



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

«Διερεύνηση της παρουσίας της *Listeria monocytogenes* στο κρέας, τα προϊόντα κρέατος και το περιβάλλον εγκαταστάσεων επεξεργασίας και διάθεσης κρέατος στη Β. Ελλάδα»

ΠΑΠΑΤΖΗΜΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΑΠΟΦΟΙΤΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΟΥ
ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

2019

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

«Διερεύνηση της παρουσίας της *Listeria monocytogenes* στο κρέας, τα προϊόντα κρέατος και το περιβάλλον εγκαταστάσεων επεξεργασίας και διάθεσης κρέατος στη Β. Ελλάδα»

ΠΑΠΑΤΖΗΜΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΑΠΟΦΟΙΤΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΟΥ
ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

2019

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:

Δρ. Σεργκελίδης Δανιήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής Α.Π.Θ.

Μέλη:

Δρ. Μαλισσιόβα Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Π.Θ.

Δρ. Οικονόμου Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής Α.Π.Θ.

Στη μνήμη του πατέρα μου,

Στην μητέρα μου,

Στον αδελφό μου

Διερεύνηση της παρουσίας της *Listeria monocytogenes* στο κρέας, τα προϊόντα κρέατος και το περιβάλλον εγκαταστάσεων επεξεργασίας και διάθεσης κρέατος στη Β. Ελλάδα

Λέξεις κλειδιά: *L. monocytogenes*, κρέας, προϊόντα κρέατος, εγκαταστάσεις επεξεργασίας κρέατος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *L. monocytogenes* είναι ένα σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο, που προκαλεί τη λιστερίωση, μία σοβαρή ασθένεια με μεγάλη θνησιμότητα στους ανθρώπους και τα ζώα. Σχεδόν το 90% των περιστατικών λιστερίωσης στον άνθρωπο εκδηλώνεται μετά από κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων. Ιδιαίτερα εκτεθειμένες στο εν λόγω βακτήριο εμφανίζονται οι ευάλωτες ομάδες όπως τα νεογνά, οι έγκυες γυναίκες, οι υπερήλικες και γενικά τα ανοσοκατασταλμένα άτομα. Το βακτήριο είναι ευρέως διαδεδομένο σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Η ικανότητά του να παράγει βιομεμβράνες σε επιφάνειες εξοπλισμού και επεξεργασίας αυξάνει τον κίνδυνο μόλυνσης των τροφίμων. Ως εκ τούτου και λόγω της δυσκολίας ανίχνευσης και ελέγχου του στα τρόφιμα, καθίσταται επικίνδυνο τροφιμογενές παθογόνο αναφορικά με την ασφάλεια των τροφίμων και κατ' επέκταση της δημόσιας υγείας. Στο πλαίσιο της παρούσης εργασίας διερευνήθηκε η συχνότητα παρουσίας της *L. monocytogenes* στο νωπό κρέας, στα προϊόντα κρέατος, στο περιβάλλον επεξεργασίας μιας καθετοποιημένης εταιρίας μεταποίησης κρέατος και εμπορίας ειδών διατροφής στη Βόρεια Ελλάδα και στα τρία υποκαταστήματά της. Εξετάστηκαν συνολικά 303 δείγματα νωπού κρέατος θηλαστικών και πουλερικών, έτοιμα-προς-κατανάλωση τρόφιμα, αλλαντικά ωρίμανσης και παρασκευάσματα κρέατος. Επίσης, ελήφθησαν δείγματα από τις επιφάνειες και το περιβάλλον επεξεργασίας των εγκαταστάσεων της εταιρίας καθώς και από τα χέρια και τις ρινικές κοιλότητες των εργαζόμενων. Η απομόνωση της *Listeria* spp. έγινε με βάση την ISO 11290-2:1998 σε άγαρ *Listeria* Ottavani & Agosti (ALOA) ενώ η ταυτοποίηση των ειδών και η τυποποίηση της *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο φασματοσκοπίας μαζών εκρόφησης/ιονισμού της μήτρας με την βοήθεια ακτίνων λέιζερ (MALDI – TOF MS). Από το σύνολο των εξετασθέντων δειγμάτων, 12 εξ αυτών βρέθηκαν μολυσμένα με *L. monocytogenes* (3,26%), 8 (2,64%) με *L. innocua* και 2 (0,66%) με *L. welshimeri*. Εννέα στελέχη της *L. monocytogenes* απομονώθηκαν από τον εξοπλισμό και τις επιφάνειες επεξεργασίας

(75%), δύο από προϊόντα νωπού κρέατος (16,66%) και ένα από τα χέρια χειριστή τροφίμων (8,33%). Το παθογόνο δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα που ελήφθησαν από τα έτοιμα-προς-κατανάλωση τρόφιμα. Ακολούθησε δοκιμασία προσδιορισμού των οροτύπων των απομονωθέντων στελεχών της *L. monocytogenes* με τη μέθοδο πολλαπλής PCR (multiplex PCR) τα αποτελέσματα της οποίας κατέδειξαν πως το σύνολο των στελεχών ανήκουν σε 2 ομάδες οροτύπων : 10 στελέχη εξ αυτών ανήκουν στην IIa (1/2a και 3a) σε ποσοστό 83,3%, ένα στέλεχος στην IIc (1/2c και 3c) σε ποσοστό 8,3%, ενώ ένα στέλεχος βρέθηκε μη τυποποιήσιμο. Παράλληλα έγινε έλεγχος των στελεχών αναφορικά με τη λοιμογόνο δράση τους με τη μέθοδο ανίχνευσης των γονιδίων λοιμογονικότητας *inlA*, *inlB*, *inlC* (κωδικοποιούν ιντερναλίνες), *plcA* (κωδικοποιεί την φωσφολιπάση C της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης), *prfA* (μεταγραφικό ενεργοποιητή πρωτεΐνης), *actA* (κωδικοποιεί την ακτίνη), *hlyA* (κωδικοποιεί την λιστεριολυσίνη O), *iap* (κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που σχετίζεται με την διείσδυση του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατέδειξαν πως και στα 12 εξετασθέντα στελέχη ανιχνεύθηκαν τα παραπάνω γονίδια παθογένειας με εξαίρεση 4 στελέχη, τα οποία ήταν αρνητικά όσον αφορά την παρουσία του γονιδίου *actA*. Ο έλεγχος της ικανότητας σχηματισμού βιομεμβρανών κατέδειξε πως τα 11 από τα 12 στελέχη είχαν ισχυρή ικανότητα ανάπτυξης βιομεμβρανών. Επίσης, από την μελέτη του δένδρογράμματος βασικού φάσματος (Main spectra profiles, MSP), που κατασκευάστηκε με βάση το πρωτεϊνικό προφίλ των απομονωθέντων στελεχών, προέκυψε πως υπήρχε συγγένεια μεταξύ στελεχών προερχομένων από διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα βρέθηκαν τρία συγγενικά clusters, εκ των οποίων το πρώτο αναπτύχθηκε μεταξύ πέντε στελεχών (τέσσερα από το περιβάλλον επεξεργασίας και ένα από χειριστή τροφίμων), το δεύτερο μεταξύ δύο στελεχών (από νωπά προϊόντα κρέατος) και το τρίτο μεταξύ πέντε στελεχών (όλα από το περιβάλλον επεξεργασίας). Συμπερασματικά, η ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* σε διάφορους παράγοντες του περιβάλλοντος, η ικανότητά της να παράγει βιομεμβράνες καθώς και η λοιμογονικότητά της, καθιστούν αφενός το παθογόνο αυτό βακτήριο σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία και αφετέρου τον έλεγχο του δύσκολο καθήκον των επιχειρήσεων επεξεργασίας κρέατος και γενικότερα της βιομηχανίας τροφίμων. Η ικανότητά του δε να σχηματίζει βιομεμβράνες στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων αποτελεί πρόκληση για τις επιχειρήσεις. Οι εξετάσεις που αφορούν την παραμονή του παραπάνω μικροβίου στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων μετά την εξυγίανσή τους, αποτελούν σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης του προγράμματος καθαρισμού και απολυμάνσεων που εφαρμόζουν οι επιχειρήσεις αυτές, αλλά και γενικότερα της επαλήθευσης του συστήματος διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων με βάση τις αρχές HACCP. Κάθε επιχείρηση, συνεπώς, που σχετίζεται με τρόφιμα επιβάλλεται να επενδύει στη συνεχή εκπαίδευση και κατάρτιση του προσωπικού καθώς και στην εκπόνηση, ανάπτυξη και εφαρμογή προγράμματος καθαρισμού και απολυμάνσεων, στα πλαίσια του οποίου η χρήση ειδικών υλικών καθαρισμού και η διενέργεια μικροβιολογικών εξετάσεων θα επαληθεύει την αποτελεσματική εξάλειψη της παρουσίας της *L. monocytogenes*.

Investigation of the presence of *Listeria monocytogenes* in meat, meat products and the environment of meat processing and retail facilities in Northern Greece

Key Words: *L. monocytogenes*, meat, meat products, meat processing plants

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a well-known foodborne pathogen that causes severe illness with high mortality in humans and animals. Almost 90% of human listeriosis occurs after consumption of contaminated food. Particularly vulnerable groups are infants, pregnant women, elderly people and generally immunocompromised individuals. The bacterium is ubiquitous and widely disseminated in food processing environments producing biofilms on equipment surfaces and increasing the risk of food contamination. For this reason and because of the great difficulty of controlling its presence in food, this foodborne pathogen is directly related to food safety. In this study, the incidence of *L. monocytogenes* was investigated in meat, meat products and the environment of a vertically integrated company in Northern Greece with a processing plant and three trading facilities. A total of 303 samples were examined including raw meat of mammals and poultry, ready-to-eat cooked and cured meat products, meat preparations, processing surfaces and the environment of these facilities as well as the food handlers' hands and nasal cavities. The isolation and identification of *Listeria* spp. was performed according to ISO 11290-2:1998 on Agar Listeria Ottavani & Agosti (ALOA). The identification of the species as well as clustering of *L. monocytogenes* was performed by matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry (MALDI – TOF MS). Overall, of the samples tested, 12 samples were found contaminated with *L. monocytogenes* (3.26%), 8 with *L. innocua* (2.64%) and 2 with *L. welshimeri* (0.66%). Nine *L. monocytogenes* strains were isolated from the equipment and the processing surfaces (75%), two from raw meat products (16.66%) and one from food handlers (8.33%). The pathogen was not recovered from any final ready-to-eat product. The assay for serotyping *L. monocytogenes* isolates by multiplex PCR revealed 10 strains belonging to serogroup IIa and one to IIc while one strain was nontypeable. The assay for the detection of the virulence associated genes *inlA*, *inlB* and *inlC* (encoding internalin), *plcA* (encoding phosphatidylinositol phospholipase C), *prfA* (encoding virulence regulator), *actA* (encoding actin), *hlyA* (encoding listeriolysin O) and *iap*

(encoding invasion associated protein), revealed that almost all isolates carried these genes except four which didn't carry the *actA* gene. Furthermore, the biofilm formation assay revealed that 11 isolates of *L. monocytogenes* had strong ability to form biofilms. The MALDI-TOF dendrogram clustering the Main Spectrum Profile (MSPs) from each *L. monocytogenes* isolate, revealed three clusters: one with five isolates (four environmental samples and one from a food handler), one with two isolates (both from raw meat products) and one with five isolates (all from environmental samples). In conclusion, some characteristics of *L. monocytogenes*, such as the virulence, the resistance to various environmental factors and the ability to produce biofilms, make this pathogen a major public health concern and its control a particularly difficult task for meat processing companies and the food industry in general. Especially its ability to form biofilms in the food processing environment is a challenge for food producers and examinations for its presence on food processing surfaces after their sanitation is an important means of assessing the cleaning and disinfection program of these businesses and for the verification of the applied food safety management system based on the HACCP principles. It is crucial that every food industry invests in a complete program of a continuing education and training of their staff and in the development and implementation of a cleaning and disinfection program by which, using specific cleaning materials and microbiological tests, they can verify the effective elimination of *L. monocytogenes* presence.

Περιεχόμενα

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ	i
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ	ii
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	iii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	iv
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1 <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.1 Περιγραφή.....	1
1.2 Ομαδοποίηση των στελεχών της <i>Listeria monocytogenes</i>	4
1.3 Ιστορική αναδρομή της ανακάλυψης της <i>Listeria monocytogenes</i>	6
1.4 Βιοχημικά χαρακτηριστικά της <i>L. monocytogenes</i>	8
1.5 Η παρουσία της <i>L. monocytogenes</i> στο περιβάλλον	8
2 Παθογένεια της <i>L. monocytogenes</i>	10
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά παθογονικότητας	11
2.1.1 Γονίδια σχετιζόμενα με την παθογονικότητα.....	13
2.2 Παρουσία της <i>L. monocytogenes</i> στα τρόφιμα	16
2.3 Κλινικές εκδηλώσεις λιστερίωσης	19
2.3.1 Ομάδες αυξημένου κινδύνου για προσβολή από την <i>L. monocytogenes</i>	21
2.4 Επιδημιολογία λιστερίωσης	22
2.4.1 Επιδημιολογία της ασθένειας στα ζώα.....	23
2.4.2 Επιδημιολογία της ασθένειας στον άνθρωπο	24
2.4.3 Απομόνωση της <i>L. monocytogenes</i> από διάφορες κατηγορίες τροφίμων	28
3 Η <i>L. monocytogenes</i> στα τρόφιμα.....	34
3.1 Γενικές συνθήκες επιβίωσης της <i>L. monocytogenes</i> στα τρόφιμα.....	34
3.2 Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά επιβίωσης της <i>L. monocytogenes</i> στα τρόφιμα.....	36
3.2.1 Προστασία σε εχθρικό περιβάλλον.....	38
3.2.2 Μεταβολική συνεργασία.....	38
3.2.3 Απόκτηση νέων γενετικών συμπεριφορών	39

4 Έλεγχος της <i>L. monocytogenes</i> στα τρόφιμα	41
4.1 Σημασία του ελέγχου της <i>L. monocytogenes</i>	41
4.2 Νομοθετικό πλαίσιο του ελέγχου της <i>L. monocytogenes</i> στα τρόφιμα	44
4.3 Διαχείριση ασφάλειας τροφίμων (HACCP).....	46
4.4 Τρόποι ελέγχου αλλά και διαχείρισης της μόλυνσης των τροφίμων από την <i>L. monocytogenes</i>	49
4.4.1 Θερμική επεξεργασία	49
4.4.2 Εφαρμογή ιονίζουσας ακτινοβολίας	50
4.4.3 Χαμηλή θερμοκρασία (ψύξη ή κατάψυξη)	51
4.4.4 Θέρμανση με μικροκύματα	51
4.4.5 Χρήση συσκευασίας Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας (MAP).....	52
4.4.6 Άλλες τεχνικές συσκευασίας των τροφίμων	53
4.4.7 Χρήση Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP)	54
4.4.8 Προσθήκη άλατος	54
4.4.9 Προσθήκη συντηρητικών ουσιών (νιτρικά και νιτρώδη άλατα)	55
4.4.10 Ρύθμιση του pH με την προσθήκη οργανικών οξέων	56
4.4.11 Κάπνιση.....	56
4.4.12 Προσθήκη καρυκευμάτων.....	57
4.4.13 Χρήση βακτηριοσινών (μέθοδος βιοσυντήρησης).....	58
4.4.14 Αναστολή πολλαπλασιασμού λόγω ανταγωνισμού	59
4.4.15 Άλλες αντιμικροβιακές ουσίες που περιλαμβάνονται στα τρόφιμα	59
4.4.16 Συστατικά των τροφίμων	60
4.4.17 Τεχνολογία εμποδίων (hurdle technology)	60
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	62
5 Πειραματική προσέγγιση - Μεθοδολογία	62
5.1 Σκοπός της έρευνας.....	62
5.2 Υλικά και Μέθοδοι	63
5.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	63
5.2.2 Παρασκευή υποστρωμάτων	69

5.2.3 Απομόνωση και ταυτοποίηση των <i>Listeria</i> spp.	73
5.2.4 Εξέταση επιλεγμένων δειγμάτων για μέτρηση πληθυσμών <i>Escherichia coli</i> και Ολικής Αερόβιας Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX).	73
5.2.5 Ταυτοποίηση <i>L. monocytogenes</i> και άλλων ειδών με την μέθοδο φασματοσκοπίας μαζών εκρόφησης/ιονισμού της μήτρας με την βοήθεια ακτίνων λέιζερ (MALDI – TOF MS)	74
5.2.6 Εκχύλιση του DNA	75
5.2.7 Προσδιορισμός οροτύπων της <i>L. monocytogenes</i> με την εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).	76
5.2.8 Προσδιορισμός της λοιμογόνου δράσης της <i>L. monocytogenes</i> με την εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).	78
5.2.9 Έλεγχος της ικανότητας σχηματισμού βιομεμβρανών των απομονωθέντων στελεχών <i>L. monocytogenes</i>	80
5.3 Αποτελέσματα	81
5.3.1 Εξέταση επιλεγμένων δειγμάτων για <i>E.coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> και Ολικής Αερόβιας Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX).	81
5.3.2 Αποτελέσματα ταυτοποίησης της <i>L. monocytogenes</i> και άλλων ειδών με την μέθοδο MALDI – TOF MS	83
5.3.3. Δενδρόγραμμα MSP <i>L. monocytogenes</i>	90
5.3.4 Αποτελέσματα ελέγχου της ικανότητας σχηματισμού βιομεμβρανών των απομονωθέντων στελεχών <i>L. monocytogenes</i>	91
5.3.5. Αποτελέσματα προσδιορισμού οροτύπων της <i>L. monocytogenes</i> με την εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).	94
5.3.6. Αποτελέσματα της λοιμογόνου δράσης της <i>L. monocytogenes</i> με την εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).	96
5.4 Συζήτηση.....	99
5.5 Συμπεράσματα	109
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	113

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Πίνακας 1: Γενεαλογικές ομάδες, σωματικά (O) και βλεφαριδικά (H) αντιγόνα γνωστών ορότυπων της Listeria monocytogenes</i>	5
<i>Πίνακας 2: Βιοχημικά χαρακτηριστικά των ειδών του γένους Listeria (Mourra et al., 2016)</i>	8
<i>Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός Πίνακας Δειγματοληψιών</i>	65
<i>Πίνακας 4: Γονίδια ανίχνευσης και οι ορότυποι στους οποίους ανιχνεύονται</i>	76
<i>Πίνακας 5: Αλληλουχίες εκκινητών DNA για μελέτη των ορολογικών ομάδων της L. monocytogenes (Doumith et al., 2004)</i>	77
<i>Πίνακας 6: Αρχικές αλληλουχίες εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων μολυσματικότητας της L. monocytogenes (Liu et al., 2007)</i>	79
<i>Πίνακας 7: Αρχικές αλληλουχίες εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων μολυσματικότητας της L. monocytogenes (Rawool et al., 2007)</i>	80
<i>Πίνακας 8: Πληθυσμοί Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας L. monocytogenes και Escherichia coli</i>	82
<i>Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων και αποτελεσμάτων ταυτοποίησης των Listeria spp.</i>	84
<i>Πίνακας 10: Πίνακας με τα ταυτοποιημένα στελέχη L. monocytogenes</i>	88
<i>Πίνακας 11: Πίνακας με τα ταυτοποιημένα στελέχη L. innocua</i>	89
<i>Πίνακας 12: Πίνακας με τα ταυτοποιημένα στελέχη L. welshimeri</i>	89
<i>Πίνακας 13: Πίνακας ικανότητας σχηματισμού βιομεμβρανών των απομονωθέντων στελεχών L. monocytogenes</i>	92
<i>Πίνακας 14: Κατανομή ορότυπων των στελεχών της L. monocytogenes που απομονώθηκαν</i>	95

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>Εικόνα 1: Απεικόνιση στελεχών της L. monocytogenes (Chuks & Orji, 2012)</i>	<i>2</i>
<i>Εικόνα 2: Απεικόνιση των περίτριχων βλεφαρίδων που επιτρέπουν την κίνηση (Ooi & Lorber, 2005).....</i>	<i>2</i>
<i>Εικόνα 4: Η πορεία της L. monocytogenes στο εσωτερικό του οργανισμού (Cossart P., 2011).....</i>	<i>10</i>
<i>Εικόνα 3: Είσοδος της L. monocytogenes στα κύτταρα (Cossart P., 2011).....</i>	<i>13</i>
<i>Εικόνα 5: Παρουσίαση της τεχνολογίας των εμποδίων με παραδείγματα (Leistner, 1995).....</i>	<i>61</i>
<i>Εικόνα 6: Δενδρόγραμμα MSP στελεχών L. monocytogenes.....</i>	<i>90</i>
<i>Εικόνα 7: Έλεγχος των L. monocytogenes στελεχών για την παραγωγή βιομεμβρανών με τη μέθοδο μικροτιτλοποίησης πλακών (microtiter plates)</i>	<i>91</i>
<i>Εικόνα 8: Οροτύπηση της L. monocytogenes με την εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).....</i>	<i>94</i>
<i>Εικόνα 9: Πηκτή αγαρόζης ηλεκτροφόρησης των στελεχών με τη χρήση των γονιδίων inlA, inlC και inlJ.....</i>	<i>97</i>
<i>Εικόνα 10: Πηκτή αγαρόζης ηλεκτροφόρησης των στελεχών με γονίδια plcA, actA, hlyA και iap.....</i>	<i>98</i>

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Ετήσια επίπτωση της λιστερίωσης (αριθμός κρουσμάτων ανά 1.000.000 κατοίκους) στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, 2004-2017 (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2018)27

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής διπλωματικής εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Δανιήλ Σεργκελίδη, Αναπληρωτή Καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, ο οποίος δέχτηκε να αναλάβει την επίβλεψη της εργασίας μου και μου πρόσφερε συνεχώς τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγηση του, χωρίς τις οποίες η ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας θα ήταν αδύνατη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ευάγγελο Οικονόμου, Επίκουρο Καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης – Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου, για την πολύτιμη υποστήριξή του, τις εποικοδομητικές υποδείξεις του και το πολύ καλό κλίμα συνεργασίας που διαμόρφωσε συμβάλλοντας τα μέγιστα στην κατάρτιση της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ελένη Μαλισσιόβα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (πρώην Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων), η οποία ήταν πάντοτε διαθέσιμη και πρόθυμη να προσφέρει τις γνώσεις και να μοιραστεί τις εμπειρίες της για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής διπλωματικής αυτής εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαρία Α. Κυρίτση, Βιοπαθολόγο-Μικροβιολόγο του Εργαστηρίου Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και τον κ. Χρήστο Χατζηχρηστοδούλου, Καθηγητή Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τόσο για την συνδρομή τους στην διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της παρούσης μεταπτυχιακής διπλωματικής

εργασίας, όσο και για την προθυμία τους να προσφέρουν τις επιστημονικές τους γνώσεις και εμπειρίες γενικότερα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χαράλαμπο Κοτζαμανίδη και τον κ. Ζδράγκα Αντώνιο, ερευνητών του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης του ΕΛΓΟ «Δήμητρα» για την πολύτιμη βοήθειά τους στην πραγμάτωση του πειραματικού μέρους της παρούσας έρευνας.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 Listeria monocytogenes

1.1 Περιγραφή

Το γένος *Listeria* ανήκει στην οικογένεια των *Listeriaceae*, στην κλάση των *Bacilli* και στην τάξη των *Bacillales* που ανήκει στο φύλο *Firmicutesa* (Garrity et al., 2004). Περιλαμβάνει δεκαεπτά είδη (συμπεριλαμβανομένων και εννέα, τα οποία περιγράφηκαν μετά το 2009) εκ των οποίων η *Listeria monocytogenes* είναι και το μοναδικό είδος που χαρακτηρίζεται από σημαντική παθογονικότητα (Orsi & Wiedmann, 2016). Επιπλέον, σε μικρό ποσοστό, έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση ασθενειών στον άνθρωπο και τα είδη *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* και *Listeria ivanovii* (Fredriksson-Ahomaa et al., 2009).

Η *L. monocytogenes* είναι ένας θετικός κατά Gram βάκιλος (Gram +) που συνήθως εντοπίζεται είτε με την μορφή αυτόνομων μεμονωμένων κυττάρων είτε σχηματίζει αποικίες με τη μορφή αλυσίδων μικρού μήκους σε σχήμα Y ή V. Στην περίπτωση που καλλιεργηθεί σε άγαρ τρυπτόνης οι αποικίες του έχουν ένα χαρακτηριστικό πράσινο – μπλε χρώμα. Το χρώμα των αποικιών του μεταβάλλεται σε χαρακτηριστικό γκρι – μπλε στην περίπτωση που αναπτυχθεί σε θρεπτικό άγαρ για 24 ώρες (Farber & Peterkin, 1991). Σε ορισμένες περιπτώσεις τα κύτταρα είναι δυνατόν να χάσουν την ικανότητα τους να διατηρούν την χρώση Gram και ως εκ τούτου, λανθασμένα να θεωρηθούν ως *Hemophilus* (Rocourt & Buchrieser, 2007; Wagner & McLaughlin, 2008).



Εικόνα 11: Απεικόνιση στελεχών της *L. monocytogenes* (Chuks & Orji, 2012)

Είναι μη σπορογόνο βακτήριο τα κύτταρα του οποίου μπορεί να έχουν μορφή κόκκων ή να είναι ραβδοειδή με μήκος 10 μm . Οι διαστάσεις του συνήθως είναι 0,4 – 0,5 μm x 0,5 – 2 μm . Διαθέτει περίτριχες βλεφαρίδες, οι οποίες επιτρέπουν την κίνησή του όταν καλλιεργηθεί σε θερμοκρασία δωματίου (20 – 25 °C) (Gründling et al., 2004). Αντίθετα, όταν καλλιεργηθεί σε θερμοκρασίες άνω των 30 °C δεν διαθέτει ικανότητες κίνησης (Cordano & Jacquet, 2009).



Εικόνα 22: Απεικόνιση των περίτριχων βλεφαρίδων που επιτρέπουν την κίνηση (Ooi & Lorber, 2005)

Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι 30 °C με 35 °C και το ελάχιστο και το μέγιστο θερμοκρασιακό όριο ανάπτυξής του είναι 3 °C και 45 °C αντίστοιχα (Sorqvist, 1994). Ανήκει, επομένως, στους ψυχρότροφους μικροοργανισμούς με δυνατότητα ανάπτυξης ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες (Lado & Yousef, 2007). Η ιδιότητα του αυτή δικαιολογεί τον εντοπισμό του ακόμη και σε τρόφιμα σε συνθήκες ψύξης (2 °C - 4 °C). Μολονότι οι αυξητικοί ρυθμοί του μικροβίου σε συνθήκες ψύξης είναι αισθητά αργοί, δεδομένου ότι τα στελέχη αναπτύσσονται με χρόνο διπλασιασμού 20-30 h και 100-186 h στους 3 °C και 0 °C αντίστοιχα (Swaminathan, 2001), ο έλεγχός του στα τρόφιμα με τη χρήση μόνο ψύξης κρίνεται ικανοποιητικός (Walker et al., 1990). Ο μικρότερος χρόνος διπλασιασμού του στελέχους σε συνθήκες ψύξης 4 °C έχει παρατηρηθεί κατά τη συντήρηση γαλακτοκομικών προϊόντων και ανερχόταν στις 48 ώρες (Buchanan et al., 1989). Κατά τη λανθάνουσα φάση, ο χρόνος διπλασιασμού του διαρκεί από 1 έως και 30 ημέρες σε θερμοκρασίες κάτω των 5 °C. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί πως δύναται να επιβιώσει ακόμη και σε θερμοκρασίες κάτω από 0 °C εφόσον οι υπόλοιπες συνθήκες, όπως λ.χ. το pH, είναι βέλτιστες (Ramaswamy et al., 2007). Αντίθετα, εμφανίζεται να είναι ευαίσθητο στη διαδικασία της παστερίωσης σε υγρά τρόφιμα ειδικά όταν αυτή πραγματοποιείται για 15 sec σε θερμοκρασία 72 °C (Farber & Peterkin, 1991).

Όσον αφορά τις τιμές του pH, δύναται να παρατηρηθεί αύξηση του μικροβίου σε τιμές από 4,4 μέχρι και 9,4 αν και η βέλτιστη ανάπτυξή του εντοπίζεται σε pH 7,0 (Buchanan et al., 1989). Η τιμή του pH φαίνεται να είναι καίρια για την επιβίωσή του, καθώς σε τιμές μικρότερες του 5,5 ο ρυθμός ανάπτυξής του μειώνεται αισθητά (Adams & Moss, 2008). Το μικρόβιο παύει να πολλαπλασιάζεται σε χαμηλό pH ιδιαίτερα όταν σημειωθεί ταυτόχρονη αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσεται (Sorrells et al., 1989; Cordano & Jacquet, 2009).

Πρόκειται για προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, καθώς εμφανίζει επιπλέον τη δυνατότητα μέγιστης ανάπτυξης σε συγκεντρώσεις 5 – 10% του διοξειδίου του άνθρακα (Rocourt & Buchrieser, 2007). Ως προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός επομένως, έχει τη δυνατότητα να επιβιώνει είτε παρουσία είτε απουσία οξυγόνου. Η ιδιότητά του αυτή το καθιστά ικανό να αναπτύσσεται ακόμη και σε συσκευασμένα τρόφιμα με αποτέλεσμα να απασχολεί σε μεγάλο βαθμό την επιστήμη της μικροβιολογίας. Ωστόσο, η ανάπτυξή του συντελείται με καλύτερους ρυθμούς σε αερόφιλες συνθήκες (Cordano & Jacquet, 2009).

Επιπρόσθετα, ανήκει στα ελάχιστα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια που μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές συντελεστή ενεργού ύδατος (a_w) κάτω του 0,93 (Buchanan et al., 1989; De Daza et al., 1991). Γενικά, η ανάπτυξή του πραγματοποιείται σε τιμές ενεργότητας ύδατος από 0,90 έως 0,99, με βέλτιστη ανάπτυξη στο 0,97. Μπορεί βέβαια να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε τιμές έως 0,83 (Shahamat et al., 1980), ενώ σε τιμές έως 0,90 επιβιώνει απλώς χωρίς να αναπτύσσεται (FSAI, 2011).

Ταυτόχρονα, παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος (10% NaCl) αλλά η επιβίωσή του σε αυτές εξαρτάται από τη θερμοκρασία που επικρατεί. Σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις NaCl εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης, εφόσον η θερμοκρασία ανάπτυξης είναι χαμηλή (Gandhi & Chikindas, 2007; Lado & Yousef, 2007).

Άμεσα συνδεδεμένη με τις συνθήκες θερμοκρασίας, pH, αλατότητας και ενεργού ύδατος (a_w) φαίνεται να είναι η δράση των συντηρητικών στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Σε χαμηλές τιμές pH και θερμοκρασίας, η ανάπτυξή του αναστέλλεται με την προσθήκη σορβικών αλάτων ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες εξίσου δραστικά είναι το διοξικό νάτριο και το προπιονικό νάτριο (Chasseignaux et al., 2001).

1.2 Ομαδοποίηση των στελεχών της *Listeria monocytogenes*

Η διάκριση των στελεχών της *L. monocytogenes* σε ομάδες βασίζεται στα διαφορετικά φυλογενετικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους. Τα στελέχη της λιστέριας διακρίνονται σε ορότυπους (serotypes ή serological variants, serovars) βάσει των σωματικών (O) και βλεφαριδικών (H) αντιγόνων που διαθέτουν (Fredriksson-Ahomaa et al., 2009; Lei et al., 2001; Seeliger & Jones, 1986), τα οποία χρησιμοποιούνται ως στόχοι αντίστοιχων μονόκλωνων και πολύκλωνων αντισωμάτων κατά τον ανοσολογικό προσδιορισμό και την ορολογική τυποποίηση (serotyping) των στελεχών. Για όλα τα είδη λιστέριας έχουν χαρτογραφηθεί 15 διαφορετικοί υπότυποι (subtypes) σωματικών αντιγόνων (I-XV) και τέσσερις υπότυποι βλεφαριδικών αντιγόνων (A-D). Μέχρι σήμερα, για την *L. monocytogenes* είναι γνωστοί 13 ορότυποι, οι οποίοι εντάσσονται σε 4 γενεαλογικές ομάδες (lineages) I, II, III, IV (Ward et al., 2008) και αναφέρονται στον Πίνακα 1 (Gorski, 2008; Hyden et al., 2016). Κάθε γενεαλογική ομάδα χαρακτηρίζεται από γονίδια, τα οποία αποτελούν συγκεκριμένους δείκτες για τα στελέχη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που ανήκουν σε αυτές (Doumith et al., 2004).

Πίνακας 14: Γενεαλογικές ομάδες, σωματικά (O) και βλεφαριδικά (H) αντιγόνα γνωστών ορότυπων της *Listeria monocytogenes*

Γενεαλογικές ομάδες	Ορότυπος	Σωματικά(O) αντιγόνα ^β	Βλεφαριδικά(H) αντιγόνα
I	1/2b	I, II	A, B, C
	3b	II, IV	A, B, C
	4b	V, VI	A, B, C
	4d	(V) ^α , VI, VIII	A, B, C
	4e	V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
	7	XII, XIII	A, B, C
II	1/2a	I, II	A, B
	1/2c	I, II	B, D
	3a	II, IV	A, B
	3c	II, IV	B, D
	4a	(V), VII, IX	A, B, C
III	4b	V, VI	A, B, C
	4c	V, VII	A, B, C
	1/2a	I, II	A, B
IV	4a	(V), VII, IX	A, B, C
	4c	V, VII	A, B, C

α Πηγή: προσαρμογή από Gorski, 2008 και Hyden et al. 2016.

β Τα εντός παρενθέσεως αντιγόνα μπορεί να μην ανιχνεύονται σε όλες τις απομονώσεις του μικροοργανισμού.

Η γενεαλογική ομάδα I περιέχει στελέχη, τα οποία έχουν απομονωθεί από κρούσματα επιδημιών και έχουν κλινική σημασία (Jeffers et al., 2001; orsi et al., 2011). Σε αυτή συγκαταλέγονται οι ορότυποι 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e και 7. Στην ομάδα II με τους ορότυπους 1/2a, 1/2c, 3a και 3c εντοπίζονται στελέχη, τα οποία απομονώθηκαν τόσο

από ζώα όσο και από το περιβάλλον, ενώ η ομάδα III (ορότυποι 4a, 4c, 1/2a και 4b) περιλαμβάνει στελέχη, τα οποία αφορούν σπάνιες περιπτώσεις σε ζώα (Gombas et al., 2003; Gray et al., 2004). Τέλος στην γενεαλογική ομάδα IV ανήκουν οι ορότυποι 4a και 4c, οι οποίοι σπάνια σχετίζονται με ανθρώπινη λιστερίωση (Orsi et al., 2011; Roche et al., 2008).

Βασικές είναι οι διαφορές που εντοπίζονται στη γενετική ακολουθία μεταξύ της ομάδας I και των ομάδων II, III και IV. Χαρακτηριστική είναι η μικρή δυνατότητα γενετικού ανασυνδυασμού της ομάδας I σε σύγκριση με τις υπόλοιπες (Chae & Schraft, 2000). Οι διαφορές στην γενετική ακολουθία πιθανόν να οφείλονται στη μεγαλύτερη ποικιλομορφία που διέπει τις υπόλοιπες ομάδες (II, III και IV) αναφορικά με τον τρόπο επιβίωσης. Το γεγονός αυτό δημιουργεί υποψίες που σχετίζονται με την συχνότητα εμφάνισης των στελεχών της ομάδας I (Chasseignaux et al., 2001).

Από τα στελέχη της ομάδας I, τα οποία έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο, σχεδόν το 90% ταυτοποιείται στους ορότυπους 1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, ενώ ο ορότυπος 1/2a είναι εκείνος που εντοπίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα τρόφιμα και κυρίως στο νωπό κρέας (Hof & Rocourt, 1992; Thevenot et al., 2005b), είναι ο ορότυπος 4b που ενοχοποιείται για το μεγαλύτερο ποσοστό επιδημιών στον ανθρώπινο πληθυσμό (Gilot et al., 1996; Gombas et al., 2003).

1.3 Ιστορική αναδρομή της ανακάλυψης της *Listeria monocytogenes*

Η ονομασία '*Listeria monocytogenes*' δόθηκε προς τιμήν του Άγγλου ιατρού χειρουργού Joseph Lister (1827-1912), ο οποίος υπήρξε πρωτοπόρος στον τομέα της χειρουργικής αντισηψίας παρά το γεγονός ότι δε συμμετείχε στην ανακάλυψη του μικροβίου αυτού (Carpentier & Cerf, 2011).

Ήδη από το 1891 ο Hayem στην Γαλλία και το 1893 ο Henle στην Γερμανία είχαν διαπιστώσει την ύπαρξη Gram+ βακτηρίων ραβδόμορφου σχήματος σε αποθανόντες ασθενείς χωρίς, ωστόσο, να εντοπίσουν τα αίτια θανάτου τους (Nesbakken et al., 1996). Ο πρώτος που φαίνεται να διέκρινε την παρουσία του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* είναι ο Σουηδός Hulphers, ο οποίος όμως δεν προχώρησε σε περιγραφή και ταυτοποίηση αυτού. Κατόρθωσε, ωστόσο, να απομονώσει από

νεκρωτικούς ιστούς στο ήπαρ κουνελιού ένα στέλεχος, που ονόμασε *Bacillus hepatitis*, του οποίου η περιγραφή εμφανίζεται να έχει αρκετές ομοιότητες με εκείνη της λιστέριας. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με άλλες αναφορές σε μολύνσεις από στελέχη αυτού του γένους, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι, πολύ πριν την επίσημη περιγραφή του, είχε εντοπιστεί η ύπαρξη του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού (Buchanan et al., 1989).

Αφορμή για την απομόνωση του βακτηρίου υπήρξε ο εντοπισμός μιας ασθένειας, που εκδηλωνόταν σε ζώα, τα οποία χρησιμοποιούνταν από ερευνητικές ομάδες στο Πανεπιστήμιο του Cambridge. Η ερευνητική ομάδα του Murray το 1924 περιέγραψε την εμφάνιση σηπτικής νόσου σε ινδικά χοιρίδια και κουνέλια στην κτηνοτροφική μονάδα του Τμήματος Παθολογίας του Πανεπιστημίου. Αρχικά, παρατηρήθηκαν έξι αιφνίδιοι θάνατοι ενώ στους επόμενους μήνες τα κρούσματα πολλαπλασιάστηκαν. Η νόσος συνοδευόταν από περιφερική μονοκυττάρωση και η εμφάνιση των μονοπύρηνων κυττάρων στο αίμα των ζώων που προσβλήθηκαν, οδήγησε στην αρχική ονομασία του μικροοργανισμού ως *Bacterium monocytogenes* (Autio et al., 2004).

Το ίδιο περίπου χρονικό διάστημα στη Νότια Αφρική ο Pirie και η ερευνητική του ομάδα διαπίστωσαν κρούσματα σε άγρια ζώα των οποίων τα συμπτώματα εμφάνιζαν αρκετές ομοιότητες με την παραπάνω ασθένεια. Ο Pirie απομόνωσε τον μικροοργανισμό από το ήπαρ αρουραίων (αφρικανικά ποντίκια) και του έδωσε την ονομασία *Lysterella hepatolytica* καθώς προκαλούσε ηπατικές βλάβες στα ζώα (Ooi & Lorber, 2005).

Σύντομα διαπιστώθηκε πως το *Bacterium monocytogenes* και η *Lysterella hepatolytica* είναι ο ίδιος μικροοργανισμός. Ως συνέπεια, η ονομασία του βακτηρίου τροποποιήθηκε και μετονομάστηκε σε *Listerella monocytogenes* (Nesbakken et al., 1996). Με δεδομένο όμως ότι ο όρος *Listerella* είχε ήδη δοθεί το 1906 από τον Jahn προκειμένου να περιγραφεί ένα μυκητιακό στέλεχος μυξομυκήτων, η ονομασία και πάλι τροποποιήθηκε το 1940 σε *Listeria monocytogenes* (Ralovich & Domjan-Kovacs, 1996).

Ο διαχωρισμός της *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα είδη του γένους *Listeria* έγινε από τον Rocourt το 1983 με τη χρήση βιοχημικών μεθόδων αλλά και γενετικών αλληλουχιών. Ταυτόχρονα, έγινε και η διάκριση τους με βάση την παθογονικότητα που εμφάνιζαν, οπότε και η *L. monocytogenes* περιγράφηκε ως το μοναδικό παθογόνο στέλεχος (Bennion et al., 2008).

1.4 Βιοχημικά χαρακτηριστικά της *L. monocytogenes*

Τα διαφορετικά είδη του γένους *Listeria* εμφανίζουν ένα σημαντικό αριθμό όμοιων βιοχημικών ιδιοτήτων. Παράγουν οξύ μεταβολίζοντας μια ποικιλία σακχάρων, όπως είναι η γλυκόζη και η μαμνόζη, δίχως όμως να εκλύουν συγχρόνως αέριο. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης γίνεται είτε αερόβια, οπότε παράγεται πυροσταφυλικό οξύ μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης είτε αναερόβια, οπότε σχηματίζεται γαλακτικό οξύ. Ο χρόνος που απαιτείται για τον καταβολισμό της γλυκόζης φτάνει μέχρι και τις 48 ώρες (Buchanan et al., 1989).

Πέρα από τις βιοχημικές τους ομοιότητες, τα διάφορα είδη του γένους εμφανίζουν και βασικές διαφορές, στις οποίες βασίζεται ο διαχωρισμός τους. Η αιμολυτική ικανότητα που εμφανίζουν είναι η κυριότερη διαφορά τους. Με τον όρο **‘αιμολυτική ικανότητα’** χαρακτηρίζεται η δυνατότητα των βακτηρίων αυτών να δημιουργούν ζώνες αιμόλυσης όταν αναπτύσσονται σε αιματούχο άγαρ. Η έκταση των ζωνών αυτών ποικίλει. Ειδικότερα, το είδος *L. ivanovii* σχηματίζει ζώνες μεγάλου εύρους, οι οποίες διακρίνονται με ευκρίνεια. Αντιθέτως, στα είδη *L. monocytogenes* και *L. seeligeri* η αιμόλυση που προκαλείται είναι μικρού μεγέθους και την καλύπτει ο υπερκείμενος πολλαπλασιασμός του βακτηρίου. Τέλος, στα υπόλοιπα είδη του γένους δεν παρατηρείται αιμόλυση (Cabanès et al., 2002).

Πίνακας 22: Βιοχημικά χαρακτηριστικά των ειδών του γένους *Listeria* (Mourra et al., 2016)

		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
B-Αιμόλυση		+	-	+	+	-	-
Καταλάση		+	+	+	+	+	+
Οξειδάση		-	-	-	-	-	-
Ζύμωση Υδατανθράκων	Ραμνόζη	+	+/-	-	-	+/-	+/-
	Μαννιτόλη	-	-	-	-	-	+
	Ξυλόζη	-	-	+	+	+	-
	Δεξτρόζη	+	+	+	+	+	+

1.5 Η παρουσία της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον

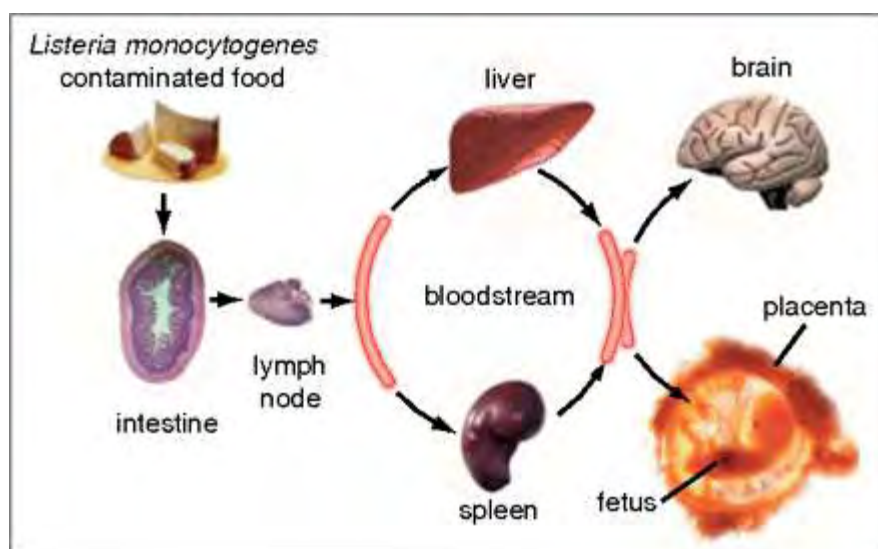
Η λιστέρια είναι αρκετά διαδεδομένη και έχει εντοπιστεί σχεδόν παντού. Ειδικότερα, ανιχνεύεται στο φυσικό περιβάλλον, στο χώμα, στα λύματα και στη βλάστηση. Μάλιστα είναι δυνατόν να διαβιώσει στο νερό και ιδιαίτερα σε λίμνες, ρυάκια και ποτάμια, ενώ σε μικρότερο βαθμό στο θαλασσίνο νερό, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από την επιμόλυνση των θαλασσινών ψαριών από στελέχη του συγκεκριμένου βακτηρίου (NicAogain & Byrne, 2016). Πιθανή πηγή εμφάνισής της στο έδαφος αποτελούν τα κόπρανα των ζώων στα οποία μπορεί να επιβιώσει από 1-6 χρόνια (Sauders & Wiedmann, 2007). Παράλληλα, εντοπίζεται και σε τεχνητά περιβάλλοντα, όπως είναι τα σιλό αποθήκευσης σιτηρών και ζωοτροφών, όπου και επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα (Ryser et al., 1997). Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει πως τα σιλό αποτελούν μια από τις βασικότερες εστίες μόλυνσης ειδικά εάν η κατασκευή τους είναι χαμηλής ποιότητας (Gandhi & Chikindas, 2007).

Η *L. monocytogenes*, έχει εντοπιστεί σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων και σε μέρη όπως το πάτωμα, οι τοίχοι ακόμη και η οροφή των κτισμάτων. Έρευνες έχουν αποδείξει την επιμονή της παρουσίας της *L. monocytogenes* σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων, σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις και για χρονικό διάστημα άνω των δέκα ετών (Stoller et al., 2019). Έχει εντοπιστεί, επίσης, σε συσκευασμένα και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, όπως λαχανικά, φρούτα, γαλακτοκομικά προϊόντα και σκευάσματα κρέατος. Η μη τήρηση των κανόνων υγιεινής κατά την επεξεργασία των τροφίμων αυτών πιθανόν να προκαλέσει τη μόλυνση τους ακόμη και μετά από τη θερμική τους επεξεργασία. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη σημασία τήρησης αυστηρών μέτρων-κανόνων υγιεινής κατά τη διαχείριση των τροφίμων προκειμένου να προληφθεί η μόλυνση τους από το βακτήριο αυτό (Autio et al., 1999; Blatter et al., 2010; Tompkin, 2002).

2 Παθογένεια της *L. monocytogenes*

Στην περίπτωση της μόλυνσης του ανθρώπου από τη λιστέρια μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων, αρχικά το βακτήριο επιβιώνει έναντι των μη ειδικών μηχανισμών άμυνας, όπως η λυσοζύμη του σιέλου. Εν συνεχεία διέρχεται από το στόμαχο, όπου επίσης αντιμετωπίζει τη δράση των γαστρικών υγρών και πολλαπλασιάζεται στο έντερο. Ακολούθως, τα μικροβιακά κύτταρα διηθούν τον βλεννογόνο του εντέρου μέσω ενδοκύττωσης. Οι γαστρικές εκκρίσεις με το ιδιαίτερα χαμηλό pH αποτελούν σημαντική γραμμή άμυνας ενάντια στους τροφιμογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς. Σε περίπτωση που ένας παθογόνος μικροοργανισμός κατορθώσει να επιβιώσει στο όξινο και κατά συνέπεια εξαιρετικά θανατηφόρο περιβάλλον του στομάχου, τότε η πιθανότητα αποίκησης στον εντερικό σωλήνα αυξάνεται.

Η επιβίωση της λιστέριας στις συνθήκες χαμηλού pH του στομάχου οφείλεται σε κυτταρικούς ομοιοστατικούς μηχανισμούς που διαθέτει και οι οποίοι επιτρέπουν την επιβίωσή της στο όξινο περιβάλλον του. Εξάλλου η επαγωγή των προσαρμοστικών μηχανισμών του βακτηρίου το καθιστούν ανθεκτικό και σε μεταγενέστερες ακραίες καταπονήσεις, όπως η πέψη (Cotter et al., 2001). Τέλος, ο χρόνος παραμονής του μολυσμένου τροφίμου στο στόμαχο δεν είναι πάντα επαρκής για την εξουδετέρωση του παθογόνου καθώς η διάρκεια της πέψης εξαρτάται και από το είδος και την ποσότητα του προσληφθέντος γεύματος (Carpentier & Cerf, 2011).



Εικόνα 33: Η πορεία της *L. monocytogenes* στο εσωτερικό του οργανισμού (Cossart P., 2011)

Μέσω της κυκλοφορίας του αίματος οι μικροοργανισμοί μεταφέρονται και μολύνουν διάφορα όργανα όπως είναι το ήπαρ, ο θυρεοειδής αδένας και ο σπλήνας. Συνέπεια της διασποράς της λιστέριας και της προσβολής των οργάνων αυτών είναι η εμφάνιση φλεγμονών και νεκρωτικών εστιών. Εκτός αυτών, όταν η λιστέρια προσβάλλει το κεντρικό νευρικό σύστημα προκαλεί εγκεφαλίτιδα η οποία μπορεί να αποβεί ενίοτε θανατηφόρα. Ειδικότερα σε περιπτώσεις κύησης, ο μικροοργανισμός δύναται να διαπεράσει τον πλακούντα, επιφέροντας σοβαρές επιπτώσεις στο κυοφορούμενο έμβρυο όπως αποβολή, ενδομήτριος θάνατος εμβρύου ή πρόωρο τοκετό (de Noordhout et al., 2014; Rohr et al., 2016).

2.1 Γενικά χαρακτηριστικά παθογονικότητας

Η παθογένεια του βακτηρίου συνδέεται με την ικανότητα του να προκαλεί αιμόλυση στα κύτταρα, τα οποία προσβάλλει και εντός των οποίων πολλαπλασιάζεται. Ο κύριος παράγοντας, ο οποίος ευθύνεται για την αιμολυτική ικανότητα της *L. monocytogenes* είναι η λιστεριολυσίνη *O* (*listeriolysin O*, *LLO*) ενώ σε δευτερεύοντα ρόλο συμμετέχουν και άλλες πρωτεΐνες, όπως οι φωσφολιπάσες *C* και συγκεκριμένα η λεκιθινάση (*PC-PLC*) και η φωσφολιπάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (*PI-PLC*) (Leimester-Wachter et al., 1991). Κυρίαρχο ρόλο στην παθογένεια έχει η *LLO* διότι δίνει την ευχέρεια στο βακτήριο να διαφύγει από τα φαγοκύτταρα, τα οποία ενεργοποιεί ο οργανισμός ως μηχανισμούς άμυνας απέναντι στη μόλυνση (Cossart & Lecuit, 1998). Πρόκειται για αιμολυσίνη, η οποία ενεργοποιείται μέσω της θειόλης και επιδρά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων δημιουργώντας πόρους (Bielecki et al., 1990; Gaillard et al., 1987; Mengaud et al., 1988; Tilney & Portnoy, 1989). Οι φωσφολιπάσες λειτουργούν σε συνδυασμό με την *LLO* και ενισχύουν το ρόλο της υποβοηθώντας τη διαφυγή του βακτηρίου από το πρωτογενές φαγοκυτταρικό κενοτόπιο (Goldfine & Wadsworth, 2002). Στελέχη της λιστέριας που στερούνται αυτών, διαφεύγουν λιγότερο αποτελεσματικά, ενώ στελέχη με μειωμένες συγκεντρώσεις των παραπάνω πρωτεϊνών εγκλωβίζονται στα δευτερεύοντα κενοτόπια διπλής μεμβράνης (Cabanes et al., 2002). Όσον αφορά στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα, ο συνδυασμός της δράσης τους καθιστά ικανό το βακτήριο να διαφύγει από την αμυντική λειτουργία των φαγοκυτταρικών κενοτοπίων (Goldfine & Wadsworth, 2002).

