbiology**, 8(9), 623–33. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
 68. Franciosa, G., Maugliani, A., Scalfaro, C., Floridi, F., & Aureli, P. (2009). “Expression of internalin A and biofilm formation among *Listeria monocytogenes* clinical isolates”. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, 22(1), 183–193. <https://doi.org/10.1177/039463200902200121>
 69. Freitag, N. E., Port, G. C., & Miner, M. D. (2009). “*Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen”. **Nature Reviews Microbiology**, 7(9), 623–628. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2171>
 70. Fsihi, H., Steffen, P., & Cossart, P. (2001). Chapter 16: *Listeria monocytogenes*. In E. A. Groisman (Ed.), *Principles of Bacterial Pathogenesis*. Academic Press, Elsevier Ltd. pp. 751–803. <https://doi.org/10.1016/B978-012304220-0/50017-0>
 71. Galvão, N. N., Chiarini, E., Destro, M. T., de Aguiar Ferreira, M., & Nero, L. A. (2012). “PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities”. **Meat Science**, 92(4), 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.06.011>
 72. Garner, D., & Kathariou, S. (2016). “Fresh produce-associated listeriosis outbreaks, sources of concern, teachable moments, and insights”. **Journal of Food Protection**, 79(2), 337–344. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-387>
 73. Gérard, A., El-Hajjaji, S., Niyonzima, E., Daube, G., & Sindic, M. (2018). “Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese - A

- review". *International Journal of Dairy Technology*, 71(4), 825–843. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12552>
74. Gnanou Besse, N., Barre, L., Buhariwalla, C., Vignaud, M. L., Khamissi, E., Decourseulles, E., ... Kalmokoff, M. (2010). "The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria* spp. in food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis". *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.025>
 75. Godreuil, S., Galimand, M., Gerbaud, G., Jacquet, C., & Courvalin, P. (2003). "Efflux pump *lde* is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(2), 704–708. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.704-708.2003>
 76. Godshall, C. E., Suh, G., & Lorber, B. (2013). "Cutaneous listeriosis". *Journal of Clinical Microbiology*, 51(11), 3591–3596. <https://doi.org/10.1128/JCM.01974-13>
 77. Goulet, V., Hebert, M., Hedberg, C., Laurent, E., Vaillant, V., De Valk, H., & Desenclos, J. - C. (2012). "Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis". *Clinical Infectious Diseases*, 54(5), 652–660. <https://doi.org/10.1093/cid/cir902>
 78. Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A., & De Valk, H. (2008). "Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries". *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), 734–740. <https://doi.org/10.3201/eid1405.071395>
 79. Goulet, V., King, L. A., Vaillant, V., & de Valk, H. (2013). "What is the incubation period for listeriosis?". *BMC Infectious Diseases*, 13(1) <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-11>
 80. Guerini, M. N., Brichta-Harhay, D. M., Shackelford, S. D., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Kalchayanand, N., . . . Koohmaraie, M. (2007). "Listeria prevalence and *Listeria monocytogenes* serovar diversity at cull cow and bull processing plants in the United States". *Journal of Food Protection*, 70(11), 2578–2582. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.11.2578>
 81. Guevara, R. E., Mascola, L., & Sorvillo, F. (2009). "Risk factors for mortality among patients with nonperinatal listeriosis in Los Angeles County, 1992–2004". *Clinical Infectious Diseases*, 48(11), 1507–1515. <https://doi.org/10.1086/598935>
 82. Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., & Briandet, R. (2015). "Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype". *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1813–1819. <https://doi.org/10.1128/AEM.03173-14>
 83. Hamon, M., Bierne, H., & Cossart, P. (2006). "Listeria monocytogenes: A multifaceted model". *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 423–434. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1413>
 84. Hansen, C. H., Vogel, B. F., & Gram, L. (2006). "Prevalence and Survival of *Listeria monocytogenes* in Danish Aquatic and Fish-Processing Environments". *Journal of Food Protection*, 69(9), 2113–2122. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.9.2113>
 85. Harmsen, M., Lappann, M., Knöchel, S., & Molin, S. (2010). "Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*". *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2271–2279. <https://doi.org/10.1128/AEM.02361-09>
 86. Hasegawa, M., Iwabuchi, E., Yamamoto, S., Muramatsu, M., Takashima, I., & Hirai, K. (2014). "Prevalence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in feces

- of black beef cattle reared in three geographically distant areas in Japan”. **Foodborne Pathogens and Disease**, 11(2), 96-103. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1616>
87. Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D., & Gahan, C. G. M. (2002). “Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: Jumping the hurdles imposed by minimal processing”. **International Dairy Journal**, 12(2-3), 273-283. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00125-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00125-X)
 88. Ho, J. L., Shands, K. N., Friedland, G., Eckind, P., & Fraser, D. W. (1986). “An Outbreak of Type 4b *Listeria monocytogenes* Infection Involving Patients from Eight Boston Hospitals”. **Archives of Internal Medicine**, 146(3), 520. <https://doi.org/10.1001/archinte.1986.00360150134016>
 89. ISO 11290-1. (2017). *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. — Part 1: Detection method*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
 90. Jadhav, S., Gulati, V., Fox, E. M., Karpe, A., Beale, D. J., Seviar, D., Bhave, M., & Palombo, E. A. (2015). “Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry”. **International Journal of Food Microbiology**, 202, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.023>
 91. Jang, Y.-S., Moon, J.-S., Kang, H. J., Bae, D., & Seo, K.-H. (2021). “Prevalence, Characterization, and Antimicrobial Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from Raw Beef and Slaughterhouse Environments in Korea”. **Foodborne Pathogens and Disease**, 18(6), 419–425. <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2903>
 92. Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., & Uyttendaele, M. (2010). “Alternative microbial methods: An overview and selection criteria”. **Food Microbiology**, 27(6), 710–730. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.008>
 93. Jiang, J., & Xiong, Y. L. (2015). “Technologies and mechanisms for safety control of ready-to-eat muscle foods: An updated review”. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 55(13), 1886-1901. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.732624>
 94. Jinneman, K. C., Wekell, M. M., & Eklund, M. W. (2007). Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Fish and Seafood. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety* (Third edition). Boca Raton: CRC Press, FL. pp. 617-653. <https://doi.org/10.1201/9781420015188-22>
 95. Jordan, K., Hunt, K., & Dalmasso, M. (2016). *Listeria monocytogenes* in Milk Products. In N. Garg, S. M. Abdel-Aziz, & A. Aeron (Eds.), *Microbes in Food and Health*. Springer International Publishing, Switzerland. pp. 289–315. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25277-3_15
 96. Jordan, K., Hunt, K., Lourenco, A., & Pennone, V. (2018). “*Listeria monocytogenes* in the Food Processing Environment”. **Current Clinical Microbiology Reports**, 5(2), 106–119. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0090-1>
 97. Kawacka, I., Pietrzak, B., Schmidt, M., & Olejnik-Schmidt, A. (2023). “*Listeria monocytogenes* isolates from meat products and processing environment in Poland are sensitive to commonly used antibiotics, with rare cases of reduced sensitivity to ciprofloxacin”. **Life**, 13(3), 821. <https://doi.org/10.3390/life13030821>
 98. Khen, B. K., Lynch, O. A., Carroll, J., McDowell, D. A., & Duffy, G. (2015). “Occurrence, antibiotic resistance and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* in the beef chain in the republic of Ireland”. **Zoonoses and Public Health**, 62(1), 11-17. <https://doi.org/10.1111/zph.12106>
 99. Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G.-J., & Giaouris, E. (2012). “Differential Biofilm Formation and Chemical Disinfection Resistance of

- Sessile Cells of Listeria monocytogenes Strains under Monospecies and Dual-Species (with Salmonella enterica) Conditions*. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(8), 2586–2595. <https://doi.org/10.1128/aem.07099-11>
100. Kovacevic, J., Ziegler, J., Walecka-Zacharska, E., Reimer, A., Kitts, D. D., & Gilmour, M. W. (2016). “Tolerance of *Listeria monocytogenes* to Quaternary Ammonium Sanitizers is mediated by a Novel Efflux Pump Encoded by *emrE*”. **Applied and Environmental Microbiology**, 82(3), 939–953. <https://doi.org/10.1128/aem.03741-15>
 101. Kremer, P. H. C., Lees, J. A., Koopmans, M. M., Ferwerda, B., Arends, A. W. M., Feller, M. M., ... Bentley, S. D. (2017). “Benzalkonium tolerance genes and outcome in *Listeria monocytogenes* meningitis”. **Clinical Microbiology and Infection**, 23(4), 265.e1–265.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.12.008>
 102. Kulesh, R., Shinde, S. V., Khan, W. A., Chaudhari, S. P., Patil, A. R., Kurkure, N. V., ... Barbuddhe, S. B. (2022). “The occurrence of *Listeria monocytogenes* in goats, farm environment and invertebrates”. **Biological Rhythm Research**, 53(6), 831-840. <https://doi.org/10.1080/09291016.2019.1660836>
 103. Kurazono, M., Nakamura, K., Yamada, M., Yonemaru, T., & Sakoda, T. (2003). “Pathology of listerial encephalitis in chickens in Japan”. **Avian Diseases**, 47(4), 1496-1502. <https://doi.org/10.1637/7066>
 104. Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety* (Third edition). Boca Raton: CRC Press, FL. pp. 157-214.
