

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων & Υδάτων & Δημόσια Υγεία

«Διερεύνηση της συχνότητας παρουσίας των *Listeria* spp. στο απαστερίωτο αγελαδινό γάλα από εκτροφές της Βορείου Ελλάδος».

Αφροδίτη Σπυρίδωνος Γραμμένου

Γεωπόνος

2020

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων & Υδάτων & Δημόσια Υγεία

«Διερεύνηση της συχνότητας παρουσίας των *Listeria* spp. στο απαστερίωτο αγελαδινό γάλα από εκτροφές της Βορείου Ελλάδος».

Αφροδίτη Σπυρίδωνος Γραμμένου

Γεωπόνος

2020

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Σεργκελίδης Δανιήλ, Αν. καθηγητής, επιβλέπων

Αγγελίδης Απόστολος, Καθηγητής, μέλος

Γιαδίνης Νεκτάριος, Καθηγητής, μέλος

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συχνότητα παρουσίας των *Listeria* spp. εστιάζοντας στη *Listeria monocytogenes* στο νωπό απαστερίωτο αγελαδινό γάλα από 138 εκτροφές της Βορείου Ελλάδος. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η παρουσία του είδους *Listeria monocytogenes*, καθώς πρόκειται για το είδος του γένους *Listeria* το οποίο παρουσιάζει την πλέον σημαντική παθογονικότητα τόσο για τα ζώα όσο και για τον άνθρωπο. Η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών με αποτέλεσμα να εισχωρεί σε διάφορα περιβάλλοντα όπως οι χώροι επεξεργασίας τροφίμων. Η λιστερίωση αποτελεί μία από τις πιο θανατηφόρες τροφιμογενείς ασθένειες καθώς εμφανίζει υψηλά ποσοστά θνητότητας (περίπου 20%) και νοσηλείας σε νοσοκομείο (>95%). Για την αδρανοποίηση του παθογόνου εφαρμόζονται διάφορες μέθοδοι επεξεργασίας. Η παστερίωση του γάλακτος, εξασφαλίζει την πλήρη θανάτωση της *L. monocytogenes*. Ωστόσο εφαρμόζονται και άλλες μέθοδοι θερμικής ή μη θερμικής επεξεργασίας. Σε περίπτωση ατελούς θανατηφόρας επεξεργασίας ή επομόλυνσης, η *L. monocytogenes* μπορεί να προσκολληθεί σε διάφορα υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων με συνέπεια τον σχηματισμό βιοϋμενίων. Τα βιοϋμενία αυτά αποτελούν δυνητική πηγή επιμολύνσεων των τελικών προϊόντων διακυβεύοντας την ασφάλειά τους,

Η συλλογή των 138 δειγμάτων νωπού αγελαδινού γάλακτος, πραγματοποιήθηκε κατά την χρονική περίοδο Ιουνίου-Ιουλίου 2019. Από το σύνολο των 138 δειγμάτων που εξετάστηκαν, απομονώθηκαν ύποπτες αποικίες (σε υπόστρωμα ALOA) από πέντε δείγματα. Στα δείγματα αυτά, ακολούθησαν εξετάσεις για την ταυτοποίηση του είδους, τον προσδιορισμό των ορότυπων, τη φορεία γονιδίων λοιμογονικότητας και την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων. Η ταυτοποίηση απέδειξε πως τα απομονωθέντα στελέχη ήταν *L. monocytogenes*. Ακολούθως, η οροτύπισή τους πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της πολλαπλής PCR (multiplex PCR, mPCR) και έδειξε πως η οροτυπική ομάδα IIa (και οι ορότυποί της), ήταν η επικρατέστερη. Σε ό,τι αφορά την φορεία των γονιδίων λοιμογονικότητας, τα γονίδια *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA* και *iap* ανιχνεύθηκαν και στα πέντε στελέχη. Τέλος, αξιολογώντας την ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων, οι ορότυποι που ανήκουν στην ομάδα IIa (1/2a ή 3a), εμφάνισαν μέτρια ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων σε αντίθεση με τους ορότυπους 1/2c ή 3c και 4a ή 4c που ανήκουν στις ομάδες IIc και IVa αντίστοιχα και παρουσίασαν ασθενή ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων.

## Abstract

The aim of this study was to investigate the prevalence of *Listeria* spp. in raw cow's milk from 138 farms in Northern Greece, focusing in the presence of *Listeria monocytogenes*, as it is the most important species of the genus *Listeria* and shows significant pathogenicity for both humans and animals. *L. monocytogenes* has the remarkable ability to survive under a wide variety of environmental stresses enabling it to invade and grow in various environments such as various food processing areas. Listeriosis is one of the deadliest foodborne illnesses as it has high mortality (approximately 20%) and hospitalization rates (>95%). Various treatment methods are used to inactivate the pathogen in foods. Pasteurization effectively handles the levels of *L. monocytogenes* typically found in raw milk. However, alternative thermal or non thermal methods can be applied. In case of incomplete heat treatment or re-contamination, *L. monocytogenes* can adhere to various materials that are widely used in the food industry, resulting in the formation of biofilms. These biofilms represent a potential source for contamination of final products endangering their safety.

Out of total of 138 samples of raw cow's milk examined, five samples yielded suspect colonies on ALOA agar. The five isolates, were examined by tests for the identification of species, serotypes, the detection of virulence genes and the ability to form biofilms. The five isolates were identified as *L. monocytogenes* and classified into serogroups via multiplex PCR (mPCR). The application of the mPCR showed that group IIa was the predominant serotype group. All five isolates carried the *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA* and *iap* virulence genes. Finally, in the assessment of biofilm formation ability, strains belonging to serogroup IIa (1/2a or 3a) were characterized as "moderate", while strains belonging to serogroups IIc and IVa (serotypes 1/2c or 3c and 4a or 4c), showed a weak biofilm-forming ability.

## Περιεχόμενα

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	I
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	II
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	III
Ευχαριστίες.....	IV
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Το γένος <i>Listeria</i> spp.....</b>	<b>1</b>
1.1. Εισαγωγή .....	1
1.2. Ιστορική ανασκόπηση της ανακάλυψης της <i>L. monocytogenes</i> .....	1
1.3. Γενικά χαρακτηριστικά της <i>L. monocytogenes</i> .....	2
1.3.1. Μορφολογία .....	2
1.3.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά .....	3
1.3.3. Θερμοκρασία ανάπτυξης .....	3
1.3.4. Ενεργός οξύτητα (pH) .....	4
1.3.5. Επίδραση NaCl .....	4
1.3.6. Ενεργότητα νερού (aw).....	5
1.4. Μεταβολισμός και βιοχημικά χαρακτηριστικά .....	5
1.5. Ανάπτυξη σε εκλεκτικά υποστρώματα .....	6
1.6. Παρουσία στο φυσικό περιβάλλον .....	7
1.7. Οροτυπική ταξινόμηση των στελεχών της <i>L. monocytogenes</i> .....	8
<b>2. Παθογένεια της λιστερίωσης .....</b>	<b>9</b>
2.1. Μηχανισμός παθογένειας .....	9
2.2. Τοξικότητα .....	12
2.3. Αντοχή στα αντιμικροβιακά φάρμακα .....	12
2.4. Λιστερίωση.....	13

2.5. Η λιστερίωση στον άνθρωπο .....	14
2.5.1. λιστερίωση στην εγκυμοσύνη.....	15
2.5.2. Νεογνική λιστερίωση.....	16
2.5.3. Λιστερίωση και Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS) .....	16
2.5.4. Τρόποι μετάδοσης της <i>L. monocytogenes</i> στον άνθρωπο.....	16
2.6. Η λιστερίωση στα ζώα.....	17
2.7. Επιδημιολογικά δεδομένα της λιστερίωσης.....	19
2.7.1. Κατανάλωση νοπού γάλακτος .....	19
2.7.2. Επιδημιολογία της λιστερίωσης στην Ευρώπη.....	20
2.7.3. Επιδημιολογία της λιστερίωσης στην Ελλάδα .....	21
<b>3. Μικροβιολογία νοπού γάλακτος.....</b>	<b>22</b>
3.1. Προέλευση των μικροοργανισμών του νοπού γάλακτος.....	22
3.2. Μικροοργανισμοί του νοπού γάλακτος .....	23
3.2.1. Παθογόνα βακτήρια .....	23
3.2.2. Οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) .....	24
3.2.3. Μυκοτοξίνες.....	24
3.2.4. Ψυχρότροφα βακτήρια.....	24
3.2.5. Παθογόνα ψυχρότροφα βακτήρια.....	25
3.2.6. Θερμοάντοχα βακτήρια.....	26
3.3. Θερμοανθεκτικότητα της <i>L. monocytogenes</i> .....	26
<b>4. Μέθοδοι επεξεργασίας νοπού γάλακτος .....</b>	<b>28</b>
4.1. Θερμική επεξεργασία.....	28
4.2. Μη θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας.....	30
4.2.1. Ψύξη .....	30
4.2.2. Παλλόμενα Ηλεκτρικά Πεδία Υψηλής Τάσης.....	30

4.2.3. Υψηλή Υδροστατική Πίεση.....	31
4.2.4. Υπέρηχοι.....	32
4.2.5. Βιολογικές μέθοδοι.....	32
4.2.6. Αντιμικροβιακά συστήματα τροφίμων.....	33
4.2.7. Τεχνολογία εμποδίων.....	34
<b>5. Έλεγχος της <i>L. monocytogenes</i> στη βιομηχανία τροφίμων.....</b>	<b>34</b>
5.1. Νομοθετικό πλαίσιο.....	34
5.2. Διαχείριση ασφάλειας τροφίμων (HACCP).....	35
5.3. Παρουσία της <i>L. monocytogenes</i> στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων.....	36
5.4. Σχηματισμός βιοϋμενίων.....	37
5.4.1. Σχηματισμός βιοϋμενίων από τη <i>L. monocytogenes</i> .....	38
5.5. Καθαρισμός και εξυγίανση εξοπλισμού και χώρων επεξεργασίας τροφίμων.....	39
<b>6. Η <i>L. monocytogenes</i> στα γαλακτοκομικά προϊόντα.....</b>	<b>40</b>
6.1. Τυριά.....	40
6.2. Παγωτά.....	41
6.3. Βούτυρο .....	42
6.4. Ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα.....	42
6.5. Συμπεριφορά της <i>L. monocytogenes</i> στο νωπό γάλα.....	43
6.6. Επιβίωση και δυνατότητα ανάπτυξης των <i>Listeria</i> spp. και της <i>L. monocytogenes</i> στα γαλακτοκομικά προϊόντα κατά την παραγωγή και συντήρησή τους.....	44
<b>7. Μοριακή ταυτοποίηση της <i>L. monocytogenes</i> .....</b>	<b>46</b>
7.1. Ταχείες μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης.....	46
7.1.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	46
7.1.2. PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR).....	47
7.1.3. Πολλαπλή PCR (multiplex PCR).....	48
7.1.3.1. Οροτύπιση της <i>L. monocytogenes</i> με πολλαπλή PCR.....	49



7.1.3.2. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της PCR.....	49
7.1.4. Μικροσυστοιχίες DNA (DNA Microarrays).....	50
7.1.5. Αλληλουχοεξαρτώμενη ενίσχυση νουκλεϊκού οξέος (NASBA).....	50
7.2. Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης της <i>L. monocytogenes</i> .....	51
7.2.1. Ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE).....	51
7.2.2. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP).....	52
7.2.3. Πολυμορφισμός ενισχυμένου μήκους θραύσματος (AFLP).....	52
7.2.4. Τυχαία ενίσχυση του πολυμορφικού DNA (RAPD) .....	52
7.3. Επιτήρηση της λιστερίωσης με αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) .....	53
 <b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>54</b>
 1. Απομόνωση και ταυτοποίηση των ειδών του γένους <i>Listeria</i> και της <i>L. monocytogenes</i> .....	54
1.1. Απομόνωση των <i>Listeria</i> spp.....	54
1.2. Ταυτοποίηση των <i>Listeria</i> spp. και προσδιορισμός των οροτύπων της <i>L. monocytogenes</i> .....	55
1.3. Προσδιορισμός των ορότυπων των στελεχών της <i>L. monocytogenes</i> .....	56
2. Έλεγχος φορέας των γονιδίων λοιμογονικότητας <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>inlC</i> , <i>plcA</i> , <i>prfA</i> , <i>hlyA</i> και <i>iap</i> .....	58
2.1. Ανίχνευση των γονιδίων <i>inlA</i> , <i>inlC</i> , <i>inlJ</i> .....	58
2.2. Ανίχνευση των γονιδίων <i>plcA</i> , <i>actA</i> , <i>hlyA</i> και <i>iap</i> .....	59
2.3. Εξέταση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων.....	60
3. Αποτελέσματα.....	61

4. Συζήτηση.....	62
5. Συμπεράσματα.....	68
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	69
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ.....	69
ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	92

## Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας σηματοδοτεί την ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Αναπληρωτή Καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων, του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, κ. Δανιήλ Σεργκελίδη, ο οποίος δέχτηκε να αναλάβει την επίβλεψη της εργασίας μου και μου πρόσφερε συνεχώς συμβουλές και καθοδήγηση, χωρίς τις οποίες η ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας θα ήταν αδύνατη.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Υγιεινής και Τεχνολογίας του Γάλακτος και των Προϊόντων του, κ. Αγγελίδη Απόστολο και τον Καθηγητή Παθολογίας των Μικρών Μηρυκαστικών, κ. Γιαδίνη Νεκτάριο, για την συμμετοχή και συμβολή τους στην πραγματοποίηση και εξέταση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ζδράγκα Αντώνη, τακτικό ερευνητή και Διευθυντή του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών και τον κ. Κοτζαμανίδη Χαράλαμπο για την πολύτιμη συμβολή και βοήθεια στην πραγματοποίηση των εργαστηριακών μοριακών μεθόδων της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 1:** Όρια ανάπτυξης και επιβίωσης της *L. monocytogenes* (FSAI, 2011), σελ.5

**Πίνακας 2:** Ετήσιος αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων και επίπτωσης της λιστερίωσης στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, 2004-2019 (ΕΟΔΥ, 2019) σελ.22

**Πίνακας 3:** Αλληλουχίες εκκινητών γονιδίου-στόχου και μέγεθος προϊόντος PCR για την μοριακή ταυτοποίηση της *L. monocytogenes* (D'agostino et al., 2004), σελ.47

**Πίνακας 4:** Εξετασθέντα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ταυτοποίησης των ειδών του γένους *Listeria*, σελ.56

**Πίνακας 5:** Αλληλουχίες εκκινητών DNA που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ορολογικών ομάδων της *L. monocytogenes*, σελ.57

**Πίνακας 6:** Αλληλουχίες εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων μολυσματικότητας της *L. monocytogenes* *inlA*, *inlC* και *inlJ* (Liu et al., 2007), σελ.59

**Πίνακας 7:** Αλληλουχίες εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων μολυσματικότητας της *L. monocytogenes* *plcA*, *actA*, *hlyA* και *iap*, σελ.60

**Πίνακας 8:** Χαρακτηριστικά απομονωθέντων στελεχών της *L. monocytogenes* από νωπό αγελαδινό γάλα, σελ.62

**Πίνακας 9:** Συχνότητα απομόνωσης της *L. monocytogenes* σε δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος παγκοσμίως, σελ.64

**Πίνακας 10:** Συχνότητα απομόνωσης άλλων ειδών του γένους *Listeria* εκτός της *L. monocytogenes* σε δείγματα νωπού γάλακτος παγκοσμίως, σελ 66

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

**Εικόνα 1:** Η *L. monocytogenes* καθώς καταστέλλει την έκφραση των βλεφαρίδων στους 37 °C. Μικροφωτογραφία TEM κλινικού δείγματος που απεικονίζει μία μόνο βλεφαρίδα. Μεγέθυνση x20.000 (Remuzgo-Martínez & Ramos Vivas, 2013), σελ.2

**Εικόνα 2:** Αποικίες της *L.monocytogenes*, έπειτα από καλλιέργεια σε αιματούχο άγαρ προερχόμενο από βοοειδή για 24 ώρες στους 37 °C (Vetbact, 2017), σελ.6

**Εικόνα 3:** Απεικόνιση των αποικιών της *L. monocytogenes* με τη διαυγή άλω και της *L. innocua* χωρίς, στο εκλεκτικό υπόστρωμα ALOA (Biolife, 2018), σελ.7

**Εικόνα 4:** Διαφορά μεταξύ σωματικού (O) και βλεφαριδικού (H) αντιγόνου (Aryal, 2018), σελ.9

**Εικόνα 5:** Σχηματική αναπαράσταση του ενδοκυτταρικού κύκλου ζωής της *L. monocytogenes* (Luque-Sastre et al., 2018), σελ.11

**Εικόνα 6:** Αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών με την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας κατά την επεξεργασία γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων (Gieffel & Wells-Bennik, 2010), σελ.29

**Εικόνα 7:** Αδρανοποίηση της *L. monocytogenes* σε πλήρες γάλα, με διοχέτευση ηλεκτρικού ρεύματος ισχύος 35 kV/cm (●) και 25 kV/cm (■). Θερμοκρασία 25 °C, ρυθμός ροής 7 ml/s, διάρκεια παλμού 1,5 ms, συχνότητα 1700 Hz (Reina et al., 1998), σελ.31

**Εικόνα 8:** Στάδια σχηματισμού των βιοϋμενίων (Abdallah et al., 2014), σελ.38

**Εικόνα 9:** Σχηματισμός βιοϋμενίου της *L .monocytogenes* σε ανοξείδωτο ατσάλι σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Di Ciccio et al., 2012), σελ.39

**Εικόνα 10:** Ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε διάφορους τύπους τυριών κατά την διάρκεια αποθήκευσής τους (Karpetanakou et al., 2017), σελ.41

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

**Γράφημα 1:** Μηνιαία κατανομή επιβεβαιωμένων περιπτώσεων λιστερίωσης κατά το διάστημα 2013-2017 σε χώρες της ΕΕ / ΕΟΧ (EFSA & ECDC, 2018), σελ.21

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. Το γένος *Listeria* spp.

### 1.1 Εισαγωγή

Το γένος *Listeria* ανήκει στην οικογένεια των *Listeriaceae*, στην τάξη των *Bacillales* και στην κλάση των *Bacilli* που ανήκει στο φύλο *Firmicutes* (Hurst, 2018). Περιλαμβάνει 19 είδη (*Listeria monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae*, *L. costaricensis* και *L. thailandensis*) 11 από τα οποία περιγράφηκαν μετά το 2009 (Graves et al., 2010; Leclercq et al., 2010; Bertsch et al., 2013; Lang Halter et al., 2013; den Bakker et al., 2014; Weller et al., 2015; Núñez-Montero et al., 2018; Leclercq et al., 2019). Διάφορα γενετικά και φαινοτυπικά δεδομένα ορίζουν μια σαφώς διακριτή ομάδα έξι δυνητικά παθογόνων ειδών (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* και *L. grayi*) (Orsi & Wiedmann, 2016). Από τα είδη αυτά, η *L. monocytogenes* παρουσιάζει σημαντική παθογονικότητα για τα ζώα και τον άνθρωπο, ενώ η *L. ivanovii* είναι παθογόνο κυρίως για τα ζώα και σπάνια προσβάλλει τον άνθρωπο (Liu, 2006). Τα είδη του συγκεκριμένου γένους, συνήθως υπάρχουν ευρέως στο περιβάλλον ειδικά στο έδαφος και στα ανθρώπινα και ζωικά λύματα (Hurst, 2018). Χαρακτηριστικό γνώρισμα της *L. monocytogenes* είναι η ικανότητα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού υπό ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες με αυξημένη οσμωτική πίεση. Η *L. monocytogenes* είναι ένα τροφιμογενές βακτήριο το οποίο προσβάλλει τόσο τα ζώα όσο και τον άνθρωπο προκαλώντας την λιστερίωση, μια ιδιαίτερα σοβαρή ασθένεια με υψηλή θνητότητα η οποία εμφανίζεται με διάφορες κλινικές εκδηλώσεις όπως σηψαιμία, αποβολές, γαστρεντερίτιδα και εγκεφαλίτιδα (ANSES, 2011).

### 1.2 Ιστορική ανασκόπηση ανακάλυψης της *L. monocytogenes*

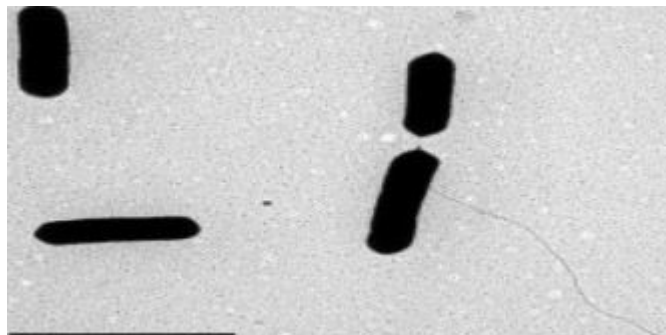
Η *L. monocytogenes* έχει χαρακτηριστεί ως παθογόνο βακτήριο από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Το 1919 απομονώθηκε από το ήπαρ κουνελιών και ονομάστηκε *Bacillus hepatitis*. Το 1924 σε εργαστήριο στην Αγγλία, κουνέλια και ινδικά χοιρίδια εμφάνισαν συστηματική ασθένεια λόγω της μονοπυρήνωσης που προκλήθηκε από το βακτήριο. Το βακτήριο τότε ονομάστηκε *Bacterium monocytogenes*, ενώ το 1940 του δόθηκε η ονομασία *Listeria monocytogenes*. Σε αντίθεση με την ονομασία του, η μονοπυρήνωση είναι ένα άτυπο χαρακτηριστικό της λιστερίωσης και δεν αποτελεί αξιόπιστο κλινικό σύμπτωμα της νόσου (Armstrong & Gellin, 1998).

Οι κυτταρικές ιδιότητες της *L. monocytogenes* μελετήθηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1970. Στα μέσα της δεκαετίας του 1980 και με την βοήθεια των τεχνικών της μοριακής βιολογίας άνοιξε ο δρόμος για την μελέτη των παραγόντων της μολυσματικότητας του βακτηρίου. Τότε διαπιστώθηκε πως η *L. monocytogenes* είναι τροφιμογενώς μεταδιδόμενος παθογόνος μικροοργανισμός για τον άνθρωπο. Το 2001 η δημοσίευση της γονιδιακής αλληλουχίας δύο στελεχών των ειδών *L. monocytogenes* και *L. innocua* αποτέλεσε την αρχή των μεταγονιδιακών μελετών, όπως οι συγκριτικές μελέτες μεταξύ των ειδών του γένους *Listeria* και στελεχών του είδους *L. monocytogenes* (Dortet et al., 2009).

### 1.3 Γενικά Χαρακτηριστικά της *L. monocytogenes*

#### 1.3.1 Μορφολογία

Η *L. monocytogenes* είναι ένας θετικός κατά Gram (Gram+) ραβδόμορφος βάκιλος, μη σπορογόνος και προαιρετικά αναερόβιος. Το μέγεθός του ποικίλει (διάμετρος 0,4-0,5μm με μήκος 1-2μm) και δεν δημιουργεί κάψες (Wang & Orsi, 2013). Στο γονιδίωμά του, το ποσοστό G+C νουκλεοτιδίων (GC περιεχόμενο) είναι χαμηλό σε ποσοστό 36-42% και έχει στενή φυλογενετική σχέση με τα γένη *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium* και *Staphylococcus* (Vasquez-Boland et al., 2001). Τα βακτήρια του γένους *Listeria* διαθέτουν 1 έως 5 μαστίγια τα οποία τους προσδίδουν κινητικότητα που συνήθως εκδηλώνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (20-25 °C). Πολλά είδη του γένους *Listeria*, χάνουν την κινητικότητά τους στους 37 °C λόγω της αδυναμίας έκφρασης των μαστιγίων στη συγκεκριμένη θερμοκρασία (Dortet et al., 2009).



**Εικόνα 1:** Η *L. monocytogenes* καθώς καταστέλλει την έκφραση των βλεφαρίδων στους 37 °C. Μικροφωτογραφία TEM κλινικού δείγματος που απεικονίζει μία μόνο βλεφαρίδα. Μεγέθυνση x20.000 (Remuzgo-Martínez & Ramos Vivas, 2013)



Η *L. monocytogenes* είναι δυσδιάκριτη μορφολογικά σε σχέση με τα άλλα είδη του γένους της. Για το λόγο αυτό, ο εργαστηριακός έλεγχος κρίνεται απαραίτητος για την διαφοροποίησή της από τα άλλα είδη (Liu, 2006). Τα κύτταρα παρουσιάζονται στο μικροσκόπιο είτε σε μεμονωμένες μονάδες, είτε σε μικρές αλυσίδες είτε διατάσσονται σε σχήματα V, Y και πιο πολύπλοκους συνδυασμούς (palisades) (Rocourt & Buchrieser, 2007). Οι αποικίες της *L. monocytogenes* εμφανίζουν μία χαρακτηριστική μπλε-πράσινη χροιά όταν παρατηρηθούν υπό λοξό φωτισμό (45° Henry Illumination). Η *L. monocytogenes* είναι θετική στη δοκιμή καταλάσης, αρνητική στη δοκιμή οξειδάσης και παράγει μία β-αιμολυσίνη η οποία σχηματίζει διαυγείς ζώνες σε αιματούχο άγαρ (Farber & Peterkin, 1991).

### 1.3.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Πολλές ερευνητικές εργασίες έχουν ασχοληθεί με την προσαρμογή της *L. monocytogenes* στο περιβαλλοντικό στρες όπως το χαμηλό pH, τη χαμηλή θερμοκρασία, την επίδραση της έκθεσης σε θερμοκρασίες λίγο χαμηλότερες από τις θανατηφόρες και την επίδραση του NaCl (Sergelidis & Abraham, 2009).

Η *L. monocytogenes* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, του οποίου όμως η ανάπτυξη ενισχύεται σε ατμόσφαιρα με μειωμένη περιεκτικότητα σε οξυγόνο και με διοξείδιο του άνθρακα σε συγκέντρωση 5-10% (Pearson & Marth, 1990).

### 1.3.3 Θερμοκρασία ανάπτυξης

Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της *L. monocytogenes* είναι η ικανότητα της να αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος από 0 έως 45 °C με βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας ανάπτυξης τους 30-37 °C. Παρότι πρόκειται για ένα μεσόφιλο βακτήριο φαίνεται πως πολλά στελέχη του παραμένουν μεταβολικά ενεργά σε χαμηλές θερμοκρασίες κάτω των 5 °C, μία θερμοκρασία η οποία χρησιμοποιείται κατά τη συντήρηση των τροφίμων (Bereksi et al., 2002). Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού όμως του μικροοργανισμού στις χαμηλές θερμοκρασίες είναι αργός με χρόνο διπλασιασμού 20-30 h και 100-186 h στους 3 και 0 °C αντιστοίχως (Swaminathan, 2001). Η παρουσία του σε επεξεργασμένα γαλακτοκομικά προϊόντα οφείλεται πιθανότατα στην επιμόλυνση του τελικού προϊόντος από το περιβάλλον των εγκαταστάσεων επεξεργασίας γάλακτος, αφού πολλές έρευνες τεκμηριώνουν την παρουσία του μικροοργανισμού στις επιφάνειες των ψυκτικών θαλάμων και των χώρων και του εξοπλισμού επεξεργασίας (D'amico & Donnelly, 2017). Έχει αναφερθεί πως ο χρόνος διπλασιασμού του βακτηρίου στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι 35 h στους 4 °C και 41 min στους 35 °C (Marth et al.,

1986). Θανατώνεται με την εφαρμογή της βραδείας παστερίωσης (63 °C) για χρονικό διάστημα 30 λεπτών (Low-Temperature Long-Time, LTLT) η οποία λαμβάνει χώρα σε δεξαμενές με διπλά τοιχώματα αλλά και με την εφαρμογή ταχείας παστερίωσης (71,7 °C) για χρονικό διάστημα 15 δευτερολέπτων (High Temperature Short Time, HTST). Η εφαρμογή των παραπάνω ισοδύναμων μεθόδων θερμικής επεξεργασίας εξασφαλίζει την θανάτωση του παθογόνου (Ryser et al., 2011).

#### 1.3.4 Ενεργός οξύτητα (pH)

Η ικανότητα των βακτηρίων να αντέχουν σε συνθήκες περιβαλλοντικού στρες, τόσο εντός όσο και εκτός του ξενιστή, παίζει κρίσιμο ρόλο στον χαρακτηρισμό τους ως παθογόνα. Το χαμηλό pH των γαστρικών εκκρίσεων δρα ως εμπόδιο στην επιτυχή προσβολή του ξενιστή (Davis et al., 1996). Η *L. monocytogenes* παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη σε ουδέτερο προς ελαφρώς αλκαλικό pH, αναπτύσσεται όμως και σε τιμές pH 5,0 έως 9,6 (Pearson & Marth, 1990).

Σε τέσσερα στελέχη της *L. monocytogenes*, έπειτα από επώαση στους 30 °C σε Tryptic Soy broth παρατηρήθηκε ανάπτυξη σε τιμές pH από 4,5 και πάνω (Parish & Higgins, 1989). Σε θερμοκρασίες επώασης 20-30, 10, 7 και 4 °C, οι ελάχιστες τιμές pH στις οποίες παρατηρήθηκε ανάπτυξη ήταν 4,39, 4,62, 4,81 και 5,23 αντίστοιχα (George et al., 1988). Το ελάχιστο pH ανάπτυξης ενός βακτηρίου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος ανάπτυξης, η θερμοκρασία και η παρουσία NaCl (Jay, 1996).

#### 1.3.5 Επίδραση NaCl

Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της *L. monocytogenes* είναι η ικανότητά της να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται ακόμη και υπό ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος όπως η υψηλή οσμωτική πίεση (Sleator et al., 2003). Είναι ανθεκτική σε περιβάλλοντα που συνδυάζουν χαμηλή θερμοκρασία, χαμηλό pH και υψηλή αλατότητα (Sorrells & Enigl, 1990). Αναπτύσσεται σε pH 4,5 έως 9 και σε συγκέντρωση 10% NaCl, αλλά παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη σε ουδέτερο pH και συγκέντρωση 0,5% NaCl (Dortet et al., 2009). Έπειτα από καλλιέργεια σε θρεπτικό ζωμό τρυψίνης σόγιας (Trypticase Soy Broth, TSB) που περιείχε NaCl, η *L. monocytogenes* αναπτύχθηκε σε συγκέντρωση NaCl 10% στους 35 °C και 12% στους 25 °C (Sorrells & Enigl, 1990). Τέλος, μπορεί να αντέξει σε συγκέντρωση NaCl 25% για 4 μήνες και σε 30% για 5 ημέρες στους 37 °C (Pitt et al., 1999).

### 1.3.6 Ενεργότητα νερού ( $a_w$ )

Η *L. monocytogenes* παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη σε ενεργότητα νερού ( $a_w$ )  $\geq 0,97$ . Για τα περισσότερα στελέχη η ελάχιστη τιμή  $a_w$  στην οποία αναπτύσσονται είναι 0,93, ενώ κάποια άλλα μπορεί να αναπτύσσονται και σε τιμές χαμηλότερες από 0,90. Επιπλέον ο μικροοργανισμός μπορεί να επιβιώσει για μεγάλα διαστήματα σε τιμές  $a_w$  μέχρι και 0,83 (Ryser & Buchanan, 2013). Χρησιμοποιώντας γλυκερόλη, NaCl και σουκρόζη για τη ρύθμιση των επιπέδων ενεργότητας νερού και παράλληλα με την επώαση του βακτηρίου στους 30 °C, οι χαμηλότερες τιμές  $a_w$  στις οποίες παρατηρήθηκε ανάπτυξη της *L. monocytogenes* ήταν 0,90, 0,92 και 0,93 αντίστοιχα για κάθε μέσο (Farber et al., 1992).

**Πίνακας 1:** Όρια ανάπτυξης και επιβίωσης της *L. monocytogenes* (FSAI, 2011).

Παράμετρος	Εύρος	Βέλτιστο εύρος	Ικανότητα επιβίωσης (αλλά όχι ανάπτυξης)
Θερμοκρασία (°C)	-1,5 έως 45	30 έως 37	-18
pH	4,2 έως 9,5	7	3,3-4,2
Ενεργότητα νερού ( $a_w$ )	0,90 έως >0,99	0,97	<0,90
Αλατότητα (%)	<0,5 έως 12	Δ/Υ	$\geq 20$

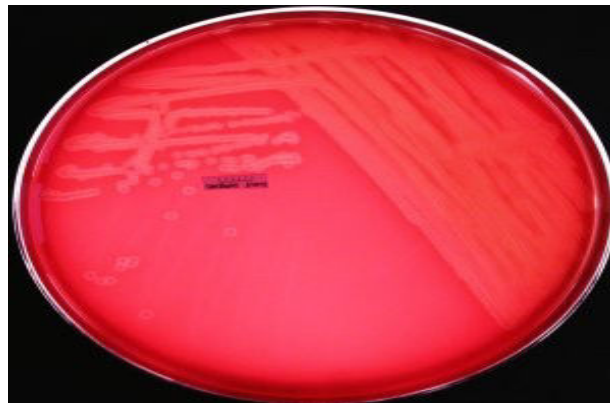
### 1.4 Μεταβολισμός και βιοχημικά χαρακτηριστικά

Τα είδη του γένους *Listeria* είναι θετικά στην καταλάση και αρνητικά στην οξειδάση και την ινδόλη (Liu, 2006). Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για να περιγράψουν την αερόβια και αναερόβια ανάπτυξη σε επιλεγμένα σάκχαρα σε διάφορα μέσα ανάπτυξης, όλα τα στελέχη παρουσίασαν αερόβια ανάπτυξη στην γλυκόζη σχηματίζοντας ως κύρια τελικά προϊόντα γαλακτικό ή οξικό οξύ. Σε αναερόβια ανάπτυξη σχηματίστηκε μόνο γαλακτικό οξύ (Pine et al., 1989). Σε ένα ακόμη πείραμα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των τελικών μεταβολικών προϊόντων της *L. monocytogenes* υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, με μέσο ανάπτυξης και πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, βρέθηκε πως από τα 10 στελέχη που εξετάστηκαν, όλα παρήγαγαν οξικό οξύ σε αερόβιες συνθήκες αλλά όχι σε αναερόβιες (Romick et al., 1996).

Αναερόβια ανάπτυξη εμφανίζουν μόνο σε μέσα ανάπτυξης με εξόζες και πεντόζες, ενώ αεροβίως κάποια στελέχη αναπτύσσονται σε μέσο ανάπτυξης με μαλτόζη και με λακτόζη αλλά όχι με σακχαρόζη (Pine et al., 1989).

Τα είδη του γένους *Listeria*, διαθέτουν βιοχημικές ιδιότητες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον βιοχημικό διαχωρισμό των ειδών του γένους όπως διαφοροποιήσεις στην ικανότητά τους να αιμολύουν ερυθρά αιμοσφαίρια ίππων ή προβάτων καθώς και στην ικανότητα ζύμωσης της L-ραμνόζης, D-ξυλόζης και α-μεθυλο-D-γλυκοζίτη μαννόζης (Robinson et al., 2000).

Η πλήρης λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων ορίζεται ως β-αιμόλυση (Buxton, 2005) και μόνο τρία είδη του γένους *Listeria* είναι αιμολυτικά. Συγκεκριμένα, η *L. monocytogenes*, η *L. seeligeri* και η *L. ivanovii* προκαλούν τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων της πλειονότητας των θηλαστικών ζώων. Η αιμολυτική δραστηριότητα αποδεικνύεται με τη χρήση αιματούχου άγαρ, με αίμα προερχόμενο από πρόβατα, βοοειδή ή ίππους. Η αιμόλυση που προκαλεί η *L. monocytogenes* μοιάζει με εκείνη του *Streptococcus agalactiae*. Η ζώνη της αιμόλυσης είναι διαυγής και στενή. Συχνά δεν εκτείνεται πέρα από την άκρη των αποικιών και λόγω της διάχυσης της, το χρώμα της προσομοιάζει με εκείνο του θρεπτικού μέσου (Allerberger, 2003; Buxton, 2005).