Ο κυρίαρχος ρόλος της *LLO* στην παθογένεια του μικροοργανισμού κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικός. Η *LLO* ανήκει σε μια ευρύτερη κατηγορία κυτολυσινών και συγκεκριμένα στις χοληστερολοεξαρτώμενες κυτολυσίνες (*cholesterol-dependent cytolysins*, *CDC*). Οι χοληστερολοεξαρτώμενες κυτολυσίνες είναι ουσίες που

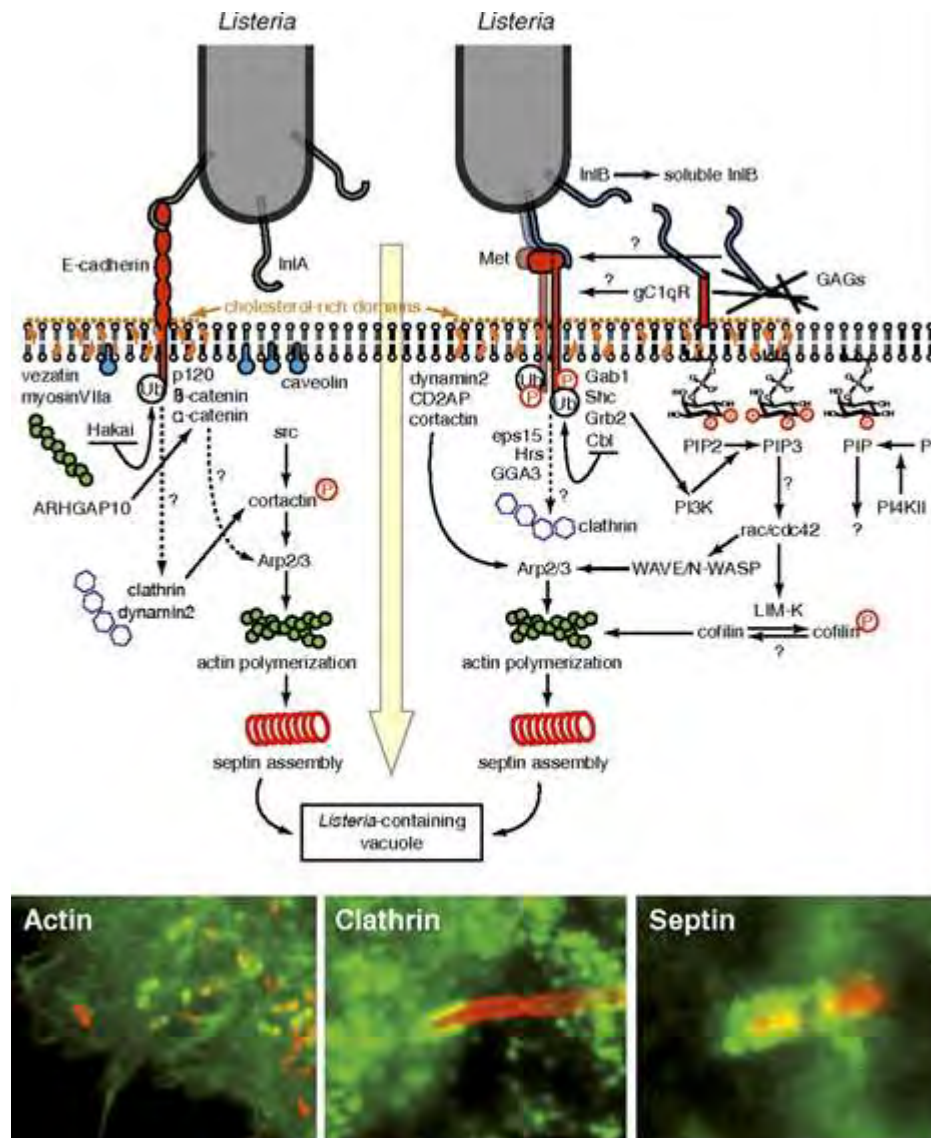
εκκρίνονται από το μεγαλύτερο ποσοστό των Gram+ παθογόνων βακτηρίων. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται η περφρινγολυσίνη (PFO), ουσία που εκκρίνεται από το παθογόνο βακτήριο *Clostridium perfringens* καθώς και η στρεπτολυσίνη O (SLO) που παράγεται από το βακτήριο *Streptococcus pyogenes* (Leimester-Wachter et al., 1991). Ο μηχανισμός δράσης των ουσιών της ομάδας αυτής είναι κοινός και οφείλεται στην υψηλή ομοιότητα που εμφανίζει η στερεοχημική τους δομή. Στη βάση του, αρχικά υποβοηθά τη σύνδεση του μικροοργανισμού με μεμβράνες που περιέχουν στη δομή τους χοληστερόλη και ακολούθως, την είσοδο του μικροοργανισμού στο κύτταρο του ξενιστή. Ακολουθεί ο σχηματισμός ενός πόρου (διάκενου) με διάμετρο 20-30 nm με τον ολιγομερισμό 20-80 μονομερών. Το βασικό χαρακτηριστικό της LLO, το οποίο και τη διαφοροποιεί από τις υπόλοιπες κυτολυσίνες της ομάδας αυτής, είναι η ικανότητά της να παρουσιάζει την βέλτιστη δράση σε περιβάλλοντα ιδιαίτερα όξινα. Το χαρακτηριστικό αυτό επιτρέπει στην LLO να επιβιώνει τόσο στο όξινο περιβάλλον ορισμένων τροφίμων όσο και στο περιβάλλον του στομάχου (Cabanes et al., 2002).

Η μολυσματική δόση, δηλαδή ο ακριβής αριθμός των κυττάρων του μικροοργανισμού που θα πρέπει να εισέλθουν στον οργανισμό προκειμένου να προκληθεί λοίμωξη, δεν είναι σαφής. Σε κάθε περίπτωση όμως η μολυσματική δόση είναι ιδιαίτερα χαμηλή καθώς υπάρχουν ενδείξεις πως ακόμη και λιγότερα από 1000 κύτταρα της λιστέριας μπορούν να προκαλέσουν λοίμωξη (Carpentier & Cerf, 2011).

Κατά τη φάση της μόλυνσης ο μικροοργανισμός εισέρχεται στο υγιές κύτταρο αφού πρώτα δημιουργήσει φαγοσώματα. Μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης το φαγόσωμα αρχικά εισέρχεται στο κύτταρο. Εν συνέχεια, με τη βοήθεια των ενζύμων LLO, της φωσφολιπάσης και της λεκιθινάσης, λύεται η μεμβράνη του φαγοσώματος και το βακτήριο πλέον είναι ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα. Εκεί μπορεί να πολλαπλασιαστεί και να προκαλέσει λοίμωξη (Chae & Schraft, 2000).

Η έντονη παθογονικότητα που χαρακτηρίζει τη λιστέρια οφείλεται σε μεγάλο βαθμό και στην ικανότητά της να προσβάλλει τα γειτονικά υγιή κύτταρα. Προκειμένου να εισβάλλει σε αυτά, ενεργοποιεί μηχανισμούς του κυττάρου, που έχει ήδη προσβάλλει και το οποίο πλέον αποτελεί κύτταρο-ξενιστή. Μέσω των μηχανισμών αυτών κινητοποιείται η διαδικασία πολυμερισμού της ακτίνης, η οποία καταλήγει στη δημιουργία ενός σχηματισμού με μορφή βλεφαρίδας στο ένα από τα δύο άκρα (πόλους) του κυττάρου-ξενιστή. Ο σχηματισμός αυτός στην ουσία επιτρέπει στον μικροοργανισμό να μετακινηθεί και να βρεθεί στην περιοχή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου. Εξαπλώνεται συνεπώς από κύτταρο σε κύτταρο δίχως να εκτίθεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Με την άσκηση πίεσης (ώθησης) από τον μικροοργανισμό στο σημείο αυτό της κυτταρικής μεμβράνης σχηματίζεται μια προεκβολή. Η προεκβολή αυτή επιτρέπει στον μικροοργανισμό να εισέλθει στο εσωτερικό του γειτονικού υγιούς κυττάρου και να το μολύνει. Στην πράξη, η προεκβολή αυτή αποτελεί ένα σάκο διπλής μεμβράνης, από τον οποίο στη συνέχεια

τα βακτήρια διαφεύγουν προκειμένου να επαναλάβουν τον κύκλο ανάπτυξής τους. Επομένως, με την δημιουργία φαγοσώματος, διαδικασία η οποία εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με εκείνη της αρχικής προσβολής, πραγματοποιείται και πάλι λύση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με αποτέλεσμα το μικρόβιο να εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και να μολύνει νέα κύτταρα (Cabanes et al., 2002; Dabiri et al., 1990; Kuhn & Goebel, 2007; Mounier et al., 1990; Theriot et al., 1992; Tilney & Portnoy, 1989).



Εικόνα 44: Είσοδος της *L. monocytogenes* στα κύτταρα (Cossart P., 2011)

Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ο ενδοκυτταρικός παρασιτισμός απαιτείται η έκφραση μιας σειράς γονιδίων (γονίδια μολυσματικότητας). Η *Listeria Pathogenicity Island (LIPI-1)* είναι μια νησίδα γονιδίων μεγέθους 9 kb, η οποία περιλαμβάνει τα σημαντικότερα από αυτά. Τα γονίδια που σχετίζονται με την παθογονικότητα είναι αυτά των ιντερναλινών, που είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια της *L. monocytogenes* και ευθύνονται για την είσοδο των λιστεριών στο εσωτερικό του κυττάρου. Η μεταγραφή των γονιδίων που υπάρχουν στο σύμπλεγμα LIPI-1 πραγματοποιείται από το μεταγραφικό εκκινητή PrfA, ο οποίος κωδικοποιείται από το γονίδιο *prfA* και ανήκει στις κυκλικές μονοφωσφορικές αδενοσίνες (cAMP) πρωτεΐνες-υποδοχείς, της (CRP)/FNR οικογένειας των βακτηριακών ρυθμιστών (Vasquez-Boland et al., 2001; Sant'Ana et al., 2012). Τις τελευταίες δεκαετίες η απομόνωση αυτών των γονιδίων από τρόφιμα και κλινικά δείγματα έχει απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα προκειμένου να διαλευκανθεί η διαδικασία που προκαλεί την εκδήλωση της παθογόνου δράσης του μικροοργανισμού και θα μπορούσε να διαχωρίσει τα στελέχη του βακτηρίου σε παθογόνα και μη (Hadjilouka et al., 2015).

Οι ιντερναλίνες οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των LLR (leucine-rich repeat) πρωτεϊνών, ταξινομούνται με βάση το μέγεθός τους και την ικανότητά τους να αναπτύσσουν ομοιοπολική σύνδεση με τα τοιχώματα των βακτηριακών κυττάρων σε τρεις κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία, όπου ανήκει η InlA (πρωτεΐνη 800 αμινοξέων), συγκαταλέγονται αυτές που έχουν σχετικά μεγάλο μέγεθος και αναπτύσσουν ομοιοπολικό δεσμό με τα τοιχώματα των βακτηριακών κυττάρων. Στην δεύτερη κατηγορία, όπου ανήκει η InlB (πρωτεΐνη 630 αμινοξέων), ανήκουν αυτές που αναπτύσσουν χαλαρή μη ομοιοπολική σύνδεση με τις επιφάνειες των κυττάρων. Τέλος, η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει πρωτεΐνες όπως η InlC, οι οποίες βρίσκονται ελεύθερες στο κυτταρόπλασμα λόγω αδυναμίας πρόσδεσής τους με τις επιφάνειες των κυττάρων (Kuhn et al., 2008). Στην *L. monocytogenes*, οι InlA και InlB αναγνωρίζονται ως οι πιο σημαντικές.

Το γονίδιο *inlA* κωδικοποιεί την InlA, η οποία επιτρέπει την διείσδυση του παθογόνου στα κύτταρα στόχους μέσω μιας σειράς αναδιατάξεων του κυτταροσκελετού του τελευταίου. Αυτή η διείσδυση οφείλεται στην αντίδραση που λαμβάνει χώρα μεταξύ του μοτίβου LPXTG της InlA που φέρει στο C-άκρο της και της πρωτεΐνης (E-κατχερίνη) προσκόλλησης του κυττάρου-στόχου (Orsi et al., 2007; Roche et al., 2008). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εξειδικεύεται στο να διευκολύνει την είσοδο του παθογόνου κυρίως στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και σε ορισμένα ηπατοκύτταρα (Dramsi et al., 1995; Lecuit et al., 1997; Lecuit et al., 2004). Το γονίδιο *inlB* κωδικοποιεί την InlB, η οποία αναγνωρίζει τον κυτταρικό υποδοχέα Met και συν-υποδοχέα Clq-R της επιφάνειας του κυττάρου-στόχου (μέσω του μοτίβου GW που φέρει στο C-άκρο της) και έτσι επιτρέπει την *L. monocytogenes* να διεισδύσει σε ηπατοκύτταρα, ινοβλάστες και επιθηλιοειδή κύτταρα (Braun et al., 1997; Greiffenberg et al., 1998; Parida et al., 1998).

Όσον αφορά τις ιντερναλίνες InlC και InlJ (ή Imo2821), οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *inlC* και *inlJ* αντίστοιχα, ο ρόλος τους είναι εξίσου σημαντικός στην παθογονικότητα του μικροβίου καθώς συμβάλλουν στην είσοδό του στα κύτταρα κυρίως στα τελευταία στάδια της λοίμωξης (μετεντερικά) (Roche et al., 2008). Συγκεκριμένα η InlC συμβάλλει στην διέλευση του παθογόνου από τον εντερικό φραγμό ενώ η *inlJ* αδρανοποιεί τις πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη δομή των συνδέσεων των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου στα θηλαστικά (Tuba και N-WASP), δημιουργώντας προεξοχές και προκαλώντας λέπτυνση της εξωτερικής στιβάδας των κυττάρων-στόχων (Leung et al., 2013). Προκειμένου να προσδιοριστεί η παθογονικότητα στελεχών του βακτηρίου *L. monocytogenes*, οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι λοιμογόνοι παράγοντες, μαζί με τις ιντερναλίνες, είναι τα γονίδια που ανήκουν στη νησίδα γονιδίων παθογονικότητας LIPI-1. Η νησίδα που βρίσκεται στον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* και στη οποία ανευρίσκονται τα σημαντικότερα γονίδια της λοιμογόνου δράσης του μικροοργανισμού, πλαισιώνεται από τα γονίδια *prs* και *orfX* και αποτελείται από τα έξι γονίδια *prfA*, *plcA*, *plcB*, *actA*, *hly*, και *mpl* (Paramithiotis et al., 2014).

Το γονίδιο *hlyA* κωδικοποιεί την τοξίνη LLO. Η LLO συνεργάζεται, όπως αναφέρθηκε με δυο φωσφολιπάσες C, την PlcA και την PlcB που κωδικοποιούνται στην LIPI-1 από τα γονίδια *plcA* και *plcB* αντίστοιχα, με στόχο την λύση των κενотоπίων και των φαγοσωμάτων εντός των οποίων βρίσκεται η *L. monocytogenes* (Aurora et al., 2008; Kuhn et al., 2008). Μέσω της συνέργειας αυτής επιτυγχάνεται η λύση του αρχικού κενотоπίου.

Όσον αφορά το γονίδιο *actA*, συμβάλλει στην κωδικοποίηση της πρωτεΐνης ActA, ο ρόλος της οποίας είναι διπλός. Προστατεύει αφενός τον παθογόνο *L. monocytogenes* από την αυτοφαγία των κυττάρων ξενιστών (Birmingham et al., 2007) και αφετέρου επιτρέπει την ενδο- και διακυτταρική κινητικότητα η οποία βασίζεται στην ακτίνη, ενώ παράλληλα ενισχύει την διείσδυση του παθογόνου στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή (Suarez et al., 2001).

Το γονίδιο *p60* ή *iap* (invasion associated protein) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Iap, η οποία απαντάται στην επιφάνεια όλων των στελεχών της *L. monocytogenes* (Bubert et al., 1992; Kuhn et al., 1989; Wood et al., 1993), έχει την ικανότητα να υδρολύει την μуреΐνη (Haase et al., 1995), γεγονός που την καθιστά απαραίτητη για τη σωστή διαίρεση του κυττάρου. Επιπροσθέτως, έχει επιβεβαιωθεί ο πρωταγωνιστικός της ρόλος στην διεκπεραίωση της διείσδυσης του παθογόνου σε ινοβλάστες και ηπατοκύτταρα (Bubert et al., 1992).

Τέλος, το γονίδιο *mpl* κωδικοποιεί την θερμολυσίνη Mpl (μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου), η οποία είναι ενεργή σε πολύ μεγάλο εύρος pH και θερμοκρασιών (Coffey et al., 2000) και με τον τρόπο αυτό ενεργοποιεί την PC-PLC εντός των κενотоπίων (η οποία εκφράζεται ως ένα προένζυμο).

Οι Liu et al. (2007) ερεύνησαν τη σκοπιμότητα ανίχνευσης με πολλαπλή PCR των γονιδίων *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inlJ* για τον ειδικό προσδιορισμό των παθογόνων *L. monocytogenes* ως προς το είδος και τη μολυσματικότητά τους. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι είναι δυνατή η ταχεία και ταυτόχρονη επιβεβαίωση της ταυτότητας της *L. monocytogenes* και της ενδεχόμενης λοιμογόνου δράσης της.

2.2 Παρουσία της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα

Κύριος τρόπος μετάδοσης της *L. monocytogenes* στον άνθρωπο, εκτός από την άμεση μετάδοσή της μέσω της επαφής της με προσβεβλημένα ζώα, είναι η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων. Η μετάδοση του παθογόνου βακτηρίου μέσω της επαφής παρατηρείται κυρίως σε συγκεκριμένες ομάδες ατόμων, όπως οι εκδοροσφαγείς, οι κτηνίατροι και οι αγρότες, ωστόσο δεν είναι τόσο συχνή (Gandhi & Chikindas, 2007). Για τη μετάδοση μέσω της κατανάλωσης τροφίμων έχει ενοχοποιηθεί κατά καιρούς μια μεγάλη ομάδα τροφίμων, στην οποία περιλαμβάνονται γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το βούτυρο και τα μαλακά τυριά (Roquefort, Camembert και Brie), το γάλα (παστεριωμένο ή όχι) και ορισμένα λαχανικά, όπως το μαρούλι και το λάχανο (Ryser & Marth, 2007). Στην κατηγορία των επικίνδυνων τροφίμων σημαντική θέση κατέχουν επίσης το κρέας και τα σκευάσματα που προκύπτουν από την επεξεργασία του (τα λουκάνικα και τα αλλαντικά), το κρέας των πουλερικών, των ψαριών (σολομός) και τα οστρακοειδή (μύδια) (Chao et al., 2006; Cordano & Jacquet, 2009; Domenech et al., 2007; Inoue et al., 2000; Jami et al., 2014; Nakari et al., 2014; Vongkamjan et al., 2013; Wesley, 2007).

Την πιο συχνή όμως αιτία των καταγεγραμμένων κρουσμάτων ανθρώπινης λιστερίωσης περί το 90% (Liu D., 2008) αποτελούν τα **έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (ΕΚΤ)**. Πρόκειται για τρόφιμα, τα οποία διατίθενται από τον παραγωγό ή τον παρασκευαστή προς κατανάλωση δίχως να απαιτείται μαγείρεμα ή κάποια άλλη επεξεργασία, ικανή να εξουδετερώσει ολοκληρωτικά ή να μειώσει, σε αποδεκτό για την υγεία επίπεδο, τους απειλητικούς παθογόνους μικροοργανισμούς (Swaminathan & Gerner-Smith, 2007). Στα ΕΚΤ συμπεριλαμβάνονται οι ακόλουθες ομάδες τροφίμων:

- λαχανικά και φρούτα μαγειρεμένα στον ατμό
- τρόφιμα φυτικής προέλευσης, τα οποία δεν απαιτούν επιπρόσθετη επεξεργασία, όπως πλύσιμο ή μαγείρεμα και στα οποία έχει αφαιρεθεί ήδη η φλούδα ή το κέλυφος
- μπαχαρικά και ζάχαρη
- αλλαντικά, παστά προϊόντα κρέατος και αποξηραμένα προϊόντα με βάση το κρέας
- τα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας, τα οποία έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία και διανέμονται στον καταναλωτή σε ερμητικά κλειστές συσκευασίες

Η επιμόλυνση των ΕΚΤ από την *L. monocytogenes* είναι πιθανό να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο της επεξεργασίας ή και της διανομής τους (Huss et al., 2000; Nakamura et al., 2006).

Εκτός από τα ΕΚΤ, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, επίσης, αποτελούν κύριες πηγές μετάδοσης του παθογόνου μικροοργανισμού. Μολονότι το γάλα εμπεριέχει μεγάλες συγκεντρώσεις παθογόνων μικροοργανισμών, μέσω της παστερίωσής του ένα σημαντικό ποσοστό αυτών θανατώνεται. Κάποιοι, ωστόσο, εξ αυτών δύναται να επιβιώσουν λόγω της ανθεκτικότητας που εμφανίζουν στις θερμοκρασίες παστερίωσης (Hassan et al., 2000). Η συντήρηση βέβαια του μολυσμένου γάλακτος σε συνθήκες ψύξης εξαλείφει αρκετούς από τους εναπομείναντες μικροοργανισμούς. Η *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών καθιστώντας δυσχερή την εξουδετέρωση της (Doyle et al., 2002). Μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης του παθογόνου εμφανίζονται στα τυροκομικά προϊόντα σε σχέση με τα υπόλοιπα γαλακτοκομικά (γάλα, βούτυρο, γιαούρτι κ.ο.κ). Αυτό οφείλεται κατά βάση στον προστατευτικό ρόλο των λιπιδίων και στην περιεκτικότητα των τυριών σε αλάτι. Τα περισσότερα τυριά έχουν περιεκτικότητα 0,5-2% σε αλάτι, συγκέντρωση πολύ χαμηλότερη από τα ανεκτά για τη λιστέρια όρια επιβίωσης. Η παρουσία, συνεπώς, του αλατιού λειτουργεί ανασταλτικά στην ανάπτυξη εκείνων των μικροοργανισμών, οι οποίοι ανταγωνίζονται την ανάπτυξη της λιστέριας παρέχοντάς της την δυνατότητα πολλαπλασιασμού σε ένα λιγότερο ανταγωνιστικό περιβάλλον (Carpentier & Cerf, 2011).

Μεταξύ των κύριων πηγών μόλυνσης από το παθογόνο συμπεριλαμβάνεται και το κρέας καθώς και τα σκευάσματά του. Το νωπό κρέας που προορίζεται προς κατανάλωση αποτελεί κύρια πηγή μόλυνσης. Η πιθανότητα μόλυνσης αυξάνεται σε ποσοστό 70-100% κατά τα στάδια του τεμαχισμού και της συσκευασίας του κρέατος. Επίσης, το κρέας μπορεί να μολυνθεί κατά την επαφή του με τον εξοπλισμό και τις

επιφάνειες εργασίας (Desmarchelier et al., 2007). Το επίπεδο της μόλυνσης με ή χωρίς επαφή του κρέατος με τις επιφάνειες επεξεργασίας κυμαίνεται μεταξύ 17%-50% και 11%-25% αντίστοιχα (Mureddu et al., 2014). Το κρέας είναι πιθανότερο να μολυνθεί κατά τις ενδιάμεσες φάσεις επεξεργασίας του, όπως στα σφαγεία, τις βιομηχανίες, τους χώρους εστίασης και όχι τόσο από το ήδη προσβεβλημένο ζώο. Η μη ορθή παρέμβαση του ανθρώπινου παράγοντα κατά την επεξεργασία του κρέατος ενισχύει την παρουσία διασταυρούμενης μόλυνσης, όπως σε περιπτώσεις μη τήρησης των προτύπων υγιεινής από την πλευρά των εργαζομένων (Kurpas et al., 2018).

Η ιδιότητα του παθογόνου να δημιουργεί βιομεμβράνες (biofilms) κατά την επαφή του με τις επιφάνειες εργασίας, ειδικότερα το γυαλί και το ανοξείδωτο ατσάλι, συνιστά ένα πιθανό λόγο της τόσο συχνής εμφάνισής του στους χώρους εργασίας των βιομηχανιών τροφίμων (Galvão et al., 2012; Gomez et al., 2015). Καθώς το βακτήριο είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό σε διάφορα απολυμαντικά, τα οποία χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, μέσω του σχηματισμού βιομεμβρανών καθίσταται ικανό να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα. Έχει παρατηρηθεί δε ότι οι βιομεμβράνες μπορούν να περικλείουν και άλλα βακτήρια, που πιθανώς βρίσκονται πάνω στις επιφάνειες, ενδυναμώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο τη δομή και την αντοχή της *L. monocytogenes*. Κρίνεται συνεπώς επιβεβλημένη - μετά το πέρας καθαρισμού όλων των επιφανειών από τυχόν υπολείμματα - η χρήση απολυμαντικών που κατά κύριο λόγο βασίζονται σε χημικές ενώσεις και στοιχεία, όπως χλώριο, αλογόνα, υπεροξείδιο του υδρογόνου (Kurpas et al., 2018).

Η παρουσία *L. monocytogenes* στα τρόφιμα και κατ' επέκταση η λιστέρια εγκυμονεί μεγάλους κινδύνους για τη δημόσια υγεία γι' αυτό και έχουν θεσπιστεί νόμοι οι οποίοι θεσπίζουν κριτήρια για τον έλεγχο της στα τρόφιμα. Σύμφωνα με τον ΕΚ 2073/2005, θα πρέπει να υπάρχει απουσία κυττάρων *L. monocytogenes* σε 25 g τροφίμων έτοιμων προς κατανάλωση που προορίζονται για βρέφη, ειδικούς ιατρικούς σκοπούς και άλλα εκτός των ανωτέρω που είναι ικανά να αναπτύξουν την παρουσία της. Η συγκεκριμένη απουσία κυττάρων θα πρέπει να παρατηρείται κατά το στάδιο διατήρησης των τροφίμων στην αγορά και πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον παραγωγό αντίστοιχα για τις δύο κατηγορίες τροφίμων. Παράλληλα, είναι απαραίτητο η συγκέντρωση των κυττάρων να μην υπερβαίνει τα 100 cfu/g σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση ικανά και μη ικανά για ανάπτυξη *L. monocytogenes* κατά τη διάρκεια διατήρησης τους στην αγορά.

2.3 Κλινικές εκδηλώσεις λιστερίωσης

Η λοιμώδης νόσος που οφείλεται στην προσβολή του οργανισμού από την *L. monocytogenes* ονομάζεται **λιστερίωση** και αποτελεί μια εξαιρετικά απειλητική και σοβαρή νόσο, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά θνητότητας. Ανήκει στις τροφιμογενείς ασθένειες και εμφανίζεται με τη μορφή σποραδικών κρουσμάτων αλλά και επιδημιών. Αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για τις βιομηχανίες τροφίμων, καθώς η μόλυνση των προς κατανάλωση προϊόντων από το βακτήριο αυτό μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στην ανάκληση τους (Rohr et al., 2016). Μορφολογικά δεν είναι εφικτό να διαχωρισθεί η *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα είδη του γένους *Listeria* και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η διεξαγωγή ειδικών εργαστηριακών δοκιμών ώστε να εντοπιστεί η παρουσία της και να ταυτοποιηθεί (Gandhi & Chikindas, 2007).

Η *L. monocytogenes* αποτελεί το μοναδικό είδος τους γένους *Listeria* spp. που μολύνει αποκλειστικά τον ανθρώπινο οργανισμό αν και έχουν καταγραφεί σπάνιες περιπτώσεις κρουσμάτων από την *L. ivanovii*, η οποία κατά κύριο λόγο προσβάλλει μηρυκαστικά. (Domenech et al., 2007; Guillet et al., 2010; Salimnia et al., 2010; Radoshevich & Cossart, 2018).

Η περίοδος επώασης της *L. monocytogenes* μέχρι την εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας εξαρτάται από ένα σύνολο παραγόντων. Κύριοι παράγοντες είναι η συγκέντρωση των μικροοργανισμών στο τρόφιμο καθώς και η ευπάθεια του οργανισμού του ατόμου, το οποίο μολύνθηκε. Για το λόγο αυτό η περίοδος επώασης ποικίλει και κυμαίνεται από 24 ώρες μέχρι και 90 ημέρες με το μέσο χρόνο επώασης να υπολογίζεται στις 30 ημέρες (Duffy et al., 2001).

Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι, εξαιτίας της αυξημένης κατανάλωσης ΕΚΤ και έτοιμων προϊόντων που χρειάζονται απλό ζέσταμα (Heat-to-eat food products), η *L. monocytogenes* αναδείχθηκε ως σημαντικός τροφιμογενής παθογόνος παράγοντας, προκαλώντας σοβαρές ασθένειες σε βρέφη, εγκύους, ηλικιωμένους και ανοσοκατασταλμένα άτομα. Τα συνήθη συμπτώματα που τις συνοδεύουν είναι: σηψαιμία, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, αποβολές μέχρι και θάνατος (Liu et al., 2007).

Η ηλικία του ατόμου κατά την μόλυνση κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική για την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Η ασθένεια σε έναν ενήλικα μπορεί να εκδηλωθεί με ήπια συμπτώματα, παρόμοια με αυτά της γρίπης ή τοπικής δερματικής λοίμωξης. Συχνά όμως εκδηλώνεται ως μηνιγγίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, πνευμονία αλλά και σηψαιμία (Silk et al., 2012). Τα κλινικά συμπτώματα της μηνιγγίτιδας κυμαίνονται

από ήπια, με συνοδεία πυρετού, και μπορεί να φθάσουν μέχρι την πρόκληση νοητικών μεταβολών ακόμη και κόματος. Η υποξεία μορφή της νόσου εκδηλώνεται κυρίως σε ενήλικες, για την διάγνωση της οποίας απαιτείται καλλιέργεια εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Rohr et al., 2016). Οι εκδηλώσεις της λιστερίωσης σε άτομα που διανύουν τη μέση ηλικία (40-60 ετών) αφορούν σε ποσοστό 55% την εμφάνιση μηνιγγίτιδας, σε 25% βακτηριαμία και μόνο στο 7% εκδηλώνεται με τη μορφή άτυπης νόσου (Μπαλατσούρας, 2006; Mead et al., 2009). Οι ασθενείς με σηψαιμία εμφανίζουν πυρετό, κόπωση, μειωμένη διάθεση και έντονο άλγος στην κοιλιακή χώρα (Lorber, 1997). Κύριες εκδηλώσεις όμως της ασθένειας είναι η μηνιγγίτιδα καθώς και οι διαταραχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Πιο σπάνια είναι η εκδήλωση εγκεφαλίτιδας, η οποία επιδεινώνεται με την εμφάνιση αποστήματος στον εγκέφαλο. Τέλος, λιγότερο συχνή είναι η ρομβοεγκεφαλίτιδα. Ανάμεσα στα τυπικότερα συμπτώματά της συγκαταλέγεται η πολυμορφοπυρήνωση και σε δεύτερο χρόνο η μονοκυττάρωση (Rohr et al., 2016).

Η εμφάνιση εγκεφαλίτιδας προκαλείται από την άμεση προσβολή του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Είναι όμως πιθανό η μηνιγγίτιδα και η εγκεφαλίτιδα να εκδηλωθούν ταυτόχρονα στον ασθενή. Κλινικά συμπτώματα της εγκεφαλίτιδας είναι η κεφαλαλγία και ο πυρετός ενώ σε κάποιες περιπτώσεις εκδηλώνεται ως παθολογική κατάσταση, παρόμοια με ημιπληγία, η οποία δύναται να προκληθεί μετά από εγκεφαλικό επεισόδιο (Κίλις et al., 2016; Mead et al., 2009).

Σπανιότερη εκδήλωση της λιστερίωσης αποτελεί η ρομβοεγκεφαλίτιδα. Η πορεία της νόσου αυτής είναι διφασική και αρχικά εκδηλώνεται με κεφαλαλγία, πυρετό και ναυτία και στη συνέχεια με παράλυση των κρανιακών νεύρων συνοδευόμενη από αταξία, μειωμένη αντιληπτική ικανότητα και πιθανότατα από επιληπτικές κρίσεις και ημιπάρεση (Passos & Kuaye, 2002). Στην διαφορική διάγνωση της ρομβοεγκεφαλίτιδας περιλαμβάνεται ένα μεγάλο εύρος λοιμογόνων και μη λοιμογόνων ασθενειών (Moragas et al., 2011). Ορισμένες από αυτές είναι η τοξοπλάσμωση, η φυματίωση, η κρυπτοκόκκωση, η βρουκέλλωση, η νόσος του Lyme και ο ιός Epstein-Barr. Από την άλλη, η σαρκοείδωση, η σκλήρυνση κατά πλάκας, οι συστηματικές ρευματικές ασθένειες (σύνδρομο Behçet's, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος), τα παρανεοπλασματικά σύνδρομα και το λέμφωμα είναι μερικές μη λοιμογόνες ασθένειες, οι οποίες δύναται να προκαλέσουν σημαντικές αλλοιώσεις στην παρεγκεφαλίδα και στο εγκεφαλικό στέλεχος.

Η σηψαιμία μπορεί να εκδηλωθεί σε ασθενείς κάθε ηλικίας. Στην περίπτωση νεογνών, τα οποία έχουν μολυνθεί κατά τη διάρκεια του τοκετού ή κατά την διάρκεια της πρώτης εβδομάδας της ζωής τους, η σήψη εκδηλώνεται άμεσα ή μετέπειτα με πρόσθετα συμπτώματα, με πιθανότερα αυτά της μηνιγγίτιδας. Η εμφάνιση σηψαιμίας σε τόσο αρχικό στάδιο της ζωής προκαλεί σε μεγάλο ποσοστό το θάνατο των νεογνών. Στην περίπτωση ενηλίκων ασθενών η σηψαιμία συνοδεύεται από πυρετό

και σε κάποιες περιπτώσεις από σηπτικό σοκ, το οποίο πιθανόν να προκαλέσει μηνιγγίτιδα ή εγκεφαλίτιδα (Rohr et al., 2016).

Σε εγκυμονούσες γυναίκες η μόλυνση προκαλείται συνήθως κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης (Lorber, 2010). Οι προσβεβλημένες εκδηλώνουν συμπτώματα, όπως πυρετό και κεφαλαλγία ενώ ταυτόχρονα αντιμετωπίζουν γαστρεντερικά προβλήματα. Πέρα από τους κινδύνους για τις ίδιες τις έγκυες αυξημένος είναι ο κίνδυνος και για το έμβρυο, όπου ενδέχεται να προκληθεί αποβολή, ενδομήτριος θάνατος ή πρόωρος τοκετός (Lamont, 2011). Δεδομένου ότι η ασθένεια μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να εκδηλωθεί με συμπτώματα που μοιάζουν με αυτά της κοινή γρίπης, η νόσος αρχικά ενδέχεται να μην αξιολογηθεί ανάλογα. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να συλλέγεται αίμα για εργαστηριακές εξετάσεις από οποιαδήποτε εγκυμονούσα, η οποία παρουσιάζει πυρεξία ασαφούς αιτιολογίας όμοια με αυτή της γρίπης (Καραϊωαννόγλου, 2008). Σε ένα μεγάλο ποσοστό (σχεδόν 25%) των κήσεων η προσβολή της εγκύου από το μικρόβιο προκαλεί αποβολή του εμβρύου ενώ σε ελάχιστες περιπτώσεις (περίπου 5% του συνόλου) το έμβρυο δεν προσβάλλεται από τη λιστερίωση. Η ικανότητα επομένως του μικροβίου να μεταδίδεται διαμέσου του πλακούντος στο έμβρυο δύναται να προκαλέσει την ενδομήτρια μόλυνσή του με σοβαρές συνέπειες για τη επιβίωσή του (Ooi & Lorber, 2005).

Ανησυχητικά είναι τα επίπεδα θνητότητας που εμφανίζει η συγκεκριμένη ασθένεια και τα οποία κυμαίνονται περί το 20%. Σε άτομα μέσης ηλικίας το ποσοστό θνησιμότητας μπορεί να ανέλθει στο 30%. Παρόμοια, υψηλό ποσοστό θνησιμότητας το οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις ξεπερνά και το 30% εντοπίζεται στις ομάδες υψηλού κινδύνου όπως οι εγκυμονούσες γυναίκες, τα βρέφη και γενικά τα άτομα που για οποιονδήποτε λόγο βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή (Mead et al., 2009).

2.3.1 Ομάδες αυξημένου κινδύνου για προσβολή από την *L. monocytogenes*

Ως ομάδες υψηλού κινδύνου θεωρούνται τα παιδιά, οι ηλικιωμένοι, οι έγκυες και άτομα με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα. Στην τελευταία κατηγορία περιλαμβάνονται ασθενείς που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή, καρκινοπαθείς και άτομα που πάσχουν από το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοβιολογικής Ανεπάρκειας (AIDS). Ειδικότερα για τις εγκύους και τα άτομα άνω των 65 ετών, ο κίνδυνος προσβολής από τη λιστέρια είναι ιδιαίτερα αυξημένος. Η χρήση αντιόξινων και η ακόλουθη αλκαλοποίηση του στομάχου καθώς και οι χειρουργικές επεμβάσεις για τη

θεραπεία του έλκους στομάχου αποτελούν επιβαρυντικούς παράγοντες, οι οποίοι αυξάνουν την πιθανότητα μόλυνσης από τον μικροοργανισμό (Lorber, 1997; Mead et al., 2009). Η αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης αυτής της σοβαρής ασθένειας πιθανόν να οφείλεται στην αύξηση των ευπαθών πληθυσμών γεγονός που προκαλεί ανησυχία σχετικά με την εμφάνιση μολυσμένων με *L. monocytogenes* τροφίμων που διατίθενται προς κατανάλωση (Goulet et al., 2008; Ricci et al., 2018).

2.4 Επιδημιολογία λιστερίωσης

Η πρώτη απομόνωση της *L. monocytogenes* επετεύχθη το 1929 στη Νέα Ζηλανδία από τον Gill, ο οποίος εντόπισε μεταξύ των προβάτων μία νόσο, την οποία και ονόμασε ‘κυκλωτική ασθένεια’ (Circling disease). Ο όρος αυτός εξακολουθεί να χρησιμοποιείται προκειμένου να περιγράψει ασθένειες, όπως είναι η εγκεφαλομυελίτιδα, η μηνιγγοεγκεφαλοπάθεια και η εγκεφαλίτιδα, οι οποίες και αποτελούν τις πιο συχνές εκδηλώσεις της νόσου της λιστερίωσης σε ζώα, όπως τα βοοειδή και τα πρόβατα. Τα ζώα αυτά ενοχοποιούνται για τη μετάδοση των ασθενειών αυτών στον άνθρωπο (Sanaa et al., 1993).

Ήδη από το 1929 είχε γίνει αντιληπτή η δυνατότητα μόλυνσης, όχι μόνο των ζώων, αλλά και του ανθρώπου από το μικρόβιο αυτό. Την χρονιά αυτή καταγράφηκαν τρία περιστατικά ασθενών, οι οποίοι εμφάνιζαν παραπλήσια συμπτώματα με αυτά της μονοπυρήνωσης. Το 1935 στις ΗΠΑ είχε πλέον αποσαφηνιστεί η σχέση της *L. monocytogenes* με ασθένειες, όπως η μηνιγγίτιδα και η σηψαιμία, δίχως όμως να γίνει σαφής ο ρόλος των τροφίμων στη μετάδοσή της. Η απόδειξη του συσχετισμού μεταξύ τους ήρθε πολύ αργότερα, το 1985, όταν στην πολιτεία της Καλιφόρνια ξέσπασε μια επιδημία λιστερίωσης, η οποία και συνοδεύτηκε από 48 θανάτους και η οποία φαίνεται να προκλήθηκε από την κατανάλωση λαχανικών (Gandhi & Chikindas, 2007).

Ενώ η μετάδοση του μικροβίου μέσω των τροφίμων και του γαστρεντερικού συστήματος είχε γίνει εμφανής, υπήρξε μια μεγάλη καθυστέρηση μέχρι να ενταχθεί στην ομάδα των τροφιμογενών παθογόνων μικροβίων. Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και στις αρχές αυτής του 1980 καταγράφηκαν αρκετές τροφιμογενείς επιδημίες, οι οποίες χαρακτηρίζονταν από μεγάλη θνησιμότητα. Το 1979 αναφέρθηκε η πρώτη στη Βοστώνη με 23 περιστατικά και με θνητότητα που ανέρχονταν στο 23%. Τα αίτια αυτής αποδόθηκαν στην πιθανή κατανάλωση μολυσμένων λαχανικών. Το 1983

επίσης, η κατανάλωση μολυσμένου αγελαδινού γάλακτος προκάλεσε το θάνατο 14 ατόμων σε συνολικά 49 ασθενείς στη Μασαχουσέτη των ΗΠΑ (Duffy et al., 2001).

Η μεγαλύτερη, όμως, επιδημία λιστερίωσης συνέβη το 1985 στο Λος Άντζελες των ΗΠΑ, όπου καταγράφηκαν 142 περιστατικά. Από αυτά το 34% (48 άτομα) τελικά κατέληξε, ενώ τραγικό είναι το γεγονός ότι ένα μεγάλο ποσοστό μεταξύ των κρουσμάτων (65%) ήταν έγκυες γυναίκες. Τα αίτια της επιδημίας αυτής εντοπίστηκαν στη χρήση μη παστεριωμένου γάλακτος, το οποίο αναμειχθηκε με παστεριωμένο κατά την παρασκευή ενός είδους μεξικάνικου μαλακού τυριού χωρίς ωρίμανση, το οποίο ονομάζεται 'queso blanco' (Wiedmann et al., 1997).

Οι σοβαρότερες όμως επιδημίες καταγράφηκαν στην Ευρώπη και οφείλονταν σε παρασκευάσματα κρέατος. Το 1990 στη Μεγάλη Βρετανία και το 1992 στη Γαλλία, καταγράφηκαν περισσότερα από 300 περιστατικά σε κάθε χώρα με αίτιο την κατανάλωση μολυσμένου κρέατος χοίρου το οποίο υπέστη θερμική επεξεργασία. Σε μια προσπάθεια ελέγχου της ραγδαίας αύξησης των κρουσμάτων η Ευρωπαϊκή Ένωση συνέστησε ένα σύστημα επιτήρησης, το οποίο για το χρονικό διάστημα 1992 – 2002 κατέγραψε 19 επιδημίες αποδεικνύοντας ότι, παρά τη δραστηριοποίηση και τα μέτρα ελέγχου σε ό,τι αφορά την πρόληψη, τα περιστατικά λιστερίωσης παραμένουν υψηλά (DeValk et al., 2001).

2.4.1 Επιδημιολογία της ασθένειας στα ζώα

Η πρώτη απομόνωση της *L. monocytogenes* σε ζώα αφορούσε επιδημική έξαρση σε ινδικά χοιρίδια και κουνέλια, που έλαβε χώρα το 1926 σε εργαστηριακή μονάδα αναπαραγωγής ζώων και εντοπίστηκε από τον Murray. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περισσότερα από 40 διαφορετικά είδη ζώων, άγριων ή και οικόσιτων, τα οποία εκδήλωσαν νόσο λόγω προσβολής από *Listeria* spp. (Desmarchelier et al., 2007).

Κρούσματα λιστερίωσης εντοπίζονται πιο συχνά στα μικρά μηρυκαστικά καθώς το ποσοστό των καταγεγραμμένων περιστατικών προσβολής τους αγγίζει το 30%. Αντίθετα, στα βοοειδή το ποσοστό προσβολής τους δεν υπερβαίνει το 15%. Γενικά το ποσοστό προσβολής των ζώων εμφανίζει διακυμάνσεις. Τα ποσοστά θνησιμότητας κυμαίνονται από 20% μέχρι και 100%, γεγονός που καταδεικνύει την επικινδυνότητα

της συγκεκριμένης ασθένειας και για τους ζωικούς πληθυσμούς. Ο θάνατος επέρχεται σύντομα στις αίγες και στα πρόβατα μέσα σε 2 έως 3 ημέρες, ενώ στα βοοειδή η νόσος ακολουθεί βραδύτερους ρυθμούς (Low & Donachie, 2007).

Επιπροσθέτως, η εγκεφαλίτιδα που οφείλεται στη λιστερίωση συνδέεται με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας στα μηρυκαστικά (Kotzamanidis et al., 2019). Η εγκεφαλίτιδα εμφανίζει κλινικά συμπτώματα που αποτελούν απόρροια των αλλοιώσεων που υφίσταται το εγκεφαλικό στέλεχος. Τα συμπτώματα αυτά εκδηλώνονται με χαρακτηριστική πτώση του βλεφάρου, συνεχείς κυκλικές κινήσεις, κλίση κεφαλής, έλλειψη συντονισμού, νωθρότητα, παράλυση και κατάκλιση. Στην περίπτωση των βοοειδών, η λιστερίωση εμφανίζεται με συμπτώματα όπως η μαστίτιδα, η σηψαιμία αλλά και η εγκεφαλοπάθεια. Μετά την εγκεφαλίτιδα, ιδιαίτερα συχνές είναι οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος που οφείλονται σε *Listeria* spp. Δεν είναι σπάνιο μέσα στην ίδια ομάδα ζώων (κοπάδι) να εκδηλωθούν διαφορετικές μορφές της λιστερίωσης (Desmarchelier et al., 2007).

2.4.2 Επιδημιολογία της ασθένειας στον άνθρωπο

Οι επιδημιολογικές μελέτες τις τελευταίες δεκαετίες (από το 1980 και μετά) έχουν καταγράψει αύξηση κρουσμάτων τροφιμογενών ασθενειών στον άνθρωπο (Domenech et al., 2007). Ειδικότερα στις ανεπτυγμένες χώρες, περί το 10-15% των ατόμων του πληθυσμού, προσβάλλεται από τροφιμογενή νόσο τουλάχιστον μια φορά το χρόνο, που μπορεί να αποβεί επικίνδυνη τόσο για τα νοσούντα άτομα όσο και για το κοινωνικό σύνολο γενικότερα. Επειδή, άλλωστε, η απώλεια ανθρώπινης ζωής δεν θεωρείται σε καμία περίπτωση αμελητέα, κρίνεται αναγκαία η αύξηση των ιατρικών δαπανών για την πρόληψη και την αντιμετώπισή της (Domenech et al., 2007). Επιπλέον ο οικονομικός αντίκτυπος στις βιομηχανίες τροφίμων είναι εξίσου σημαντικός καθώς αυξάνονται οι μικροβιολογικοί και εργαστηριακοί έλεγχοι, προϊόντα ανακαλούνται ή υφίστανται εκ νέου επεξεργασία, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις προκύπτουν και νομικά ζητήματα όπως κυρώσεις, πρόστιμα ή ακόμη και αποζημιώσεις καταναλωτών λόγω της διάθεσης ακατάλληλων προς κατανάλωση τροφίμων στην αγορά. Παρότι η καταγεγραμμένη συχνότητα εμφάνισης της λιστερίωσης δεν είναι μεγάλη συγκριτικά με άλλες τροφιμογενείς νόσους, ωστόσο η σοβαρότητα των κλινικών συμπτωμάτων της αλλά και το μεγάλο ποσοστό θνητότητας που τη χαρακτηρίζει, έχουν στρέψει το ενδιαφέρον των ερευνητών στην μελέτη της. Αξίζει να επισημανθεί ότι ανάμεσα στα τροφιμογενή νοσήματα κατέχει την τρίτη υψηλότερη θέση σε ποσοστά θνητότητας, που αγγίζουν το 16% ενώ στην

πρώτη θέση βρίσκεται το βακτήριο *Vibrio vulnificus* με 35% και ακολουθεί το βακτήριο *Clostridium botulinum* με 17% (ECDC, 2011; SCHARFF, 2012).

Το 2009 σε σύνολο 1688 ύποπτων για λιστέρια κρουσμάτων, δηλωμένων από 28 χώρες, επιβεβαιώθηκαν 1685 κρούσματα λιστερίωσης. Χώρες όπως η Πορτογαλία, το Λιχτενστάιν, η Κύπρος, η Μάλτα και η Ισλανδία ανέφεραν μηδενικά κρούσματα (ECDC, 2011).

Στις Η.Π.Α τα κρούσματα της ασθένειας αποτελούν μείζον πρόβλημα για τις βιομηχανίες τροφίμων. Κατά τη διάρκεια των ετών 1980 μέχρι και 1986 καταγράφηκαν από το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Center for Disease Control and Prevention, CDC) 7,4 κρούσματα της ασθένειας ανά εκατομμύριο ατόμων του πληθυσμού. Πρόκειται για ποσοστό της τάξης των 1850 κρουσμάτων λιστερίωσης και 425 θανάτων ανά έτος από την ασθένεια αυτή (Heymann, 2015). Με την υιοθέτηση και την τήρηση αυστηρών μέτρων πρόληψης και ελέγχου στις βιομηχανίες τροφίμων, η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας ανά έτος μειώθηκε σε 4,4 κρούσματα ανά εκατομμύριο του πληθυσμού μέχρι και το 1993. Το ποσοστό αυτό μεταφράζεται σε 1092 κρούσματα και 248 θανάτους από την νόσο ανά έτος (Bennion et al., 2008). Στις ΗΠΑ το έτος 2010 το CDC κατέγραψε 568 επίσημα κρούσματα λιστερίωσης, εκ των οποίων τα 72 κρούσματα (13%) αφορούσαν γυναίκες εγκύους (CDC, 2012a).

Η λιστερίωση εμφανίζεται συχνότερα με τη μορφή σποραδικής ασθένειας και σπάνια εκδηλώνεται ως επιδημία. Για το διάστημα 2000-2003, βάσει στοιχείων που συνελέγησαν από 9 πολιτείες των ΗΠΑ, προέκυψε ότι από τις 249 καταγεγραμμένες περιπτώσεις λιστερίωσης το 97% ήταν σποραδικές. Η μόλυνση αυτών αποδόθηκε στην κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου, κυρίως κρέατος και γαλακτοκομικών προϊόντων (Bennion et al., 2008). Ανάλογη έρευνα κατά το χρονικό διάστημα 2000 - 2008 κατέγραψε 1600 περιπτώσεις λιστερίωσης με ποσοστό θνησιμότητας 16% (περίπου 255 θάνατοι) (Scallan et al., 2011).