 105. Lamont, R. F., Sobel, J., Mazaki-Tovi, S., Kusanovic, J. P., Vaisbuch, E., Kim, S. K., . . . Romero, R. (2011). “Listeriosis in human pregnancy: A systematic review”. **Journal of Perinatal Medicine**, 39(3), 227-236. <https://doi.org/10.1515/JPM.2011.035>
 106. Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). “An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food”. **Frontiers in Microbiology**, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01227>
 107. Lawrence, L.M., Gilmour, A. (1994). “Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR”. **Applied and Environmental Microbiology**, 60(12), 4600-4604. <https://doi.org/10.1128/aem.60.12.4600-4604.1994>
 108. Li, Q., Sherwood, J. S., & Logue, C. M. (2007). “Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. recovered from processed bison”. **Letters in Applied Microbiology**, 44(1), 86-91. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02027.x>
 109. Lin, H., Ye, C., Chen, S., Zhang, S., & Yu, X. (2017). “Viable but non-culturable *E. coli* induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable counterparts”. **Environmental Pollution**, 230, 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.047>
 110. Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., ... Broome, C. V. (1988). “Epidemic Listeriosis Associated with Mexican-Style Cheese”. **New England Journal of Medicine**, 319(13), 823–828. <https://doi.org/10.1056/nejm198809293191303>
 111. Little, C.L., Pires, S.M., Gillespie, I.A., Grant, K., Nichols, G.L. (2010). “Attribution of human *Listeria monocytogenes* infections in England and Wales to ready-to-eat food sources placed on the market: Adaptation of the Hald Salmonella

- source attribution model". *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(7):749-56. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0439>
112. Liu, D. (2008). *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Raton: CRC Press, FL. pp. 1-270.
 113. Liu, S., Graham, J. E., Bigelow, L., Morse II, P. D., & Wilkinson, B. J. (2002). "Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature". *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1697-1705. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1697-1705.2002>
 114. Liu, D., Lawrence, M. L., Ainsworth, A. J., & Austin, F. W. (2005). "Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains". *FEMS Microbiology Letters*, 243(2), 373-378. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.025>
 115. Liu, D., Lawrence, M. L., Austin, F. W., & Ainsworth, A. J. (2007). "A multiple x PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*". *Journal of Microbiological Methods*, 71(2), 133-140. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.007>
 116. Lungu, B., O'Bryan, C. A., Muthaiyan, A., Milillo, S. R., Johnson, M. G., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2011). "*Listeria monocytogenes*: Antibiotic resistance in food production". *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(5), 569-578. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0718>
 117. Madden, R. H., Espie, W. E., Moran, L., McBride, J., & Scates, P. (2001). "Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on beef carcasses in Northern Ireland". *Meat Science*, 58(4), 343-346. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00153-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00153-4)
 118. Maertens De Noordhout, C., Devleeschauwer, B., Maertens De Noordhout, A., Blocher, J., Haagsma, J. A., Havelaar, A. H., & Speybroeck, N. (2016). "Comorbidities and factors associated with central nervous system infections and death in non-perinatal listeriosis: A clinical case series". *BMC Infectious Diseases*, 16(1) <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1602-3>
 119. Magalhães, R., Mena, C., Ferreira, V., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2014). Bacteria: *Listeria monocytogenes*. In Y. Motarjemi (Ed.), *Encyclopedia of Food Safety*. Academic Press, Elsevier Ltd. pp. 450–461. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378612-8.00101-3>
 120. Magiorakos, A. – P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., . . . Monnet, D. L. (2012). "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance". *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
 121. Mata, M. T., Baquero, F., & Pérez-Díaz, J. C. (2000). "A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*". *FEMS Microbiology Letters*, 187(2), 185-188. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00199-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00199-3)
 122. Mattila, M., Lindström, M., Somervuo, P., Markkula, A., & Korkeala, H. (2011). "Role of *flhA* and *motA* in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures". *International Journal of Food Microbiology*, 148(3), 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.022>