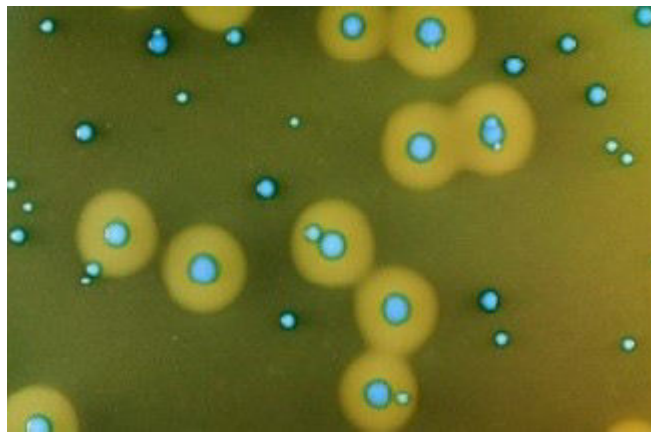


**Εικόνα 2:** Αποικίες της *L.monocytogenes*, έπειτα από καλλιέργεια σε αιματούχο άγαρ προερχόμενο από βοοειδή για 24 ώρες στους 37 °C (Vetbact, 2017)

### 1.5 Ανάπτυξη σε εκλεκτικά υποστρώματα

Για την απομόνωση του μικροοργανισμού από τρόφιμα, περιβάλλον και λύματα, υπάρχουν διαθέσιμα εκλεκτικά υποστρώματα τόσο υγρά όσο και στερεά. Από τις μεθόδους ISO 11290-1:1996 και ISO 11290-2:1998 προτάθηκαν δύο εκλεκτικά υποστρώματα: το PALCAM και το OXFORD (Wagner & McLauchlin, 2008).

Το 2004 πραγματοποιήθηκε τροποποίηση της αρχικής έκδοσης των ISO 11290-1:1996 και ISO 11290-2:1998 για την απομόνωση και ταυτοποίηση της *L. monocytogenes* από τα τρόφιμα. Για την απομόνωση ύποπτων αποικιών του παθογόνου, υιοθετήθηκε το χρωμογόνο υπόστρωμα ALOA (Άγαρ *Listeria* Ottavani & Agosti). Στο υπόστρωμα ALOA τα είδη του γένους *Listeria* εμφανίζονται ως μπλε-πράσινες αποικίες λόγω της παραγωγής του ενζύμου β-D-γλυκοσιδάση. Το ALOA, αποτελείται από το χρωμογόνο παράγοντα 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολ-β-D-γλυκοκυρανοσίδιο, ο οποίος διασπάται από το ένζυμο β-D-γλυκοσιδάση (Angelidis et al., 2015) και την L-a-φωσφατιδιλινοσιτόλη η οποία υδρολύεται από τη φωσφολιπάση C. Η αντίδραση του χρωμογόνου παράγοντα με το ένζυμο δίνει μπλε-πράσινες αποικίες για όλα τα είδη του γένους *Listeria*. Η υδρόλυση της L-a-φωσφατιδιλινοσιτόλης από την φωσφολιπάση C, δημιουργεί μία διαυγή άλω γύρω από τις αποικίες, η οποία υποδηλώνει παθογένεια και διαφοροποιεί τις αποικίες της *L. monocytogenes* από εκείνες των άλλων ειδών του γένους (Εικόνα 3) (da Silva et al., 2018).



**Εικόνα 3:** Απεικόνιση των αποικιών της *L. monocytogenes* με τη διαυγή άλω και της *L. innocua* χωρίς, στο εκλεκτικό υπόστρωμα ALOA (Biolife, 2018)

## 1.6 Παρουσία στο φυσικό περιβάλλον

Η *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένη στο φυσικό περιβάλλον. Έχει απομονωθεί από ποικίλα περιβαλλοντικά δείγματα όπως το έδαφος, την αποσυντιθέμενη βλάστηση, τα αστικά λύματα, τα κόπρανα και το νερό (Dhama et al., 2015). Υπάρχει σε ύδατα και ιζήματα ποταμών, κανάλια, λίμνες, θαλάσσια ύδατα και ακτογραμμές. Το παθογόνο παρουσιάζει υψηλό επιπολασμό σε εδάφη που βρίσκονται κοντά σε ύδατα, σε εδάφη με μεγαλύτερα ποσοστά υγρασίας και σε εδάφη που βρίσκονται κοντά σε βοσκότοπους (Kuzmanović et al., 2011). Το παθογόνο έχει απομονωθεί παγκοσμίως από ανθρώπους και ζώα (Dhama et al., 2015).

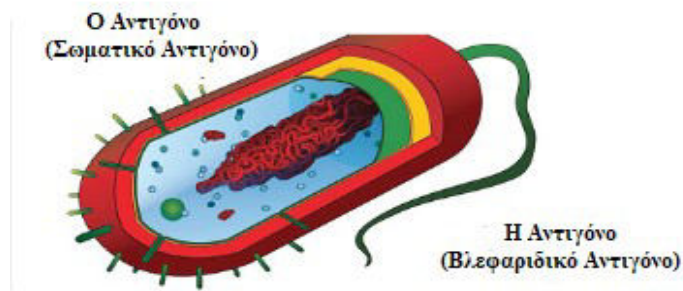
Η *L. monocytogenes* συνήθως απαντάται σε περιοχές της εύκρατης ζώνης, έχει υψηλή περιβαλλοντική προσαρμοστικότητα και υπάρχει ως σαπρόφυτο στα φυτά και ως παθογόνο στα ζώα. Διαθέτει ισχυρούς μολυσματικούς παράγοντες και μπορεί εύκολα να εισχωρήσει στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα (Konosopoka et al., 2012). Επιβιώνει στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου, με το 2-10% του γενικού πληθυσμού να είναι ασυμπτωματικοί φορείς του παθογόνου (Buchanan et al., 2017).

Σε ότι αφορά τα τρόφιμα, η *L. monocytogenes* έχει εντοπιστεί σε γάλα, κρέας, κρεατοσκευάσματα, θαλασσινά, φρέσκα φρούτα και λαχανικά (Dhama et al., 2015). Ιδανικότερο περιβάλλον για την ανάπτυξη του παθογόνου είναι τα νωπά, μη επεξεργασμένα τρόφιμα, τα οποία συντηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα υπό ψύξη, τα τρόφιμα που έχουν υποστεί επεξεργασία σε χώρους με ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής και τα προμαγειρεμένα και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Kuzmanović et al., 2011).

Η παρουσία της *L. monocytogenes* είναι συχνή και στις κτηνοτροφικές μονάδες. Το παθογόνο μπορεί να επιβιώσει για μήνες σε διάφορους τύπους ζωοτροφών και στην υγρή κοπριά. Οι ενσιρωμένες ζωοτροφές αποτελούν μία από τις σημαντικότερες πηγές μετάδοσης του παθογόνου στα ζώα. Η κατανάλωση μολυσμένων ζωοτροφών έχει ως αποτέλεσμα την εξάπλωση του παθογόνου στην κτηνοτροφική μονάδα μέσω των ζωικών κοπράνων. Η επακόλουθη χρήση των κοπράνων των μολυσμένων ζώων ως λίπασμα μπορεί να μολύνει τα νωπά τρόφιμα με το παθογόνο (Ferreira et al., 2014).

### **1.7 Οροτυπική ταξινόμηση των στελεχών της *L. monocytogenes***

Οι μικροοργανισμοί δρουν σαν αντιγόνα, είτε στο σύνολό τους είτε τμηματικά, με αντιγονικά στοιχεία που υπάρχουν επί ή εντός των μικροβίων (σωματικά αντιγόνα) και στις βλεφαρίδες (βλεφαριδικά αντιγόνα) (Λεβειδιώτου-Στεφάνου, 2000). Οι αντιγονικοί τύποι των ειδών του γένους *Listeria* διακρίνονται σε σωματικά (O) και βλεφαριδικά (H) αντιγόνα (Pearson & Marth, 1990).



**Εικόνα 4:** Διαφορά μεταξύ σωματικού (O) και βλεφαριδικού (H) αντιγόνου (Aryal, 2018)

Βάσει αυτών των αντιγόνων, τα στελέχη της *L. monocytogenes* υποδιαιρούνται στους παρακάτω 15 ορότυπους (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 6a, 6b και 7). Έχει παρατηρηθεί ότι οι ορότυποι 1/2a, 1/2b και 4b της *L. monocytogenes* ευθύνονται για το 98% των καταγεγραμμένων περιπτώσεων λιστερίωσης σε ανθρώπους, ενώ οι ορότυποι 4a και 4c σπάνια σχετίζονται με εξάρσεις της νόσου. Επιπλέον, ο ορότυπος 4b έχει απομονωθεί μόνο από επιδημικές εξάρσεις λιστερίωσης, ενώ οι ορότυποι 1/2a και 1/2b συνδέονται μόνο με σποραδικές μολύνσεις από *L. monocytogenes* (Chen et al., 2017).

Παρόλο που ο ορότυπος 1/2a απομονώνεται συχνότερα από τα τρόφιμα, ο ορότυπος 4b είναι εκείνος που ευθύνεται για την πλειονότητα των επιδημικών κρουσμάτων ανθρώπινης λιστερίωσης. Το γεγονός αυτό, οφείλεται στην υψηλότερη τοξικότητα του οροτύπου 4b (Jamali et al., 2013).

## 2. Παθογένεια της λιστερίωσης

### 2.1 Μηχανισμός παθογένειας

Τα μολυσμένα τρόφιμα είναι η κύρια πηγή της μόλυνσης των ανθρώπων τόσο σε σποραδικές όσο και σε επιδημικές περιπτώσεις και το έντερο θεωρείται ως η κύρια είσοδος του παθογόνου στον ξενιστή (Vasquez-Boland et al., 2001). Μετά την είσοδο στον στόμαχο του ξενιστή, η *L. monocytogenes* αντέχει στην έκθεση στα πρωτεολυτικά ένζυμα, στα χολικά άλατα και στο όξινο περιβάλλον του στομάχου (pH 2,0) (Liu, 2006).

Η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να εισχωρεί και να πολλαπλασιάζεται στα κύτταρα του ξενιστή με τους εξής δύο τρόπους: είτε τα μακροφάγα κύτταρα προσλαμβάνουν το βακτήριο, είτε το ίδιο το βακτήριο ενεργοποιώντας κυτταρικούς μηχανισμούς εισέρχεται σε κύτταρα που δεν δρουν φαγοκυτταρικά όπως είναι τα ηπατικά, οι ινοβλάστες και διάφοροι τύποι νευρικών κυττάρων (Vasquez-Boland et al., 2001). Ο μηχανισμός της παθογένειας της *L. monocytogenes* βασίζεται στην είσοδο του βακτηριακού κυττάρου στο κύτταρο του ξενιστή, την απόδραση του από το χυμοτόπιο-κενοτόπιο (vacuole) στο κυτταρόπλασμα και τη διασπορά του από το ένα κύτταρο στο άλλο με κινητικότητα βασισμένη στην ακτίνη (Cossart & Lecuit, 1998).

Η *L. monocytogenes* παράγει διάφορους μολυσματικούς παράγοντες ώστε να καταφέρει να προσκολληθεί επάνω σε φυσιολογικά, μη φαγοκυτταρικά κύτταρα και να πραγματοποιήσει την ενδοκύττωση (Seveau, 2014). Αρχικά ενεργοποιούνται οι επιφανειακές πρωτεΐνες ιντερναλίνες, *InlA* και *InlB*, χάρη στη δραστηριότητα των οποίων η *L. monocytogenes* επιτυγχάνει την είσοδό της στα κύτταρα στόχους. Η *InlA* αλληλεπιδρά με τη E-καντχερίνη (μόριο κυτταρικής προσκόλλησης) βοηθώντας το βακτήριο να εισχωρήσει στα επιθηλιακά κύτταρα (Pizzaro-Cerda & Cossart, 2006) ενώ η *InlB* διευκολύνει το βακτήριο να εισέλθει σε περισσότερα είδη κυττάρων του ξενιστή, όπως τα ηπατικά κύτταρα και τους ινοβλάστες (Vasquez-Boland et al., 2001). Μόλις η *L. monocytogenes* προσβάλλει το κύτταρο (φαγοκυτταρικό ή μη) εγκαθίσταται στο χυμοτόπιο-κενοτόπιο (vacuole) του κυττάρου (Seveau, 2014). Τότε λόγω της δράσης της λιστεριολυσίνης O (listeriolysin O, LLO) διαφεύγει στο κυτταρόπλασμα όπου αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται (Pizzaro & Cossart, 2006). Συνεργιστική δράση με τη LLO έχουν και οι PI-PLC και PC-PLC φωσφολιπάσες.

Οι φωσφολιπάσες αυτές βοηθούν την LLO στην λύση του κενοτοπίου και στην μετακίνηση του βακτηρίου από το κενοτόπιο του ενός κυττάρου στο κενοτόπιο του άλλου (Vasquez-Boland et al., 2001).

Ταυτόχρονα με τον πολλαπλασιασμό του στο κύτταρο, το βακτήριο ενεργοποιεί τον πολυμερισμό της επιφανειακής πρωτεΐνης ακτίνης ActA για την κινητικότητα της λιστέρινας στο κυτταρόπλασμα. Η ακτίνη είναι μια πολωμένη επιφανειακή πρωτεΐνη του κυττάρου, ο πολυμερισμός της οποίας οδηγεί στον σχηματισμό μια υδρόφοβης προωθητικής ουράς στον ένα πόλο του βακτηριακού κυττάρου, η οποία διασχίζει το κυτταρόπλασμα και βοηθά στην προσβολή γειτονικών υγιών κυττάρων του ξενιστή (Pizzaro-Cerda & Cossart, 2006). Η *L. monocytogenes* προωθείται από την ουρά στην επιφάνεια του κυττάρου του ξενιστή, έως ότου σχηματιστεί μια εξωκυτταρική προεξοχή (ψευδόποδας), η οποία εισβάλλει στα υγιή γειτονικά κύτταρα. Μόλις η προεξοχή αυτή εισβάλλει στα γειτονικά κύτταρα, η *L. monocytogenes* τοποθετείται σε ένα δεύτερο κενοτόπιο με διπλή μεμβράνη. Η LLO είναι απαραίτητη και αυτή τη φορά για τη διάσπαση και του δεύτερου κενοτοπίου (Seveau, 2014). Η ικανότητα του βακτηρίου να μεταδίδεται από κύτταρο σε κύτταρο καταστρατηγώντας την άμυνα του οργανισμού του ξενιστή, ίσως να υποδηλώνει πως τα αντισώματα δεν παρέχουν προστασία και πως η ανοσία στη λιστέρια σχετίζεται με τα T-λεμφοκύτταρα (Cossart & Lecuit, 1998).

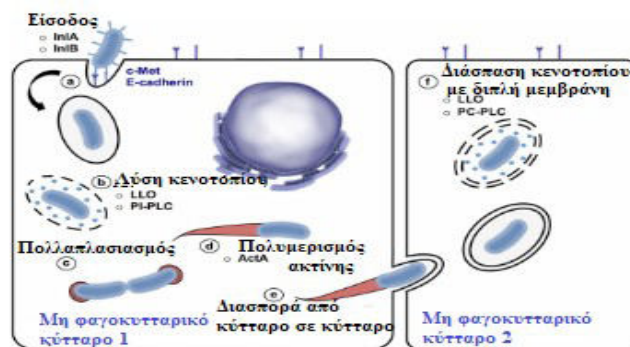


Η LLO είναι μία κυτολυσίνη εξαρτώμενη από τη χοληστερόλη (cholesterol-dependent cytolysin) η οποία παράγεται ενδοκυτταρικά από την *L. monocytogenes*. Είναι ένας πολύπλευρος μολυσματικός παράγοντας με διάφορους ρόλους στην αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου (Vasquez-Boland et al., 2006) και έχει καθοριστικό ρόλο στον ενδοκυτταρικό κύκλο ζωής του βακτηρίου.

Η LLO ενεργοποιείται από τη θειόλη όπως και η στρεπτολυσίνη O του *Streptococcus pyogenes* (SLO), η πνευμολυσίνη του *Streptococcus pneumoniae* και η τοξίνη περφρινγολυσίνη (PFO) του *Clostridium perfringens*. Τα μονομερή της LLO συνδέονται με τη χοληστερόλη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων και ολιγομερίζονται σχηματίζοντας μεγάλους πολύπλοκους πόρους 50-80 υπομονάδων (Gekara et al., 2005). Επίσης η LLO διασπά το κενοτόπιο όπου βρίσκεται το βακτήριο, με αποτέλεσμα την διαφυγή του στο κυτταρόπλασμα και τον πολλαπλασιασμό του. Μεταλλαγμένα βακτήρια με έλλειψη της LLO μπορούν να επιβιώσουν στο κύτταρο του ξενιστή αλλά όχι να αναπτυχθούν (Jarvis et al., 2006).

Βασικό χαρακτηριστικό της LLO το οποίο τη διαφοροποιεί από τις υπόλοιπες κυτολυσίνες που ενεργοποιούνται από τη θειόλη, είναι η ικανότητά της να εμφανίζει βέλτιστη δράση σε ιδιαίτερος όξινα περιβάλλοντα (Cabanès et al., 2002). Η δραστηριότητα της LLO είναι βέλτιστη σε pH 5,5. Το όξινο pH που συναντάται στο φαγόσωμα, ευνοεί την κυτταρολυτική δράση της λύοντας την φαγοσωματική μεμβράνη και επιτρέποντας την απελευθέρωση του βακτηρίου στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή.

Όταν το pH στο κυτταρόπλασμα είναι 7,0 τότε η LLO είναι λιγότερο δραστήρια (Fsihi et al., 2001). Το γεγονός αυτό μπορεί και να δικαιολογεί την ικανότητά της να επιβιώνει στο όξινο περιβάλλον ορισμένων τροφίμων και στο γαστρικό περιβάλλον του στομάχου (Cabanès et al., 2002).



**Εικόνα 5:** Σχηματική αναπαράσταση του ενδοκυτταρικού κύκλου ζωής της *L. monocytogenes* (Luque-Sastre et al., 2018)

## 2.2 Τοξικότητα

Η *L. monocytogenes* αποτελείται στην πραγματικότητα από ένα σύνολο στελεχών ή γενοτύπων με ποικίλη δυνητική παθογένεια. Ενώ αρκετά στελέχη της είναι εξαιρετικά παθογόνα έως και θανατηφόρα, κάποια άλλα είναι σχετικά μη μολυσματικά και προκαλούν μικρή βλάβη στον ξενιστή. Έτσι η διαθεσιμότητα εργαστηριακών μεθόδων για την εκτίμηση της παθογόνου δυναμικής των στελεχών της *L. monocytogenes* είναι εξαιρετικά σημαντική για τον αποτελεσματικό έλεγχο και την πρόληψη της λιστερίωσης (Liu, 2006).

Στελέχη που προέρχονται από τρόφιμα είναι ιδιαίτερα μολυσματικά και ευθύνονται για επιδημικά κρούσματα και θανάτους. Αντίθετα, στελέχη που προέρχονται από το χώρο επεξεργασίας των τροφίμων είναι λιγότερο μολυσματικά κυρίως λόγω της μετάλλαξης των βασικών γονιδίων λοιμογονικότητας του βακτηρίου. Η μολυσματικότητα του βακτηρίου δεν είναι σταθερό χαρακτηριστικό του, αλλά μπορεί να επηρεαστεί από τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, το pH και η οσμωτική καταπόνηση αλλά και από την σύσταση του τροφίμου που έχει μολύνει (EFSA BIOHAZ Panel, 2018).

## 2.3 Αντοχή στα αντιμικροβιακά φάρμακα

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων του ανθρώπου και των ζώων. Οι παράγοντες αυτοί στην πλειονότητά τους επιδρούν σε διάφορα χαρακτηριστικά του βακτηριακού κυττάρου, όπως είναι η βακτηριακή μεμβράνη, η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, συγκεκριμένα στάδια της πρωτεϊνικής σύνθεσης, η σύνθεση του DNA και του RNA και ο μεταβολισμός του φολικού οξέος. Ανάλογα με την φύση τους, οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο ή στην αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης (Luque-Sastre et al., 2018).

Τα είδη του γένους *Listeria* σπάνια εμφανίζουν επίκτητη αντοχή στα αντιμικροβιακά. Ωστόσο, λόγω της υπερβολικής χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων φαίνεται πως τα βακτήρια έχουν αναπτύξει αντοχή, λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια που κωδικοποιούν την ανθεκτικότητά τους (Luque-Sastre et al., 2018). Η μεταφορά γενετικών στοιχείων από τα γένη *Enterococcus* και *Streptococcus* στα είδη του γένους *Listeria* καθορίζει την αντοχή της στις μακρολίδες, στις λινκοσαμίνες, στην τετρακυλίνη και στη στρεπτογραμίνη B (Allerberger, 2007).

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες χρησιμοποιούνται ευρέως στις ζωοτροφές για τον έλεγχο και την θεραπεία των νόσων των ζώων. Η αυξανόμενη χορήγησή τους στα ζώα, θα μπορούσε να είναι η αιτία ανάπτυξης της αντιμικροβιακής αντοχής της *L.*

*monocytogenes*. Το παθογόνο συνήθως εμφανίζει ευαισθησία σε διάφορα αντιμικροβιακά όπως είναι η πενικιλίνη, η αμπικιλίνη, η γενταμυκίνη, η ερυθρομυκίνη, η τετρακυκλίνη, η ριφαμπικίνη, η χλωραμφενικόλη και μέτρια ευαισθησία στις κινολόνες (Allerberger, 2007; Jamali et al., 2013). Επιπλέον, έχουν απομονωθεί και κάποια στελέχη του από περιπτώσεις λιστερίωσης σε ανθρώπους τα οποία εμφανίζουν αντοχή σε πολλαπλά φάρμακα. Λόγω του υψηλού ποσοστού θνησιμότητας και της αυξημένης αντοχής σε πολλαπλά φάρμακα, γίνεται εξέταση της ευαισθησίας του παθογόνου για την κατανόηση των μοτίβων αντιμικροβιακής αντοχής του (Jamali et al., 2013).

## 2.4 Λιστερίωση

Ως παθογόνα είδη φαίνεται να χαρακτηρίζονται μέχρι σήμερα η *L. monocytogenes* και η *L. ivanovii*. Η λοιμώδης νόσος που οφείλεται στα παθογόνα αυτά, ονομάζεται Λιστερίωση (McLauchlin, 1996; Lorber, 1997) και αποτελεί σοβαρή νόσο για τα ζώα και τον άνθρωπό. Ενώ η *L. monocytogenes* προσβάλλει ένα μεγάλο εύρος ζωικών ειδών και φυσικά τον άνθρωπο, η *L. ivanovii*, η οποία παλαιότερα ήταν γνωστή ως *L. monocytogenes* ορότυπος 5, απομονώθηκε για πρώτη φορά στη Βουλγαρία από αμνούς με συγγενή λιστερίωση, σπανίως προσβάλλει τον άνθρωπο (Vasquez-Boland et al., 2001; Snapir et al., 2006).

Ο έλεγχος της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα αποτελεί σημαντικά μεγαλύτερη πρόκληση σε σχέση με τον έλεγχο των περισσότερων παθογόνων που μεταδίδονται από τα τρόφιμα καθώς η *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένη στο περιβάλλον και είναι ανθεκτική σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως το χαμηλό pH, οι υψηλές συγκεντρώσεις NaCl και κυρίως η χαμηλή θερμοκρασία (Ryser & Buchanan, 2013). Για το 2018 τα τρόφιμα που ευθύνονταν για τα ισχυρότερα κρούσματα λιστερίωσης ήταν οι χυμοί, τα λαχανικά και τα προϊόντα αυτών (EFSA & ECDC, 2018). Σύμφωνα με τον Οργανισμό Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ τα τρόφιμα που έχουν προκαλέσει επιδημικά κρούσματα λιστερίωσης συνήθως έχουν μολυνθεί με το παθογόνο κατά το στάδιο της επεξεργασίας τους. Για το λόγο αυτό, η λιστερίωση σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (ΕΚΤ). Παραδείγματα έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων, νωπών και επεξεργασμένων, στα οποία έχει εντοπιστεί το παθογόνο είναι το νωπό και παστεριωμένο γάλα, τα μαλακά τυριά, τα πλούσια σε λιπαρά τυριά, οι σαλάτες, τα φρεσκοκομμένα φρούτα και λαχανικά και τα νωπά και μαγειρεμένα οστρακοειδή και μαλάκια (FDA, 2017). Η λιστερίωση είναι μία τροφιμογενής ασθένεια η οποία εγείρει σοβαρές ανησυχίες για τη δημόσια υγεία λόγω της δριμύτητάς της (σηψαιμία, μηνιγγίτιδα, αποβολή), του υψηλού ποσοστού θνητότητας (περίπου 20-30%) και του μεγάλου χρόνου επώασης του παθογόνου (1 έως 67 ημέρες) (Goulet et al., 2013). Επιπλέον αποτελεί κίνδυνο για ομάδες του πληθυσμού

όπως ανοσοκατεσταλμένα άτομα και άτομα με υποκείμενο νόσημα καθώς η λιστερίωση οδηγεί στην εξασθένηση της ανοσίας που προκαλείται από τα T λεμφοκύτταρα (Ryser & Buchanan, 2013).

Η παρατεταμένη επιβίωση του παθογόνου στο περιβάλλον των τροφίμων (νερό, έδαφος,) έχει συμβάλλει στην είσοδό του στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων με διάφορους τρόπους (Adzitey & Huda, 2010). Η *L. monocytogenes* επιβιώνει στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων και αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (2 °C - 4 °C). Επίσης, παρατείνει την επιβίωσή της μέσω του σχηματισμού βιοϋμενίων στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων αλλά και στα ίδια τα τρόφιμα (Ryser & Buchanan, 2013). Η απομόνωση του παθογόνου από δείγματα κατεψυγμένων και παστεριωμένων τροφίμων, συντηρημένων υπό ψύξη, επιβεβαιώνει την ικανότητά του να επιβιώνει σε συνθήκες ψύξης. Το γεγονός αυτό, παράλληλα με την πιθανή επιμόλυνση των τροφίμων κατά την επεξεργασία τους, καθιστούν την επεξεργασία των τροφίμων εξαιρετικά κρίσιμη για την παραγωγή ασφαλών προϊόντων απαλλαγμένων από το παθογόνο (Adzitey & Huda, 2010; Ryser & Buchanan, 2013).

Η *L. ivanovii*, όπως και η *L. monocytogenes*, είναι τυπικά προαιρετικά ενδοκυτταρικά παράσιτα τα οποία χρησιμοποιούν χαρακτηριστικές στρατηγικές μόλυνσης των ζωικών κυττάρων και ιστών. Τα βακτήρια αυτά εισβάλλουν στον οργανισμό του ξενιστή από το στόμα, διαπερνούν εντερικό φραγμό και πολλαπλασιάζονται εντός μακροφάγων και μη μακροφάγων κυττάρων διαθέτοντας παρόμοιες ενδοκυτταρικές ιδιότητες (Vasquez-Boland et al., 2001). Ωστόσο, παρά τις ενδοκυτταρικές ομοιότητές τους, διαφέρουν στην παθογένεια. Η *L. ivanovii* προκαλεί σηπτική νόσο που εκδηλώνεται με εντερίτιδα, εμβρυϊκή σηψαιμία και αποβολή, αλλά όχι προσβολή του νευρικού συστήματος (Gill et al., 1997). Ωστόσο παρόλο που η *L. ivanovii* είναι ικανή να εισβάλλει και να αναπαρχθεί στα αμνιακά κύτταρα, η επιβίωσή της στο κυτταρόπλασμα είναι περιορισμένη σε σύγκριση με την *L. monocytogenes*.

Η *L. innocua*, αν και σχετίζεται γενετικά πολύ με τη *L. monocytogenes*, δεν θεωρείται παθογόνος. Μέχρι σήμερα, αυτό το είδος έχει συσχετιστεί μόνο με ελάχιστες ασθένειες στον άνθρωπο, όπως σε μοιραία περίπτωση βακτηριαμίας σε ηλικιωμένο ασθενή και μια περίπτωση οξείας λοίμωξης από μηνιγγίτιδα (Perinn et al., 2003; Favaro et al., 2014).

## 2.5 Η λιστερίωση στον άνθρωπο

Η λιστερίωση στον άνθρωπο αφορά συνήθως ομάδες υψηλού κινδύνου όπως είναι οι έγκυες γυναίκες, τα νεογνά και γενικώς οι ανοσοκατεσταλμένοι (Vasquez-Boland et al., 2001). Η ανοσοκαταστολή καθιστά τους ανθρώπους ιδιαίτερα ευαίσθητους στη λοίμωξη (Videau, 1987). Η μολυσματική δόση εκτιμάται σε 100-106 κύτταρα έπειτα από

κατανάλωση τροφίμου μολυσμένου με το παθογόνο (Adzitey & Huda, 2010). Ο χρόνος επώασης της *L. monocytogenes* εξαρτάται από ένα σύνολο παραγόντων. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων επηρεάζεται από την συγκέντρωση του παθογόνου που εισήλθε στον οργανισμό μέσω την κατανάλωσης μολυσμένου τροφίμου και από την ευπάθεια του οργανισμού του μολυσμένου ατόμου. Επομένως ο χρόνος επώασης του παθογόνου ποικίλει κατά περίπτωση και κυμαίνεται από 24 ώρες έως και 90 ημέρες, με μέσο χρόνο επώασης τις 30 ημέρες (Duffy et al., 2001).

Τα κλινικά συμπτώματα της λοίμωξης είναι παρόμοια σε όλους τους ευαίσθητους ξενιστές. Οι δύο κύριες μορφές της λοίμωξης είναι η διεισδυτική και μη διεισδυτική λιστερίωση. Σε ό,τι αφορά την διεισδυτική λιστερίωση, πρόκειται για μία οξεία μορφή της νόσου η οποία προσβάλλει τις ομάδες υψηλού κινδύνου του πληθυσμού όπως είναι οι έγκυες γυναίκες, τα έμβρυα, οι καρκινοπαθείς που υποβάλλονται σε θεραπεία, οι ηλικιωμένοι και οι ανοσοκατεσταλμένοι. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν βακτηριαιμία, πυρετό, σηψαιμία και μηνιγγίτιδα. Η εκδήλωση τους επηρεάζεται από την ευπάθεια του οργανισμού του μολυσμένου ατόμου (WHO, 2018).

Σε ό,τι αφορά τη μη διεισδυτική λιστερίωση, πρόκειται για μία ήπια μορφή της νόσου η οποία προσβάλλει τον υγιή πληθυσμό. Ο χρόνος επώασης είναι σύντομος και τα πιο συνήθη συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, πονοκέφαλο, μυαλγία και διάρροια. Η εκδήλωσή τους επηρεάζεται από την συγκέντρωση του παθογόνου που εισήλθε στον οργανισμό μέσω της κατανάλωσης μολυσμένου τροφίμου. Η συγκεκριμένη μορφή της νόσου μπορεί να προκαλέσει και εμπύρετη γαστρεντερίτιδα με χρόνο επώασης του βακτηρίου από 11 ώρες έως 1 εβδομάδα (Sim et al., 2002).

Αντίθετα με τη μόλυνση από άλλα γνωστά τροφιμογενή παθογόνα όπως η *Salmonella*, που σπανίως οδηγεί σε θάνατο, η λιστερίωση είναι μία σοβαρή νόσος. Το μέσο ποσοστό θνητότητας είναι 20-30% ή και υψηλότερο παρά την άμεση θεραπεία με αντιμικροβιακά φάρμακα (Slutsker & Schuchat, 1999; Vasquez-Boland et al., 2001).

### **2.5.1 Λιστερίωση κατά την εγκυμοσύνη**

Η λιστερίωση μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε στάδιο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, αλλά συνήθως παρατηρείται στο τελευταίο τρίμηνο. Τα συμπτώματα συνήθως μοιάζουν με εκείνα της ήπιας γρίπης και σχεδόν τα δύο τρίτα των εγκύων γυναικών εμφανίζουν αυτά τα συμπτώματα ως πρόδρομα. Τα συμπτώματα αυτά σχετίζονται με τη φάση της βακτηριαιμίας, κατά την οποία πραγματοποιείται ο ασφαλής διαγνωστικός έλεγχος της λιστερίωσης (Slutsker & Schuchat, 1999). Οι εγκυμονούσες γυναίκες σπάνια εκδηλώνουν οξεία μορφή της νόσου ωστόσο η μόλυνση κατά την εγκυμοσύνη μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή ή πρόωρο τοκετό (Devets & Bronze, 2008).

### 2.5.2 Νεογνική λιστερίωση

Λόγω της μητρικής βακτηριαμίας και της μετάδοσης μέσω του πλακούντα, πάνω από τα δύο τρίτα των νεογνών που επιζούν και γεννιούνται από μητέρες με λιστερίωση, εμφανίζουν σηψαιμία ή μινιγγίτιδα (Drevets & Bronze, 2008). Σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention) η νεογνική λιστερίωση διαχωρίζεται σε πρόωρη και όψιμη. Η πρόωμη μορφή της νόσου εμφανίζεται μέσα στις πρώτες έξι μέρες ζωής ως σηψαιμία και είναι αποτέλεσμα της μετάδοσης του παθογόνου στο νεογνό μέσω του πλακούντα (CDC, 2019). Λιγότερο συχνά παρατηρείται η όψιμη νεογνική λιστερίωση 1-8 εβδομάδες μετά τον τοκετό. Προκαλεί πυρετό, μινιγγίτιδα και σε κάποιες περιπτώσεις γαστρεντερίτιδα και πνευμονία (Vasquez-Boland et al., 2001).

### 2.5.3 Λιστερίωση και Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS)

Η λοίμωξη επηρεάζει τους ενήλικες προσβάλλοντας συχνότερα το κεντρικό νευρικό σύστημα. Η λοίμωξη προκαλεί μινιγγοεγκεφαλίτιδα με μεταβολές στην συνείδηση, κινητικά προβλήματα και παράλυση των κρανιακών νεύρων. Συχνή μορφή της λιστερίωσης είναι η βακτηριαμία η οποία σε ανοσοκατασταλμένους έχει υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (Vasquez-Boland et al., 2001). Άτομα που πάσχουν από το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS) έχει αναφερθεί ότι εμφάνισαν βακτηριαμία ή μινιγγίτιδα ως αποτέλεσμα της μόλυνσης με το παθογόνο. Η λιστερίωση δεν είναι ένα σύνηθες νόσημα μεταξύ των ασθενών με λοίμωξη HIV (σύνδρομο AIDS), ωστόσο, εμφανίζεται συχνότερα σε αυτούς τους ασθενείς παρά στο γενικό πληθυσμό (Slutsker & Schuchat, 1999).

### 2.5.4 Τρόποι μετάδοσης της *L. monocytogenes* στον άνθρωπο

Η μετάδοση της *L. monocytogenes* στον άνθρωπο, πραγματοποιείται:

- Τροφιμοφενώς μέσω κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων. Αν και τα υγιή άτομα μπορεί να καταναλώσουν μολυσμένα τρόφιμα χωρίς να νοσήσουν, τα ευπαθή άτομα (ηλικιωμένοι, ανοσοκατεσταλμένοι, κ.α) είναι πιθανό να νοσήσουν ακόμα και μετά την κατανάλωση τροφίμων μολυσμένων με μικρό μικροβιακό φορτίο. Τα λαχανικά μπορεί να μολυνθούν από το χώμα ή από την

κοπριά, όταν αυτή χρησιμοποιείται ως λίπασμα. Τα μολυσμένα άτομα μπορούν να διασπείρουν το παθογόνο για αρκετούς μήνες (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ, 2011). Έχει βρεθεί πως το 0,6-3,4% των ασυμπτωματικών φορέων με απροσδιόριστη πηγή έκθεσης στο βακτήριο, αποβάλλουν τη *L. monocytogenes* στα κόπρανά τους. Ωστόσο, έρευνες σε επιδημικά κρούσματα λιστερίωσης έχουν δείξει πως οι ασθενείς δεν αποβάλλουν πάντα το παθογόνο μέσω των κοπράνων καθιστώντας έτσι τον ρόλο των ασυμπτωματικών φορέων στη μετάδοση του παθογόνου ασαφή (Saha et al., 2015).

