

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:**

**ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ &**

**ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**



**Αντιμικροβιακή δράση βακτηριοσίνης (νισίνης-E234) και βακτηριοφάγου (P-100) έναντι της *L.monocytogenes* σε σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση, «τυροσαλάτα» και «ταραμοσαλάτα»**

**Διπλωματική Εργασία**

**Ανδροκλής, Βασιλείου Βαθράκης**

**Τεχνολόγος τροφίμων, Αλεξάνδριο Τεχνολογικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης**

**Λάρισα, 2013**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:**

**ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ &**

**ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**



**Αντιμικροβιακή δράση βακτηριοσίνης (νισίνης-E234) και βακτηριοφάγου (P-100) έναντι της *Listeria monocytogenes* σε σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση, «τυροσαλάτα» και «ταραμοσαλάτα»**

**Διπλωματική Εργασία**

**Ανδροκλής, Βασιλείου Βαθράκης**

**Τεχνολόγος τροφίμων, Αλεξάνδριο Τεχνολογικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης**

**Λάρισα, 2013**

**Επιβλέπων:** Πουρνάρας Σπύρος  
**Μέλη τριμελούς:** Πλακοκέφαλος Ηλίας, Γκόβαρης Αλέξανδρος

«Περιορισμός επιμόλυνσης της *L. monocytogenes* σε είδη σαλάτας (τυροσαλάτα, και ταραμοσαλάτα) έτοιμες προς κατανάλωση με τη χρήση βακτηριοσίνης (νισίνης-E234) και βακτηριοφάγου (P-100)»

## Περίληψη

Από υπεραγορά της πόλης της Λάρισας αγοράστηκαν δυο σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση, «τυροσαλάτα» και «ταραμοσαλάτα». Οι σαλάτες επιμολύνθηκαν με πρότυπα στελέχη *Listeria monocytogenes* (4b & 1/2a) με 100 Cfu/g το οποίο είναι και το νομοθετικό όριο βάση του κανονισμού 2073/2005/EC για τα τρόφιμα. Η αντιμικροβιακή δράση του βακτηριοφάγου P-100 κατά της *L. monocytogenes* μελετήθηκε με την προσθήκη του σε τυροσαλάτα και ταραμοσαλάτα σε τρεις συγκεντρώσεις φορτίου 0 (μάρτυρας), ( $10^3$  Pfu/g) και ( $10^7$  Pfu/g) για διάρκεια αποθήκευσης μια εβδομάδας στους 4 °C. Ο βακτηριοφάγος προστιθέμενος στις σαλάτες σε συγκέντρωση  $10^3$  Pfu/g δεν παρουσίασε μείωση στον πληθυσμό της *L. monocytogenes*, σε αντίθεση με την συγκέντρωση  $10^7$  Pfu/g που παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση. Στην συνέχεια μελήθηκε η αντιμικροβιακή δράση του βακτηριοφάγου με την νισίνη σε τρεις συνδυασμούς  $10^7$  Pfu/g & 0 mg/Kg νισίνη,  $10^7$  Pfu/g & 3 mg/Kg νισίνης και  $10^7$  Pfu/g & 12 mg/Kg νισίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο βακτηριοφάγος και η νισίνη παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση κατά του παθογόνου με το συνδυασμό  $10^7$  Pfu/g & 12 mg/Kg νισίνη να παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση ( $p < 0,05$ ), με μείωση σε σχέση με το μάρτυρα κατά 1 log Cfu/g μόλις σε μία μέρα με πληθυσμούς κάτω από το νομοθετικό όριο της ΕΕ. Ο βακτηριοφάγος όπως και η νισίνη παρουσίασαν την ίδια δράση και στις δύο σαλάτες.

## Abstract

Bacteriophage P-100 and nisin have been evaluated for antilisterial activity using two ready to eat dressings “tarama” and “hot cheese salad”. The samples were inoculated with 2 log (100 Cfu/g) of two serotypes mix (4b&1/2a) *L. monocytogenes* which is limit for products placed on the market during their shelf-life according to 2073/2005 EC. First, three doses of phage P-100 plaque forming unit (Pfu)/g 0, (control),  $10^3$  and  $10^7$  tested against *L. monocytogenes* population for one week storage at 4° C. The results showed that the dose  $10^7$  Pfu/g was able to reduce the population 0.17 log Cfu/g (from 2 log to 1.83 log,  $p < 0,05$ ) after one-day storage. The dose of  $10^3$  has no statistical difference ( $p < 0,05$ ) from the control. We had also evaluated the combination of the  $10^7$  dose of the bacteriophage P-100 with two concentrations of nisin:  $10^7 + 0$  mg/Kg nisin (control),  $10^7$  Pfu/g + 3 mg/Kg nisin and  $10^7$  Pfu/g + 12 mg/Kg nisin. The results showed statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) with the combination  $10^7 + 12$  mg/Kg nisin (reduction 1 log Cfu/g at only one day of storage at 4° C) presenting the higher antimicrobial activity. The nisin and the bacteriophage had the same effects against the *L. monocytogenes* population with no statistical differences in both dressings.