 123. Maurella, C., Gallina, S., Ru, G., Adriano, D., Bellio, A., Bianchi, D.M., Chiavacci, L., Crescio, M.I., Croce, M., D'Errico, V., Dupont, M.F., Marra, A., Natangelo, U., Pomilio, F., Romano, A., Stanzione, S., Zaccaria, T., Zuccon, F., Caramelli, M., Decastelli, L. (2018). "Outbreak of febrile gastroenteritis caused

- by *Listeria monocytogenes* 1/2A in sliced cold beef ham, Italy, May 2016". *Eurosurveillance*, 23(10). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2018.23.10.17-00155>
124. McCollum, J. T., Cronquist, A. B., Silk, B. J., Jackson, K. A., O'Connor, K. A., Cosgrove, S., . . . Mahon, B. E. (2013). "Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe". *New England Journal of Medicine*, 369(10), 944-953. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215837>
 125. Melo, J., Andrew, P. W., & Faleiro, M. L. (2015). "Listeria monocytogenes in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses". *Food Research International*, 67, 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.031>
 126. Meloni, D., Mazza, R., Piras, F., Lamon, S., Consolati, S. G., Mureddu, A., & Mazzette, R. (2012). "The biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolated from meat, poultry, fish and processing plant environments is related to serotype and pathogenic profile of the strains". *Veterinary Science Development*, 2(1), 12. <https://doi.org/10.4081/vsd.2012.4012>
 127. Mereghetti, L., Quentin, R., Marquet-Van der Mee, N., & Audurier, A. (2000). "Low Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to Quaternary Ammonium Compounds". *Applied Environmental Microbiology*, 66(11), 5083–5086. <https://doi.org/10.1128/aem.66.11.5083-5086.2000>
 128. Milillo, S. R., Friedly, E. C., Saldivar, J. C., Muthaiyan, A., O'bryan, C., Crandall, P. G., ... Ricke, S. C. (2012). "A Review of the Ecology, Genomics, and Stress Response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(8), 712–725. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.507909>
 129. Min, S. C., Schraft, H., Hansen, L. T., & Mackereth, R. (2006). "Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass". *Food Microbiology*, 23(3), 250-259. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.04.004>
 130. Minarovičová, J., Véghová, A., Mikulášová, M., Chovanová, R., Šoltýs, K., Drahovská, H., & Kačlíková, E. (2018). "Benzalkonium chloride tolerance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from a meat processing facility is related to presence of plasmid-borne bcrABC cassette". *International Journal of Genetics and Molecular Microbiology*, 111(10), 1913–1923. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1082-0>
 131. Møretrø, T., & Langsrud, S. (2004). "Listeria monocytogenes: biofilm formation and persistence in food-processing environments". *Biofilms*, 1(2), 107–21. <https://doi.org/10.1017/S1479050504001322>
 132. Moshtaghi, H., Garg, S. R., & Mandokhot, U. V. (2003). "Prevalence of *Listeria* in soil". *Indian Journal of Experimental Biology*, 41(12), 1466–1468.
 133. Mostowy, S., & Cossart, P. (2012). "Virulence factors that modulate the cell biology of listeria infection and the host response". *Adv. Immunol.*, 113, 19-32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394590-7.00007-5>
 134. Müller, A., Rychli, K., Zaiser, A., Wieser, C., Wagner, M., & Schmitz-Esser, S. (2014). "The *Listeria monocytogenes* transposon Tn6188 provides increased tolerance to various quaternary ammonium compounds and ethidium bromide". *FEMS Microbiology Letters*, 361(2), 166–173. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12626>

135. Murray, P. R. (2010). "Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology". **Clinical Microbiology and Infection**, 16(11), 1626–1630. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03364.x>
136. Murray, E.G., Webb, R.A., & Swann, M.B. (1926). "A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.)". **The Journal of Pathology and Bacteriology**, 29(4), 407–439. <https://doi.org/10.1002/path.1700290409>
137. Mylonakis, E., Paliou, M., Hohmann, E. L., Calderwood, S. B., & Wing, E. J. (2002). "Listeriosis during pregnancy: A case series and review of 222 cases". **Medicine**, 81(4), 260-269. <https://doi.org/10.1097/00005792-200207000-00002>
138. Niemira, B. A. (2010). "Irradiation sensitivity of planktonic and biofilm-associated *Listeria monocytogenes* and *L. innocua* as influenced by temperature of biofilm formation". **Food and Bioprocess Technology**, 3(2), 257-264. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0079-5>
139. Noll, M., Trunzer, K., Vondran, A., Vincze, S., Dieckmann, R., Al Dahouk, S., & Gold, C. (2020). "Benzalkonium Chloride Induces a VBNC State in *Listeria monocytogenes*". **Microorganisms**, 8(2), 184. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020184>
140. Nwaiwu, O. (2020). "What are the recognized species of the genus *Listeria*?". **Access Microbiology**, 2(9). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000153>