- Από την έγκυο γυναίκα στο έμβρυο με κάθετη μετάδοση είτε μέσω του πλακούντα, κατά τη διάρκεια της κύησης, είτε κατά τον τοκετό. Οι μητέρες μολυσμένων νεογνών μπορούν να διασπείρουν το βακτήριο μέσω των κολλικών εκκρίσεων και των ούρων από 7 έως και 10 μέρες μετά την γέννηση και σπανιότερα για μεγαλύτερο διάστημα (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ, 2011).
- Μέσω της επαφής με πάσχοντα ζώα ή με τις εκκρίσεις τους (κυρίως σάλιο) καθώς και μέσω νοσοκομειακών λοιμώξεων (Saha et al., 2015).

## 2.6 Η λιστερίωση στα ζώα

Μια μεγάλη ποικιλία ζωικών ειδών μπορεί να προσβληθεί από την *L. monocytogenes*, συμπεριλαμβανομένων θηλαστικών, πτηνών, ψαριών και των καρκινοειδών. Τα περισσότερα όμως κλινικά περιστατικά λιστερίωσης εμφανίζονται στα μηρυκαστικά. Τα πτηνά είναι γενικά υποκλινικοί φορείς του παθογόνου. Οι περισσότερες λοιμώξεις στα ζώα είναι υποκλινικές, αλλά δριμεία μορφή της νόσου μπορεί να εμφανιστεί είτε σε σποραδικά περιστατικά είτε ως επιδημικό ξέσπασμα.

Η κύρια μορφή της νόσου στα ζώα πλην των μηρυκαστικών είναι η σηψαιμία. Οι χοίροι, ιδιαίτερα τα νεογνά, εμφανίζουν σηψαιμία ενώ στους ίππους, εμφανίζεται σηψαιμία και γαστρεντερίτιδα (CFSPH, 2019).

Η *Listeria* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1926 από τους Murray, Webb και Swann, οι οποίοι εντόπισαν το παθογόνο κατά τη διερεύνηση μίας εργαστηριακής επιδημικής λοίμωξης σε κουνέλια και ινδικά χοιρίδια (Mateus, 2013). Το παθογόνο έχει απομονωθεί από το κρέας ή και το γάλα βοοειδών, αιγοπροβάτων και βουβαλιών καθώς και από αλιεύματα και πουλερικά. Πλούσιες πηγές του παθογόνου θεωρούνται το έδαφος, το νερό, το κακής ποιότητας χορτάρι και τα περιττώματα των θηλαστικών και των πτηνών (Dhama et al., 2015). Επιπλέον τα είδη του γένους *Listeria* απομονώνονται ευρέως μεταξύ των πτηνών. Τα είδη που επηρεάζονται περισσότερο είναι τα πουλερικά και το πιο κοινό σύμπτωμα είναι η σηψαιμία. Οι όρνιθες λειτουργούν ως φορείς του παθογόνου και συμβάλλουν στην διάδοσή του, μολύνοντας τα απορρίμματα και τις εγκαταστάσεις εκτροφής και επεξεργασίας πουλερικών (Njagi et al., 2004). Ο εντερικός αποικισμός και

η παρουσία της *L. monocytogenes* στα κόπρανα των πουλερικών παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση της λιστερίωσης σε οικόσιτα ζώα και μηρυκαστικά (Dhama et al., 2015).

Η *L. monocytogenes* εισέρχεται στον οργανισμό των ζώων κυρίως μέσω του πεπτικού συστήματος. Έπειτα από κατανάλωση μολυσμένης τροφής, ο μικροοργανισμός εισέρχεται στο εντερικό επιθήλιο και ακολούθως στην κυκλοφορία του αίματος. Η ασυμπτωματική φάση της νόσου είναι πιο συχνή απ' ό,τι η κλινική εκδήλωσή της. Η κλινική εικόνα της νόσου εμφανίζεται συχνότερα στα βοοειδή και στα αιγοπρόβατα ωστόσο, το παθογόνο προσβάλλει και άλλα είδη θηλαστικών (CFSPH, 2019). Η *L. monocytogenes* μπορεί να προκαλέσει γαστρεντερίτιδα και υποκλινική μαστίτιδα σε βοοειδή και πρόβατα. Στην περίπτωση των βοοειδών η εκδήλωση της λιστερίωσης συνοδεύεται κυρίως από συμπτώματα όπως είναι η μαστίτιδα, η σηψαιμία, η εγκεφαλοπάθεια (Saha et al., 2015) και οι αποβολές, καθώς πολλά στελέχη του παθογόνου έχουν απομονωθεί από το στομαχικό περιεχόμενο από των εμβρύων. Σε ό,τι αφορά τα αιγοπρόβατα, η νόσος εκδηλώνεται με τη μορφή εγκεφαλίτιδας, σηψαιμίας, γαστρεντερίτιδας και μαστίτιδας ενώ στα νοσούντα πρόβατα διακόπτεται η κυοφορία κατά τη δωδέκατη εβδομάδα κύησης (Dhama et al., 2015).

Η πρόκληση μαστίτιδας στα βοοειδή από τη *L. monocytogenes* έχει ελάχιστες φορές αναφερθεί, είναι όμως ιδιαίτερα επίμονη και δύσκολη στην θεραπευτική αντιμετώπιση, ενώ παράλληλα μπορεί να αποτελέσει αιτία για τη θανάτωση των μολυσμένων ζώων της εκτροφής (Bourry & Routrel, 1996; Jensen et al., 1996; Fthenakis et al., 1998; Stewart, 1998; Shome et al., 2003; Rawool et al., 2007). Μπορεί να προσβάλλει ένα ή όλα τα τεταρτημόρια του μαστού και να προκαλέσει οξεία ή υποκλινική μαστίτιδα. Η υποκλινική μαστίτιδα μπορεί να περάσει απαρατήρητη με κίνδυνο το βακτήριο να εκκρίνεται με το γάλα επί μήνες αποτελώντας σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (Hird & Genigeorgis, 1990).

Τα προσβεβλημένα ζώα αποβάλλουν το παθογόνο με τα κόπρανά τους και έτσι είναι δυνατόν να επιμολύνουν τα προϊόντα τους (γάλα, κρέας) και το περιβάλλον. Τα μηρυκαστικά μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο ως πηγή μόλυνσης για τον άνθρωπο, κυρίως από κατανάλωση μολυσμένων ζωικών προϊόντων (OIE, 2018).

Στα αιγοπρόβατα, το ποσοστό καταγεγραμμένων περιστατικών προσβολής τους αγγίζει το 30% σε αντίθεση με τα βοοειδή που το ποσοστό προσβολής τους δεν υπερβαίνει το 15%. Οι περισσότερες περιπτώσεις λιστερίωσης στα μηρυκαστικά εμφανίζονται κυρίως τους χειμερινούς μήνες, πιθανόν λόγω της ικανότητας της λιστέριας να αναπτύσσεται και σε χαμηλές θερμοκρασίες (Low & Donachie, 2007).



## 2.7 Επιδημιολογικά δεδομένα της λιστερίωσης

Η λιστερίωση αποτελεί μία από τις πιο θανατηφόρες τροφιμογενείς ασθένειες καθώς εμφανίζει υψηλά ποσοστά θνητότητας (περίπου 20%) και νοσηλείας σε νοσοκομείο (>95%) (EFSA & ECDC, 2018). Η νόσος προκαλείται και από τους 13 ορότυπους του παθογόνου, ιδίως όμως από τους 1/2a, 1/2b και 4b. Η επίπτωση της νόσου ποικίλει από 2 έως 15 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού (Dhama et al., 2015).

Η πρώτη καταγεγραμμένη έξαρση της νόσου ήταν το 1979 σε 23 ασθενείς νοσοκομείου της Βοστώνης έπειτα από κατανάλωση μολυσμένων λαχανικών (Lorber, 1997). Η επόμενη επιδημική έξαρση ήταν το 1981 λόγω κατανάλωσης λαχανοσαλάτας. Η επιδημιολογική έρευνα έδειξε πως η *L. monocytogenes* που απομονώθηκε από τη λαχανοσαλάτα ήταν πανομοιότυπη με εκείνη του πρώτου κρούσματος του 1979, δίνοντας έτσι για πρώτη φορά την οριστική απόδειξη ότι η λιστερίωση είναι μία τροφιμογενής νόσος (Ramaswamy et al., 2007).

Η μεγαλύτερη έξαρση της νόσου παγκοσμίως, εμφανίστηκε στη Νότιο Αφρική από τον Ιανουάριο του 2017 έως τον Ιούλιο του 2018. Καταγράφηκαν 1060 κρούσματα με ποσοστό θνητότητας 30%. Πηγή της επιδημίας ήταν έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα κρέατος (ECDC, 2017).

Το πρώτο καταγεγραμμένο κρούσμα σχετικό με την κατανάλωση μολυσμένου προϊόντος νωπού γάλακτος ήταν το 1985 στην Καλιφόρνια, έπειτα από την κατανάλωση μαλακού ανώριμου τυριού μεξικάνικου τύπου κατά την παρασκευή του οποίου υπήρξε ανάμειξη απαστερίωτου γάλακτος με παστεριωμένο. Η συχνότητα παρουσίας του παθογόνου σε δεξαμενές αποθήκευσης νωπού γάλακτος ποικίλει από 1 έως 13%. Στις μονάδες επεξεργασίας γάλακτος το ποσοστό κυμαίνεται από 7 έως 28%. Βάσει ερευνών περίπου το 2,5, 3,6 και 5,2 % των δειγμάτων νωπού γάλακτος που εξετάστηκαν σε Βόρεια Αμερική, Ευρώπη και αλλού αντίστοιχα ήταν θετικά (Ryser & Buchanan, 2013).

### 2.7.1 Κατανάλωση νωπού γάλακτος

Το νωπό γάλα και τα προϊόντα του αποτελούν κύρια πηγή της *L. monocytogenes* (Ryser & Buchanan, 2013). Πολλές οικογένειες που διαθέτουν φάρμες, καταναλώνουν νωπό γάλα επειδή αποτελεί παραδοσιακή συνήθεια και φθηνότερη επιλογή σε σχέση με το συσκευασμένο παστεριωμένο γάλα που διατίθεται στην αγορά. Αρκετοί θεωρούν ότι το νωπό γάλα έχει υψηλότερη θρεπτική αξία σε σχέση με το παστεριωμένο. Επίσης, έρευνες έχουν δείξει πως η κατανάλωση του νωπού γάλακτος συνδέεται με το μορφωτικό επίπεδο των καταναλωτών. Πιο συγκεκριμένα, άνθρωποι χαμηλού

μορφωτικού επιπέδου είναι πιθανότερο να καταναλώσουν νωπό γάλα απ'ότι οι καταναλωτές με υψηλότερο μορφωτικό επίπεδο (Oliver et al., 2005).

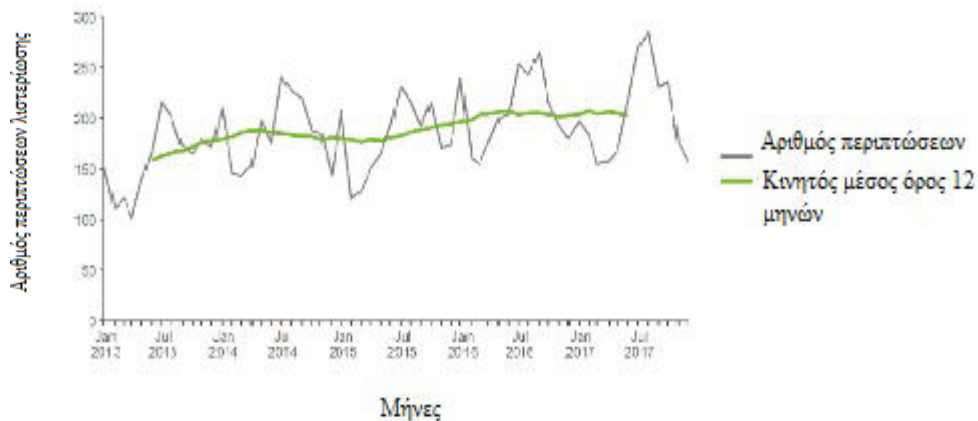
Η *L. monocytogenes* έχει εντοπιστεί σε νωπό γάλα το οποίο διατίθεται στην αγορά μέσω μηχανημάτων αυτόματης πώλησης. Στην Γερμανία και στην Ιταλία, η πώληση του νωπού γάλακτος πραγματοποιείται μέσω αυτόματων πωλητών, οι οποίοι βρίσκονται στις φάρμες και συνοδεύεται από τη νομική υποχρέωση οι καταναλωτές να βράζουν το γάλα πριν το καταναλώσουν. Ωστόσο σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία μόνο 63 από τους 100 συμμετέχοντες απάντησαν ότι επεξεργάζονται θερμικά το γάλα πριν το καταναλώσουν. Οι υπόλοιποι, δήλωσαν ότι δεν προβαίνουν σε καμία θερμική επεξεργασία (Fusko et al., 2020). Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής το νωπό γάλα διατίθεται στην αγορά μέσω καταστημάτων λιανικής πώλησης σε 13 πολιτείες. Σε δύο πολιτείες υπάρχει νομικός περιορισμός, σε 13 πολιτείες η πώληση περιορίζεται στις φάρμες και σε 22 πολιτείες υπάρχει νομική απαγόρευση πώλησής του (CDC, 2017)

### 2.7.2 Επιδημιολογία της Λιστερίωσης στην Ευρώπη

Η επιτήρηση της λιστερίωσης στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης/Ευρωπαϊκού Οικονομικού Χώρου (ΕΕ/ΕΟΧ) επικεντρώνεται στις οξείες μορφές της νόσου από τις οποίες κινδυνεύουν περισσότερο οι έγκυες γυναίκες, οι ηλικιωμένοι, οι ανοσοκατεσταλμένοι ενήλικες και τα νεογνά (EFSA & ECDC, 2018). Το ποσοστό των καταγεγραμμένων κρουσμάτων το διάστημα 2005-2018 αυξήθηκε κατά 60% με τον αριθμό των κρουσμάτων να αυξάνεται από 1381 σε 2206. Το 2015 σημειώθηκαν 270 θάνατοι, αριθμός ο οποίος ήταν ο μεγαλύτερος που είχε καταγραφεί από το 2008 (EFSA BIOHAZ Panel, 2018). Το 2017 καταγράφηκαν 2480 επιβεβαιωμένα κρούσματα σε 28 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης/Ευρωπαϊκού Οικονομικού Χώρου (ΕΕ/ΕΟΧ). Τα δεδομένα αυτά αντιστοιχούν σε ποσοστό 0,48 ανά 100.000 πληθυσμού.

Εμπλεκόμενα τρόφιμα ήταν τα τυριά, τα ψάρια και τα αλιευτικά προϊόντα, τα κρέατα και τα κρεατοσκευάσματα, λαχανικά και φρούτα. Το υψηλότερο ποσοστό της νόσου παρατηρήθηκε σε άτομα άνω των 64 ετών.

Ο ετήσιος αριθμός των περιπτώσεων λιστερίωσης δείχνει αυξητική τάση, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στον αυξημένο πληθυσμό των ηλικιωμένων στην Ευρώπη. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η πρόληψη και ο έλεγχος της νόσου (EFSA & ECDC, 2018). Το 2019 καταγράφηκαν 2621 επιβεβαιωμένα κρούσματα λιστερίωσης, σε αντίθεση με το 2018, που είχαν καταγραφεί 2545 κρούσματα. Το ποσοστό θνησιμότητας στην Ε.Ε παρουσίασε αύξηση σε σύγκριση με το 2017 και το 2018. Η λιστερίωση ήταν η ζωνόσος με τα υψηλότερα ποσοστά νοσηλείας των ασθενών σε όλη την Ε.Ε, ενώ σημειώθηκαν 300 θάνατοι (EFSA & ECDC, 2021).



**Γράφημα 1:** Μηνιαία κατανομή επιβεβαιωμένων περιπτώσεων λιστερίωσης κατά το διάστημα 2013-2017 σε χώρες της ΕΕ / ΕΟΧ (EFSA & ECDC, 2018)

### 2.7.3 Επιδημιολογία της Λιστερίωσης στην Ελλάδα

Σύμφωνα με τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ), η λιστερίωση παρουσιάζει χαμηλή δηλούμενη επίπτωση στην Ελλάδα (1 κρούσμα/1.000.000 πληθυσμού για το 2019). Η επιτήρηση της λιστερίωσης στην Ελλάδα ξεκίνησε μέσω του συστήματος υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων το 2004 (ΕΟΔΥ, 2019).

Το διάστημα 2004-2019 δηλώθηκαν συνολικά στη χώρα μας 188 κρούσματα λιστερίωσης. Το υψηλότερο ποσοστό της νόσου παρατηρήθηκε σε άτομα άνω των 65 ετών. Το 52,4% των δηλωθέντων κρουσμάτων αφορούσε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, το 3,7% εγκυμονούσες και το 2,1% νεογνά.

Το 2015 παρουσιάστηκε αύξηση των δηλωθέντων κρουσμάτων στο σύνολο της επικράτειας (3,04 κρούσματα/1.000.000 πληθυσμού) ενισχύοντας την ανάγκη συνεργασίας των αρμόδιων φορέων για την λήψη μέτρων πρόληψης και προστασίας του πληθυσμού (ΕΟΔΥ, 2019).

**Πίνακας 2:** Ετήσιος αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων και επίπτωσης της λιστερίωσης στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, 2004-2019 (ΕΟΔΥ, 2019)

Έτος	Αριθμός κρουσμάτων	Ετήσια επίπτωση (ανά 1.000.000 πληθυσμού)
2004	3	0,3
2005	8	0,7
2006	7	0,6
2007	10	0,9
2008	1	0,1
2009	4	0,4
2010	10	0,9
2011	10	0,9
2012	11	1,0
2013	10	0,9
2014	10	0,9
2015	35	3,2
2016	20	1,8
2017	21	1,9
2018	20	1,8
2019	10	0,9
<b>Σύνολο</b>	<b>188</b>	<b>1,1</b>

### 3. Μικροβιολογία νωπού γάλακτος

#### 3.1 Προέλευση των μικροοργανισμών του νωπού γάλακτος

Το γάλα στο εσωτερικό ενός υγιούς μαστού θεωρείται στείρο. Εφόσον πραγματοποιηθεί η άμελξη, το νωπό γάλα μπορεί να επιμολυνθεί με μικροοργανισμούς που προέρχονται από της θηλής του ζώου, τον αέρα, το έδαφος, το χορτάρι, το νερό και τον εξοπλισμό συλλογής και επεξεργασίας του γάλακτος (Quigley et al., 2013). Η παρουσία της *L. monocytogenes* στο νωπό αγελαδινό γάλα συνδέεται με τη συχνή παρουσία του παθογόνου στο φρέσκο χορτάρι. Σημαντική πηγή μόλυνσης των ζώων αποτελούν οι ζωοτροφές. Η *L. monocytogenes* μεταδίδεται στα ζώα γαλακτοπαραγωγής και κρεατοπαραγωγής με τις ενσιρωμένες ζωοτροφές. Η μικροχλωρίδα του μαστού, του δέρματος και του περιβάλλοντος της μονάδας παραγωγής αντικατοπτρίζεται στα βακτήρια του νωπού γάλακτος. Τα βακτήρια του νωπού γάλακτος μπορεί να μολύνουν και τον εξοπλισμό συλλογής και επεξεργασίας του γάλακτος (Driehuis et al., 2018).

Το γάλα, επιτρέπει την ανάπτυξη πολλών και ετερογενών μικροοργανισμών, κυρίως λόγω της πλούσιας σύστασής του σε θρεπτικά συστατικά. Βάσει διαφόρων μελετών, η παρουσία των μικροοργανισμών στο νωπό γάλα μπορεί να μην οφείλεται μόνο σε

εξωγενή επιμόλυνση, αλλά να είναι αποτέλεσμα και ενδογενούς επιμόλυνσης. Μικροοργανισμοί από διαφορετικές ανατομικές περιοχές του ζώου, είναι ικανοί να εισέλθουν στον μαστικό αδένα. Μικροοργανισμοί από τον πεπτικό σωλήνα, συνήθως μέσω των ανοσοκυττάρων, διέρχονται από τους μεσεντέριους λεμφαδένες και καταλήγουν στο μαστό του ζώου. Έτσι, βακτήρια εξωγενούς και ενδογενούς προέλευσης αναπτύσσονται στο νωπό γάλα που έχει αμελχθεί (Fusco et al., 2020).

### 3.2 Μικροοργανισμοί του νωπού γάλακτος

Το γάλα είναι μία τροφή με υψηλή θρεπτική αξία και προέρχεται από ζώα όπως αγελάδες, αιγοπρόβατα και βουβάλια αλλά και από τον άνθρωπο για ανθρώπινη κατανάλωση. Η ποικιλία θρεπτικών συστατικών που διαθέτει όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, βιταμίνες και απαραίτητα αμινοξέα σε συνδυασμό με την υψηλή ενεργότητα νερού και το ουδέτερο pH, αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών (Quigley et al., 2013).

Οι μικροοργανισμοί που απαντώνται στο γάλα χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τους παθογόνους και τους αλλοιογόνους (σαπροφυτικοί μικροοργανισμοί). Οι παθογόνοι αποτελούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία καθώς ευθύνονται για τις τροφικές λοιμώξεις και δηλητηριάσεις. Οι αλλοιογόνοι, λόγω των δραστικών ενζύμων που διαθέτουν, υδρολύουν τα συστατικά του γάλακτος έτσι ώστε να παραχθούν συστατικά κατάλληλα για την ανάπτυξή τους. Αυτή η ενζυμική δράση έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση τους γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων (Touch & Deeth, 2009).

#### 3.2.1 Παθογόνα βακτήρια

Ως παθογόνο ορίζεται ένα βακτήριο, το οποίο μπορεί να προκαλέσει ασθένεια, λοίμωξη ή δηλητηρίαση σε έναν ξενιστή (Vasavada, 1987). Τα τροφιμογενή νοσήματα προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων μολυσμένων με παθογόνα βακτήρια ή τοξίνες. Τα παθογόνα που απαντώνται συχνότερα στο νωπό γάλα είναι τα εξής: ορότυποι της *Escherichia coli* και βακτήρια των γενών *Salmonella* και *Shigella* (Kim et al., 2017), *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Brucella abortus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* και *Aeromonas hydrophila* (Konosonoka et al., 2012).

### 3.2.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB)

Ένα από τα φυσικά ενδιαιτήματα των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB, Lactic Acid Bacteria) είναι το γάλα. Εκτός από το γάλα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια απαντώνται σε περιβάλλοντα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα λαχανικά, το έδαφος και ο πεπτικός σωλήνας ανθρώπων και ζώων. Πρόκειται για θετικά κατά Gram (Gram+), μη σπορογόνα βακτήρια. Είναι αναερόβια ή προαιρετικά αερόβια και έχουν σχήμα κόκκων ή ραβδίων. Τα βακτήρια αυτά, ζυμώνουν τους υδατάνθρακες του γάλακτος, με κύριο προϊόν της ζύμωσης το γαλακτικό οξύ (Wassie & Wassie, 2016). Εκτός όμως από οργανικά οξέα παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου και διακετύλιο. Τα συστατικά αυτά μπορούν να περιορίσουν την ανάπτυξη πολλών παθογόνων (Quigley et al., 2013). Ωστόσο, τα οξυγαλακτικά βακτήρια προκαλούν και σημαντική ανεπιθύμητη αλλοίωση σε ορισμένα προϊόντα (Lu et al., 2013). Τα γένη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώνονται συχνότερα από το νοπό γάλα είναι τα εξής: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* και *Streptococcus* (Karakas-Sen & Karakas, 2017).

### 3.2.3 Μυκοτοξίνες

Οι μυκοτοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από νηματώδεις μύκητες. Οι μυκοτοξίνες με την μεγαλύτερη σημασία για τη δημόσια υγεία είναι οι αφλατοξίνες, οι τριχοθεσίνες, οι ζεαραλενόνες, οι φουμοσινίνες και οι ωχρατοξίνες. Τα πιο σημαντικά είδη μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες είναι τα είδη: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* και *Penicillium*. Οι μυκοτοξίνες, μόλις καταναλωθούν από τα μηρυκαστικά περνούν από το στομάχι στην κυκλοφορία του αίματος, κατανέμονται στο εσωτερικό του οργανισμού και μεταβολίζονται έως ότου εκκριθούν στο γάλα. Η αφλατοξίνη Β1 παράγεται από τον *Aspergillus flavus* και τον *Aspergillus parasiticus* και είναι η μόνη αφλατοξίνη με σημαντική μεταφορά στο γάλα. Μεταβολίζεται σε αφλατοξίνη Μ1 στο σκώτι των μηρυκαστικών και περίπου το 1-6% εκκρίνεται στο γάλα. Τα συμπτώματα που προκαλούνται στον άνθρωπο έπειτα από την κατανάλωση τροφίμων μολυσμένων με μυκοτοξίνες είναι διάρροια και πονοκέφαλος ενώ κάποιες μυκοτοξίνες έχουν πιθανόν καρκινογόνο δράση (Quigley et al., 2013).

### 3.2.4 Ψυχρότροφα βακτήρια

Τα ψυχρότροφα βακτήρια αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες με βέλτιστη

θερμοκρασία ανάπτυξης τους 15 °C (de Oliveira et al., 2015). Τα αρνητικά κατά Gram (Gram-) βακτήρια αποτελούν την πλειονότητα των ψυχρότροφων βακτηρίων που βρίσκονται στο νωπό γάλα. Δεν επιβιώνουν της παστερίωσης, μπορεί όμως να εμφανιστούν στο παστεριωμένο γάλα έπειτα από επιμόλυνση (de Oliveira et al., 2015). Η σταδιακή βελτίωση των πρακτικών αποθήκευσης και επεξεργασίας του γάλακτος, όπως για παράδειγμα οι αλλαγές στα συστήματα ψύξης, έχουν επηρεάσει την μικροχλωρίδα του, οδηγώντας στην επικράτηση των Gram- ψυχρότροφων βακτηρίων έναντι των Gram + (Giffel & Wells-Bennik, 2010).

Τα Gram- ψυχρότροφα βακτήρια ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* και *Flavobacterium* (de Oliveira et al., 2015). Η μεταβολική δραστηριότητα των ειδών του γένους *Pseudomonas* θεωρείται η πιο σημαντική, λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν θερμοάντοχα ένζυμα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους σε θερμοκρασίες ψύξης. Τα ένζυμα αυτά δεν αδρανοποιούνται με την παστερίωση ακόμα και αν το βακτήριο έχει θανατωθεί και προκαλούν την ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος (Touch & Deeth, 2009).

Τα κολοβακτηριοειδή είναι αρνητικά κατά Gram (Gram-) βακτήρια, ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και αποτελούν το 5-35% της ψυχρότροφης μικροχλωρίδας (Touch & Deeth, 2009). Τα κολοβακτηριοειδή αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 3 °C έως 50 °C και επιφέρουν ταχεία αλλοίωση στο γάλα καθώς ζυμώνουν τη λακτόζη παράγοντας οξύ ή αέριο. Εντοπίζονται σχεδόν πάντα στο νωπό γάλα, ωστόσο με την εφαρμογή των κατάλληλων μέτρων ελέγχου κατά την παραγωγή τα επίπεδά τους διατηρούνται χαμηλά. Τα βακτήρια του γένους *Enterobacter* και *Klebsiella* προκαλούν αλλοιώσεις στο γάλα, δεν επιβιώνουν της παστερίωσης και η παρουσία τους σε επεξεργασμένο γάλα υποδηλώνει δευτερογενή επιμόλυνση (Touch & Deeth, 2009).

### 3.2.5 Παθογόνα ψυχρότροφα βακτήρια

Τα βακτήρια *L.monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* και *Bacillus cereus* είναι τα παθογόνα με την μεγαλύτερη σημασία στην βιομηχανία γάλακτος (Champagne et al., 1994). Η *L. monocytogenes* έχει μέση ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τον 1,1°C και μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες περίπου 0,6 °C χαμηλότερες από την ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των μη αιμολυτικών στελεχών του γένους *Listeria*. Η *Y. enterocolitica* είναι Gram- βακτήριο και έχει απομονωθεί από νωπό και παστεριωμένο γάλα παγκοσμίως. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψύξης και προκαλεί γαστρεντερίτιδα. Η *A. hydrophila* είναι ένα ακόμα ψυχρότροφο παθογόνο που έχει απομονωθεί από το γάλα και προκαλεί γαστρεντερίτιδα (Champagne et al., 1994).

Ο *B. cereus* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 4 °C. Κατά την συντήρηση

του γάλακτος υπό ψύξη στους 4 °C το παθογόνο πολλαπλασιάζεται όταν η θερμοκρασία αποθήκευσης αυξηθεί κατά μόλις 2 °C. Λόγω των τοξινών που παράγει, είναι αιτία πρόκλησης δύο διαφορετικών ειδών τροφικής δηλητηρίασης. Η εμετική τοξίνη προκαλεί εμετό ενώ οι τουλάχιστον τρεις διαφορετικές εντεροτοξίνες που παράγει το βακτήριο προκαλούν διάρροια (Necidona et al., 2014). Άλλα είδη του γένους αυτού που μεταδίδονται τροφιμογενώς είναι τα *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus* (Champagne et al., 1994).

### 3.2.6 Θερμοάντοχα Βακτήρια

Τα θερμοάντοχα βακτήρια που απαντώνται στο γάλα, επιζούν της παστερίωσης και διακρίνονται σε σπορογόνα και μη σπορογόνα. Γενικότερα όλα τα θερμοάντοχα βακτήρια είναι Gram+, με τα σπορογόνα βακτήρια να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντοχή στη θερμότητα. Η εκβλάστιση των σπόρων που έχουν επιζήσει της θερμικής επεξεργασίας αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την ασφάλεια και την ποιότητα του γάλακτος (Schmidt, 2008). Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Bacillus* είναι τα πιο σημαντικά, καθώς οι σπόροι τους επιβιώνουν της παστερίωσης και μειώνουν τον χρόνο διατηρησιμότητας του γάλακτος (Champagne et al., 1994). Τα σπορογόνα βακτήρια του γένους *Clostridium* απαντώνται σπανιότερα στο γάλα επειδή είναι αναερόβια (Schmidt, 2008).

Τα μη σπορογόνα θερμοάντοχα βακτήρια που μπορούν να βρεθούν στο νωπό γάλα ανήκουν στα γένη *Alcaligenes*, *Microbacterium* και *Micrococcus* και επιζούν της θέρμανσης στους 63 °C για 30 λεπτά (Schmidt, 2008).

### 3.3 Θερμοανθεκτικότητα της *L. monocytogenes*

Η *L. monocytogenes* δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι είναι περισσότερο θερμοανθεκτική σε σχέση με άλλα μη σπορογόνα παθογόνα όπως η *Salmonella* και η *Escherichia coli* (Bucur et al., 2018). Η θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η έκθεσή του σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις, τα συστατικά του τροφίμου και η παραλλακτικότητα των στελεχών του (Doyle et al., 2001).

Ορισμένα στελέχη της *L. monocytogenes* είναι 2,5 έως 3 φορές πιο θερμοανθεκτικά από άλλα (Doyle et al., 2001). Στελέχη του ορότυπου 1/2a έχουν σχετικά χαμηλή αντοχή στην θερμότητα συγκριτικά με στελέχη των ορότυπων 1/2b και 4b η θερμοαντοχή των οποίων παρουσιάζει μεταβλητότητα (Bucur et al., 2018). Επειδή δεν έχουν εξεταστεί



όλα τα στελέχη υπό τις ίδιες συνθήκες δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τον χαρακτηρισμό ενός συγκεκριμένου στελέχους ως το θερμοανθεκτικότερο όλων. Ωστόσο, το στέλεχος Scott A λόγω της σταθερής θερμοανθεκτικότητάς του χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα (Doyle et al., 2001).

Διάφοροι τύποι γάλακτος έχουν μελετηθεί πειραματικά ως προς την θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου σε αυτά. Έχει αποδειχθεί ότι τα είδη του γένους *Listeria* έχουν μεγαλύτερη αντοχή στην θερμότητα στο νοπό γάλα συγκριτικά με το αποστειρωμένο γάλα και στο αποβουτυρωμένο γάλα συγκριτικά με το πλήρες γάλα σε θερμοκρασίες κάτω των 63 °C (Doyle et al., 2001). Οι D-τιμές στο γάλα κατά την εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (71,7 °C) για βραχύ χρονικό διάστημα περίπου 15 δευτερολέπτων (HTST) κυμαίνονται από 0,9 έως 2 sec και επαρκούν για την μείωση του παθογόνου κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης. Επίσης, η εφαρμογή χαμηλής θερμοκρασίας (63 °C) για χρονικό διάστημα 30 λεπτών (LTLT) είναι ακόμα πιο καταστροφική για το παθογόνο (Lani & Hassan, 2016).

Η περιεκτικότητα των λιπαρών επηρεάζει τη θερμική αδρανοποίηση στο κρέας και στα ψάρια. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε και η αντοχή της *L. monocytogenes* σε γάλα με διαφορετική περιεκτικότητα σε λιπαρά. Χρησιμοποιώντας πέντε στελέχη της *L. monocytogenes* σε πλήρες γάλα, αποβουτυρωμένο γάλα και σε γάλα με 11% στερεά γάλακτος χωρίς λιπαρά διαπιστώθηκε πως η σύσταση του γάλακτος δεν είναι καθοριστικός παράγοντας στην θερμική αδρανοποίηση του παθογόνου (Donnelly & Briggs, 1986).

Οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις επηρεάζουν επίσης την θερμοανθεκτικότητα της *L. monocytogenes*. Περισσότερο θερμοανθεκτικά φαίνεται πως είναι τα κύτταρα του παθογόνου τα οποία έχουν εκτεθεί σε πρότερη θερμική καταπόνηση. Η προγενέστερη έκθεση του παθογόνου στους 48 °C για 3 λεπτά συμβάλλει στην αύξηση της ανθεκτικότητας των κυττάρων στην επακόλουθη θερμική επεξεργασία. Σε χυμούς φρούτων η προσαρμοστικότητα του παθογόνου στην οξύτητα ενισχύει την ικανότητα επιβίωσής του κατά τη θερμική επεξεργασία (Bucur et al., 2018).

Η συγκέντρωση του άλατος επηρεάζει επίσης την ικανότητα του παθογόνου να επιβιώνει των θερμικών επεξεργασιών. Ορισμένα άλατα, δρουν προστατευτικά στους μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας. Σε προϊόντα αυγών, η τιμή D<sub>63</sub> της *L. monocytogenes* αυξήθηκε κατά έξι φορές με την προσθήκη 10% NaCl. Η συγκέντρωση των αλάτων, όπως το NaCl, αυξάνουν την θερμοανθεκτικότητα των βακτηρίων μειώνοντας την ενεργότητα νερού του τροφίμου (Barlett & Hawke, 1995).

## 4. Μέθοδοι επεξεργασίας νοπού γάλακτος

### 4.1 Θερμική επεξεργασία

Κατά το αρχικό στάδιο της επεξεργασίας και αφού έχει προηγηθεί η απομάκρυνση των σωματικών κυττάρων με φυγοκέντρηση, η εφαρμογή θέρμισης δύναται να παρατείνει τον χρόνο συντήρησης του νοπού γάλακτος μετά την συλλογή του έως 3 ημέρες σε θερμοκρασία  $\leq 8$  °C. Πρόκειται για μία ήπια διαδικασία θέρμανσης που πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 60-69 °C για 20-30 δευτερόλεπτα. Στόχος της είναι η καταστροφή των βλαστικών μορφών των αλλοιογόνων βακτηρίων, κυρίως των ψυχρότροφων, και η μερική αδρανοποίηση των ενζύμων. Μετά το θέρμισμα το γάλα ψύχεται σε θερμοκρασία  $< 5$  °C (Wilbey, 1996; Sfakianakis & Tzia, 2014).