Από τον Αύγουστο μέχρι το Νοέμβριο του 2013 εμφανίστηκαν 8 κρούσματα λιστερίωσης σε 5 πολιτείες της Αμερικής λόγω κατανάλωσης ημίσκληρου τυριού. Από τα οκτώ κρούσματα το ένα επέφερε το θάνατο του ασθενούς (CDC, 2017c). Από τον Μάιο μέχρι τον Ιούλιο του 2013 εμφανίστηκαν 6 κρούσματα σε 5 πολιτείες της Αμερικής, επίσης εξαιτίας της κατανάλωσης τυριού με αποτέλεσμα έναν θάνατο και μια αποβολή (CDC, 2017b). Τέλος, 19 άνθρωποι σε 9 πολιτείες της Αμερικής νοσηλεύθηκαν λόγω της λιστερίωσης το 2015. Σε αυτήν την περίπτωση ως αιτία εξελήφθη η κατανάλωση συσκευασμένης σαλάτας (CDC, 2017a).

Στον Καναδά το 2008 ξέσπασε μια επιδημία λιστερίωσης με 57 επιβεβαιωμένα κρούσματα και 23 θανάτους (Hatt & Hatt, 2012; Self JL., 2016).

Το 2009 καταγράφηκαν 3 εξάρσεις κρουσμάτων λιστερίωσης στην Αυστρία, Τσεχία και Γερμανία. Αφορούσαν 40 κρούσματα, εκ των οποίων τα 11 ήταν θανατηφόρα. Αίτιο των κρουσμάτων αυτών θεωρήθηκε η κατανάλωση τυριού quargel (EFSA, 2011).

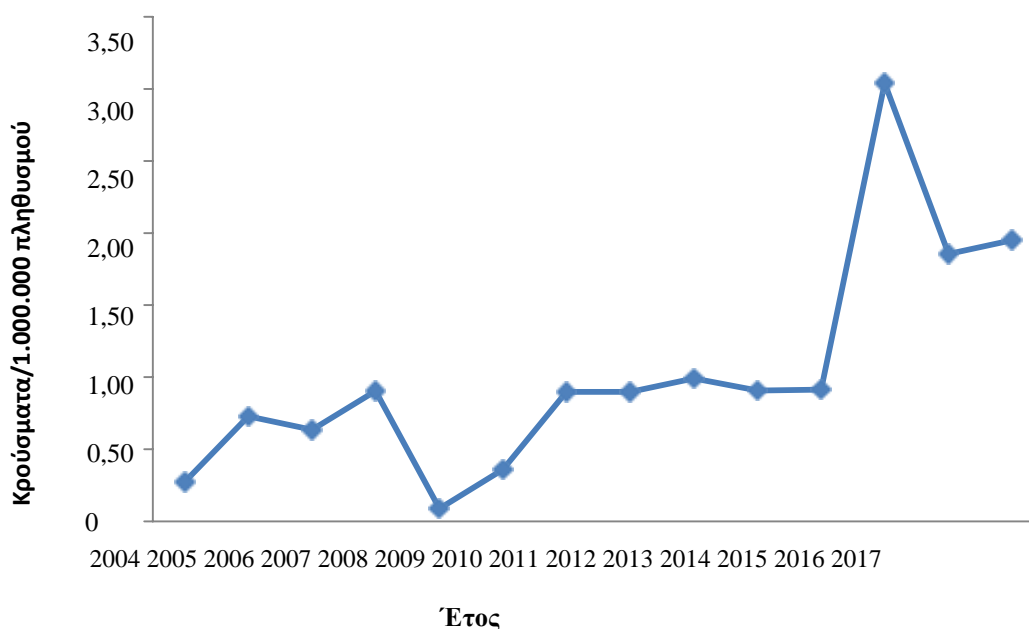
Τις τελευταίες δεκαετίες σε χώρες της Ευρώπης εκδηλώνονται κρούσματα λιστερίωσης σε ευρεία κλίμακα (στη Φινλανδία σε μονάδες αλιείας) (EFSA, 2017; National Institute for Health and Welfare, 2018). Στις Ευρωπαϊκές χώρες τα κρούσματα λιστερίωσης από το 1991 μέχρι και το 2001 ήταν 2065, δηλαδή σχεδόν 188 περιστατικά ανά έτος. Πιθανολογείται πως δεν έχει καταγραφεί το σύνολο των περιστατικών, καθώς ενδεχομένως δεν έγιναν αντιληπτά από τους αρμόδιους φορείς υγείας και επομένως δεν κατεγράφησαν. Παρατηρήθηκε, ωστόσο, μια αύξηση των κρουσμάτων κατά την δεκαετία που ακολούθησε και το 2008 το σύνολο των καταγεγραμμένων περιστατικών λιστερίωσης ανήλθε στα 1381. Για το 2010 η συχνότητα ήταν επίσης υψηλή και έφτασε τα 3,5 κρούσματα ανά εκατομμύριο ατόμων του πληθυσμού στην Ευρώπη.

Το 2013 στην Ευρωπαϊκή Ένωση κατεγράφησαν 1763 κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης (EFSA, 2015). Την χρονιά εκείνη σημειώθηκε το υψηλότερο ποσοστό κρουσμάτων συνοδευόμενων από νοσοκομειακή περίθαλψη των ασθενών (> 99%) και με περιστατικά θανάτων που ανέρχονταν στο 15,6%. Το γεγονός αυτό την καθιστά την 5η συχνότερη ζωοανθρωπονόσο. Το 2015, 28 κράτη της Ευρώπης ανέφεραν την εκδήλωση 2206 κρουσμάτων λιστερίωσης με την επίπτωση να υπολογίζεται στα 4,6 κρούσματα ανά εκατομμύριο ατόμων του πληθυσμού. Η θνησιμότητα για το έτος αυτό ανήλθε στο 17,7% των περιστατικών με την πλειονότητα τους να αφορά άτομα άνω των 65 και ιδιαίτερα άνω των 85 ετών (Rohr et al., 2016; ECDC, 2015).

Ειδικότερα, στην Αγγλία και στην Ουαλία, από το 1980 και μετά, κατεγράφη ανησυχητική αύξηση των κρουσμάτων λιστερίωσης. Αξίζει να σημειωθεί πως παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από λιστέρια και του χαμηλού οικονομικού επιπέδου των ασθενών. Συγκριτικά, όμως, με τα κρούσματα σαλμονέλας που παρατηρήθηκαν κατά το ίδιο χρονικό διάστημα, το ποσοστό παραμένει ακόμη χαμηλό. Το γεγονός, άλλωστε, ότι στις συγκεκριμένες χώρες η λιστερίωση αποτελεί την τέταρτη πιο κοινή αιτία θανάτου, οφειλόμενη στην κατανάλωση τροφίμων, εντείνει το ενδιαφέρον για τη νόσο αυτή (Domenech et al., 2007).

Τον Δεκέμβριο του 2017 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO- World Health Organization) ειδοποιήθηκε για επιδημία λιστερίωσης στην Νότια Αφρική. Μέχρι τις 22 Δεκεμβρίου του ίδιου έτους, 550 άνθρωποι είχαν νοσήσει, εκ των οποίων οι 60 έχασαν την ζωή τους (WHO, 2018). Τον Μάρτιο του 2018 εντοπίστηκε η πηγή της λιστερίωσης (έτοιμο προς κατανάλωση προϊόν κρέατος), ενώ μέχρι τον Μάιο του ίδιου έτους επιβεβαιώθηκαν 1024 κρούσματα με το ποσοστό θνησιμότητας να αγγίζει το 28%.

Στην Ελλάδα τα επίπεδα εμφάνισης λιστερίωσης είναι χαμηλά με ένα μόνο κρούσμα να καταγράφεται το 1998 και στη συνέχεια επτά περιστατικά το 1999. Το 2000 επιβεβαιώθηκε η εκδήλωση έξι κρουσμάτων λιστερίωσης και κανένα για τα έτη μέχρι και το 2004 οπότε και εκδηλώνονται τρία περιστατικά. Στα επόμενα έτη παρατηρείται αύξηση στον αριθμό των καταγεγραμμένων περιστατικών με οκτώ για το 2005, επτά για το 2006 και δέκα για το 2007. Το 2008 ο αριθμός των κρουσμάτων μειώνεται στο ελάχιστο με ένα μόνο περιστατικό για να αυξηθεί και πάλι σε τέσσερα κρούσματα το 2009 και δέκα το 2010. Για το διάστημα επομένως 2004-2010 η μέση επίπτωση ανά έτος υπολογίστηκε στα 0,55 κρούσματα ανά 1 εκατομμύριο του πληθυσμού (Rohr et al., 2016). Συνολικά, κατά το διάστημα 2004-2017 δηλώθηκαν 158 κρούσματα λιστερίωσης στη χώρα μας. Ο μέσος ετήσιος αριθμός των κρουσμάτων ήταν 11,3 (τυπική απόκλιση: 8,4). Η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση ήταν 1,03 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού. Από το 2015 έως και το 2017 παρατηρήθηκε αύξηση των κρουσμάτων λιστερίωσης (3,04, 1,85 και 1,95 κρούσματα/1.000.000 πληθυσμού για τα έτη 2015, 2016 και 2017, αντίστοιχα). Ο αριθμός των δηλωθέντων κρουσμάτων, καθώς και η επίπτωση της λιστερίωσης κατ' έτος για το χρονικό διάστημα 2004-2017 παρουσιάζονται στο Γράφημα 1.



Γράφημα 14: Ετήσια επίπτωση της λιστερίωσης (αριθμός κρουσμάτων ανά 1.000.000 κατοίκους) στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, 2004-2017 (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2018)

Η κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων ενοχοποιείται για το μεγαλύτερο ποσοστό των περιστατικών προσβολής από λιστερίωση (μεγαλύτερο του 50%). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ευκολία μόλυνσης των τροφίμων αυτών από το παθογόνο μικρόβιο και στο γεγονός ότι η κατηγορία αυτών των τροφίμων καταναλώνεται ευρέως από άτομα κάθε ηλικίας ακόμη και από άτομα που ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου (Hassan et al., 2000). Σε δεύτερη θέση βρίσκονται τα ΕΚΤ, το κρέας και τα σκευάσματά του (EFSA και ECDC, 2015).

2.4.3 Απομόνωση της *L. monocytogenes* από διάφορες κατηγορίες τροφίμων

2.4.3.1 Προϊόντα κρέατος και πουλερικών

Η παρουσία της *L. monocytogenes* σε ότι αφορά τα κρέατα και τα σκευάσματα κρέατος κυμαίνεται από 10% μέχρι και 90% και μπορεί να εμφανιστεί σε διάφορα στάδια της παραγωγής κρέατος, από τα σφαγεία μέχρι και τα καταστήματα πώλησης. Για παράδειγμα, η αποθήκευση νωπού κρέατος στα ψυγεία είναι ένα πολύ κρίσιμο στάδιο της παραγωγής, καθώς το βακτήριο μπορεί να δημιουργήσει βιομεμβράνες σε διάφορες επιφάνειες και να εξαπλωθεί σε άλλες περιοχές της παραγωγής (Kurpas et al., 2018). Η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού επιτυγχάνεται στην περίπτωση που το κρέας έχει pH μικρότερο από 5,5 - 5,7, έχει αποθηκευτεί στους 0 °C και είναι συσκευασμένο αεροστεγώς. Σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5 °C και σε pH άνω του 5,7 ο ρυθμός πολλαπλασιασμού του βακτηρίου αυξάνεται και το τρόφιμο αποικίζεται με ταχύτατους ρυθμούς (Gómez et al., 2015).

Σε ότι αφορά τα θερμικώς επεξεργασμένα τρόφιμα, κρίνεται μείζονος σημασίας όχι μόνο η απουσία *L. monocytogenes* από το κρέας αλλά και ο τρόπος αποθήκευσής τους. Ειδικότερα, για το κόκκινο κρέας, οι ημέρες αποθήκευσης δεν θα πρέπει να ξεπερνούν τις 15 στους 7 °C ενώ για τα πουλερικά τις 3 ημέρες στους 4 °C. Επίσης, σημαντικός παράγοντας για την ασφάλεια των τροφίμων είναι ο τρόπος συσκευασίας τους, ειδικά όταν αυτά είναι τεμαχισμένα. Σε έρευνες αναφέρεται ότι σε δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε αεροστεγείς συσκευασίες ή σε δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε συσκευασίες κενού, ανιχνεύτηκε *L. monocytogenes* μετά από συντήρηση στους 5 °C έπειτα από 16 και 23 ημέρες αντίστοιχα, ενώ μετά από συντήρηση στους 25 °C σε 6 και 18 ημέρες αντίστοιχα. (Kurpas et al., 2018). Η θερμική επεξεργασία, στην οποία

υπόκεινται τα προϊόντα αυτά, μειώνει τον αριθμό των βακτηρίων. Επιβιώνουν μόνον όσοι τύποι του βακτηρίου αναπτύσσονται σε ψυχρές θερμοκρασίες. Σε περίπτωση όμως που τεμαχιστούν, είναι μεγαλύτερος ο κίνδυνος μόλυνσης από το βακτήριο γι' αυτό και χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές επεξεργασίας πριν τη συσκευασία τους, όπως sous vide και cook-and-chill (Borch & Arinder, 2002).

Σε ότι αφορά τα βραστά αλλαντικά, η παρουσία του μικροοργανισμού είναι συχνή και εντοπίζεται σε όλη τη γραμμή επεξεργασίας τους, από τη θερμική επεξεργασία έως τον τεμαχισμό και τη συσκευασία. Τα βραστά αλλαντικά παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε διασταυρούμενη μόλυνση καθώς περνούν από περισσότερα στάδια επεξεργασίας και διατίθενται χωρίς να απαιτείται μαγείρεμα για την κατανάλωσή τους. Ως εκ τούτου, αυξάνεται η πιθανότητα μόλυνσης του καταναλωτή. Σε Ευρωπαϊκές βιομηχανίες σε όλη τη γραμμή παραγωγής αλλαντικών αέρος, έχουν εντοπιστεί η *L. monocytogenes* καθώς και άλλα στελέχη του γένους *Listeria* (Jiang et al., 2011).

Υπάρχουν προϊόντα αλλαντοποίησης που παρασκευάζονται από σύγκοπτο κρέας με ζύμωση και ωρίμανση (σαλάμι αέρος Λευκάδας, Θάσου, Ευρυτανίας κ.λ.π., σουτζούκια). Τα αλλαντικά αυτά μετά τον τεμαχισμό του κρέατος και του λίπους, την παραγωγή και ενθήκευση της κρεατόπαστας υφίστανται ωρίμανση σε ειδικούς θαλάμους χωρίς να υποβληθούν σε θερμική επεξεργασία. Αυτά διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα συνήθως υπό ψύξη και δεν μαγειρεύονται πριν καταναλωθούν. Η *L. monocytogenes* είναι δυνατόν να ανιχνεύεται στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης των αλλαντικών αυτών, αλλά στην συνέχεια ο πληθυσμός τους μειώνεται ή δεν είναι ανιχνεύσιμη μετά το τέλος της ωρίμανσης στα ελληνικά αλλαντικά (Drosinos et al. 2005; Samelis et al. 1998). Η τιμή που ορίζεται είναι 100 cfu/g σύμφωνα με την νομοθεσία, ως κριτήριο ασφαλείας για τα τρόφιμα (Ε.Κ. 2073/2005 και Ε.Κ. 1441/2007).

Η *L. monocytogenes* εντοπίζεται και στο νωπό κρέας και ειδικότερα στον κιμά που προκύπτει από τον λεπτοτεμαχισμό νωπού κρέατος. Η μεταφορά του είθισται να γίνεται μέσα σε πλαστικές συσκευασίες, στις οποίες δημιουργούνται μικροαερόφιλες συνθήκες, που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό της *Listeria*. Στην περίπτωση που η μετέπειτα θερμική επεξεργασία (μαγείρεμα) από τον καταναλωτή είναι ανεπαρκής, ο κίνδυνος επιβίωσης του βακτηρίου και μόλυνσης του καταναλωτή είναι μεγάλος (Lemay et al., 2002).

2.4.3.2 Ιχθυηρά

Πρόκειται για κατηγορία τροφίμων η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και για το λόγο αυτό προτιμάται από μεγάλη μερίδα καταναλωτών. Ένα μεγάλο ποσοστό ιχθυηρών υφίσταται επεξεργασίες όπως είναι η αλάτιση (ξηρή ή υγρή), η κάπνιση, η κονσερβοποίηση, η αποξήρανση αλλά και η κατάψυξη (Huss et al., 2000).

Η *L. monocytogenes* έχει εντοπιστεί σχεδόν παντού και στο υδάτινο περιβάλλον. Η *L. monocytogenes* μπορεί να εμφανιστεί τόσο στο έδαφος όσο και στο νερό και κατ' επέκταση στις καλλιέργειες ιχθυηρών, από όπου μπορεί να μεταδοθεί/μεταφερθεί στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας (Aalto-Araneda et al., 2019). Η μόλυνση των ιχθυηρών συνεπώς είναι πολύ πιθανή. Κατά τη διαδικασία του φιλεταρίσματος υπάρχει υψηλός κίνδυνος διασταυρούμενης μόλυνσης (Skowron et al., 2018). Μάλιστα, έπειτα από έρευνα που πραγματοποιήθηκε από την EFSA το 2017 βρέθηκε ότι στα ιχθυηρά και στα προϊόντα αλιείας εμφανίζεται το μεγαλύτερο ποσοστό μη τήρησης των ευρωπαϊκών προτύπων που αφορούν την ασφάλεια τροφίμων (Skowron et al., 2018). Για τον λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία η ορθή επιλογή των περιοχών αλίευσης καθώς και η αποφυγή περιοχών, στις οποίες εντοπίζονται λύματα και κυρίως λύματα βόθρων. Η αλίευση σε ανοιχτή θάλασσα μειώνει τον κίνδυνο μόλυνσης των ιχθυηρών από το μικρόβιο χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η πιθανότητα μόλυνσή τους είτε κατά το στάδιο της αλίευσης, είτε κατά τα στάδια μεταφοράς και επεξεργασίας τους (Jahncke et al., 2004).

Η συχνότητα και το ποσοστό κρουσμάτων λιστερίωσης που οφείλονται στην κατανάλωση ιχθυηρών είναι κατά πολύ μικρότερα σε σύγκριση με εκείνα που οφείλονται στην κατανάλωση κρέατος, πουλερικών και γαλακτοκομικών προϊόντων. Στα ιχθυηρά καθοριστικός για την επιβίωση των βακτηρίων είναι ο τρόπος μαγειρέματός τους. Αυτό προκύπτει και από τον μεγάλο αριθμό κρουσμάτων στην Ιαπωνία όπου είθισται η βρώση νωπών ιχθυηρών (Nakamura et al., 2004). Η θερμική επεξεργασία (μαγείρεμα) για 2 min σε θερμοκρασία 70 °C έχει ως συνέπεια την πλήρη εξουδετέρωση της *L. monocytogenes*. Ωστόσο υπάρχουν είδη ιχθυηρών στα οποία δεν εφαρμόζεται θερμική επεξεργασία, όπως τα μαριναρισμένα αλιεύματα (μαριναρισμένο χταπόδι, σκουμπρί φιλέτο), τα αφυδατωμένα-αλατισμένα (βακαλάος, τσίροι) και τα καρκινοειδή (καβούρια, γαρίδες, αστακούς, караβίδες) (Miettinen et al., 2001).

Ξεχωριστή κατηγορία αποτελούν τα ψάρια, τα οποία υπόκεινται στην επεξεργασία ψυχρής ή θερμής κάπνισης. Αρχικά τα ψάρια φιλετάρονται, ακολουθεί η προσθήκη

άλατος, αποξηραίνονται και καπνίζονται στην ανάλογη θερμοκρασία. Στη συνέχεια ψύχονται και συσκευάζονται σε αεροστεγείς συσκευασίες προκειμένου να διανεμηθούν στους χώρους πώλησης (Gall et al., 2004).

Βασικός κίνδυνος για την υγεία του καταναλωτή είναι η αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* (στην περίπτωση που ήδη εντοπίζονται κύτταρα του μικροβίου στο τρόφιμο) κατά την παραμονή του προϊόντος στο ράφι, σε επίπεδα ικανά να προκαλέσουν την εκδήλωση νόσου. Ακόμη και αν η επεξεργασία πραγματοποιηθεί κάτω από τις πλέον κατάλληλες συνθήκες υγιεινής, το γεγονός αυτό δεν αποκλείει τον κίνδυνο εμφάνισης της *L. monocytogenes* σε συγκεκριμένα είδη ιχθυηρών όπως είναι ο καπνιστός σολομός. Η θέση αυτή ενισχύεται από έρευνες σε βιομηχανίες επεξεργασίας σολομού, οι οποίες ανίχνευσαν παραμένοντα στελέχη του βακτηρίου, ικανά να αναπτύσσουν βιομεμβράνες (Tocmo et al., 2014). Για το λόγο αυτό επιβάλλεται τα προϊόντα αυτά να φέρουν στη συσκευασία τους ειδική σήμανση, η οποία θα διασφαλίζει από ενδεχόμενους κινδύνους ευπαθείς ομάδες, λ.χ. άτομα που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή και έγκυες γυναίκες (Eklund, 1997).

2.4.3.3 Λαχανικά και φρούτα

Η παρουσία της *L. monocytogenes* εντοπίζεται σε πολλά φρούτα και λαχανικά, αρκετά από τα οποία σχετίζονται με κρούσματα τροφιμογενούς λιστερίωσης (Hadjilouka et al., 2014). Η *L. monocytogenes* ανιχνεύεται σε ωμά λαχανικά (λάχανο, μαρούλι, ντομάτες, πατάτες και άλλα) και η διάρκεια παραμονής της στους ιστούς του φυτού μπορεί να ξεπεράσει τα 10 χρόνια. Παράλληλα, αυτός ο παθογόνος μικροοργανισμός απομονώνεται από χυμούς φρούτων και από σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση αλλά και κατεψυγμένες. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι οι υδατάνθρακες που περιέχουν τα τρόφιμα αυτά (πατάτες, πεπόνι, ζυμαρικά) είναι κύριο συστατικό, που συμβάλλει στην ανάπτυξη του βακτηρίου (Lokerse et al., 2016). Παρομοίως, συστατικά λαχανικών, όπως η υψηλή περιεκτικότητα σε νιτρώδη άλατα (σέλινο) και σε φυτοαλεξίνες (καρότα - γνωστά για την αντιμικροβιακή τους δράση) παρεμποδίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* (Ziegler et al., 2019). Αντιθέτως, η χρήση κοπριάς ως λιπάσματος αυξάνει τον κίνδυνο μόλυνσης του φυτού παρόλο που η ακόλουθη πλύση του με χλωριούχο διάλυμα μειώνει αρκετά το μικροβιακό του φορτίο (Cordano & Jacquet, 2009). Δεν αποκλείεται βέβαια και η επιμόλυνση των λαχανικών να συμβεί κατά την κοπή και τη συσκευασία τους. Η κατανάλωσή τους δίχως να προηγείται θερμική επεξεργασία αυξάνει τον κίνδυνο παρουσίας του μικροβίου σε αυτά και επομένως της μόλυνσης των καταναλωτών (Ooi & Lorber, 2005).

2.4.3.4 Γάλα (φρέσκο και παστεριωμένο) και γαλακτοκομικά προϊόντα

Τα ποσοστά μόλυνσης των γαλακτοκομικών προϊόντων από την *L. monocytogenes* κυμαίνονται από 4% μέχρι και 10% (Rohr et al., 2016). Παράλληλα παρατηρείται μια διακύμανση στην παρουσία του παθογόνου στο γάλα ανάλογα με την εποχή συλλογής. Κατά τη διάρκεια της άνοιξης η παρουσία της λιστέριας είναι πιο συχνή σε σύγκριση με τους χειμερινούς μήνες, όπου είναι ελαττωμένη κατά 6% με 8%. Η μόλυνση του φρέσκου γάλακτος συνδέεται με παράγοντες όπως είναι η ανεπαρκής καθαριότητα των σιλό, οι αυξημένες τιμές pH ($pH > 4,0$) σε αυτά, η έλλειψη κανόνων υγιεινής στους χώρους διαβίωσης των ζώων και η έλλειψη απολύμανσης στα δοχεία αρμέγματος (Hassan et al., 2000).

Ο έλεγχος της παρουσίας της *L. monocytogenes* στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα επιτυγχάνεται κυρίως με τη μέθοδο της παστερίωσης σε συνδυασμό με την αυστηρή εξυγίανση του εξοπλισμού. Κυριότερο πρόβλημα κατά την απολύμανση των μηχανών παστερίωσης είναι η ανάπτυξη βιομεμβρανών του μικροοργανισμού, οι οποίες θα πρέπει να απομακρύνονται προσεκτικά. Η αξιολόγηση και η επιβεβαίωση των ορθών θερμοκρασιών, στις οποίες θα πραγματοποιηθεί η παστερίωση είναι εξίσου σημαντικές, ενώ μεγάλη προσοχή θα πρέπει να δίνεται και στο χειρισμό του γάλακτος, μετά την ολοκλήρωση της παστερίωσης, προκειμένου να μην αναμολυνθεί (Kozak et al., 1996). Η πιθανότητα μόλυνσης των καταναλωτών από τη *L. monocytogenes* αυξάνεται κατά την κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος ή γαλακτοκομικών προϊόντων που προκύπτουν από αυτό. Η μη θερμική επεξεργασία του γάλακτος και των προϊόντων του αυξάνει επίσης τον κίνδυνο μόλυνσης (Rohr et al., 2016).

Τα **τυριά** αποτελούν μια ειδική κατηγορία γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς ένα αξιοσημείωτο ποσοστό προσβολής από την *L. monocytogenes* αφορά την κατανάλωση τυροκομικών προϊόντων (Rohr et al., 2016). Η παρουσία της *L. monocytogenes* βρέθηκε να είναι πιο συχνή σε μαλακά τυριά από ότι σε σκληρά τυριά (Arthur, 2002; Churchill et al., 2019). Επίσης τυριά, τα οποία ωριμάζουν παρουσία μυκήτων, εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά παρουσίας του μικροβίου, καθώς η υψηλή υγρασία και το υψηλό pH κατά την ωρίμανση τους ευνοεί την επιβίωση και ανάπτυξη του βακτηρίου. Η αύξηση του pH κατά την διαδικασία της ωρίμανσης τυριών όπως το Camembert και το Brie, συνδέεται σημαντικά με την αύξηση του μικροβιακού φορτίου της λιστέριας σε αυτά. Στα τυριά η αυξημένη τιμή του pH πάνω από το όριο 4,2 και σε ορισμένες περιπτώσεις πάνω από 5,6 υποβοηθά την ανάπτυξη

του βακτηρίου. Αντίθετα, η πτώση τιμής του pH προκαλεί μείωση του ρυθμού ανάπτυξης της *L. monocytogenes*. Γενικά οι χαμηλότερες τιμές pH στα τυριά έχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη της (Cadavez et al., 2018). Σε τυριά όπως το ανθότυρο, αποδείχθηκε ότι το μικρόβιο αναπτύσσεται αρκετά καλά (Rohr et al., 2016). Το ευνοϊκότερο υπόστρωμα όμως για τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου αποδείχθηκε ότι είναι το τυρί Ricotta, καθώς δεν περιέχει αντιμικροβιακές ουσίες. Επομένως ο κίνδυνος για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε αυτό είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους τυριών ακόμη και αν το προϊόν συντηρηθεί σε αεροστεγή συσκευασία και κάτω από κατάλληλες συνθήκες ψύξης. Άλλοι τύποι τυριών, μολονότι δεν υποβοηθούν τον πολλαπλασιασμό του μικροβίου, ωστόσο του επιτρέπουν να επιβιώνει στο εσωτερικό τους. Πρόκειται για τύπους τυριών με χαμηλό pH (<5,6) και χαμηλά επίπεδα υγρασίας. Ανάμεσα τους συγκαταλέγονται η φέτα, το Cheddar και τα κρεμώδη τυριά (Gombas et al., 2003).

Ορισμένα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το γιαούρτι, το κεφίρ, το ξινόγαλα, δεν ευνοούν την ανάπτυξη του βακτηρίου λόγω της φύσης τους. Έρευνες, ωστόσο, έχουν δείξει ότι, ακόμη και σε συνθήκες χαμηλού pH, υπάρχει δυνατότητα ανάπτυξης και επιβίωσης του βακτηρίου σε αυτά (Berrocal et al., 2002). Η δυσκολία επιβίωσής του εντός των προϊόντων αυτών οφείλεται στο χαμηλό pH (<4,5) και στην παρουσία οργανικών οξέων, τα οποία αναστέλλουν σημαντικά την ανάπτυξή του. Το γεγονός αυτό όμως δεν αναιρεί την ανάγκη συμμόρφωσης των παραγωγών στους προβλεπόμενους - για τον έλεγχο του μικροοργανισμού - κανόνες υγιεινής (Jagadeesan et al., 2018).

Το **βούτυρο** αποτελεί γαλακτοκομικό προϊόν, το οποίο παρασκευάζεται από παστεριωμένη κρέμα γάλακτος και σε ορισμένες περιπτώσεις είναι αλατισμένο. Η μόλυνσή του από το μικρόβιο είναι σπάνια αν και δεν αποκλείεται να προκληθεί μόλυνση του προϊόντος στο περιβάλλον επεξεργασίας (Maijala et al., 2001).

Τέλος τα **παγωτά**, που ανήκουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα, αποτελούν πιθανή αιτία μόλυνσης καθότι το γάλα αποτελεί το βασικό συστατικό παραγωγής του. Τα παγωτά, τα οποία παρασκευάζονται από μη παστεριωμένο γάλα και κρέμα γάλακτος, ενέχουν τους ίδιους κινδύνους με αυτούς της κατανάλωσης μη παστεριωμένου γάλακτος. Έρευνα σε Φινλανδικό εργοστάσιο παραγωγής παγωτού που πραγματοποιήθηκε από τους Lake, Hudson και Cressey κατά το χρονικό διάστημα 1990-1997, κατέληξε στο συμπέρασμα πως η μόλυνση των παγωτών με *L. monocytogenes* συμβαίνει κατά κύριο λόγο μετά την παστερίωση. Αυτό μπορεί να οφείλεται αφενός στην προσθήκη συστατικών μετά την παστερίωση του γάλακτος και αφετέρου στις ακατάλληλες συνθήκες υγιεινής του περιβάλλοντος επεξεργασίας των βιομηχανιών. Κατά κύριο λόγο οι θερμοκρασίες κατάψυξης παγωτού είναι η πλέον αποτελεσματική μέθοδος για την μείωση του κινδύνου πρόκλησης λιστερίωσης. Επιπλέον η προσθήκη ξηρών καρπών ή φρούτων κατά την διαδικασία παραγωγής παγωτού αυξάνει τον κίνδυνο μόλυνσης (Kozak et al., 1996). Σύμφωνα με τους Rohr

et al. (2016) τα περισσότερα κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης σχετίζονται με την παρασκευή και την κατανάλωση σπιτικού παγωτού. Δεν είναι σπάνια βέβαια και τα κρούσματα που εκδηλώνονται από την κατανάλωση βιομηχανοποιημένων παγωτών.

3 Η *L. monocytogenes* στα τρόφιμα

3.1 Γενικές συνθήκες επιβίωσης της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα

Η επιβίωση κάθε μικροοργανισμού εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος, στο οποίο αναπτύσσεται. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη αλλά και η επιβίωση της λιστέριας στα τρόφιμα βρίσκεται σε συνάρτηση αφενός με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε τροφίμου, όπως το pH και η περιεκτικότητα του σε νερό, και αφετέρου με τις συνθήκες συσκευασίας και αποθήκευσης (θερμοκρασία, υγρασία). Παράλληλα, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι διάφορες τεχνικές, που χρησιμοποιούνται κατά την επεξεργασία των τροφίμων, όπως η θερμική επεξεργασία (Agnelli & Mascheroni, 2001).

Το γεγονός ότι η λιστέρια ανήκει στα ψυχότροφα βακτήρια, της επιτρέπει να αναπτύσσεται ακόμη και σε θερμοκρασίες μικρότερες των 5 °C που αποτελούν την συνηθέστερη θερμοκρασία συντήρησης, με βέλτιστη ανάπτυξη σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (30 °C με 35 °C). Σε θερμοκρασίες μικρότερες από 5 °C ο μικροοργανισμός παρουσιάζει ακόμη τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού παρότι αυτή επιβραδύνεται αισθητά (Carpentier & Cerf, 2011). Ο χρόνος ανάπτυξης της λιστέριας σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας επιβραδύνεται και μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 30 ημέρες. Αντίθετα, η αύξηση της θερμοκρασίας επισπεύδει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού επιφέροντας μείωση τόσο του χρόνου προσαρμογής του όσο και του διπλασιασμού του. Ενδεικτικά, σε ζυμό κοτόπουλου βρέθηκε πως η διάρκεια της φάσης προσαρμογής στους 5 °C ήταν 2 ημέρες και μειώθηκε στη 1 ημέρα όταν η θερμοκρασία ανέβηκε στους 7,5 °C. Αντίστοιχα, ο χρόνος διχοτόμησης από 19 ώρες στους 5 °C μειώθηκε σε 9 ώρες στους 7,5 °C (Agnelli & Mascheroni, 2001). Όσο καθοριστική, όμως, και αν αποδεικνύεται η επίδραση της θερμοκρασίας για την ανάπτυξη του βακτηρίου, ο τελικός ρυθμός πολλαπλασιασμού του καθορίζεται και από άλλους παράγοντες, όπως το pH και την περιεκτικότητα των τροφίμων σε αλάτι. Εξάλλου, ο τελικός ρυθμός ανάπτυξης της λιστέριας επιβραδύνεται και από την

ανταγωνιστική παρουσία άλλων βακτηρίων, τα οποία εκκρίνουν βακτηριοσίνες (Nilsson et al., 2004).

Η επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας ή γ-ακτινοβολίας δε φαίνεται να επηρεάζει την επιβίωση της λιστέριας καθότι ανήκει στην ομάδα των θετικών Gram βακτηρίων, τα οποία εμφανίζονται ανθεκτικά στις ακτινοβολίες αυτές. Η ανθεκτικότητα που εμφανίζει έναντι της γ-ακτινοβολίας είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την ανθεκτικότητά της έναντι την υπεριώδους ακτινοβολίας (Huhtanen et al., 1989; Lee et al., 2005). Ο σχηματισμός ενδοσπορίων, ιδιότητα χαρακτηριστική αρκετών βακτηρίων προκειμένου να επιβιώσουν σε αντίξοες συνθήκες, αυξάνει την αντοχή του μικροοργανισμού στην υπεριώδη ακτινοβολία σε σύγκριση με τις βλαστικές μορφές του. Τα αφυδατωμένα κύτταρα των ενδοσπορίων με τα ανθεκτικά τοιχώματα παρουσιάζουν 3,5 με 4 φορές μεγαλύτερη ανθεκτικότητα, γεγονός που επιτρέπει την επιβίωση του μικροοργανισμού σε αντίξοες συνθήκες (Delincée, 2002).

Το μεγάλο εύρος τιμών του pH στις οποίες είναι εφικτή η επιβίωση της λιστέριας, αποτελεί ένα ακόμη πρόβλημα για τη βιομηχανία τροφίμων. Τα ανεκτά ως προς την επιβίωση όρια του pH κυμαίνονται από 4,4 μέχρι 9,4 με βέλτιστη τιμή το ουδέτερο pH 7,0. Σε θερμοκρασία ψύξης (5 °C) η λιστέρια μπορεί να επιβιώσει ακόμη και για περισσότερες από 90 ημέρες σε χυμό φρούτων με pH 5,8. Η αποθήκευση των τροφίμων σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες και η ταυτόχρονη μείωση του pH αποδυναμώνει την ανθεκτικότητα του βακτηρίου, με συνέπεια σε pH 3,6 το χρονικό διάστημα επιβίωσής του να φτάνει τις 20 ημέρες (Carpentier & Cerf, 2011). Η επαγωγή μηχανισμών οξεοανθεκτικότητας επιτρέπει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου σε όξινα τρόφιμα. Επίσης, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την μετέπειτα ικανότητα του να επιβιώνει κατά τη διέλευση του από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Ανάμεσα στους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται κατά την παραμονή του στο όξινο γαστρικό περιβάλλον ανήκουν η έκκριση πρωτεϊνών όπως η αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού οξέος και η απαμινάση της αργινίνης. Η ικανότητα αυτή καλείται **απόκριση σε όξινη καταπόνηση (Acid Tolerance Response, ATR)** και αποτελεί γνώρισμα και άλλων βακτηρίων. Η δυνατότητα της λιστέριας να αντέχει σε συνθήκες χαμηλού pH εξηγεί και την παρουσία της σε τροφές με χαμηλό pH, όπως για παράδειγμα το τυρί, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των γαλακτοκομικών προϊόντων με τιμές pH που κυμαίνονται μεταξύ 5,0 με 5,5. Η μεγάλη προσαρμοστικότητα που εκδηλώνει το μικρόβιο και η οξεοανθεκτικότητά του είναι επικίνδυνες για την ασφάλεια των τροφίμων με χαμηλό pH (Gandhi & Chikindas, 2007). Ακόμη, σε τρόφιμα με υψηλό ποσοστό λίπους ή πρωτεΐνης, ο μικροοργανισμός έχει μεγαλύτερες πιθανότητες να επιβιώσει κατά τη διέλευση του από το στομάχο καθώς μπορεί να παραμείνει εγκλωβισμένος μέσα στις υδροφοβικές ομάδες των λιπιδίων ή των πρωτεϊνών και ως εκ τούτου, να προστατευτεί διαφεύγοντας από το όξινο περιβάλλον του στομάχου (Agnelli & Mascheroni, 2001).

Καθοριστικό για την επιβίωση του παθογόνου φαίνεται να είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί, από τη μόλυνση του τροφίμου από λιστέρια μέχρι την κατανάλωση και την έκθεσή του στο γαστρικό υγρό του στομάχου. Συνεπώς όσο μεγαλύτερο είναι το χρονικό αυτό διάστημα τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα επιβίωσης του βακτηρίου στο γαστρικό περιβάλλον. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, κατά την εκθετική φάση του κύκλου ανάπτυξής του, ο μικροοργανισμός είναι πιο ευαίσθητος στην έκθεσή του σε αντίξοες συνθήκες, όπως το όξινο περιβάλλον, καθώς το μεγαλύτερο τμήμα της ενέργειάς του δαπανάται προκειμένου να πολλαπλασιαστεί. Κατά τη στατική φάση ανάπτυξης, όλη η ενέργειά του δαπανάται για την ενεργοποίηση μηχανισμών προσαρμογής, κατάλληλων για την επιβίωσή του. Συνεπώς είναι αρκετά πιθανό τα πιο ανθεκτικά βακτηριακά κύτταρα να διαπεράσουν το επιθήλιο του εντερικού σωλήνα και να εκδηλώσουν παθογόνο δράση (Cotter et al., 2001).

Όσον αφορά τα προϊόντα ζύμωσης κρέατος και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα οποία αποθηκεύονται σε συνθήκες ψύξης, κατάλληλη μέθοδο ελέγχου της ανάπτυξης του βακτηρίου, λόγω της ψυχότροφης φύσης του, αποτελεί η προσθήκη οξέων. (Domenech et al., 2007).

Γίνεται, λοιπόν, σαφές πως η ανάπτυξη και η επιβίωση της λιστέριας επηρεάζεται από ένα σύνολο παραγόντων με κυριότερους τη θερμοκρασία, το συντελεστή ενεργού ύδατος και το pH. Η ικανότητά του αυτή να αναπτύσσεται σε ένα τόσο ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και pH διευκολύνει, σε μεγάλο βαθμό, την επιβίωση του στο περιβάλλον επεξεργασίας των τροφίμων (Burlingame & Pineiro, 2007).

3.2 Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά επιβίωσης της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα

Η *L. monocytogenes* είναι ένα παθογόνο βακτήριο που χαρακτηρίζεται από δύο επιπρόσθετες ιδιότητες, οι οποίες καθορίζουν σημαντικά την επιβίωση της. Διαθέτει την ικανότητα να προσαρμόζεται ταχύτατα σε αντίξοες καταστάσεις (***stress response***) και τη δυνατότητα να σχηματίζει ***βιομεμβράνες (biofilms)***.

Σε αντίξοες συνθήκες περιβάλλοντος, όπως αρκετά χαμηλή ή υψηλή θερμοκρασία και υψηλό ή χαμηλό pH, ο μικροοργανισμός εκδηλώνει την ικανότητα να αποκρούει

την απειλή με την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών νικανώ να επιβιώνουν στις αντίξοες συνθήκες. Στο μεγάλο εύρος τιμών θερμοκρασίας, στο pH αλλά και σε άλλες συνθήκες ανάπτυξης του παθογόνου μικροβίου αποδίδεται η εξελικτική του πορεία και η ανάπτυξη στελεχών, ικανών να προσαρμόζονται στις εκάστοτε συνθήκες προκειμένου να επιβιώσουν. Η ικανότητα ανάκαμψης των κυττάρων του παθογόνου στα τρόφιμα σε αντίξοες συνθήκες συνιστά σοβαρή απειλή καθώς είναι δυνατόν να προκαλέσει την εκ νέου μόλυνση του τροφίμου με ακόμη πιο ανθεκτικά στελέχη, των οποίων η καταπολέμηση είναι σαφώς δυσκολότερη. Η δυνατότητα αυτή του μικροοργανισμού επηρεάζει αρκετά τον τρόπο διαχείρισης αλλά και ελέγχου της ασφάλειας των τροφίμων (Doyle et al., 2002). Ειδικότερα, το κρέας και τα σκευάσματά του, τα οποία έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας, δύναται να περικλείουν ανθεκτικά στελέχη του μικροβίου. Το ίδιο ισχύει και κατά την επεξεργασία τροφίμων, τα οποία διατηρούνται σε θερμαινόμενους δίσκους μέχρι την τελική τους θερμική επεξεργασία ή σε περίπτωση διακοπής της τελευταίας για τεχνικούς λόγους (Sergelidis & Abraham, 2009).

Κατά συνέπεια, η έκθεση του μικροβίου σε ήπιες μεθόδους αναστολής της ανάπτυξης του που εφαρμόζονται από τις βιομηχανίες τροφίμων, όπως η θέρμανση και η αύξηση της αλατότητας, επάγει σε αρκετές περιπτώσεις την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού σε αυτές. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη οξεοανθεκτικότητας μπορεί να συνοδεύεται από ταυτόχρονη αντοχή στην αύξηση ή στη μείωση της θερμοκρασίας ενώ έχει καταγραφεί και η παράλληλη αντοχή του στην παρουσία αιθανόλης και άλατος. Στην περίπτωση όμως της θερμικής καταπόνησης αυτή δε φαίνεται να μειώνει την ανθεκτικότητά του σε όξινες συνθήκες (Cotter et al., 2001).

Μια άλλη σημαντική ικανότητα της λιστέριας, η οποία απαντάται και σε άλλα είδη βακτηρίων είναι ο **σχηματισμός βιομεμβρανών**. Οι βιομεμβράνες είναι μια ομάδα κυττάρων τα οποία πολλαπλασιάζονται ως ομάδα, περιβαλλόμενα από ένα εξωτερικό περιβάλλον πολυσακχαρίτη (Gandhi & Chikindas, 2007). Η παρουσία του εξωτερικού περιβάλλοντος αλλά και η συγκέντρωση ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων αυξάνει την ανθεκτικότητα του μικροβίου σε εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Παράλληλα έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να επιβιώσει στη μορφή αυτή για μεγάλα χρονικά διαστήματα δίχως να τροφοδοτείται με θρεπτικά συστατικά καθώς μειώνονται οι μεταβολικοί του ρυθμοί (Colagiorgi et al., 2017). Ο σχηματισμός αποικιών αυτής της μορφής αποτελεί πηγή μόλυνσης των τροφίμων καθώς αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα επιβίωσης του μικροοργανισμού (Chae & Schraft, 2000; Piercey et al., 2017). Η ανάπτυξη των βιομεμβρανών από τα βακτήρια τους προσδίδει κάποια πλεονεκτήματα (Davey and O' Toole, 2000; Giaouris et al., 2014) όπως:

- Προστασία ενάντια σε εχθρικά περιβάλλοντα
- Διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και μεταβολική συνεργασία

- Απόκτηση νέων γενετικών χαρακτηριστικών

3.2.1 Προστασία σε εχθρικό περιβάλλον

Τα βακτηριακά κύτταρα, όταν βρίσκονται μέσα σε μία βιομεμβράνη, προστατεύονται από διάφορες εξωτερικές περιβαλλοντικές μεταβολές. Έτσι, ο σχηματισμός βιομεμβράνης παρέχει προστασία ενάντια σε πολλές περιβαλλοντικές προκλήσεις (environmental challenges), όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών (starvation) (Costerton, 1995), η έκθεση σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, η τοξικότητα μετάλλων (metal toxicity), η έκθεση σε οξέα, η αφυδάτωση, τα αντιβιοτικά (Borucki et al., 2003; Di Bonaventura et al., 2008; Smirnova et al., 2010; da Silva and De Martinis, 2011) και ποικίλους άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Mah and O'Toole, 2001).

3.2.2 Μεταβολική συνεργασία

Οι υψηλής διαπερατότητας δίοδοι ύδατος παρέχουν ένα αποτελεσματικό μέσο ανταλλαγής θρεπτικών συστατικών, αλλά και απομάκρυνσης τοξικών μεταβολικών προϊόντων (Costerton, 1995; Costerton et al., 1999). Η έλλειψη O_2 , όμως, οδηγεί στον σχηματισμό ανοξικών ζωνών, όπου τα ζυμωτικά βακτήρια είναι ενεργά, σχηματίζονται χαμηλού μοριακού βάρους οργανικά οξέα και CO_2 , συνθήκες οι οποίες ευνοούν τα αναγωγικά θειώδη βακτήρια και με αυτόν τον τρόπο υπάρχει διάβρωση της επιφάνειας προσκόλλησης (Poulsen, 1999). Το ίδιο υλικό μπορεί, επίσης, να δρα ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Για παράδειγμα, κύτταρα τα οποία βρίσκονται στο κέντρο της βιομεμβράνης εμφανίζουν χαμηλές απαιτήσεις σε O_2 , τα ζυμωτικά βακτήρια καταβολίζουν και παράγουν οξέα και αλκοόλες που εύκολα χρησιμοποιούν τα οξυγενή βακτήρια. Επίσης, υπό κανονικές συνθήκες, τα βακτηριακά κύτταρα δεν είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν το δικό τους εξωκυτταρικό πολυμερές υλικό, αλλά μέσα σε βιομεμβράνες αποτελούμενες από πολλά είδη (mixed-species biofilms), μερικά βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιήσουν τις εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες που άλλα βακτήρια παρήγαγαν, παρέχοντας έτσι ευκαιρία για διασταυρούμενη θρέψη (cross-feeding) (Costerton, 1995; James et al., 1995; Sutherland, 2001 a, b).

3.2.3 Απόκτηση νέων γενετικών συμπεριφορών

Η οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού (horizontal gene transfer) είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία για την γενετική ποικιλομορφία. Αυξάνει την μεταβολική και φυσιολογική απόδοση των βιοϋμενικών κυττάρων μέσω της μεταφοράς γονιδίων με σύζευξη (conjugation), ενώ διάφορα πλασμίδια επηρεάζουν την βακτηριακή αύξηση (Mah and O'Toole, 2001).

3.2.4. Πρόληψη, έλεγχος, αφαίρεση και εξάλειψη των βιομεμβρανών στη βιομηχανία τροφίμων

Η απολύμανση ή και η καταστροφή των βιομεμβρανών μπορεί να γίνει είτε με χημική, είτε με φυσική επεξεργασία ή με συνδυασμό και των δύο μεθόδων. Ο πρωταρχικός στόχος μιας διαδικασίας καθαρισμού είναι η αφαίρεση υπολειμμάτων προϊόντων. Έμμεσα, η αφαίρεση αυτών των υπολειμμάτων είναι επίσης ένα πρώτο κρίσιμο σημείο στην αφαίρεση, τη θανάτωση και τον έλεγχο των βιομεμβρανών. Επαρκείς μέθοδοι που διασπούν και αφαιρούν το προϊόν που έχει εναποτεθεί στην επιφάνεια επαφής καθώς και η υπάρχουσα μήτρα βιομεμβράνης είναι σημαντικές για τη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων (Zottola and Sasahara, 1994), επειδή η ατελής απομάκρυνση διευκολύνει την επανασύνδεση της *L. monocytogenes* στην επιφάνεια και το σχηματισμό μιας νέας βιομεμβράνης (Gibson et al., 1999). Επιπλέον, τα απολυμαντικά είναι λιγότερο αποτελεσματικά όταν υπάρχουν σωματίδια τροφίμων ή ακαθαρσίες στις επιφάνειες (Holah, 1990; Sinde and Carballo, 2000). Οι συνήθεις μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων, όπως ο καθαρισμός βασιζόμενος σε αλκάλια και με βάση το οξύ, είναι επαρκείς μόνο για την αφαίρεση του εξωκυτταρικού πολυμερούς της βιομεμβράνης όταν συνοδεύεται από κατάλληλες συνθέσεις, συγκεντρώσεις, χρόνο, θερμοκρασία και κινητική ενέργεια (ροή) (Parkar et al., 2004; Antoniou and Frank, 2005). Στην βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιείται ευρύ φάσμα χημικών απολυμαντικών, τα οποία μπορούν να χωριστούν σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους: i) οξειδωτικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των ενώσεων με βάση το χλώριο, υπεροξείδιο του υδρογόνου, όζον, ii) δραστικές ενώσεις που περιλαμβάνουν ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου και ανιονικές ενώσεις οξέων και iii) ιωδοφόρα. Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης επηρεάζεται από το pH, τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση, τον χρόνο επαφής και τις παρεμποδιστικές οργανικές ουσίες όπως τα σωματίδια τροφίμων και οι ρύποι (Holah, 1992; Mosteller and Bishop, 1993).

Η αφαίρεση των βιομεμβρανών διευκολύνεται επίσης σημαντικά με την εφαρμογή μηχανικής δύναμης (όπως βούρτσισμα και τρίψιμο) στην επιφάνεια κατά τον καθαρισμό (Wirtanen et al., 1996). Οι Sadoudi et al. (1997) έδειξαν ότι οι παλμικές ακτίνες λέιζερ θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική μέθοδος καθαρισμού για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου στις επιφάνειες. Ωστόσο, αν και αποτελεσματική, η απομάκρυνση είχε ως αποτέλεσμα τη μεταφορά βακτηρίων στον αέρα με τη μορφή αερολύματος, και ως εκ τούτου θα ήταν αναγκαία πρόσθετα μέτρα για την πρόληψη της εξάπλωσης των επιβιωσάντων βακτηρίων. Αυτός είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους η χρήση ψεκασμών υψηλής πίεσης έχει αντικατασταθεί από καθαρισμό με αφρό ή πηκτή.

Έχει αποδειχθεί ότι η *L. monocytogenes* μπορεί να εγκατασταθεί και να παραμείνει σε αποχετεύσεις δαπέδων. Επομένως, οι αποχετεύσεις πρέπει να καθαρίζονται και να απολυμαίνονται κατά τρόπο που να αποφεύγεται η μόλυνση άλλων επιφανειών του περιβάλλοντος επεξεργασίας. Τα σκεύη για τον καθαρισμό των αποχετευτικών αγωγών θα πρέπει να διακρίνονται εύκολα και να είναι αφιερωμένα στο σκοπό αυτό ελαχιστοποιώντας τις πιθανότητες μόλυνσης. Παράλληλα, οι εργαζόμενοι οι οποίοι καθαρίζουν αποχετεύσεις θα πρέπει να αλλάζουν τα ρούχα τους και να απολυμαίνονται προτού έρθουν σε επαφή με τις επιφάνειες επαφής με τα τρόφιμα.