141. Olaimat, A. N., Al-Holy, M. A., Shahbaz, H. M., Al-Nabulsi, A. A., Abu Ghoush, M. H., Osaili, T. M., ... Holley, R. A. (2018). "Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from Food Products: A Comprehensive Review". **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 17(5), 1277–1292. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12387>
142. Olsen, S. J., Patrick, M., Hunter, S. B., Reddy, V., Kornstein, L., MacKenzie, W. R., . . . Mead, P. (2005). "Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat". **Clinical Infectious Diseases**, 40(7), 962-967. <https://doi.org/10.1086/428575>
143. Ooi, S. T., & Lorber, B. (2005). "Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*". **Clinical Infectious Diseases**, 40(9), 1327-1332. <https://doi.org/10.1086/429324>
144. Orsi, R. H., Bakker, H. C. den, & Wiedmann, M. (2011). "*Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics". **International Journal of Medical Microbiology**, 301(2), 79–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.05.002>
145. Oswaldi, V., Lüth, S., Dzierzon, J., Meemken, D., Schwarz, S., Feßler, A. T., Félix, B., & Langforth, S. (2022). "Distribution and Characteristics of *Listeria* spp. in Pigs and Pork Production Chains in Germany". **Microorganisms**, 10(3), 512. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030512>
146. Pamer, E. G. (2004). "Immune responses to *Listeria monocytogenes*". **Nature Reviews Immunology**, 4(10), 812-823. <https://doi.org/10.1038/nri1461>
147. Papatzimos, G., Kotzamanidis, C., Kyritsi, M., Malissiova, E., Economou, V., Giantzi, V., . . . Sergelidis, D. (2022). "Prevalence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in meat, meat products, food handlers and the environment of the meat processing and the retail facilities of a company in northern Greece". **Letters in Applied Microbiology**, 74(3), 367-376. <https://doi.org/10.1111/lam.13620>

148. Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. and Göker, M. (2020). "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 5607-5612; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
149. Peccio, A., Autio, T., Korkeala, H., Rosmini, R., & Trevisani, M. (2003). "Listeria monocytogenes occurrence and characterization in meat-producing plants". *Letters in Applied Microbiology*, 37(3), 234–238. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01384.x>
150. Pirie, J. H. H. (1940). "Listeria: Change of name for a genus of bacteria [7]". *Nature*, 145(3668), 264. <https://doi.org/10.1038/145264a0>
151. Pizarro-Cerdá, J., Kühbacher, A., & Cossart, P. (2012) "Entry of Listeria monocytogenes in mammalian epithelial cells: an updated view". *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2 (11), a010009. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010009>
152. Popowska, M., Krawczyk-Balska, A., Ostrowski, R., & Desvaux, M. (2017). "InlL from Listeria monocytogenes is involved in biofilm formation and adhesion to mucin". *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00660>
153. Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., & Sohier, D. (2011). "Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology". *Food Microbiology*, 28(5), 848–861. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008>
154. Potel, J. (1952). "Granulomatosis infantiseptica. [Zur Granulomatosis infantiseptica.]". *Zentralblatt Für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abt.: Allgemeine, Landwirtschaftliche Und Technische Mikrobiologie*, 158(3-5), 329-332.
155. Pouillot, R., Klontz, K. C., Chen, Y., Burall, L. S., Macarisin, D., Doyle, M., . . . Van Doren, J. M. (2016). "Infectious dose of Listeria monocytogenes in outbreak linked to ice cream, United States, 2015". *Emerging Infectious Diseases*, 22(12), 2113-2119. <https://doi.org/10.3201/eid2212.160165>
156. Quereda, J. J., Dussurget, O., Nahori, M. - A., Ghoulane, A., Volant, S., Dillies, M. - A., . . . Pizarro-Cerda, J. (2016). "Bacteriocin from epidemic Listeria strains alters the host intestinal microbiota to favor infection". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(20), 5706-5711. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523899113>
157. Radoshevich, L., & Cossart, P. (2018). "Listeria monocytogenes: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis". *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 32-46. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>
158. Rawool, D. B., Malik, S. V. S., Shakuntala, I., Sahare, A. M., & Barbuddhe, S. B. (2007). "Detection of multiple virulence-associated genes in Listeria monocytogenes isolated from bovine mastitis cases". *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), 201-207. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.029>
159. Ray, B., & Bhunia, A. (2008). *Fundamental Food Microbiology* (4th edition). Boca Raton: CRC Press, FL. pp. 288-294.