Η **παστερίωση** του γάλακτος εισήχθη στην βιομηχανία επεξεργασίας γάλακτος ως μέθοδος πρόληψης της βρουκέλωσης, της φυματίωσης και άλλων ασθενειών που μεταδίδονται μέσω της κατανάλωσης γάλακτος (Cerf & Cordon, 2006). Οι προδιαγραφές παστερίωσης του γάλακτος έχουν καθοριστεί έτσι ώστε να καταστρέφουν τα παθογόνα βακτήρια *Mycobacterium tuberculosis* και *Coxiella burnetii*. Ωστόσο, σύμφωνα με την επιτροπή Codex Alimentarius για την υγιεινή των τροφίμων, ως παστερίωση ορίζεται η θερμική επεξεργασία η οποία στοχεύει στη μείωση τυχόν παθογόνων μικροοργανισμών στο νοπό γάλα και τα υγρά γαλακτοκομικά προϊόντα σε ασφαλή επίπεδα για την δημόσια υγεία (Cerf & Cordon, 2006).

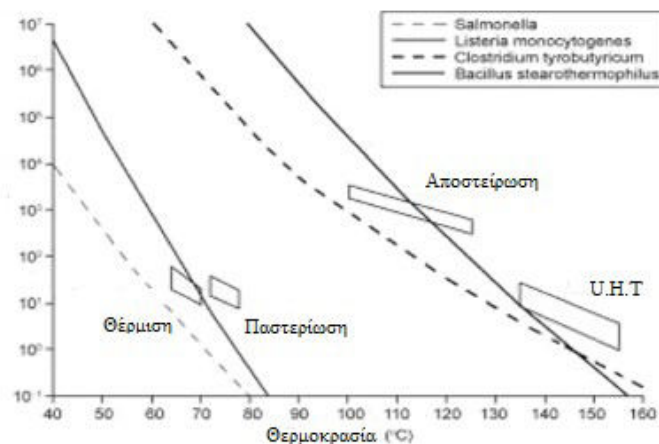
Η παστερίωση επιφέρει και την καταστροφή θερμοευαίσθητων αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών στο νοπό γάλα στους οποίους συγκαταλέγεται και η *L. monocytogenes*. Οι ελάχιστες απαιτούμενες χρονοθερμοκρασιακές συνθήκες στην παστερίωση για την αδρανοποίηση δυνητικά παθογόνων βακτηρίων είναι η επεξεργασία στους 71,7 °C για 15 δευτερόλεπτα (High Temperature Short Time, HTST) και στους 63 °C για 30 λεπτά (Low-Temperature Long-Time, LTLT) (Giffel & Wells-Bennik, 2010). Η εφαρμογή των παραπάνω ισοδύναμων τρόπων θερμικής επεξεργασίας βεβαιώνει την αδρανοποίηση των αναμενόμενων επιπέδων της *L. monocytogenes*. Η παστερίωση είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη θερμική επεξεργασία στις βιομηχανίες γάλακτος. Ωστόσο, αν και καταστρέφει πλήρως τα παθογόνα βακτήρια του γάλακτος χωρίς ουσιαστικά να επηρεάζει τα θρεπτικά συστατικά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του, δεν εξαλείφει τους σπόρους των ψυχρότροφων βακτηρίων (Ryser, 2012).

Η **υψηλή θερμική επεξεργασία** είναι μία εντονότερη θερμική επεξεργασία από την παστερίωση. Χρησιμοποιούνται θερμοκρασίες κοντά στους 100 °C στιγμιαία, κατά την εφαρμογή της. Με την επεξεργασία αυτή θανατώνονται όλοι οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί όχι όμως οι σπόροι. Επίσης, αδρανοποιείται το ένζυμο λακτο-

υπεροξειδάση, το οποίο παραμένει ενεργό έπειτα από την εφαρμογή της παστερίωσης (Καμινारीδης & Μοάτσου, 2015).

Η **αποστείρωση** καταστρέφει όλους τους μικροοργανισμούς του γάλακτος, συμπεριλαμβανομένων και των σπόρων, έτσι ώστε να μπορεί να διατηρηθεί για μεγαλύτερο χρόνο και εκτός ψύξης. Εφαρμόζεται με δύο τρόπους: την κλασική αποστείρωση και την αποστείρωση σε υπέρ-υψηλές θερμοκρασίες (UHT, Ultra High Temperature). Η κλασική αποστείρωση πραγματοποιείται στους 110 °C για 30 λεπτά και αδρανοποιεί την πλειονότητα των ενδογενών ενζύμων. Προκαλεί ωστόσο καστανίωση του γάλακτος λόγω της αντίδρασης Maillard και αλλοιώνει τη γεύση του λόγω της εξάτμισης πολλών πτητικών ουσιών δημιουργώντας μία χαρακτηριστική γεύση «καμμένου» (Boelrijik et al., 2003).

Η UHT επεξεργασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες 135 έως 150 °C για 1-2 δευτερόλεπτα. Επιφέρει την ίδια βακτηριακή αδρανοποίηση με την κλασική αποστείρωση αλλά ηπιότερα αποτελέσματα ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την θρεπτική αξία. Το γάλα έχει μικρότερη απώλεια θρεπτικών συστατικών και παράγονται θειούχες πτητικές ουσίες όπως το υδρόθειο που προσδίδουν στο γάλα μία ελαφρά γεύση «βρασμένου» (Boelrijik et al., 2003).



**Εικόνα 6:** Αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών με την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας κατά την επεξεργασία γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων (Gieffels & Wells-Bennik, 2010)

Η θερμική επεξεργασία έχει θετικά αποτελέσματα όσον αφορά την καταστροφή των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών και την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής του τροφίμου. Ωστόσο, επιφέρει απώλεια βιταμινών και αλλαγή σε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως το χρώμα και η γεύση. Επιπλέον, η θερμική επεξεργασία επιδρά στην αδρανοποίηση των ενζύμων, την οξείδωση των λιπιδίων, την μετουσίωση των πρωτεϊνών και τη μη ενζυμική αμαύρωση (αντίδραση Maillard).

Για τους παραπάνω λόγους μελετώνται εναλλακτικές μορφές μη θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων όπως η επεξεργασία με εφαρμογή υπερήχων, παλλόμενων ηλεκτρικών πεδίων υψηλής τάσης, υψηλής υδροστατικής πίεσης και υπεριώδους ακτινοβολίας (Choudhary & Bandla, 2012).

## 4.2 Μη θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας

### 4.2.1 Ψύξη

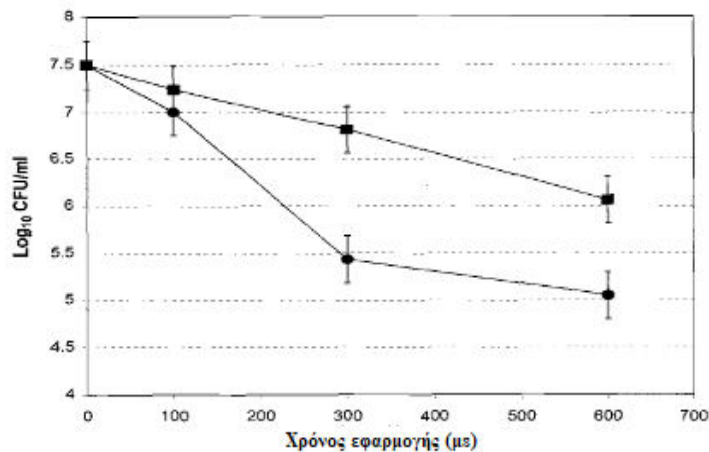
Η θερμοκρασία συντήρησης έχει κυρίαρχο ρόλο στην επιβράδυνση ή την αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Για την αποφυγή αλλοιώσεων του γάλακτος, λόγω της ανάπτυξης μικροοργανισμών και την αύξηση του χρόνου διατήρησης του, το νωπό γάλα ψύχεται αμέσως μετά την άμελξη σε θερμοκρασία χαμηλότερη από 5 °C. Εάν η μόλυνσή του είναι μεγάλη τότε ψύχεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες συνήθως 1,7 °C ώστε να αποτραπεί η ανάπτυξη ψυχρότροφων βακτηρίων όπως η *L. monocytogenes* (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2010). Η ψύξη εφαρμόζεται ως μέθοδος ελέγχου της μικροβιακής ανάπτυξης ευρέως γιατί σπάνια επιδρά στις ιδιότητες του τροφίμου. Γενικά στις μη θερμικές επεξεργασίες οι σπόροι των βακτηρίων παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα. Αν και η παστερίωση καταστρέφει τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, κάποιες βλαστικές μορφές μειώνουν τον χρόνο ζωής του προϊόντος καθιστώντας την συντήρηση υπό ψύξη απαραίτητη για την διατήρηση του τροφίμου (Raso et al., 2004).

### 4.2.2 Παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία υψηλής τάσης

Η *L. monocytogenes*, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ένας μικροοργανισμός με μεγάλη προσαρμοστικότητα σε διαφορετικά περιβάλλοντα ενώ μπορεί να βρεθεί στο γάλα λόγω επιμόλυνσης του μετά τη θερμική επεξεργασία. Τα παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία υψηλής τάσης (High-Intensity Pulsed Electric Fields), είναι μία εναλλακτική μη θερμική μέθοδος επεξεργασίας κυρίως των υγρών τροφίμων. Παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία υψηλής τάσης εφαρμόζονται στα τρόφιμα για πολύ μικρό χρονικό διάστημα χωρίς να αλλοιώνουν τα θρεπτικά συστατικά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (Reina et al., 1998). Με την εφαρμογή παλλόμενων ηλεκτρικών πεδίων παρατηρείται το φαινόμενο της ηλεκροπόρωσης κατά το οποίο τα κύτταρα φορτίζονται και δημιουργούνται πόροι στην κυτταρική τους μεμβράνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη

λύση της κυτταρικής μεμβράνης και την καταστροφή του βακτηρίου (Alirezalu et al., 2019).

Για την αδρανοποίηση της *L. monocytogenes* στο πλήρες γάλα απαιτείται διοχέτευση ισχύος 35 kV/cm στους 25 °C (Reina et al., 1998). Η επίδραση της μεθόδου αυτής ποικίλει μεταξύ των μικροοργανισμών και των βλαστικών μορφών τους. Αν η μέθοδος αυτή συνδυασθεί με ήπια θερμική επεξεργασία, με την εφαρμογή θερμοκρασιών χαμηλότερων εκείνων της παστερίωσης τότε ενισχύεται η επίδραση της επεξεργασίας στους μικροοργανισμούς και τα ένζυμα του γάλακτος (Alirezalu et al., 2019).



**Εικόνα 7:** Αδρανοποίηση της *L. monocytogenes* σε πλήρες γάλα, με διοχέτευση ηλεκτρικού ρεύματος ισχύος 35 kV/cm (●) και 25 kV/cm (■). Θερμοκρασία 25 °C, ρυθμός ροής 7 ml/s, διάρκεια παλμού 1,5 ms, συχνότητα 1700 Hz (Reina et al., 1998)

#### 4.2.3 Υψηλή υδροστατική πίεση

Η εφαρμογή υψηλής υδροστατικής πίεσης είναι μία μη θερμική μέθοδος επεξεργασίας για την αδρανοποίηση των αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών σε υγρά και στερεά τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Η τεχνική αυτή εξασφαλίζει την παραγωγή ασφαλών προϊόντων με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής τα οποία διατηρούν την θρεπτική αξία και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Η πίεση που εφαρμόζεται ξεκινά από 100 MPa και μπορεί να ξεπεράσει τα 800 MPa για την καταστροφή ανθεκτικών σπόρων (Fellows, 2017). Τα Gram- βακτήρια απαιτούν την εφαρμογή χαμηλότερων πιέσεων για την αδρανοποίησή τους από τα Gram+. Συνήθως τα βακτήρια που είναι ανθεκτικά στη θέρμανση είναι επίσης ανθεκτικότερα των άλλων και στις υψηλές πιέσεις. Η μέθοδος εφαρμόζεται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, ωστόσο είναι αποτελεσματικότερη με ταυτόχρονη εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών (Ogawa et al., 1989).

Στο νωπό γάλα έπειτα από εφαρμογή υδροστατικής πίεσης 600 MPa η D-τιμή της *L. monocytogenes* είναι 2,43 λεπτά. Σε θρεπτικό υλικό Brain Heart infusion Broth οι D-τιμές της *L. monocytogenes* είναι 3,79 και 1,63 λεπτά σε πίεση 400 MPa και 600 MPa αντίστοιχα. Όσο υψηλότερη πίεση εφαρμόζεται τόσο η D-τιμή, δηλαδή ο απαιτούμενος χρόνος για την μείωση της *L. monocytogenes* κατά 90%, μειώνεται (Dogan & Erkmen, 2004).

#### 4.2.4 Υπέρηχοι

Ως υπέρηχοι, ορίζονται τα ηχητικά κύματα με συχνότητα μεγαλύτερη από 20 kHz. Έχει αποδειχθεί πως έχουν βακτηριοκτόνο δράση ιδιαίτερα όταν συνδυαστούν με ήπια θέρμανση (D'Amico et al., 2006). Η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών με την εφαρμογή υπερήχων αποδίδεται στην ενδοκυτταρική σπηλαιώση που επιφέρουν. Η επίδραση ενός ηχητικού κύματος με μεγάλο εύρος έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μικροσκοπικών φυσαλίδων στο βακτηριακό κύτταρο και την επακόλουθη διάσπασή του. Τα υπερηχητικά κύματα διαταράσσουν τα κυτταρικά τοιχώματα και διευκολύνουν την απελευθέρωση των κυτταρικών συστατικών με αποτέλεσμα τη λύση του βακτηριακού κυττάρου (Hoover, 2000).

Η επεξεργασία με υπερήχους σε συνδυασμό με ήπια θερμοκρασία (57 °C) για 18 λεπτά οδήγησε στην μείωση της *L. monocytogenes* στο υπέρ-παστεριωμένο (UHT) γάλα και των αερόβιων βακτηρίων στο νωπό γάλα κατά πέντε λογαρίθμους. Ειδικότερα στο γάλα η εφαρμογή υπερήχων βοηθά στην ομογενοποίηση του γάλακτος, στην απομάκρυνση των αερίων και στην καλύτερη αντιοξειδωτική του ικανότητα (D'Amico et al., 2006).

#### 4.2.5 Βιολογικές μέθοδοι

Η διασφάλιση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων με βιολογικές μεθόδους επιτυγχάνεται με την δράση των προϊόντων μεταβολισμού των γαλακτικών βακτηρίων όπως πεπτιδία ή πρωτεΐνες που ονομάζονται βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες θεωρούνται ως τα πλέον αποδεκτά συντηρητικά τροφίμων επειδή παράγονται από βακτήρια που υπάρχουν στην φυσική μικροχλωρίδα των τροφίμων (Adams & Moss, 2008). Οι βακτηριοσίνες *νισίνη* και *πενιδίνη* παράγονται από τα γαλακτικά βακτήρια *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* και *Pediococcus acidilactici*, αντίστοιχα.

Ο μηχανισμός της αντιμικροβιακής τους δράσης περιλαμβάνει το σχηματισμό πόρων στην κυτταρική μεμβράνη των παθογόνων κυττάρων με αποτέλεσμα την καταστροφή τους (Jydegaard et al., 2000).

Η νισίνη καταστρέφει τους Gram+ μικροοργανισμούς. Αντίθετα οι Gram- μικροοργανισμοί και οι μύκητες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα και αδρανοποιούνται μόνο σε συνδυασμό με μία χηλική ένωση. Μερικές συνήθεις χηλικές ενώσεις είναι το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediaminetetraacetic acid- EDTA) και το τετραϋδροφουρφουρυλο δισουλφίδιο (thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide- TTFD) (Jay, 1996). Επιπλέον η νισίνη είναι μη τοξική, θερμοάντοχη και δεν αλλοιώνει τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται ως βιοσυντηρητικό σε διάφορα τρόφιμα όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα αυγά, τα λαχανικά, το κρέας και τα δημητριακά. Μεταξύ των παθογόνων που αδρανοποιεί η νισίνη συμπεριλαμβάνεται και η *L. monocytogenes*. Λόγω της φύσης του βακτηρίου η ψύξη δεν επαρκεί για να αποτρέψει την ανάπτυξη της στα τρόφιμα. Επομένως η χρήση της νισίνης σαν δευτερεύουσα μέθοδος συντήρησης επιδρά στον έλεγχο της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* στα συσκευασμένα τρόφιμα (Jin, 2010).

#### 4.2.6 Αντιμικροβιακά συστήματα των τροφίμων

Αρκετά από τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα περιλαμβάνουν αντιμικροβιακές ουσίες όπως είναι για παράδειγμα η λυσοζύμη. Η λυσοζύμη είναι η πιο διαδεδομένη αντιμικροβιακή φυσική ουσία που χρησιμοποιείται ως συντηρητικό των τροφίμων. Πρόκειται για ένα ένζυμο, το οποίο προκαλεί τη λύση των βακτηριακών κυττάρων υδrolύοντας την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος. Το ένζυμο περιέχεται σε μια ποικιλία τροφίμων μεταξύ των οποίων είναι τα αυγά και το γάλα και δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Κύριο μειονέκτημα στη δράση της είναι η μετουσίωση της κατά την παστερίωση και συνεπώς η απώλεια της δραστηριότητάς της (Miettinen et al., 2001).

Το νωπό γάλα περιέχει διάφορες αντιμικροβιακές ουσίες που αναχαιτίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Έχει βρεθεί πως πληθυσμοί των μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus* και *Salmonella enteritidis* αναπτύσσονται σε νωπό και παστεριωμένο γάλα. Στο νωπό γάλα οι βακτηριακοί πληθυσμοί παρουσιάζουν μείωση μέσα σε 32 ώρες (Quigley et al., 2013). Σε μελέτη για την επίδραση του νωπού γάλακτος στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* στους 15 °C, χρησιμοποιήθηκαν έξι στελέχη του παθογόνου που απομονώθηκαν από νωπό γάλα για την αξιολόγηση της βακτηριοστατικής δράσης του ενζύμου λάκτο-υπεροξειδάση. Μετά από 65 ώρες στην στατική φάση ανάπτυξης το παθογόνο αναπτύχθηκε στο παστεριωμένο και στο νωπό γάλα κατά 2-3,5 και 0,8-2,3 λογάριθμους αντίστοιχα.

Η προσθήκη θειοκυανικών και υπεροξειδίου του υδρογόνου ενίσχυσαν την αναχαιτιστική δράση της λάκτο-υπεροξειδάσης αφού τρία στελέχη δεν αναπτύχθηκαν και τα υπόλοιπα αναπτύχθηκαν κατά 0,7-1,3 λογάριθμους (Griffiths, 2010).

#### 4.2.7 Τεχνολογία εμποδίων

Η ασφάλεια και η σταθερότητα των τροφίμων είναι αποτέλεσμα της επίδρασης όχι ενός αλλά πολλών παραγόντων. Ο συνδυασμός των παραγόντων είναι μέρος ενός δυναμικού συστήματος το οποίο αλλάζει συνεχώς μέχρι το προϊόν να φτάσει στον καταναλωτή (Raso et al., 2004). Οι παράγοντες που συνδυάζονται στην συντήρηση των τροφίμων και λειτουργούν ως εμπόδια στην ανάπτυξη μικροοργανισμών είναι η θερμοκρασία (υψηλή ή χαμηλή), η ενεργότητα νερού ( $a_w$ ), η ενεργός οξύτητα (pH), το δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh), τα συντηρητικά (νιτρικά και θειώδη άλατα) και η ανταγωνιστική μικροχλωρίδα (οξυγαλακτικά βακτήρια) (Leistner, 2000). Χαρακτηριστικό παράδειγμα της εφαρμογής της τεχνολογίας εμποδίων είναι η παστερίωση του γάλακτος σε συνδυασμό με την άμεση ψύξη και συντήρησή του υπό ψύξη. Η θερμική επεξεργασία αδρανοποιεί τις βλαστικές μορφές των παθογόνων και μειώνει τον πληθυσμό των αλλοιογόνων βακτηρίων, ενώ η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης καθυστερεί την ανάπτυξη των βακτηρίων που επέζησαν της παστερίωσης (Raso et al., 2004).

### 5. Έλεγχος της *L. monocytogenes* στη βιομηχανία τροφίμων

#### 5.1 Νομοθετικό Πλαίσιο

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005, περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, ορίζονται συγκεκριμένα κριτήρια ασφάλειας τροφίμων για τον έλεγχο της *L. monocytogenes* σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα. Ως μικροβιολογικά κριτήρια ορίζονται οι προϋποθέσεις εκείνες που επιβάλλεται να ικανοποιούνται και οι οποίες καθορίζουν το βαθμό στον οποίο ένα τρόφιμο ή μία διαδικασία επεξεργασίας τροφίμου θεωρείται ασφαλής και αποδεκτή (EURL Lm, 2018).

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005, τα μικροβιολογικά κριτήρια που πρέπει να πληρούνται είναι τα ακόλουθα:

- Σε ότι αφορά τρόφιμα που προορίζονται για κατανάλωση από βρέφη και νήπια ή που καταναλώνονται για ιατρικούς λόγους, θα πρέπει να εξασφαλιστεί η πλήρης απουσία της λιστέριας σε 25 γραμμάρια του τροφίμου.
- Σε ότι αφορά τα τρόφιμα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* και δεν προορίζονται για κατανάλωση από βρέφη και νήπια ή δεν καταναλώνονται για ιατρικούς λόγους τα αποδεκτά ανώτατα όρια παρουσίας



του παθογόνου είναι 100 κύτταρα ανά γραμμάριο προϊόντος κατά το χρόνο διάθεσης του στην αγορά και μέχρι τη λήξη του αναφερόμενου χρόνου συντήρησης του. 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 την μη υπέρβαση του προβλεπόμενου ορίου στο τέλος της διαδικασίας συντήρησης. Επιπλέον θα πρέπει να εξασφαλιστεί η πλήρης απουσία της λιστέριας σε 25 γραμμάρια του τροφίμου όσο το τρόφιμο παραμένει στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας και εάν ο υπεύθυνος παραγωγής δεν είναι σε θέση να αποδείξει στις αρμόδιες αρχές ότι στο τέλος της διαδικασίας συντήρησης, το βακτήριο στο προϊόν δεν θα έχει υπερβεί τα 100 κύτταρα ανά γραμμάριο προϊόντος.

- Σε ότι αφορά τα τρόφιμα που δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* και δεν προορίζονται για κατανάλωση από βρέφη και νήπια ή δεν καταναλώνονται για ιατρικούς λόγους τα αποδεκτά ανώτατα όρια παρουσίας του παθογόνου είναι 100 κύτταρα ανά γραμμάριο προϊόντος κατά το χρόνο διάθεσης του στην αγορά και μέχρι τη λήξη του αναφερόμενου χρόνου συντήρησης (FSAI, 2011).

Επιπλέον οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων πρέπει να συμμορφώνονται με τα κριτήρια ασφάλειας των τροφίμων όσον αφορά τη *L. monocytogenes* για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, στο πλαίσιο των ορθών πρακτικών υγιεινής και των προγραμμάτων ανάλυσης κινδύνου στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP) (EURL Lm, 2018).

## 5.2 Διαχείριση ασφάλειας τροφίμων (HACCP)

Η εφαρμογή του προγράμματος διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων βασισμένου στην Ανάλυση Κινδύνων – Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου ΑΚΚΣΕ) ή άλλως HACCP (Hazard Analysis – Critical Control Points), επιβάλλεται να εφαρμόζεται από όλες τις βιομηχανίες τροφίμων και σε όλα τα στάδια από τα οποία περνάει το τρόφιμα (παραγωγή, συσκευασία, διανομή) ώστε να επιτυγχάνεται το προβλεπόμενο όριο ασφάλειας των προς κατανάλωση τροφίμων. Πρόκειται για ένα σύστημα διαχείρισης που χρησιμοποιείται από επιχειρήσεις που σχετίζονται με οποιαδήποτε τρόπο με τα τρόφιμα (παραγωγή, διανομή, εστίαση κ.ο.κ) και αποσκοπεί στην αναγνώριση, εκτίμηση και έλεγχο των κινδύνων που σχετίζονται με τα τρόφιμα, οι οποίοι μπορεί να είναι βιολογικοί (ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών στο τρόφιμο όπως βακτήρια, ιοί, παράσιτα κτλ.), χημικοί (χημικές ουσίες όπως φυτοφάρμακα, κτηνιατρικά φάρμακα, τοξίνες κ.α.) ή φυσικοί κίνδυνοι (ξένα σωματίδια που προέρχονται από εγκαταστάσεις, εξοπλισμό και εργαζομένους όπως γυαλί, ύφασμα, τρίχες). Το πρόγραμμα HACCP αποτελεί πρακτικά μια συστηματική προσέγγιση η οποία αποσκοπεί στην καταγραφή

των πιθανών κινδύνων καθώς και στον έλεγχο και τον περιορισμό τους. Στην περίπτωση που ακολουθείται συστηματικά και ορθά μπορεί να ελαχιστοποιήσει την πιθανότητα μόλυνσης του τροφίμου (Strohben et al., 2004).

Η υιοθέτηση και εφαρμογή του συστήματος HACCP στα πρότυπα ISO 9001/2 είναι απαραίτητη για τη διαχείριση και διασφάλιση της ποιότητας και ασφάλειας του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Πρόκειται για μία προσέγγιση η οποία εντοπίζει όλους τους κινδύνους που σχετίζονται με την ασφάλεια και την ποιότητα, ξεκινώντας από το νωπό γάλα έως τα συσκευασμένα τελικά γαλακτοκομικά προϊόντα. Εκτιμά τους σχετικούς κινδύνους και προσδιορίζει τις λειτουργίες εκείνες που θα έχουν ως αποτέλεσμα τον αποδοτικότερο έλεγχο της παραγωγικής διαδικασίας (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2010).

### **5.3 Παρουσία της *L. monocytogenes* στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων**

Εκτός από τον έλεγχο της παρουσίας του παθογόνου στα τρόφιμα, εξίσου σημαντικός είναι και ο έλεγχος της παρουσίας του παθογόνου στους χώρους επεξεργασίας των τροφίμων έτσι ώστε να αποφευχθεί μία τυχόν επιμόλυνση των παραγόμενων τροφίμων με το παθογόνο (Reij et al., 2004).

Η παρουσία της *L. monocytogenes* στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων θεωρείται η κύρια αιτία της επιμόλυνσης των τροφίμων μετά το στάδιο της επεξεργασίας τους (Buchannan et al., 2017). Παρόλο που το βακτήριο καταστρέφεται με τις επεξεργασίες που εφαρμόζονται κατά την επεξεργασία των τροφίμων, η επακόλουθη επιμόλυνση από τον εξοπλισμό, το προσωπικό ή το χώρο επεξεργασίας όπως είναι το πάτωμα, οι τοίχοι ακόμη και η οροφή, αποτελεί μείζον ζήτημα για την ασφάλεια των τροφίμων. Έχει εντοπιστεί σε συσκευασμένα και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα όπως λαχανικά, φρούτα, γαλακτοκομικά προϊόντα και κρεατοσκευάσματα (Ferreira et al., 2014). Η *L. monocytogenes* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο βακτήριο στο περιβάλλον και επομένως μπορεί εύκολα να μεταφερθεί στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων μέσω των πρώτων υλών φυτικής και ζωικής προέλευσης καθώς και μέσω του χώματος στα παπούτσια των εργαζομένων (Reij et al., 2004).

Όταν οι μέθοδοι καθαρισμού και απολύμανσης του εξοπλισμού είναι αναποτελεσματικές και οι συνθήκες υγιεινής κατά την παραγωγή είναι ακατάλληλες, το βακτήριο εξαιτίας της υψηλής προσαρμοστικότητάς του σε φυσικοχημικές μεταβολές και περιβαλλοντική καταπόνηση μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων σχηματίζοντας ανθεκτικότερες δομές όπως είναι τα βιοϋμένια (Buchannan et al., 2017). Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση μικροβιολογικών ελέγχων του χώρου επεξεργασίας των τροφίμων και

του εξοπλισμού έτσι ώστε σε περίπτωση που ανιχνευθεί το παθογόνο, να γίνει επανεξέταση των μεθόδων καθαρισμού και απολύμανσης (Ferreira et al., 2014).

#### 5.4 Σχηματισμός βιοϋμενίων

Οι ορθές πρακτικές επεξεργασίας καθώς και το σύστημα HACCP έχουν καθιερωθεί για την μεγιστοποίηση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων. Ωστόσο τα βιοϋμένια δεν εντοπίζονται πάντα μέσω της εφαρμογής του συστήματος HACCP στις βιομηχανίες τροφίμων. Το σύστημα Hence, μία αναβαθμισμένη εκδοχή του συστήματος HACCP, παρέχει σαφέστερες πληροφορίες σχετικά με την παρουσία των βιοϋμενίων στη βιομηχανία τροφίμων. Συγκεκριμένα, συμβάλλει στην ανάπτυξη των κατάλληλων μεθόδων απολύμανσης και στον σχεδιασμό συστημάτων επεξεργασίας απαλλαγμένων από τα βιοϋμένια (Shi & Zhu, 2009).

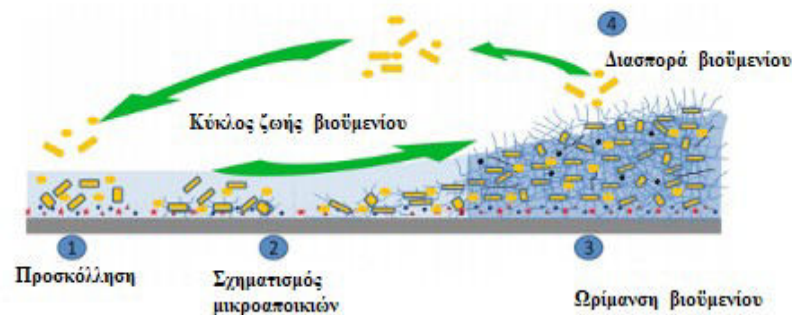
Ως βιοϋμένιο ή βιομεμβράνη ή βιοφίλμ, ορίζεται η μορφή βακτηριακής ζωής η οποία χαρακτηρίζεται από την πρόσφυση μικροοργανισμών σε ζωντανούς οργανισμούς, τρόφιμα ή επιφάνειες με επακόλουθη παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών (Extracellular Polymeric Substances, EPSs) (Musk et al., 2005).

Η λειτουργικότητά τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το pH, η θερμοκρασία και η παρουσία οργανικών ή ανόργανων συστατικών.

Τα **βιοϋμένια** στην πλειονότητά τους σχηματίζονται από διάφορα είδη βακτηρίων και θεωρείται ως η επικρατέστερη μορφή βακτηριακής ανάπτυξης σε πολλά περιβάλλοντα, μεταξύ των οποίων και οι χώροι επεξεργασίας τροφίμων. Τα βακτήρια στα βιοϋμένια εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα σε καθαριστικά, απολυμαντικά και αντιμικροβιακά μέσα σε σχέση με τα πλαγκτονικά (Lemon et al., 2007).

Ο σχηματισμός των βιοϋμενίων πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια (Abdallah et al., 2014). Αρχικά τα βακτήρια προσφύονται στις επιφάνειες. Για τον καλύτερο προσανατολισμό τους και την ευκολότερη και ισχυρότερη πρόσδεσή τους σε αυτές, τα κύτταρα χρησιμοποιούν εξωκυτταρικά οργανίδια και πρωτεΐνες. Η αρχική προσκόλληση των βακτηρίων στις επιφάνειες είναι ασθενής και πραγματοποιείται μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Στο στάδιο αυτό τα βακτήρια μπορούν να αφαιρεθούν με διάφορα μέσα από την επιφάνεια πρόσδεσης (Reger & Wiebel, 2011). Ακολούθως παρατηρείται μεγάλη ανάπτυξη των κυττάρων και παραγωγή ενός συμπλέγματος εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών (EPSs) τις οποίες εκκρίνουν για μεγαλύτερη μηχανική σταθερότητα στις επιφάνειες. Οι ουσίες αυτές αποτελούνται από DNA, λιποσακχαρίτες, λιπίδια και πρωτεΐνες. Στη φάση αυτή τα κύτταρα είναι ισχυρά προσκολλημένα στην επιφάνεια και δεν μπορούν να αφαιρεθούν (Oliveira et al., 2010). Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την αντιγραφή των κυττάρων και τον σχηματισμό

μικροαποικιών. Τα κύτταρα των αποικιών ενθλακώνονται σε μία γέλη που δημιουργείται από τις EPSs και η οποία λειτουργεί σαν φυσικό εμπόδιο μεταξύ της μικροαποικίας και του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος. Στο τρίτο στάδιο πραγματοποιείται η ωρίμανση του βιοϋμενίου. Η μικροαποικία αναπτύσσεται σε μία τρισδιάστατη δομή, η ώριμη μορφή της οποίας είναι το βιοϋμένιο το οποίο συγκρατείται από το σύμπλεγμα των πολυμερικών ουσιών (Renner & Wiebel, 2011). Στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο, τα βακτήρια διασπείρονται εκτός του βιοϋμενίου μολύνοντας νέες επιφάνειες (Abdallah et al., 2014). Σε μία μονάδα παραγωγής τροφίμων η διασπορά αυτή συνεπάγεται την επιμόλυνση της γραμμής παραγωγής. Τα κύτταρα που απελευθερώνονται από τα βιοϋμένια είναι στην βλαστική μορφή τους. Όταν επαναπροσκολλώνται σε νέες επιφάνειες φέρουν τα χαρακτηριστικά του βιοϋμενίου και αναπτύσσονται ταχύτερα από τα πρωταρχικά κύτταρα (Rasmussen et al., 2005).



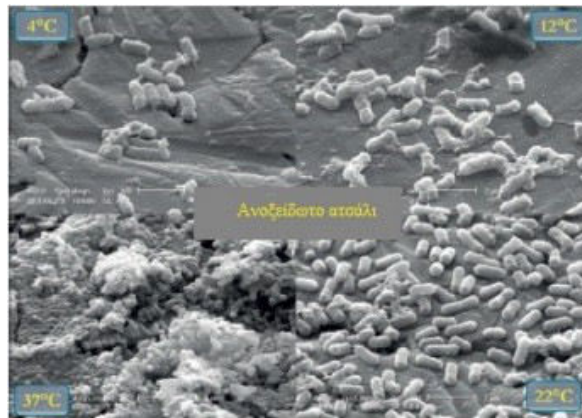
**Εικόνα 8:** Στάδια σχηματισμού των βιοϋμενίων (Abdallah et al., 2014)

#### 5.4.1 Σχηματισμός βιοϋμενίων από τη *L. monocytogenes*

Η *L. monocytogenes* προσκολλάται σε διάφορα υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων όπως το γυαλί, το καουτσούκ, το πολυπροπυλένιο και το ανοξείδωτο ατσάλι (Lee et al., 2019). Ο σχηματισμός βιοϋμενίων από τη *L. monocytogenes* εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η φύση της επιφάνειας ανάπτυξης των κυττάρων και η υδροφοβία του υλικού. Τα βιοϋμενία του βακτηρίου αποτελούνται κυρίως από τειχοϊκά οξέα (teichoic acids) (Galié et al., 2018). Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με τον σχηματισμό βιοϋμενίων από τη *L. monocytogenes*, έχουν πραγματοποιηθεί σε υψηλότερη θερμοκρασία από αυτή που συνήθως επικρατεί στο περιβάλλον μιας βιομηχανίας τροφίμων. Ο μικροοργανισμός σχηματίζει βιοϋμένια στην βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του, δηλαδή από 35 έως 39 °C, καθώς και στους 25 °C, θερμοκρασία στην οποία ο μικροοργανισμός αναπτύσσει μαστίγια τα οποία συμβάλλουν στην αρχική προσκόλληση στην επιφάνεια (Colagiorgi et al., 2017) αλλά όχι στον τελικό σχηματισμό των βιοϋμενίων, όπως συμβαίνει στα περισσότερα Gram- βακτήρια (Lemon et al., 2007). Η έκφραση της μαστιγίνης, της πρωτεΐνης που πολυμερίζεται για να σχηματίσει

τα νημάτια των μαστιγίων του κυττάρου, αναστέλλεται στα βιοϋμένια γεγονός που αποδεικνύει πως η μαστιγίνη συντίθεται κατά την αρχική προσκόλληση των κυττάρων στις επιφάνειες και αναστέλλεται στην τελική μορφή των βιοϋμενίων (Shi & Zhu, 2009).