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό, π.χ. βούρτσες γενικής χρήσης, βούρτσες μπουκαλιών, σφουγγαρίστρες, πλυντήρια δαπέδων και ηλεκτρικές σκούπες θα πρέπει να διατηρούνται και να καθαρίζονται έτσι ώστε να μην αποτελούν πηγή μόλυνσης. Ο εξοπλισμός πρέπει να είναι αφιερωμένος είτε στις μη καθαρές περιοχές είτε στις καθαρές και να διακρίνεται εύκολα (π.χ. κωδικοποιημένα εργαλεία καθαρισμού, διαφορετικά χρώματα κλπ).

4 Έλεγχος της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα

4.1 Σημασία του ελέγχου της *L. monocytogenes*

Η βιομηχανία τροφίμων αντιλαμβάνομενη την απειλή της ασφάλειας των τροφίμων από την *L. monocytogenes* ανέπτυξε μια σειρά μεθόδων επεξεργασίας αλλά και χειρισμού των τροφίμων με στόχο την καταστροφή και τον έλεγχο της ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού. Παρά το γεγονός ότι εφαρμόζονται αρκετές και ποικίλες μέθοδοι και τεχνικές, η οριστική εξόντωση του βακτηρίου φαίνεται να είναι εφικτή αποκλειστικά με τη θερμική επεξεργασία και με την εφαρμογή ακτινοβολίας. Η εφαρμογή της τελευταίας δεν επιτρέπεται σε χώρες της Ευρώπης, πλην ελαχίστων εξαιρέσεων, όπως στη Γαλλία. Οι τεχνικές αυτές είναι εξίσου αποτελεσματικές στην εξουδετέρωση και άλλων παθογόνων μικροβίων και για το λόγο αυτό επιλέγονται στο μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων. Οι υπόλοιπες μέθοδοι δεν φαίνεται να είναι ικανές να αποδώσουν τα ίδια αποτελέσματα και ως εκ τούτου δεν θεωρούνται από μόνες τους επαρκείς για τον έλεγχο της ανάπτυξης της λιστέριας στα τρόφιμα. Συχνά όμως χρησιμοποιούνται ως επιμέρους συμπληρωματικές τεχνικές ελέγχου (Bennion et al., 2008).

Σε μεγάλο βαθμό οι βιομηχανίες τροφίμων εφαρμόζουν την *τεχνολογία εμποδίων* σύμφωνα με την οποία λαμβάνονται ταυτόχρονα διαφορετικά μέτρα σε συνδυασμό το ένα με το άλλο. Κάθε μέτρο αποτελεί από μόνο του ένα εμπόδιο στην ανάπτυξη του βακτηρίου είτε σε μεγάλο είτε σε μικρότερο βαθμό. Ο συνδυασμός ενός μεγάλου αριθμού αυτών επιτρέπει στις βιομηχανίες να εξασφαλίζουν την ασφάλεια των τροφίμων (Tolvanen et al., 2009). Τα μέτρα που μπορούν να εφαρμοστούν αφορούν τη θερμοκρασία, όπως γίνεται με τη θερμική επεξεργασία, την οξύτητα, όπως συμβαίνει με τη διατήρηση τροφίμων σε ξύδι, ή την προσθήκη άλλων παραγόντων, όπως για παράδειγμα αλάτι ή ζάχαρη, που επιφέρουν τη μείωση του συντελεστή ενεργού ύδατος (a_w) (Huss et al., 2000).

Σε περιπτώσεις που απαιτούνται ήπιες μέθοδοι για την επεξεργασία των τροφίμων, με τη συνδυαστική χρήση διαφορετικών μέτρων επιτυγχάνεται όχι μόνο ο έλεγχος της λιστέριας αλλά και η ικανοποίηση πελατών που επιθυμούν να καταναλώσουν τρόφιμα ελαφρώς επεξεργασμένα. Η χρήση συνδυασμού μεθόδων είναι πολύ συχνή κυρίως στο προσυσκευασμένο χοιρινό κρέας, το οποίο υπόκειται σε θερμική επεξεργασία, ψύχεται και τέλος συσκευάζεται σε συσκευασία Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας (MAP, Modified Atmosphere Package) (Lee et al., 2005).

Εξίσου σημαντική κρίνεται και η πρόληψη αναμόλυνσης των τροφίμων κατά την επεξεργασία τους, όπως στη περίπτωση των βραστών αλλαντικών που τεμαχίζονται και συσκευάζονται σε κενό. Ο έλεγχος των περιβαλλοντικών συνθηκών επιβάλλεται να είναι αυστηρός ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο η πιθανότητα ανάπτυξης νέων εστιών μόλυνσης, γεγονός το οποίο αποτελεί πρόκληση για τη βιομηχανία τροφίμων (Huss et al., 2000).

Για τον αποτελεσματικό έλεγχο της παρουσίας της λιστέριας στα τρόφιμα οι βιομηχανίες τροφίμων λαμβάνουν μέτρα που αφορούν: την αποφυγή της μόλυνσης των τροφίμων από το μικρόβιο, την επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού του και την οριστική εξουδετέρωση του στην περίπτωση που το τρόφιμο έχει ήδη μολυνθεί (Jahncke et al., 2004).

Με εξαίρεση τα τρόφιμα που δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, τα υπόλοιπα επιβάλλεται να υπόκεινται σε συνεχή έλεγχο. Τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση, τα οποία δεν ευνοούν τον πολλαπλασιασμό της λιστέριας είναι όσα εμφανίζουν ιδιαίτερα χαμηλές τιμές pH και a_w και προφανώς δεν αποτελούν κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών σύμφωνα με τους κανονισμούς ασφάλειας τροφίμων που ισχύουν.

Συγκεκριμένα, ως προς τις τιμές του pH, έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες έρευνες για να προσδιορίσουν τις τιμές στις οποίες επιτρέπεται η ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Το εύρος της ελάχιστης τιμής κυμαίνεται μεταξύ pH 4,0 και pH 4,4. Κάτω από αυτές τις τιμές τα κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν αλλά όχι να πολλαπλασιαστούν. Η μεγαλύτερη ανάπτυξη του βακτηρίου παρατηρείται σε τιμές μεταξύ pH 6 και pH 8.

Σχετικά με τον a_w , η ανάπτυξη παρατηρείται σε ένα εύρος ελάχιστων τιμών μεταξύ 0,90 και 0,97 ανάλογα με το στέλεχος της *L. monocytogenes*. Σημαντικό ρόλο για την επίδραση αυτού του παράγοντα έχει η εκάστοτε ουσία που χρησιμοποιείται για τη ρύθμισή του και η σύσταση του υποστρώματος.

Στην κατηγορία των τροφίμων, τα οποία κρίνονται ασφαλή προς κατανάλωση περιλαμβάνονται και εκείνα που έχουν καταψυχθεί και στη συνέχεια χρειάζονται θερμική επεξεργασία (μαγείρεμα) ώστε να καταναλωθούν. Επίσης, στην ίδια κατηγορία ανήκουν τρόφιμα που καταναλώνονται από βρέφη και νήπια, τα οποία συσκευάζονται ενώ είναι ζεστά σε αποστειρωμένους περιέκτες και, τέλος, κονσερβοποιημένα τρόφιμα που έχουν υποβληθεί σε ήπια αποστείρωση (η οποία

πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες μέχρι 90 °C) ή προσφέρονται προς κατανάλωση ήδη μαγειρεμένα (Doyle et al., 2002).

Ο πλέον αξιόπιστος τρόπος αξιολόγησης της συμπεριφοράς της λιστέριας στα ΕΚΤ, είναι η διεξαγωγή πειραμάτων πρόκλησης (challenge tests), τα οποία εφαρμόζονται σε διάφορα στάδια της επεξεργασίας όπως η θερμική επεξεργασία ή άλλη διαδικασία ελέγχου της. Ειδικότερα, εφαρμόζονται κατά τον τεμαχισμό, τη συσκευασία και τη συντήρηση των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων (Jahncke et al., 2004). Σημαντικό βοηθητικό μέσο αποτελεί η χρήση μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης, τα οποία αποτυπώνουν τη συμπεριφορά του παθογόνου σε συνάρτηση με το περιβάλλον παρουσίας του, δηλαδή με τα ενδογενή φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε τροφίμου καθώς και τα εξωγενή όπως η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα συντήρησης του. Ως φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ενός τροφίμου ορίζονται μεταξύ άλλων η παρουσία συντηρητικών, η συγκέντρωση άλατος, το pH και ο a_w (Arthur, 2002). Τέτοια προγνωστικά μοντέλα είναι διαθέσιμα στο διαδίκτυο.

Τα ανωτέρω προγνωστικά μοντέλα, δεν κρίνονται απόλυτα ασφαλή για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη συμπεριφορά και τον έλεγχο της λιστέριας σε ένα συγκεκριμένο τρόφιμο. Η διαπίστωση αυτή προκύπτει από το γεγονός ότι ο έλεγχος μέσω πειραμάτων πρόκλησης καθώς και τα εξαγόμενα από αυτόν συμπεράσματα αφορούν μία συγκεκριμένη παρτίδα τροφίμων, στην οποία πραγματοποιήθηκε, καθώς και τις συγκεκριμένες συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος. Συνεπώς, δεν είναι ασφαλές να θεωρηθεί ότι τα εξαγόμενα συμπεράσματα ισχύουν και για τις υπόλοιπες παρτίδες του ίδιου τροφίμου. Κύρια αιτία είναι οι σημαντικές διαφοροποιήσεις στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά από παρτίδα σε παρτίδα (McMeekin et al., 2006).

Τέλος, με ελάχιστες εξαιρέσεις, τα περισσότερα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης, τα οποία εφαρμόζονται τα τελευταία χρόνια, έχουν σχεδιαστεί έχοντας ως βάση πειραματικά δεδομένα. Αυτά προέκυψαν από εργαστηριακά πειράματα που διεξήχθησαν σε μικροβιολογικά υποστρώματα και όχι σε ένα πραγματικό περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων και υπό τις αντικειμενικά υπάρχουσες συνθήκες παραγωγής και συντήρησής τους. Ανάμεσα σε αυτές ανήκουν η παρουσία και άλλων ειδών μικροοργανισμών στο τρόφιμο (μικροβιακή χλωρίδα), τα οποία πιθανότατα να λειτουργούν ανταγωνιστικά στην παρουσία και στην ανάπτυξη της λιστέριας, καθώς και τα ίδια φυσικά συστατικά του τροφίμου, τα οποία παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση. Για το λόγο αυτό συχνά τα μοντέλα αυτά τείνουν να υπερεκτιμούν την ικανότητα της λιστέριας να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Burlingame & Pineiro, 2007).

Πρόβλημα επίσης στην εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων αποτελεί και η αδυναμία εξασφάλισης σταθερών ή αναμενόμενων θερμοκρασιών συντήρησης κατά την

αποθήκευση και τη μεταφορά των τροφίμων από τις βιομηχανίες παραγωγής στα σημεία λιανικής πώλησης (Miettinen et al., 2001). Ακόμη, η μετέπειτα συντήρηση των τροφών από τους ίδιους τους καταναλωτές σε οικιακό επίπεδο επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα σε ότι αφορά την τελική ασφάλεια των προς κατανάλωση τροφίμων (Tomrkin, 2002).

4.2 Νομοθετικό πλαίσιο του ελέγχου της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα

Η Ευρωπαϊκή Ένωση με τη θέσπιση του Κανονισμού 2073/2005, προσδιορίζει τα κριτήρια που πρέπει να πληρούνται ώστε να θεωρηθεί ασφαλές ένα τρόφιμο προς κατανάλωση. Ως μικροβιολογικά κριτήρια ορίζονται οι προϋποθέσεις εκείνες που επιβάλλεται να ικανοποιούνται και οι οποίες καθορίζουν το βαθμό στον οποίο ένα τρόφιμο ή μια διαδικασία επεξεργασίας τροφίμου θεωρείται ασφαλής και αποδεκτή. Οι προϋποθέσεις αυτές πληρούνται στην απόλυτη απουσία των μικροβίων ή σε περίπτωση παρουσίας τους, στον αριθμό των μικροβίων ή στη συγκέντρωση των παραγόμενων τοξινών ανά γραμμάριο ή χιλιοστόλιτρο του προϊόντος. Μεταξύ των μικροβιολογικών κριτηρίων υγιεινής και ασφάλειας, που θεσπίστηκαν βάσει του ανωτέρω κανονισμού, είναι και αυτά που αφορούν στην *L. monocytogenes*. Οι κανονισμοί που αφορούν στην υγιεινή και την ασφάλεια των τροφίμων, παρέχουν σαφείς οδηγίες σε ό,τι αφορά τις διαδικασίες παραγωγής, επεξεργασίας, συσκευασίας και διανομής των τροφίμων (Burlingame & Pineiro, 2007).

Τα διαθέσιμα προς κατανάλωση τρόφιμα κρίνονται ασφαλή, εφόσον εφαρμόζονται πιστά πρακτικές και διαδικασίες, οι οποίες επιτυγχάνουν τα προβλεπόμενα κριτήρια υγιεινής. Η ασφάλειά τους καθορίζεται από την σαφή ανάλυση των κινδύνων και των απαιτούμενων σημείων ελέγχου των διαδικασιών. Τόσο τα μικροβιολογικά κριτήρια όσο και τα κριτήρια ελέγχου των διαδικασιών που ακολουθούνται στηρίζονται στο σύστημα HACCP αλλά και σε άλλα συστήματα ελέγχου των συνθηκών υγιεινής (Arthur, 2002).

Σύμφωνα με τον Κανονισμό 2073/2005, σε ότι αφορά την *L. monocytogenes*, τα μικροβιολογικά κριτήρια που πρέπει να πληρούνται είναι τα ακόλουθα:

- Σε ότι αφορά τα τρόφιμα που προορίζονται για κατανάλωση από βρέφη και νήπια ή για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς, επιβάλλεται να εξασφαλίζεται πλήρως η απουσία της λιστέριας ανά 25 γραμμάρια του τροφίμου. Ο λόγος

της αυστηρής τήρησης των ορίων αυτών είναι απολύτως κατανοητός δεδομένης της ευπάθειας των ατόμων, από τα οποία πρόκειται να καταναλωθούν. Το κριτήριο της πλήρους απουσίας της λιστέριας θα πρέπει να υφίσταται μέχρι την τελική ημερομηνία διάθεσης του προϊόντος στην αγορά. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται προκειμένου να επιτευχθεί η πλήρης απουσία του βακτηρίου δεν είναι εφικτό να εφαρμοστούν και για τις υπόλοιπες κατηγορίες τροφίμων. Γι' αυτό τα όρια παρουσίας της *L. monocytogenes* σε αυτές είναι πιο ελαστικά δεδομένου ότι προορίζονται προς κατανάλωση από λιγότερο ευπαθείς ομάδες.

- Σε ό,τι αφορά τρόφιμα που δεν προορίζονται για κατανάλωση από βρέφη και νήπια, ούτε ικανοποιούν ιατρικούς σκοπούς, τα αποδεκτά ανώτατα όρια παρουσίας της *L. monocytogenes* είναι 100 κύτταρα ανά γραμμάριο προϊόντος κατά το χρόνο διάθεσής του στην αγορά και μέχρι τη λήξη του αναφερόμενου χρόνου συντήρησης του καθώς και η απουσία της ανά 25 γραμμάρια του τροφίμου, πριν αυτό αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του παραγωγού. Για να επιτευχθεί το όριο αυτό θα πρέπει κατά τις ενδιάμεσες διαδικασίες επεξεργασίας να ορισθούν πιο χαμηλά όρια παρουσίας του μικροβίου, τα οποία θα εγγυώνται τη μη υπέρβαση του προβλεπόμενου ορίου στο τέλος της διαδικασίας συντήρησης (Huss et al., 2000).
- Σχετικά με τα τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση τα οποία δεν μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, επιβάλλεται η συγκέντρωση των κυττάρων να είναι μικρότερη των 100 cfu/g κατά το χρόνο διάθεσής τους στην αγορά.

Οι Ευρωπαϊκές χώρες ακολουθούν πιστά τον Κανονισμό 2073/2005 και επιβάλλουν την τήρηση των αποδεκτών ορίων στις βιομηχανίες παραγωγής τροφίμων. Ακόμη και πριν από τη θέσπιση του ανωτέρω Κανονισμού, ήδη είχε γίνει εμφανές πως η παρουσία περισσότερων από 100 cfu/g της *L. monocytogenes* είναι απαγορευτική και πως τα τρόφιμα, στα οποία έχουν εντοπιστεί μεγαλύτερες τιμές συνήθως υποβάλλονται και πάλι σε επεξεργασία ή σε κάποιες περιπτώσεις αποσύρονται από την κατανάλωση (Mackey & Bratcell, 2009).

Σε αντίθεση με την ΕΕ, στις χώρες της Ασίας δεν έχουν θεσπιστεί ακόμη κανονισμοί σχετικά με τα αποδεκτά όρια παρουσίας της λιστέριας ανά γραμμάριο τροφίμου, γεγονός που αποτελεί σαφή απειλή για την υγεία του καταναλωτικού κοινού (Miettinen et al., 2001). Στις ΗΠΑ και την Αυστραλία τα αποδεκτά όρια είναι ακόμη πιο αυστηρά σε σύγκριση με τις Ευρωπαϊκές χώρες και απαιτείται η απόλυτη απουσία της *L. monocytogenes* ανά 25 γραμμάρια του τροφίμου. Παράλληλα με την πλήρη απουσία του μικροβίου στο τελικό προϊόν, επιβάλλεται και η απουσία εντοπισμού του σε επιφάνειες με τις οποίες έρχεται σε επαφή το τρόφιμο κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας του. Στην περίπτωση που κάποια επιφάνεια στην αλυσίδα επεξεργασίας εντοπιστεί θετική στην παρουσία της λιστέριας, τότε το

σύνολο των τροφίμων τα οποία ήρθαν σε επαφή με αυτή κρίνονται μολυσμένα και θα πρέπει να υποβληθούν σε νέα διαδικασία επεξεργασίας (Bennion et al., 2008).

Στον Καναδά εφαρμόζεται ένα νομοθετικό πλαίσιο μεικτής πολιτικής σύμφωνα με το οποίο σε κάποιες κατηγορίες τροφίμων επιβάλλεται η πλήρης απουσία της *L. monocytogenes* ανά 25 γραμμάρια προϊόντος ενώ σε άλλες κατηγορίες είναι αποδεκτή η παρουσία πληθυσμών του μικροβίου σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 100 cfu/g τροφίμου. Τα κριτήρια τήρησης των ανωτέρω ορίων καθορίζονται από την ιδιότητα των τροφίμων να ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου καθώς και από την δυνατότητα αποθήκευσής τους για μεγάλο χρονικό διάστημα. Στην κατηγορία των τροφίμων, τα οποία θεωρούνται χαμηλού κινδύνου, περιλαμβάνονται εκείνα τα οποία δεν ευνοούν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και είναι τρόφιμα με χαμηλό pH και χαμηλό a_w . Επίσης περιλαμβάνονται τρόφιμα τα οποία προσφέρονται προς πώληση κατεψυγμένα και ακολούθως θα πρέπει να υποστούν επαρκή θερμική επεξεργασία για να καταναλωθούν, τρόφιμα, τα οποία επεξεργάζονται θερμικά μέσα στους περιέκτες πώλησης τους και τρόφιμα, τα οποία συσκευάζονται σε υψηλές θερμοκρασίες οι οποίες δεν επιτρέπουν την επιβίωση του μικροβίου (Meyer, 2006).

Βασικό μειονέκτημα στη διαδικασία ελέγχου των τροφίμων αποτελεί το γεγονός ότι ο έλεγχος πραγματοποιείται με τυχαία δειγματοληψία και συνεπώς μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα που να αφορούν το σύνολο της παρτίδας του προϊόντος (Huss et al., 2000).

4.3 Διαχείριση ασφάλειας τροφίμων (HACCP)

Ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης της τροφιμογενούς λιστερίωσης είναι η πρόληψη. Το 2001 και το 2003, η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA), το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) και το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ (U.S. Department of Agriculture, USDA) δημοσίευσαν ένα εθνικό σχέδιο δράσης για το παθογόνο βακτήριο *Listeria* (*Listeria* Action Plan), ώστε να βοηθηθούν οι προσπάθειες οδηγίων ελέγχου που πραγματοποιούνταν από τη βιομηχανία, τις ρυθμιστικές αρχές και τις αρχές δημόσιας υγείας (Painter και Slutsker, 2007). Ο έλεγχος της *L. monocytogenes* για πολλά έτοιμα για κατανάλωση προϊόντα συνήθως απαιτεί αυστηρή εφαρμογή καλής πρακτικής υγιεινής και άλλα υποστηρικτικά

προγράμματα. Αυτά τα προαπαιτούμενα προγράμματα, μαζί με το HACCP παρέχουν ένα επιτυχημένο πλαίσιο για τον έλεγχο της *L. monocytogenes*.

Τα εν λόγω σχέδια αναφέρονταν σε πολλαπλά σημεία δράσης, συμπεριλαμβανομένης της κανονιστικής οδηγίας για την παραγωγή των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων. Οι αρχές του προγράμματος HACCP (Hazard Analysis – Critical Control Points, Ανάλυση Κινδύνων – Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου) επιβάλλεται δια νόμου να εφαρμόζονται από όλες τις βιομηχανίες τροφίμων και σε όλα τα στάδια χειρισμών και επεξεργασίας τους (παραγωγή, συσκευασία, διανομή) ώστε να επιτυγχάνεται το προβλεπόμενο όριο ασφάλειας των προς κατανάλωση τροφίμων. Πρόκειται για ένα σύστημα διαχείρισης που επιβάλλεται να εφαρμόζεται από επιχειρήσεις, οι οποίες σχετίζονται καθ' οιονδήποτε τρόπο με τα τρόφιμα (παραγωγή, διανομή, εστίαση κ.ο.κ). Αποσκοπεί στην αναγνώριση, εκτίμηση και στον έλεγχο των κινδύνων που ελλοχεύουν στα τρόφιμα, οι οποίοι δύναται να είναι βιολογικοί (ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών στο τρόφιμο όπως τα βακτήρια και οι ιοί), χημικοί (χημικές ουσίες που βρίσκονται ή προστίθενται στα τρόφιμα όπως φυτοφάρμακα, χρωστικές, ιχθυοτοξίνες κ.α.) ή φυσικοί κίνδυνοι (ξένα σωματίδια που προέρχονται από εγκαταστάσεις, εξοπλισμό, εργαζομένους κ.ο.κ όπως γυαλί, ύφασμα, τρίχες κ.α.). Το πρόγραμμα HACCP αποτελεί πρακτικά μια συστηματική προσέγγιση, η οποία αποσκοπεί στην καταγραφή των πιθανών κινδύνων μόλυνσης καθώς και στον έλεγχο και τον περιορισμό τους (Djekic et al., 2016). Στην περίπτωση που εφαρμόζεται συστηματικά και ορθά μπορεί ακόμη και να εξαλείψει την πιθανότητα μόλυνσης του τροφίμου (Strohben et al., 2004).

Το σύστημα HACCP για πρώτη φορά εφαρμόστηκε στις ΗΠΑ στα τέλη της δεκαετίας του 1960. Αποσκοπούσε στον έλεγχο της ασφάλειας των τροφίμων που θα τροφοδοτούσαν το πρόγραμμα αεροναυπηγικής της ΝΑΣΑ (Gardner, 1997). Στη συνέχεια αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε και σε άλλους τομείς, όπως στην ασφαλή επεξεργασία κονσερβοποιημένων τροφίμων με χαμηλή οξύτητα. Μετά από τις δοκιμές αυτές ήταν αναμενόμενο επακόλουθο η επιβολή της εφαρμογής του συστήματος σε παγκόσμια κλίμακα και σε κάθε τομέα της βιομηχανίας παραγωγής τροφίμων (Griffith, 2006).

Οι επιχειρήσεις θα πρέπει σε κάθε στάδιο επεξεργασίας των τροφίμων να ακολουθούν πιστά τις κατευθυντήριες οδηγίες και αρχές που διέπουν το σύστημα HACCP, οι οποίες αναλύονται ως εξής (ΕΚ αρ. 852/2004):

- Αρχή 1^η: Προσδιορισμός πιθανών κινδύνων και ανάλυση επικινδυνότητας
- Αρχή 2^η: Καθορισμός των κρίσιμων σημείων ελέγχου (Critical Control Point-CCP)
- Αρχή 3^η: Καθορισμός κρίσιμων σημείων (Critical Limits-CL) για κάθε CCP

- Αρχή 4^η: Ανάπτυξη συστήματος παρακολούθησης των CCPs
- Αρχή 5^η: Καθορισμός διορθωτικών ενεργειών σε περίπτωση απόκλισης από CL
- Αρχή 6^η: Εγκατάσταση συστήματος τεκμηρίωσης και αρχειοθέτησης
- Αρχή 7^η: Εγκατάσταση συστήματος επαλήθευσης της αποτελεσματικότητας του συστήματος HACCP.

Ο έλεγχος της *L. monocytogenes* απαιτείται σε όλα τα στάδια της αλυσίδας παραγωγής τροφίμων και συνιστά μια ολοκληρωμένη προσέγγιση για την πρόληψη της παρουσίας και του πολλαπλασιασμού αυτού του βακτηρίου στο τελικό προϊόν διατροφής. Οι προκλήσεις για τον έλεγχο της *L. monocytogenes* είναι σημαντικές, δεδομένης της γενικευμένης φύσης τους, της υψηλής αντοχής στις συνήθεις μεθόδους συντήρησης, όπως η χρήση αλατιού, καπνού ή όξινης κατάστασης στα τρόφιμα και η ικανότητά της να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψύξης (World Health Organization, 2018).

Για τους ανωτέρω λόγους κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή και τήρηση κάποιων προαπαιτούμενων όπως ορίζονται στις οδηγίες εφαρμογής του συστήματος HACCP: υποδομή των βιομηχανιών (εγκαταστάσεις, εξοπλισμός, απεντόμωση, μυοκτονία, συντήρηση εξοπλισμού), εκπαίδευση του προσωπικού (ρουχισμός, διασταυρούμενη επιμόλυνση, καθαριότητα), Ορθή Υγιεινή Πρακτική (Good Hygiene Practises-GHP) και Ορθή Βιομηχανική Πρακτική (Good Manufacturing Practises-GMP) (ΕΚ. αρ. 852/2004; Nakamura et al., 2004).

Πέρα από το γεγονός ότι η εφαρμογή ενός συστήματος HACCP αποτελεί νομική υποχρέωση των βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων, αποτελεί επίσης ένα σύστημα διαχείρισης και ανάπτυξης τους και ένα πολύτιμο προληπτικό εργαλείο για την διασφάλιση της ποιότητας, της υγιεινής και της ασφάλειας των παραγόμενων προϊόντων. Η αυστηρή εφαρμογή του συστήματος αυτού κατοχυρώνει την παροχή προϊόντων υψηλών προδιαγραφών ασφάλειας στο καταναλωτικό κοινό.

4.4 Τρόποι ελέγχου αλλά και διαχείρισης της μόλυνσης των τροφίμων από την *L. monocytogenes*

Προκειμένου να ελεγχθεί η παρουσία της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα επιδιώκεται αρχικά η αποφυγή μόλυνσης τους. Σε περίπτωση όμως μόλυνσης, επιδιώκεται είτε η εξουδετέρωση του παθογόνου είτε η επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού του σε αυτά. Η ολοένα αυξανόμενη προτίμηση του καταναλωτικού κοινού για τρόφιμα απαλλαγμένα από συντηρητικά υπαγορεύει την μείωση χημικών πρόσθετων. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι ελέγχου και διαχείρισης των τροφίμων βασιζόμενες στα ιδιαίτερα βιοχημικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου. Επίσης έχουν αναπτυχθεί και συνδυασμοί των μεθόδων αυτών, οι οποίοι οδηγούν στην εισαγωγή νέων διεργασιών, στη βελτιστοποίηση των συστημάτων επεξεργασίας καθώς και στην εξασφάλιση της απόλυτης υγιεινής των τροφίμων με τον καλύτερο δυνατό τρόπο (Arthur, 2002).

4.4.1 Θερμική επεξεργασία

Αποτελεί μια από τις κυριότερες διαδικασίες που εφαρμόζονται στα ΕΚΤ. Στις περισσότερες περιπτώσεις πρόκειται για μια ήπια θερμική επεξεργασία γνωστή και ως παστερίωση, η οποία θανατώνει τα βλαστικά κύτταρα των παθογόνων βακτηρίων. Κατά συνέπεια το ολικό μικροβιακό φορτίο ελαττώνεται σε ασφαλή επίπεδα ενώ η ταυτόχρονη μείωση των συγκεντρώσεων αλλοιογόνων μικροοργανισμών προκαλεί την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής του τροφίμου.

Ειδικότερα για τα προϊόντα κρέατος η θερμική επεξεργασία (βρασμός, ψήσιμο κ.τ.λ.) αποτελεί μια μέθοδο, κατά την οποία η θερμοκρασία στο εσωτερικό τους (στον πυρήνα τους) ξεπερνά τους 70 °C (McMinn et al., 2018). Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται σε ικανοποιητικό βαθμό η μείωση των ζωντανών στελεχών της *L. monocytogenes* και σε ασφαλή για την υγεία επίπεδα. Αποτελεί την αποτελεσματικότερη μέθοδο καταστροφής και αδρανοποίησης των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα (Li et al., 2017). Κάθε μονάδα παραγωγής επιβάλλεται να επιβλέπει τα κρίσιμα σημεία ελέγχου σε κάθε στάδιο της παραγωγικής δραστηριότητας και εφόσον εντοπισθούν συνθήκες ευνοϊκές για την εμφάνιση κινδύνου, έχει καθήκον να προβαίνει στις κατάλληλες για την εξάλειψή του διορθωτικές ενέργειες. Σε αυτό συμβάλλει η τήρηση όλων των προαπαιτούμενων

προγραμμάτων του συστήματος HACCP (κτιριακή υποδομή, εκπαίδευση προσωπικού, μέτρα για αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης κ.ο.κ).

4.4.2 Εφαρμογή ιονίζουσας ακτινοβολίας

Η δράση της ιονίζουσας ακτινοβολίας έγκειται στη δυνατότητά της να επηρεάζει άμεσα την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αλληλεπιδρώντας με βασικά μόρια του κυττάρου ή ακόμη και έμμεσα μέσω των ελευθέρων ριζών, οι οποίες απελευθερώνονται κατά τη διαδικασία αυτή. Σημαντικό θεωρείται το γεγονός ότι η χαμηλή δόση ακτινοβολίας δεν επιφέρει σημαντικές μειώσεις στην θρεπτική αξία των τροφίμων, καθώς μακρομόρια όπως είναι οι υδατάνθρακες, τα λίπη και οι πρωτεΐνες παραμένουν σταθερά. Η ακτινοβολία θανατώνει ένα μεγάλο ποσοστό μικροοργανισμών αλλά δεν είναι αποτελεσματική ενάντια στους ιούς. Ευαίσθητη στην χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας είναι μεταξύ άλλων παθογόνων μικροβίων και η *L. monocytogenes* (Badr, 2004).

Η έκθεση του τροφίμου σε ιονίζουσα ακτινοβολία προερχόμενη από μια ραδιενεργό πηγή αποτελεί τεχνική ελέγχου η οποία είναι γνωστή και ως **κρύα παστερίωση**. Η πιθανή αλλοίωση που μπορεί να επέλθει στα τρόφιμα είχε ως αποτέλεσμα, σύμφωνα με την οδηγία 1999/2/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η τεχνική αυτή να γίνεται αποδεκτή μόνο σε τρόφιμα όπως τα αποξηραμένα βότανα, τα καρυκεύματα και τα αρτύματα από λαχανικά (Samelis et al., 2005). Στην Ευρώπη (Γαλλία, Ιταλία, Βέλγιο, Ηνωμένο Βασίλειο) έχει χορηγηθεί περιορισμένος αριθμός αδειών για ακτινοβολία των καρυκευμάτων, ενώ στις Η.Π.Α η χρήση της επεκτείνεται και στο κρέας. Στην Ευρώπη και συγκεκριμένα στη Γαλλία η χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας σε πουλερικά είναι επιτρεπτή αρκεί η απορρόφηση ενέργειας να μην υπερβαίνει τα 5 kGy, ενώ στο Ηνωμένο Βασίλειο η μέγιστη επιτρεπτή απορρόφηση ενέργειας στα ιχθυηρά είναι τα 3 kGy. Επίσης, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σταδιακή αύξηση της χρήσης ιονίζουσας ακτινοβολίας σε Ασιατικές χώρες ενώ αντίθετα παρατηρείται μείωση της χρήσης της στην Ε.Ε., γεγονός που τεκμαίρεται από την χορήγηση αδειών σε 25 μόνο εγκαταστάσεις το 2012. Σε ότι αφορά συγκεκριμένα τη *L. monocytogenes* η επαρκής ακτινοβολία για να επέλθει η μερική θανάτωση των πληθυσμών της υπολογίζεται στα 4 kGy. Έχει διαπιστωθεί ότι όσο υψηλότερη είναι η δόση ακτινοβολίας τόσο χαμηλότερες είναι οι τιμές των μικροβιολογικών δεικτών (Roza et al., 2018). Η μέθοδος ακτινοβολίας των τροφίμων επηρεάζει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες προκαλώντας χρωματικές αλλοιώσεις και τάγγισμα του τροφίμου. Η δράση της αυτή, ωστόσο, δεν αίρει την αξία της, καθώς θεωρείται ασφαλής μέθοδος μικροβιακού ελέγχου (Brewer, 2004).

4.4.3 Χαμηλή θερμοκρασία (ψύξη ή κατάψυξη)

Ως ψύξη χαρακτηρίζεται η επεξεργασία του τροφίμου κατά την οποία αφαιρείται θερμότητα από αυτό με την έκθεση του ακόμη και σε ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες δίχως όμως να προκαλείται κρυσταλλοποίηση (πήξη) του νερού που περικλείεται στο τρόφιμο (Soyer et al., 2010). Ειδικότερα σε ότι αφορά την επεξεργασία και τη συντήρηση σκευασμάτων κρέατος σημαντική είναι η διατήρηση της ψυκτικής αλυσίδας σε όλες τις διαδικασίες από τη λήψη του κρέατος από τα σημεία σφαγής μέχρι και την τελική κατανάλωσή του. Όλες οι φάσεις της ψυκτικής αλυσίδας πραγματοποιούνται κάτω από συνθήκες θερμοκρασιών ψύχους, οι οποίες έχουν ως στόχο την ελαχιστοποίηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Jiang et al., 2011).

Κύριο μειονέκτημα στη χρήση χαμηλών θερμοκρασιών στον πληθυσμιακό έλεγχο της *L. monocytogenes* είναι η ικανότητα του παθογόνου να επιβιώνει σε αρκετά χαμηλές θερμοκρασίες. Ταυτόχρονα η ίδια η φύση των τροφίμων λειτουργεί επικουρικά στην προστασία του μικροβίου κατά τη διάρκεια συνθηκών ψύξης ή κατάψυξης. Έχουν εντοπιστεί τρόποι επεξεργασίας, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ελαττώνουν την προστατευτική δράση των τροφίμων έναντι της *L. monocytogenes*. Κατά κύριο λόγο η ψύξη και η κατάψυξη αποτελούν τους πλέον αποτελεσματικούς τρόπους μείωσης της βιωσιμότητας του μικροβίου χωρίς, ωστόσο, να το εξουδετερώνουν πλήρως (Patsias et al., 2008).

4.4.4 Θέρμανση με μικροκύματα

Αν και το βακτήριο εμφανίζει ιδιαίτερη αντοχή στη χρήση μικροκυμάτων ως τεχνική θέρμανσης του τροφίμου, η αναθέρμανσή του σε θερμοκρασία άνω των 70 °C θα μπορούσε να μειώσει αισθητά τον κίνδυνο μόλυνσης. Έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε τρόφιμα επιμολυσμένα με *L. monocytogenes* κατέδειξαν ότι η θέρμανσή τους με μικροκύματα σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τους 74 °C, εξάλειψε σχεδόν

ολοκληρωτικά την μόλυνση. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ότι η υψηλή θερμοκρασία συμβάλλει στην μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου (Guo et al., 2017). Βέβαια, υπάρχει πάντα η περίπτωση να μη θερμανθεί ομοιογενώς όλη η μάζα του τροφίμου, με αποτέλεσμα τελικά το βακτήριο να επιβιώσει. Προκειμένου να μειωθεί ο συγκεκριμένος κίνδυνος είναι αρκετά σημαντικό να ακολουθούνται πιστά οι οδηγίες χρήσης της συσκευής όπως αναγράφονται από τον κατασκευαστή. Ανάμεσα σε αυτές αναφέρεται η ανάδευση του τροφίμου ανά τακτά διαστήματα ακόμη και αν ο φούρνος διαθέτει δίσκο υποδοχής που περιστρέφεται. Επίσης η παραμονή του τροφίμου σε ηρεμία για μικρό χρονικό διάστημα μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας αναθέρμανσης επιτρέπει την ομοιόμορφη κατανομή της θερμότητας καθώς η συσκευή συνεχίζει να θερμαίνεται (Satin, 2002).

4.4.5 Χρήση συσκευασίας Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας (MAP)

Η συσκευασία των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων σε Τροποποιημένη Ατμόσφαιρα (Modified Atmosphere Packaging, MAP) εφαρμόζεται σε μια ευρεία κατηγορία τεμαχισμένων και επεξεργασμένων θερμικώς τροφίμων. Πραγματοποιείται μέσω της απομάκρυνσης του ατμοσφαιρικού αέρα από την συσκευασία του τροφίμου, ο οποίος αντικαθίσταται από ένα μείγμα αερίων όπως το διοξείδιο του άνθρακα και το άζωτο (Παπαδάκης, 2012). Η εισαγωγή μείγματος αερίων σε συσκευασία από κατάλληλο υλικό και η επακόλουθη ψύξη της εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των περισσότερων μικροβίων. Θεωρείται αρκετά ήπια καθώς οι αλλοιώσεις που επιφέρει στα χαρακτηριστικά του τροφίμου όπως τη γεύση και το χρώμα του δεν είναι σημαντικές (Patsias et al., 2008; Samir et al., 2019). Η καλύτερη ενδεδειγμένη αναλογία αερίων για τα κόκκινα κρέατα είναι 60-80% O₂, 20-30% CO₂ και μέχρι 20% N₂, σε αντίθεση με το κρέας των πουλερικών που η συνιστώμενη αναλογία αερίων είναι 20-35% CO₂ και 65-80% N₂. (Μπλούκας, 2007).

Η *L. monocytogenes* είναι ένα βακτήριο που χαρακτηρίζεται από τη δυνατότητα να αναπτύσσεται σε συνθήκες ψύξης τόσο αερόβια όσο και αναερόβια (Farber & Peterkin, 1991). Κατά συνέπεια η χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής ελέγχου πιθανότατα να αποδειχθεί ανεπαρκής για τον έλεγχο του συγκεκριμένου παθογόνου. Προκειμένου να ανασταλεί η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* το τρόφιμο πρέπει να συσκευάζεται με χρήση υψηλών συγκεντρώσεων διοξειδίου του άνθρακα σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70%. Ωστόσο, η τεχνική της Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτόνομα παρά μόνον ως συμπληρωματική μέθοδος ελέγχου. Οι τεχνικές, με τις οποίες συνήθως συνδυάζεται είναι η ψύξη και η κατάψυξη του τροφίμου, η προσθήκη συντηρητικών ουσιών και η παστερίωση του προϊόντος εντός της συσκευασίας (Walker et al., 1990).

4.4.6 Άλλες τεχνικές συσκευασίας των τροφίμων

Η εφεύρεση μιας ποικιλίας υλικών συσκευασίας συνέβαλλε στην παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού αρκετών μικροοργανισμών. Οι εδώδιμες μεμβράνες αποτελούνται από ένα λεπτό στρώμα βρώσιμου υλικού που τοποθετείται απευθείας στο τρόφιμο με ψεκασμό, επάλειψη ή με εμβάπτιση του τροφίμου σε αυτό και θεωρείται μέρος του τελικού προϊόντος (Sanchez-Ortega et al., 2014). Τα εδώδιμα φιλμ τα οποία χρησιμοποιούνται σε συσκευασίες προϊόντων κρέατος λειτουργούν ανασταλτικά στον πολλαπλασιασμό της *L. monocytogenes*. Παρασκευάζονται συνήθως από πρωτεΐνες (ορού γάλακτος, σόγιας, ζείνη καλαμποκιού, κολλαγόνο), πολυσακχαρίτες (άμυλο, κυτταρίνη, χιτοζάνη), λιπίδια ή από συνδυασμό αυτών. Η ιδέα της χρήσης τους προέκυψε από τις φυσικές μεμβράνες που διαθέτουν κάποια τρόφιμα, όπως φρούτα και λαχανικά (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011).

Μια ιδανική εδώδιμη μεμβράνη σχηματίζει ένα λεπτό στρώμα στην επιφάνεια του τροφίμου και παρέχει έναν αποτελεσματικό φραγμό σε νερό, ατμούς, υγρασία ή/και θερμοκρασία (Tavassoli-Kafrani et al., 2016). Αποτελεί εναλλακτική μέθοδο για την παράταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων, δρώντας ως εμπόδιο διείσδυσης νερού, ατμού, οξυγόνου, διοξειδίου του άνθρακα, αρωματικών ενώσεων κλπ, αλλά και για τη δράση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, οι εδώδιμες μεμβράνες διατηρούν την υγρασία στα νωπά κρέατα και μειώνουν την οξείδωση της μυογλοβίνης (Sanchez-Ortega et al., 2014). Οι τεχνικές αυτές απουσιάζουν κατά την απλή συσκευασία των τροφίμων, μολονότι ενισχύουν τον έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης στα ΕΚΤ (Ravishankar et al., 2012). Οι εδώδιμες μεμβράνες θεωρούνται φιλικές προς το περιβάλλον, δεδομένου ότι αποδομούνται εύκολα σε σύγκριση με τα κοινά συνθετικά πλαστικά. Οι ιδιότητες αυτών των βιοπολυμερών μπορούν να τροποποιηθούν με την προσθήκη πλαστικοποιητών, αντιμικροβιακών παραγόντων, χρωστικών ουσιών με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους (Gutierrez et al., 2016).

Στις εδώδιμες μεμβράνες μπορούν να ενσωματωθούν και άλλες ουσίες, όπως αρωματικές ενώσεις, αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακοί παράγοντες, χρωστικές, βιταμίνες (Evageliou et al., 2015). Η χρήση εδώδιμων μεμβρανών και επικαλύψεων ως φορείς δραστικών συστατικών είναι ελπιδοφόρα τεχνική. Θα πρέπει όμως να πληρούν ειδικές απαιτήσεις: καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, υψηλούς φραγμούς, καλές μηχανικές ιδιότητες, βιοχημική, φυσικοχημική και μικροβιακή

σταθερότητα, ασφάλεια, απλή τεχνολογία και χαμηλό κόστος πρώτων υλών και επεξεργασίας (Salgado et al., 2015).

4.4.7 Χρήση Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP)

Πρόκειται για τεχνική που εφαρμόζεται τα τελευταία χρόνια και αφορά την εμφάνιση ενός τροφίμου το οποίο έχει ήδη συσκευαστεί κανονικά, σε ένα δοχείο με υγρό υψηλής πίεσης. Η ασκούμενη πίεση μπορεί να φτάσει ακόμη και τα 1000 megapascals (MPa). Συνήθως το υγρό που βρίσκεται εντός του δοχείου είναι νερό (Hugas et al., 2002). Η εφαρμογή υψηλής πίεσης συνδυάζεται συχνά και με άλλες τεχνικές όπως είναι η θερμική επεξεργασία, η προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών και το χαμηλό pH. Ο συνδυασμός ειδικότερα της υψηλής υδροστατικής πίεσης με την προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών παρατείνει τη διάρκεια ζωής των τροφίμων προκαλώντας αδρανοποίηση των μικροβίων (Tomarkin et al., 1999).

Η μείωση του συνολικού πληθυσμού της *L. monocytogenes* είναι δυνατό να επιτευχθεί μετά από έκθεση του τροφίμου για 10 min σε πίεση ίση με 250-300 MPa. Η αντοχή που παρουσιάζει ο μικροοργανισμός όταν εντοπίζεται εντός γαλακτοκομικών προϊόντων είναι αισθητά μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή που επιδεικνύει εντός σκευασμάτων πουλερικών. Σύμφωνα με τη μελέτη των Rodríguez-Calleja et al. (2012) κατά την οποία πραγματοποιήθηκε επεξεργασία φιλέτων στήθους κοτόπουλου με HHP (300MPa), η ολική μικροβιακή χλωρίδα των δειγμάτων στον χρόνο t0, μειώθηκε στην τιμή 2,10 log cfu/g για τα δείγματα HHP -MAP, και κάτω από το όριο ανίχνευσης για τα δείγματα HHP -MAP επεξεργασμένων με διάλυμα οξικού-γαλακτικού οξέος, επεκτείνοντας το χρόνο ζωής τους μέχρι και 4 εβδομάδες κατά τη συντήρησή τους στους 4°C. Η επιτυχία συνεπώς των αποτελεσμάτων της μεθόδου εξαρτάται από τις ιδιότητες και το είδος του εκάστοτε τροφίμου. Σημαντικό σε κάθε περίπτωση θεωρείται το γεγονός ότι τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του τροφίμου δεν επηρεάζονται από την εφαρμογή αυτής της τεχνικής. Για το λόγο αυτό εφαρμόζεται ευρέως σε Ευρώπη και ΗΠΑ στον έλεγχο τεμαχισμένων σκευασμάτων κρέατος (Hugas et al., 2002).

4.4.8 Προσθήκη άλατος

Το αλάτι ανήκει στους αντιμικροβιακούς παράγοντες καθώς παρεμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών στα τρόφιμα, στα οποία έχει προστεθεί. Το αλάτι θεωρείται ως ένα από τα βασικότερα συντηρητικά του κρέατος. Το αλάτισμα γίνεται είτε με τρίψιμο του άλατος επάνω στην επιφάνεια του κρέατος, διαδικασία που καλείται ξηρό αλάτισμα, είτε με εμβάπτιση του κρέατος σε άλμη (υγρό αλάτισμα) (Stekelberg & Kant-Muermans, 2001), είτε με έγχυση άλμης μέσα στο κρέας με τη χρήση ειδικών αυτόματων συσκευών (Belitz et al., 2009). Το αλάτισμα του κρέατος σε ένα επίπεδο μέχρι 5% NaCl προκαλεί τη διόγκωσή του.

Η *L. monocytogenes* εμφανίζει αυξημένη αντοχή στην αλατότητα και ανήκει στην κατηγορία των ελάχιστων βακτηρίων, τα οποία επιβιώνουν σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος. Ορισμένα στελέχη του είδους έχουν τη δυνατότητα να επιβιώσουν σε συγκεντρώσεις άλατος σε ποσοστό 20% (προκαλεί συρρίκνωση στο κρέας και στα προϊόντα του). Σε περιεκτικότητα άλατος 12% και σε θερμοκρασία 30 °C είναι δυνατή η ανάπτυξη των στελεχών του βακτηρίου αν και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού του είναι σχετικά αργός (Arthur, 2002). Σύμφωνα με έρευνες, η συγκέντρωση του άλατος σε ποσοστό μεγαλύτερο του 3% αναστέλλει σε ψυχρές θερμοκρασίες την ανάπτυξη του βακτηρίου εφόσον οι τιμές pH είναι μικρότερες του 5,5 (Shamahat et al., 1980). Συνεπώς η ικανότητα της *L. monocytogenes* να επιβιώνει σε τρόφιμα, που περιέχουν αλάτι θα πρέπει να ερευνάται σε συνάρτηση με την θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου (Shahamat et al., 1980). Έχει αποδειχθεί ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης (0-4 °C) η ικανότητα ανάπτυξης του βακτηρίου αυξάνεται με συνέπεια την ενίσχυση της λοιμογόνου δράσης του. Αντίθετα οι υψηλές θερμοκρασίες συντήρησης του τροφίμου δρουν ανασταλτικά στο ρυθμό ανάπτυξης και επιβίωσης του βακτηρίου (Mead et al., 2009).

4.4.9 Προσθήκη συντηρητικών ουσιών (νιτρικά και νιτρώδη άλατα)

Η χρήση νιτρικών και νιτρωδών αλάτων ως συντηρητικών περιλαμβάνει την προσθήκη στο τρόφιμο νιτρικού καλίου, νιτρικού νατρίου και νιτρωδών αλάτων. Συνήθως τα άλατα προστιθέμενα σε τρόφιμα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, έχουν την ικανότητα να επιφέρουν γευστικές και χρωματικές βελτιώσεις. Το νιτρώδες νάτριο χαρακτηρίζεται από ευρεία αντιβακτηριακή δράση. Μεταξύ των βακτηρίων, τα οποία είναι ευαίσθητα στην προσθήκη του, εντάσσεται και η *L. monocytogenes*. Η αντιβακτηριακή του δράση ενισχύεται εφόσον συνδυαστεί

με τη κατάλληλη θερμοκρασία αποθήκευσης και το pH του τροφίμου. Στην περίπτωση μη θερμικώς επεξεργασμένων ή ακόμη και αφυδατωμένων σκευασμάτων κρέατος χρησιμοποιείται νιτρικό κάλιο (Tomprkin et al., 1999).

4.4.10 Ρύθμιση του pH με την προσθήκη οργανικών οξέων

Η *L. monocytogenes* αναπτύσσεται και επιβιώνει σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH. Επομένως, η προσθήκη οργανικών οξέων με σκοπό τον περιορισμό και τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα συστατικά του υπό επεξεργασία τροφίμου. Παράλληλα, σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει και ο τύπος του προστιθέμενου οξέος. Στις διαδικασίες συντήρησης των τροφίμων η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική περιλαμβάνει τη χρήση οξυγαλακτικών βακτηρίων, διότι κατά το μεταβολισμό τους παράγεται γαλακτικό οξύ, το οποίο δεν θεωρείται επικίνδυνο και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό συντηρητικό στα τρόφιμα. Συγκεκριμένα, η χρήση κιτρικού οξέος ή γαλακτικού οξέος επιδρά λιγότερο στην ανάπτυξη του μικροβίου σε σύγκριση με τη χρήση οξικού οξέος. Η πλειονότητα των οξέων, η χρήση των οποίων επιτρέπεται κατά την επεξεργασία τροφίμων, δε θεωρείται αποτελεσματική για τον έλεγχο του συγκεκριμένου παθογόνου (Stekelberg & Kant-Muermans, 2001). Από έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε μη αλατισμένο, αποστειρωμένο κομμάτι μοσχαρίσιου κρέατος, προέκυψε ότι ο συνδυασμός οξικού νατρίου με γαλακτικό νάτριο επέφερε το βέλτιστο αποτέλεσμα στην μείωση - σε σημαντικό βαθμό - των πληθυσμών της *L. monocytogenes* χωρίς παράλληλα να επηρεάζει τα χαρακτηριστικά του τροφίμου, ενώ με τη προσθήκη διοξικού νατρίου το pH μειώθηκε ελαφρώς στο 5,9 από 6,3 (Mbandi & Shelef, 2000).