160. Reis-Teixeira, F. B. D., Alves, V. F., & de Martinis, E. C. P. (2017). "Growth, viability and architecture of biofilms of Listeria monocytogenes formed on abiotic surfaces". *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 587-591. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.004>

161. **Rivera-Betancourt, M., Shackelford, S. D., Arthur, T. M., Westmoreland, K. E., Bellinger, G., Rossman, M., Reagan, J. O., & Koohmaraie, M.** (2004). "Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in Two Geographically Distant Commercial Beef Processing Plants in the United States". **Journal of Food Protection**, 67(2), 295–302. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.2.295>
162. **Robben, C., Fister, S., Witte, A. K., Schoder, D., Rossmanith, P., & Mester, P.** (2018). "Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts". **Scientific Reports**, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33595-5>
163. **Rocourt, J., BenEmbarek, P., Toyofuku, H., & Schlundt, J.** (2003). "Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: The FAO/WHO approach". **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 35(3), 263-267. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00468-6](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00468-6)
164. **Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J., Vázquez-Sánchez, D., & López Cabo, M.** (2018). "Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol". **Foods**, 7(6), 85. <https://doi.org/10.3390/foods7060085>
165. **Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., & Al Dahouk, S.** (2015). "FISHing for bacteria in food – A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria?". **Food Microbiology**, 46, 395–407. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.002>
166. **Sauders, B. D., & Wiedmann, M.** (2007). Ecology of *Listeria* Species and *L. monocytogenes* in the Natural Environment. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety* (Third edition). Boca Raton: CRC Press, FL. pp. 21–53. <https://doi.org/10.1201/9781420015188.ch2>
167. **Schaffter, N., & Parriaux, A.** (2002). "Pathogenic-bacterial water contamination in mountainous catchments". **Water Research**, 36(1), 131–139. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00242-1](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00242-1)
168. **Schlech, W. F.** (2019). "Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection". **Microbiology Spectrum**, 7(3) <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0014-2018>
169. **Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., . . . , & Broome, C. V.** (1983). "Epidemic listeriosis — evidence for transmission by food". **New England Journal of Medicine**, 308(4), 203-206. <https://doi.org/10.1056/NEJM198301273080407>
170. **Schoder, D., Guldemann, C., & Märtilbauer, E.** (2022). "Asymptomatic carriage of *Listeria monocytogenes* by animals and humans and its impact on the food chain". **Foods**, 11(21) <https://doi.org/10.3390/foods11213472>
171. **Settanni, L., & Corsetti, A.** (2007). "The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review". **Journal of Microbiological Methods**, 69(1), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.12.008>
172. **Silk, B. J., Date, K. A., Jackson, K. A., Pouillot, R., Holt, K. G., Graves, L. M., . . . Mahon, B. E.** (2012). "Invasive listeriosis in the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 2004-2009: Further targeted prevention needed for higher-risk groups". **Clinical Infectious Diseases**, 54(SUPPL.5), S396-S404. <https://doi.org/10.1093/cid/cis268>

173. Singh, A., Poshtiban, S., & Evoy, S. (2013). "Recent Advances in Bacteriophage Based Biosensors for Food-Borne Pathogen Detection". *Sensors*, 13(2), 1763–1786. <https://doi.org/10.3390/s130201763>
174. Sleator, R. D., Watson, D., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2009). "The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract". *Microbiology*, 155(8), 2463-2475. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030205-0>
175. Smith, B., Larsson, J.T., Lisby, M., Müller, L., Madsen, S.B., Engberg, J., Bangsbo, J., Ethelberg, S., Kemp, M. (2011). "Outbreak of listeriosis caused by infected beef meat from a meals- on- wheels delivery in Denmark 2009". *Clin Microbiol Infect*, 17(1):50-2. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03200.x>
176. Srinivasan, V., Nam, H. M., Nguyen, L. T., Tamilselvam, B., Murinda, S. E., & Oliver, S. P. (2005). "Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms". *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(3), 201-211. <https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.201>
177. Takahashi, T., Ochiai, Y., Hiroki Matsudate, Hasegawa, K., Segawa, T., Fukuda, M., Hondo, R., & Ueda, F. (2007). "Isolation of *Listeria monocytogenes* from the Skin of Slaughtered Beef Cattle". *Public Health*, 69(10), 1077–1079. <https://doi.org/10.1292/jvms.69.1077>
178. Thakur, M., Asrani, R. K., & Patial, V. (2017). *Listeria monocytogenes*: A food-borne pathogen. In C. ER. Dodd, T. G. Aldsworth, & R. A. Stein (Eds.), *Foodborne diseases* (Third edition). Academic Press, Elsevier Ltd. pp. 157-192. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00006-3>
179. Thomas, J., Govender, N., McCarthy, K. M., Erasmus, L. K., Doyle, T. J., Allam, M., ... Stewart, R. (2020). "Outbreak of Listeriosis in South Africa Associated with Processed Meat". *New England Journal of Medicine*, 382(7), 632–643. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1907462>