Ο Di Bonaventura και οι συνεργάτες του (2008), μελέτησαν τον σχηματισμό βιοϋμενίων 44 απομονωθέντων στελεχών της *L. monocytogenes* σε 4 διαφορετικές επιφάνειες, υπό 4 διαφορετικές θερμοκρασίες. Με βάση τον αριθμό των κυττάρων στα βιοϋμένια και την παραγωγή EPSs, παρατήρησαν μία σύνθετη δομή των βιοϋμενίων στους 22 και 37 °C και μία ασθενέστερη δομή στους 4 και 12 °C (Di Bonaventura et al., 2008). Παράλληλα με την ικανότητα πολλαπλασιασμού του σε χαμηλές θερμοκρασίες, το βακτήριο ως απόκριση στις χαμηλές θερμοκρασίες ενισχύει την προσκόλλησή του στις επιφάνειες και αυξάνει την αντοχή του στα μέσα καθαρισμού σχηματίζοντας βιοϋμένια (Galié et al., 2018).



**Εικόνα 9:** Σχηματισμός βιοϋμενίου της *L. monocytogenes* σε ανοξείδωτο ατσάλι σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Di Ciccio et al., 2012)

## **5.5 Καθαρισμός και εξυγίανση του εξοπλισμού και των χώρων επεξεργασίας τροφίμων**

Ο καθαρισμός και η εξυγίανση του εξοπλισμού και των χώρων επεξεργασίας των τροφίμων είναι βασικές διεργασίες (προαπαιτούμενο πρόγραμμα ενός συστήματος HACCP) που πραγματοποιούνται κατά την επεξεργασία και παραγωγή όλων των τροφίμων συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος. Με τον καθαρισμό απομακρύνεται το 90% των μικροοργανισμών των επιφανειών χωρίς όμως να επιτυγχάνεται η καταστροφή τους. Για το λόγο αυτό, η εφαρμογή εξυγίανσης κρίνεται απαραίτητη. Η αποτελεσματικότητα της εφαρμογής του καθαρισμού και της εξυγίανσης, επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα και την ασφάλεια του τελικού προϊόντος (Bremer et al., 2006).

Κατά τον καθαρισμό είναι ιδιαίτερα σημαντική η αφαίρεση των υπολειμμάτων των

τροφίμων ή άλλων υπολειμμάτων τα οποία μπορεί να προάγουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Στις βιομηχανίες γάλακτος τα υπολείμματα αποτελούνται κυρίως από πρωτεΐνες, λίπος, άλατα ασβεστίου και βακτήρια τα οποία στερεοποιούνται στις επιφάνειες με τη μορφή γαλάλιθου (Simoes et al., 2010). Συνήθως χρησιμοποιούνται συνδυαστικά επιφανειοδραστικά και αλκαλικά χημικά απορρυπαντικά προϊόντα με ταυτόχρονη χρήση κρύου ή ζεστού νερού. Ωστόσο, για να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα όπως ο γαλάλιθος πρέπει να χρησιμοποιηθούν ισχυρότερα απορρυπαντικά που περιέχουν οξέα (Wildbrett & Escobar, 2000). Η διαδικασία του καθαρισμού χαρακτηρίζεται αποτελεσματική όταν καταστρέφεται η δομή των EPSs που συγκρατούν το βιοϋμένιο έτσι ώστε τα απολυμαντικά να επιδράσουν στα ζωντανά κύτταρα του βιοϋμένιου (Simoes et al., 2010).

Η εξυγίανση εφαρμόζεται στις επιφάνειες και στον εξοπλισμό των χώρων επεξεργασίας για να εξαλειφθούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, πλην των σπόρων τους και να περιοριστεί ο μικροβιακός πληθυσμός των μη παθογόνων σε επιτρεπτό όριο. Για την αποτελεσματική εφαρμογή της εξυγίανσης είναι απαραίτητο να προηγείται η σύνταξη ενός συγκεκριμένου και κατάλληλου σχεδίου καθαρισμού το οποίο θα εφαρμόζεται και θα επιτηρείται σχολαστικά. Σε αντίθετη περίπτωση ορισμένα υπολείμματα μπορεί να μειώσουν τη δράση των απολυμαντικών. Τα απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται ευρέως, αποτελούνται από αλκάλια, οξέα και αναστολείς διάβρωσης (González-Rivas et al., 2018).

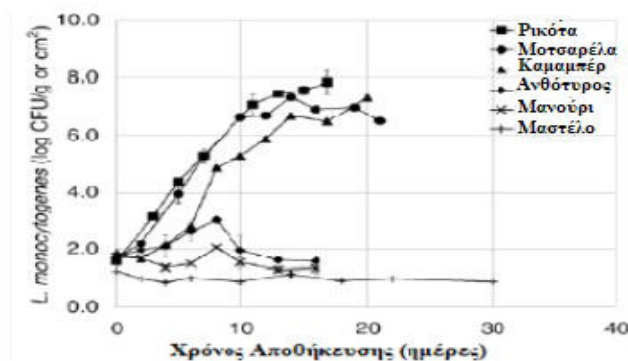
## **6. Η *L. monocytogenes* στα γαλακτοκομικά προϊόντα**

### **6.1 Τυριά**

Η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να επιβιώνει κατά τη διάρκεια της παραγωγής και της ωρίμανσης διαφόρων τύπων τυριών. Επιβιώνει περισσότερο σε μαλακά τυριά όπως το Camambert και λιγότερο σε προϊόντα όπως το τυρί Cottage. Η δράση της οξυγαλακτικής καλλιέργειας που χρησιμοποιείται κατά την παραγωγή των τυριών, περιορίζει την ανάπτυξη του βακτηρίου αλλά όχι μέχρι πλήρους αδρανοποίησής του (Farber & Peterkin, 1991). Η παρουσία της *L. monocytogenes* αποτελεί μείζονα κίνδυνο για τη βιομηχανία των τυροκομικών προϊόντων. Το βακτήριο μπορεί να επιβιώσει ή και να πολλαπλασιαστεί σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH και σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, αποτελώντας έτσι κίνδυνο για αρκετούς τύπους τυριών με διαφορετικές τεχνολογίες παρασκευής. Έχει αποδειχθεί πως στην πλειονότητά τους, τα κρούσματα λιστερίωσης, σποραδικά ή επιδημικά, οφείλονται στην κατανάλωση μαλακών τυριών, κρεμωδών τυριών και τυριών τυρογάλακτος μολυσμένων με το παθογόνο. Η τεχνολογία παρασκευής των συγκεκριμένων τυριών είναι διαφορετική από εκείνη των σκληρών ή

ημίσκληρων τυριών. Το γεγονός αυτό, ευνοεί την επιβίωση και ανάπτυξη του βακτηρίου στα μαλακά τυριά λόγω της υψηλής υγρασίας και του υψηλού pH κατά την διαδικασία παραγωγής και ωρίμανσης (Karetanakou et al., 2017).

Τυριά με  $pH > 4,2$  το οποίο σε κάποιες περιπτώσεις είναι μεγαλύτερο από 5,6, υποβοηθούν την 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 πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε αυτά. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι το βακτήριο έχει αρκετά καλή ανάπτυξη και σε τυριά όπως ο Ανθότυρος (Rohr et al., 2016). Το καλύτερο υπόστρωμα όμως για τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου αποδείχθηκε ότι είναι το τυρί Ricotta. Ο συγκεκριμένος τύπος τυριού δεν περιέχει φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες και επομένως ο κίνδυνος για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους τυριών ακόμη και αν το προϊόν συντηρηθεί σε αεροστεγή συσκευασία και υπό συνθήκες ψύξης. Τέλος, το μικροβιακό φορτίο του μικροοργανισμού μπορεί να αυξηθεί και σε τύπους τυριών με χαμηλό pH (<5,6) και χαμηλά επίπεδα υγρασίας όπως είναι η Φέτα και το τυρί Cheddar (Gombas et al., 2003).



**Εικόνα 10** :Ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε διάφορους τύπους τυριών κατά την διάρκεια αποθήκευσής τους (Karetanakou et al., 2017)

## 6.2 Παγωτά

Τα παγωτά παρασκευάζονται από παστεριωμένο γάλα και κρέμα γάλακτος. Ο έλεγχος της παρουσίας της *L. monocytogenes* στα παγωτά, εστιάζεται στην επιλογή ποιοτικού νοπού γάλακτος και στον αυστηρό έλεγχο κατά την επεξεργασία, τη συσκευασία, τη διανομή και τις συνθήκες διατήρησης του τελικού προϊόντος. Ο έλεγχος του παθογόνου είναι αποτελεσματικός κατά το στάδιο της παστερίωσης του μείγματος του παγωτού. Ωστόσο η παρουσία του στο τελικό προϊόν είναι συνήθως αποτέλεσμα επιμόλυνσης σε μεταγενέστερο στάδιο της επεξεργασίας στο χώρο επεξεργασίας του παγωτού (Kozak et al., 1996).

Η *L. monocytogenes* δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες κατάψυξης. Επιπλέον, κατά την διαδικασία παραγωγής του παγωτού, μετά στάδιο της παστερίωσης ακολουθούν η ωρίμανση, η κατάψυξη, η διανομή και η διατήρηση του τελικού προϊόντος. Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα αυτά, τα κύρια σημεία επιμόλυνσης μία παρτίδας παγωτού με το παθογόνο, μπορεί να είναι το στάδιο της ωρίμανσης (κατά το οποίο το μείγμα παγωτού συντηρείται σε θερμοκρασίες ψύξης 0-5 °C) και της συσκευασίας καθώς και τα στάδια της διανομής και διατήρησης του τελικού προϊόντος, στα οποία το παγωτό μπορεί να εκτεθεί σε μη προβλεπόμενες θερμοκρασίες (Gougouli et al., 2008).

### 6.3 Βούτυρο

Το βούτυρο παρασκευάζεται από παστεριωμένη κρέμα γάλακτος και θεωρείται μικροβιολογικά ασφαλές γαλακτοκομικό προϊόν. Η μόλυνσή του με το παθογόνο είναι σχετικά σπάνια αν και δεν αποκλείεται η επιμόλυνση του τελικού προϊόντος από το περιβάλλον επεξεργασίας. Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005, η συγκέντρωση της *L. monocytogenes* δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 CFU/g. Κρούσματα που σχετίζονται με την κατανάλωση βουτύρου μολυσμένου με *L. monocytogenes* έχουν καταγραφεί στην Φινλανδία, την Αγγλία και τις ΗΠΑ κατά το διάστημα 1990-2003, εγείροντας έτσι το ενδιαφέρον για την εντονότερη παρατήρηση της σχέσης μεταξύ του παθογόνου και του βουτύρου. Ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο εάν το παθογόνο είναι ικανό να αναπτυχθεί στο βούτυρο καθώς χρειάζονται περισσότερα δεδομένα σχετικά με την ανάπτυξη και την επιβίωση του παθογόνου σε προϊόν με σύσταση σαν αυτή του βουτύρου (Voysey et al., 2009).

### 6.4 Ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα

Η διαδικασία της ζύμωσης δρα αποτρεπτικά στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* στα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Έτσι, τα προϊόντα αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν ως προϊόντα χαμηλού κινδύνου για την ανάπτυξη του βακτηρίου. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί πως ορισμένα στελέχη του βακτηρίου αναπτύσσουν προσαρμοστικότητα στο όξινο περιβάλλον και επιβιώνουν σε προϊόντα ζύμωσης όπως είναι το τυρί Cottage και το γιαούρτι (Gahan et al., 1996). Η *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει έως και 30 μέρες από την παραγωγή του γιαουρτιού σε χαμηλές τιμές pH που φτάνουν το 4,0. Γενικότερα το βακτήριο παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από τα κολοβακτηριοειδή στο ξινόγαλα και το γιαούρτι (Farber & Peterkin, 1991). Η οξεοαντοχή της *L. monocytogenes* ενισχύεται μέσω του φαινομένου που είναι γνωστό ως Acid Tolerance Response (ATR). Κατά το φαινόμενο αυτό, η έκθεση του βακτηρίου σε ήπιες, μη θανατηφόρες για το ίδιο τιμές pH, επιφέρει ορισμένες μεταβολικές αλλαγές



που το καθιστούν ικανό να επιβιώνει όταν εκτεθεί σε ακραίες και θανατηφόρες τιμές pH (Smith et al., 2012).

### 6.5 Συμπεριφορά της *L. monocytogenes* στο νοπό γάλα

Η *L. monocytogenes*, ως ψυχρότροφο βακτήριο, όχι μόνο μπορεί να επιβιώσει στο νοπό αγελαδινό γάλα, αλλά μπορεί και να αναπτυχθεί κατά τη διάρκεια συντήρησής του υπό ψύξη. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί στο νοπό αγελαδινό γάλα που διατηρείται στους 4 °C, αλλά ο χρόνος προσαρμογής (lag phase) και ο ρυθμός ανάπτυξης κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης (exponential phase) ποικίλλει μεταξύ των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες αυτές (Brouillaud-Delattre et al., 1997; Farber et al., 1990; Giacometti et al., 2012b; Pitt et al., 1999)

Η μεταβλητότητα αυτή οφείλεται σε διαφορές συμπεριφοράς μεταξύ των στελεχών της *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκαν, της φυσιολογικής κατάστασης του ενοφθαλμισμού, διαφορών στη μεθοδολογία των πειραματισμών και των υποστρωμάτων που πραγματοποιήθηκε η μέτρηση, αλλά και τις ιδιότητες του νοπού γάλακτος (ιδιαίτερα η παρουσία και άλλων βακτηρίων).

Στις προαναφερθείσες μελέτες, η διάρκεια της φάσης προσαρμογής κυμάνθηκε από 3-7 ημέρες, εκτός από τη μελέτη των Pitt et al. (1999b) όπου αναφέρθηκε ανάπτυξη μετά τη δεύτερη ημέρα. Στην εργασία μάλιστα αυτή έγινε ενοφθαλμισμός καλλιέργειας που προέκυψε κατ' ευθείαν από την απόψυξη των συντηρημένων στελεχών χωρίς προηγουμένως να έχει αναζωογονηθεί και να χρησιμοποιηθεί φρέσκια και θα αναμενόταν επέκταση του χρόνου της φάσης προσαρμογής. Σε όλους τους πειραματισμούς στους 4 °C δεν παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού του παθογόνου μεγαλύτερη του 1 log<sub>10</sub> πριν τη παρέλευση πέντε ημερών. Σε πειράματα που μετρήθηκε η ανάπτυξη της λιστέριας έως 10 ημέρες, η ανάπτυξη ήταν μικρότερη των 2 log<sub>10</sub>. Σε μία όμως εργασία (Farber et al., 1990) στην οποία χρησιμοποιήθηκε γάλα από αγελάδα με μαστίτιδα, και η συγκέντρωση της λιστέριας ήταν περίπου 4 log<sub>10</sub> CFU/ml, σε τρεις πειραματισμούς η φάση προσαρμογής διήρκησε 3-5 ημέρες και ο χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού της λιστέριας (generation time) υπολογίστηκε στις 25,3 ώρες έναντι των 70 ωρών που υπολογίστηκε από τους Giacometti et al., (2012). Αυτό αποτελεί ένδειξη πως σε περίπτωση φυσικής μόλυνσης του γάλακτος με *L. monocytogenes* είναι πολύ πιθανό οι χρόνοι της φάσης προσαρμογής και εκθετικής ανάπτυξης, να είναι μικρότεροι. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην καλύτερη προσαρμογή του παθογόνου στο περιβάλλον του γάλακτος, ωστόσο όμως απαιτούνται περαιτέρω μελέτες προς επιβεβαίωση.

Οι προαναφερθέντες χρόνοι, αφορούν σε σταθερή θερμοκρασία συντήρησης 4 °C. Σε περίπτωση που υπάρξουν περίοδοι συντήρησης σε υψηλότερες θερμοκρασίες, υπολογίστηκε πως σε θερμοκρασία 7 °C ο πληθυσμός της λιστέριας παρουσίασε αύξηση

κατά  $1 \log_{10}$  μετά από πέντε ημέρες και  $2 \log_{10}$  μετά από 10 ημέρες αντίστοιχα, χωρίς όμως να διαπιστωθεί φάση προσαρμογής (Pitt et al., 1999b). Σε άλλη εργασία ανέφερθηκε αύξηση του παθογόνου κατά  $1 \log_{10}$  εντός επτά ημερών αλλά με εκτεταμένο χρόνο προσαρμογής, πιθανόν λόγω τραυματισμού των βακτηριακών κυττάρων (Northolt et al., 1988). Σε πειραματισμό που χρησιμοποιήθηκε φυσικά μολυσμένο με λιστέρια γάλα (Farber et al., 1990) ο πληθυσμός του παθογόνου αυξήθηκε κατά  $1,5 \log_{10}$  σε θερμοκρασία συντήρησης  $10^{\circ}\text{C}$  σε 10 ημέρες και μόλις σε δύο ημέρες σε θερμοκρασία  $15^{\circ}\text{C}$ . Ο αντίστοιχος μέσος χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού του παθογόνου ήταν 10,8 ώρες στους  $10^{\circ}\text{C}$  και 7,4 στους  $15^{\circ}\text{C}$ .

### **6.6 Επιβίωση και δυνατότητα ανάπτυξης των *Listeria* spp. και *L. monocytogenes* στα γαλακτοκομικά προϊόντα κατά την παραγωγή και συντήρησή τους**

Τα είδη του γένους *Listeria* και ιδιαίτερα το πλέον παθογόνο είδος η *L. monocytogenes* είναι παρόντα σε μια μεγάλη ποικιλία οικοτόπων (π.χ. έδαφος, νερό, απόβλητα, βλάστηση, ενσιρώματα, κόπρανα υγιών ανθρώπων και ζώων, κλπ) (Ivanek et al., 2006). Ως σημαντικές πηγές μόλυνσης των ζώων θεωρούνται τα αποσυντιθέμενα φυτά και τα ενσιρώματα. Τα παραγωγικά ζώα δεν θεωρείται ότι αποτελούν την κύρια δεξαμενή μόλυνσης της *L. monocytogenes* αν και τα μολυσμένα ζώα μπορεί να ασθενήσουν και να διασπείρουν το βακτήριο στο περιβάλλον της κτηνοτροφικής μονάδας (Nightingale et al., 2004).

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων, η κατανάλωση τροφίμων μολυσμένων με λιστέρια αποτελεί την κύρια οδό μόλυνσης του ανθρώπου (EFSA, 2018).

Η λιστέρια έχει απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα εκ των οποίων τα συχνότερα εμπλεκόμενα σε λοιμώξεις είναι το νωπό γάλα και τα μαλακά τυριά, ειδικότερα σε μαλακά τυριά με επιφανειακή ανάπτυξη λευκών μυκήτων (π.χ. Camembert και Brie) (Lundén et al., 2004; Fretz et al., 2010). Γενικά με βάση τα ιδιαίτερα ενδογενή χαρακτηριστικά καθενός εκ των γαλακτοκομικών προϊόντων (pH, αδιάστατο γαλακτικό οξύ, aw, περιεκτικότητα σε NaCl κλπ), όχι όλα από αυτά μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των λιστεριών σε υψηλούς πληθυσμούς (Argyani et al., 2016). Τα μαλακά τυριά διαθέτουν ασθενέστερα εμπόδια για τη μικροβιακή ανάπτυξη σε σύγκριση με τα σκληρά τυριά, εμφανίζουν μεγαλύτερη συχνότητα βακτηριακής μόλυνσης και υποστηρίζουν την επιβίωση και ανάπτυξη της *L. monocytogenes* (Lobacz et al., 2013). Επιπλέον τα μαλακά τυριά έχουν ενοχοποιηθεί για τα περισσότερα θανατηφόρα κρούσματα λιστερίωσης (Fretz et al., 2010).

Στα τυριά αυτά, εξ αιτίας της κατανάλωσης του γαλακτικού οξέος από τους μύκητες, αυξάνεται το pH στην επιφάνεια τους με συνέπεια να ευνοείται η ανάπτυξη της

λιστέριας και σε περίπτωση μόλυνσης με το παθογόνο, αυτό να αναπτύσσεται κατά τη συντήρησή τους σε πληθυσμούς ικανούς να προκαλέσουν λοίμωξη. Ωστόσο, παρόλο που τα σχετιζόμενα περιστατικά λιστερίωσης προέρχονται από κατανάλωση ωμού γάλακτος, προϊόντων από ωμό γάλα και μαλακών τυριών, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις λοίμωξης από την κατανάλωση και άλλων μολυσμένων γαλακτοκομικών προϊόντων από παστεριωμένο γάλα εξ αιτίας μόλυνσής τους σε μεταγενέστερα της παστερίωσης στάδια (π.χ. συσκευασία) (Lundén et al., 2004; Bucanan et al., 2017).

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι λιστερίες έχουν απομονωθεί από διάφορα σημεία των εγκαταστάσεων επεξεργασίας γάλακτος, ιδιαίτερα από υγρά περιβάλλοντα και σημεία με στάσιμα νερά ή συμπυκνώματα υδρατμών (π.χ. αποχετεύσεις, δάπεδα, ψυκτικό εξοπλισμό, υπολείμματα τροφίμων κλπ) (Carpentier & Cerf, 2011), και μάλιστα με σχηματισμό βιομεμβρανών στις επιφάνειες (Valderama et al., 2013), καθώς και την πιθανότητα φορείας από τους εργαζόμενους (Bucanan et al., 2017; Davis et al., 2019) ιδιαίτερη σημασία έχουν τα μέτρα πρόληψης της μόλυνσης των τελικών προϊόντων με την αυστηρή εφαρμογή κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής και αποτελεσματικού προγράμματος εξυγίανσης των εγκαταστάσεων και του εξοπλισμού. Για τον περιορισμό και την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης με λιστέρια των εγκαταστάσεων επεξεργασίας γάλακτος και παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων, οι επιχειρήσεις υποχρεούνται να εφαρμόζουν διαδικασίες επιτήρησης και τεκμηρίωσης της υγιεινής των εγκαταστάσεων και του εξοπλισμού (Ε.Ε. Κανονισμός 2073/2005) μέσω τακτικών ελέγχων της επιφανειακής μόλυνσης του εξοπλισμού και της μόλυνσης των τελικών προϊόντων πριν τη διάθεση στην αγορά.

Για την πρόκληση τροφιμογενούς λοίμωξης, απαιτείται η κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου με σχετικά υψηλό πληθυσμό λιστεριών. Σύμφωνα με τους Farber et al. (1996) για τους υγιείς καταναλωτές κυμαίνεται από 10-100 εκατομμύρια CFU, ενώ για τις ευπαθείς ομάδες 0,1-10 εκατομμύρια CFU. Λόγω ενδογενών παραγόντων, τα ημίσκληρα και σκληρά τυριά ή όξινα γαλακτομικά όπως τα γιαούρτια, όλα τα γαλακτομικά δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη των λιστεριών στις απαιτούμενες συγκεντρώσεις (Argani et al., 2016). Επιπλέον διασταυρούμενη μόλυνση από το περιβάλλον επεξεργασίας είναι απίθανο να συμβεί σε τέτοιους πληθυσμούς. Επομένως η δυνατότητα υποστήριξης ή όχι της ανάπτυξης της λιστέριας από τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι κορυφαίας σημασίας. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει εκδόσει οδηγίες για τη διενέργεια πειραμάτων πρόκλησης ή προσομείωσης (Challenge tests) για τη διερεύνηση της ικανότητας ενός τροφίμου να υποστηρίξει ή όχι την ανάπτυξη της λιστέριας (Beaufort et al., 2014).

Προγνωστικά μοντέλα μπορεί να χρησιμοποιηθούν για προεκτίμηση μελετών προσομείωσης και την αξιολόγηση της δυνατότητας υποστήριξης και της έκτασης της ανάπτυξης της λιστέριας στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Για τον σκοπό αυτό είναι χρήσιμα και διαθέσιμα μοντέλα όπως τα “Combase” (Baranyi and Tamplin, 2004), “Sym’Previous” (Leporq et al., 2005) και “Pathogen Modelling Programme” (USDA, 2018)

## 7. Μοριακή ταυτοποίηση της *L. monocytogenes*

### 7.1 Ταχείες μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης

#### 7.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ταυτοποίηση και την ανίχνευση της *L. monocytogenes* χρησιμοποιούνται μοριακές μέθοδοι ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 1990. Λόγω της εξέλιξης της επιστήμης και της τεχνολογίας, η PCR έχει εξελιχθεί από μέθοδος ποιοτικής ανάλυσης και σε μέθοδο ποσοτικής ανάλυσης (Rantsiou et al., 2008).

Η PCR είναι μία μέθοδος η οποία επιτρέπει την *in vitro* ενζυματική ενίσχυση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου DNA που χρησιμεύει ως μήτρα. Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο ολιγονουκλεοτιδικά μόρια (εκκινητές) τα οποία αποτελούν τη βάση για τον πολλαπλασιασμό του DNA από την DNA πολυμεράση. Οι εκκινητές οριοθετούν την περιοχή που θα ενισχυθεί και τοποθετούνται στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας. Το δείγμα DNA, οι εκκινητές, μία DNA πολυμεράση, κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την βέλτιστη λειτουργία του ενζύμου και 4 τύποι δεοξυνουκλεοζιτών (dNTPs) προστίθενται σε έναν θερμικό κυκλοποιητή. Αρχικά, το μίγμα των αντιδραστηρίων θερμαίνεται στους 95 °C έτσι ώστε να μετουσιωθεί το DNA και να αποδιαταχθούν οι δύο αλυσίδες (στάδιο αποδιάταξης). Στη συνέχεια, οι εκκινητές προσδένονται βάσει συμπληρωματικότητας στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας της αλληλουχίας στόχου (στάδιο υβριδοποίησης). Η θερμοκρασία στο στάδιο αυτό ποικίλει και εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης των δύο εκκινητών. Γενικά ρυθμίζεται 5 °C χαμηλότερα από το σημείο τήξης των εκκινητών και εφαρμόζεται για 30-60 δευτερόλεπτα.

Ο πολυμερισμός του DNA πραγματοποιείται στους 72°C για 2 λεπτά (στάδιο επέκτασης). Η DNA πολυμεράση προσδένεται στους εκκινητές και επιμηκύνει την συμπληρωματική αλυσίδα της οριοθετημένης περιοχής της μήτρας προσθέτοντας σταδιακά νουκλεοτίδια. Για κάθε κύκλο της αντίδρασης η αλληλουχία στόχος διπλασιάζεται και έτσι έπειτα από 2-3 ώρες και 30-40 κύκλους μίας αντίδρασης ο αριθμός των μορίων του DNA στόχου ξεπερνά τα 10<sup>6</sup> αντίγραφα (Saiki et al., 1988).

Τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και υφίστανται χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Τα μόρια του βρωμιούχου αιθιδίου φθορίζουν κατά την έκθεση τους στην υπεριώδη ακτινοβολία, επιτρέποντας την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης. Η παρουσία της *L. monocytogenes* προσδιορίζεται με την ύπαρξη ζώνης που να αντιστοιχεί στην αλληλουχία στόχο του γονιδίου του παθογόνου (Churchill et al., 2006).

Η ακρίβεια της μεθόδου στην ταυτοποίηση της *L. monocytogenes* εξαρτάται από την επιλογή της κατάλληλης αλληλουχίας-στόχου του DNA του παθογόνου (Chen et al., 2017). Τα γονίδια, οι αλληλουχίες των οποίων λειτουργούν ως αλληλουχίες στόχοι, σχετίζονται με την λοιμογονικότητα του παθογόνου. Στα γονίδια αυτά περιλαμβάνονται το *hlyA* το οποίο κωδικοποιεί την λυστεριολυσίνη O (LLO), το *prfA* το οποίο είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής για την έκφραση πολλών γονιδίων λοιμογονικότητας, το *iap* το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη διείσδυση του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή, το *inlAB* το οποίο κωδικοποιεί τις ιντερναλίνες A και B, το *plcB* το οποίο κωδικοποιεί τη φωσφολιπάση C, το *actA* το οποίο κωδικοποιεί την ακτίνη και το γονίδιο *mpl* το οποίο κωδικοποιεί μία μεταλλοπρωτεάση (Mansouri-Najand et al., 2015).

**Πίνακας 3:** Αλληλουχίες εκκινητών γονιδίου-στόχου και μέγεθος προϊόντος PCR για την μοριακή ταυτοποίηση της *L. monocytogenes* (D'agostino et al., 2004)

Γονίδια	Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος PCR
<i>prfA</i>	LIP 1	5'-GATACAGAAACATCGGTTGGC-3'	274 bp
	LIP 2	5'-GTGTAATCTTGATGCCATCAGG-3'	

Η συμβατική μέθοδος PCR μπορεί να ταυτοποιήσει το παθογόνο χωρίς όμως να μπορεί να ποσοτικοποιήσει το επίπεδο της βακτηριακής μόλυνσης. Για την μεγαλύτερη ακρίβεια της μεθόδου, την ταχύτερη ταυτοποίηση της *L. monocytogenes* στο δείγμα αλλά και τον διαχωρισμό των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα αναπτύχθηκαν παραλλαγές της κλασικής μεθόδου PCR (Chen et al., 2017).

### 7.1.2 PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου ή ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου qrt-PCR (quantitative real time PCR) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Higuchi και τους συνεργάτες του το 1993 (Valasek & Reza, 2005). Είναι δημοφιλής μέθοδος καθώς παρέχει υψηλή ακρίβεια μέσω του ταυτόχρονου εντοπισμού και υπολογισμού των προϊόντων της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, ενώ ακόμα αυτά συντίθενται. Πρόκειται για μία τροποποιημένη εκδοχή της συμβατικής μεθόδου PCR κατά την οποία η ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος πραγματοποιούνται ταυτόχρονα στον ίδιο σωλήνα. Επιπλέον, τα στάδια της αποδιάταξης, της υβριδοποίησης και της

επέκτασης των αλυσίδων του DNA παρατηρούνται έπειτα από κάθε κύκλο σε πραγματικό χρόνο με τη βοήθεια φθορίζουσών χρωστικών ουσιών. Όση μεγαλύτερη ποσότητα δίκλωνου DNA υπάρχει στην αντίδραση, τόσο περισσότερο DNA συνδέεται με την φθορίζουσα χρωστική με αποτέλεσμα το φθορίζον σήμα να είναι εντονότερο. Η χρωστική που χρησιμοποιείται είναι η SYBR Green η οποία όταν προσδένεται στο δίκλωνο DNA έχει εντονότερο φάσμα εκπομπής (Churchill et al., 2006).

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του πληθυσμού της *L. monocytogenes* από κλινικά δείγματα και δείγματα τροφίμων λόγω της υψηλής ευαισθησίας της που φτάνει τα 1-10 κύτταρα ανά αντίδραση (Chen et al., 2017). Λόγω της qrt-PCR η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης τείνει να εξαλειφθεί (Churchill et al., 2006).

### 7.1.3 Πολλαπλή PCR (multiplex PCR)

Η μέθοδος της πολλαπλής PCR, αναπύχθηκε για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί που θέτει η qrt-PCR. Η qrt-PCR εντοπίζει μία αλληλουχία στόχο, συχνά κάτω από ορισμένους περιορισμούς όπως είναι το υψηλό κόστος της μεθόδου και η μικρή ισχύς του δείγματος.

Με την πολλαπλή PCR, ενισχύονται ταυτόχρονα περισσότερες από μία αλληλουχίες στόχοι σε ένα δείγμα και χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερα ζεύγη εκκινητών ειδικά όταν πρόκειται για διαφορετικές αλληλουχίες στόχους. Για την πραγματοποίηση μίας αξιόπιστης και επιτυχημένης μεθόδου πολλαπλής PCR απαιτείται η προσεκτική σχεδίαση των εκκινητών ώστε να έχουν παρόμοια σημεία τήξης.

Αυτή η ταυτόχρονη ενίσχυση διαφορετικών αλληλουχιών στόχων βρίσκει εφαρμογή στον εντοπισμό διαφορετικών παθογόνων στελεχών σε ένα δείγμα. Παραλλαγή της πολλαπλής PCR είναι η μέθοδος της ποσοτικής ανταγωνιστικής PCR η οποία χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό DNA ή RNA αλληλουχιών-στόχων (Chen et al., 2017).

#### 7.1.3.1 Οροτύπιση της *L. monocytogenes* με πολλαπλή PCR

Η multiplex PCR εφαρμόστηκε για τον διαχωρισμό των 4 βασικών οροτύπων της *L. monocytogenes* σε διακριτές ομάδες από δείγματα τροφίμων και κλινικά δείγματα. Η οροτύπιση είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την μικροβιολογική

επιτήρηση της λιστερίωσης. Από τους 13 ορότυπους του παθογόνου που έχουν περιγραφεί, τουλάχιστον το 95% των στελεχών που απομονώνονται από κλινικά δείγματα και δείγματα τροφίμων ανήκουν στους ορότυπους 1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b (Doumith et al., 2004)

Βάσει της ποικίλης φορείας γονιδίων οι ορότυποι της *L. monocytogenes* ταξινομήθηκαν σε 3 βασικές κατηγορίες τις I, II και III, οι οποίες στην συνέχεια υποδιαιρέθηκαν σε οροτυπικές ομάδες με κοινά φυλογενετικά χαρακτηριστικά. Οι ορότυποι της *L. monocytogenes* έχουν ταξινομηθεί βάσει των φυλογενετικών χαρακτηριστικών τους σε 4 κύριες ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τους ορότυπους 1/2a-3a, η δεύτερη περιλαμβάνει τους ορότυπους 1/2c-3c, η τρίτη περιλαμβάνει τους ορότυπους 1/2b, 3b, 7 και η τέταρτη περιλαμβάνει τους ορότυπους 4b, 4d, 4e. Υπάρχει και μία πέμπτη ομάδα η οποία περιλαμβάνει τους ορότυπους 4a-4c ο οποίοι όμως είναι λιγότερο συνήθεις (Doumith et al., 2004).

Για το διαχωρισμό των 4 κύριων οροτύπων (1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b) του παθογόνου σε 4 ξεχωριστές ομάδες, επιλέγονται αλληλουχίες στόχοι από ένα γονίδιο της κάθε ομάδας. Για την ανίχνευση των γονιδίων *lmo0737*, *lmo1118*, ORF2819, ORF2110 και *prs* χρησιμοποιούνται 5 ζεύγη εκκινητών. Οι ορότυποι 1/2a και 3a της πρώτης ομάδας φέρουν το γονίδιο *lmo0737* και ενισχύεται επιλεγμένη αλληλουχία του συγκεκριμένου γονιδίου. Οι ορότυποι 1/2c και 3c της δεύτερης ομάδας φέρουν ταυτόχρονα τα γονίδια *lmo0737* και *lmo1118* και ενισχύονται επιλεγμένες αλληλουχίες των συγκεκριμένων γονιδίων. Οι ορότυποι 1/2b, 3b και 7 της τρίτης ομάδας φέρουν το γονίδιο ORF2819 και ενισχύεται η επιλεγμένη αλληλουχία του συγκεκριμένου γονιδίου. Οι ορότυποι 4b, 4d και 4e φέρουν ταυτόχρονα τα γονίδια ORF2819 και ORF2110 και ενισχύονται επιλεγμένες αλληλουχίες των συγκεκριμένων γονιδίων. Σε όλους τους ορότυπους ενισχύεται η αλληλουχία του γονιδίου *prs* (Doumith et al., 2004).