4.4.11 Κάπνιση

Κάπνιση είναι η υποβολή ενός τροφίμου στη δράση αερίων που προκύπτουν από την καύση συγκεκριμένων φυτικών υλικών με στόχο την επιμήκυνση του χρόνου ζωής του τροφίμου. Η πέστροφα, ο σολομός, διάφοροι τύποι χοιρινού ή βοδινού κρέατος ανήκουν στα τρόφιμα, στα οποία εφαρμόζεται συνήθως η κάπνιση. Κατά τη διαδικασία της κάπνισης τα τρόφιμα εμποτίζονται με πτητικές ουσίες που περιέχει ο καπνός. Στα σημαντικότερα συστατικά του καπνού περιλαμβάνονται καρβονυλικές

ενώσεις και φαινόλες, οι οποίες παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό της *L. monocytogenes*. Λόγω των βακτηριοκτόνων και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους εναποτίθενται - μέσω της κάπνισης - συχνά σε σκευάσματα κρέατος, σε πουλερικά, σε ιχθυηρά ακόμη και σε κάποια είδη τυριών. Βέβαια, ο κίνδυνος που ενέχουν οι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες, που σχηματίζονται κατά την διάρκεια της κάπνισης δύναται να περιοριστεί σε ικανοποιητικό βαθμό με τη χρήση κατάλληλων διεργασιών όπως με εξωτερική παραγωγή καπνού και καθαρισμό του καπνού με ψυχρές παγίδες, ψεκασμό ή φίλτρα (Belitz et al., 2009). Στα προϊόντα με βάση το κρέας, η κάπνιση συνδυάζεται πάντα με μια ακόμη επεξεργασία, όπως η θερμική επεξεργασία ή η αφυδάτωση (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2014).

Διακρίνεται σε ψυχρή κάπνιση, η οποία πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες μεταξύ 20 °C – 50 °C και σε θερμή κάπνιση, κατά την οποία η θερμοκρασία ανέρχεται πάνω από 60 °C. Ανάλογα με τη διαδικασία κάπνισης η υγρασία του τροφίμου μπορεί να μειωθεί μέχρι και 40% (Gall et al., 2004). Η θερμή κάπνιση είναι αποτελεσματικότερη στη θανάτωση της λιστέριας, κατά την οποία συνδυάζονται οι πτητικές ουσίες που περιέχει ο καπνός με την υψηλή θερμοκρασία επεξεργασίας και τη μείωση της υγρασίας. Η θερμή κάπνιση θεωρείται σχετικά αποτελεσματικότερη από τη ψυχρή λόγω του συνδυασμού των χημικών ενώσεων του καπνού με την υψηλή θερμοκρασία. Αυτό ενισχύεται από την διαπίστωση ότι κατά την ψυχρή κάπνιση δείγματα ψαριών σε θερμοκρασίες μεταξύ 20 °C και 30 °C, παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροβίου (Eklund, 1997). Εκτός από την ψυχρή και τη θερμή κάπνιση εφαρμόζεται, σε αρκετά έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα και η υγρή κάπνιση. Κατά τη διαδικασία αυτή, η ξήρανση του προς επεξεργασία τροφίμου συνδυάζεται με την προσθήκη σε αυτό υγρών αρωματικών ενώσεων του καπνού. Η εισαγωγή των αρωματικών αυτών ουσιών σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις είναι μεν αποτελεσματική στη μείωση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού επιφέρει όμως αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων (χρώμα, γεύση και οσμή) γεγονός που τα καθιστά μη αποδεκτά από τους καταναλωτές (Jahncke et al., 2004).

4.4.12 Προσθήκη καρυκευμάτων

Αν και η πλειονότητα των καρυκευμάτων προστίθενται στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα με μοναδικό σκοπό να βελτιώσουν τη γεύση τους, έχει βρεθεί ότι πολλά φυτικά εκχυλίσματα περιέχουν χημικές ενώσεις με αντιμικροβιακή δράση ενάντια στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται η κανέλα, το δενδρολίβανο, το γαρύφαλλο, το ροδόδερο και ο λυκίσκος. Δυστυχώς, όμως οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις τους προκειμένου να είναι αποτελεσματική η αναστολή πολλαπλασιασμού του μικροβίου είναι αρκετά μεγάλες. Το γεγονός αυτό επιφέρει

ανεπιθύμητες αλλοιώσεις των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (χρώμα, γεύση και οσμή) των τροφίμων με αποτέλεσμα να μην τα προτιμά το καταναλωτικό κοινό (Jahncke et al., 2004).

4.4.13 Χρήση βακτηριοσινών (μέθοδος βιοσυντήρησης)

Οι βακτηριοσίνες χαρακτηρίζονται για την αντιμικροβιακή τους δράση. Αποτελούν αντιμικροβιακές ουσίες, οι οποίες συντίθενται από τα ριβοσώματα του μικροβιακού κυττάρου και ποικίλουν ανάλογα με τη γενετική τους προέλευση, τον τρόπο δράσης τους, το αντιμικροβιακό φάσμα και τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Η εφαρμογή τους ενδείκνυται ως συντηρητικό στα τρόφιμα προκειμένου να μειωθεί ή να απαλειφθεί η χρήση άλλων συντηρητικών, τα οποία θεωρούνται επικίνδυνα για τον καταναλωτή. Προϊόντα του μεταβολισμού τους είναι αντιμικροβιακές ουσίες όπως υπεροξειδίο του υδρογόνου και βακτηριοσίνες (Nilsson et al., 2004).

Η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* επηρεάζεται αρνητικά από την παράλληλη ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων. Ανάμεσα στις βακτηριοσίνες, στις οποίες επιδεικνύει ευαισθησία είναι η **νισίνη** αν και η αντιμικροβιακή της δράση ενάντια στη λιστέρια δεν είναι μεγάλη (Muriana, 1996, Aly et al., 2012; Shi et al., 2017). Παρότι άλλες βακτηριοσίνες φαίνεται να έχουν εντονότερη δράση ενάντια στο παθογόνο βακτήριο, η νισίνη είναι η μοναδική βακτηριοσίνη η χρήση της οποίας επιτρέπεται στα τρόφιμα. Παράγεται από το βακτήριο *Lactococcus lactis* και είναι δραστική έναντι των Gram θετικών βακτηρίων καταπολεμώντας ακόμη και τα σπόρια αυτών. Αντίθετα δεν είναι αποτελεσματική ενάντια σε ζύμες, μύκητες και Gram αρνητικά βακτήρια (Samelis et al., 2003). Σχετική έρευνα κατέδειξε ότι η ολική μικροβιακή χλωρίδα φιλέτου κοτόπουλου, συντηρημένου σε ψύξη (4 °C) και σε MAP συνθήκες (20% CO₂, 80% O₂), και επεξεργασμένου με διάφορους συνδυασμούς νισίνης- EDTA, έφτασε στις τιμές 7,8 και 7,1 cfu/g μετά από 21 ημέρες αποθήκευσης (Jay, 2005).

Η χρήση της νισίνης μπορεί επίσης να ελαττώσει τον ρυθμό ανάπτυξης του βακτηρίου αλλά για μικρό χρονικό διάστημα. Μετά τις πρώτες μέρες, κατά τις οποίες το μικροβιακό φορτίο είναι μειωμένο, έπεται σταδιακή ανάκαμψη του μικροοργανισμού και επαναφορά του στις αρχικές πριν την εφαρμογή της νισίνης συγκεντρώσεις. Επομένως η χρήση της θα πρέπει να συνδυάζεται με την παράλληλη εφαρμογή και άλλων μεθόδων ώστε να εξασφαλιστεί η υγιεινή των επεξεργαζόμενων τροφίμων (κυρίως με τη συντήρηση του τροφίμου σε σωστή θερμοκρασία ανάλογα με τη φύση του τροφίμου και για συγκεκριμένο διάστημα). Ο μεγάλος χρόνος

αποθήκευσης ενέχει τον κίνδυνο το τρόφιμο να επαναμολυνθεί αποτελώντας απειλή για την υγεία του καταναλωτή (Nilsson et al., 2004).

4.4.14 Αναστολή πολλαπλασιασμού λόγω ανταγωνισμού

Η αναστολή της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* μπορεί να είναι το αποτέλεσμα όχι μόνο της παρουσίας βακτηριοσινών αλλά και του ανταγωνισμού της με άλλα μικρόβια. Η χρήση λυοφιλοποιημένης καλλιέργειας του βακτηρίου *Leuconostoc carnosum* έχει ως συνέπεια τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού του μικροοργανισμού. Η προσθήκη της καλλιέργειας του βακτηρίου αυτού στο υπό επεξεργασία τρόφιμο (συνήθως σε τεμαχισμένο και μαγειρεμένο κρέας) γίνεται είτε με ψεκασμό των σκευασμάτων κρέατος είτε με εμβάπτιση τους στην καλλιέργεια και ακολουθεί η συσκευασία τους σε Τροποποιημένη Ατμόσφαιρα (Kozak et al., 1996). Επίσης στελέχη του βακτηρίου *Lactobacillus curvatus* και άλλα βακτήρια γαλακτικού οξέος που απομονώνονται από calabresa (προϊόν κρέατος που έχει υποστεί ζύμωση), έχουν υψηλή βακτηριογόνο δράση κατά της *L. monocytogenes* (Castilho et al., 2019).

4.4.15 Άλλες αντιμικροβιακές ουσίες που περικλείονται στα τρόφιμα

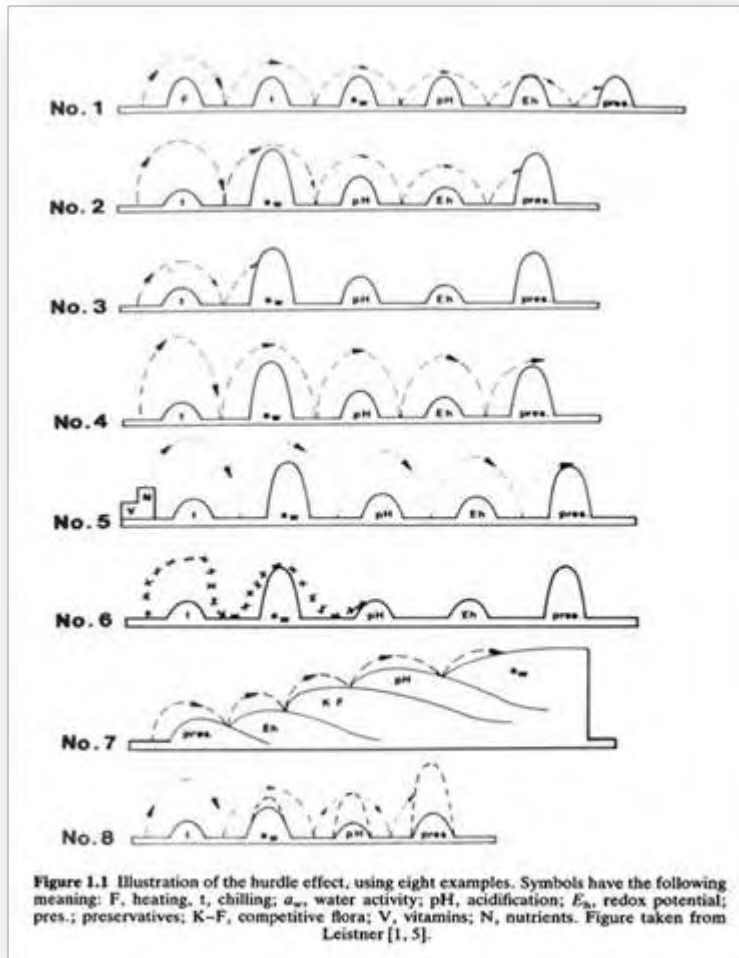
Σε αρκετά από τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα εμπεριέχονται αντιμικροβιακές ουσίες, όπως πρωτεΐνες, με κυριότερη την λυσοζύμη, και το lauric arginate, ένα μίγμα αποτελούμενο από λαυρικό οξύ, L-αργινίνη και αιθανόλη (Sánchez-Ortega et al., 2014). Η λυσοζύμη είναι θερμοανθεκτικό ένζυμο, το οποίο εντοπίζεται σε μια ποικιλία τροφίμων μεταξύ των οποίων είναι τα αυγά και το γάλα, και δρα ανασταλτικά ενάντια στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Κύριο μειονέκτημα στη δράση της είναι η μετουσίωσή της κατά την παστερίωση και συνεπώς η απώλεια της δραστηρότητας της (Miettinen et al., 2001).

4.4.16 Συστατικά των τροφίμων

Τα χαρακτηριστικά του τροφίμου αποτελούν βασικό παράγοντα σε ότι αφορά τον έλεγχο της ανάπτυξης και της επιβίωσης της *L. monocytogenes*. Η περιεκτικότητά του σε λίπη αυξάνει την ανθεκτικότητα του μικροβίου στην επίδραση υψηλών θερμοκρασιών. Συγκεκριμένα η αύξηση της συγκέντρωσης λίπους ενός τροφίμου ενισχύει τη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου προστατεύοντάς το σε υψηλές θερμοκρασίες. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού και της υψηλής τους περιεκτικότητας σε λίπος, οι θερμοκρασίες στις οποίες επεξεργάζονται θερμικά τα σκευάσματα κρέατος, όπως είναι τα βραστά αλλαντικά, θα πρέπει να είναι υψηλότερες από εκείνες που επικρατούν κατά την παστερίωση των προϊόντων γάλακτος (Lemay et al., 2002).

4.4.17 Τεχνολογία εμποδίων (hurdle technology)

Πρόκειται για μια αποτελεσματική προσέγγιση στην παραγωγή ασφαλών και ταυτόχρονα θρεπτικών τροφίμων, η οποία εισήχθη πρώτη φορά το 1977 από τον Leistner και το 1982 από τους Rodel & Leistner. Αποτελεί συνδυασμό διαφορετικών μεθόδων συντήρησης, οι οποίες καλούνται εμπόδια (hurdles), μερικά από τα οποία είναι η υψηλή θερμοκρασία επεξεργασίας, η a_w και το pH (Ταούκης, 2009). Τα τελευταία χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερα από 40 νέα εμπόδια (πίεση, ακτινοβολία, νέα υλικά συσκευασίας κ.λ.π.). Η εφαρμογή πολλαπλών εμποδίων έχει ως συνέπεια να λειτουργούν συνδυαστικά και να καταστέλλουν την μικροβιακή ανάπτυξη. Ο συνδυασμός τους καθίσταται πιο αποτελεσματικός για την καταπολέμηση του μικροβίου απ' ό,τι η μεμονωμένη χρήση τους. Η δράση κάθε εμποδίου στοχεύει σε διαφορετική λειτουργία του κυττάρου (Mead et al., 2009). Το κάθε εμπόδιο μπορεί να επιφέρει διαφορετικά αποτελέσματα στο τρόφιμο, αναλόγως με την ένταση του. Επομένως θα πρέπει να εφαρμόζεται ένας τέτοιος συνδυασμός προκειμένου να επιτευχθεί στο μέγιστο δυνατό βαθμό η ασφάλεια του τροφίμου.



Εικόνα 55: Παρουσίαση της τεχνολογίας των εμποδίων με παραδείγματα (Leistner, 1995)

Η τεχνολογία των εμποδίων περιλαμβάνει τη συνδυαστική χρήση ήπιων μεθόδων επεξεργασίας με εμπόδια, τα οποία εφαρμόζονται σε χαμηλότερη ένταση απ' όση θα χρειαζόταν εάν εφαρμόζονταν μεμονωμένα. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται μεγαλύτερη οικονομία και διατήρηση των φυσικών τους χαρακτηριστικών (γεύση, οσμή, θρεπτικά συστατικά). Η χρήση της συγκεκριμένης τεχνολογίας θεωρείται επιτυχής εφόσον αναστέλλει τη μικροβιακή ανάπτυξη στο τρόφιμο χωρίς ταυτόχρονα να αλλοιώνει τα χαρακτηριστικά και τη θρεπτικότητα του (Huss et al., 2000). Κάποια από τα βασικότερα εμπόδια που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων είναι η a_w και το pH, ενώ ειδικότερα στα κρέατα χρησιμοποιούνται επίσης η προσθήκη συντηρητικών, η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας και λιγότερο συχνά η χαμηλή ακτινοβολία.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5 Πειραματική προσέγγιση - Μεθοδολογία

5.1 Σκοπός της έρευνας

Η βιομηχανία των τροφίμων αναγνωρίζοντας τη σημασία της *L. monocytogenes* στην ασφάλεια των τροφίμων, ανέπτυξε μια σειρά μεθόδων επεξεργασίας αλλά και χειρισμού των τροφίμων με στόχο την καταστροφή της στα τελικά προϊόντα κρέατος, την πρόληψη της αναμόλυνσής τους και τον έλεγχο της ανάπτυξης του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους. Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής διερευνήθηκε η συχνότητα παρουσίας της *L. monocytogenes* στο κρέας, τα προϊόντα κρέατος και το περιβάλλον ορισμένων εγκαταστάσεων επεξεργασίας και διάθεσης κρέατος στη Βόρεια Ελλάδα.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή» με κατεύθυνση «Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων & Υδάτων & Δημόσια Υγεία» του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η υλοποίηση της πειραματικής έρευνας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως – Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, του Τμήματος Κτηνιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στο Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης του ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ».

5.2 Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Για το σκοπό της παρούσας έρευνας ελήφθησαν δείγματα από νωπό κρέας, από προϊόντα κρέατος και το περιβάλλον επεξεργασίας μιας καθετοποιημένης εταιρίας μεταποίησης κρέατος και εμπορίας ειδών διατροφής στη Βόρεια Ελλάδα και στα τρία υποκαταστήματά της. Ο εφοδιασμός των υποκαταστημάτων γίνεται αποκλειστικά και μόνο με οχήματα της εταιρίας. Οι δειγματοληψίες έλαβαν χώρα κατά τους φθινοπωρινούς μήνες Οκτώβριο-Νοέμβριο του 2018.

Ειδικότερα, οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε νωπό κρέας θηλαστικών και πουλερικών που διατίθενται στο καταναλωτικό κοινό, σε έτοιμα-προς-κατανάλωση τρόφιμα, σε αλλαντικά ωρίμανσης και σε νωπά παρασκευάσματα κρέατος. Επίσης, ελήφθησαν δείγματα από τις επιφάνειες και το περιβάλλον επεξεργασίας των εγκαταστάσεων της εταιρίας καθώς και από τα χέρια και τις ρινικές κοιλότητες των εργαζόμενων τόσο στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας όσο και στα υποκαταστήματα.

Συγκεκριμένα η λήψη δειγμάτων από τις επιφάνειες του εξοπλισμού, από τα χέρια και τις ρινικές κοιλότητες των εργαζόμενων και τις επιφάνειες μεγάλων τεμαχίων κρέατος (ημιμόρια, τεταρτημόρια κ.λ.π.), πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της μεθόδου απόμαξης με βαμβακοφόρους στυλεούς και άμεση εισαγωγή τους σε σωλήνες με προεμπλουτιστικό ζωμό *Listeria Fraser Broth Half Concentration* (Biolab, Budapest, Hungary).

Η δειγματοληψία των σκευασμάτων κρέατος βασίστηκε στην άσηπτη λήψη ποσότητας μεγαλύτερης ή ίσης των 25 g (αντιπροσωπευτική όλων των επιπέδων της μάζας εκάστου δείγματος) και εν συνεχεία στην τοποθέτησή τους σε πλαστικούς περιέκτες (σάκους stomacher). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν υπό συνθήκες ψύξης στο εργαστήριο εντός δύο ωρών, μέσα σε ισοθερμικά δοχεία με παγοκύστες σύμφωνα με τις οδηγίες της ISO 7218. Στη συνέχεια, τα δείγματα συντηρήθηκαν σε συνθήκες ψύξης έως ότου πραγματοποιηθεί η εξέτασή τους. Η εξέταση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε εντός 24 ωρών από την έναρξη της δειγματοληψίας. Συνολικά, εξετάστηκαν 303 δείγματα, εκ των οποίων τα 175 προέρχονταν από την εργοστασιακή μονάδα της εταιρίας και τα 128 από τα τρία υποκαταστήματα λιανικής πώλησης (κρεοπωλεία) όπως φαίνεται αναλυτικότερα στον Πίνακα 3.

Ανάλογα με την προέλευσή τους τα δείγματα χωρίστηκαν στις εξής κατηγορίες:

1. Προσωπικό
 - Χέρια
 - Ρινικές κοιλότητες
2. Εξοπλισμός
3. Επιφάνειες Επεξεργασίας
4. Νωπά Κρέατα (θηλαστικών και πουλερικών) όπως: χοιρινές μπριζόλες λαιμού, χοιρινές πανσέτες, χοιρινό μπούτι, χοιρινή σπάλα, χοιρινό τρανς, νουά βοοειδούς, σπάλα βοοειδούς, σπαλομπριζόλες βοοειδούς με οστό, κιλότο βοοειδούς, κοτόπουλο μπούτι, κοτόπουλο παϊδάκια, κοτόπουλο στήθος φιλέτο
5. Παρασκευάσματα Νωπού Κρέατος όπως: λουκάνικα νωπά, γύρος χοιρινός, σουβλάκι χοιρινό, σουβλάκι κοτόπουλο, σνίτσελ κοτόπουλου μαριναρισμένο, κοκορέτσι, ρολό χοιρινό, μπιφτέκι ανάμεικτο (50% χοιρινό κρέας-50% μοσχαρίσιο), μπιφτέκι μοσχαρίσιο, σουτζουκάκι, σεφταλιά
6. Έτοιμα Προς Κατανάλωση Τρόφιμα (ΕΚΤ)
 - Βραστά Αλλαντικά (θερμικής επεξεργασίας) όπως: πάριζα, παριζάκι, μορταδέλα, λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης, λουκάνικα κοτόπουλου, λουκάνικα κοκτέιλ, ζαμπόν κοπής, ζαμπόν σε φέτες, φιλέτο γαλοπούλας σε φέτες, φιλέτο γαλοπούλας κοπής, φιλέτο κοτόπουλο σε φέτες, σκορδάτο, σαλάμι τύπου Ουγγαρίας, χοιρινή μπριζόλα, σαλάμι τύπου μύρας (ημίξηρο)
 - Αλλαντικά Ωρίμανσης όπως: προσούτο, παστοურμάς από βοδινό κρέας, σαλάμι αέρος
7. Επιφάνειες του Περιβάλλοντος Επεξεργασίας όπως: Τοίχοι, Κάδοι, Ψυγεία, Νεροχύτες, Φρεάτια

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός Πίνακας Δειγματοληψιών

Εγκατάσταση δειγματοληψίας	Προέλευση Δειγμάτων	Αριθμός Δειγμάτων
Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Προσωπικό (χέρια)	11
	Προσωπικό (ρινικές κοιλότητες)	11
	Εξοπλισμός	40
	Επιφάνειες Επεξεργασίας	44
	Νωπά Κρέατα (θηλαστικών και πουλερικών)	26
	Παρασκευάσματα Νωπού Κρέατος (σουβλάκι χοιρινό, σουβλάκι κοτόπουλο, κοκορέτσι, ρολό χοιρινό, μπιφτέκι ανάμεικτο)	5
	Βραστά Αλλαντικά (θερμικής επεξεργασίας) (πάριζα, παριζάκι, μορταδέλα)	3
	Αλλαντικά Ωρίμανσης (σαλάμι αέρος)	1
	Επιφάνειες του Περιβάλλοντος Επεξεργασίας (Τοίχοι – Κάδοι – Ψυγεία – Νεροχύτες – Φρεάτια)	34
Σύνολο δειγμάτων εργοστασίου	175	

Πίνακας 3. (συνέχεια)

Εγκατάσταση δειγματοληψίας	Προέλευση Δειγμάτων	Αριθμός Δειγμάτων
Κρεοπωλείο Α	Προσωπικό (χέρια)	2
	Προσωπικό (ρινικές κοιλότητες)	2
	Εξοπλισμός	9
	Επιφάνειες Επεξεργασίας	12
	Νωπά Κρέατα (θηλαστικών και πουλερικών)	6
	Παρασκευάσματα Νωπού Κρέατος	11
	Βραστά Αλλαντικά (θερμικής επεξεργασίας) (λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης, ζαμπόν κοπής, φιλέτο γαλοπούλας σε φέτες, σκορδάτο, μπριζόλα χοιρινή)	5
	Αλλαντικά Ωρίμανσης (προσούτο)	1
	Επιφάνειες του Περιβάλλοντος Επεξεργασίας (Τοίχοι – Κάδοι – Ψυγεία – Νεροχύτες - Φρεάτια)	14
Σύνολο δειγμάτων κρεοπωλείου Α	62	

Πίνακας 3. (συνέχεια)

Εγκατάσταση δειγματοληψίας	Προέλευση Δειγμάτων	Αριθμός Δειγμάτων
Κρεοπωλείο Β	Προσωπικό (χέρια)	2
	Προσωπικό (ρινικές κοιλότητες)	2
	Εξοπλισμός	3
	Επιφάνειες Επεξεργασίας	4
	Νωπά Κρέατα (θηλαστικών και πουλερικών)	7
	Παρασκευάσματα Νωπού Κρέατος	7
	Αλλαντικά Θερμικής Επεξεργασίας (λουκάνικα κοτόπουλου, λουκάνικα κοκτέιλ φιλέτο γαλοπούλας κοπής-μπαστούνι)	3
	Αλλαντικά Ωρίμανσης (παστουρμάς)	1
	Επιφάνειες του Περιβάλλοντος Επεξεργασίας (Τοίχοι – Κάδοι – Ψυγεία – Νεροχύτες - Φρεάτια)	5
Σύνολο δειγμάτων κρεοπωλείου Β	34	

Πίνακας 3. (συνέχεια)

Εγκατάσταση δειγματοληψίας	Προέλευση Δειγμάτων	Αριθμός Δειγμάτων
Κρεοπωλείο Γ	Προσωπικό (χέρια)	2
	Προσωπικό (ρινικές κοιλότητες)	2
	Εξοπλισμός	3
	Επιφάνειες Επεξεργασίας	4
	Νωπά Κρέατα (θηλαστικών και πουλερικών)	6
	Παρασκευάσματα Νωπού Κρέατος	7
	Βραστά Αλλαντικά (θερμικής επεξεργασίας) (φιλέτο κοτόπουλο σε φέτες, σαλάμι τύπου Ουγγαρίας, ζαμπόν σε φέτες σαλάμι τύπου μύρας)	4
	Επιφάνειες του Περιβάλλοντος Επεξεργασίας (Τοίχοι - Λαβές Ψυγείων – Νεροχύτες - Φρεάτια)	4
Σύνολο δειγμάτων κρεοπωλείου Γ	32	
Σύνολο δειγμάτων από όλες τις εγκαταστάσεις	303	

5.2.2 Παρασκευή υποστρωμάτων

Στις μικροβιολογικές εξετάσεις που εφαρμόστηκαν προκειμένου να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν τα στελέχη των *Listeria* spp. και της *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υποστρώματα:

ALOA (Agar *Listeria* Ottavani & Agosti Medium , LabM, Hal 10, Lancashire, United Kingdom) για την ταυτοποίηση των *Listeria* spp. και της *L. monocytogenes*.

Listeria Fraser Broth Full Concentration (Biolab, Budapest, Hungary)

Listeria Fraser Broth Half Concentration (Biolab, Budapest, Hungary)

Tryptone Soy agar (TSA, Biolab, Budapest, Hungary)

Peptone Water: για την πραγματοποίηση διαδοχικών αραιώσεων.

PCA (Plate Count Agar, LAB M)

TBX (Tryptone Bile X – glucuronide Agar , Biolab, Budapest, Hungary)

TSA (Tryptone Soy agar, Biolab, Budapest, Hungary)

5.2.2.1 Παρασκευή του εκλεκτικού υποστρώματος Agar *Listeria* Ottavani & Agosti Medium (ALOA, LabM, Hal 10, Lancashire, United Kingdom) για την ταυτοποίηση των *Listeria* spp. και της *Listeria monocytogenes*.

Σε 500 ml αποσταγμένου νερού διαλύθηκαν 35,5 g σκόνης υποστρώματος. Το μίγμα θερμάνθηκε με συνεχή ανάδευσή του, με γυάλινη ράβδο, έως ότου επήλθε το σημείο του βρασμού, οπότε και διαλύθηκε πλήρως η σκόνη του υποστρώματος.

Αμέσως μετά το υπόστρωμα τοποθετήθηκε σε γυάλινη φιάλη τύπου Duran με καπάκι και τοποθετήθηκε στον κλίβανο για αποστείρωσή της στους 121 °C για 15 min. Μετά το πέρας της αποστείρωσης, η φιάλη τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία του υποστρώματος στους 48-50 °C.

Έπειτα, αναδεύοντας με κυκλικές κινήσεις προστέθηκε σε αυτό το ALOA Selective Supplement (Biolife, 423051, Italy) (αφού προηγήθηκε η ανασύστασή του) και το

ALOA Enrichment Supplement (Biolife, 423051, Italy). Η ανασύσταση του ALOA Selective Supplement έγινε με την προσθήκη 5ml αιθανόλης συγκέντρωσης 50%. Για την παρασκευή του διαλύματος της αιθανόλης 50%, προστέθηκαν σε αποστειρωμένο φιαλίδιο universal 2,5 ml αποσταγμένου νερού και 2,5 ml αιθανόλης 99%. Ακολούθως το universal τοποθετήθηκε σε κυκλομίκτη (Vortex) και το προκύψαν διάλυμα προστέθηκε στο ALOA Selective Supplement. Το διάλυμα που προέκυψε (μετά από καλή ανάμιξη σε Vortex), προστέθηκε στο αρχικό διάλυμα ALOA agar.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε διαμοιρασμός του υποστρώματος σε στείρα τρυβλία petri και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει και ακολούθησε έλεγχος στειρότητας με δοκιμαστική επώαση στους 37°C overnight και συντήρηση στους 2-8°C.

5.2.2.2 Παρασκευή των εμπλουτιστικών ζωμών *Listeria Fraser Broth Half Concentration* και *Listeria Fraser Broth Full Concentration*.

Για την παρασκευή των εμπλουτιστικών ζωμών *Listeria Fraser Broth Half Concentration* και *Listeria Fraser Broth Full Concentration* (Biolab, Budapest, Hungary), ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του παρασκευαστή. Συγκεκριμένα σε 500 ml αποσταγμένου νερού διαλύθηκαν 27,4 g σκόνης υποστρώματος και η φιάλη αποστειρώθηκε στους 120 °C για 15min.

Μετά την αποστείρωση, η φιάλη τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο έως ότου η θερμοκρασία σταθεροποιήθηκε στους 48-50 °C. Μετά την ανασύσταση του Ferric Ammonium Citrate Supplement (FAC, Biolife, 4240056, Italy) με 5 ml αποσταγμένου νερού και ανάδυσή του σε Vortex, πραγματοποιήθηκε η τελική ανάμιξη προσθήκη του στους ζωμούς.

5.2.2.3 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων *Peptone water*, *Tryptone Soya agar*, *Tryptone Bile X – glucuronide Agar* και *Plate Count Agar*.

Για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων *Peptone water*, *TSA*, *TBX*, *PCA*, ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του παρασκευαστή. Συγκεκριμένα για το πεπτονούχο ύδωρ σε 1000 ml απεσταγμένο νερό διαλύθηκαν 9 g Sodium Chloride και 1 g σκόνης υποστρώματος *Proteose Peptone A* με θέρμανση και υπό συνεχή ανάδευση Ακολουθώς μοιράστηκαν με αυτόματη πιπέττα ποσότητες των 9 ml σε σωλήνες universal και ακολούθησε αποστείρωση των σωλήνων στους 120 °C για 15 min.

Για την παρασκευή *TSA* σε 1000 ml απεσταγμένο νερό διαλύθηκαν 45 g σκόνης υποστρώματος. Για την παρασκευή *TBX* σε 1000 ml απεσταγμένο νερό διαλύθηκαν 36,5 g σκόνης υποστρώματος ενώ 23,5 g σκόνης του αντίστοιχου υποστρώματος διαλύθηκαν σε 1000 ml απεσταγμένο νερό για την παρασκευή *PCA*. Τέλος η κάθε φιάλη που περιείχε τα παραπάνω διαλύματα αποστειρώθηκε στους 120 °C για 15 min.

Μετά την αποστείρωση, η κάθε φιάλη τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο έως ότου η θερμοκρασία σταθεροποιήθηκε στους 48-50 °C. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε διαμοιρασμός των υποστρωμάτων σε στείρα τρυβλία petri

και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει και ακολούθησε έλεγχος στειρότητας με δοκιμαστική επώαση στους 37°C overnight και συντήρηση στους 2-8°C.

5.2.2.4 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης ζυγίστηκαν σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας 1,65 g αγαρόζης και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη που περιείχε 110 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης, Tris Borate Acid/EDTA (TBE, ThermoFisher Scientific, B52, USA). Ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων επί 3-5 min προκειμένου να επιτευχθεί η διάλυση της σκόνης και να δημιουργηθεί ένα διαυγές διάλυμα. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Εν συνεχεία στο διάλυμα έγινε έγχυση 10 ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Παράλληλα προετοιμάστηκε το εκμαγείο και τα χτένια τοποθετήθηκαν στις προκαθορισμένες θέσεις. Το ρυθμιστικό διάλυμα μόλις κρύωσε τοποθετήθηκε με προσοχή στο εκμαγείο και τυχόν φυσαλίδες απομακρύνθηκαν με αποστειρωμένα tips. Μόλις το πήκτωμα κρύωσε και σταθεροποιήθηκε, αφού προηγήθηκε η αφαίρεση των χτενιών από το εκμαγείο, τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.

5.2.3 Απομόνωση και ταυτοποίηση των *Listeria* spp.

Οι μικροβιολογικές εξετάσεις που εφαρμόστηκαν προκειμένου να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν τα στελέχη των *Listeria* spp. και της *L. monocytogenes* έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες των ISO 11290-1:1996 και ISO 11290-2:1998 σε υπόστρωμα ALOA. Τα δείγματα των τροφίμων που εξετάστηκαν, τεμαχίστηκαν άσηπτα και εν συνεχεία ποσότητα 25 g εκάστου δείγματος (αντιπροσωπευτική όλων των επιπέδων της μάζας) τοποθετήθηκε εντός πλαστικού περιέκτη stomacher bag μαζί με 225 ml *Listeria* Fraser Broth Base Half Concentration. Ακολουθούσε ομογενοποίηση του πλαστικού περιέκτη για 2 min σε ομογενοποιητή stomacher (Lab Blender 400, A. J. Seward and Co. Ltd., London, UK). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση στους 30 °C για 24 h. Εν συνέχεια 2,5 ml από το υπερκείμενο κάθε δείγματος μεταφέρθηκε σε εμπλουτιστικό ζωμό *Listeria* Fraser Broth Full Concentration και επώαστηκε στους 30 °C για ακόμη 24 h. Ακολούθησε ενοφθαλμισμός του σε ALOA και επώαση στους 37 °C ± 1 °C για 24 h ± 3 h.

Κατόπιν δύο-τρεις αντιπροσωπευτικές αποικίες από κάθε τρυβλίο, μεταφέρθηκαν σε Tryptone Soy agar (TSA, Biolab, Budapest, Hungary) και μετά από επώασή στους 37 °C ± 1 °C για 24 h, πραγματοποιήθηκε η δοκιμή καταλάσης. Συγκεκριμένα σε στείρο τρυβλίο έγινε έγχυση σταγόνων με υπεροξείδιο του υδρογόνου 3% (H₂O₂) και μετά την προσθήκη ποσότητας 10 μl αποικιών διαπιστώθηκε ποιες από αυτές είναι θετικές σε καταλάση. Όλες οι ύποπτες αποικίες για *Listeria* spp. στάλθηκαν στο εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση του είδους τους με την μέθοδο φασματοσκοπίας μαζών εκρόφησης/ιονισμού της μήτρας με την βοήθεια ακτίνων λέιζερ (MALDI – TOF MS).

5.2.4 Εξέταση επιλεγμένων δειγμάτων για μέτρηση πληθυσμών *Escherichia coli* και Ολικής Αερόβιας Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX).

Παράλληλα με τη διερεύνηση της παρουσίας ή όχι της *L. monocytogenes* σε 25 g δείγματος, δεκατέσσερα δείγματα επελέγησαν τυχαία από το εργοστάσιο της εταιρίας για αρίθμηση της OMX και της *E. coli*. Τα δείγματα αυτά αφορούσαν προϊόντα ωρίμανσης (3 δείγματα) και παρασκευάσματα κρέατος (11 δείγματα). Από κάθε δείγμα, περίπου 10 g μετά την τοποθέτησή τους σε σάκο Stomacher ομογενοποιούνταν σε συσκευή Stomacher (Lab Blender 400, A. J. Seward and Co. Ltd., London, UK) για 1 min με ανάλογη ποσότητα πεπτονούχου ύδατος 0,1% w/v

ώστε να προκύψει αραιώση 10^{-1} . Από την αραιώση αυτή παρασκευάζονταν οι υπόλοιπες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με τη μεταφορά από την προηγούμενη στην επόμενη αραιώση 1 ml σε σωλήνες που περιείχαν 9 ml πεπτονόχο ύδωρ. Στη συνέχεια, 0,1 ml από την κάθε αραιώση εξαπλώνονταν επιφανειακά σε διπλή σειρά τρυβλίων με το κατάλληλο για τον κάθε εξεταζόμενο μικροοργανισμό υπόστρωμα.

Ο προσδιορισμός της *E.coli* έγινε σύμφωνα με το πρότυπο ISO 16649-2: 2001 και σε κάθε τρυβλίο προστίθονταν 20 ml περίπου από το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Bile X – glucuronide Agar (TBX, Biolab, Budapest, Hungary) και γίνονταν ανάμιξη με ήπια περιστροφή. Στο τέλος αφού τα τρυβλία στέγνωσαν ακολούθησε επώαση στους 44 °C για 48 h.

Ο προσδιορισμός της OMX εκτιμήθηκε με τη χρήση του θρεπτικού υλικού Plate Count Agar (PCA, LAB M), με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης, σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο ISO 4833 : 2013. Συγκεκριμένα σε κάθε τρυβλίο προστίθονταν 20 ml περίπου από το συγκεκριμένο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και γίνονταν ανάμιξη με ήπια περιστροφή. Στο τέλος αφού τα τρυβλία στέγνωσαν ακολούθησε επώαση στους 30°C για 72 h. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, καταμετρούνταν όλες οι ορατές αποικίες που αναπτύσσονταν σε κάθε τρυβλίο.

5.2.5 Ταυτοποίηση *L. monocytogenes* και άλλων ειδών με την μέθοδο φασματοσκοπίας μαζών εκρόφησης/ιονισμού της μήτρας με την βοήθεια ακτίνων λέιζερ (MALDI – TOF MS)

Όλα τα στελέχη που χαρακτηρίστηκαν πιθανώς *L. monocytogenes*, καλλιεργήθηκαν σε TSYEA agar και ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους με Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με MALDI Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Προκειμένου να αυξηθεί η ποιότητα του ραδιοφάσματος, οι πρωτεΐνες εκχυλίστηκαν με τη χρήση εκτεταμένης μεθόδου άμεσης μεταφοράς, η οποία περιελάμβανε επικάλυψη με φορμικό οξύ.

Λεπτομερώς, μία μοναδική αποικία συνελέγη και τοποθετήθηκε κατευθείαν σε μία πλάκα στόχου MALDI σπογγώδους χάλυβα. Στη συνέχεια, 1 μl 70% μυρμηγκικού οξέος (Penta) εφαρμόστηκε σε κάθε στόχο και αφέθηκε να στεγνώσει στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου. Εφαρμόστηκε 1 μl κεκορεσμένου διαλύματος α-κυανο-4-υδροξυκινναμωμικού οξέος (HCCA) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) και

αφέθηκε να συν-κρυσταλλώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Τα προφίλ των πρωτεϊνών αποκτήθηκαν χρησιμοποιώντας γραμμική ανάλυση θετικού τρόπου με συχνότητα λέιζερ στα 20 Hz.

Τα ακατέργαστα φάσματα αποκτήθηκαν αυτόματα με το λογισμικό ελέγχου AutoXecute (έλεγχος Flex 3.4, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) και καταγράφηκαν στην κλίμακα από 2.000 έως 20.000 Da. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό MALDI Biotyper, έκδοση 4.0, με προεπιλεγμένες παραμέτρους και τα ληφθέντα φάσματα συγκρίθηκαν με τη βιβλιοθήκη μάζας φάσματος (v6.093 MSPs).

Τα αποτελέσματα ταξινομήθηκαν χρησιμοποιώντας τις τροποποιημένες τιμές σκορ όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή. Για τη συσσωμάτωση των απομονωμένων στελεχών της *L. monocytogenes*, κατασκευάστηκε ένα δενδρόγραμμα βασικού φάσματος (MSP) με βάση το πρωτεϊνικό τους προφίλ.

5.2.6 Εκχύλιση του DNA

Με βακτηριολογικούς κρίκους μιας χρήσης, αποστειρωμένα erpendorfs και αποστειρωμένα tips, ενοφθαλμίστηκε σε ALOA υπόστρωμα ποσότητα από κάθε δείγμα που περιείχε κατεψυγμένη ποσότητα καθαρής καλλιέργειας από τα αρχικά δείγματα. Ακολούθησε σπορά και επώαση στους 37 °C για 24h. Με τους κρίκους συνελέγη από το ALOA υπόστρωμα ποσότητα ίση με 10 μl για κάθε δείγμα και ενοφθαλμίστηκε σε erpendorf, το οποίο περιείχε 100 μl milli Q water. Ακολούθησε ανάμειξη σε κυκλομίκτη για 10 sec και τα erpendorfs τοποθετήθηκαν στο erpendorf thermomixer® για 10min στους 100 °C. Ακολούθως τα erpendorfs αφού κρύωσαν στην κατάψυξη, τοποθετήθηκαν για φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5 min. Αφαιρέθηκε απ' αυτά το υπερκείμενο υγρό και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε συνθήκες κατάψυξης στους -80 °C σε κρυοφιαλίδια έως ότου χρησιμοποιηθούν για επιβεβαίωση και ταυτοποίηση των οροτύπων τους.

5.2.7 Προσδιορισμός οροτύπων της *L. monocytogenes* με την εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).

Το 2004, οι Doumith et al. πρότειναν ένα πρωτόκολλο συνδυαστικής PCR, στο οποίο οι αλληλουχίες-στόχοι ήταν τμήματα των γονιδίων *lmo0737*, *oRF2819*, *lmo1118* και *oRF2110*. Η ενίσχυση των τεσσάρων αυτών τμημάτων επιτρέπει το διαχωρισμό των στελεχών *L. monocytogenes* σε τέσσερις ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τους οροτύπους 1/2a και 3a (ανίχνευση μόνο του *lmo0737*), η δεύτερη αποτελείται από τους οροτύπους 1/2c και 3c (ταυτόχρονη ανίχνευση των *lmo0737* και *lmo1118*), η τρίτη αποτελείται από τους οροτύπους 1/2b, 3b και 7 (ανίχνευση μόνο του *oRF2819*) και η τέταρτη αποτελείται από τους οροτύπους 4b, 4d και 4e (ταυτόχρονη ανίχνευση των *oRF2819* και *oRF2110*). Στον Πίνακα 4 περιγράφεται η εκλεκτικότητα των γονιδίων ανίχνευσης για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων οροτύπων.

Πίνακας 44: Γονίδια ανίχνευσης και οι ορότυποι στους οποίους ανιχνεύονται

Γονίδια ανίχνευσης	Ορότυποι				
	IIa	IIb	IIc	IVa	IVb
<i>lmo0737</i>	+	-	+	-	-
<i>oRF2819</i>	-	+	-	-	+
<i>lmo1118</i>	-	-	+	-	-
<i>oRF2110</i>	-	-	-	-	+
<i>prs</i>	+	+	+	+	+

Η πολλαπλή PCR αποτελεί μια τεχνική με την οποία 2-3 διαφορετικές αλληλουχίες του γονιδιώματος (DNA) μπορούν να πολλαπλασιαστούν ταυτόχρονα σε μια αντίδραση χρησιμοποιώντας διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (Gorski, 2008). Η ορολογική τυποποίηση των 12 στελεχών της *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της πολλαπλής PCR (mPCR), που περιγράφηκε από τους Doumith et al (2004). Συγκεκριμένα για την οροτύπηση χρησιμοποιήθηκε 1 σετ PCR (multiplex PCR) με εκκινητές που αφορούσαν τα γονίδια *lmo1118*, *lmo0737*, *oRF2110*, *oRF2819*, *prs* και τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες ακολουθίες βάσεων DNA,

χαρακτηριστικές για την αναγνώριση συγκεκριμένων οροτύπων της *L. monocytogenes*. Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα παραπάνω γονίδια-στόχους και σε περίπτωση παρουσίας της *L. monocytogenes* ενισχύονται παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 55: Αλληλουχίες εκκινητών DNA για μελέτη των ορολογικών ομάδων της *L. monocytogenes* (Doumith et al., 2004)

Εκκινητής ή γονίδιο - στόχος	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Προϊόν (bp)
<i>lmo0737</i>	AGGGCTTCAAGGACTTACCC ^α ACGATTTCTGCTTGCCATTC ^β	691
<i>lmo1118</i>	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA ^α CGGCTTGTTCGGCATACTTA ^β	906
oRF2819	AGCAAAATGCCAAACTCGT ^α CATCACTAAAGCCTCCCATTG ^β	471
oRF2110	AGTGGACAATTGATTGGTGAA ^α CATCCATCCCTTACTTTGGAC ^β	597

^α Επέκταση εκκινητή προς τα εμπρός κατά τη σύνθεση cDNA.

^β Επέκταση εκκινητή προς τα πίσω κατά τη σύνθεση cDNA.

Περίληπτικά αναφέρεται ότι, η mPCR διεξήχθη σε τελικό όγκο 100μl που περιείχε 2 U από *Taq* DNA polymerase (Roche, Boehringer), 0,2 mM τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (deoxynucleotide triphosphates, dNTP's, Perkin-Elmer) και 50 mM Tris-HCl-10 mM KCl-50 mM (NH₄)₂SO₄-2 mM MgCl₂ και pH 8,3. Από τα γονίδια-στόχους τοποθετήθηκαν 1 μM *lmo0737*, 1 μM oRF2819, 1 μM oRF2110, 1,5 μM *lmo1118* και 0,2 μM prs. Οι συνθήκες στο θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf, Germany) ήταν οι ακόλουθες: αρχική θερμοκρασία 94 °C για 3 min, μετά 35 κύκλοι σε θερμοκρασίες 94 °C για 40 sec, 53 °C για 1,15 min, 72 °C για 1,5 min ακολουθούμενοι από τελική σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία για 7 min. Μετά το τέλος της PCR 5 μl του master mix αναμίχθηκαν με 3 μl loading buffer και ακολούθησε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτική 2% αγαρόζης. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν το H₂O και στέλεχος *Staphylococcus aureus* ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θετικό στέλεχος *L. monocytogenes* του εργαστηρίου. Τα τμήματα του DNA γίνονταν ορατά με τη βοήθεια βρωμιούχου αιθιδίου.

5.2.8 Προσδιορισμός της λοιμογόνου δράσης της *L. monocytogenes* με την εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).

Όλα τα προϊόντα απομόνωσης της *L. monocytogenes* αναλύθηκαν με 2 σετ πολλαπλής PCR (multiplex PCR) με δύο ομάδες εκκινητών, που περιλαμβάνουν τρία και τέσσερα γονίδια σχετικά με τη λοιμογόνο δράση. Το ένα σετ PCR αποτελούνταν από *inlC* και *inlJ* γονίδια, τα οποία ενσωματώνουν *inlA* γονίδια, ειδικά για την αναγνώριση του είδους της *L. monocytogenes*. Η ανάλυση του αμπλικονίου (ένα τεμάχιο DNA ή RNA που είναι η πηγή και/ή προϊόν των γεγονότων ενίσχυσης ή αναδιπλασιασμού) πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση όπως περιγράφεται από τους Liu et al. , (2007). Η παρουσία των γονιδίων *inlA*, *inlC* και *inlJ* στα εξεταζόμενα στελέχη ανιχνεύθηκαν από τον σχηματισμό των αναμενόμενων ζωνών σε 800, 517 και 238 bp αντίστοιχα.

Περίληπτικά, η mPCR διεξήχθη σε τελικό όγκο 25 μl που περιείχε 0,8 U (Taq DNA polymerase, Invitrogen, Καλιφόρνια, Η.Π.Α.), 200 mM τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (deoxynucleotide triphosphates, dNTP's) (Invitrogen), 10 ng στελέχους DNA, 40 pmol εκκινητών των γονιδίων *inlA*, 30 pmol *inlC* και 20 pmol *inlJ*. Οι συνθήκες στο θερμικό κυκλοποιητή (PTC200 Thermo Cycler, MJ Research, Waltham, Μασαχουσέτη, Η.Π.Α.) ήταν οι ακόλουθες: αρχική θερμοκρασία 94°C για 2 min, 30 κύκλοι σε θερμοκρασίες 94 °C για 20 sec, 55 °C για 20 sec και 72 °C για 50 sec, ακολουθούμενοι από τελική σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72 °C για 2 min. Μετά το τέλος της PCR, ακολουθούσε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 2% αγαρόζης (Applichem, Darmstadt, Γερμανία) για να διαπιστωθεί ο πολλαπλασιασμός του DNA. Τα τμήματα του DNA γίνονταν ορατά με τη βοήθεια 10 μg/ml βρωμιούχου αιθιδίου (Applichem).

Πίνακας 66: Αρχικές αλληλουχίες εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων μολυσματικότητας της *L. monocytogenes* (Liu et al., 2007)

Γονίδια	Αλληλουχίες κωδικοποίησης	Αλληλουχίες εκκινητών (5' - 3')	Θέσεις νουκλεοτιδίων	Προϊόν (bp)
<i>inlA</i>	94534–96936	ACGAGTAACGGGACAAATGC	94612–94631	800
		CCCGACAGTGGTGCTAGATT	95411–95392	
<i>inlC</i>	107200–108090	AATTCCCACAGGACACAACC	107306–107325	517
		CGGGAATGCAATTTTTCTACTA	107822–107802	
<i>inlJ</i>	188153–190708	TGTAACCCCGCTTACACAGTT	188989–189009	238
		AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	189226–189207	

Το δεύτερο σετ αποτελείται από *plcA*, *actA*, *hlyA* και *iap* γονίδια. Η τεχνική πολλαπλής PCR που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται από τους Rawool et al. (2007). Η παρουσία των γονιδίων *plcA*, *actA*, *hlyA* και *iap* στα εξεταζόμενα στελέχη ανιχνεύθηκε από τον σχηματισμό των αναμενόμενων ζωνών σε 1484, 839, 456 και 131 bp αντίστοιχα. Οι εκκινητές για την ανίχνευση του γονιδίου που κωδικοποιεί την τοξίνη LLO (*hlyA*), του ρυθμιστικού γονιδίου (*prfA*), του γονιδίου που κωδικοποιεί τη Φωσφατιδυλινοσιτόλη Φωσφολιπάση C (*plcA*), του γονιδίου που κωδικοποιεί την ακτίνη (*actA*) και του γονιδίου ρ60 (*iap*) της *L. monocytogenes*, που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, συντέθηκαν από τη Sigma Aldrich, ΗΠΑ. Οι λεπτομέρειες των αλληλουχιών εκκινητών εμφανίζονται στον Πίνακα 7.