180. Thønnings, S., Knudsen, J. D., Schønheyder, H. C., Søgaard, M., Arpi, M., Gradel, K. O., . . . Pinholt, M. (2016). "Antibiotic treatment and mortality in patients with *Listeria monocytogenes* meningitis or bacteraemia". *Clinical Microbiology and Infection*, 22(8), 725-730. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.006>
181. Välimaa, A.-L., Tilsala-Timisjärvi, A., & Virtanen, E. (2015). "Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain – A review". *Food Control*, 55, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.037>
182. Varsaki, A., Ortiz, S., Santorum, P., López, P., López-Alonso, V., Hernández, M., . . . Martínez-Suárez, J. V. (2022). "Prevalence and population diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy cattle farms in the Cantabria region of Spain". *Animals*, 12(18). <https://doi.org/10.3390/ani12182477>
183. Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2010). "An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors". *Biotechnology Advances*, 28(2), 232–254. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.12.004>
184. Vivant, A.-L., Garmyn, D., & Piveteau, P. (2013). "*Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(NOV) <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00087>
185. Wang, Y., Lu, L., Lan, R., Salazar, J. K., Liu, J., Xu, J., & Ye, C. (2017). "Isolation and characterization of *Listeria* species from rodents in natural

- environments in China". **Emerging Microbes & Infections**, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.28>
186. **Wesley, I. V.** (2007). Listeriosis in animals. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety* (Third edition). Boca Raton: CRC Press, FL. pp. 55-84.
 187. **Wieczorek, K., Dmowska, K., & Osek, J.** (2012). "Prevalence, Characterization, and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolates from Bovine Hides and Carcasses". **Applied and Environmental Microbiology**, 78(6), 2043–2045. <https://doi.org/10.1128/aem.07156-11>
 188. **Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., Grudlewska-Buda, K., Walecka-Zacharska, E., Korkus, J., & Gospodarek-Komkowska, E.** (2021). "Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to the stress factors in the food processing environment". **Frontiers in Microbiology**, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.710085>
 189. **Winter, P., Schilcher, F., Bagò, Z., Schoder, D., Egerbacher, M., Baumgartner, W., & Wagner, M.** (2004). "Clinical and histopathological aspects of naturally occurring mastitis caused by *Listeria monocytogenes* in cattle and ewes". **Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, 51(4), 176-179. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00751.x>
 190. **Witte, C. E., Archer, K. A., Rae, C. S., Sauer, J. - D., Woodward, J. J., & Portnoy, D. A.** (2012). "Innate immune pathways triggered by *Listeria monocytogenes* and their role in the induction of cell-mediated immunity". **Adv. Immunol.**, 113, 135-156. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394590-7.00002-6>
 191. **World Health Organization.** (2018). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine* (Sixth revision). Switzerland, pp. 1-52. Access at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf>
 192. **Yeni, F., Acar, S., Polat, Ö. G., Soyer, Y., & Alpas, H.** (2014). "Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce". **Food Control**, 40, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.020>
 193. **Yu, T., Jiang, X., Zhang, Y., Ji, S., Gao, W., & Shi, L.** (2018). "Effect of Benzalkonium Chloride Adaptation on Sensitivity to Antimicrobial Agents and Tolerance to Environmental Stresses in *Listeria monocytogenes*". **Frontiers in Microbiology**, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02906>
 194. **Zenewicz, L. A., & Shen, H.** (2007). "Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: A short overview". **Microbes and Infection**, 9(10), 1208-1215. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.008>
 195. **Zeng, H., Zhang, X., Sun, Z., & Fang, W.** (2005). "Multiplex PCR identification of *Listeria monocytogenes* isolates from milk and milk-processing environments". **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 86(3), 367–371. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2352>
 196. **Zhang, Y., Yeh, E., Hall, G., Cripe, J., Bhagwat, A. A., & Meng, J.** (2007). "Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods". **International Journal of Food Microbiology**, 113(1), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.010>
 197. **Zhao, Q., Hu, P., Li, Q., Zhang, S., Li, H., Chang, J., . . . Lu, S.** (2021). "Prevalence and transmission characteristics of *Listeria* species from ruminants in farm and slaughtering environments in China". **Emerging Microbes and Infections**, 10(1), 356-364. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1888658>

198. **Zhu, L., Feng, X., Zhang, L., Zhu, R., & Luo, X.** (2012). “*Prevalence and Serotypes of Listeria monocytogenes Contamination in Chinese Beef Processing Plants*”. **Foodborne Pathogens and Disease**, 9(6), 556–560. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1088>
199. **Zunabovic, M., Domig, K. J., & Kneifel, W.** (2011). “*Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods and manufacture environments – A review*”. **LWT - Food Science and Technology**, 44(2), 351–362. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.005>

Ελληνική

1. **Αρβανιτίδου-Βαγιωνά, Μ.** (2013). *Υγιεινή* (Δεύτερη έκδοση). Θεσσαλονίκη: University Studio Press, Ελλάδα. σελ. 79-81.