### 7.1.3.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της PCR

Η PCR είναι μία απλή μέθοδος τόσο στην κατανόηση όσο και στην εφαρμογή της. Πρόκειται για μία ταχεία μέθοδο με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία. Επιπλέον με την ανάπτυξη της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου τα δεδομένα ποσοτικοποιούνται ενώ με την εφαρμογή της πολλαπλής PCR εντοπίζονται ταυτόχρονα διαφορετικά γονίδια από το ίδιο δείγμα στην ίδια αντίδραση (Bologna et al., 2008).

Λόγω της υψηλής ευαισθησίας της μεθόδου ακόμα και ελάχιστη επιμόλυνση του δείγματος επιδρά άμεσα στην ακρίβεια των τελικών αποτελεσμάτων, οδηγώντας σε παραπλανητικά αποτελέσματα. Επιπλέον για την σχεδίαση των εκκινητών απαιτείται η ύπαρξη μίας ήδη γνωστής αλληλουχίας. Έτσι η μέθοδος PCR ταυτοποιεί ήδη γνωστά γονίδια ή παθογόνους μικροοργανισμούς. Ένας ακόμα περιορισμός είναι πως η DNA

πολυμεράση μπορεί να προσθέσει λάθος νουκλεοτίδια στην αλληλουχία επειδή εκκινητές μπορεί να προσδεθούν σε αλληλουχία παρόμοια με την αλληλουχία στόχο και όχι στην πραγματική (Bologna et al., 2008)

#### **7.1.4 Μικροσυστοιχίες DNA (DNA Microarrays)**

Οι μικροσυστοιχίες DNA αποτελούνται από διάφορους DNA ανιχνευτές (probes), οι οποίοι είναι τοποθετημένοι σε ένα στερεό υπόστρωμα, όπως το γυαλί. Κάθε DNA ανιχνευτής είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο συμπληρωματικό σε μια αλληλουχία-στόχο του DNA το οποίο έχει επισήμανση φθορισμού. Τα αντιγραφόμενα τμήματα DNA συνδέονται μόνο με ανιχνευτές με συμπληρωματική αλληλουχία (Churchill et al., 2006). Για τον μοριακό εντοπισμό των ειδών του γένους *Listeria* με την μέθοδο των μικροσυστοιχιών, εφαρμόζεται αρχικά PCR η οποία με τη βοήθεια των κατάλληλων εκκινητών αντιγράφει όλα τα 16S rRNA γονίδια που υπάρχουν στο δείγμα. Στους ανιχνευτές συνδέονται τα αντιγραφόμενα τμήματα DNA που έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες με αυτούς και στο σημείο σύνδεσης εμφανίζεται φθορισμός. Με τον τρόπο αυτό εντοπίζονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί στη μικροσυστοιχία (Churchill et al., 2006).

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών επιτρέπει τον δυνητικά άμεσο προσδιορισμό του πλήρους γενετικού προφίλ ενός μικροοργανισμού αποτελώντας έτσι σημαντική μέθοδο για την διαλογή και την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών (Volokhov et al, 2002).

#### **7.1.5 Αλληλουχοεξαρτώμενη ενίσχυση νουκλεϊκού οξέος (NASBA)**

Με τη μέθοδο NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) για τη μοριακή ταυτοποίηση του παθογόνου, εκχυλίζεται το ολικό RNA του δείγματος. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται το μεταφορικό RNA σαν στόχος επειδή προβλέπει την βιωσιμότητα των κυττάρων καλύτερα από το ριβοσωμικό ή το ολικό RNA. Χρησιμοποιούνται τα ένζυμα, Rnase H, T7 RNA-πολυμεράση και αντίστροφη μεταγραφή καθώς και δύο εκκινητές, ειδικοί για την αλληλουχία-στόχο. Έτσι δεν κρίνεται αναγκαία η εφαρμογή της PCR. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ζωντανών κυττάρων της *L. monocytogenes* ακόμα και όταν η αλληλουχία-στόχος είναι σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (10 CFU/gr) (Churchill et al., 2006).

## **7.2 Μοριακές μέθοδοι για την τυποποίηση της *L. monocytogenes***



Η τυποποίηση των μικροοργανισμών στοχεύει στον χαρακτηρισμό των στελεχών τους καθώς και στον εντοπισμό συστάδων (clusters) των μικροοργανισμών συμβάλλοντας στον προσδιορισμό της γενετικής και της επιδημιολογικής συγγένειας μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν και στον εντοπισμό της πιθανής πηγής της μόλυνσης (Mouya et al., 2017). Η συμβατική οροτύπωση της *L. monocytogenes*, επιτρέπει την ταξινόμηση του μικροοργανισμού σε 12 ορότυπους, εκ των οποίων οι 4b, 1/2a και 1/2b ευθύνονται για το 96% των περιπτώσεων ανθρώπινης λιστερίωσης. Η χαμηλή αναπαραγωγιμότητα, η ανταλλαγή αντιγόνων μεταξύ των οροτύπων και η μειωμένη διακριτική ισχύς εμποδίζουν την εφαρμογή της οροτύπωσης ως μέθοδο έρευνας στα επιδημικά κρούσματα καθώς η έρευνα απαιτεί ακριβέστερες μεθόδους τυποποίησης (Liu, 2006).

### **7.2.1 Ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE)**

Η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) είναι μία μοριακή γενετική μέθοδος τυποποίησης της *L. monocytogenes*. Εφαρμόζεται ευρέως παγκοσμίως, είναι απαραίτητη στην έρευνα των επιδημικών κρουσμάτων (Mouya et al., 2017) και επιτρέπει το διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA (10-2000kb) (Churchill et al., 2006). Για να εφαρμοστεί η συγκεκριμένη μέθοδος, το βακτηριακό γονιδίωμα διαιρείται σε θραύσματα μικρότερου μεγέθους με τη χρήση ενζύμων που ονομάζονται περιοριστικές ενδοκουκλεάσες. Στην περίπτωση της *L. monocytogenes* τα ένζυμα που διαιρούν το γονιδίωμα του βακτηρίου είναι τα *AscIa* και *ApaI*. Τα θραύσματα αυτά τοποθετούνται στην πηκτή αгарόζης και λόγω της κινητικότητας που αποκτούν μέσω της εφαρμογής του εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου διαχωρίζονται (PulseNet USA, 2009).

Στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PFGE συμβάλλει σημαντικά το Pulse Net. Πρόκειται για μία βάση δεδομένων η οποία παρέχει πρωτόκολλα της μεθόδου για διάφορα τροφιμογενή παθογόνα στα οποία περιλαμβάνεται και η *L. monocytogenes*. Η σημασία της PFGE στην επιτήρηση της λιστερίωσης αυξάνεται με την διάδοση του Pulse Net παγκοσμίως (Fugget et al., 2007).

### **7.2.2 Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)**

Ο πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) στοχεύει στον εντοπισμό αλλοιώσεων του γενετικού υλικού των

υπό μελέτη μικροοργανισμών. Βασίζεται στην πέψη του βακτηριακού DNA με περιοριστικά ένζυμα και τη δημιουργία γονιδιακών θραυσμάτων διαφορετικού μήκους (Liu, 2006). Η μέθοδος RFLP χρησιμοποιήθηκε το 1997 από τον Wiedmann και τους συνεργάτες του, για τα γονίδια *hlyA*, *actA* και *inlA* της *L. monocytogenes* με σκοπό την διάκριση των βακτηριακών στελεχών που παρουσιάζουν παθογόνο δράση (Wiedmann et al., 1997). Τα θραύσματα του DNA τοποθετούνται σε πηκτή αгарόζης, όπου διαχωρίζονται ανάλογα με το μήκος τους. Η μέθοδος δεν απαιτεί μεγάλο αριθμό αντιγράφων για να εφαρμοστεί. Ωστόσο, έχει μικρή διακριτική ικανότητα και θα πρέπει να εφαρμόζεται συνδυαστικά με άλλες μεθόδους τυποποίησης (Liu, 2006).

### 7.2.3 Πολυμορφισμός ενισχυμένου μήκους θραύσματος (AFLP)

Ο πολυμορφισμός ενισχυμένου μήκους θραύσματος AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) βασίζεται στον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA χρησιμοποιώντας συνδυασμό πέψης του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και PCR. Το γονιδιωματικό DNA πέπτεται με δύο περιοριστικά ένζυμα με στόχο τη δημιουργία πολυάριθμων θραυσμάτων.

Οι εκκινητές που έχουν σχεδιαστεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε να είναι συμπληρωματικοί μόνο σε ένα υποσύνολο θραυσμάτων, προσδένονται σε αυτά και ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός τους με PCR. Με την μέθοδο αυτή ελέγχεται ολόκληρο το γονιδίωμα για γενετικό πολυμορφισμό χωρίς να χρειάζονται προηγούμενες πληροφορίες για την αλληλουχία στόχο (Keto-Timonen et al., 2003). Πρόκειται για μία μέθοδο τυποποίησης με μεγάλη αναπαραγωγικότητα και ιδιαίτερα αποτελεσματική για την τυποποίηση της *L. monocytogenes*. Είναι κατάλληλη για τον έλεγχο κυρίως μεγάλου αριθμού θραυσμάτων, επιτρέποντας την δημιουργία μίας βάσης δεδομένων με διαφορετικά πρότυπα της μεθόδου (Keto-Timonen et al., 2007).

### 7.2.4 Τυχαία ενίσχυση του πολυμορφικού DNA (RAPD)

Η μέθοδος RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) στηρίζεται στην μέθοδο PCR. Βασίζεται στον πολλαπλασιασμό αλληλουχιών της *L. monocytogenes* με χρήση τυχαίου εκκινητή ο οποίος δεν στοχεύει σε κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία βακτηριακού DNA. Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή στην ανίχνευση της προέλευσης της μόλυνσης στις μονάδες επεξεργασίας τροφίμων. Είναι ταχύτερη από άλλες μεθόδους τυποποίησης ιδιαίτερα όταν πρόκειται για μικρό αριθμό στελεχών. Παρουσιάζει όμως χαμηλότερη αναπαραγωγικότητα και έχει υψηλότερο κόστος (Jamshidi & Zeinali, 2019).

### 7.3 Επιτήρηση της λιστερίωσης με αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS)

Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος WGS (Whole Genome Sequencing) είναι μία μέθοδος η οποία προσδιορίζει την πλήρη αλληλουχία βάσεων ολόκληρου του γονιδιώματος ενός μικροοργανισμού. Η μέθοδος αυτή, λόγω της ικανότητάς της να διαχωρίζει τα στελέχη κάθε μικροοργανισμού με μεγάλη ακρίβεια χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο για την επιτήρηση των μικροοργανισμών και την άμεση διερεύνηση των επιδημικών κρουσμάτων των νόσων (Portman et al., 2018).

Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος ενός και μόνο στελέχους παρέχει πληθώρα πληροφοριών οι οποίες συμβάλλουν στην ταυτοποίηση του μικροοργανισμού, την επιδημιολογία του, την παθογένεια και την αντοχή του σε διάφορα φάρμακα. Η μέθοδος αυτή βοηθά στον έλεγχο και τον άμεσο εντοπισμό επιδημικών κρουσμάτων της λιστερίωσης σε πολλές χώρες. Καθώς το γάλα προσφέρεται ως τρόφιμο για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, ο ρόλος της μεθόδου WGS είναι καθοριστικός στον προσδιορισμό των επιδημιολογικών χαρακτηριστικών του γονιδιώματος τροφιμογενών βακτηρίων που συνδέονται με την κατανάλωση γάλακτος (Fouski et al., 2020).

Οι μέθοδοι που υπόσχονται μεγαλύτερη ταχύτητα και αξιοπιστία αποτελεσμάτων είναι όσες βασίζονται στην ανάλυση της αλληλουχίας του DNA. Τέτοιες μέθοδοι τυποποίησης στελεχών είναι η αλληλουχία πολλαπλών γενετικών τύπων MLST (Multilocus Sequence Typing) και η αλληλουχία πολλαπλών μολυσματικών στελεχών MVLST (Multi-Virulence-Locus Sequence Typing). Για την ακριβέστερη τυποποίηση της *L.monocytogenes* αναπτύχθηκε η μέθοδος cgMLST (core genome MLST) (Ruppitsch et al., 2015). Πρόκειται για μία μέθοδο με εξαιρετική αναπαραγωγικότητα η οποία επιτρέπει τη σύγκριση στελεχών μεταξύ των εργαστηρίων με τη χρήση τυποποιημένων ονοματολογιών (Moyra et al., 2015). Πολλές έρευνες σε διαφορετικά βακτήρια δείχνουν ότι η μέθοδος WGS μπορεί να συμβάλλει στην εύκολη επιτήρηση των επιδημικών κρουσμάτων και να παρέχει ακριβέστερη διάκριση μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών πολλών βακτηρίων και της *L. monocytogenes* (Ruppitsch et al., 2015).

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Απομόνωση και ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Listeria* και της *L. monocytogenes*

#### 1.1 Απομόνωση των *Listeria* spp.

Κατά τη χρονική διάρκεια του Ιουνίου και του Ιουλίου του 2019, συλλέχθηκαν άσηπτα 138 δείγματα αγελαδινού γάλακτος από τις δεξαμενές συντήρησης του γάλακτος ισάριθμων κτηνοτροφικών μονάδων της Βόρειας Ελλάδας. Η αρχική απομόνωση και ταυτοποίηση της *L. monocytogenes* έγινε σύμφωνα με την ISO 11290-1 (ISO:2004) και η επιβεβαίωση με PCR. Τα δείγματα του νοπού αγελαδινού γάλακτος λαμβάνονταν από τις δεξαμενές συλλογής του (παγολεκάνες) μετά από προηγούμενη ανάδευσή για τουλάχιστον 5 λεπτά και κατόπιν λαμβάνονταν 100 ml γάλακτος με τη χρήση αποστειρωμένων πλαστικών περιεκτών κάτω από άσηπτες συνθήκες.

Τα δείγματα μεταφέρονταν σε ισοθερμικά δοχεία με παγοκύστες εντός 2-3 ωρών στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων του Τμήματος Κτηνιατρικής του ΑΠΘ. Αμέσως μετά την άφιξή τους, μεταφέρονταν ποσότητα 25 ml από το καθένα σε σάκους stomacher που περιείχαν 225 ml Half Fraser Broth (Biolife, Italy). Ακολουθούσε ομογενοποίηση σε συσκευή stomacher (Lab Blender 400, A. J. Seward and Co. Ltd., London, UK) επί 2 min, και κατόπιν μεταφέρονταν για επώαση σε κλίβανο θερμοκρασίας 30 °C επί 24 ώρες (πρώτη εμπλουτιστική φάση). Παράλληλα, γινόταν και απ' ευθείας σπορά με επιφανειακή εξάπλωση 0,2 ml γάλακτος από κάθε δείγμα σε τριβλία με το εκλεκτικό υπόστρωμα Agar *Listeria* Ottavani & Agosti (ALOA, LabM, Lancashire, UK) και επώαση τους σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C επί 24 ώρες.

Μετά την επώαση, από κάθε σάκο stomacher, μεταφέρονταν ποσότητα 1 ml σε φιαλίδια με 9 ml Full Fraser Broth (biolife, Italy) και ακολουθούσε επώαση στους 30 °C επί 24 ώρες (δεύτερη εμπλουτιστική φάση). Μετά την ολοκλήρωση της δεύτερης εμπλουτιστικής φάσης ακολουθούσε επιφανειακή σπορά 0,1 ml από κάθε φιαλίδιο με ζωμό Full Fraser σε τριβλία με ALOA και ακολουθούσε επώασή τους στους 37 °C επί 24 ώρες.

Από τα τριβλία με ALOA που εμφάνιζαν την ανάπτυξη χαρακτηριστικών για τις λιστέρειες αποικιών, τόσο στη φάση της απ'ευθείας σποράς πριν τον εμπλουτισμό όσο και από την φάση σποράς μετά τον δεύτερο εμπλουτισμό, μεταφέρονταν 2-3 αποικίες σε TSYE άγαρ και επώάζονταν στους 37 °C επί 24 ώρες. Μετά την επώαση ακολουθούσε με τη χρήση αποστειρωμένων κρίκων μεταφορά των ύποπτων αποικιών σε κρυοφιαλίδια (cryobanks) με ζωμό TSYE που περιείχε γλυκερόλη 20%. Τα κρυοφιαλίδια αυτά, αποθηκεύονταν σε βαθειά κατάψυξη (-80 °C) μέχρι να ακολουθήσουν οι εξετάσεις για

την ταυτοποίηση του είδους, την ανίχνευση γονιδίων λοιμογονικότητας, τον προσδιορισμό των ορότυπων και την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων.

## **1.2 Ταυτοποίηση των *Listeria* spp. και προσδιορισμός ορότυπων της *L. monocytogenes***

Για την ταυτοποίηση του είδους των απομονωθέντων στελεχών γινόταν αναζωογόνηση των στελεχών που συντηρούνταν στους -80 °C σε ζωμό TSYE και επώαση στους 37 °C επί 24 ώρες και ακολουθούσαν για την ταυτοποίηση του είδους οι εξής εξετάσεις: δοκιμή καταλάσης, δοκιμή κινητικότητας στους 25 °C και δοκιμές ζύμωσης των σακχάρων ξυλόζης, ραμνόζης και μαννιτόλης. (Πίνακας 4)

Οι δοκιμές ζύμωσης των σακχάρων γινόταν σε σωλήνες οι οποίοι περιείχαν 5 ml ζωμό Phenol-red Broth Base (Millipore Merck) με την προσθήκη δισκίων των υπό εξέταση σακχάρων (Rosco, DK) ως ακολούθως: από τους ζωμούς TSYE με τα αναζωογονημένα ύποπτα στελέχη, μεταφέρονταν άσηπτα με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας ποσότητα 0,1ml και ακολουθούσε επώαση σε θερμοκρασία 36±1 °C επί 24-48 ώρες. Η ανάγνωση γινόταν μετά την 18<sup>η</sup> ώρα και κάθε 12 ώρες, για την διαπίστωση της αλλαγής ή όχι του χρώματος του ζωμού από κόκκινο σε κίτρινο, ως αποτέλεσμα της ζύμωσης.

Από τις εξετάσεις των ύποπτων στελεχών ένα στέλεχος από κάθε ύποπτο δείγμα που πληρούσε τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά κάποιου είδους του γένους *Listeria*, υποβαλλόταν σε μοριακή εξέταση για επιβεβαίωση του είδους. Σε περίπτωση που ήταν *L. monocytogenes*, ακολουθούσε και ο μοριακός προσδιορισμός της οροτυπικής ομάδας στην οποία ανήκε.

**Πίνακας 4:** Εξετασθέντα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ταυτοποίησης των ειδών του γένους *Listeria*

Εξετάσεις	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
Αιμόλυση	+ -	+ -	+ -	+ -	=	=
Καταλάση	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
Οξειδάση	=	=	=	=	=	=
Κινητικότητα	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
Ζυμώσεις σακχαρώδων υδρατμών	Ραμνόζη	+ -	+/-	=	=	+/-
	Μαννιτόλη	=	=	=	=	+ -
	Ξυλόζη	=	=	+ -	+ -	+ -

### 1.3 Προσδιορισμός των οροτύπων των στελεχών της *L. monocytogenes*

Τα στελέχη που βάσει της φαινοτυπικής εξέτασης θεωρούνταν *L. monocytogenes*, ανακαλλιεργούνταν σε ALOA άγαρ με επώαση στους 37 °C για 24h. Μετά την επώασή τους, για τη εκχύλιση του DNA, τα βακτηριακά κύτταρα επαναιωρούνταν σε μικροσωληνάρια τα οποία περιείχαν 100 μl milli Q water και στη συνέχεια θερμαίνονταν στους 90 °C για 10 min. Ακολούθως, τα μικροσωληνάρια φυγοκεντρώνονταν στις 13000 στροφές για 5 min, συλλεγόταν το υπερκείμενο υγρό και αποθηκεύονταν στους -80 °C.

Η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός των οροτύπων των στελεχών της *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή μίας πολλαπλής PCR (multiplex PCR, mPCR) που ανιχνεύει ταυτόχρονα την παρουσία των ειδικών για τους ορότυπους γονιδίων *lmo0737*, *lmo1118*, ORF2819 και ORF2110 καθώς και του γονιδίου *prs* το οποίο είναι ειδικό για την ταυτοποίηση του γένους *Listeria* (Doumith et al., 2004).

Με τη μέθοδο αυτή, τα στελέχη των *L. monocytogenes* κατανέμονται σε τέσσερις

οροτυπικές ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τους ορότυπους 1/2a και 3a (φορεία μόνο του γονιδίου *lmo0737*), η δεύτερη αποτελείται από τους ορότυπους 1/2c και 3c (ταυτόχρονη φορεία των γονιδίων *lmo0737* και *lmo1118*), η τρίτη αποτελείται από τους ορότυπους 1/2b, 3b και 7 (φορεία μόνο του γονιδίου ORF2819) και η τέταρτη από τους ορότυπους 4b, 4d και 4e (ταυτόχρονη φορεία των γονιδίων). Για την οροτύπηση χρησιμοποιήθηκε ένα σετ mPCR με τους εκκινητές για τη ανίχνευση των γονιδίων *lmo1118*, *lmo0737*, ORF2110, ORF2819 και *prs*. Οι αλληλουχίες αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5:** Αλληλουχίες εκκινητών DNA που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των οροτυπικών ομάδων της *L. monocytogenes*

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Προϊόν (bp)
<i>lmo0737</i>	AGGGCTTCAAGGACTTACCC <sup>α</sup> ACGATTTCTGCTTGCCATTC <sup>β</sup>	691
<i>lmo1118</i>	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA <sup>α</sup> CGGCTTGTTTCGGCATACTTA <sup>β</sup>	906
ORF2819	AGCAAAATGCCAAACTCGT <sup>α</sup> CATCACTAAAGCCTCCCATTG <sup>β</sup>	471
ORF2110	AGTGGACAATTGATTGGTGAA <sup>α</sup> CATCCATCCCTTACTTTGGAC <sup>β</sup>	597
<i>prs</i>	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG <sup>α</sup> CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG <sup>β</sup>	370

<sup>α</sup> Επέκταση εκκινητή προς τα εμπρός κατά τη σύνθεση cDNA.

<sup>β</sup> Επέκταση εκκινητή προς τα πίσω κατά τη σύνθεση cDNA.

Συνοπτικά η μέθοδος που εφαρμόστηκε είχε ως εξής:

Η mPCR διεξήχθη σε τελικό όγκο 25μl που περιείχε 10 ng DNA 2 U *Taq* DNA polymerase (Roche, Boehringer), ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3) και 0,2 mM τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (deoxynucleotide triphosphates, dNTP's, Perkin-Elmer). Οι συγκεντρώσεις των ζευγών των εκκινητών στο μείγμα της αντίδρασης ήταν 1 μM για τα γονίδια *lmo0737*, ORF2819 και ORF2110, 1,5 μM για το γονίδιο *lmo1118* και τέλος 0,2 μM για το γονίδιο *prs*.

Οι συνθήκες στο θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf, Germany) ήταν οι ακόλουθες: αρχική θερμοκρασία 94 °C για 3 min, 35 κύκλοι σε θερμοκρασίες 94 °C για 40 sec, 53

°C για 1,15 min και 72 °C για 1,5 min ακολουθούμενοι από την τελική σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72 °C για 7 min.

Για την PCR αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες ένα στέλεχος *L. monocytogenes* 1/2a που είχε προηγουμένως οροτυπηθεί στο Institute für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg (Giannati-Stefanou et al., 2006) και το στέλεχος *L. monocytogenes* NCTC 11994 (ορότυπος 4b). Μετά το τέλος της αντίδρασης, 5 μl των προϊόντων αναμιγνύονταν με 3 μl διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) και ακολουθούσε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2% w/v).

## **2. Έλεγχος φορέας των γονιδίων λοιμογονικότητας *inlA*, *inlB*, *inlC*, *plcA*, *prfA*, *hlyA* και *iap***

Όλα τα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *L. monocytogenes*, υποβλήθηκαν σε έλεγχο για τη φορεία οκτώ/επτά γονιδίων που σχετίζονται με τη λοιμογονικότητα: τα γονίδια *inlA* (ειδικό για την ταυτοποίηση του είδους), *inlB* και *inlC* (ιντερναλίνες), το *plcA* (φωσφολιπάση C της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης), το *prfA* (μεταγραφικό ενεργοποιητή πρωτεΐνης), το *actA* (ακτίνη), το *hlyA* (λιστεριολυσίνη O) και το *iap* (πρωτεΐνη που σχετίζεται με την διείσδυση του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή).

Η ανίχνευση των γονιδίων λοιμογονικότητας έγινε με mPCR, με δύο ομάδες εκκινητών που στόχευαν στην ανίχνευση τριών (*inlA*, *inlC*, *inlJ*) και πέντε (*plcA*, *prfA*, *actA*, *hlyA*, *iap*) γονιδίων (Πίνακες 6 και 7).

### **2.1 Ανίχνευση των γονιδίων *inlA*, *inlC* και *inlJ***

Η ανίχνευση των γονιδίων *inlA*, *inlC* και *inlJ* έγινε με mPCR σε τελικό όγκο 25 μl που περιείχε 10 ng DNA, ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3), 0,8 U πολυμεράση (Taq DNA polymerase, Invitrogen, Καλιφόρνια, Η.Π.Α) και 200 μM τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (deoxynucleotide triphosphates, dNTP's) (Invitrogen). Οι συγκεντρώσεις των ζευγών των εκκινητών στο μείγμα της αντίδρασης ήταν 40 pmol για το γονίδιο *inlA*, 30 pmol για το γονίδιο *inlC* και 20 pmol για το γονίδιο *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 και 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 αγαρόζης



(2% w/v) (Applichem, Darmstadt, Γερμανία) και η παρουσία των γονιδίων *inlA*, *inlC* και *inlJ* ανιχνευόταν με τον σχηματισμό των αναμενόμενων ζωνών της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της mPCR με μέγεθος 800, 517 και 238 bp, αντίστοιχα.

**Πίνακας 6:** Αλληλουχίες εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων μολυσματικότητας της *L. monocytogenes inlA*, *inlC* και *inlJ* (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	AATGCCACAGGACACAACC	107306–107325	517
		CGGGAATGCAATTTTTCACTA	107822–107802	
		TGTAACCCCGCTTACACAGTT	188989–189009	
<i>inlJ</i>	188153–190708	AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	189226–189207	238

## 2.2 Ανίχνευση των γονιδίων *plcA*, *actA*, *hlyA* και *iap*

Η τεχνική mPCR που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση της δεύτερης ομάδας γονιδίων λοιμογονικότητας (*plcA*, *actA*, *hlyA* και *iap*) ήταν αυτή που περιγράφεται από τους Rawool et al., (2007). Η mPCR διεξήχθη σε τελικό όγκο 25 μl που περιείχε 10 ng DNA, ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3), 1 U Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen) και 200 μM τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (Invitrogen) και όλα τα ζεύγη των εκκινητών (0,1 μM).

Οι συνθήκες στο θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf, Germany) ήταν οι ακόλουθες: αρχική θερμοκρασία 95 °C για 2 min και 35 κύκλοι σε θερμοκρασίες 95 °C για 15 sec, 60 °C για 30 sec, 72 °C για 90 sec ακολουθούμενοι από τελική σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72 °C για 10 min.

Μετά το τέλος της PCR, ακολουθούσε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1,5% w/v). 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). Η παρουσία των γονιδίων *plcA*, *actA*, *hlyA* και *iap* ανιχνευόταν με τον σχηματισμό των αναμενόμενων ζωνών της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της mPCR με μέγεθος 1484, 839, 456 και 131 bp, αντίστοιχα.

**Πίνακας 7:** Αλληλουχίες εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων μολυσματικότητας της *L. monocytogenes* *plcA*, *prfA*, *actA*, *hlyA* και *iap*

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

### 2.3 Εξέταση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων

Η ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων από τα απομονωθέντα στελέχη της *L. monocytogenes* εξετάστηκε με την εφαρμογή της ημι-ποσοτικής μέθοδου μικροτιτλοποίησης πλακών (microtiter plates) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Wang et al. (2010). Αρχικά προετοιμάζονταν 24ωρη καλλιέργεια των υπό εξέταση στελεχών, σε ζωμό Tryptone Soy broth (TSB, LAB M Limited) εμπλουτισμένου με 0,25% γλυκόζη, η οποία ακολούθως αραιώνονταν στον επιθυμητό βαθμό (περίπου 10<sup>8</sup> CFU/ml).

Ποσότητα 200 μl από τις αραιωμένες υγρές καλλιέργειες εμβολιάζονταν σε βοθρία (wells) μικροπλακών πολυστυρενίου (τέσσερα βοθρία ανά στέλεχος) με επίπεδο πυθμένα (96 well, cell culture plates, Costar, USA). Μετά από επώαση για 24 ώρες στους 37 °C, τα βοθρία ξεπλένονταν απαλά τρεις φορές με 200 μl αποστειρωμένου διαλύματος 0,9% NaCl. Ακολουθούσε η προσθήκη 100 μl διαλύματος 3% w/v κρυσταλλικού ιώδους σε κάθε βοθρίο. Μετά από 5 λεπτά, η μη δεσμευμένη ποσότητα του κρυσταλλικού ιώδους απομακρύνονταν με έκπλυση της πλάκας με νερό, η οποία επαναλαμβάνονταν τρεις φορές. Η πλάκα αφήνονταν στο περιβάλλον για να στεγνώσει, η δεσμευμένη στην βιομεμράνη ποσότητα του κρυσταλλικού ιώδους απελευθερώνονταν με την προσθήκη 100 μl διαλύματος 70% v/v αιθανόλης και ακολουθούσε ο έλεγχος της

παραγωγής βιοϋμενίου με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (OD) της πλάκας με αυτόματο φασματοφωτόμετρο, στα 570 nm (A570). Ως μάρτυρες χρησιμοποιούνταν βοθρία τα οποία επωάζονταν με όλα τα συστατικά εκτός από βακτήρια (αποστειρωμένος ζωμός TSB).

Τα αποτελέσματα ερμηνεύτηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια των Borges et al. (2012). Συγκεκριμένα, η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης των μαρτύρων ορίζονταν ως η οπτική απορρόφηση του cut-off (OD<sub>c</sub>) και με βάση την μέτρηση της οπτικής τους πυκνότητας (OD), η παραγωγή βιοϋμενίου από τα στελέχη της *L. monocytogenes* χαρακτηρίζονταν ως: μη παραγωγή (OD < OD<sub>c</sub>), ασθενής παραγωγή (OD<sub>c</sub> < OD ≤ 2 × OD<sub>c</sub>), μέτρια παραγωγή (2 × OD<sub>c</sub> < OD ≤ 4 × OD<sub>c</sub>), ισχυρή παραγωγή (4 × OD<sub>c</sub> < OD<sub>c</sub>).

### 3. Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν συνολικά 138 δείγματα γάλακτος από τις δεξαμενές συντήρησης του αγελαδινού γάλακτος ισάριθμων αγελαδοτροφικών εκμεταλλεύσεων, ως προς την παρουσία των *Listeria* spp. και της *L. monocytogenes*. Συνολικά, 5 δείγματα βρέθηκαν θετικά ως προς την παρουσία των *Listeria* spp. (3,62%) και όλα τα απομονωθέντα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *L. monocytogenes* (3,62%).

Η εφαρμογή της mPCR για την οροτύπωση των πέντε στελεχών της *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από τα πέντε διαφορετικά δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος έδειξε πως τα στελέχη ανήκουν στις οροτυπικές ομάδες IIa, IIc και IVa. Η ομάδα IIa, ήταν η επικρατέστερη μεταξύ των οροτυπικών ομάδων των στελεχών που απομονώθηκαν, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 8.

Σε ό,τι αφορά στην ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων των στελεχών της *L. monocytogenes* όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, οι ορότυποι που ανήκαν στην ομάδα IIa (1/2a ή 3a), εμφάνισαν μέτρια ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων, ενώ οι ορότυποι 1/2c ή 3c και 4a ή 4c που ανήκαν στις ομάδες IIc και IVa αντίστοιχα, παρουσίασαν ασθενή ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων.

Σε ό,τι αφορά την φορεία των γονιδίων λοιμογονικότητας, η παρουσία των γονιδίων *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *prfA*, *hlyA* και *iap* ανιχνεύθηκε και στα πέντε εξετασθέντα στελέχη. Αντίθετα το γονίδιο *actA*, ανιχνεύθηκε μόνο στα δείγματα K9, K11 και Σ18 τα οποία εμφάνισαν επίσης ασθενή ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων.

**Πίνακας 8:** Χαρακτηριστικά απομονωθέντων στελεχών της *L. monocytogenes* από νωπό αγελαδινό γάλα

Κωδικός δείγματος	Ορότυπος	Γονίδια λοιμογονικότητας	Ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων
I29	IIa	<i>inlA, inlC, inlJ, plcA, prfA, hlyA, iap</i>	Μέτρια
K3	IIa	<i>inlA, inlC, inlJ, plcA, prfA, hlyA, iap</i>	Μέτρια
K9	IIc	<i>inlA, inlC, inlJ, plcA, actA, prfA, hlyA, iap</i>	Ασθενής
K11	IIa	<i>inlA, inlC, inlJ, plcA, actA, prfA, hlyA, iap</i>	Ασθενής
Σ18	IVa	<i>inlA, inlC, inlJ, plcA, actA, prfA, hlyA, iap</i>	Ασθενής

#### 4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα απομόνωσης της *L. monocytogenes* στις δεξαμενές συντήρησης του αγελαδινού γάλακτος αγελαδοτροφικών μονάδων της Βόρειας Ελλάδας ήταν σχετικά χαμηλή (3,62%) ενώ δεν απομονώθηκε άλλο είδος του γένους *Listeria*. Το ποσοστό απομόνωσης αυτό, είναι σύμφωνο με εκείνα προγενέστερων εργασιών που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό της συχνότητας παρουσίας της *L. monocytogenes* στο νωπό αγελαδινό γάλα.

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 10, το αποτέλεσμα της συχνότητας απομόνωσης του παθογόνου στην παρούσα εργασία ήταν ανάλογο με τα ποσοστά εργασιών που πραγματοποιήθηκαν στις Η.Π.Α, την Ιταλία και την Τσεχία σύμφωνα με τις οποίες το παθογόνο απομονώθηκε από το νωπό αγελαδινό γάλα σε ποσοστό 3,4%, 3,7% και 3,2% αντίστοιχα (Oliver et al.,2009; Gelbícová & Karpísková, 2012a; Parisi et

al., 2013). Μηδενικό ποσοστό μόλυνσης του αγελαδινού γάλακτος με *L. monocytogenes* και *Listeria* spp. αναφέρθηκε σε εργασία που πραγματοποιήθηκε στη Λετονία (Konosonoka et al., 2012) σε 244 δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος από τέσσερις οργανικές φάρμες. Υψηλότερα ποσοστά από αυτό της παρούσας εργασίας, τα οποία κυμαίνονται μεταξύ 5%-13%, αναφέρθηκαν σε εργασίες από την Ινδία, το Ιράν, την Αλγερία, το Μαρόκο, τη Γκάνα, την Πορτογαλία, την Ισπανία και το Μεξικό (Carlos et al., 2001; Guerra et al., 2001; Vilar et al., 2007; Boubendir et al., 2011; El Marnissi et al., 2013; Karthikeyan et al., 2015; Mansouri et al., 2015; Owusu-Kwarteng et al., 2018). Υψηλότερη συχνότητα απομόνωσης του παθογόνου αναφέρθηκε επίσης στην Κολομβία, την Εσθονία και τις Η.Π.Α με ποσοστά μεταξύ 19,7%-28,6% (Vanegas et al., 2009; Kalmus et al., 2015; Rahn et al., 2016). Η συχνότητα απομόνωσης της *L. monocytogenes* ήταν χαμηλότερη σε δείγματα νωπού γάλακτος σε έρευνες από τη Βραζιλία, την Τουρκία, την Κίνα, τη Λετονία, τη Σουηδία και τη Νέα Ζηλανδία (Waak et al., 2002; Hill et al., 2012; Konosonoka et al., 2012; Ning et al., 2013; Cerva et al., 2014; Durmaz et al., 2015) ενώ ήταν μηδενική σε Βραζιλία και Η.Π.Α (D'Amico & Donnelly, 2010; Cerva et al., 2014).