Περίληπτικά, ακολουθήθηκε πρωτόκολλο για παρασκευή master mix 50 μl, το οποίο περιελάμβανε 5,0 μl από 10× PCR buffer, 1 μl of 10 mM dNTP mix, 4 μl από 25 mM MgCl₂, 0,1 μM για κάθε εκκινητή U από Taq DNA polymerase (Sigma, USA) και 5 μl milli Q water με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί τελικό δείγμα ανά PCR tube ποσότητας 0,2 ml. Οι συνθήκες στο θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf, Germany) ήταν οι ακόλουθες: αρχική θερμοκρασία 95 °C για 2 min, 35 κύκλοι σε θερμοκρασίες 95 °C για 15 sec, 60 °C για 30 sec, 60 °C για 1 min ακολουθούμενοι από τελική σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72 °C για 30 sec και έπειτα στους 72 °C για 10 min. Μετά το τέλος της PCR, ακολουθούσε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 1,5% αραρόζης. Τα τμήματα του DNA γίνονταν ορατά με τη βοήθεια 0,5 μg/ml βρωμιούχου αιθιδίου και απεικονίζονταν με την βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας (UVP Gel Seq Software, England).

Πίνακας 27: Αρχικές αλληλουχίες εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων μολυσματικότητας της *L. monocytogenes* (Rawool *et al.*, 2007)

Γονίδιο	Αλληλουχίες εκκινητών	Προϊόν (bp)	Βιβλιογραφικές Αναφορές
<i>plcA</i>	f 5'-CTGCTTGAGCGTTCATGTCTCATCCCC-3' r 5'-CATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC-3'	1484	Notermans <i>et al.</i> (1991a)
<i>prfA</i>	f 5'-CTGTTGGAGCTCTTCTTGGTGAAGCAATCG-3' r 5'-AGCAACCTCGGTACCATATACTAACTC-3'	1060	Notermans <i>et al.</i> (1991a)
<i>hlyA</i>	f 5'-GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA-3' r 5'-GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG-3'	456	Paziak-Domanska <i>et al.</i> (1999)
<i>iap</i>	f 5'-ACAAGCTGCACCTGTTGCAG-3' r 5'-TGACAGCGTGTGTAGTAGCA-3'	131	Furrer <i>et al.</i> (1991)
<i>actA</i>	f 5'-CGCCGCGGAAATTAATAAAGA-3' r 5'-ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG-3'	839	Suarez and Vazquez-Boland (2001)

5.2.9 Έλεγχος της ικανότητας σχηματισμού βιομεμβρανών των απομονωθέντων στελεχών *L. monocytogenes*

Η ικανότητα για παραγωγή βιομεμβρανών των στελεχών *L. monocytogenes* εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας έναν ημι-ποσοτικό προσδιορισμό προσκόλλησης μικροτίτλων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Wang *et al.* (2017) μετρώντας την οπτική πυκνότητα (OD) των προσκολλημένων βιομεμβρανών που χρωματίζονται με 1% (w / v) κρυσταλλικό ιώδες στα 595 nm. Αρχικά τα στελέχη *L. monocytogenes* από την MALDI-TOF καλλιεργήθηκαν σε Tryptone Soy broth (TSB, LAB M Limited) υπόστρωμα. Ακολούθησε παρασκευή διαλύματος Trypticase Soy-Yeast Extract Broth (TSB-YE) (BD, Franklin Lakes, NJ) με 2% γλυκόζη. Στην

συνέχεια 20 μl των αραιωμένων υγρών καλλιιεργειών και 180 μl TSB-YE υποστρώματος εμβολιάζονταν σε βοθρία (wells) μικροπλακών πολυστυρενίου (τρία βοθρία ανά στέλεχος) με επίπεδο πυθμένα (96 well, cell culture plates, Costar, USA). Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 48 h. Επιπρόσθετα η μη δεσμευμένη ποσότητα του κρυσταλλικού ιώδους απομακρύνονταν με έκπλυση της πλάκας με αποσταγμένο νερό, η οποία επαναλαμβάνονταν για τρεις φορές και μετά το στέγνωμα της πλάκας σε θερμοκρασία 55 °C για 15 min. Η δεσμευμένη στην βιομεμβράνη ποσότητα του κρυσταλλικού ιώδους απελευθερώνονταν για 1h με την προσθήκη 200 μl στείρου διαλύματος 95% v/v αιθανόλης. Η αποκοπή (ODc) ορίστηκε ως η μέση τιμή oD του αρνητικού μάρτυρα (απλό μέσον ζωμού). Ανάλογα με τις προκύπτουσες τιμές oD, τα εξεταζόμενα στελέχη ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τους Borges et al. (2012), δεδομένου ότι είτε δεν υπάρχουν παραγωγί βιομεμβρανών (OD < ODc), αδύναμοι (ODc < OD ≤ 2 × oDc), μέτριοι (2 × oDc < OD ≤ 4 × oDc) ή ισχυροί παραγωγί βιομεμβρανών (4 × oDc < OD).

5.3 Αποτελέσματα

5.3.1 Εξέταση επιλεγμένων δειγμάτων για *E.coli*, *L. monocytogenes* και Ολικής Αερόβιας Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX).

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζεται αναλυτικά η προέλευση των 14 δειγμάτων του εργοστασίου που επιλέχθηκαν τυχαία καθώς και τα αποτελέσματα της μεταβολής των μικροβιακών πληθυσμών τους (OMX, *L. monocytogenes* και *Escherichia coli*).

Πίνακας 88: Πληθυσμοί Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας *L. monocytogenes* και *Escherichia coli*

Προέλευση δειγμάτων	OMX στους 30°C	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E.coli</i>
Λουκάνικο Χωριάτικο Ωρίμανσης	5,4 x 10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	<10 cfu/g
Λουκάνικο Χωριάτικο με Πράσο	1,2 x 10 ³ cfu/g	Απουσία / 25g	<10 cfu/g
Λουκάνικο Παραδοσιακό με Κρεμμύδι	5,9 x 10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	<10 cfu/g
Σουβλάκι Κοτόπουλο	5,8 x 10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	<10 cfu/g
Φιλέτο Στήθος Κοτόπουλο Μαριναρισμένο	5,6 x 10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	<10 cfu/g
Κοτόπουλο Ρολό	6,1x10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	<10 cfu/g
Φιλετίνι Μπριζολάκι Κόντρα Χοιρινό	6,2x10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	<10 cfu/g
Φιλετίνι Μπριζολάκι Λαιμού Χοιρινό	4,9x10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	<10 cfu/g
Σουτζουκάκι	1,8x10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	Παρουσία (<40 cfu/g)
Μπιφτέκι ανάμεικτο	5x10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	Παρουσία (<40 cfu/g)
Κεμπαπίνι Κιμάς	5,2x10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	Παρουσία (<40 cfu/g)
Σουβλάκι Χοιρινό Χειροποίητο	3,8x10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	<10 cfu/g
Τηγανιά Χοιρινή	6,4x10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	<11 cfu/g
Κεμπάπ Χοιρινό	5,7x10 ² cfu/g	Απουσία / 25g	<12 cfu/g

Όπως προκύπτει και από τον Πίνακα 8 στα 14 δείγματα δεν διαπιστώθηκε παρουσία της *L. monocytogenes*, ενώ ο πληθυσμός της OMX κυμάνθηκε από 5,4 x 10² έως 1,8 x 10² cfu/g στους 30 °C. Όσον αφορά την *E.coli* οι ποσότητες στα αλλαντικά και στα παρασκευάσματα κρέατος, που προέρχονται από τεμαχισμένο κρέας, είναι μικρότερες από 10 cfu/g. Παρατηρήθηκε, ωστόσο, πως στα παρασκευάσματα που

προέρχονται από λεπτοτεμαχισμένο κρέας (σουτζουκάκι, μπιφτέκι, κεμπαπίνι) ο πληθυσμός της είναι αυξημένος, όχι όμως μεγαλύτερος από 40 cfu/g.

5.3.2 Αποτελέσματα ταυτοποίησης της *L. monocytogenes* και άλλων ειδών με την μέθοδο MALDI – TOF MS

Πίνακας 99: Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων και αποτελεσμάτων ταυτοποίησης των *Listeria spp.*

Εγκατάσταση δειγματοληψίας	Προέλευση Δειγμάτων	Αριθμός Δειγμάτων	Αρ. θετικών δειγμάτων <i>Listeria spp.</i> (%)	Αρ. θετικών σε <i>L. monocytogenes</i> (%)	Αρ. θετικών σε <i>L. innocua</i> (%)	Αρ. θετικών σε <i>L. welshimeri</i> (%)
Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Προσωπικό (χέρια)	11	1	1	0	0
	Προσωπικό (ρινικές κοιλότητες)	11	0	0	0	0
	Εξοπλισμός	40	7	4	3	0
	Επιφάνειες Εργασίας	44	2	2	1	1
	Νωπά Κρέατα (θηλαστικών και πουλερικών)	26	3	2	1	0
	Παρασκευάσματα Νωπού Κρέατος	5	1	0	1	0
	Βραστά Αλλαντικά (θερμικής επεξεργασίας) (πάριζα, παριζάκι, μορταδέλα)	3	0	0	0	0
	Αλλαντικά Ωρίμανσης (σαλάμι αέρος)	1	0	0	0	0
	Επιφάνειες του Περιβάλλοντος Επεξεργασίας (Τοίχοι – Κάδοι – Ψυγεία – Νεροχύτες – Φρεάτια)	34	8	3	2	1
Σύνολο δειγμάτων εργοστασίου		175	22	12	8	2

Πίνακας 9. (συνέχεια)

Εγκατάσταση δειγματοληψίας	Προέλευση Δειγμάτων	Αριθμός Δειγμάτων	Αρ. θετικών δειγμάτων <i>Listeria</i> spp. (%)	Αρ. θετικών σε <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> (%).	Αρ. θετικών σε <i>L.innocua</i> (%)	Αρ. θετικών σε <i>L.welshimeri</i> (%)
Κρεοπωλείο Α	Προσωπικό (χέρια)	2	0	0	0	0
	Προσωπικό (ρινικές κοιλότητες)	2	0	0	0	0
	Εξοπλισμός	9	0	0	0	0
	Επιφάνειες Εργασίας	12	0	0	0	0
	Νωπά Κρέατα (θηλαστικών και πουλερικών)	6	0	0	0	0
	Παρασκευάσματα Νωπού Κρέατος	11	0	0	0	0
	Βραστά Αλλαντικά (θερμικής επεξεργασίας) (λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης, ζαμπόν κοπής, φιλέτο γαλοπούλας σε φέτες, σκορδάτο, χοιρινή μπριζόλα)	5	0	0	0	0
	Αλλαντικά Ωρίμανσης (προσούτο)	1	0	0	0	0
	Επιφάνειες του Περιβάλλοντος Επεξεργασίας (Τοίχοι – Κάδοι – Ψυγεία – Νεροχύτες – Φρεάτια)	14	0	0	0	0
Σύνολο δειγμάτων κρεοπωλείου Α		62	0	0	0	0

Πίνακας 9. (συνέχεια)

Εγκατάσταση δειγματοληψίας	Προέλευση Δειγμάτων	Αριθμός Δειγμάτων	Αρ. θετικών δειγμάτων <i>Listeria</i> spp. (%)	Αρ. θετικών σε <i>L. monocytogenes</i> (%)	Αρ. θετικών σε <i>L. innocua</i> (%)	Αρ. θετικών σε <i>L. welshimeri</i> (%)
Κρεοπωλείο Β	Προσωπικό (χέρια)	2	0	0	0	0
	Προσωπικό (ρινικές κοιλότητες)	2	0	0	0	0
	Εξοπλισμός	3	0	0	0	0
	Επιφάνειες Εργασίας	4	0	0	0	0
	Νωπά Κρέατα (θηλαστικών και πουλερικών)	7	0	0	0	0
	Παρασκευάσματα Νωπού Κρέατος	7	0	0	0	0
	Βραστά Αλλαντικά (Θερμικής Επεξεργασίας) (λουκάνικα κοτόπουλου, λουκάνικα κοκτέιλ, φιλέτο γαλοπούλας κοπή-μπαστούνι)	3	0	0	0	0
	Αλλαντικά Ωρίμανσης (παστουρμάς)	1	0	0	0	0
	Επιφάνειες του Περιβάλλοντος Επεξεργασίας (Τοίχοι – Κάδοι – Ψυγεία – Νεροχύτες – Φρεάτια)	5	0	0	0	0
Σύνολο δειγμάτων κρεοπωλείου Β		34	0	0	0	0

Πίνακας 9. (συνέχεια)

Εγκατάσταση δειγματοληψίας	Προέλευση Δειγμάτων	Αριθμός Δειγμάτων	Αρ. θετικών δειγμάτων <i>Listeria</i> spp. (%)	Αρ. θετικών σε <i>L. monocytogenes</i> (%)	Αρ. θετικών σε <i>L. innocua</i> (%)	Αρ. θετικών σε <i>L. welshimeri</i> (%)
Κρεοπωλείο Γ	Προσωπικό (χέρια)	2	0	0	0	0
	Προσωπικό (ρινικές κοιλότητες)	2	0	0	0	0
	Εξοπλισμός	3	0	0	0	0
	Επιφάνειες Εργασίας	4	0	0	0	0
	Νωπά Κρέατα (θηλαστικών και πουλερικών)	6	0	0	0	0
	Παρασκευάσματα Νωπού Κρέατος	7	0	0	0	0
	Βραστά Αλλαντικά (θερμικής επεξεργασίας) (φιλέτο κοτόπουλο σε φέτες, σαλάμι τύπου Ουγγαρίας, ζαμπόν σε φέτες σαλάμι τύπου μύρας)	4	0	0	0	0
	Επιφάνειες του Περιβάλλοντος Επεξεργασίας (Τοίχοι – Κάδοι – Ψυγεία – Νεροχύτες – Φρεάτια)	3	0	0	0	0
Σύνολο δειγμάτων κρεοπωλείου Γ	32	0	0	0	0	
Σύνολο δειγμάτων από όλες τις εγκαταστάσεις	303	22 (7,26%)	12 (3,96%)	8 (2,64%)	2 (0,66%)	

Τα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *L. monocytogenes* συγκέντρωσαν βαθμολογία (score value) μοριακού βάρους μεγαλύτερη των 2000 μονάδων. Από τα 303 δείγματα στα 22 (7,26%) απομονώθηκαν είδη του γένους *Listeria* spp., εκ των οποίων τα 12 (3,96%) ήταν μολυσμένα με *L. monocytogenes*, τα 8 (2,64%) με *L. innocua* και τα 2 (0,66%) με *L. welshimeri*. Και τα 22 δείγματα που βρέθηκαν θετικά σε *Listeria* spp. προέρχονται από το εργοστάσιο παραγωγής κρέατος και κανένα από τα υποκαταστήματα. Συγκεκριμένα η προέλευση των δειγμάτων, από τα οποία απομονώθηκαν *Listeria* spp. περιγράφεται στους Πίνακες 10, 11 και 12.

Πίνακας 1010: Πίνακας με τα ταυτοποιημένα στελέχη *L. monocytogenes*

Προέλευση δειγμάτων	Είδος <i>Listeria</i> spp	Βαθμολογία
Σπαλομπριζόλα Βοειδούς Με Οστό Ελληνικής Προέλευσης	<i>L. monocytogenes</i>	2.509
Σχάρες Αποχετεύσεων Διαδρόμου Κατά μήκος Παραγωγής	<i>L. monocytogenes</i>	2.421
Τσιγκέλια Αποστέωσης 1	<i>L. monocytogenes</i>	2.399
Βέργες για κρέμασμα Λουκάνικων 2	<i>L. monocytogenes</i>	2.414
Βέργες για κρέμασμα Λουκάνικων 1	<i>L. monocytogenes</i>	2.461
Μπιφτεκομηχανή	<i>L. monocytogenes</i>	2.544
Cuter	<i>L. monocytogenes</i>	2.189
Νιπτήρας Αλλαντοποιείου	<i>L. monocytogenes</i>	2.443
Χερούλι Ψυγείου Καταστροφής	<i>L. monocytogenes</i>	2.496
Πληκτρολόγιο Αναδευτήρα	<i>L. monocytogenes</i>	2.28
Προσωπικό χέρια	<i>L. monocytogenes</i>	2.356
Κόντρα Μπριζόλα Βοειδούς Με Οστό Ελληνικής Προέλευσης	<i>L. monocytogenes</i>	2.411
Σύνολο	12	

Πίνακας 114: Πίνακας με τα ταυτοποιημένα στελέχη *L. innocua*

Προέλευση δειγμάτων	Είδος <i>Listeria</i> spp	Βαθμολογία
Ράμπα Παραλαβής 1	<i>L. innocua</i>	2.258
Παλέτες Μεταφοράς Νοπών Προϊόντων Κρέατος Ψυγείου Συντήρησης Α Υλών 2	<i>L. innocua</i>	2.436
Διακόπτες Παραλαβής	<i>L. innocua</i>	2.391
Σουβλάκι Κοτόπουλο	<i>L. innocua</i>	2.499
Μπριζόλα Βοειδούς Με Οστό (δείγματα από σπαλομπριζόλα και κόντρα)	<i>L. innocua</i>	2.302
Πριονοκορδέλα	<i>L. innocua</i>	2.56
Τσιγκέλια Αποστέωσης 2	<i>L. innocua</i>	2.541
Καμπάνα συσκευαστικό 2	<i>L. innocua</i>	2.559
Σύνολο	8	

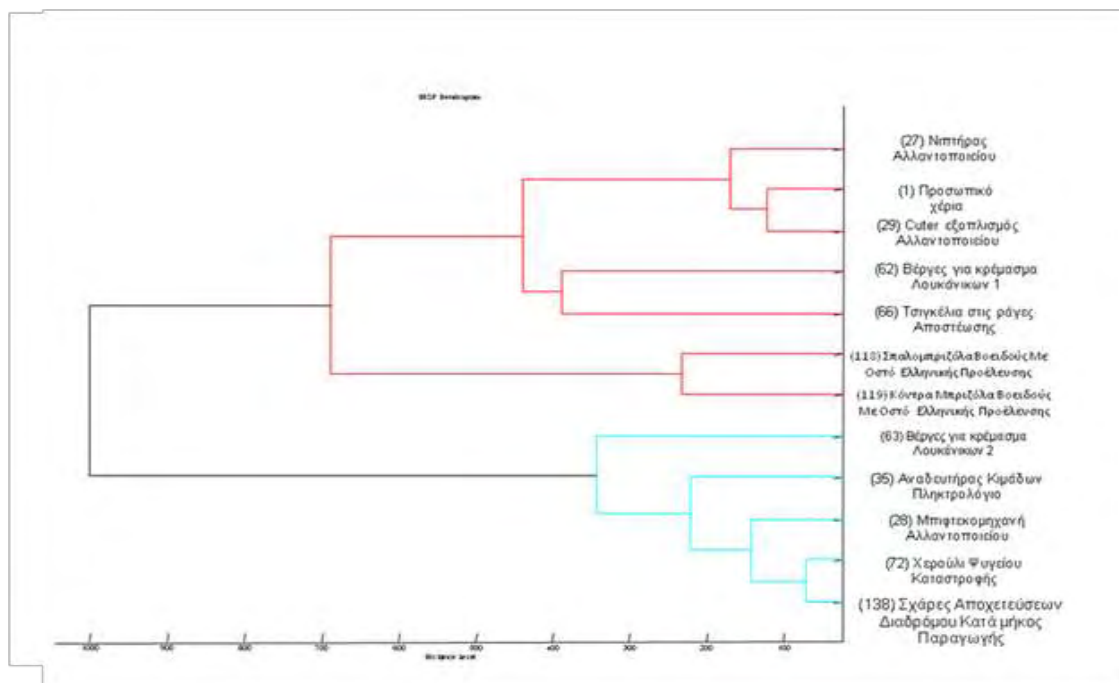
Πίνακας 1212: Πίνακας με τα ταυτοποιημένα στελέχη *L. welshimeri*

Προέλευση δειγμάτων	Είδος <i>Listeria</i> spp	Βαθμολογία
Τείχη στο τμήμα της Αποστέωσης	<i>L. welshimeri</i>	2.254
Πάγκος Βελονιστή	<i>L. welshimeri</i>	2.117
Σύνολο	2	

5.3.3. Δενδρόγραμμα MSP *L. monocytogenes*

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη συγγένειας μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών της *L. monocytogenes* από διαφορετικές πηγές προέλευσης κατασκευάστηκε ένα δενδρόγραμμα βασικού φάσματος (MSP) με βάση το πρωτεϊνικό τους προφίλ. Όπως φαίνεται στο δενδρόγραμμα, αναπτύχθηκαν τρία συγγενικά clusters (δύο κόκκινα και ένα μπλε). Το πρώτο cluster περιλαμβάνει τα στελέχη (27) Νιπτήρας αλλαντοποιείου, (1) Προσωπικό χέρια, (29) Cuter αλλαντοποιείου, (62) Βέργες για κρέμασμα λουκάνικων και (66) Τσιγκέλια στις ράγες αποστέωσης. Το δεύτερο cluster περιλαμβάνει τα στελέχη (118) Σπαλομπριζόλα βοοειδούς με οστό, Ελληνικής εκτροφής και (119) Κόντρα μπριζόλα βοοειδούς με οστό, Ελληνικής εκτροφής. Το τρίτο cluster περιλαμβάνει τα στελέχη (63) Βέργες για κρέμασμα λουκάνικων, (35) Πληκτρολόγιο αναδευτήρα κιμάδων, (28) Μπιφτεκομηχανή αλλαντοποιείου, (72) Χερούλι ψυγείου καταστροφής και (138) Σχάρες αποχετεύσεων διαδρόμου κατά μήκος της παραγωγής.

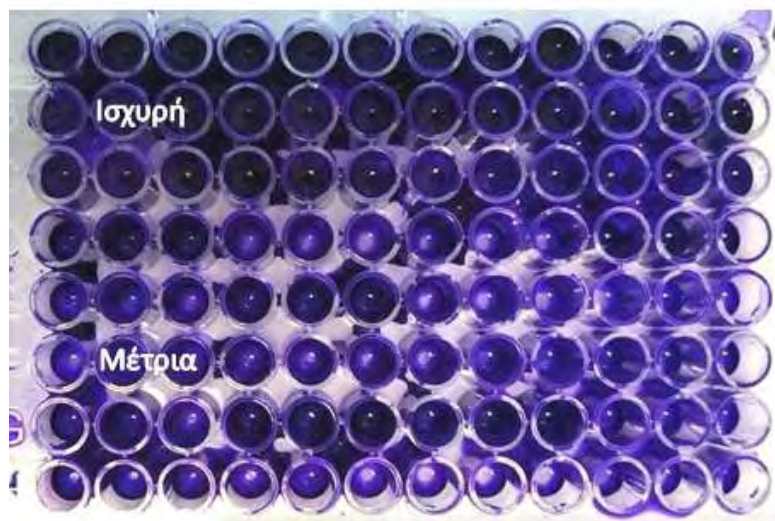
Παρατηρήθηκε πως το 2^ο cluster αφορά προϊόντα νωπά, που προέρχονται από αυτοτελή τεμάχια κρέατος και μάλιστα από βοοειδή Ελληνικής εκτροφής που αποθηκεύονταν στο ψυγείο συντήρησης.



Εικόνα 66: Δενδρόγραμμα MSP στελεχών *L. monocytogenes*

5.3.4 Αποτελέσματα ελέγχου της ικανότητας σχηματισμού βιομεμβρανών των απομονωθέντων στελεχών *L. monocytogenes*.

Σύμφωνα με τις προκύπτουσες τιμές οπτικής πυκνότητας του Πίνακα 13 τα 11 δείγματα παρουσίασαν ισχυρή ικανότητα παραγωγής βιομεμβρανών. Αυτά είναι : (1) προσωπικό, (27) νιπτήρας αλλαντοποιείου, (28) μπιφτεκομηχανή αλλαντοποιείου, (29) cutter εξοπλισμός αλλαντοποιείου, (35) πληκτρολόγιο αναδευτήρα κιμάδων, (62) βέργες για κρέμασμα λουκάνικων 1, (63) τσιγκέλια αποστέωσης 1, (66) τσιγκέλια στις ράγες αποστέωσης, (72) χερούλι ψυγείου καταστροφής, (118) σπαλομπριζόλα βοοειδούς με οστό, ελληνικής προέλευσης, (119) κόντρα μπριζόλα βοοειδούς με οστό, ελληνικής προέλευσης, (138) σχάρες αποχετεύσεων διαδρόμου κατά μήκος της παραγωγής. Εξάιρεση αποτελεί το δείγμα 72 (χερούλι ψυγείου καταστροφής), το οποίο παρουσίασε μέτρια ικανότητα παραγωγής βιομεμβρανών.



● $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ αδύναμη παραγωγή (0.26 : 0.56) ● $2 \times OD_c < OD < 4 \times OD_c$ μέτρια παραγωγή (0.26x2 : 0.52) ● $4 \times OD_c < OD$ ισχυρή παραγωγή (0.26x4 : 1.04)

Εικόνα 77: Έλεγχος των *L. monocytogenes* στελεχών για την παραγωγή βιομεμβρανών με τη μέθοδο μικροτιτλοποίησης πλακών (microtiter plates)

Πίνακας 1313: Πίνακας ικανότητας σχηματισμού βιομεμβρανών των απομονωθέντων στελεχών *L. monocytogenes*

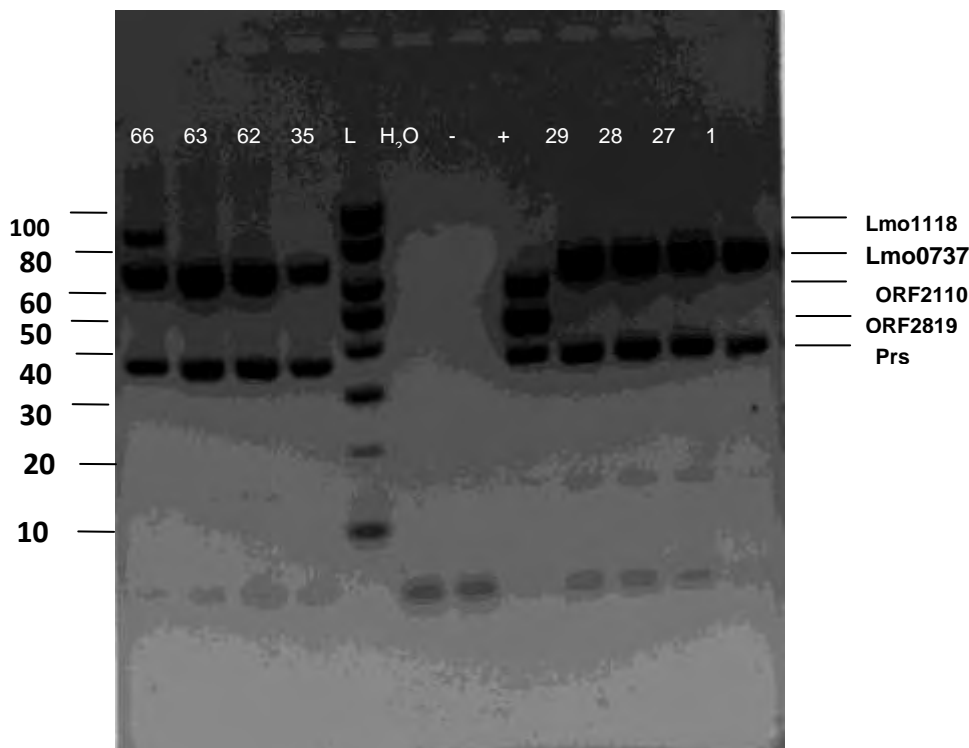
Δείγματα με στελέχη <i>L.monocytogenes</i>	Βαθμολογία	Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων	Μέση τιμή οπτικής πυκνότητας : 0.26
(1)* Προσωπικό	1.40	ΙΣΧΥΡΗ	(1.04<1.40)
(27) Νιπτήρας αλλαντοποιείου	1.26	ΙΣΧΥΡΗ	
(28) Μπιφτεκομηχανή αλλαντοποιείου	1.128	ΙΣΧΥΡΗ	
(29) Cuter εξοπλισμός αλλαντοποιείου	1.35	ΙΣΧΥΡΗ	
(35) Πληκτρολόγιο Αναδευτήρα Κιμάδων	1.07	ΙΣΧΥΡΗ	
(62) Βέργες για κρέμασμα Λουκάνικων 1	1.24	ΙΣΧΥΡΗ	
(63) Τσιγκέλια Αποστέωσης 1	1.26	ΙΣΧΥΡΗ	
(66) Τσιγκέλια στις ράγες Αποστέωσης	1.14	ΙΣΧΥΡΗ	
(72) Χερούλι Ψυγείου Καταστροφής	0.99	ΜΕΤΡΙΑ	(0.52<0.99<1.04)
(118) Σπαλομπριζόλα Βοειδούς Με Οστό Ελληνικής Προέλευσης	1.2	ΙΣΧΥΡΗ	
(119) Κόντρα Μπριζόλα Βοειδούς Με Οστό Ελληνικής Προέλευσης	1.37	ΙΣΧΥΡΗ	
(138) Σχάρες Αποχετεύσεων Διαδρόμου Κατά μήκος Παραγωγής	1.24	ΙΣΧΥΡΗ	

(*) Κωδικός δείγματος

Βάσει των ανωτέρω αποτελεσμάτων, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να παράγει βιομεμβράνες πάνω σε διάφορων ειδών υλικά και μάλιστα σε υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται κατά κόρων στις βιομηχανίες τροφίμων. Είναι λοιπόν κρίσιμο να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίο μπορεί να παραμένει και επιβιώνει στους χώρους επεξεργασίας ώστε να μπορεί να ελεγχθεί η μόλυνση των τροφίμων από το μικρόβιο αυτό. Παράλληλα, διεγείρονται

πολλά ερωτήματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων καθαρισμού και απολύμανσης που χρησιμοποιούν οι βιομηχανίες τροφίμων. Οι βιομηχανίες είναι επιτακτικό να επενδύουν σε ένα ολοκληρωμένο σύστημα απολύμανσης αλλά και ελέγχου ώστε να διαπιστώνεται η ολοκληρωτική εξάλειψη των βιομεμβρανών της *L.monocytogenes* από τους χώρους με τους οποίους έρχονται σε επαφή τα τρόφιμα και οι εργαζόμενοι.

5.3.5. Αποτελέσματα προσδιορισμού οροτύπων της *L. monocytogenes* με την εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).



Εικόνα 88: Οροτύπηση της *L. monocytogenes* με την εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Τα αποτελέσματα της PCR κατέδειξαν ότι το γονίδιο *prs*, ενδεικτικό της ταυτοποίησης *Listeria* spp., ανιχνεύτηκε σε όλα τα στελέχη. Το σύνολο των στελεχών κατενεμήθη σε 2 ομάδες οροτύπων. Δέκα στελέχη εξ αυτών βρέθηκε ότι ανήκουν στην Πα (1/2a και 3a) σε ποσοστό 83,3%, ένα στέλεχος στην Πc (1/2c και 3c) σε ποσοστό 8,3%, ενώ ένα στέλεχος σε ποσοστό 8,3% βρέθηκε μη τυποποιημένο. Τα στελέχη (1) Προσωπικό, (27) Νιπτήρας αλλαντοποιείου, (28) Μπιφτεκομηχανή αλλαντοποιείου, (29) Cuter εξοπλισμός αλλαντοποιείου, (35) Πληκτρολόγιο Αναδευτήρα Κιμάδων, (62) Βέργες για κρέμασμα Λουκάνικων 1, (63) Τσιγκέλια Αποστέωσης 1, (118) Σπαλομπριζόλα Βοοειδούς με οστό, Ελληνικής Προέλευσης, (119) Κόντρα Μπριζόλα Βοοειδούς με οστό, Ελληνικής Προέλευσης, (138) Σχάρες Αποχετεύσεων διαδρόμου κατά μήκος της Παραγωγής, ανήκουν στον ορότυπο Πα και το στέλεχος (66) Τσιγκέλια στις ράγες Αποστέωσης ανήκουν στον ορότυπο Πc. Στο στέλεχος (72) Χερούλι Ψυγείου Καταστροφής δεν μπόρεσε να γίνει μοριακή οροτύπηση. Στον Πίνακα 14 περιγράφονται οι ορότυποι του κάθε στελέχους που ανιχνεύθηκαν.

Πίνακας 1414: Κατανομή ορότυπων των στελεχών της *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν

Στέλεχος	Προέλευση	Ορότυποι
(1)* Προσωπικό	Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Πα
(27) Νιπτήρας αλλαντοποιείου	Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Πα
(28) Μπιφτεκομηχανή αλλαντοποιείου	Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Πα
(29) Cuter εξοπλισμός αλλαντοποιείου	Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Πα
(35) Πληκτρολόγιο Αναδευτήρα Κιμάδων	Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Πα
(62) Βέργες για κρέμασμα Λουκάνικων 1	Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Πα
(63) Τσιγκέλια Αποστέωσης 1	Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Πα
(66) Τσιγκέλια στις ράγες Αποστέωσης	Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Πc
(118) Σπαλομπριζόλα βοοειδούς με οστό, Ελληνικής Προέλευσης	Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Πα
(119) Κόντρα μπριζόλα βοοειδούς με οστό, Ελληνικής Προέλευσης	Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Πα
(138) Σχάρες Αποχετεύσεων διαδρόμου κατά μήκος Παραγωγής	Εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος	Πα

(*) Κωδικός δείγματος

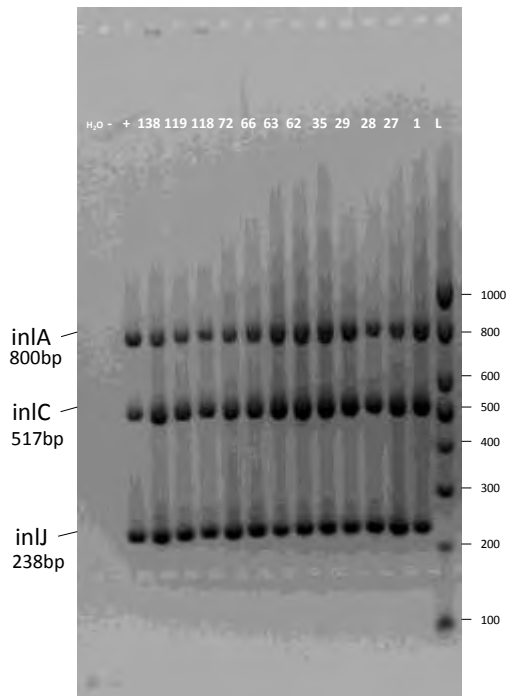
Αναφορικά με τους ορότυπους που ταυτοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε πως 1/2a και 1/2c είναι οι πιο συχνόι στα τρόφιμα και ενοχοποιούνται για την εκδήλωση της ανθρώπινης λιστερίωσης. Συγκεκριμένα ο 1/2a ταυτοποιήθηκε τόσο στο προσωπικό και στον εξοπλισμό των εγκαταστάσεων όσο και στα νωπά προϊόντα κρέατος γεγονός που αποδεικνύει την ικανότητα του συγκεκριμένου στελέχους να επιβιώνει και να αναπαύεται σε μεγάλο εύρος των βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα κανένα στέλεχος που να αφορά τα ΕΚΤ δεν ταυτοποιήθηκε ως

Listeria spp. γεγονός το οποίο καταδεικνύει την επιβίωση του παθογόνου εντός της εγκατάστασης του εργοστασίου. Επομένως, ο υψηλός επιπολασμός της *L. monocytogenes* στις βιομηχανίες επεξεργασίας κρέατος αποδίδεται, κατα κύριο λόγο, στην μη ορθή τήρηση των κανόνων υγιεινής.

5.3.6. Αποτελέσματα της λοιμογόνου δράσης της *L. monocytogenes* με την εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).

Η ταυτότητα των ειδών των 12 στελεχών *L. monocytogenes* επικυρώνεται μέσω του σχηματισμού μιας ζώνης 800 bp με τους εκκινητές με *inlA* γονίδια ενώ η πιθανή λοιμογόνος δράση αυτών των στελεχών επιβεβαιώνεται από την παραγωγή ζωνών 517 bp και 238 bp χρησιμοποιώντας τους εκκινητές με *inlC* και *inlJ* γονίδια. Τα αποτελέσματα, όπως απεικονίζονται στην Εικόνα 9, έδειξαν ότι και στα 12 στελέχη *L. monocytogenes* ανιχνεύθηκαν τα γονίδια *inlA*, *inlC* και *inlJ* επιβεβαιώνοντας την μολυσματική ικανότητα των στελεχών που εξετάστηκαν.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και η παρουσία των *inlC* και *inlJ* σε ένα δεδομένο στέλεχος *L. monocytogenes* υποδηλώνει την πιθανή μολυσματικότητα και την ικανότητά του να επιφέρει το θάνατο μέσω της ενδοπεριτοναϊκής οδού, δεν σημαίνει απαραίτητα ότι και τα στελέχη, που φέρουν τα γονίδια αυτά, μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο μέσω της συμβατικής κατάποσης από το στόμα (Liu et al., 2007).



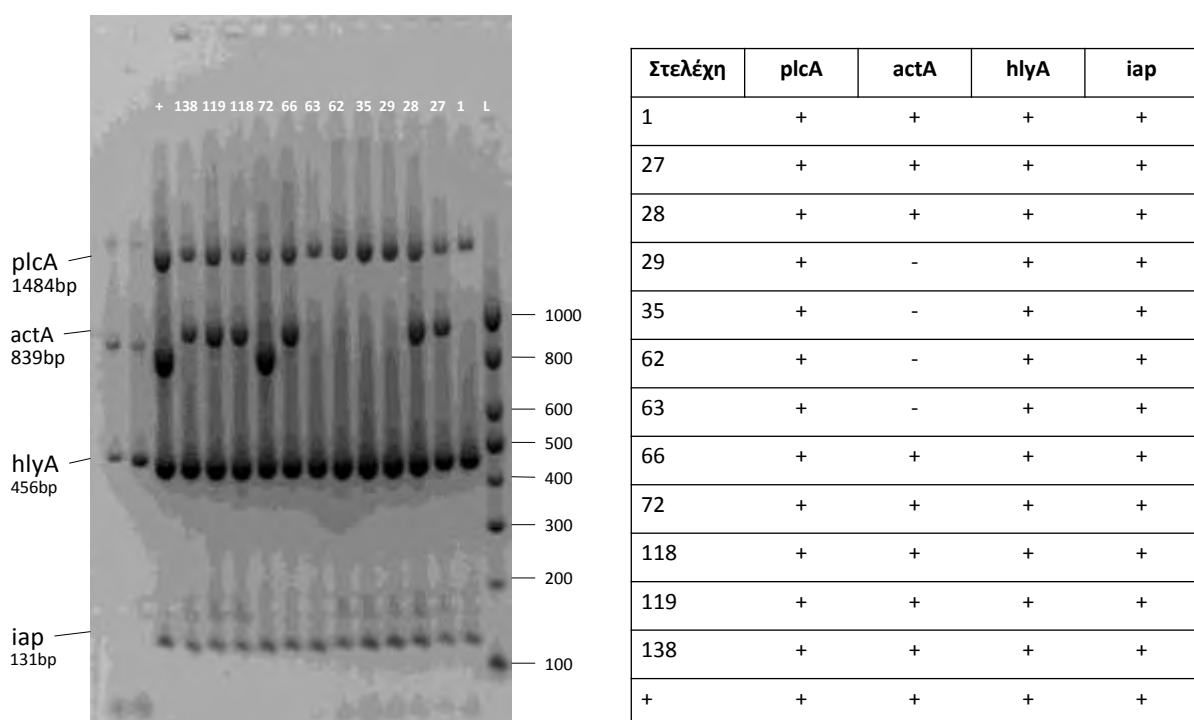
Στελέχη	inlA	inlC	inlJ
1	+	+	+
27	+	+	+
28	+	+	+
29	+	+	+
35	+	+	+
62	+	+	+
63	+	+	+
66	+	+	+
72	+	+	+
118	+	+	+
119	+	+	+
138	+	+	+
+	+	+	+

Εικόνα 99: Πηκτή αγαρόζης ηλεκτροφόρησης των στελεχών με τη χρήση των γονιδίων *inlA*, *inlC* και *inlJ*.

Είναι πολύ σημαντικό να διαχωρίζονται τα μολυσματικά από τα μη παθογόνα στελέχη του βακτηρίου, τα οποία είναι και σχετικά ακίνδυνα, προκειμένου να γίνεται αποτελεσματικότερος έλεγχος της παρουσίας της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον και στα τρόφιμα. Η ταυτόχρονη χρήση και των δύο εκκινητών, *inlC* και *inlJ*, επιβεβαιώνει εις διπλούν τη μολυσματική δράση των στελεχών της *L. monocytogenes*. Όπως βλέπουμε στα αποτελέσματα, όλα τα στελέχη ήταν θετικά στους εκκινητές αυτούς, επομένως όλα τα στελέχη έχουν μολυσματική ικανότητα, κάνοντας επιτακτική την ανάγκη για περισσότερους και πιο ενδελεχούς εργαστηριακούς ελέγχους παθογονικότητας στα τρόφιμα, ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες κατανάλωσης τροφίμων που μπορούν να πλήξουν την δημόσια υγεία.

Στην Εικόνα 10 απεικονίζεται η παρουσία των γονιδίων *plcA*, *actA*, *hlyA* και *iap* στα εξεταζόμενα στελέχη, που ανιχνεύθηκαν από τον σχηματισμό των αναμενόμενων ζωνών σε 1484, 839, 456 και 131 hr αντίστοιχα. Σε όλα τα εξεταζόμενα στελέχη έγινε εμφανής η παρουσία των γονιδίων *plcA*, *actA*, *hlyA* και *iap* εκτός από τα δείγματα (29) Cuter εξοπλισμός αλλαντοποιείου, (35) Πληκτρολόγιο Αναδευτήρα Κιμάδων, (62) Βέργες για κρέμασμα Λουκάνικων 1, (63) Τσιγκέλια Αποστέωσης 1, τα οποία ήταν αρνητικά όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου *actA*.

Όπως συμπεραίνουμε και από τα αποτελέσματα, το γονίδιο *plcA*, το οποίο εμφανίζεται μόνο σε παθογόνα στελέχη τη *L. monocytogenes*, παρουσιάστηκε σε όλα τα εξεταζόμενα στελέχη. Παράλληλα, το γονίδιο *hlyA*, το οποίο είναι ένας σημαντικός δείκτης για την ταυτοποίηση της *L. monocytogenes* ενώ ταυτόχρονα κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία είναι απαραίτητη για τη παθογονικότητα του μικροβίου, εμφανίστηκε επίσης σε όλα τα στελέχη (Law et al., 2015). Κρίνεται λοιπόν όπως αναφέραμε και ανωτέρω κρίσιμη η ανάγκη για περισσότερους ελέγχους τόσο από τις επιχειρήσεις όσο και από το κράτος ώστε να διαφυλάσσεται η ασφάλεια των καταναλωτών.



Εικόνα 1010: Πηκτή αгарόζης ηλεκτροφόρησης των στελεχών με γονίδια *plcA*, *actA*, *hlyA* και *iap*

5.4 Συζήτηση

Η *L. monocytogenes* είναι ένα παθογόνο, το οποίο ανιχνεύεται πολύ συχνά στα προϊόντα κρέατος και μάλιστα η εμφάνισή της παρατηρείται σε όλα τα στάδια της παραγωγής, από το ίδιο το ζώο μέχρι και τα καταστήματα πώλησης του κρέατος και των προϊόντων του. Σύμφωνα και με άλλες έρευνες, που έχουν διεξαχθεί σχετικά με την ανίχνευση της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα, το παθογόνο παρουσιάζεται κυρίως στον εξοπλισμό και στις επιφάνειες επεξεργασίας των βιομηχανιών τροφίμων, ενώ η παρουσία του στο ίδιο το ζώο δεν σημαίνει απαραίτητα και την παρουσία του στο προς κατανάλωση τρόφιμο (Kurpas et al., 2018).

Η ποικιλομορφία των στελεχών που απομονώνονται από τις επιφάνειες επεξεργασίας αλλά και από τα ίδια τα προϊόντα, ενδεχομένως να οφείλεται είτε στη συνεχή μόλυνσή τους από τις πρώτες ύλες είτε στην ανθεκτικότητα κάποιων στελεχών έναντι των διαδικασιών καθαρισμού και απολύμανσης. Οι Lundén et al. (2003a, b) και Thevenot et al. (2006) ανέφεραν την παρουσία παροδικών (σποραδικών) αλλά και μόνιμων (επίμονων) στελεχών σε μονάδες επεξεργασίας κρέατος. Η *L. monocytogenes* δύναται να αναπτυχθεί στο περιβάλλον επεξεργασίας και να επιβιώσει για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Έρευνα των Giovannacci et al. (1999) και Lundén et al. (2002) ανέφερε την επιβίωση του παθογόνου για χρονικό διάστημα περισσότερο του ενός έτους σε δυο μονάδες επεξεργασίας χοιρινού κρέατος και για 3 χρόνια σε μια μηχανή λείανσής του. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία είναι προφανές ότι ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες τροφίμων είναι ένας πολύ κρίσιμος παράγοντας ως προς την επιμόλυνση των τροφίμων από το συγκεκριμένο παθογόνο.

Παράλληλα, κρίσιμος παράγοντας είναι και το προσωπικό το οποίο εργάζεται στις βιομηχανίες τροφίμων καθώς μπορεί να μεταφέρει διάφορους μικροοργανισμούς στους χώρους των εγκαταστάσεων μιας βιομηχανίας ενισχύοντας τη διασταυρούμενη μόλυνση. Στην παρούσα έρευνα βρέθηκε θετικός σε *L. monocytogenes* ένας εργαζόμενος με την ιδιότητα χειριστή τροφίμων, ο οποίος εργάζεται παράλληλα σε δύο χώρους της παραγωγικής διαδικασίας (στο τμήμα της αλλαντοποίησης και στο τμήμα της συσκευασίας). Το εύρημα αυτό ισχυροποιείται από άλλες σχετικές έρευνες οι οποίες απέδειξαν πως στις βιομηχανίες τροφίμων το ενδεχόμενο μιας διασταυρούμενης μόλυνσης είναι μεγάλο δεδομένης της μετακίνησης των εργαζομένων στο περιβάλλον των εγκαταστάσεων από χώρους που πληρούν αυστηρούς κανόνες υγιεινής σε άλλους χώρους που χαρακτηρίζονται ελαστικότεροι ως προς την τήρησή τους (Aalto-Aranedo et al., 2019).

Στην παρούσα έρευνα εξετάστηκαν συνολικά 303 δείγματα νωπού κρέατος θηλαστικών και πουλερικών, έτοιμα-προς-κατανάλωση τρόφιμα, αλλαντικά ωρίμανσης και παρασκευάσματα κρέατος. Από τα 55 δείγματα που αφορούσαν τον εξοπλισμό, τα 7 (12,72%) βρέθηκαν θετικά σε *Listeria* spp. εκ των οποίων τα 4 (7,28%) ταυτοποιήθηκαν ως *L. monocytogenes*. Όσον αφορά τις επιφάνειες επεξεργασίας, από τα 64 δείγματα τα 2 (3,13%) βρέθηκαν θετικά σε *Listeria* spp. και ταυτοποιήθηκαν ως *L. monocytogenes*. Κατά το διάστημα 2012-2013 διεξήχθη στην Ισπανία ανάλογη έρευνα από τους Gomez et al. (2015) με στόχο την ανίχνευση της *L. monocytogenes* σε τρόφιμα και στο περιβάλλον διαφόρων βιομηχανιών επεξεργασίας κρέατος της Ισπανίας. Η έρευνα βασίστηκε σε 129 δείγματα ΕΚΤ και 110 δείγματα από επιφάνειες επεξεργασίας και εξοπλισμού των βιομηχανιών. Για το σκοπό της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν μαγειρεμένα προϊόντα κρέατος, αλίπαστα προϊόντα και τεμαχισμένα αλλαντικά, τα οποία προέρχονταν από βιομηχανίες τροφίμων και καταστήματα λιανικής πώλησης της Ισπανίας. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από τις επιφάνειες και τον εξοπλισμό έξι βιομηχανιών επεξεργασίας κρέατος όπως μαχαίρια, επιφάνειες κοπής, δοχεία, τραπέζια κ.α. Τα δείγματα ελήφθησαν και κατά τη διαδικασία παραγωγής των προϊόντων αλλά και μετά τον καθαρισμό και την απολύμανση των επιφανειών. Σε τρόφιμα, τα οποία βρέθηκαν θετικά κατά την ημέρα μηδέν ανιχνεύθηκε *Listeria* spp. σε ποσοστά 17,14% σε μαγειρεμένα προϊόντα κρέατος, 36,84% σε αλίπαστα προϊόντα και 24,32% σε τεμαχισμένα αλλαντικά. Ο αριθμός των μονάδων δειγματοληψίας που υπερέβη το όριο ασφάλειας των τροφίμων των 100 cfu/g μειώθηκε κατά το χρονικό διάστημα από την ημερομηνία παρασκευής έως τη μισή διάρκεια ζωής τους και εν συνεχεία μειώθηκε περαιτέρω στο τέλος της διάρκειας ζωής τους. Κατά μέσο όρο, το 27,90% των ΕΚΤ από τις βιομηχανίες και από τα καταστήματα λιανικής πώλησης βρέθηκαν θετικά σε *L. monocytogenes*, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσης, κατά την οποία το παθογόνο δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα έτοιμα-προς-κατανάλωση τρόφιμα και σε κανένα από τα καταστήματα λιανικής. Όσον αφορά τα δείγματα από το περιβάλλον των βιομηχανιών, η *L. monocytogenes* ανιχνεύτηκε στα 25 από τα 110 δείγματα και συγκεκριμένα σε δεκαεπτά ληφθέντα από ανοξείδωτες επιφάνειες, έξι από ζώνες μεταφοράς και δύο από επιφάνειες κοπής. Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και στη παρούσα έρευνα καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των θετικών δειγμάτων (75%) απομονώθηκε από επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα ποσοστά θετικών δειγμάτων ήταν πολύ υψηλότερα στις επιφάνειες πριν τον καθαρισμό (84%) από ότι μετά την απολύμανση τους (16%). Τα στοιχεία των ανωτέρω ερευνών αποκαλύπτουν ότι ακόμη και μετά τον καθαρισμό και την απολύμανση των επιφανειών, είναι εμφανής η παρουσία της στον εξοπλισμό και στο περιβάλλον των βιομηχανιών, καθιστώντας αναγκαία την βελτίωση των μεθόδων εξυγίανσης.