2. **Κανονισμός (ΕΕ) 2017/625 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 15ης Μαρτίου 2017** για τους επίσημους ελέγχους και τις άλλες επίσημες δραστηριότητες που διενεργούνται με σκοπό την εξασφάλιση της εφαρμογής της νομοθεσίας για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές και των κανόνων για την υγεία και την καλή μεταχείριση των ζώων, την υγεία των φυτών και τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, για την τροποποίηση των κανονισμών του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 999/2001, (ΕΚ) αριθ. 396/2005, (ΕΚ) αριθ. 1069/2009, (ΕΚ) αριθ. 1107/2009, (ΕΕ) αριθ. 1151/2012, (ΕΕ) αριθ. 652/2014, (ΕΕ) 2016/429 και (ΕΕ) 2016/2031, των κανονισμών του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 1/2005 και (ΕΚ) αριθ. 1099/2009 και των οδηγιών του Συμβουλίου 98/58/ΕΚ, 1999/74/ΕΚ, 2007/43/ΕΚ, 2008/119/ΕΚ και 2008/120/ΕΚ και για την κατάργηση των κανονισμών του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 854/2004 και (ΕΚ) αριθ. 882/2004, των οδηγιών του Συμβουλίου 89/608/ΕΟΚ, 89/662/ΕΟΚ, 90/425/ΕΟΚ, 91/496/ΕΟΚ, 96/23/ΕΚ, 96/93/ΕΚ και 97/78/ΕΚ και της απόφασης 92/438/ΕΟΚ του Συμβουλίου (κανονισμός για τους επίσημους ελέγχους). Επίσημη Εφημερίδα της ΕΕ, L95/1, σελ. 1-142.
3. **Κανονισμός (ΕΚ) 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005** περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. Επίσημη Εφημερίδα της ΕΕ, L338, σελ. 1-30.
4. **Κανονισμός (ΕΚ) 853/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004** για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Επίσημη Εφημερίδα της ΕΕ, L139/5, σελ. 1-151.
5. **Καραϊωάννογλου, Π.** (2016). *Υγιεινή του Κρέατος των Θηλαστικών* (Τέταρτη έκδοση). Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Α.Ε. Αφοί Κυριακίδη, Ελλάδα. σελ. 521-527.
6. **Μάντης, Α. Ι., Παπαγεωργίου, Δ. Κ., Φλετούρης, Δ. Ι., & Αγγελίδης, Α. Σ.** (2015). *Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Α.Ε. Αφοί Κυριακίδη, Ελλάδα. σελ. 106-109.
7. **Matthews, K. R., Kniel, K. E., & Montville, T. J.** (2021). *Μικροβιολογία Τροφίμων* (Πρώτη Έκδοση) (Ι. Γιαβάσης, Ι. Μποζιάρης, Ε. Γκιαούρης, μετ.). Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Δίσιγμα, Ελλάδα. σελ. 267-290.
8. **Murray, P.R., Rosenthal, K.S., & Pfaller, M.A.** (2012). *Ιατρική Μικροβιολογία* (Εκτη έκδοση) (Ν. Μαλισιόβα, μετ.). Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, Ελλάδα. σελ. 277-280.
9. **Φωκάς, Σ., & Φωκάς, Σ.** (2017). *Κλινική Μικροβιολογία και Αντιβιογράμμα* (Δεύτερη έκδοση). Αθήνα: Λύχνος Ε.Π.Ε. – Γραφικές Τέχνες, Ελλάδα. σελ. 99-102.