Στην παρούσα εργασία δεν απομονώθηκε άλλο είδος του γένους *Listeria*. Το ποσοστό συνήθως απομόνωσης των *Listeria* spp. που αναφέρεται στις περισσότερες εργασίες είναι συνήθως μεγαλύτερο από αυτό της *L. monocytogenes*. Υψηλότερο ποσοστό αναφέρθηκε σε παρόμοια εργασία στο Μεξικό (Carlos et al., 2001) κατά την οποία το ποσοστό απομόνωσης της *L. monocytogenes* ήταν 13% (Πίνακας 9) έναντι 11% που ήταν το αντίστοιχο ποσοστό για όλα τα υπόλοιπα είδη (Πίνακας 10)

Ενώ στην παρούσα εργασία δεν απομονώθηκαν άλλο είδος λιστέριας, η απομόνωση της *L. ivanovii* σε άλλες εργασίες που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες χώρες, κυμάνθηκε από 0 έως 6%, της *L. innocua* από 0 έως 13,80%, της *L. welshimeri* από 0 έως 8%, της *L. seeligeri* από 0-4%, και της *L. grayi* από 0-4,40% (Πίνακας 10)

Η μεταβλητότητα στα ποσοστά της συχνότητας απομόνωσης της *L. monocytogenes* από δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η υγιεινή και ο αριθμός των ζώων στις αγελαδοτροφικές μονάδες, ο τύπος των ζωοτροφών με τις οποίες τρέφονται, η υγιεινή της άμελης, η τεχνική δειγματοληψίας και οι εργαστηριακές μέθοδοι ανίχνευσης του παθογόνου. Η συχνότητα ανίχνευσης του παθογόνου σε δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος είναι αυξημένη κατά καιρούς σε όλες τις ηπείρους με εξαίρεση την Ωκεανία.

Επιπλέον η συχνότητα απομόνωσης της *L. monocytogenes* από δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος επηρεάζεται από την εποχικότητα και τα γεωγραφικά χαρακτηριστικά του κάθε τόπου. Η μεταβλητότητα των ποσοστών συχνότητας απομόνωσης του παθογόνου, ενδέχεται να οφείλεται στις διαφορετικές κλιματικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε τόπο, όπως είναι η ατμοσφαιρική θερμοκρασία και η σχετική υγρασία. Οι κλιματικές συνθήκες που φαίνεται να ευνοούν την ανάπτυξη του παθογόνου είναι οι χαμηλές θερμοκρασίες και το ξηρό περιβάλλον (Yoshida et al.,

1998). Η αυξημένη συχνότητα απομόνωσης της *L. monocytogenes* στην Εσθονία (Πίνακας 9), μπορεί να επιβεβαιώσει την ανάπτυξη του παθογόνου υπό τις συγκεκριμένες κλιματικές συνθήκες.

Η εποχικότητα παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στην συχνότητα απομόνωσης του παθογόνου. Η μόλυνση του νωπού γάλακτος με τη *L. monocytogenes* είναι συνήθως πιο συχνή το χειμώνα, πιθανότατα επειδή η σίτιση των ζώων με ενσιρωμένες ζωοτροφές χαμηλής ποιότητας είναι πιο συχνή εκείνη την εποχή σε πολλά μέρη του κόσμου. Ο αριθμός των ζώων που μολύνονται με το παθογόνο παρουσιάζει την υψηλότερη συχνότητα κατά τους μήνες Φεβρουάριο-Μάρτιο στο Βόρειο ημισφαίριο (Yoshida et al., 1998).

Αντίθετα, παρατηρείται απουσία του παθογόνου την άνοιξη και χαμηλή συχνότητα απομόνωσης το καλοκαίρι. Το γεγονός αυτό πιθανότατα να οφείλεται στην αλλαγή της διατροφής των ζώων την άνοιξη και το καλοκαίρι η οποία πραγματοποιείται μέσω της βόσκησης στους βοσκότοπους (El Marnissi et al., 2013). Το μικρό ποσοστό παρουσίας του παθογόνου στη Νέα Ζηλανδία, σχετίζεται με την παραμονή των βοοειδών γαλακτοπαραγωγής σε εξωτερικό χώρο και όχι σε εσωτερικές εγκαταστάσεις γαλακτοπαραγωγών μονάδων (Hill et al., 2012)

**Πίνακας 9:** Συχνότητα απομόνωσης της *L. monocytogenes* σε δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος παγκοσμίως.

Χώρα	Ποσοστό	Βιβλιογραφία
<b>Αμερική:</b>		
Βραζιλία	1,10%	Cerva et al., 2014
Η.Π.Α	0,00% 3,40% 19,70% 6,50% 4,60% 4,20% 4,10% 12,60 % 4,90% - 7,00%	D'Amico & Donnelly, 2010 Oliver et al.,2009 Rahn et al., 2016 Van Kessel et al., 2004 Jajaroo &Henning, 2001 Lovett et al., 1987 Rohrbach et al., 1990 Hassan et al., 2000 Muraoka, et al., 2003
Κολομβία	26,00%	Vanegas et al., 2009
Καναδάς	1,30% 5,40% 4,00% 1,60% 1,90% 2,50%	Farber et al., 1988 Slader et al., 1988 Liewen & Palautz, 1988 Davidson et al., 1989 Fedio & Jackson, 1990 Steele et al., 1997

Μεξικό	13,00%	Carlos at al., 2001
Τρινιντάντ	1,70%	Adesiyun et al., 1996
<b>Ασία:</b>		
Ινδία	5,60%	Karthikeyan et al., 2015
Ιράν	5,00%	Mansouri et al., 2015
Κίνα	0,36%	Ning et al, 2013
Μαλαισία	5,40%	Jamali et al., 2013
Τουρκία	2,00% 12,00%	Durmaz et al., 2015 Sanlibaba, et al., 2018
<b>Αφρική:</b>		
Αίγυπτος	0,00%	El-Sherbini et al., 1998
Αιθιοπία	2,04%	Seyoum et al., 2015
Αλγερία	5,76%	Boubendir et al., 2011
Γκάνα	8,80%	Owusu-Kwarteng et al., 2018
Μαρόκο	5,90%	El Marnissi et al., 2013
<b>Ευρώπη:</b>		
Εσθονία	28,60%	Kalmus et al., 2015
Ισπανία	6,10% 3,00%	Vilar et al., 2007 Fernandez et al., 2008
Ιταλία	3,70% 1,70%	Parisi et al., 2013 Bianchi et al., 2013
Κύπρος	1,46%	Botsaris et al., 2016
Λετονία	0,00%	Konosonoka et al., 2012
Πορτογαλία	5,00% 1,90%	Guerra et al., 2001 Kongo et al., 2006
Σουηδία	1,00%	Waak et al., 2002
Τσεχία	3,20%	Gelbícová & Karpísková, 2012a
Φινλανδία	5,50%	Ruusunen et al., 2013
<b>Ωκεανία:</b>		
Νέα Ζηλανδία	0,70% 4,10%	Hill et al., 2012 Soboleva et al., 2013

**Πίνακας 10:** Συχνότητα απομόνωσης άλλων ειδών του γένους *Listeria* εκτός της *L. monocytogenes* σε δείγματα νοπού γάλακτος παγκοσμίως

Χώρα	Είδος του γένους <i>Listeria</i> – ποσοστό (%)	Βιβλιογραφία
Μεξικό	<i>L. ivanovii</i> 6,00% <i>L. seeligeri</i> 4,00% <i>L. innocua</i> 1,00%	Carlos et al., 2001
Σουηδία	<i>L. innocua</i> 2,30%	Waak et al., 2002
Αιθιοπία	<i>L. innocua</i> 6,40% <i>L. ivanovii</i> 3,50% <i>L. grayi</i> 4,40% <i>L. seeligeri</i> 2,30% <i>L. welshimeri</i> 0,60%	Sayoum et al., 2015
Ισπανία	<i>L. innocua</i> 7,10% <i>L. grayi</i> 1,00% <i>L. welshimeri</i> 1,00%	Vilar et al., 2007
Καναδάς	<i>L. innocua</i> 9,70% <i>L. welshimeri</i> 1,30%	Farber et al., 1988
Τουρκία	<i>L. innocua</i> 12,00% <i>L. ivanovii</i> 4,00% <i>L. welshimeri</i> 8,00%	Sanlibaba et al., 2018
Μαλαισία	<i>L. innocua</i> 13,80% <i>L. welshimeri</i> 2,50% <i>L. seeligeri</i> 0,80%	Jamali et al., 2013
Αίγυπτος	<i>L. ivanovii</i> 1,40% <i>L. seeligeri</i> 1,40% <i>L. welshimeri</i> 0,70%	El-Sherbini et al., 1998



Με βάση την οροτύπιση της *L. monocytogenes* με mPCR, τα πέντε εξετασθέντα στελέχη ταξινομήθηκαν στις οροτυπικές ομάδες 1/2a-3a (3/5,60%), 1/2c-3c (1/5,20%) και 4a-4c (1/5,20%). Η κατανομή των οροτυπικών ομάδων των στελεχών του νοπού γάλακτος μπορεί να θεωρηθεί προβλέψιμη, καθώς φαίνεται ο ορότυπος 1/2a να υπερισχύει μεταξύ των στελεχών που απομονώνονται από δείγματα τροφίμων (Jamali et al., 2013). Το αποτέλεσμα της οροτύπισης στην παρούσα εργασία είναι ανάλογο πρωτύπων εργασιών. Συγκεκριμένα, η οροτυπική ομάδα 1/2a-3a έχει εντοπιστεί σε ποσοστό 61,50% στο Ιράν (Jamali et al., 2013), 60% στις Η.Π.Α (Gilberth et al., 2005) και 51,60% στη Γκάνα (Owusu-Kwarteng et al.,2018). Επιπλέον η ομάδα 1/2c-3c έχει αναφερθεί σε ποσοστό 23,10% (Jamali et al., 2013) και 11,30% (Owusu-Kwarteng et al.,2018).Οι ορότυποι 4a-4c είναι λιγότερο συνήθεις και απαντώνται σπανιότερα (Doumith et al., 2004). Ο ορότυπος 4c έχει εντοπιστεί σε 2 από τα 56 στελέχη νοπού γάλακτος στις Η.Π.Α (Van Kessel et al., 2004).

Όπως έχει προαναφερθεί, ο ορότυπος 1/2a απομονώνεται συχνότερα από τα τρόφιμα. Η υψηλή συχνότητα απομόνωσης του συγκεκριμένου ορότυπου μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός της φορέας περισσότερων πλασμιδίων από τα στελέχη του συγκεκριμένου ορότυπου. Τα πλασμίδια αυτά προσδίδουν ανθεκτικότητα στις τοξικές ουσίες των καθαριστικών σκευασμάτων που εφαρμόζονται στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων (Korsak et al., 2012).

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι ο ορότυπος 1/2a μαζί με τους 1/2b και 4b της ευθύνονται για το 98% των καταγεγραμμένων περιπτώσεων λιστερίωσης σε ανθρώπους, ενώ οι ορότυποι 4a και 4c σπάνια σχετίζονται με εξάρσεις της νόσου (Jamali et al., 2013; Chen et al., 2017). Επομένως η μέτρια και όχι ασθενής ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίων που παρατηρήθηκε στους ορότυπους 1/2a-3a της ομάδας Πα ενδέχεται να σχετίζεται με τη συχνότερη απομόνωση του ορότυπου 1/2a από τα τρόφιμα.

Σε ό,τι αφορά τη φορεία των γονιδίων λοιμογονικότητας, τα γονίδια *inlA*, *inlC*, *inlJ* που κωδικοποιούν τις ιντερναλίνες ανιχνεύθηκαν και στα πέντε εξετασθέντα στελέχη της *L. monocytogenes*. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα συμφωνεί με προηγούμενες έρευνες (Kalorey et al.,2008; Indrawattana et al., 2011; Lomonaco et al.,2012; Sant'Ana et al.,2012; Jamali et al.,2015) στις οποίες σχεδόν όλα τα στελέχη του παθογόνου από δείγματα διαφόρων κατηγοριών τροφίμων όπως κρέας, τυρί, ιχθυηρά και λαχανικά φέρουν τα συγκεκριμένα γονίδια λοιμογονικότητας. Επιπλέον τα πέντε εξετασθέντα στελέχη του παθογόνου βρέθηκαν θετικά στην φορεία των γονιδίων *plcA*, *hlyA* και *iap*. Η φορεία των γονιδίων αυτών έχει αναφερθεί και σε άλλες εργασίες τόσο σε στελέχη της *L. monocytogenes* που είχαν απομονωθεί από νοπό γάλα (Owusu-Kwarteng et al., 2018), όσο και σε στελέχη του παθογόνου που είχαν απομονωθεί από ιχθυηρά (Momtaz & Yadollahi, 2013). Στην παρούσα μελέτη το γονίδιο *actA* ανιχνεύθηκε σε τρία από τα πέντε εξετασθέντα στελέχη.

Το γεγονός ότι το γονίδιο *actA* δεν ανιχνεύθηκε σε όλα τα εξετασθέντα στελέχη μπορεί να αποδοθεί στην διαφορά μοριακού βάρους του γονιδίου μεταξύ των διαφορετικών οροτύπων των πέντε στελεχών. Σε αντίστοιχη εργασία, το γονίδιο εντοπίστηκε στα περισσότερα στελέχη με εξαίρεση δύο στελέχη των οροτύπων 4a και 4b (Niebuhr et al., 1993).

## 5. Συμπεράσματα

Η συχνότητα παρουσίας του παθογόνου στο νωπό αγελαδινό γάλα στην παρούσα εργασία ήταν χαμηλή. Το μικρό αυτό ποσοστό των δειγμάτων που ήταν μολυσμένα με το παθογόνο, μπορεί να αποδοθεί σε τυχαία ή και μόνιμα περιστατικά επιμόλυνσης από τον εξοπλισμό, το προσωπικό ή το χώρο επεξεργασίας του γάλακτος. Παρόλη τη χαμηλή συχνότητα παρουσίας του παθογόνου, η παστερίωση και η επεξεργασία των γαλακτοκομικών προϊόντων και ιδιαίτερα του νωπού γάλακτος δεν θα πρέπει να παραβλέπονται. Η παστερίωση αποτελεί καθοριστικής σημασίας μέθοδο για την ασφάλεια του γάλακτος και των παραγόμενων από αυτό προϊόντων διότι θανατώνει το παθογόνο στο γάλα, με αποτέλεσμα να προκύπτουν ασφαλή γαλακτοκομικά προϊόντα απαλλαγμένα από αυτό.

Παράλληλα με την παστερίωση του γάλακτος, ο έλεγχος των ζωοτροφών αλλά και η ορθή εφαρμογή των πρακτικών υγιεινής κατά τα στάδια παραγωγής και επεξεργασίας θα πρέπει να εξακολουθούν να εφαρμόζονται προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός των στελεχών της *L. monocytogenes* και ο κίνδυνος επιμόλυνσής του, ώστε να διασφαλιστεί η ασφάλεια και η ποιότητα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Βάσει της χαμηλής συχνότητας παρουσίας του παθογόνου, το νωπό γάλα δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως μία δυνητική πηγή τροφιμογενούς μόλυνσης με *L. monocytogenes* για τον πληθυσμό της Βόρειας Ελλάδος παρά μόνο σε περιπτώσεις που καταναλώνεται νωπό ή παράγονται γαλακτοκομικά προϊόντα από νωπό γάλα. Τέλος, απαιτείται συνεχής παρακολούθηση της παρουσίας της *L. monocytogenes* στα γαλακτοκομικά προϊόντα και το περιβάλλον παραγωγής τους ώστε να καταστεί δυνατός ο προσδιορισμός των τροφίμων εκείνων που ενδέχεται να αποτελούν πηγές τροφιμογενούς μόλυνσης με το παθογόνο.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ**

**Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N. E.** (2014). "*Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments*". **Archives of Microbiology**, 196, 453-472.

**Adesiyun, A. A., Webb, L. A., Romain, H., Kaminjolo, J. S.** (1996). "*Prevalence of Salmonella, Listeria monocytogenes, Campylobacter spp., Yersinia enterocolitica and Cryptosporidium spp. in bulk milk, cows' faeces and effluents of dairy farms in Trinidad*". **Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop. (RSH)**. 49:303–309.

**Adzitey, F. & Huda, N.** (2010). "*Listeria monocytogenes in foods: Incidences and possible control measures*". **African Journal of Microbioly Research**, 4: 2848–2855.

**Al-Mariri, A., Younes, A., & Ramadan, L.** (2013). "*Prevalence of Listeria spp. in raw milk in Syria*". **Burgarian Jurnal of Veterinary Medicine** 16, 112–122.

**Allerberger, F.** (2003). "*Listeria: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology*". **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 35, 183-189.

**Allerberger, F.** (2007). *Listeria* In: Shabbir Simjee (Ed.), *Foodborne Diseases*. New Jersey: Humana Press Ink. pp. 28-38.

**Alirezalu, K., Munekata, P. E. S., Parniakov, O., Barba, F. J., Witt, J., Toepfl, S., Wiktor, A., Lorenzo, J. M.** (2019) "*Pulsed electric field and mild heating for milk processing: a review on recent advances*". **Journal Science Food Agriculture**. 100:16–24.

**Angelidis, A.S.; Kalamaki, M.S.; Georgiadou, S.S.**(2015) "*Identification of non-Listeria spp. bacterial isolates yielding a  $\beta$ -D-glucosidase-positive phenotype on Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti (ALOA)*". **International Journal of Food Microbiology**, 193, 114–129

**ANSES** (2011). "*Listeria monocytogenes*". **Datasheet on foodborne foodborne**


**biological hazards, 1-4.**

**Armstrong, D & Gellin, B.G.**(1998). *Listeria monocytogenes* infections. In: Evans A.S, Brachman P.S, (Eds.) *Bacterial Infections of Humans. Epidemiology and Control*. 3rd ed. New York, NY: Plenum Medical Book Company. pp.421–436.

**Aryal, S** (2018). Difference between O antigen and H antigen [.https://microbenotes.com/differences-between-o-antigen-and-h-antigen/](https://microbenotes.com/differences-between-o-antigen-and-h-antigen/)  
Ημερομηνία Ανάκτησης: 13/4/20

**Aryani, D.C., Zwietering, M.H., Den Besten, H.M.W.** (2016). "*The effect of different matrices on the growth kinetics and heat resistance of Listeria monocytogenes and Lactobacillus plantarum*". **International Journal of Food Microbiology**. 238, 326-237.

**Barancelli, G.V., Camargo, T.M., Reis, C.M., Porto, E., Hofer, E., Oliveira, C.A.** (2011) "*Incidence of Listeria monocytogenes in cheese manufacturing plants from the northeast region of São Paulo*". **Brazilian Journal of Food Protection**.74, 816–819.

**Baranyi, J., Tamplin, M. L.** (2004). *ComBase: a common database on microbial responses to food environments*. **Journal of Food Protection**, 67: 1967-1971.   
DOI:10.4315/0362-028x-69.9.1967

**Bartlett, F. M & Hawke, A. E.**(1995)."*Heat resistance of Listeria monocytogenes Scott A and HAL 957E1 in various liquid egg products*". **Journal Food Protection**, 58: 1211-1214.

**Beaufort, A., Bergis, H., Lardeux, A. L., Polet, M., Botteldoorn, N., Papageorgiou, G., Andersen, J.K., Boel, J., Hickey, B., Prencipe, V., et al.** (2014). *Technical guidance document for conducting shelf-life studies on Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods. European Union Reference Laboratory for Listeria monocytogenes 2014. EURL Lm Technical Guidance Document*. Available online [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety\\_fh\\_mc\\_technical\\_guidance\\_document\\_listeria\\_in\\_re\\_te\\_foods.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_technical_guidance_document_listeria_in_re_te_foods.pdf)

**Bereksi, N., Gavini, F., Benezech, T., & Faille, C.** (2002). "*Growth, morphology and surface properties of Listeria monocytogenes Scott A and LO28 under saline and acid environments*." **Journal of Applied Microbiology**, 92(3):556–565.

**Bertsch, C., Ramirez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., AbouMansour, E., Spagnolo, A., Clement, C., & Fontaine, F.** (2013). "*Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood*." **Plant Pathology**, 62:243-265.

**Bianchi, D., Barbaro, A., Gallina, S., Vitale, N., Chiavacci, L., Caramelli, M., Decastelli, L.** (2013). "*Monitoring of foodborne pathogenic bacteria in vending machine raw milk in Piedmont, Italy*". **Food Control**, 32: 435-439.

**Borges, S., Silva, J., Teixeira, P.** (2012). "Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs". **Antonie Van Leeuwenhoek** 101, 677-682.

**Botsaris, G., Nikolaou, K., Liapi, M., Pipis, C.** (2016). "Prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in cattle farms in Cyprus using bulk tank milk samples". **Journal of Food Safety**, 36: 482-488.

**Biolife** (2018). ALOA® AGAR LISTERIA ACC. TO OTTAVIANI & AGOSTI ALOA® ENRICHMENT SELECTIVE SUPPLEMENTS. **Scheda Tecnica, pp.1-5.** <http://www.biolifeitaliana.it/public/cartellina-allegati-schede-certificazioni/schede-tecniche-italiano/ST-4016052.pdf>

**Boelrijk, A. E. M., de Jong, C., Smit, G.** (2003). Flavour generation in dairy products. In Smith, G., (Ed.) *Dairy Processing*. Cambridge UK: Woodhead Publishing LTD. pp. 7:128–1533

**Bologna, J., Jorizzo, J., Rapini, R.** (2008). *Dermatology*. Spain: Mosby Publishing

**Boubendir, A., Hamidechi, M. A., Mostakim, M., EL Abed, S., Ibsouda Koraichi, S.** (2011). "Incidence de *Listeria* spp. et autres bactéries psychrotrophes dans le lait cru bovin dans le Nord Est Algérien." **Revue de médecine vétérinaire**, 162:265-269.

**Bourry, A., Poutrel, B.,** (1996). "Bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*: kinetics of antibody response in serum and milk after experimental infection". **Journal of Dairy Science**, 79, 2189–2195

**Bremer, P. J., Fillery, S., & McQuillan, A. J.** (2006). "Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms". **International Journal of Food Microbiology**, 106, 254–262.

**Brouillaud-Delattre, A., Marie, M., Collette, C., Mattei, C., Lahellec, C.** (1997). "Predictive microbiology of dairy products: Influence of biological factors affecting growth of *Listeria monocytogenes*". **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 80(4): 913-919.

**Buchanan, R. L., Gorris, L.G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., Whiting, R. C.** (2017). *A review of Listeria monocytogenes: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments.* **Food Control**, 75, 1-13.

**Bucur, F. I., Grigore-Gurgu L., Crauwels P., Riedel C. U, Nicolau A. I.** (2018). "Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments". **Frontiers in Microbiology**, 9, 2700.

**Buxton, R.,** (2005). "*Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols*". **American Society for Microbiology**, 1-9 .

**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.

**Carlos, V. S., Oscar, R. S., & Irma, Q. R. E.**(2001). "*Occurrence of Listeria species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city*". **Food Microbiology**, 18, 177–181.

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** (2017). *Raw milk Food Safety*.<https://www.cdc.gov/foodsafety/rawmilk/raw-milk-index.html> Ημερομηνία Ανάκτησης: 10/6/20.

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** (2019). *Listeriosis (Listeria monocytogenes) Case Definition*.  
<https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/listeriosis/case-definition/2019/> Ημερομηνία Ανάκτησης:15/7/2020.

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**. (2020). *Listeria (listeriosis)*.  
<https://www.cdc.gov/listeria/index.html> Ημερομηνία Ανάκτησης: 10/5/2020.

**Center for Food Safety and Public Health (CFSPH)** (2019). *Listeriosis*.  
<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/listeriosis.pdf>. Ημερομηνία Ανάκτησης: 6/7/2020.

**Cerf, O. & Condron, R.** (2006). "*Coxiella burnetii and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle?*". **Epidemiology & Infection**, 134:946– 951.

**Cerva, C., C. Bremm, E. M. dos Reis, .Bezerra, A. V. A., Loiko, M. R., da Cruz C. E. F. , Cenci,A., & Mayer, F. Q.** (2014). "*Food safety in raw milk production: risk factors associated to bacterial DNA contamination*".**Tropical Animal Health and Production**, 46, 877–882.

**Champagne, C. P., Laing, R.R., Roy, D., Mafu, A.A., Griffiths, M. W.** (1994). Psychrotrophs in dairy products: their effect and their control. **Crit. Rev. Food Science & Nutrition**, 34, 1–30.

**Chen, J. Q., Healey, S., Regan, P., Laksanalamai, P., Hu, Z.** (2017) "*PCR-based methodologies for detection and characterization of Listeria monocytogenes and Listeria ivanovii in foods and environmental sources*". **Food Science and Human Wellness**, 6:39-59.

**Churchill, R. L. T., Lee, H., & Hall, J. C.** (2006). "*Detection of Listeria monocytogenes and the toxin listeriolysin O in food*". **Journal of Microbiological Methods**, 64(2), 141–170.

**Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S., and Ianieri, A. (2017).** " *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry". **Pathogens** 6, 41-50.

**D'Amico D. J & Donnelly C. W (2017).** Growth and survival of microbial pathogens in cheese. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW (eds) Cheese. Elsevier, Amsterdam pp 573-594.

**da Silva, N., Taniwaki, H. M., Junqueira, C. A. V., Silveira, F. A. N., Okazaki, M. M & Gomez, A. R. R. (2018).** *Listeria Monocytogenes* In Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> Edition. UK: CPC Press.

**Davidson, R.J., Sprung, D.W., Park, C.E., Rayman, M.K. (1989).** "Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., and *Yersinia enterocolitica* in Manitoba raw milk". **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, 22:70–74.

**Davis, M. J., Coote, P. J. and O'Byrne, C. P. (1996).** "Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. **Microbiology Society** 142, 2975–2982.

**Davis, M.L., Ricke, S.C., Donaldson, J.R. (2019).** "Establishment of *Listeria monocytogenes* in the Gastrointestinal Tract". **Microorganisms**, 7, 75. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030075>.

**de Oliveira ,G. B. D., Favarin, L., Luchese, R. H. & McIntosh D. (2015).** "Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?". **Brazilian Journal of Microbiology**, 46, 313-321.

**den Bakker, H. C., Warchocki S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S, Stasiewicz, M. J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L. K, Fortes, E., Nightingale, K. K., Kephart, D., Wiedmann, M. (2014).** "*Listeria floridensis* sp. Nov., *Listeria aquatica* sp. Nov., *Listeria cornellensis* sp. Nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64:1882–1889.

**Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M.Z., Barbuddhe, S., Malik, S. V. S., Singh, R.K. (2015).** "*Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: A comprehensive review*". **Veterinary Quarterly**. 35, 211–235.

**Dortet, L., Veiga-Chacon, E & Cossart, P. (2009).** "*Listeria monocytogenes*. In Schaechter M, (Ed.). *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd ed. Oxford: Elsevier. pp. 182–198.

**Doyle, M. E., Mazzotta, A.S., Wang, T., Wiseman, D. W & Scott, V. N. (2001).** "Heat resistance of *Listeria monocytogenes*". **Journal of Food Protection**, 64: 410-429.

- Drevets, D. A & Bronze, M. S.** (2008). "*Listeria monocytogenes: Epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion*". **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 53: 151–165.
- Driehuis, F., Wilkinson, J. M., Jiang, Y., Ogunade, I., & Adesogan, A. T.** (2018). "*Silage review: animal and human health risks from silage*". **Journal of Dairy Science**, 1, 4093–4110.
- 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.
- Durmaz, H., Avcı, M., & Aygün, O.** (2015). "*The presence of Listeria species in corn silage and raw milk produced in Southeast region of Turkey*". **Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 21, 41–44.
- Donnelly, C. W., & Briggs, E. H.** (1986). "*Psychrotrophic Growth and Thermal Inactivation of L. monocytogenes as a Function of Milk Composition*". **Journal of Food Protection**, 49: 994-998.
- Dogan, C. & Erkmen, O.** (2004) "*High-pressure inactivation kinetics of Listeria monocytogenes inactivation in broth, milk, peach and orange juices*". **Journal of Food Engineering**, 62: 47–52.
- D’Amico, D. J., Silk, T. M., Wu, J. & Guo, M.** (2006). "*Inactivation of microorganisms in milk and apple cider treated with ultrasound*". **Journal of Food Protection**, 69, 556–563.
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D’Orio, V., Vergara, A., Conter, M., Ianieri, A.** (2008). "*Influence of temperature on biofilm formation by Listeria monocytogenes on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity*". **Journal of Applied Microbiology**, 104, 1552–1561.
- Di Ciccio, P., Conter, M., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Paludi, D., Festino, A.R & Ianieri, A.** (2012). "*Listeria monocytogenes: Biofilms in food processing*". **Italian Journal of Food Science**, 24, 203–213.
- D’Agostino, M., Wagner, M., & Vazquez-Boland, J. A.** (2004). "A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model-towards an international standard". **Journal of Food Protection**. 67: 1646–1645.
- Doumith, M., C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet, & P. Martin.** (2004). "Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR". **Journal of Clinical Microbiology**, 42:3819–3822 .



- EFSA Panel on Biological Hazards (EFSA BIOHAZ Panel)** (2018). *Scientific Opinion on the Listeria monocytogenes contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU*. **EFSA Journal**, 16(1):5134 pp.1-173.
- El Marnissi, B., Bennani, L., Cohen, N., Lalami, A. E, & Belkhou, R.** (2013). "Presence of *Listeria monocytogenes* in raw milk and traditional dairy products marketed in the north-central region of Morocco". **African Journal of Food Science**, 7: 87-91.
- El-Sherbini, M., Al-Agili, S., Garbaj, A.** (1998). "Isolation of listerias from farm milk and abortion cases in women". **The Eastern Mediterranean Health Journal**, 4, 589-592.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)** (2017). *Listeriosis In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017*. Stockholm: ECDC; 2020.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA & ECDC).** (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12):5500.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA & ECDC).** (2018).The European Union One Health 2019 Zoonoses Report.*EFSA Journal* 2021;19(2):6406.
- European Union Laboratory for Listeria monocytogenes (EURL-Lm)** (2018). *EURL Lm Guidance document: competence of laboratories implementing. Lm shelf-life studies* 2:1-25.
- Farber, J.M., Sanders, G.W., Malcolm, S.A.** (1988). "The presence of *Listeria* spp. In raw milk in Ontario". **Canadian Journal of Microbiology**, 34: 95:100
- Farber, J. M., Sanders, G. W., Speirs, J. I.** (1990). "Growth of *Listeria monocytogenes* in naturally-contaminated raw milk". **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, 23(3):252-254.
- Farber, J. M. & Peterkin, P. I.** (1991) "*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen" **Microbiology Review**, 55:476-511.
- Farber, J. M., Coates, F., & Daley, E.** (1992). "Minimum Water Activity Requirements for the Growth of *L.monocytogenes*". **Letters in Applied Microbiology**, 15:103-105.
- Farber, J.M., Ross, W. H., Harwig, J.** (1996). "Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada". **International Journal of Food Microbiology**, 30:145-56.

**Favaro, M., Sarmati, L., Sancesario, G., Fontana, C. (2014).** "First case of *Listeria innocua meningitis in a patient on steroids and eternecept*". **JMM Case Reports**, 1-5. DOI 10.1099/jmmcr.0.003103.

**Fedio, W. M., & Jackson, H. (1990).** " Incidence of *Listeria monocytogenes in raw milk in Alberta*". **Canadian Insitute of Food Science and Technology**. 23:236–238.

**Fellows, P. J (2016).** Minimal processing methods In. *Food Processing Technology. Principles and Practice*. Woodhead Publishing Limited.4:431-511.

**Fernandez, L. B., Flores, G., Gonzalez, A.A., Valladeres, J., Castro, P., Pereira, S. (2008).** "Hygienic quality in concentrates, milk and grass and maize sillages in dairy farms in Galicia Spain". <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2008%2FES%2FES0808.xml%3BES2008001649>.

**Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014).** "*Listeria monocytogenes persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health*". **Journal of Food Protection**, 77,150-170.

**Food Safety Authority of Ireland (2011).** *Listeria monocytogenes*. **Microbial Factsheet Series**. 1:1-6.

**Food and Drug Administration (FDA) (2017).** Control of *Listeria monocytogenes* In *Ready-to-eat Foods:Guidance for Industry. Draft Guidance*. **U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition**.

**Fsihi, H., Steffen, P & Cossart, P. (2001).** *Listeria monocytogenes* In *Principles of Bacterial Pathogenesis*. E.A Groisman (Ed.) Elsevier Inc . 16:751-800.

**Fthenakis, G.C., Saratsis, Ph., Tzora, A., Linde, K. (1998).** "*Naturally occurring subclinical ovine mastitis associated with Listeria monocytogenes*". **Small Rumin. Res.** 31, 23–27.

**Fugett, E. B., Schoonmaker-Bopp D., Dumas N.B., Corby, J.,Wiedmann, M.(2007).** "*Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched Listeria monocytogenes isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types*". **Journal of Clinical Microbiology**, 45:865–873.

**Furrer, B., Candrian, U., Hoefelein, C., & Luethy, J. (1991)."** *Detection and identification of Listeria monocytogenes in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments*". **Journal of Applied Bacteriology**, 70:372–379.

**Fusco, V., Chieffi, D., Fanelli, F., Logrieco, A. F., Cho, G.-S., Kabisch, J., Franz, C. M. A. P.** (2020). "*Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century*". **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 1–37.

**Gahan, C. G., O'Driscoll, B & Hill, C.** (1996). "*Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation*". **Applied Environmental Microbiology**, 62(9):3128-3132.

**Galie, S., Garcia-Gutierrez, C., Miguelez, E. M., Villar, C. J. & Lombo, F.** (2018) "*Biofilms in the food industry: health aspects and control methods*". **Frontiers in Microbiology**, 9, 898.

**Garner, M. & McLauchlin, J.** (2008). Biology and Pathogenicity In. Dongyou Liu (Ed.) *Handbook of *Listeria monocytogenes**. FL CRC Press pp 3-97.

**Gekara, N. O., Jacobs, T., Chakraborty, T. & Weiss, S.** (2005). "*The cholesterol-dependent cytolysin listeriolysin O aggregates rafts via oligomerization*". **Cellular Microbiology**., 7,1345-1356.

**Gelbícová, T., & Karpísková, R.** (2012a). "*Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* isolated from raw cow's milk collected on farms and from vending machines*". **Klinická Mikrobiologie Infek** . 18, 38e42.

**George, S. M., Lung, B. M., & Brocklehurst, T. F.**(1998). "*The effect of pH and Temperature Initiation of Growth of *L. monocytogenes**". **Letters in Applied Microbiology**, 6:153-156.

**Giacometti, F., Serraino, A., Finazzi, G., Daminelli, P., Losio, M. N., Tamba, M., Garigliani, A., Mattioli, R., Riu, R., Zanoni, R. G.** (2012). "*Field handling conditions of raw milk sold in vending machines: experimental evaluation of the behaviour of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Campylobacter jejuni**". **Italian Journal of Animal Science**, 11(2): 132-136.

**Giffel, M. C. & Wells-Bennik, M. H. J.** (2010). "*Good hygienic practice in milk production and processing*" In Griffiths, M. W. (Ed.) *Improving the safety and quality of milk. Milk production and processing*. Woodhead Publishing Limited, pp. 179-193.

**Gill, P.A., Boulton, J.G. Fraser, G.c., Stevenson, A.E., Reddacliff, L.A.** (1997). "*Bovine abortion caused by *Listeria ivanovii**". **Aust. Vet. J.** 75:214.

**Gilbreth, S. E., Call, J. E., Wallace, F. M., Scott, V. N., Chen, Y., & Luchansky, J. B.** (2005). "*Relatedness of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from selected ready*

to-eat foods and listeriosis patients in the United States". **Applied and Environmental Microbiology**, 71.

**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.

**González-Rivas, F., Ripolles-Avila, C., Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A. G., & Rodríguez-Jerez, J. J.** (2018). "Biofilms in the spotlight: Detection, quantification, and removal methods". **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 17(5), 1261–1276.