Σε έρευνα που διεξήχθη επίσης στην Ελλάδα το 2004 και συγκεκριμένα στη Θεσσαλονίκη από τους Αγγελίδη και Κουτσουμάνη, συλλέχθηκαν 209 δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων κρέατος (θερμικής επεξεργασίας και ωρίμανσης) προερχόμενα από καταστήματα λιανικής μεγάλων αλυσίδων πώλησης τροφίμων της Ελλάδας. Τα 136 δείγματα προέρχονταν από Έλληνες παραγωγούς

ενώ τα 73 από προϊόντα εισαγόμενα από την Ευρώπη. Από το σύνολο των δειγμάτων, το 8,1% (17 δείγματα) ταυτοποιήθηκαν ως θετικά σε *L. monocytogenes*, ενώ παράλληλα από τα ίδια δείγματα βρέθηκαν 4 θετικά σε *L. innocua* και 8 σε *L. welshimeri*. Σύμφωνα με την παρούσα έρευνα από το σύνολο των εξετασθέντων δειγμάτων, 12 εξ αυτών βρέθηκαν μολυσμένα με *L. monocytogenes* (3,26%), 8 (2,64%) με *L. innocua* και 2 (0,66%) με *L. welshimeri*. Βάσει των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό θετικών δειγμάτων εμφανίστηκαν σε προϊόντα τα οποία ήταν τεμαχισμένα σε κύβους σε αντίθεση με αυτά που ήταν σε φέτες. Αντίστοιχα στη παρούσα έρευνα βρέθηκε μεγαλύτερο ποσοστό μολυσματικών οργανισμών σε λεπτοτεμαχισμένα προϊόντα κρέατος σε σχέση με τα αυτούσια κομμάτια. Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό θετικών δειγμάτων (8 από τα 17 δείγματα) προερχόταν από έναν συγκεκριμένο κατασκευαστή της Ευρωπαϊκής Ένωσης και όχι της Ελλάδας. Τέλος, 12 από τα 17 δείγματα που βρέθηκαν θετικά σε *L. monocytogenes* ήταν δείγματα μπέικον, ένα προϊόν που καταναλώνεται συνήθως (αλλά όχι πάντα) έπειτα από ήπια θερμική επεξεργασία.

Παρόμοια έρευνα διεξήχθη, κατά το διάστημα 2000-2002 από τους Peccio et al. (2003) σε σφαγείο βοοειδών και σε εργοστάσιο επεξεργασίας χοιρινού κρέατος στη βορειοανατολική Ιταλία. Συνολικά ελήφθησαν 97 δείγματα από επιφάνειες επεξεργασίας, μηχανήματα και εξοπλισμό των εγκαταστάσεων, αφού όμως είχε προηγηθεί καθαρισμός και απολύμανσή τους. Ελήφθησαν επίσης 24 δείγματα από αυτοτελή τεμάχια κρέατος και κιμά. Ανιχνεύτηκαν 26 θετικά δείγματα σε *L. monocytogenes*, τα οποία προέρχονταν από σφάγια ζώων της πρώτης εγκατάστασης, 3 θετικά δείγματα από τα μαχαίρια κοπής, τα οποία μάλιστα θεωρούνταν καθαρά και είχαν αποθηκευτεί για επόμενη χρήση, ενώ στη δεύτερη εγκατάσταση ανιχνεύτηκαν 5 θετικά δείγματα σε μερικώς επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος (αλατισμένο κιμά με μπαχαρικά) και σε νωπό χοιρινό κρέας. Παρόλο που η εμφάνιση της *L. monocytogenes* ήταν συχνή, η συγκέντρωσή της ήταν εντός των επιτρεπτών ορίων (110 cfu/g για την Ιταλία και 100 cfu/g για την Ευρώπη) (Peccio et al., 2003).

Έρευνα για την παρουσία της *L. monocytogenes* στο κρέας και συγκεκριμένα στο ερυθρό κρέας διεξήχθη από τους Al-mashhadany et al. (2016). Τριακόσια δεκαοχτώ δείγματα από κρέας βοοειδών, προβάτων και αιγών συνελέγησαν από το κεντρικό σφαγείο της Νταμάρ στην Υεμένη και από καταστήματα λιανικής πώλησης της περιοχής. Από τα δείγματα αυτά τα εβδομήντα τρία (22,9%) ταυτοποιήθηκαν ως *L. monocytogenes*. Συγκεκριμένα τα 26 εξ αυτών προέρχονταν από κρέας βοοειδών (26%), τα 27 από κρέας αιγών (25,5%) και τα 20 από κρέας προβάτου (17,9%).

Κατά το διάστημα 2009-2013, οι Kacaniovna et al. (2015) διεξήγαγαν έρευνα σε 100 δείγματα ΕΚΤ, κυρίως βραστών αλλαντικών, από διάφορα καταστήματα λιανικής πώλησης στη Σλοβακία. Σε αυτή την έρευνα, εφαρμόστηκε η μέθοδος Stepone real-time PCR αντί για multiplex PCR, η οποία συνίσταται στην επώαση των στελεχών για 2 λεπτά στους 95 °C, ακολουθούμενη από 40 κύκλους του ενός δευτερολέπτου

και μετουσίωση τους στους 95 °C και 20 δευτερόλεπτα πυράκτωση και επιμήκυνση των αλυσίδων του DNA στους 60 °C. Συνολικά το 40% των δειγμάτων εμφανίστηκε θετικό σε *L. monocytogenes* και συγκεκριμένα, τα δεκαεπτά από τα πενήντα δείγματα αφορούσαν θερμικώς επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος. Το μεγαλύτερο όμως ποσοστό των θετικών δειγμάτων (28%) παρατηρήθηκε σε προϊόντα κοτόπουλου. Στην παρούσα έρευνα από το σύνολο των παρασκευασμάτων (30 δείγματα) μόλις το 1 (3,33%) ταυτοποιήθηκε ως *L. innocua* και αφορούσε το σουβλάκι κοτόπουλο.

Καθώς η *L. monocytogenes* είναι σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο, το είδος περιλαμβάνει ένα φάσμα στελεχών με ποικίλη λοιμογονικότητα. Ενώ πολλά στελέχη της *L. monocytogenes* είναι φυσικώς μολυσματικά και ικανά να προκαλέσουν νοσηρότητα με σημαντική θνητότητα, κάποια είναι μη μολυσματικά και δεν είναι σε θέση να προξενήσουν μόλυνση στα θηλαστικά (Liu et al., 2007). Από τους 11 κοινούς οροτύπους *L. monocytogenes* (δηλ., 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d και 4e), πάνω από το 98% των κλινικά απομονωθέντων στελεχών από περιστατικά λιστερίωσης στον άνθρωπο, ανήκει μόνο σε τέσσερις οροτύπους, τους 4b, 1/2a, 1/2b και 1/2c. Άλλοι ορότυποι (ειδικά ο 4a) οι οποίοι απαντώνται κυρίως σε τρόφιμα και ζώα, σπάνια ευθύνονται για λοιμώξεις από *L. monocytogenes* στον άνθρωπο και δύσκολα επιφέρουν τον θάνατο. Αυτή η αξιοσημείωτη ποικιλομορφία στην παθογένεια μεταξύ των στελεχών της *L. monocytogenes* απαιτεί την ανάπτυξη ταχέων και αξιόπιστων εργαστηριακών μεθόδων, οι οποίες δύνανται να διακρίνουν εύκολα τα λοιμογόνα στελέχη από τα μη λοιμογόνα. Οι πληροφορίες σχετικά με τον επιπολασμό και την κατανομή μη μολυσματικών στελεχών της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα και στο περιβάλλον είναι μείζονος σημασίας τόσο για τον αποτελεσματικό έλεγχο όσο, κυρίως, για την πρόληψη της λιστερίωσης (Liu et al., 2007).

Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας σχετικά με τον προσδιορισμό των οροτύπων των απομονωθέντων στελεχών της *L. monocytogenes* με τη μέθοδο πολλαπλής PCR (multiplex PCR) κατέδειξαν πως το σύνολο των στελεχών ανήκουν σε 2 ομάδες οροτύπων: 10 στελέχη εξ αυτών ανήκουν στην Πα (1/2a και 3a) σε ποσοστό 83,3%, ένα στέλεχος στην Πc (1/2c και 3c) σε ποσοστό 8,3%, ενώ ένα στέλεχος βρέθηκε μη τυποποιήσιμο. Σχετική έρευνα για τον οροτυπικό προσδιορισμό της *L. monocytogenes* διεξήχθη και από τους Martin et al. (2014), οι οποίοι επεχείρησαν να ερευνήσουν την ποικιλομορφία και τη κατανομή της *L. monocytogenes* σε ισπανικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας κρέατος. Συνέλεξαν 96 στελέχη από εγκαταστάσεις παραγωγής κρέατος και συγκεκριμένα 33 από τις επιφάνειες επαφής με τα τρόφιμα, 53 από ΕΚΤ και 10 από νωπά προϊόντα κρέατος. Η ταυτοποίηση των οροτύπων στη δική τους έρευνα πραγματοποιήθηκε επίσης με multiplex PCR. Οι ορότυποι που παρουσιάστηκαν ήταν οι 1/2a (36,8%), 1/2c (34%), 1/2b (17,9%) και 4b (11,3%). Ο ορότυπος 1/2a ήταν ο πιο συχνός στις επιφάνειες των εγκαταστάσεων (45,5%) ενώ ο 1/2c και 1/2b στα προϊόντα κρέατος (38,4%). Βάσει των ανωτέρω αποτελεσμάτων συνάγεται ότι ο ορότυπος 1/2a απαντάται ως επί το πλείστον στις επιφάνειες των εγκαταστάσεων ενώ οι ορότυποι 1/2c και 1/2b στα προϊόντα κρέατος. Ταυτόχρονα, στην ίδια έρευνα έγινε ταυτοποίηση των γονότυπων με πολυτοπικό προσδιορισμό

αλληλουχιών γονιδιακών τόπων (MLST) μια τεχνική που σχεδιάστηκε για την επιδημιολογική διερεύνηση των στελεχών της *L. monocytogenes*. Με την MLST, το ST9 (1/2c) χαρακτηρίστηκε ως το πλέον κυρίαρχο αλληλόμορφο προφίλ (33% των απομονωθέντων στελεχών) ακολουθούμενο από το ST121 (16%). Τα ανωτέρω προφίλ ανιχνεύθηκαν σε εργοστάσια επεξεργασίας κρέατος και σε δείγματα από προϊόντα κρέατος που ελήφθησαν σε διαφορετικά έτη, καταδεικνύοντας ότι τα συγκεκριμένα βακτήρια προσαρμόζονται ιδιαίτερα εύκολα στο περιβάλλον. Οι επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας θεωρήθηκαν ως σημαντική πηγή της *L. monocytogenes* σε προϊόντα κρέατος, επειδή τα ίδια STs προέρχονταν από δείγματα, τα οποία ελήφθησαν τόσο από τις επιφάνειες όσο και από τα προϊόντα. Η *L. monocytogenes* ανιχνεύθηκε αφού ήδη είχαν πραγματοποιηθεί διαδικασίες εξυγίανσης στα δύο εργοστάσια επεξεργασίας, καθιστώντας επιτακτικό τον συστηματικό καθαρισμό και απολύμανση των εγκαταστάσεων.

Έρευνα σχετική με τους ορότυπους, που εμφανίζονται σε απομονωθέντα στελέχη, διεξήχθη και από τους Oliveira et al. (2018). Ο σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας ήταν η εξέταση της παρουσίας *L. monocytogenes* σε βιομηχανίες επεξεργασίας κοτόπουλου στη Βραζιλία και η ταυτοποίηση των οροτύπων λοιμογονικότητας των θετικών στελεχών. Κατά την έρευνα συγκεντρώθηκαν 195 δείγματα από σφάγια και κομμάτια κοτόπουλου και η ταυτοποίηση των ορότυπων και γονότυπων των θετικών στελεχών πραγματοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση με multiplex PCR. Από τα 195 απομονωθέντα δείγματα, τα 38 (17,9%) βρέθηκαν θετικά σε *L. monocytogenes* και τα 41 (21%) σε *L. innocua*. Το μεγαλύτερο ποσοστό επιμόλυνσης με *L. monocytogenes* εμφανίστηκε σε κομμάτια κοτόπουλου, τα οποία είχαν ήδη κοπεί και συσκευαστεί (11,3%) ενώ στα σφάγια εμφανίστηκε θετικό το 8,3% των δειγμάτων. Αναφορικά με τους ορότυπους που ταυτοποιήθηκαν, το 87% ανήκε στον 1/2a, το 8% στον 1/2c και το 5% στον 1/2b, οι οποίοι είναι και οι πιο συχνόι στα τρόφιμα. Τα ανωτέρω αποτελέσματα συνάδουν με τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας καθώς η πλειοψηφία των θετικών στελεχών της δειγματοληψίας προσδιορίστηκαν στους ορότυπους 1/2a και 1/2c.

Οι Stoller et al. (2019) ανέλυσαν 124 δείγματα θετικά σε *L. monocytogenes*, προερχόμενα από προϊόντα κρέατος, καθώς και το περιβάλλον μιας εγκατάστασης επεξεργασίας κρέατος στην Ελβετία κατά το διάστημα 2015-2018. Βάσει των αποτελεσμάτων της έρευνας, η πλειοψηφία των στελεχών ανήκαν επίσης στην ομάδα οροτύπων II (58,9%, ορότυποι 1/2c και 3c), το 38,7% ανήκε στην ομάδα I (1/2a και 3a) ενώ το 2,4% ανήκε στην ομάδα IV (4b, 4d και 4e).

Παρόμοια έρευνα διεξήχθη επίσης σε 43 πόλεις της Κίνας από τους Chen et al. (2019), οι οποίοι εξέτασαν σε καταστήματα λιανικής πώλησης 1.212 δείγματα νωπού κρέατος και προϊόντων κρέατος, προερχόμενα από κοτόπουλο, μοσχάρι, αμνοερίφια, χοιρινό, πάπια κ.α. Ο επιπολασμός της *L. monocytogenes* στα δείγματα αυτά ανήλθε

σε 29,9% (362/1.212). Η πλειοψηφία των μολυνθέντων δειγμάτων προέρχονταν από αμνοερίφια (51,1%) και από κοτόπουλο (40,5%) ενώ σε μικρότερα ποσοστά από χοιρινό (18,5%), πάπια (11,7%) και αλλαντικά (16,7%). Η μοριακή ορομάδα ανιχνεύθηκε με πολλαπλή PCR σε 458 στελέχη *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από σύνολο 362 θετικών δειγμάτων. Τα στελέχη αυτά ανήκαν στους ορότυπους 1/2a-3a (45%), 1/2c-3c (26,9%), 1/2b-3b (23,3%) και κανένα στους ορότυπους 4a-4c. Το μεγαλύτερο ποσοστό των θετικών δειγμάτων βρέθηκε εντός των επιτρεπτών ορίων ενώ το 3,9% (κυρίως κοτόπουλο) βρέθηκε άνω των επιτρεπτών ορίων. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας καθώς από τα 45 δείγματα νωπών κρεάτων (θηλαστικών και πουλερικών) τα 3 (6,66%) αναγνωρίστηκαν ως *Listeria* spp. Από αυτά τα 2 (4,44%) ταυτοποιήθηκαν ως *L. monocytogenes* και το 1 (2,22%) ως *L. innocua*. Και τα 3 θετικά δείγματα αφορούσαν νωπό κρέας βοοειδούς, ενώ με την ταυτοποίηση των ορότυπων που έγινε επίσης με τη μέθοδο πολλαπλής PCR ανιχνεύτηκαν ομοίως οι ορότυποι 1/2a-3a και 1/2c-3c. Οι ερευνητές αποδίδουν τον υψηλό επιπολασμό της *L. monocytogenes* στο κρέας και στα προϊόντα του, κατα κύριο λόγο, στην μη ορθή τήρηση των κανόνων υγιεινής.

Παράλληλα, στην Ιαπωνία από τους Maung et al. (2019) διεξήχθη έρευνα σε δείγματα κρέατος κοτόπουλου, τα οποία ελήφθησαν το 2017 από διάφορα καταστήματα λιανικής πώλησης στην Fukuoka. Οι ερευνητές συνέκριναν τα παραπάνω δείγματα με αντίστοιχα, που είχαν εξετασθεί το 2012. Συνολικά εξέτασαν 50 και 85 δείγματα κοτόπουλου στις δύο χρονιές αντίστοιχα. Σαράντα πέντε από τα 85 δείγματα (53%) βρέθηκαν θετικά σε *L. monocytogenes* το 2012 και μόνο δώδεκα από τα 50 δείγματα (24%) το 2017. Συνολικά, απομονώθηκαν 153 στελέχη *L. monocytogenes* από δείγματα του 2012 και 29 στελέχη από δείγματα του 2017. Τα στελέχη αυτά ανήκαν στους ορότυπους 1/2a (21,5%), 1/2b (73,9%), 1/2c (1,5%) και 4b/4e (3,1%) για το 2012 ενώ για το 2017 στους 1/2a (48,3%) και 1/2b (51,7%). Η συγκεκριμένη έρευνα προχώρησε στην ανίχνευση του γονιδίου *hlyA* που σχετίζεται με λοιμογόνο δράση των στελεχών και κωδικοποιεί την τοξίνη LLO. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν πως σε όλα τα απομονωμένα στελέχη του παθογόνου κατά το 2012 ανιχνεύθηκε το συγκεκριμένο γονίδιο, ενώ στην έρευνα του 2017 μόνο τα 17 (58,6%) από τα 29 στελέχη ήταν φορείς. Στην παρούσα έρευνα, δεν βρέθηκε κανένα θετικό δείγμα σε *L. monocytogenes* προερχόμενο από κοτόπουλο. Ωστόσο το γονίδιο *hlyA* ανιχνεύθηκε σε όλα τα υπόλοιπα απομονωθέντα στελέχη. Στην έρευνα των Maung et al. (2019) διαπιστώθηκε επίσης σημαντική μείωση παρουσίας της *L. monocytogenes* μεταξύ των ετών 2012 και 2017, γεγονός το οποίο καταδεικνύει την σημασία τήρησης των κανόνων ορθής υγιεινής στη μείωση του πληθυσμού του μικροβίου.

Άλλες έρευνες που διεξήχθησαν για τον προσδιορισμό της λοιμογόνου δράσης των γονιδίων της *Listeria* είναι αυτή των Kotzamanidis et al. (2019), οι οποίοι ερεύνησαν την παρουσία *L. monocytogenes* αυτή τη φορά σε δείγματα γάλακτος από φάρμες προβάτων επίσης της βόρειας και κεντρικής Ελλάδας κατά το διάστημα 2007-2012.

Χρησιμοποίησαν την μέθοδο απομόνωσης του παθογόνου με βάση το πρωτόκολλο της ISO 11290-1 και την πολλαπλή PCR για την ταυτοποίηση των σχετιζόμενων με τη λοιμογόνο δράση γονιδίων, όπως και στη δική μας έρευνα. Στο σύνολο των 147 δειγμάτων, τα 26 βρέθηκαν θετικά σε *L. monocytogenes*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCR, το γονίδιο *prs* ανιχνεύτηκε σε όλα τα στελέχη και προσδιορίστηκαν 3 ομάδες οροτύπων: IVb 57% (4b, 4d και 4e), IIa 23% (1/2a και 3a) και IVa 8%.

Έρευνα που διεξήχθη στην πόλη Τετουάν του Μαρόκου από τους Amajoud et al (2017), βασίστηκε σε 1.096 δείγματα τροφίμων από βοδινό κρέας και κοτόπουλο, τα οποία εξετάστηκαν ως προς την παρουσία των *Listeria* spp.. Εμφανίστηκαν 80 δείγματα θετικά σε *Listeria* spp., εκ των οποίων τα 16 (1,5%) βρέθηκαν θετικά σε *L. monocytogenes*. Συγκεκριμένα το 2,7% των θετικών δειγμάτων σε *L. monocytogenes* ανήκαν σε προϊόντα βοδινού κρέατος, όπως και στην παρούσα έρευνα όπου το 4,44% των θετικών δειγμάτων *L. monocytogenes* προήλθε από κρέας βοοειδών. Η ταυτοποίηση των ομάδων οροτύπων πραγματοποιήθηκε με multiplex PCR. Τα θετικά αυτά δείγματα ανήκαν στις ομάδες οροτύπων IVb (87,5%) και IIa (12,5%). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε την συγγένεια μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών της *L. monocytogenes* με την παρουσία 3 clusters, επισημαίνοντας την ύπαρξη κοινών πηγών μόλυνσης. Η μελέτη αυτή καταδεικνύει τη σημασία της μικροβιολογικής επιτήρησης της *L. monocytogenes* με στόχο την ελαχιστοποίηση της έκθεσης των καταναλωτών στο εν λόγω τροφιμογενές παθογόνο.

Σε πιο πρόσφατη έρευνα που διεξήχθη στην Τουρκία το 2017 από τους Sanlibaba et al. (2017), 201 δείγματα ΕΚΤ ελήφθησαν από τους τελικούς προορισμούς των τροφίμων (σούπερ μάρκετ, χώρους εστίασης, υπαίθριες αγορές). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των δειγμάτων για *L. monocytogenes* ήταν η ίδια που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα έρευνα βάσει του προτύπου ISO 11290, ενώ η ταυτοποίηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε παρομοίως με την χρήση της μεθόδου PCR. Βάσει των αποτελεσμάτων της έρευνας, η παρουσία των *Listeria* spp. ταυτοποιήθηκε στα 41 από τα 201 δείγματα και συγκεκριμένα το μεγαλύτερο ποσοστό (8,5%, 17 δείγματα) ταυτοποιήθηκε ως *L. monocytogenes*. Από τα 17 θετικά δείγματα σε *L. monocytogenes*, τα δεκαπέντε ομαδοποιήθηκαν σε ένα cluster, βάσει των φυλογενετικών σχέσεων τους, ενώ τα δύο δείγματα σε ένα δεύτερο cluster. Από αυτά τα δείγματα, το 41,2% προερχόταν από ερυθρό κρέας και το 23,5% από κοτόπουλο ενώ το υπόλοιπο ποσοστό δειγμάτων προέρχονταν από ψάρια, λαχανικά και γαλακτοκομικά προϊόντα. Εξάλλου τα αποτελέσματα της τεχνικής που εφαρμόστηκε κατά την παρούσα έρευνα για την κατασκευή δενδρογράμματος βασικού φάσματος (MSP), επιβεβαιώνουν την ύπαρξη συγγένειας μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών της *L. monocytogenes* από διαφορετικές πηγές προέλευσης και μάλιστα προσδιορίστηκαν 3 συγγενικά clusters. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδεικτικά της επικινδυνότητας που ενέχουν τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης ως προς τη *L. monocytogenes*. Κρίνεται, συνεπώς, ιδιαίτερα σημαντική η εφαρμογή πρακτικών ορθής υγιεινής, δεδομένου ότι τα τρόφιμα αυτά διέρχονται περισσότερα

στάδια επεξεργασίας σε σύγκριση με άλλες ομάδες τροφίμων όπως τα φυτικής προέλευσης.

Το 2017 από τους Madden et al. (2017) πραγματοποιήθηκε έρευνα, η οποία ασχολήθηκε με την ανίχνευση της *L. monocytogenes* στα προϊόντα και στο βιομηχανικό περιβάλλον, σε 24 μικρές επιχειρήσεις στην Βόρεια Ιρλανδία. Συγκεκριμένα από κάθε εταιρία συγκεντρώνονταν καθ' όλη διάρκεια της παραγωγής 6 δείγματα από το βιομηχανικό περιβάλλον (μαχαίρια κοπής, τοίχοι, πάγκοι εργασίας και αποχετεύσεις) και 2 δείγματα από προϊόντα κατά την διάρκεια της προετοιμασίας τους, ανά δύο μήνες για χρονικό διάστημα δεκαοκτώ μηνών. Συνολικά ελήφθησαν 1598 εκ των οποίων τα 1203 αφορούσαν τον βιομηχανικό εξοπλισμό και περιβάλλον και τα 395 αφορούσαν τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση (μαγειρεμένο κρέας, σαλάτες, sandwich, γαλακτοκομικά προϊόντα, νωπά ιχθυηρά και λαχανικά). Συνολικά βρέθηκαν 96 δείγματα θετικά σε *L. monocytogenes*. Οι μικροβιολογικές εξετάσεις έδειξαν πως ο επιπολασμός της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα ήταν 4,6% και στο βιομηχανικό περιβάλλον 6,3% ενώ παράλληλα στην παρούσα έρευνα τα αντίστοιχα ποσοστά ανέρχονται σε 16,66% και 75%. Επιπροσθέτως έγινε προσδιορισμός της λοιμογονικότητας των στελεχών παρομοίως με multiplex PCR και τα αποτελέσματα έδειξαν πως το 71,4% των στελεχών έφεραν τα γονίδια *inlA* και *actA*. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας τα οποία κατέδειξαν πως και στα 12 εξετασθέντα στελέχη ανιχνεύθηκαν τα γονίδια αυτά, *inlA* και *actA*, με εξαίρεση 4 στελέχη, τα οποία ήταν αρνητικά όσον αφορά την παρουσία του γονιδίου *actA*.

Παρόλο που οι βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων εφαρμόζουν προγράμματα καθαρισμού και απολύμανσης, είναι πολύ σημαντικό τα προγράμματα αυτά να ελέγχονται ως προς την αποτελεσματικότητά τους. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλές εξ αυτών απολυμαίνουν τους χώρους σε όλα τα στάδια επεξεργασίας, χωρίς ωστόσο να προβαίνουν σε συστηματικό και ενδεδειγμένο καθαρισμό του εξοπλισμού με τη χρήση απαραίτητων απολυμαντικών (Alto-Aranedo et al., 2019). Απολυμαντικά ευρέως φάσματος με βάση το χλώριο, όπως το υποχλωριώδες νάτριο (Waghmare and Apparure, 2015) και απολυμαντικά αποτελούμενα από ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου, όπως το χλωριούχο βενζαλκόνιο καθίστανται αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση του παθογόνου (Henriques and Fraqueza, 2017).

Έρευνα σχετική με τη παρουσία *L. monocytogenes* και μάλιστα σε σχέση με την αποτελεσματικότητα του προγράμματος καθαρισμού, που εφαρμόζαν οι εταιρίες, διεξήχθη από τους Schafer et al. (2017). Ένα σύνολο 1.694 δειγμάτων από στήθος (n=920) και μπουτί (n=774) κοτόπουλου ελήφθησαν από ένα μεγάλο σφαγείο κοτόπουλων στη Βραζιλία, το οποίο είχε πιστοποίηση συστήματος HACCP. Τα δείγματα αυτά ελήφθησαν πριν και μετά το κύριο πρόγραμμα εξυγίανσης, μεταξύ των ενδιάμεσων προγραμμάτων καθώς και σε κάθε μία από τις τρεις βάρδιες των εργαζομένων. Το σύνολο των δειγμάτων προέρχονταν από τον εξοπλισμό και τις

επιφάνειες επεξεργασίας. Τα 297 δείγματα ελήφθησαν μετά την εξυγίανση του χώρου και τα 276 σε τυχαίες χρονικές στιγμές εντός της ημέρας. Τα δείγματα που προέρχονταν από στήθος και μπούτι κοτόπουλου βρέθηκαν θετικά σε *L. monocytogenes* σε ποσοστό 8,64% και 44,19% αντίστοιχα. Η έρευνα που αφορούσε τις τρεις βάρδιες των εργαζομένων, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν υπήρχαν αναμεσά τους μεγάλες αποκλίσεις στην μόλυνση με *L. monocytogenes* των δειγμάτων, που προέρχονταν από το στήθος κοτόπουλου. Αντιθέτως στα δείγματα που προέρχονταν από μπούτι, το πρόγραμμα εξυγίανσης δεν κρίθηκε αποτελεσματικό. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην μαγαλύτερου βαθμού επεξεργασία που υφίσταται καθώς και στην μη κατάλληλη χρήση των υλικών απολύμανσης.

Όλες οι χώρες του κόσμου εφαρμόζουν συστήματα επιθεώρησης και πιστοποίησης για τον έλεγχο της ασφάλειας τροφίμων, τα οποία όμως παρουσιάζουν αποκλίσεις μεταξύ τους. Το διεθνές εμπόριο όμως καθιστά επιτακτική την ανάγκη για την ανάπτυξη συστημάτων βάσει κοινών αρχών και κατευθυντήριων γραμμών ώστε να υπάρχει αντιστοιχία σε παγκόσμιο επίπεδο και να επιτυγχάνονται οι ίδιοι στόχοι. Για παράδειγμα, καθώς δεν υπάρχει ισοδυναμία των συστημάτων επιθεώρησης και πιστοποίησης κρεάτων μεταξύ της Ε.Ε. και των Η.Π.Α, ιταλικές επιχειρήσεις που επιθυμούν να εξάγουν τα προϊόντα τους στις Η.Π.Α. πρέπει να θεσπίζουν συμπληρωματικά μέτρα ελέγχου και προτύπων (Neri et al., 2018).

Στο πλαίσιο της αξιολόγησης των συστημάτων ελέγχου που εφαρμόζονται από τις βιομηχανίες τροφίμων στις χώρες της Ε.Ε. και των Η.Π.Α., οι Neri et al. (2018) διεξήγαγαν σχετική έρευνα. Στη συγκεκριμένη έρευνα ελήφθησαν δείγματα από 81 τυχαίες Ιταλικές βιομηχανίες παραγωγής ΕΚΤ προϊόντων κρέατος με άδεια εξαγωγών στις Η.Π.Α καθώς και από 83 τυχαίες βιομηχανίες με άδεια εξαγωγών μόνο στην Ε.Ε. Τα δείγματα ανέρχονταν συνολικά σε 1.124 (556 από εταιρίες εξαγωγών στις ΗΠΑ και 568 στην Ε.Ε.). Θετικά σε *L. monocytogenes* εμφανίστηκαν πέντε δείγματα, εκ των οποίων τα τέσσερα προήλθαν από εταιρίες με άδεια εξαγωγών στις ΗΠΑ (0,72%) και το ένα από εταιρίες με άδεια εξαγωγών στην Ε.Ε. (0,18%). Η σημαντικότερη διαφορά, σύμφωνα με την έρευνα, εντοπίζεται στο γεγονός ότι οι Η.Π.Α. δεν δείχνουν ουδεμία ανεκτικότητα στην παρουσία της *L. monocytogenes* στα ΕΚΤ, ακόμη και σε χαμηλά ποσοστά παρουσία της, ενώ η Ε.Ε. καθορίζει ως επιτρεπτό όριο αυτό των 100 CFU/g.

Έρευνα διεξήχθη από τους Doijad et al. (2015) σε 98 στελέχη της *L. monocytogenes*, τα οποία συγκεντρώθηκαν από το κέντρο Indian Listeria Culture Center Collection (ILCC) στην Γκόα της Ινδίας προκειμένου να προσδιοριστεί η ικανότητά της να σχηματίζει βιομεμβράνες. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν τόσο από τρόφιμα όσο και από κλινικές περιπτώσεις ασθενών με λιστερίωση. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Microtiter plate, τα στελέχη ταξινομήθηκαν, όπως προηγουμένως περιγράφηκε από τους Harvey et al. (2007) και όπως αναλύεται και ανωτέρω σε προηγούμενο κεφάλαιο, και ορίστηκαν ως αδύναμοι ($OD_{595} < 0,323$), μέτριοι ($OD_{595} = 0,324-0,648$)

και δυνατοί διαμορφωτές βιομεμβρανών ($OD_{595} > 0,648$). Ποσοστό 63,26% παρουσίασε αδύναμη ή μηδενική ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών, ποσοστό 27,55% μέτρια και 9,18% δυνατή. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την ικανότητα της *L. monocytogenes* να σχηματίζει βιομεμβράνες και ισχυροποιούν τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας καθώς από την μελέτη του Πίνακα 13 σε προηγούμενο κεφάλαιο προκύπτει ότι όλα τα θετικά σε *L. monocytogenes* δείγματα επέδειξαν ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών και μάλιστα τα 11 από τα 12 στελέχη είχαν ισχυρή ικανότητα σχηματισμού.

Με την ικανότητα των *Listeria* spp. να σχηματίζουν βιομεμβράνες ασχολήθηκαν και οι Di Bonaventura et al. (2008), αναλύοντας 44 στελέχη της *L. monocytogenes* σε διαφορετικές επιφάνειες σε 4 διαφορετικές θερμοκρασίες (4 °C, 12 °C, 22 °C και 37 °C). Παρατήρησαν πολύπλοκη οργάνωση των βιομεμβρανών στους 22 °C και 37 °C όσον αφορά τον αριθμό των κυττάρων και των εξωκυττάρων πολυμερικών μεμβρανών (EPS-extracellular polymeric substance) που παράγονται. Μια υποτυπώδης βιομεμβράνη, αποτελούμενη από αραιό σύμπλεγμα κυττάρων και λίγες EPS, παρατηρήθηκε τόσο στους 4 °C όσο και στους 12 °C. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα αυτά δεν οφείλονται σε διαφορετική κυτταρική φυσιολογία αλλά μάλλον σε μειωμένη ανάπτυξη βακτηρίων. Σύμφωνα με την έρευνα αυτή, η *L. monocytogenes* ήταν σε θέση να δημιουργεί βιομεμβράνες στους 4 °C και 12 °C με υψηλότερα επίπεδα στο γυαλί σε σχέση με το πιο υδρόφοβο ανοξειδωτο ατσάλι και το πολυστυρένιο. Οι ερευνητές, τέλος, παρατήρησαν μια σημαντικά υψηλότερη παραγωγή βιομεμβρανών στους 37 °C από ότι στους 4 °C.

Παρόμοια έρευνα σχετικά με την ικανότητα της *L. monocytogenes* να σχηματίζει βιομεμβράνες διεξήγαγαν και οι Barbosa et al. (2013), οι οποίοι συνέλεξαν 725 στελέχη *L. monocytogenes*, από τα οποία 607 προέρχονταν από τρόφιμα (23% στους ορότυπους της ομάδας IIa, 23% στην IIb, 9% στην IIc και 85% στην IVb) και 118 από κλινικές περιπτώσεις λιστερίωσης, που εμφανίστηκαν στην Πορτογαλία κατά το διάστημα 2003-2008 (12% IIa, 21% IIb και 85% IVb). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, όπως και κατά την παρούσα έρευνα, ήταν η μέθοδος μικροτιτλοποίησης πλακών (microtiter plates). Βάσει των αποτελεσμάτων της έρευνας, όσα προέρχονταν από τρόφιμα κατηγοριοποιήθηκαν σε στελέχη αδύναμης ικανότητας παραγωγής βιομεμβρανών (328 στελέχη, 54%) και μέτριας (240 στελέχη, 40%) στους 37 °C για 24h. Τα στελέχη που προέρχονταν από κλινικές περιπτώσεις παρουσίασαν την ικανότητα να σχηματίζουν βιομεμβράνες, παρόλο που το μεγαλύτερο ποσοστό (83 στελέχη, 70%) εμφάνισε μειωμένη ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών. Στους 4 °C η πλειοψηφία των στελεχών από κλινικές περιπτώσεις παρουσίασε αδύναμη ικανότητα (70 στελέχη, 59%) ενώ τα υπόλοιπα εμφάνισαν μηδενική ικανότητα (48 στελέχη, 41%). Όσο για τα στελέχη που προέρχονταν από τρόφιμα, το 24% δεν εμφάνισε ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών (143 στελέχη), το 65% χαρακτηριζόταν από αδύναμη ικανότητα (397 στελέχη) και μόλις το 11% παρουσίασε μέτρια ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών (67 στελέχη). Όσον αφορά τις ομάδες οροτύπων, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ομάδες IIa και IIb και

για τα δύο είδη στελεχών και η *Πc* για τις κλινικές περιπτώσεις περιελάμβαναν τα μεγαλύτερα ποσοστά στελεχών με την πιο ισχυρή ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών στους 37 °C, ενώ το αντίθετο ίσχυε για την ομάδα IVb.

5.5 Συμπεράσματα

Τα τελευταία 25 χρόνια, η *L. monocytogenes* έχει αποκτήσει μεγάλη σημασία ως παθογόνο που σχετίζεται με τα τρόφιμα. Στις περισσότερες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης εμφανίζονται ετησίως κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης, τα οποία υπολογίζονται από δύο έως δέκα άτομα ανά εκατομμύριο πληθυσμού. Λόγω του υψηλού ποσοστού θνησιμότητας η λιστερίωση κατατάσσεται ανάμεσα στις συχνότερες αιτίες θανάτου από κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων. Οι λοιμώξεις από *L. monocytogenes* είναι υπεύθυνες για τα υψηλότερα ποσοστά νοσηλείας (91%) συγκριτικά με λοιμώξεις οφειλόμενες σε άλλα τροφιμογενή παθογόνα. Η ικανότητά της μάλιστα να επιβιώνει στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων και να πολλαπλασιάζεται ακόμη και σε θερμοκρασίες ψύξης καθιστά την *L. monocytogenes* σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία. Η μόλυνση από την *L. monocytogenes* επίσης, είναι μία από τις κυριότερες αιτίες που οδηγούν σε ανάκληση τροφίμων, κυρίως κρέατος, πουλερικών, θαλασσινών και γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα βακτηριακά βιοφίλμ είναι πανταχού παρόντα και η βιομηχανία τροφίμων δεν ξεφεύγει από τα προβλήματα που μπορεί να προκαλέσουν. Συγκεκριμένα, οι βιομεμβράνες που σχηματίζονται σε εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων και σε άλλες επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα λειτουργούν ως μόνιμη πηγή μόλυνσης που απειλεί την μικροβιολογική ποιότητα και ασφάλεια των τροφίμων και έχει σαν αποτέλεσμα ασθένειες που προκαλούνται από τρόφιμα και οικονομικές απώλειες. Επομένως, η πρόληψη και ο έλεγχος των βιομεμβρανών αποτελούν προτεραιότητα στη βιομηχανία τροφίμων και πρέπει να ενθαρρυνθεί η βιομηχανία.

Στο πλαίσιο της παρούσης έρευνας διερευνήθηκε η συχνότητα παρουσίας της *L. monocytogenes* στο κρέας, στα προϊόντα κρέατος και στο περιβάλλον ορισμένων εγκαταστάσεων επεξεργασίας και διάθεσης κρέατος στη Βόρεια Ελλάδα. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε νωπό κρέας θηλαστικών και πουλερικών που διατίθενται στο καταναλωτικό κοινό, στις επιφάνειες και πάγκους εργασίας, σε βραστά αλλαντικά, παρασκευάσματα κρέατος, σε αλλαντικά ωρίμανσης και σε επιφάνειες του περιβάλλοντος επεξεργασίας (τοίχοι – κάδοι – ψυγεία – νεροχύτες - φρεάτια). Επίσης ελήφθησαν δείγματα από τα χέρια και τις ρινικές κοιλότητες των εργαζόμενων, οι οποίοι απασχολούνται τόσο στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας όσο και στα υποκαταστήματα της εταιρίας. Αφού έγινε η απομόνωση και ταυτοποίηση της *L. monocytogenes*, πραγματοποιήθηκε στην συνέχεια προσδιορισμός των

οροτύπων των απομονωθέντων στελεχών. Επιπροσθέτως, έγινε έλεγχος ως προς την λοιμογόνο δράση τους με την ανίχνευση γονιδίων λοιμογονικότητας *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ* και *plcA*, *prfA*, *actA*, *hlyA*, *iap*. Ακολούθησε έλεγχος της ικανότητας των απομονωθέντων στελεχών για σχηματισμό βιομεμβρανών. Παράλληλα με τις εξετάσεις για τη *L. monocytogenes*, σε ορισμένα προϊόντα κρέατος, έτοιμα προς κατανάλωση, εξετάστηκαν και οι πληθυσμοί της *OMX* και της *E.coli*.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν τα εξής:

Μεγάλα, σχετικά, ποσοστά παρουσίας της *L. monocytogenes* διαπιστώθηκαν στο εργοστάσιο επεξεργασίας κρέατος, ενώ στα καταστήματα λιανικής πώλησης δεν βρέθηκε κανένα δείγμα θετικό. Συγκεκριμένα, ο έλεγχος στο μηχανικό εξοπλισμό του αλλαντοποιείου, που συγκέντρωσε τα μεγαλύτερα ποσοστά μόλυνσης από το παθογόνο, έδειξε πως οι κανόνες ορθής υγιεινής πρακτικής (ΚΟΥΠ) δεν εφαρμόζονται αυστηρά και αποτελεσματικά. Λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητα των στελεχών να σχηματίζουν βιομεμβράνες καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι, τόσο για τον περιορισμό και τον έλεγχο της διασποράς των λιστεριών στις εγκαταστάσεις όσο και για τη μείωση του κινδύνου μόλυνσης των τελικών και των έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων, η πιστή εφαρμογή των ΚΟΥΠ αποτελεί κορυφαία διαδικασία, καθώς περιορίζει τον κίνδυνο επιμόλυνσής τους.

Για τους παραπάνω λόγους κρίνεται επιτακτική ανάγκη η θωράκιση της ασφάλειας των παραγομένων προϊόντων έναντι της *L. monocytogenes*, η οποία δύναται να εξασφαλιστεί με τους εξής τρόπους:

- Αποτελεσματικό πρόγραμμα καθαρισμού και απολύμανσης σε όλα τα στάδια επεξεργασίας και παραγωγής προκειμένου να αποτραπεί η συσσώρευση των βακτηριακών κυττάρων στις επιφάνειες εξοπλισμού.
- Τακτικός έλεγχος της αποτελεσματικότητας του εφαρμοζόμενου προγράμματος εξυγίανσης με τη διεξαγωγή ελέγχων υπολειμματικότητας πρωτεϊνικών ρύπων και της μικροβιολογικής κατάστασης των επιφανειών επεξεργασίας των τροφίμων και η άμεση ανάληψη διορθωτικών ενεργειών όταν τα αποτελέσματα δεν είναι ικανοποιητικά.
- Πρόληψη του σχηματισμού βιομεμβρανών στους χώρους, στον εξοπλισμό και στο περιβάλλον επεξεργασίας των τροφίμων.
- Προσδιορισμός των περιοχών που είναι ευαίσθητες σε σχηματισμό βιομεμβρανών σε υπάρχουσες γραμμές επεξεργασίας και συστηματική παρακολούθηση του οργανικού και μικροβιακού φορτίου σε αυτές τις περιοχές.
- Επένδυση στην έρευνα σχετικά με την αποτελεσματικότητα των καθαριστικών και απολυμαντικών, τους παράγοντες που σχετίζονται με την προσκόλληση και

τον σχηματισμό βιομεμβρανών, τη μειωμένη ευαισθησία αυτών στα απολυμαντικά και την ανάπτυξη νέων στρατηγικών πρόληψης.

- Το πρόγραμμα προληπτικής συντήρησης πρέπει να περιλαμβάνει προγραμματισμένη αντικατάσταση ή επισκευή του εξοπλισμού πριν αυτός γίνει πηγή μόλυνσης. Ο εξοπλισμός πρέπει να επιθεωρείται περιοδικά για τμήματα που είναι ραγισμένα, έχουν φθαρεί ή έχουν αναπτύξει χώρους στους οποίους συσσωρεύονται τρόφιμα και υγρασία. Η συντήρηση πρέπει να περιλαμβάνει περιοδική εξέταση των φίλτρων, των φλαντζών, των αντλιών, των μηχανημάτων πλήρωσης και συσκευασίας. Τα φίλτρα αέρα για την εξαγωγή εξωτερικού αέρα στην εγκατάσταση θα πρέπει να εξετάζονται και να αλλάζονται με βάση τις προδιαγραφές του κατασκευαστή ή συχνότερα με βάση τη διαφορά πίεσης ή τη μικροβιολογική παρακολούθηση.

Είναι άκρως απαραίτητη η σωστή τήρηση των μεθόδων εξυγίανσης: απαλλαγή των επιφανειών από ορατούς ρύπους, απαιτούμενες ποσότητες των χημικών σκευασμάτων και ανάλογη διάρκεια επαφής τους με τις επιφάνειες του περιβάλλοντος επεξεργασίας, κατάλληλη θερμοκρασία των διαλυμάτων και σωστή ακολουθία χρήσης των μέσων καθαρισμού και απολύμανσης. Οι παραπάνω μέθοδοι θα πρέπει να εφαρμόζονται διεξοδικά ανά τακτά χρονικά διαστήματα, τόσο πριν και μετά την διαδικασία παραγωγής όσο και κατά τη διάρκειά της. Ειδικότερα για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των βιομεμβρανών κρίνεται επιβεβλημένη η χρήση αλκαλικών και όξινων μέσων (υπεροξειδίου του υδρογόνου και υπεροξικό οξύ) για την αφαίρεση του εξωκυτταρικού βιοπολυμερούς του βιοϋμενίου.

Παράλληλα, για την ασφάλεια τροφίμων κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή και τήρηση κάποιων προαπαιτούμενων όπως ορίζονται στις οδηγίες εφαρμογής του συστήματος HACCP: υποδομή των βιομηχανιών (εγκαταστάσεις, εξοπλισμός, απεντόμωση, συντήρηση), εκπαίδευση του προσωπικού (ρουχισμός, διασταυρούμενη επιμόλυνση, καθαριότητα), Ορθή Υγιεινή Πρακτική (Good Hygiene Practices-GHP) και Ορθή Βιομηχανική Πρακτική (Good Manufacturing Practices-GMP). Ασφαλιστική δικλείδα επομένως για την διασφάλιση της ποιότητας των παραγόμενων τροφίμων και κατά συνέπεια, για την προάσπιση της υγείας του καταναλωτή αποτελεί η πλήρης εφαρμογή του συστήματος HACCP. Η εφαρμογή του καθίσταται υποχρεωτική σε όλα τα σημεία της αλυσίδας των τροφίμων από τις φάρμες, τα σφαγεία, τις βιομηχανίες, τις εταιρείες μεταφοράς μέχρι και την κατάληξή τους στους χώρους προμήθειας (καταστήματα πώλησης και χώροι εστίασης). Οι αρχές του συστήματος HACCP συνδυαζόμενες με τα προαπαιτούμενα προγράμματα, την εκπαίδευση και την επιμόρφωση των ατόμων, που απασχολούνται στην επεξεργασία και στην παραγωγή προϊόντων, αποτελούν το σημαντικότερο κομμάτι ενός συστήματος διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων. Ειδικά τα τελευταία χρόνια που η παραγωγή τυποποιημένων και έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων έχει αυξηθεί θεαματικά και ο καταναλωτής δίνει μεγάλη βαρύτητα στην ασφάλεια των

τροφίμων για την υγεία του, καθίσταται ακόμη πιο επιτακτική η ανάγκη εφαρμογής του συστήματος αυτού.

Πέρα από το γεγονός ότι η εφαρμογή του αποτελεί νομική υποχρέωση των βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων, αποτελεί επίσης ένα σύστημα διαχείρισης και ανάπτυξης τους και ένα πολύτιμο προληπτικό εργαλείο για την διασφάλιση της ποιότητας, της υγιεινής και της ασφάλειας των παραγόμενων προϊόντων. Η εφαρμογή του συστήματος αυτού κατοχυρώνει την παροχή προϊόντων υψηλών προδιαγραφών στο καταναλωτικό κοινό.

Αμετάθετο συνεπώς χρέος των επιχειρήσεων αποτελεί: η συνεχής αναγνώριση των δυνητικών κινδύνων στις εγκαταστάσεις τους, ο προσδιορισμός των κρίσιμων σημείων ελέγχου, ο καθορισμός των ορίων που προβλέπονται από τους κανόνες υγιεινής και προστασίας, η εφαρμογή ενός συστήματος παρακολούθησης και ελέγχου των ορίων αυτών μέσω μικροβιολογικών εξετάσεων (στα παραγόμενα προϊόντα, στις πρώτες ύλες, στον εξοπλισμό, στις επιφάνειες επαφής με το κρέας και στο προσωπικό), η επαλήθευση των αποτελεσμάτων και τέλος η αρχειοθέτηση και η πλήρης καταγραφή των διεξαχθεισών διαδικασιών.

Τέλος από τη πλευρά της Πολιτείας, κρίνεται αναγκαία η συνεργασία μεταξύ των φορέων, οι οποίοι είναι αρμόδιοι για την ασφάλεια των τροφίμων, η καθοδήγηση των επιχειρήσεων, οι συχνοί και αυστηροί έλεγχοι και η ορθή αξιολόγηση των επιχειρήσεων που εμπλέκονται καθ' οιονδήποτε τρόπο με τα τρόφιμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Aalto-Araneda, M., Lunden, J., Markkula, A., Hakola, S., Korkeala, H., (2019),** “*Processing plant and machinery sanitation and hygiene practices associate with Listeria monocytogenes occurrence in ready-to-eat fish products*” **Food Microbiology**, 82: 455-464
- Adams, M.R., Moss, M.O., (2008),** *Food Microbiology*, 2nd Edition, The Royal Society of Chemistry. Cambridge: 123-127
- Angelidis A., Koutsoumanis K. (2006)** “*Prevalence and Concentration of Listeria monocytogenes in Sliced Ready-to-Eat Meat Products in the Hellenic Retail Market.*” **J. Food Prot.** 69, 938-942
- Agnelli, M .E. & Mascheroni, R.H. (2001),** “*Cryomechanical freezing. A model for the heat transfer process.*” **Journal of Food Engineering**, 47:263-270.
- Al-mashhadany, D., Ba-Salamah, H., Shater, A., Sanabani, A., Al Galil, F., (2016),** “*Prevalence of Listeria monocytogenes in Red meat in Dhamar Governorate/Yemen*”, **International Journal of Medical and Health research**, 2: 73-78
- Amajoud, N., Leclercq, A., Soriano, J., Dieye, H., Maadoudi, M., Senhaji, N., Kounoun, A., Moura, A., Lecuit, M., Abrini, J., (2017),** “*Prevalence of Listeria spp. and characterization of Listeria monocytogenes isolated from food products in Tetouan, Morocco*”, **Food Control**, 84:436-441
- Antoniou, K. and Frank, J.F. (2005)** “*Removal of Pseudomonas putida biofilm and associated extracellular polymeric substances from stainless steel by alkali cleaning.*” **J Food Prot** 68, 277– 281.
- Arthur, M.A. (2002),** “*Emerging microbiological food safety issues.*” **Food Technology**, 56:48-51.
- Aurora, R., Prakash, A., Prakash, S., Rawool, D.B., Barbuddhe, S. B. (2008),** “*Comparison of PI-PLC based assays and PCR along with in vivo pathogenicity tests for rapid detection of pathogenic Listeria monocytogenes.*” **Food Control**, 19:641–647.
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjoberg, A.M., Aarnisalo, K., Bjorkroth, J., Mattila-Sandholm, T. , Korkeala, H., (1999),** “*Sources of Listeria monocytogenes contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing.*” **Appl. Environ. Microbiol.** 65, 150–155.
- Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., Niskanen, T., Lundén, J. & Korkeala, H. (2004),** “*Prevalence and genetic diversity of Listeria monocytogenes in the tonsils of pigs.*” **Journal of Food Protection**, 4: 805–808.

- Badr, H.M.** (2004), "Use of irradiation to control foodborne pathogens and extend the refrigerated market life of rabbit meat." **Meat Science**, 67:541–548.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P.,** (2009), "Food chemistry." **Food Chemistry**.
doi:10.1007/978-3-540-69934-7
- Bennion, J.R., Sorvillo, F., Wise, M.E., Krishna, S. & Mascola, L.** (2008), "Decreasing listeriosis mortality in the United States, 1990-2005." **Clinical Infection Diseases**, 47: 867-887.
- Berrocal, D., Arias, M.L., Henderson, M., Wong, E.,** (2002), "Evaluation of the activity of probiotic cultures over *Listeria monocytogenes* during the production and storage of yogurt", **Arch Latinoam Nutr**, 52: 375-380
- Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P., Portnoy, D. A.** (1990), "Bacillus subtilis expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells". **Nature**, 345, 175–176
- Birmingham, C.L., Canadien, V., Gouin, E., Troy, E.B., Yoshimori, T., Cossart, P., Higgins, D.E., Brumell, J.H.** (2007), "*Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells." **Autophagy**, 3:442–451.
- Blatter, S., Giezendanner, N., Stephan, R., Zweifel, C.,** (2010), "Phenotypic and molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolated from the processing environment and products of a sandwich-producing plant." **Food Control**, 21, 1519–1523.
- Borch, E. & Arinder, P.** (2002), "Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures." **Meat Science**, 62:381-390.
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., Call, D. R.** (2003). "Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*." **Applied and Environmental Microbiology**. Vol 69. N° 12. 7336 - 7342.
- Braun, L. Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G., Cossart, P.** (1997), "InlB: An invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association." **Mol. Microbiol.**, 25:285-294.
- Brewer, S.** (2004), "Irradiation effect on meat color, a review." **Meat Science**, 68:1-17.
- Bubert, A., Kuhn, M., Goebel, W., Köhler, S.** (1992), "Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species." **J. Bacteriol.**, 174:8166-8171.
- Buchanan, R. L., Stahl, H. G. & Whiting, R. C.** (1989), "Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*." **Journal of Food Protection**, 52, 844-851.
- Burlingame, B. & Pineiro, M.** (2007), "Corrigendum to "the essential balance: Risks and benefits in food safety and quality." **Journal of Food Composition and Analysis**, 20:739-744.

Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurgel, o., Frangeul, L. & Cossart P. (2002), “*Surface proteins and the pathogenic potential of Listeria monocytogenes.*” **Trends Microbiology**, 10:238-245.

Cadaves, V., Campagnollo, F., Silva, R., Duffner, C., Schaffner, D., Sant’Ana, A., Gonzales-Barron, U., (2018), “*A comparison of dynamic tertiary and competition models for describing the fate of Listeria monocytogenes in Minas fresh cheese during refrigerated storage*”, **Food Microbiology**, 79: 48-60

Carpentier, B. & Cerf, o. (2011), “*Review - Persistence of Listeria monocytogenes in food industry equipment and premises.*”, **International Journal of Food Microbiology**, 145(1), 1-12.

Castilho, N. P. A., Colombo, M.,oliveira, L. L. de, Todorov, S. D., & Nero, L. A. (2019), “*Lactobacillus curvatus UFV-NPAC1 and other lactic acid bacteria isolated from calabresa, a fermented meat product, present high bacteriocinogenic activity against Listeria monocytogenes.*”, **BMC Microbiology**, 19(1).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Listeria Surveillance Annual Summary, 2010. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2012a Ημερομηνία Ανάκτησης: 20/06/2019

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: Listeria illnesses, deaths, and outbreaks--United States, 2009-2011. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 2013 7;62(22):448-52.

Centers for Disease Control and Prevention-CDC, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 20/06/2019a.

Centers for Disease Control and Prevention-CDC, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-07-13/index.html>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 15/01/2019b.

Centers for Disease Control and Prevention-CDC, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/index.html>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 19/02/2019c.

Chae, M. S. & Schraft, H. (2000), “*Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different Listeria monocytogenes strains.*”, **International Journal of Food Microbiology**, 62: 103–111.

Chao, G., Deng, Y., Zhou, X., Xu, Q., Qian, X., Zhou, L., Zhu, B. (2006), “*Prevalence of Listeria monocytogenes in delicatessen food products in China.*”, **Food Control**, 17: 971–974.

Chasseignaux, E., Toquin, M. T., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P. & Ermel, G. (2001), “*Molecular epidemiology of Listeria monocytogenes isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork processing plants.*”, **Journal of Applied Microbiology**, 91: 888–899.

- Chen, M., Cheng, J., Zhang, J., Chen, Y., Zeng, H., Xue, L., Lei, T., Rapng, R., Wu, S., Wu, H., Zhang, S., Wei, X., Zhang, Y., Ding, Y., Wu, Q.,** (2019), “*Isolation, potential virulence and population diversity of Listeria monocytogenes from meat and meat products in China*”, **Frontiers in Microbiology**, 10: 946
- Churcill, 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.
- Chuks, N. & orji, F.A.** (2012), “*Studies on the Isolation of Listeria monocytogenes from Food, Water, and Animal Droppings: Environmental Health Perspective.*”, **Environmental Health – Emerging Issues and Practice**, 2(1): 179-191.
- Cocolin, L., Stella, S., Nappi, R., Bozzetta, E., Cantoni, C. & G.Comi,** (2005), “*Analysis of PCR-based methods for characterization of Listeria monocytogenes strains isolated from different sources.*”, **Int J Food Microbiol**, 103: 167–78.
- Coffey, A., Van Den Burg, B., Veltman, R., Abee, T.** (2000), “*Characteristics of the biologically active 35-kDa metalloprotease virulence factor from Listeria monocytogenes.*”, **J. Appl. Microbiol.**, 88:132-141.
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P.A., Zanardi, E., Ghidini, S. & A., Ianieri,** (2017), “*Listeria monocytogenes Biofilms in the Wonderland of Food Industry.*”, **Pathogens**, 6: 41.
- Cordano, A. M. & Jacquet, C. H.** (2009), “*Listeria monocytogenes isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization.*”, **International Journal of Food Microbiology**, 132: 176–179.
- Cossart, P., Lecuit, M.** (1998), “*Interaction of Listeria monocytogenes with mammalian cells during entry and actin-based movement: Bacterial factors, cellular ligands and signaling.*”, **EMBO J.**, 17 : 3797.
- Cossart, P.** (2011), “*Illuminating the landscape of host–pathogen interactions with the bacterium Listeria monocytogenes.*”, **Journal of Food and Nutrition Research**, 6(2): 134-143.
- Costerton, J. W.** (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* 15. 137 - 140.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P.** (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Vol. 284. www.sciencemag.org.
- Cotter, P.D., Gahan, C. & Hill, C.** (2001), “*A glutamate decarboxylase system protects Listeria monocytogenes in gastric fluid.*”, **Molecular Microbiology**, 40: 465-475.
- Dabiri, G. A., Sanger, J. M., Portnoy, D. A., Southwick, F. S.** (1990), “*Listeria monocytogenes moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly.*”, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 6068–6072.

- da Silva, E. P. and De Martinis, E. C. P. (2011). "Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 97: 957 - 968.
- De Daza, M. S. T., Villegas, Y., & Martinez, A. (1991). "Minimal water activity for growth of *Listeria monocytogenes* as affected by solute and temperature." **International Journal of Food Microbiology**, 14(3-4), 333–337.
- Delincee, H. (2002), "Rapid Detection of irradiated frozen hamburgers.", **Radiation Physics and Chemistry**, 63: 443-446.
- de Noordhout, C. M. et al. (2014), "The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis.", **Lancet Infect. Dis.**, 14: 1073–1082.
- Desmarchelier, P., Fegan, N. & Smale, N. (2007), "Managing safety and quality through the red meat chain.", **Meat Science**, 77: 28–35.
- De Valk, H., Vaillant, V., Jacquet, C., Rocourt, J., LeQuerrec, F., Stainer, F., Quelquejeu, N., Pierre, O., Pierre, V., Desenclos, J. C. & Goulet, V. (2001), "Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, October 1999-February 2000.", **American Journal of Epidemiology**, 154: 944-950.
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D’Orio, V., Vergara, A., Conter, M., Ianieri, A., (2007), "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: 1552-1561.
- Djekic, I., Kuzmanović, J., Anđelković, A., Saračević, M., Stojanović, M. M., & Tomašević, I. (2016), "Effects of HACCP on process hygiene in different types of Serbian food establishments.", **Food Control**, 60: 131–137
- Doijad, S., Barbuddhe, S., Garg, S., Porhakar, K., Kalorey, D., Kurkure, N., Rawool, D., Chakraborty, T., (2015), "Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes isolated from different sources", **Plosone**.
- Domenech, E., Escriche, I. & Martorell, S. (2007), "Quantification of risks to consumers' health and to company's incomes due to failures in food safety.", **Food Control**, 18: 1419–1427.
- Douminth, 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: 3819-3822
- Doyle, M.E., Mazzotta, A.S., Wang, T., Wiseman, D.W. & Scott, V.N. (2002), "Heat-resistance of *Listeria monocytogenes*.", **Journal of Food Protection**, 64: 410-429.
- Dramsı, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., Cossart, P. (1995), "Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires the expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family.", **Mol. Microbiol.**, 16: 251-261.

Duffy, E. A., Belk, K. E., Sofos, J. N., Bellinger, G. R., Pape, A. & Smith G. C. (2001), "Extent of microbial contamination in United States pork retail products.", **Journal of Food Protection**, 64: 172–178.

EFSA – (European Food Safety Authority) (2011), "The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne outbreaks in the European Union in 2009." **EFSA Journal**, 9(3), 2090 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2090.htm>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 20/06/2019.

EFSA – (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2015), "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne outbreaks in 2014.", **EFSA Journal** 2015; 13(12): 4329, doi:10.2903/j.efsa.2015.4329.

EFSA (European Food Safety Authority and European), ECDC (Centre for Disease Prevention and Control) (2016), "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015.", **EFSA Journal**, 14(12): 4634.

EFSA (European Food Safety Authority and European), ECDC (Centre for Disease Prevention and Control) (2017), "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016.", **EFSA Journal**. 15: 5077.

Eklund, M.W. (1997), "Inactivation of *Listeria monocytogenes* on hot-smoked salmon by the interaction of heat and smoke or liquid smoke.", **Journal of Food Protection**, 60: 649- 654.

Evageliou V, Gerolymatou A, Sotirakoglou K, Gardeli G, Yanniotis S (2015) "Retention of trans-anethole by single and double layered films based on gelatin." **Food Hydrocolloids** 47: 94-98

Farber, J.M. & Peterkin, P.I. (1991), "*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen.", **Microbiology Review**, 55: 476-511.

Food Safety Authority of Ireland (FSAI). (2011), *Listeria monocytogenes*. Microbial Factsheet Series. Issue no.1. <https://www.fsai.ie/listeriamonocytogenes.html>. Ημερομηνία Ανάκτησης: 01/07/2019.

Fredriksson-Ahomaa, M., Gerhardt, M. & Stolle, A. (2009), "High Bacterial contamination of pig tonsils at slaughter.", **Meat Science**, 83: 334-336.

Gaillard, J. L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., Sansonetti, P. (1987), "In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2.", **Infect. Immun.**, 55: 2822–2829.

Gall, K., Scott, V.N., Collette, R., Jahncke, M.L., Hicks, D. & Wiedmann, M. (2004), "Implementing targeted good manufacturing practices and sanitation procedures to minimize *Listeria* contamination in smoked seafood products.", **Food Protection Trends**, 24: 302-315.

- 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 Sci.**, 9: 635-643.
- Gandhi, M. & Chikindas, M. L.** (2007), “*Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive.*”, **International Journal of Food Microbiology**, 113: 1-15.
- Gardner, I.A.** (1997), “*Testing to Fulfill HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) Requirements: Principles and Examples.*”, **Journal of Dairy Science**, 80: 3453-3457.
- Garrity, M.G., Bell, A.J., Lilburn, G.T.** (2004), “*Taxonomic outline of the prokaryotes*”, **Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edition.** Springer, New York.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Nychas, G. J. E.** (2014). “*Impact of acid adaptation on attachment of Listeria monocytogenes to stainless steel during long- term incubation under low or moderate temperature conditions and on subsequent recalcitrance of attached cells to lethal acid treatments.*” **International Journal of Food Microbiology**, 171. 1 - 7.
- Gibson, H., Taylor, J.H., Hall, K.E. and Holah, J.T.** (1999) “*Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms.*” **J Appl Microbiol** 87, 41– 48.
- Gilot, P., Genicot, A., Andre, P.** (1996), “*Serotyping and esterase typing for analysis of Listeria monocytogenes populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium.*”, **J. Clin. Microbiol.**, 34: 1007-1010.
- Giovannacci, I., Ragimbeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendevre, J. L., Carlier, V., Ermel, G.** (1999), “*Listeria monocytogenes in pork slaughtering and cutting plants. Use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology.*”, **Int. J. Food Microbiol.** , 53: 127–140.
- Goldfine, H. & Wadsworth, S.J.** (2002), “*Macrophage intracellular signaling induced by Listeria monocytogenes.*”, **Microbes and Infection**, 4: 1335-1343
- Gombas, D. E., Chen, Y., Clavero, R. S. & Scott, V.N.** (2003), “*Survey of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods.*”, **Journal of Food Protection**, 66: 559-569.
- Gomez, D., Iguácel, L.P., Rota, C., Carramiñana, J.J., Ariño, A. & Yangüela, J.** (2015), “*Occurrence of Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Meat Products and Meat Processing Plants in Spain.*”, **Foods**, 4: 271-282.
- Gomez, D., Azon, E., Marco, N., Carraminana, J., Rota, C., Arino, A., Yangüela, J.,** (2014), “*Antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes and Listeria innocua from meat products and meat –processing environment,*”, **Food Microbiology**, 42: 61-65
- Gorski, L.** (2008), Phenotypic identification. In D. Liu (Ed.), *Handbook of Listeria monocytogenes* Boca Raton, FL: CRC Press. 139-168
- Gray, M. J., Zadoks, R. N., Fortes, E. D., Dogan, B., Cai, S., Chen, Y., Scott, V. N., Combas, D. E, Boor, K. J. ,Wiedmann, M.,** (2004), “*Listeria monocytogenes Isolates from*

Foods and Humans Form Distinct but overlapping Populations.”, **Applied and Environmental Microbiology**, 70 (10): 5833–5841.

Greiffenberg, L., Goebel, W., Sik Kim, K., Weiglein, I., Bubert, A., Engelbrecht, F., Stins, M., Kuhn, M., (1998), “*Interaction of Listeria monocytogenes with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth and spread from macrophages to endothelial cells.*”, **Infect. Immun.**, 66: 5260-5267.

Griffith, C. (2006), “*HACCP and the management of healthcare associated infections are there lessons to be learnt from other industries?*”, **International Journal of Health Care Quality Assurance**, 19(4): 351-367.

Gründling, A., Burrack, L. S., Bouwer, H. G. A., Higgins, D. E., (2004), “*Listeria monocytogenes regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence.*”, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 101 (33): 12316–12323.

Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A., De Valk, H., (2008). “*Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries.*”, **Emerg. Infect. Dis.**, 14: 734–740.

Guillet, C., Join-Lambert, o., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechai, F., Mamzer-Bruneel, M., Bielecka, M. K., Scortti, M., Disson, o., Berche, P., Vazquez Boland, J., Lortholary, o., Lecuit, M., (2010), “*Human Listeriosis Caused by Listeria ivanovii.*”, **Emerg. Infect. Dis.**, 16: 136-138.

Gutiérrez T.J., Suniaga J., Monsalve A., García N.L., (2016) “*Influence of beet flour on the relationship surface-properties of edible and intelligent films made from native and modified plantain flour.*” **Food Hydrocolloids**, 54: 234-244

Guo, Q., Sun, D., Cheng, J., Han, Z., (2017), “*Microwave processing techniques and their recent applications in the food industry.*”, **Trends in Food Science and Technology**, 67: 236-247

Haase, J.K., Didelot, X., Lecuit, M., Korkeala, H., (2014), “*The ubiquitous nature of Listeria monocytogenes clones: a large-scale multilocus sequence typing study.*”, **Environ. Microbiol.**, 16(2): 405–416.

Hadjilouka A., Paramithiotis S., Drosinos E.H., (2014), “*Prevalence of Listeria monocytogenes and occurrence of listeriosis from ready to eat fresh fruits and vegetables.*”, In: E.C. Hambrick (Ed.) *Listeria monocytogenes: Food Sources, Prevalence and Management Strategies*. Nova Publishers, pp. 283-296.

Hadjilouka A., Paramithiotis S., Drosinos E.H., (2015), “*Prevalence of Escherichia coli and outbreaks from ready to eat fresh fruits and vegetables.*”, In: G. McCoy (Ed.) *Coliforms: occurrence, Detection Methods and Environmental Impact*. Nova Publishers. pp. 77- 106.

Hadjilouka A., Paramithiotis S., Drosinos E.H., (2015), *Listeria monocytogenes as a Food Contaminant: A Genomic Perspective*. In: T. Vicario (Ed.) *Listeria Monocytogenes: Incidence, Growth Behavior and Control*. Nova Publishers. pp. 1-36.

Hassan, L., Mohamedd, H.O., McDonough, P.L & Gonzalez, R.N., (2000), “A cross-sectional study on the prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in New York dairy herds.”, *Journal of Dairy Science*, 83: 2441-2447.

Hatt, K & Hatt, K., (2012), “Neoliberalizing food safety and the 2008 Canadian listeriosis outbreak.”, *Agriculture and Human Values*, 29 (1): 17-28.

Henriques AR, Fraqueza MJ., (2017), “Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the ready-to-eat meat-based food products food chain.”, *LWT Food Sci Technol*, 81: 180–187

Heymann D, MD., (2015), “Control of Communicable Diseases Manual. 20th Edition”, **American Public Health Association**

<http://www.who.int/csr/don/28-march-2018-listeriosis-south-africa/en/> Ημερομηνία ανάκτησης: 03/04/2019

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis> Ημερομηνία ανάκτησης: 04/04/2019

Holah, J.T., Higgs, C., Robinson, S., Worthington, D. and Spenceley, H. (1990) “A conductance-based surface disinfection test for food hygiene.” *Lett Appl Microbiol* 11, 255–259.

Holah, J.T. (1992) Industrial monitoring: hygiene in food-processing. In *Biofilms – Science and Technology* ed. L.F. Melo, T.R. Bott, M. Fletcher and B. Capdeville pp. 645–659. Dordrecht: Kluwer.

Hof, H., Rocourt, J., (1992), “Is any strain isolated detected in food a health risk.”, *Int. J. Food Microbiol.*, 16: 683–692.

Hugas, M., Garriga, M. & Monfort, J.M., (2002), “New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology.”, *Meat Science*, 62: 359-371.

Huhtanen, C.H., Jenkins, R.K. & Thayer D.W., (1989), “Gamma irradiation sensitivity of *Listeria monocytogenes*.”, *Journal of Food Protection*, 52: 610-613.

Huss, H.H., Reilly, A. & Embarek, P.K.B., (2000), “Prevention and control of hazards in seafood.”, *International Journal of Food Control*, 11: 149-156.

Hyden, P., Pietzka, A., Allerberger, F., Springer, B., Sensen, C., & Ruppitsch, W., (2016), “Draft Genome Sequence of a 94-Year-Old *Listeria monocytogenes* Isolate, SLCC208.”, *Genome Announc*, 4(1): e01572-15.

Inoue, S., Nakama, A., Arai, Y., Kokubo, Y., Maruyama, T., Saito, A., Yoshida, T., Terao, M., Yamamoto, S., Kumagai, S., (2000), “Prevalence and contamination level of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan.”, *International Journal of Food Microbiology*, 59: 73–77.

- Balamurugan, J., Schmida, V., Kupskib, B., McMahonb, W., Klijna, A.,** (2018), “*Detection of Listeria spp. and L. monocytogenes in pooled test portion samples of processed dairy products.*”, **International Journal of Food Microbiology**, 289: 30-39
- Jahncke, M.L., Collette, R., Hicks, D., Wiedmann, M., Scott, V.N. & Gall K.,** (2004), “*Treatment options to eliminate or control growth of Listeria monocytogenes on raw material and on finished product for the smoked fish industry.*”, **Food Protection Trends**, 24: 612-619.
- James, G. A., Beaudette, L., Costerton, J. W.** (1995). “*Interspecies bacterial interactions in biofilms.*” **Journal of Industrial Microbiology** 15. 257 - 262.
- Jami, M., Ghanbari, M., Zunabovic, M., Domig, K. J., Kneifel, W.,** (2014), “*Listeria monocytogenes in Aquatic Food Products-A Review.*”, **Comp. Rev Food Sci. Food Safety**, 13: 798-813
- Jay J. M.,** (2005), *Modern food Microbiology*. 7th Edition, Chapman & Hall, **Food Science Texts.**
- Jeffers, G. T., Bruce, J. L., McDonough, P. L., Scarlett, J., Boor, K. J., Wiedmann, M.,** (2001), “*Comparative genetic characterization of Listeria monocytogenes isolates from human and animal listeriosis cases.*” **Microbiology**, 147 (Pt 5), 1095–1104.
- Jiang, Z., Neetoo, H. & Chen, H.** (2011). “*Efficacy of freezing, frozen storage and edible antimicrobial coatings used in combination for control of Listeria monocytogenes on roasted turkey stored at chiller temperatures.*”, **Food Microbiology**, 28: 1394–1401.
- Kacaniova, M., Kluz, M., Petrova, J., Mellen, M., Kunova, S., Hascik, P., Lorasovsky, L.,** (2015), “*Incidence of Listeria monocytogenes in meat product samples by Real-Time PCR.*”, **Modern Chemistry and Applications**, 3: 155-160
- Kılıç, İ. H., Güler, A., Şirin, H.,** (2016), “*A Case of Listeria Rhombencephalitis Mimicking Vertebrobasilar Stroke.*”, **Turk. J. Neurol.**, 22:199-201.
- Kotzamanidis, C., Papadopoulos, T, Vafeas, G., Tsakos, P., Giantzi, V., Zdragas, A.,** (2019), “*Characterization of Listeria monocytogenes from encephalitis cases of small ruminants from different geographical regions, in Greece.*”, **Journal of Applied Microbiology**, 126: 1373-1382
- Kozak, J, Balmer, T., Byrne, R. & Fisher, K.,** (1996), “*Prevalence of Listeria monocytogenes in foods- Incidence in dairy products.*”, **Food Control**, 7: 215-21.
- Kuhn, M., Goebel, W.,** (1989), “*Identification of an extracellular protein of Listeria monocytogenes possibly involved in the intracellular uptake by mammalian cells.*”, **Infect. Immun.**, 57: 55.
- Kuhn, M., Goebel, W.,** (2007), “*Molecular virulence determinants of Listeria monocytogenes.*”, In **E.T Ryser and E.H. Marth (Eds.), Listeria, listeriosis, and food safety (3rd edn.)**. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 111-155.
- Kuhn, M., Scotti, M., Vázquez-Boland J.A.,** (2008), “*Pathogenesis.*” In Liu Dongyou (ed.), *Handbook of Listeria monocytogenes*. CRC Press. pp. 97-135.

Kurpas, M, Wieczorek, K,osek, J., (2018), “*Ready-to-eat meat products as a source of Listeria monocytogenes.*”, **J Vet Res**, 61: 49-55

Lado, B., 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* (3rd edition), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 157–213.

Lake, R., Hudson, A., Cressey, P., (2003), Risk profile: “*Listeria monocytogenes in ice cream.*”

Lamont, R. F., Sobel, J., Mazaki-Tovi, S., Kusanovic, J. P., Vaisbuch, E., Kim, S. K., Uldbjerg, N., Romero, R., (2011), “*Listeriosis in human pregnancy: a systematic review.*”, **J. Perinat. Med.**, 39: 227

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: 235-238

Lecuit, M., Ohayon, M., Braun, L., Mengaud, J., Cossart, P., (1997), “*Internalin of Listeria monocytogenes with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization.*”, **Infect. Immun.**, 65: 5309-5319.

Lecuit, M., Nelson D.M., Smith, S.D., Khun, H., Huerre, M., Vacher-Lavenu, M.C., Gordon, J.I., Cossart, P., (2004), “*Targeting and crossing of the human maternal-fetal barrier by Listeria monocytogenes: Role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin.*”, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 101: 6152.

Lee, J., Park K., Kim J. & Byu, M., (2005), “*Combined effects of gamma irradiation and rosemary extract on the shelf-life of a ready-to-eat hamburger steak.*”, **Radiation Physics and Chemistry**, 72: 49–56.

Lei, X. H., Fiedler, F., Lan, Z., Kathariou, S., (2001), “*A novel serotype-specific gene cassette (gltA-gltB) is required for expression of teichoic acid-associated surface antigens in Listeria monocytogenes of serotype 4b.*”, **J. Bacteriol.**, 183: 1133-1139.

Leimester-Wachter, M., Domann, E. & Chakraborty, T., (1991), “*Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in Listeria monocytogenes.*”, **Molecular Microbiology**, 5: 361-366.

Leister Lothar & Leon G.M Gorris, (1995), “*Food preservation by hurdle technology.*”, **Trends in Food Science & Technology**, 6: 41-45.

Lemay, M.J., Choquette, J., Delaquis, P.J., Gariépy, C., Rodrigue, N. & Saucier, L., (2002), “*Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model.*”, **International Journal of Food Microbiology**, 78: 217–226.

Leung, N., Gianfelice, A., Gray-Owen, S.D., Ireton, K., (2013), “*Impact of the Listeria monocytogenes protein InlC on infection in mice.*”, **Infect. Immun.**, 81(4): 1334-1340.

Li, C., Huang, L., Hwang, C.-A., (2017), “*Effect of temperature and salt on thermal inactivation of Listeria monocytogenes in salmo roe.*”, **Food Control**, 73: 406-410

- Liu, D.**, (2008), Epidemiology. In: Liu D, editor. Handbook of *Listeria monocytogenes*. New York, CRC Press, pp. 27–30.
- Liu, D., Lawrence, M., Austin, F., Ainsworth, A.**, (2007), “A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*.”, **Journal of Microbiological Methods**, 71: 133-140
- Lokerse, R.F.A., Maslowska-Corker, K.A., Wardt, L.C., Wijtzes, T.**, (2016), “Growth capacity of *Listeria monocytogenes* in ingredients of ready-to-eat salads.”, **Food Control**, 60: 338-345
- Lorber, B.**, (1997), “Listeriosis.” **Clinical Infectious Diseases**, 24: 1-7.
- Lorber, B.**, (2010), *Listeria monocytogenes*. In: G. L. Mandell, J. E. Bennett, R. Dolin (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases* (7th ed.), Churchill Livingstone, Philadelphia. pp.2707.
- Low, J.C. & Donachie, W.**, (2007), “A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis.”, **Veterinary Journal**, 153: 9-29.
- Lundén, J., Autio, T. J., Sjöberg, A. M., Korkeala, H. J.**, (2003b), “Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants”. **J. Food. Prot.**, 66: 2062–2069.
- Lundén, J., Autio, T., Annukka, A., Hellström, S., Korkeala, H.**, (2003a), “Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants.”, **Int. J. Food Microbiol.**, 82: 265-272.
- Mackey, B.M. & Bratcell, N.**, (2009), “A review: the heat-resistance of *Listeria monocytogenes*.”, **Journal of Applied Microbiology**, 9: 89-94.
- Madden, R., Hutchison, M., Jordan, K., Pennone, V., Gundogdu, O., Corcionivoschi, N.**, (2017), “Prevalence and persistence of *Listeria monocytogenes* in premises and products of small food business operators in Northern Ireland.”, **Food Control**, 87: 70-78
- Maijala, R., Lyytikäinen, O., Autio, T., Aalto, T., Haavisto, L. & Honkanen-Buzalski, T.**, (2001), “Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland.”, **International Journal of Food Microbiology**, 70: 97-109.
- Mah, T. F. C. and O’Toole, G. A.** (2001). “Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.” **Trends in Microbiology**. Vol 9. N° 1.
- Mann, E., Pinior, B., Wetzels, S. U., Metzler-Zebeli, B. U., Wagner, M., Schmitz-Esser, S.**, (2015), “The Metabolically Active Bacterial Microbiome of Tonsils and Mandibular Lymph Nodes of Slaughter Pigs.”, **Frontiers in Microbiology**, 6: 1362.
- Martin, B., Perich, A., Gomez, D., Yanguela, J., Rodriguez, A., Garriga, M., Aymerich, T.**, (2014), “Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants.”, **Food Microbiology**, 44: 119-127

Maung, A., Mohammadi, T., Nakashima, S., Liu, P., Masuda, Y., Honjoh, K., Miyamoto, T., (2019), “Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat in Fukuoka, Japan.”, **International Journal of Food Microbiology**, 304: 49-57

Mbandi, E., Shelef, L., (2000), “Enhanced Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in meat by combinations of Sodium Lactate and Diacetate.”, **Journal of Food Protection**, 64: 640-644

McMeekin, T.A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T. & Schmid S., (2006), “Information systems in food safety management.”, **International Journal of Food Microbiology**, 112: 181-194.

McMinn, R. P., King, A. M., Milkowski, A. L., Hanson, R., Glass, K. A., & Sindelar, J. J., (2018), “Processed Meat Thermal Processing Food Safety - Generating D-Values for *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*.”, **Meat and Muscle Biology**, 2 (1): 168.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. & R.V. Tauxe., (1999), “Food-related illness and death in the United States.”, **Emerg Infect Dis**, 5: 607

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Breese, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. & Tauxe, V., (2009), “Food-related illness and death in the United States.”, **Emerging Infectious Disease**, 5: 607-625.

Mengaud, J., Vicente, M. F., Chenevert, J., Pereira, J. M., Geoffroy, C., Gicquel-Sanze, B., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C., Cossart, P., (1988), “Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin determinant of *Listeria monocytogenes*.”, **Infect. Immun.**, 56: 766-772.

Meyer B., (2006), “Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene?”, **International Journal of Food Microbiology**, 112: 275-279.

Miettinen, H., Aarnisalo, K., Salo, S. & Ad Sjoberg, A.M., (2001), “Evaluation of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories.”, **Journal of Food Protection**, 64: 635-639.

Moragas, M., Martinez-Yelamos, S., Majos, C., Fernandez-Viladrich, P., Rubio, F., Arbizu, T., (2011), “Rhombencephalitis: a series of 97 patients.”, **Medicine (Baltimore)**, 90: 256-261.

Mosteller, T.M. and Bishop, J.R. (1993) “Santizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm.” **J Food Prot** 56, 34-41.

Mounier, J., Ryter, A., Coquis-Rondon, M., Sansonetti, P. J., (1990), “Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2.”, **Infect. Immun.**, 58: 1048-1058.

Moura, G.F., Sigarini, C. & Figueiredo, E., F., (2016), “*Listeria monocytogenes* in Chicken Meat.”, **Journal of Food and Nutrition Research**, 4(7): 436-441.

Mureddu, A., Mazza, R., Fois, F., Meloni, D., Bacciu, R.; Piras, F.; Mazzette, R., (2014), “*Listeria monocytogenes* persistence in ready-to-eat sausages and in processing plants.”, **Ital. J. Food Saf.** , 3: 12–15.

Muriana, P.M., (1996), “*Bacteriocins for control of Listeria spp. in foods.*”, **Journal of Food Protection**, 59: 54–63.

Nakamura H., Hatanaka M., Ochi K., Nagao M., Ogasawara J., Hase A., Kitase T., Haruki K. and Nishikawa Y., (2004), “*Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka city, Japan.”, **International Journal of Food Microbiology**, 94: 323–328

Nakamura, H., Tokuda, Y., Sono, A., Koyama, T., Ogasawara, J., Hase, A., Haruki, K., Nishikawa, Y., (2006), “*Molecular typing to trace Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish to a contamination source in a processing plant.”, **J. Food Prot.** 69: 835–841.

Nakari, U. M., Rantala, L., Pihlajasaari, A., Toikkanen, S., Johansson, T., Hellsten, C., Raulo, S.M, Kuusi, M., Siitonen, A., Rimhanen-Finne, R., (2014), “*Investigation of increased listeriosis revealed two fishery production plants with persistent Listeria contamination in Finland in 2010.*”. **Epidemiol. Infect.** , 142: 2261–2269.

National Institute for Health and Welfare, (2018), “*Statistical Database of the Finnish Communicable Disease*” Register. Morbidity Data for Listeriosis. https://sampo.thl.fi/pivot/prod/fi/tr/shp/fact_shp?row=area-12260&column=time-12059&filter=reportgroup-12172, Ημερομηνία Ανάκτησης: 3/7/2019.

Neri, D., Antoci, S., Iannetti, L., Beatrice Ciorba, A., D'Aurelio, R., Del Matto, I., Di Leonardo, M., Giovannini, A., Annunziata Prencipe, V., Pomilio, F., Santarelli, Migliorati, G., (2019), “*EU and US control measures on Listeria monocytogenes and Salmonella spp. In certain ready-to-eat meat products: an equivalence study.*”, **Food Control**, 96: 98–103

Nesbakken, T., Kapperud, G. & Caugant, D. A., (1996), “*Pathways of Listeria monocytogenes contamination in the meat processing industry.*”, **International Journal of Food Microbiology**, 31: 161–171.

NicAogain K and Byrne CP, (2016), “*The Role of Stress Adaptions in Determining the Fate of the Bacterial Pathogen Listeria monocytogenes in the Food Chain.*”, **Front. Microbiol.** 7: 1865.

Nilsson, L., Christiansen, J.N., Jorgensen, B.L., Grotnum, D. & Gram, L., (2004), “*The contribution of bacteriocin to inhibition of Listeria monocytogenes by Carnobacterium piscicola strains in cold-smoked salmon systems.*”, **Journal of Applied Microbiology**, 96: 133–143.

Oliveira, T., Varjao, L., Silva, L., Castro, R., Pereira, Li., Hofer, E., Vallim, D., Almeida, R., (2018), “*Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility.”, **Food Control**, 88: 131–138

Ooi, S. T. & Lorber, B., (2005), “Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*.”, **Clinical Infectious Diseases**, 40: 1327-1334.

Orsi, R.H. & Wiedmann, M., (2016), “Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009.”, **Applied Microbiology & Biotechnology**, 100: 5273–5287.

Orsi, R.H., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., (2011), “*Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics.”, **Int. J. Med. Microbiol.**, 301: 79–96.

Orsi, R., Ripoll, D., Yeung, M., Nightingale, K. & M.Wiedmann, (2007), “Recombination and positive selection contribute to evolution of *Listeria monocytogenes* *inlA*.”, **Microbiology**, 153: 2666–78.

S.K., Domann, E., Rohde, M., Müller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J., Chakraborty, T., (1998), “*Internalin B* is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells.”, **Mol. Microbiol.**, 28: 81-93.

Paramithiotis S., Hadjilouka A., Drosinos E.H., (2014), “*Listeria* pathogenicity island 1. Structure and function.” In: E.C. Hambrick (Ed.) *Listeria monocytogenes*: Food Sources, Prevalence and Management Strategies. **Nova Publishers**, pp. 265-282.

Parkar, S.G., Flint, S.H. and Brooks, J.D. (2004) “Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel.” **J Appl Microbiol** 96, 110–116.

Passos, M.C. & Kuaye, A.Y., (2002), “Influence of the formulation, cooking time and final internal temperature of beef hamburgers on the destruction of *Listeria monocytogenes*.”, **Food Control**, 13: 33-40.

Patsias, A., Badeka, A. V., Savvaidis, I.N. & Kontominas, M.G., (2008), “Combined effect of freeze chilling and MAP on quality parameters of raw chicken fillets.” **Food Microbiology**, 25: 575–581

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: 234-238

Piercey MJ, Ells TC, Macintosh AJ, Hansen LT., (2017), “Variations in biofilm formation, desiccation resistance and benzalkonium chloride susceptibility among *Listeria monocytogenes* strains isolated in Canada.”, **Int J Food Microbiol**, 257: 254–261.

Poulsen, L. V. (1999). “Microbial Biofilm in Food Processing.” **Review. Lebensm.- Wiss. u. - Technol.** 32. 321 - 326.

Radoshevich L, Cossart, P., (2018), “*Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis.”, **Nature Reviews Microbiology** 16 (1): 32

Ralovich, B. & Domjan-Kovacs, H., (1996), “Occurrence of *Listeria* and listeriosis in Hungary.”, **Acta Veterinaria Hungaria**, 44: 277-285.

- Ravishankar, S., Jaroni, D., Zhu, L., Olsen, C., McHugh, T. & Friedman, M.,** (2012), “*Inactivation of Listeria monocytogenes on ham and bologna using pectin-based apple, carrot, and hibiscus edible films containing carvacrol and cinnamaldehyde.*”, **Journal of Food Science**, 77(7): 377–382.
- Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Vijila, H.M.,** (2007), “*Listeria: review of epidemiology and pathogenesis.*”, **J Microbiol Immunol Infect**, 40 (1): 4-13
- Rawool, D., Malik, S., Shakuntala, I., Sahare, A., Barbuddhe, S.,** (2007), “*Detection of multiple virulence-associated genes in Listeria monocytogenes isolated from bovine mastitis cases.*”, **International Journal of Food Microbiology**, 113: 201-207
- Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernández Escámez, P.S., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., ter Kuile, B., Threlfall, J., Wahlström, H., Takkinen, J., Wagner, M., Arcella, D., Da Silva Felicio, M.T., Georgiadis, M., Messens, W., Lindqvist, R.,** (2018). “*Listeria monocytogenes contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU.*”, **EFSA Journal**. 16, e05134.
- Roche, M.S., Velge, P., Liu, D.,** (2008), “*Virulence determination.*”, In Liu Dongyou (ed.). *Handbook of Listeria monocytogenes*. CRC Press. pp. 241-270.
- Rocourt, J., Buchrieser, C.** (2007). “*The genus Listeria and Listeria monocytogenes: Phylogenetic position, taxonomy, and identification.*” In E.T. Ryser and E.H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (3rd edn., pp. 1-20). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Rodríguez-Calleja, J.M., Cruz-Romero, M.C., O’Sullivan, M.G., García-López, M.L., Kerry, J.P.,** (2012), “*High-pressure-based hurdle strategy to extend the shelf-life of fresh chicken breast fillets.*”, **Food Control**, 25: 516–524
- Rohr, A., Luddecke, K., Drusch, S., Mualler, M.J. & Alvensleben, R.V.,** (2016), “*Food quality and safety-consumer perception and public health concern.*”, **Food Control**, 16: 649–655.
- Timakovaa, R., Tikhonova, S., Tikhonovaa, N., Gorlova, I.,** (2018), “*Effect of various doses of ionizing radiation on the safety of meat semi-finished products.*”, **Foods and Raw Materials**, pp. 120–127.
- Ryser, E.T., Arimi, S.M. & Donnelly C.W.,** (1997), “*Effect of pH on distribution of Listeria ribotypes in corn, hay and grass silage.*”, **Applied and Environmental Microbiology**, 63(9): 3695-3697.
- Ryser, E. T., Marth, E. H.,** (2007), “*Listeria, Listeriosis and Food safety.*”, Third edition, CRC press, 2007.
- Sadoudi, A.K., Herry, J.M. and Cerf, O.** (1997) “*Elimination of adhering bacteria from surfaces by pulsed laser beams.*” **Lett Appl Microbiol** 24, 177–179.

- Salgado P.R., Ortiz C.M., Musso Y.S., Di Giorgio L., Mauri A.N.** (2015) “*Edible films and coatings containing bioactives.*” *Food Science*, 5: 86–92.
- Salimnia, H. L., Patel, D., Lephart, P. R., Fairfax, M. R., Chandrasekar, P.H.** (2010). “*Listeria grayi: vancomycin-resistant, gram-positive rod causing bacteremia in a stem cell transplant recipient*”. *Transpl. Infect. Dis.* , 12, 526.
- Samelis, J., Kakouri, A., Rogga, K.J., Savvaidis, I.N. & Kontominas M.G.**, (2003), “*Nisin treatments to control Listeria monocytogenes post-processing contamination of Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages.*”, **International Journal of Food Microbiology**, 3: 661-669.
- Samelis, J., Kakouri, A., Savvaidis, I.N., Riganakos, K. & Kontominas, M.G.**, (2005) “*Use of ionizing radiation doses of 2 and 4 kGy to control Listeria spp. and Escherichia coli O157:H7 on frozen meat trimmings used for dry fermented sausage production.*”, **Journal of Meat Science**, 2: 189-195
- Samir A. Mahgoub Rasha M. El-Mekkawy, Mohamed E. Abd El-Hack Waleed R. El-Ghareeb, Gamaleldin M. Suliman, Abdullah N. Alowaimer, Ayman A. Swelum.,** (2019), “*Inactivation of Listeria monocytogenes in ready-to-eat smoked turkey meat by combination with packaging atmosphere, oregano essential oil and cold temperature.*”, *AMB Express* 2019: 54
- Sanaa, M.B., Poutrel, J.L., Menard, B.F. & Serieys, F.**, (1993), “*Risk factors associated with contamination of raw milk by Listeria monocytogenes in dairy farms.*”, **Journal of Dairy Science**, 76: 2891-2898.
- Sanchez-Ortega, I., Garcia-Almendarez, B.E., Santos-Lopez, E.M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J.E. & Regalado, C.**, (2014), “*Antimicrobial Edible Films and Coatings for Meat and Meat Products Preservation.*”, **The Scientific World Journal**, 67(4): 833-48.
- Sanlibaba, P., Tezel, B., Cakmak, G.**, (2018), “*Prevalence and antibiotic resistance of Listeria monocytogenes isolated from Ready-to-Eat foods in Turkey.*”, **Journal of Food Quality**, <https://doi.org/10.1155/2018/7693782>
- Sant’Ana, A.S., Igarashi, M.C., Landgraf, M., Destro, M.T. & B.D., Franco,** (2012), “*Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of Listeria monocytogenes isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil.*”, **Int J Food Microbiol**, 155: 1–9.
- Sarno, E., Fierz, L., Zweifel, C., Tasara, T., Stephan, R.**, (2015), “*Characteristics of Listeria Monocytogenes isolated from tonsils of slaughtered fattening pigs in Switzerland.*”, **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, 11(1): 19- 23.
- Satin, M.**, (2002), “*Use of irradiation for microbial decontamination of meat: situation and perspectives.*”, **Meat Science**, 62: 277-283.
- 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* (3rd edn.). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 21-53.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., Griffin, P. M., (2011), "Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens.", *Emerg. Infect. Dis.*, 17: 7.

Schafer, D., Steffens, J., Barbosa, J., Zeni, J., Paroul, N., Valduga, E., Junges, A., Backes, G., Cansian, R., (2017), "Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse.", *Food science and technology*, 86: 393-398

Schuchat, A., Swaminathan, B., Broome C.V., (1991), "Epidemiology of human listeriosis.", *Clin. Microbiol*, 4: 169-183.

Self JL, Conrad A, Stroika S, Jackson A, Burnworth L, Beal J, Wellman A, Jackson KA, Bidol S, Gerhardt T, Hamel M, Franklin K, Kopko C, Kirsch P, Wise ME, Basler C., (2016), "Outbreak of Listeriosis Associated with Consumption of Packaged Salad - United States and Canada.", *MMWR Morb Mortal Wkly*, (33): 879-81

Sergelidis, D. & Abraham, A., (2009), "Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety.", *Food Control*, 20: 1-10.

Sergelidis, D., Stefanopoulou, A. M., & Genigeorgis, C., (2001), Effect of incubation temperature on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. In *Proceedings of the 2nd Balkan conference of microbiology* (p. 237).

Shahamat, M, Seaman, A. and Woodbine, W. (1980). "Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations." *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt.orig.* A 246, 506-511.

Scharff RL (2012). "Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States." *J Food Prot.* 75:123–131.

Silk, B.J., Date, K.A., Jackson, K.A, Pouillot, R., Holt K.G., Graves, L.M., Ong, K.L., Hurd, S., Meyer, R., Marcus, R., Shiferaw, B., Norton, D.M., Medus, C., Zansky, S.M., Cronquist, A.B., Henao, O.L., Jones, T.F., Vugia, D.J., Farley, M.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: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 54 Suppl 5:S396-3404.

Sinde, E. and Carballo, J. (2000) "Attachment of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers." *Food Microbiol* 17, 439– 447.

Smirnova, T. A., Didenko, L. V., Azizbekyan, R. R., Romanova, Y. M. (2010). "Structural and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms" Review. *Microbiology*. Vol. 79. N° 4. 413 - 423.

Sorrells, K.M., Enigl, D.C & J.R. Hatfield., (1989), "Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*.", *Journal of Food Protection*, 50: 730-735.

Sorqvist, S., (1994), "Heat-resistance of different servars of *Listeria monocytogenes*.", *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 383-388.

Spanu, C., Scarano, C., Ibba, M., Pala, C., Spanu, V. & De Santis, E., (2014), “*Microbiological challenge testing for Listeria monocytogenes in ready-to-eat food: a practical approach.*”, **Italian Journal of Food Safety**, 3: 231-235.

Stekelberg, F.K. & Kant-Muermans, M.L.T., (2001), “*Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of Lactobacillus curvatus and Listeria monocytogenes.*”, **International Journal of Food Microbiology**, 66: 197-203.

Stoller, A., Stevens, M., Stephan, R., Guldemann, C., (2019), “*Characteristics of Listeria monocytogenes strains persisting in a meat processing facility over a 4-year period.*”, **Pathogens**, 8: 32

Strohben, C.H., Gilmore, S.A & Sneed, J., (2004), “*Food Safety Practices and HACCP Implementation: Perceptions of Registered Dietitians and Dietary Managers.*”, **Journal of the American Dietetic Association**, 104(11): 1692-1699.

Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Vega, Y., Chico-Calero, I., Vazquez-Boland, J.A., (2001), “*A role for ActA in epithelial cell invasion by Listeria monocytogenes.*”, **Cell. Microbiol.**, 3: 853–864.

Sutherland, I. W. (2001 a). “*The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment.*” **Trends in Microbiology**. Vol. 9. N° 5.

Sutherland, I. W. (2001 b). “*Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework.*” **Microbiology** 147. 3 - 9.

Swaminathan, B., (2001), “*Listeria monocytogenes.*” In: M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville (eds), **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 2nd edition. ASM Press, Washington DC, pp. 383–409.

Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P., (2007), “*The epidemiology of human Listeriosis.*”, **Microbes Infect.** , 9(10): 1236-43.

Tavassoli-Kafrani E., Hajar Shekarchizadeh H., Masoudpour-Behabadi M. (2016) “*Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans.*” **Carbohydrate Polymers**, 137: 360–374.

Taylor E., (2008), “*A new method of HACCP for the catering and food service industry.*”, **Food Control**, 19: 126-134.

Theriot, J. A., Mitchison, T. J., Tilney, L. G., Portnoy, D. A., (1992), “*The rate of actin-based motility of intracellular Listeria monocytogenes equals the rate of actin polymerization.*”, **Nature**, 357: 257–260.

Thévenot, D., Delignette-Muller, M. L., Denburg, A., Christieans, S., VerzozyRozand, C., (2006), “*Serological and molecular epidemiology of Listeria monocytogenes strains collected in 13 French salting plants and their products.*”, **Int. J Food Microbiol.** , 112(2): 153-61.

- Thévenot, D., Delignette-Muller, M. L., Christieans, S., Vernozy-Rozand, C.,** (2005b), “Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products.”, **Int. J. Food Microbiol.**, 102: 85–94
- Tilney, L. G., Portnoy, D. A.,** (1989), “Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*.”, **J. Cell Biol.**, 109: 1597–1608.
- Tocmo, R., Krizman, K., Khoo, W. J., Phua, L. K., Kim, M., Yuk, H. G.,** (2014), “*Listeria monocytogenes* in Vacuum-Packed Smoked Fish Products: occurrence, Routes of Contamination, and Potential Intervention Measures.”, **Comp. Rev. Food Sci. Food Safety**, 13: 1735-1739.
- Tolvanen, R., Lunden, J., Horman, A., Korkeala, H.,** (2009), “Pilot-scale continuous ultrasonic cleaning equipment reduces *Listeria monocytogenes* level on conveyor belts.”, **J. Food Prot.**, 72: 408–411.
- Tompkin, R.B.,** (2002), “Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment.”, **Journal of Food Protection**, 65: 709-725.
- Parihar, V. S., Lopez-Valladares, G., Danielsson-Tham, M. L., Peiris, I., Helmersson, S., Unemo, M., et al.,** (2008), “Characterization of human invasive isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden 1986-2007.”, **Foodborne Pathogens and Disease**, 5, 755e761
- Vázquez-Boland, J.A, Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. & J., Kreft,** (2001), “*Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants.”, **Clin Microbiol Rev**, 14: 584–640.
- Vongkamjan, K., Roof, S., Stasiewicz, M. J., Wiedmann, M.,** (2013), “Persistent *Listeria monocytogenes* subtypes isolated from a smoked fish processing facility included both phage susceptible and resistant isolates.”, **Food Microbiol.**, 35: 38-48.
- Wagner, M., McLauchlin, J.,** (2008), “Handbook of *Listeria monocytogenes*.”, **Liu Dongyou (ed.) CRC Press.** pp. 3-25.
- Walker, S.J., Archer, P. & Banks, J.G.,** (1990), “Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures.”, **Journal of Applied Bacteriology**, 68: 157-162.
- Ward TJ, Ducey TF, Usgaard T, Dunn KA, Bielawski JP.,** (2008), “Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates.”, **Appl Environ Microbiol**, 74: 29–42.
- Wenkai Wang, Xiujuan Zhou, Yujuan Suo, Xiangyu Deng, Mengya Cheng, Chunlei Shi, Xianming Shi,** (2017), “Prevalence, serotype diversity, biofilm-forming ability and eradication of *Listeria monocytogenes* isolated from diverse foods in Shanghai, China.”, **Food Control**, 1068e1073
- Wesley, I.V.,** (2007), Listeriosis in animals. In E.T Ryser και E.H. Marth (Eds.), **Listeria, listeriosis, and food safety (3rd edn.)**. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 55-84

Wirtanen, G., Husmark, U. and MattilaSandholm, T. (1996) “*Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with Bacillus biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems.*” **J Food Prot** 59, 727– 733.

Wood, S., Maroushek, N., Czuprynski, C.J., (1993), “*Multiplication of Listeria monocytogenes in a murine hepatocyte cell line.*”, **Infect. Immun.**, 61: 3068.

Zhu, X., Long, F., Chen, Y., Knöchel, S., She, Q., & Shi, X., (2008), “*A putative ABC transporter is involved in negative regulation of biofilm formation by Listeria monocytogenes.*”, **Applied and Environmental Microbiology**, 74, 7675e7683.

Ziegler, M., Kent, D., Stephan, R., Guldemann, C., (2019), “*Growth potential of Listeria monocytogenes in twelve different types of RTE salads: Impact of food matrix, storage temperature and storage time.*”, **International Journal of Food Microbiology**, 296: 83-92

Zottola, E.A. and Sasahara, K.C. (1994) “*Microbial biofilms in the food processing industry – should they be a concern?*” **Int J Food Microbiol**, 23, 125– 148.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Ανδρίτσος, Ν. Δ., (2013), “*Βιοποικιλότητα και ποσοτική εκτίμηση του πληθυσμού του Listeria monocytogenes σε νωπό κρέας και προϊόντα του.*”

Αρβανιτογιάννης Ι.Σ., Στρατάκος Α.Χ. (2011) *Τεχνολογίες επεξεργασίας και συσκευασίας τροφίμων.* University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2015 της ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα (2005), Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 338

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 852/2004 του ΕΥΡΩΠΑΙΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ περί την υγιεινή των τροφίμων (2004), Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 139

Απόφαση του Ανωτάτου Χημικού Συμβουλίου (Α.Χ.Σ) 260/2013 περί του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2014), Εφημερίδα της Κυβερνήσεως, Άρθρο 89α

Καραϊωαννόγλου Π. , Υγιεινή του Κρέατος των Θηλαστικών, Γ’ έκδοση, Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη, 2008, σελ. 544.

Κωτσάκου, Β.Χ., (2017), “*Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων παθογένειας της L.monocytogenes σε υγρό θρεπτικό μέσο και σε φυτικές επιφάνειες.*”

ΚΕΕΛΠΝΟ (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων) (2016). Αύξηση δηλωθέντων κρουσμάτων λιστερίωσης στην Ελλάδα, 2015-2016 – Αποτελέσματα της έως τώρα διερεύνησης. <http://www.keelpno.gr>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 17/04/2019

Μπαλατσούρας, Γ., (2006), *Μικροβιολογία τροφίμων* (2^η έκδοση). Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.

Μπλούκας Ι.Γ. (2007) *Τεχνολογία Κρέατος.* Εκδόσεις Σταμούλη. Αθήνα.

Παπαδάκης ΣΕ (2012) *Συσκευασία Τροφίμων*. Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.

Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β., (2009), *Επιστήμη και μηχανική διεργασιών τροφίμων*
Εκδόσεις Ε.Μ.Π, Αθήνα 2009.