**Gougouli, M., Angelidis, A. S., & Koutsoumanis, K.** (2008). "A study on the kinetic behavior of *Listeria monocytogenes* in ice cream stored under static and dynamic chilling and freezing conditions". **Journal of Dairy Science**, 97, 523-530.

**Goulet, V., King, L.A., Vailant, V, et al** (2013) "What is the incubation period for listeriosis?" **BMC Infectious Diseases**, 13:11.

**Graves, L. M., Hesel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E & Sauders, B. D.** (2010). "*Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 60, 1280–1288.

**Griffiths, M. W.** (2010). "The microbiological safety of raw milk" In *Improving the safety and quality of milk. Milk production and processing*. Woodhead Publishing Limited, pp.27-53.

**Guerra, M. M., Mclauchlin, J. M., & Bernardo, F. A.** (2001). "*Listeria* in ready to eat unprocessed foods produced in Portugal". **Food Microbiology**. 18:423-429.

**Hassan, L., Mohammed, 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.

**Henriques, A. R., Melo-Cristino, J., & Fraqueza, M. J** (2015). "Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases and ready to eat meat-based foods in Portugal". **61st International Congress of Meat Science and Technology**.1-4

**Hill, B., Smythe, B., Lindsay, D., & Shepherd, J.**(2012). "Microbiology of raw milk in New Zealand." **International Journal of Food Microbiology**, 157, 305-308.

**Hird, D.W., Genigeorgis, C.** (1990). Listeriosis in food animals: clinical signs and livestock as a potential source of direct (non-foodborne) infection for humans. In: Miller,

A.J., Smith, J.L., Somakuti, G.A. (Eds.), *Foodborne Listeriosis*. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, The Netherlands, p. 31.

**Hoover, D. G.** (2000). "*Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies ultrasound*". **Journal of Food Science(Supplement)**, 93–95.

**Hurst, C. J** (2018). Opportunistic Bacteria Associated with Mammalian Livestock Disease In Hurst, C. J (Ed.) *The Connections Between Ecology and Infectious Disease*. Springer Int Publishing, pp.185-220.

**Indrawattana, N., Nibaddhasobon, T., Sookrung, N., Chongsa-nguan, M., Tungtrongchitr, A., Makino, S., et al.** (2011). "*Prevalence of Listeria monocytogenes in raw meats marketed in Bangkok and characterization of the isolates by phenotypic and molecular methods*". **Journal of Health, Population and Nutrition**, 29, 26-38.

**Ivanek, R., Gröhn, Y.T., Wiedmann, M.** (2006). *Listeria monocytogenes in Multiple Habitats and Host Populations: Review of Available Data for Mathematical Modeling*. **Foodborne Pathogens and Disease**, 4, 319-336..<http://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.319>

**Jamali, H., Radmehr, B., Thong, K.L.** (2013). "*Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of Listeria species and Listeria monocytogenes isolates from raw milk in farm bulk tanks*". **Food Control**, 24:121-125.

**Jamali, H., Chai, L. C & Thong, K.L.**(2013). "*Detection and isolation of Listeria spp. and Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods with various selective culture media*". **Food Control**. 32:19–24.

**Jamali, H.; Paydar, M.; Ismail, S.; Looi, C.Y.; Wong, W.F.; Radmehr, B.; Abedini, A.**(2015) "*Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of Listeria species and Listeria monocytogenes isolated from open-air fish markets.*" **BMC Microbiology**. 15, 144.

**Jarvis, N. A., Donaldson, J. R., O'Bryan, C. A., Ricke, S. C & Crandall, PG.**(2017). "*Listeria monocytogenes* infection of HD11, chicken macrophage-like cells". **Poultry Science**, 96:950–6.

**Jay, J. M.** (1996). "*Prevalence of Listeria spp. in Meat and Poultry Products*". **Food Control** , 7(4/5):209-214.

**Jayarao, B. M. and Henning, D. R.** (2001) "*Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk*". **Journal of Dairy Science**, vol. 84, no. 10, pp. 2157–2162.

**Jennison, A. V., Masson, J. J., Fang, N., Graham, R. M., Bradbury, M. I.; Fegan,**

**N., Gobius, K. S.; Graham, T. M., Guglielmino, C.J.; Brown, J. L.; et al.**(2017) "*Analysis of the Listeria Monocytogenes Population Structure among Isolates from 1931 to 2015 in Australia*". **Frontiers in Microbiology** , 8, 603.

**Jensen, N.E., Aarestrup, F.M., Jensen, J., Wegener, H.C.** (1996). "*Listeria monocytogenes in bovine mastitis. Possible implication for human health*". **International Journal of Food Microbiology**. 32, 209–216.

**Jin, T.** (2010). "*Inactivation of Listeria monocytogenes in skim milk and liquid egg white by antimicrobial bottle coating with polylactic acid and nisin*". **Journal of Food Science** 75(2):83–8.

**Jydegaard, A. M., Gravesen, A. & Knøchel, S.**(2000). "*Growth condition-related response of Listeria monocytogenes 412 to bacteriocin inactivation*". **Letters in Applied Microbiology**, 31, 68–72.

**Kalmus, P., Kramarenko, T., Roasto, M., Meremae, K., & Viltrop, A.** (2015). "*Quality of raw milk intended for direct consumption in Estonia*". **Food Control**, 51, 135-139.

**Kalorey D.R, Warke S.R, Kurkure N.V, Rawool D.B, Barbuddhe S.B.** (2008). "*Listeria species in bovine raw milk: A large survey of Central India*." **Food Control**. 19:109–112.

**Kapetanakou, A. E., Gkerekou M. A., Vitzilaiou, E. S & Skandamis, P. N.** (2017) "*Assessing the capacity of growth, survival, and acid adaptive response of Listeria monocytogenes during storage of various cheeses and subsequent simulated gastric digestion*". **International Journal of Food Microbiology**, 246:50–63.

**Karakas-Sen, A. & Karakas, E.**(2018)."*Isolation, identification and technological properties of lactic acid bacteria from raw cow milk*". **Bioscience Journal**, pp. 985-999.

**Karthikeyan, R., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J.** (2015). "*Molecular serotyping and pathogenic potential of Listeria monocytogenes isolated from milk and milk products in Tamil Nadu, India*". **Foodborne Pathogens and Disease**. 522–528.

**Kasalica, A., Vukovic, V., Vranjes, A. & Memisi, N.** (2011). "*Listeria monocytogenes in milk and dairy products*". **Biotechnology in Animal Husbandry**, 27, 1067–1082 .

**Keto-Timonen, R. O., Autio, T. J., & Korkeala, H. J.** (2003). "*An improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for discrimination of Listeria isolates*". **Systematic and Applied Microbiology**, 26:236–244.

**Keto-Timonen, R., Tolvanen, R., Lunden, J., & Korkeala, H.**(2007)."*An 8-year surveillance of the diversity and persistence of Listeria monocytogenes in a chilled food*

*processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism". Journal of Food Protection*, 70:1866–1873.

**Kim, I. S., Hur, Y. K., Kim, E. J., Ahn, Y. T., Kim, J. G., Choi, Y. J., & Huh, C. S.** (2017). "Comparative analysis of the microbial communities in raw milk produced in different regions of Korea". *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30:1643-1650.

**Kongo, J. M., Malcata, F.X., Ho, A. J., Wiedmann, M.** (2006). "Detection and Characterization of *Listeria monocytogenes* in Sao Jorge (Portugal) Cheese Production". *Journal of Dairy Science*, 89: 4456-4461.

**Konosonoka, I. H., Jemeljanovs, A., Osmane, B., Ikauniece, D., & Gulbe, G.**(2012). "Incidence of *Listeria spp.* in Dairy Cows Feed and Raw Milk in Latvia" **International Scholarly Research Notices**, vol. 2012, Article ID 435187, 5 pages, <https://doi.org/10.5402/2012/435187>

**Korsak, D.; Borek, A.; Daniluk, S.; Grabowska, A.; Pappelbaum, K.** (2012) "Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. *International Journal of Food Microbiology*.158, 203–208.

**Koutchma, T.** (2009). "Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods". *Food and Bioprocess Technology*, 2(2), 138–155.

**Kozak, J., Balmer, T., Byrne, R. & Fisher, K.** (1996). "Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods- Incidence in dairy products". *Food Control*, 7:215-21.

**Kuzmanovic, J., Asanin, R., Baltic, M., Misic, D., Dimitrijevic, M., Stojanovic, M., Asanin, N., & Kovacevic, J.** (2011). "Presence of *Listeria spp.* in fish samples, fish products and sea products". *Acta Veterinaria*, 61:193–203.

**Lani, M. N & Hassan, Z.** (2016). "Thermal inactivation of *L. monocytogenes* In *Listeria monocytogenes: General Overview and Its Significance to Food Safety*. Malaysia :UMT Publisher .pp19-32

**Lang Halter, E., Neuhaus K, Scherer, S.** (2013). "*Listeria weihenstephanensis sp. nov.*, isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63:641–647.

**Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A., Le Fleche-Mateos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., Allerberger, F.** (2010). "*Listeria rocourtiae sp. Nov.*" *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60:2210–2214.

**Leclercq, A.; Moura, A.; Vales, G.; Tessaud-Rita, N.; Aguilhon, C.; Lecuit, M.** (2019). "*Listeria thailandensis* sp. nov.". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 69, 74–81

**Lee, B. H., Cole, S., Badel-Berchoux, S., Guillier, L., Felix, B., Krezdorn, N., Hebraud, M., Bernadi, T., Sultan, I., & Pivetau, P.** (2019). "*Biofilm formation of Listeria monocytogenes Strains Under Food Processing Enviroments and Pan -Genome Wide Association Study*". **Frontiers in Microbiology** ,10: 2698.

**Leistner, L.,** (2000). "*Basic aspects of food preservation by hurdle technology*". **International Journal of Food Microbiology**, 55, 181–186.

**Leporq, B., Membré, J. M., Dervin, C., Buche, P., Guyonnet, J. P.** (2005). "*The "Sym'Previous" software, a tool to support decisions to the foodstuff safety*". **International Journal of Food Microbiology**, 100:231-237. DOI10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.006.hal-02683138.

**Lianou, A., & Sofos, J. N.** (2007). "*A review of the incidence and transmission of Listeria monocytogenes in ready-to-eat products in retail and food service environments*". **Journal of Food Protection**, 70, 2172–2198.

**Liewen, M.B., Plautz, M.W.** (1988). "*Occurrence of Listeria monocytogenes in raw milk in Nebraska*". **Journal of Food Protection**, 51:840–841.

**Liu, D.** (2006). "*Identification, subtyping and virulence determination of Listeria monocytogenes, an important foodborne pathogen*". **Journal of Medical Microbiology**, 55: 645–659.

**Lobacz , A, Kowalik, J., Tarczynska, A.** (2013). "*Modeling the growth of Listeria monocytogenes in mold-ripened cheeses*". **Journal of Dairy Science**, 96: 3449–3460. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5964>.

**Lomonaco, S., Patti, R., Knabel, S. J., & Civer, T.** (2012). "*Detection of virulence-associated genes and epidemic clone markers in Listeria monocytogenes isolates from PDO Gorgonzola cheese*". **International Journal of Food Microbiology**, 160, 76-79.

**Lorber, B.** (1997) "*Listeriosis*". **Clinical Infectious Diseases** 24(1):1-9.

**Low, J.C., & Donachie, W.** (2007). "*A review of Listeria monocytogenes and listeriosis*". **Veterinary Journal** , 153:9-29.

**Lovett, J., Francis, D.W., Hunt, J.M.** (1987). "*Listeria monocytogenes in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity*". **Journal of Food Protection**, 50:188–192.



- Lu, M., Y. Shiau., J. Wong., R. Lin., H. Kravis, T., Blackmon, T., Pakzad, T., Jen, A., Cheng, J., Chang, E., Ong, N., Sarfaraz & Wang, N.S.(2013). "Milk Spoilage : Methode and Practises of Detecting MilkQuality". Food and Nutrition Science (4): 113-123.**
- Lundén, J., Tolvanen, R., Korkeala, H. (2004). "Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe". Journal of Dairy Science, 87: E6–E12.**
- Luque-Sastre, L., Arroyo, C., Fox, E. M., McMahon, B. J., Bai, L., Li, F., & Fanning, S. (2018). "Antimicrobial resistance in Listeria species". Microbiology Spectrum. 6, 237–259.**
- Lyytikäinen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen- Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Anttila, V.-J., Johansson, T., Rantala, L., Aalto, T., Korkeala, H., Siitonen, A. (2000). "An outbreak of Listeria monocytogenes serotype 3a infections from butter in Finland". Journal of Infectious Diseases, 181, 1838–1841.**
- McLauchlin, J. (1996). "The relationship between Listeria and listeriosis". Food Control, 7:187**
- Mansouri, M. N., Kianpour, M., Sami, M., Jajarmi, M.(2015)."Prevalence of L. monocytogenes in raw milk in Kerman, Iran". Veterinary Research Forum,. 6(3): 223-26.**
- Marth, E. H (1986). Behaviour of Listeria monocytogenes in Milk and Cheese.Int Association of Milk Food Enviromental .Sanitarians Inc.Journal of Food Protection, 10:849-849.**
- Mateus, T., Silva, J., Maia, R.L., Teixeira, P.(2013)." Listeriosis during Pregnancy: A Public Health Concern." ISRN Obstetrics and Gynecology, 851712.**
- Momtaz, H., & Yadollahi, S. (2013). "Molecular characterization of Listeria monocytogenes isolated from fresh seafood samples in Iran". Diagnostic Pathology, 8(1),14.**
- Mugampoza, D., Muyanja, C., Ogwok, P., Serunjogi, M., & Nasinyama, G. (2011). "Occurrence of Listeria monocytogenes in bulked raw milk and traditionally fermented dairy products in Uganda".African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development 11:4610-4622.**
- Muraoka, W., Gay, C., Knowles, D., Borucki, M. (2003). "Prevalence of Listeria monocytogenes subtypes in bulk tank milk of the Pacific Northwest". Journal of Food Protection, 66:1413–1419.**

**Musk, D.J., Banko, D.A., & Hergenrother, P.J.** (2005). "Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*". **Chemistry & Biology**, 12:786- 796.

**Moyra, A., Tourdjman, M., Leclercq, A., Hamelin, E., Laurent, E., Fredriksen, N., Cauteren, D., Van Bracq-Dieye, H., Thouvenot, P., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Maury, M.M, Alexandru, A., Criscuolo, A., Quevillon, E., Donguy, M., Enouf, V., Valk, H., De Brisse, S., Lecuit, M.** (2017). "*Real-time whole-genome sequencing for surveillance of Listeria monocytogenes France*". **Emerging Infectious Diseases**, 23:1462–1470.

**Necidova, L., Bursova, S., Skockova, A., Janstova, B., Pracharova, P., Sevcikova, Z. & Janstova, B.** (2014). "*Growth and enterotoxin production of Bacillus cereus in cow, goat and sheep milk*". **Acta Veterinaria Brno**, 83:S3–S8.

**Niebuhr, K., Chakraborty, T., Rohde, M., Gazli, T., Jansen, B., Köllner, P., and Wehland, J.** (1993). "*Localization of the ActA polypeptide of Listeria monocytogenes in infected tissue culture cell lines: ActA is not associated with actin "comets."* **Infection & Immunity**, 61:2793-2802.

**Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., Grohn, Y.T., McDonough, P. L., Wiedmann, M.** (2004). "*Ecology and transmission of Listeria monocytogenes infecting ruminants and in the farm environment*". **Applied and Environmental Microbiology**, 70, 4458-67.

**Ning, N., Guo, K., Chen, L., Xu, L., Zhang, C., Cui, H., Cheng, Y., Xu, R., Liu, W., Lv Q, Cao W & Zhang, Y** (2013). "Pilot survey of raw whole milk in China for *Listeria monocytogenes* using PCR". **Food Control**. 31: 176-179.

**Njagi, L. W., Mbutia, P. G., Bebora, L.C., Nyaga, P. N., Minga, U., Olsen, J. E.** (2004). "*Carrier status for Listeria monocytogenes and other Listeria species in free range farm and market healthy indigenous chickens and ducks*". **East African Medical Journal**, 81(10):529–33.

**Northolt, M., Beckers, H., Vecht, U., Toepoel, L., Soentoro, P., Wisselink, H.** (1988). "*Listeria monocytogenes: Heat resistance and behaviour during storage of milk and whey and making of Dutch types of cheese*". **Netherlands Milk and Dairy Journal**, 42: 207-219.

**Notermans, S. H. W., Dufrenne, J., Leimeister-Wachter, M., Domann, E., and Chakraborty, T.** (1991). "*Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish pathogenic and nonpathogenic Listeria species*". **Applied and Environmental Microbiology**, 57: 2666-2670.

Núñez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J et. al (2018). "*Listeria costaricensis* sp. nov.". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 68: 844-850.

Oliver, S. P., K. J. Boor, S. C. Murphy & S. E. Murinda (2009). "*Food safety hazards associated with consumption of raw milk*". **Foodborne Pathogens and Disease**, 6, 793-806.

Oliver, S. P., Jayarao, B. M., & Almeida, R. A. (2005). "*Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications*". **Foodborne Pathogen and Disease**, pp.115-129.

Oliveira, M. M., Brugnera, D. F., Alves, E., & Piccoli, R. H. (2010). "*Biofilm formation by Listeria monocytogenes on stainless steel surface and biotransfer potential*". **Brazilian Journal of Microbiology**, 41:7-106.

Ogawa, H., Fukuhisa, K., Fukumoto, H., Hori, K., & Hayashi, R.(1989). "*Effect of hydrostatic pressure on sterilization and preservation of freshly-squeezed, nonpasteurized citrus juice*". **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, 63(6), 1109–1114.

Owusu-Kwarteng, J., Wuni, A., Akabanda, F., Jespersen, L. (2018). "*Prevalence and characteristics of Listeria monocytogenes isolates in raw milk, heated milk and nunu, a spontaneously fermented milk beverage*". **Ghana. Beverages**, 4(2): 40.

Parish, M. E., & D. P. Higgins.(1989). "*Survival of Listeria monocytogenes in low pH model broth system*". **Journal of Food Protection**, 52:144-147.

Parisi, A.; Latorre, L., Fraccalvieri, R., Miccolupo, A., Normanno, G., Caruso, M., Santagada, G. (2013). "*Occurrence of Listeria spp. in dairy plants in Southern Italy and molecular subtyping of isolates using AFLP*". **Food Control** 29, 91–97..

Paziak-Domanska, B., Bogulawska, E., Wiekowska-Szakiel, M., Kotlowski, R., Rozalska, B., Chmiela, M., Kur, J., Dabrowski, W., et al. (1999) "*Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of Listeria monocytogenes in meat foods*". **FEMS Microbiology Letters**, 171, 209–214.

Pearson, L., & Marth, E .(1990). "*Listeria monocytogenes — threat to a safe food supply: a review*". **Journal of Dairy Science**, 73, 912–928.

Perrin, M., Bremer, M., Delamare, C. (2003). "*A fatal case of Listeria innocua bacteremia*". **Journal of Clinical Microbiology**, 41, 5308–5309.

Pine, L., Malcolm, G. B., Brooks, J. B., & Daneshvar, M.I. (1989). "*Physiological studies on the growth and utilization of sugars by Listeria species*". **Canadian Journal of Microbiology**, 35, 245–254.

**Pitt, W. M., Harden, T. J. & Hull, R. R.** (1999). "*Listeria monocytogenes* in milk and dairy products". **Australian Journal of Dairy Technology**, 54, 49–65.

**Pitt, W. M., Harden, T. J., Hull, R. R.** (1999b). "*Antibacterial activity of raw milk against Listeria monocytogenes*". **Australian Journal of Dairy Technology**, 54: 90-93.

**Pizarro-Cerda, J., & Cossart, P.** (2006) "Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*". **The Journal of Pathology**, 208:215–223

**Portmann, A. C., Fournier, C., Gimonet, J., Ngom-Bru, C., Barretto., C, & Baert, L.** (2018). "*A validation approach of an end-to-end whole genome sequencing workflow for source tracking of Listeria monocytogenes and Salmonella enterica*". **Frontiers in Microbiology**, 9:446.

**PulseNet USA** (2009). *One-day (24-28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of Listeria monocytogenes by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)*.

[https://pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/5.3\\_2009\\_PNetStandProt\\_LMonocytogenes.pdf](https://pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/5.3_2009_PNetStandProt_LMonocytogenes.pdf) Ημερομηνία Ανάκτησης: 20/7/20.

**Quigley, L., O’Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter P. C.** (2013). "The complex microbiota of raw milk". **FEMS Microbiology Reviews**, 37, 664–698.

**Rahimi, E., Ameri, M., & Momtaz, H.** (2010). "*Prevalence and antimicrobial resistance of Listeria species isolated from milk and dairy products in Iran*". **Food Control**, 21, 1448e1452.

**Rahn, W. M., Gollust, S. E., Tang, X.**(2016) "*Framing Food Policy: The Case of Raw Milk*". **Policy Studies Journal**, 45, 359-383. <https://doi.org/10.1111/psj.12161>

**Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Rejitha, J. S., Lekshmi, M. U., Dharsana, K. S., Prasad, S. P., et al.** (2007). "*Listeria e review of epidemiology and pathogenesis*". **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 40, 4-13.

**Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P., Cocolin, L.**(2008). "*Detection, quantification and vitality of Listeria monocytogenes in food as determined by quantitative PCR*". **International Journal of Food Microbiology**, 121, 99–105.

**Rawool, D. B., Malik, S. V., Shakuntala, I., Sahare, A. M. & Barbuddhe, S. B.**(2007). "*Detection of multiple virulence-associated genes in Listeria monocytogenes isolated from bovine mastitis cases*". **International Journal of Food Microbiology**, 113: 201–207.

**Rasmussen, T. B., Skindersoe, M. E., Bjarnsholt, T., Phipps, R. K., Christensen, K. B. & Jensen, P. O.** (2005). "*Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by Penicillium species*". **Microbiology**. 151:1325-1340.

**Raso, J., Pagan, R., & Condon, S.** (2004). Nonthermal Technologies in Combination with other Preservation Factors In G.V. Barbosa-Cánovas, M.S. Tapia & M. P. Cano (Eds.). *Novel Food Processing Technologies*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp.453-476.

**Remuzgo-Marrtínez., S. & Ramos-Vivas., J.**(2013). "*Listeria monocytogenes and Macrophages*". **Microbiology focus (vol 5.1)**.

**Reij, M.W., & Den Aantrekker, E.D.** (2004). "Recontamination as a source of pathogens in processed foods". **International Journal of Food. Microbiology**, 91 (1), 1–11.

**Reina, L. D., Jin, Z. T., Zhang, Q. H., & Yousef, A. E.** (1998). "*Inactivation of Listeria monocytogenes in milk by pulsed electric field*". **Journal of Food Protection**, 61(9), 1203–1206

**Renner, L. D., & Weibel, D. B.** (2011). "*Physicochemical regulation of biofilm formation*". **MRS Bull** 36:347–355 .

**Robinson, R. K., Batt, C. A. & Patel, P. D.** (2000). *Encyclopedia of Food Microbiology*. San Diego, CA: Academic Press.

**Rocourt, J., & Buchrieser, C.** (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. (3rd edn). FL: CRC Press. pp. 1–20

**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.

**Rohrbach, B. W., Draughon, F. A., Davidson, P. M., Oliver, S. P.** (1992). "*Prevalence of Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni, Yersinia enterocolitica, and Salmonella in Bulk Tank Milk - Risk-Factors and Risk of Human Exposure*". **Journal of Food Protection**, 55(2): 93-97.

**Romick, T. L., Fleming, H. P., & McFeeters, R. F.** (1996). "*Aerobic and anaerobic metabolism of Listeria monocytogenes in defined glucose medium*". **Applied and Environmental Microbiology**, 62:304–307.

**Ruppitsch, W., Pietzka, A., Prior, K., Bletz, S., Fernandez, H. L., Allerberger, F., Harmsen, D., & Mellmann, A.** (2015). "*Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of Listeria monocytogenes*". **Journal of Clinical Microbiology**, 53:2869 –2876.

**Ruusunen. M., Salonen, M., Pulkkinen, H., Huuskonen, M., Hellstrom, S., Revez, J., Hanninen, M. L., Fredriksson-Ahomaa, M., Lindstrom, M.** (2013). "*Pathogenic bacteria in Finnish bulk tank milk*". **Foodborne Pathogens and Disease**, 10(2): 99-106.

- Ryser, E. T.**, (2011). Pathogens in milk: *Listeria monocytogenes*. In Fox, Fuqyay, J. W. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, London , pp.1650-1655.
- Ryser, E. T.**, (2012). Safety of Dairy Products. In Oyarzabal, O.A & Backert,S. (Eds.), *Microbial Food Safety*. New York: Springer .pp127-146.
- Ryser, E. T., & Buchanan, R. L.** (2013). *Listeria monocytogenes* In Doyle M. P & Buchanan R.L (Eds.) **Food Microbiology and Fundamentals (Vol. 4)**. Washington DC , ASM Press.
- Saha M, Debnath, C., & Pramanik, A.K.** (2015). "*Listeria monocytogenes: An emerging foodborne pathogen*". **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** ,4(11): 52–72.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B.,& Erlich, H.A.** (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase" **Science**, **239**, 487–491.
- Sanlibaba, P., Uymaz Tezel, B., Çakmak, G. A.** (2018). *Detection of Listeria spp. In raw milk and dairy products retailed in Ankara*. **GIDA**, 43(2):273-282.
- Sant'Ana, A. S., Igarashi, M. C., Landgraf, M., Destro, M. T., & Franco, B. D. G. M.** (2012). "*Prevalence, populations and pheno-and genotypic characteristics of Listeria monocytogenes isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil*." **International Journal of Food Microbiology**, 155, 1-9.
- Seeliger, H. P. R., & Jones, D.** (1986). The genus *Listeria*. In Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2). Baltimore: Williams & Wilkins. pp. 1235-1245.
- Sergelidis, D., & Abraham, A.** (2009), "*Adaptive response of Listeria monocytogenes to heat and its impact on food safety*", **Food Control**, 20: 1-10.
- Seveau, S.** (2014) "*Multifaceted activity of listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of Listeria monocytogenes*". **Subcellular Biochemistry**, 80, 161–195
- Schmidt, R. H.** (2008). Microbiological Considerations Related to Dairy Processing In Chandan R.C (Ed.) *Dairy Processing and Quality Assurance*. Wiley-Blackwell publications . Pp 105-144.
- Seyoum, E.T., Woldetsadik, D.A., Mekonen, T.K., Gezahegn, H.A., Gebreyes, W.A.** (2015). "*Prevalence of Listeria monocytogenes in raw bovine milk and milk products from central highlands of Ethiopia*". **Journal of Infections in Developing Countries** 9:1204-1209. doi: 10.3855/jidc.6211.

- Shi, X. M., & Zhu, X. N.** (2009). "*Biofilm formation and food safety in food industries*". **Trends in Food Science and Technology**, 20:407–413.
- Shome, B.R., Shakuntala, I., Shome, R., Kumar, A.** (2003). "*Isolation of Listeria monocytogenes from mastitis case in Holstein–Friesian cattle*". **Indian Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases. Annual Conference**, Umiam, Barapani, 7 Feb. Abs. No. PP:05, p. 52.
- Sfakianakis, P., & Tzia, C.** (2014). "*Conventional and innovative processing of milk for yogurt manufacture; development of texture and flavor: a review*". **Foods**, 3(1), 176–193.
- Sim, J., Hood, D., Finnie, L., Wilson, M., Graham, C., Brett, M., Hudson, J.A.,** (2002). "Series of incidents of Listeria monocytogenes non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats ". **Letters in Applied Microbiology** 35, 409–413
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J.** (2010). "*A review of current and emergent biofilm control strategies*". **LWT Food Science and Technology**, 43(4):573–583.
- Slade, P.J., Collins-Thompson, D.L., Fletcher, F.** (1988). "*Incidence of Listeria species in Ontario raw milk*". **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, 21:425–429.
- Sleator, R.D., Gahan, C.G., & Hill, C.** (2003): "*A postgenomic appraisal of osmotolerance in Listeria monocytogenes*". **Applied Environmental Microbiology**, 69: 1-9.
- Slutsker, L., & Schuchat, A.** (1999). Listeriosis in Humans. In E.T Ryser & E.H Marth, (Eds.) *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. New York :Marcel Dekker Inc., 75-95.
- Smith, J. L., Liu, Y., & Paoli, G. C.** (2012). "*How does Listeria monocytogenes combat acid conditions?*". **Canadian Journal of Microbiology**, 59(3):141-152.
- Snapir, Y.M., Vaisbeinand, E., Nassar, F.** (2006). "Low virulence but potentially fatal outcome-Listeria ivanovii". **Eur.J.Intern. Med.** 17:286.
- Soboleva, T., French, N., Marshall, J., Jamieson, P.** (2013). **Microbiology of New Zealand bulk tank milk. Proceedings of the International Association for Food Protection: European Symposium on Food Safety**, 15 May 2013, Marseille, France. Accessed at: <https://www.foodprotection.org/downloads/library/soboleva.pdf>.
- Stewart, J.E** (1998). "*Listeria monocytogenes*". <http://www.bact.wisc.edu/scienceEd/Listeriamonocytogenes.html>.

**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.

**Sorrells, K.M. & Enigl, D.C. (1990).** “*Effect of pH, acidulant, sodium chloride and temperature on the growth of Listeria monocytogenes*”. **Journal of Food Safety**, 11:31-37.

**Suarez, M., & Vazquez-Boland, J. A.(2001).** “*The bacterial actin nucleator protein ActA is involved in epithelial cell invasion by Listeria monocytogenes*”.**PUBMED [Accession No. AF103807]**.

**Swaminathan,B.(2001).** Listeria Monocytogenes .In M.P. Doyle. L.R. Beuchat & T.J. Montville (Eds.) *Food Microbiology:Fundamentals and Frontiers* (2<sup>nd</sup> ed). Washington DC:ASM Press.,383-409.

**Touch, V., & Deeth, H. C. (2009).** Microbiology of raw and market milks. In A. Y. Tamime (Ed.), *Milk processing and quality management*. West Sussex: Blackwell Publishing Ltd. pp. 48-71.

**USDA (2018).** *Agricultural Research Service, Pathogen Modeling Programme (PMP)* Online. <https://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx#nogo>.

**Valasek, M. A & Repa, J. J. (2005).** “*The power of real-time PCR.*”**Advances in Physiology Education** ,29:151–9.

**Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Gorski, L., McCluskey B. J. & Perdue M. L. (2004).**“*Prevalence of salmonellae, Listeria monocytogenes, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies*”. *Journal of Dairy Science*, 87:2822–2830.

**Vasavada, P. C. (1988).**“*Pathogenic bacteria in milk: A review*”. **Journal of Dairy Science**, 71:2809–16.

**Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., DominguezBernal, G., Goebel,W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., & Kreft, J. (2001).**’ *Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants*”. **Clinical Microbiology Reviews** 14:584–640.

**Veterinary bacteriology (Vetbact) (2017).** Listeria monocytogenes. <https://www.vetbact.org/index.php?artid=13&vbsearchstring=Listeria%20monocytogenes#>  
Ημερομηνία Ανάκτησης:20/4/20

**Videau, N. (1987).** “*Prevention and control of listeriosis*”. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, 6 (3), 815-818.

**Vilar M.J., Yus, E., Sanjuan, M.L., Dieguez, F.J., Rodriguez-Otero J.L. (2007).**“*Prevalence of and Risk Factors for Listeria Species on Dairy Farms* “.**Journal of Dairy Science**.90:5083–5088



**Volokhov, D., Rasooly, A., Chumakov, K. & Chizhikov, V. (2002)** "Identification of *Listeria* species by microarray-based assay". **Journal of Clinical Microbiology**, 40, 4720– 4728.

**Voysey, A.P., Anslow, A.P., Bridgwater, J.K., Levander, B., & Watson, L. (2009).** "The effects of butter characteristics on growth of *Listeria monocytogenes*." **International Journal of Dairy Technology**, 326-330.

**Waak, E., Tham, W., & Danielsson-Tham M. L. (2002).**"Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks". **Applied and Environmental Microbiology**, 68(7):3366-3370.

**Wang, S., & Orsi, R. H. (2013).** *Listeria*, In G. J. Morris & M. Potter (Eds.) *Foodborne Infections and Intoxications*. London: Academic Press, 199–216.

**Wang, L., Yu, F., Yang, L., Li, Q., Zhang, X., Zeng, Y., Xu, Y. (2010).** "Prevalence of virulence genes and biofilm formation among *S. aureus* clinical isolates associated with lower respiratory infection". **African Journal of Microbiology**. Res. 4, 2566-2569.

**Wassie, M., & Wassie, T. (2016).**"Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk". **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences** , 3 (8): 44-49.

**Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., den Bakker, H. C. (2015).** "*Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 65:286–292.

World Health Organization (2018a). *Listeria*. <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/en/> .Ημερομηνία ανάκτησης : 1/3/21

**Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E., McDonough, P. L., Batt, C. A. (1997).** "Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential". **Infection and Immunity**. 65:2707- 2716.

**Wilbey, R. A.(1996).** "Estimating the degree of heat treatment given to milk". **Journal Society of Dairy Technology**, 49, 109-112.

**Wildbrett, G., & Escobar, J. E (2000).** *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. Zaragoza, Spain: Editorial Acribia.

**World Health Organization (WHO) (2020).** "What is ionizing radiation?" [https://www.who.int/ionizing\\_radiation/about/what\\_is\\_ir/en/index2.html](https://www.who.int/ionizing_radiation/about/what_is_ir/en/index2.html). Ημερομηνία Ανάκτησης: 5/6/20

**World Organisation for Animal Health (OIE)** (2018). Chapter 3.9.6. *Listeria monocytogenes*, In OIE Terrestrial manual ,pp1705-1722

**Yakubu, Y, Salihu, M. D., Faleke, O. O., Abubakar, M.B., Junaidu, A. U., Magaji, A. A, Gulumbe, M. L., & Aliyu, R. M.** (2012b). "Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in raw milk from cattle herds within Sokoto Metropolis, Nigeria." **Sokoto Journal of Veterinary Sciences**, 10:13-17 .

**Yoshida, T., M. Sato, and K. Hirai.** (1998). "*Prevalence of Listeria species in raw milk from farm bulk tanks in Nagano prefecture*". **Journal of Veterinary Medical Science**. 60:311–314.

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ

**Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ)** (2019).Τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Παρέμβασης.Επιδημιολογικά Δεδομένα για τη Λιστερίωση στην Ελλάδα 2004-2018. <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/08/listeriosi-2004-2018-gr.pdf> , Ημερομηνία Ανάκτησης :10/5/20.

**Καμιναρίδης, Σ. & Μοάτσου, Γ.,** (2009). Γαλακτοκομία , Αθήνα :ΕΜΒΡΥΟ.

**Καμιναρίδης, Σ.,&Μοάτσου, Γ.**(2015). [https://oceclass.aua.gr/modules/document/file.php/OCDFSHN102/DFSHN\\_350\\_11b\\_2h.pdf](https://oceclass.aua.gr/modules/document/file.php/OCDFSHN102/DFSHN_350_11b_2h.pdf) Ημερομηνία Ανάκτησης :10/6/20

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

**Κέντρο Ελέγχου Πρόληψης Νοσημάτων (Κ.Ε.Λ.Π.ΝΟ)** (2011). Λιστερίωση (ICD-10 A32).Περιγραφή Νοσήματος. [https://eody.gov.gr/wpcontent/uploads/2019/01/listeriosi\\_perigrafi\\_teliko.pdf](https://eody.gov.gr/wpcontent/uploads/2019/01/listeriosi_perigrafi_teliko.pdf) Ημερομηνία Ανάκτησης :10/5/20.

**Λεβειδιώτου-Στεφάνου, Σ.**(2000). *Σημειώσεις Εργαστηριακών ασκήσεων ΣΤ εξαμήνου. Ιωάννινα, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.*

**Λιτοπούλου-Τζανετάκη Ε.** (2010). *Μικροβιολογία Γάλακτος*, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις ΑΙΒΑΖΗ.