Περιεχόμενα	
Εισαγωγή.....	iv
1. ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>Listeria</i> .....	1
1.1 Φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της <i>L.monocytogenes</i> .....	1
1.1.2 Γονιδίωμα και ορότυποι της <i>L.monocytogenes</i> .....	1
1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της <i>L.monocytogenes</i> .....	3
1.3 Επιδημιολογικά δεδομένα λιστερίωσης στην Ε.Ε (2006-2009).....	9
1.3.1 Επιδημιολογικά δεδομένα λιστερίωσης στις Η.Π.Α (2010).....	13
1.4 Νισίνη (E-234).....	15
1.5 Βακτηριοφάγοι.....	18
1.5.1 Μορφολογία, γονιδίωμα και χρήση βακτηριοφάγου P-100.....	19
1.6 Περιορισμός επιμόλυνσης <i>L.monocytogenes</i> με τη χρήση βακτηριοσίνης (νισίνης –E234) και βακτηριοφάγου.....	21
1.7 Διασταυρωμένη μόλυνση και αποφυγή αυτής.....	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
2.1 Δείγματα.....	31
2.2 Πρότυπα στελέχη <i>L.monocytogenes</i> .....	31
2.3 Παρασκευή ενοφθαλμίματος.....	32
2.4 Μεταχείριση δειγμάτων με τη προσθήκη βακτηριοφάγου P-100.....	32
2.5 Μικροβιολογική ανάλυση κατά 11290-1:1996/Amd.1:2004.....	33
2.5.1 Ταυτοποίηση <i>L.monocytogenes</i> .....	34
2.5.2 Επιλογή αποικιών για την επιβεβαίωση.....	34
2.6 Μικροβιολογική ανάλυση κατά ISO 11290-2:1998.....	37
2.7 Έκφραση αποτελεσμάτων (ISO 11290-2:1998 και ISO 7218).....	37
2.7.1 Μέτρηση αποικιών <i>L.monocytogenes</i> .....	37
2.7.2 Μέθοδος υπολογισμού για τρυβλία με μικρότερο από 150 αποικίες <i>L.monocytogenes</i> ένα εκ των οποίων περιέχει λιγότερες από 15 αποικίες.....	38
2.8 Υπολογισμός πληθυσμού βακτηριοφάγου.....	39
2.9 Όγκος ενοφθαλμίματος και υπολογισμός φορτίου βακτηριοφάγου (Pfu/g δείγματος).....	40
2.9.1 Ορός βακτηριοφάγου.....	41
2.10 Προετοιμασία νισίνης.....	41
2.11 Μεταχείριση δειγμάτων και νισίνης.....	42
2.12 Θρεπτικά υποστρώματα και αντιδραστήρια.....	42
2.13 Στατιστική ανάλυση.....	43
2.13.1 Χαρακτηριστικά στατιστικής ανάλυσης.....	43
2.13.2 Χαρακτηριστικά στατιστικής ανάλυσης μετά την προσθήκη νισίνης.....	43
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	52
6 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	53
Βιβλιογραφία ξένη.....	54
Βιβλιογραφία ελληνική.....	61
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ.....	62
1ΠΥ. Υπολογισμός της αρχικής συγκέντρωσης του εναιωρήματος εμβολιασμού και απαιτούμενες αραιώσεις.....	63
2ΠΥ. Παράδειγμα υπολογισμού των Pfu/mL.....	63
3ΠΥ. Παράδειγμα υπολογισμού όγκου εμβολιασμού βακτηριοφάγου και τελικής συγκέντρωσης φορτίου (Pfu/g δείγματος).....	64
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	65
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ.....	67

### **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ.Γκόβαρη.Α αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος κτηνιατρικής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Σωλομάκο.Ν λέκτορα του τμήματος κτηνιατρικής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ευγενική προσφορά της νισίνης καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου εργαστήριο υγιεινής και επιδημιολογίας του τμήματος ιατρικής (κτήριο Κατσίγρα)

## Κατάσταση πινάκων

Πίνακας 1. Ορότυποι του γένους <i>Listeria</i> .....	3
Πίνακας 2. Γονίδια που συμμετέχουν στον μηχανισμό αντοχής στο ψύχος της <i>L.monocytogenes</i> .....	5
Πίνακας 3. Όρια ανάπτυξης <i>L.monocytogenes</i> .....	6
Πίνακας 4.Χρόνος διπλασιασμού <i>L.monocytogenes</i> σε γαλακτοκομικά είδη .....	6
Πίνακας 5. Χρόνος διπλασιασμού <i>L.monocytogenes</i> σε κρεατοσκευάσματα .....	7
Πίνακας 6. Ρυθμός ανάπτυξης <i>L.monocytogenes</i> σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων .....	7
Πίνακας 7. Ρυθμός ανάπτυξης <i>L.monocytogenes</i> σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων .....	8
Πίνακας 8. Κρούσματα λιστερίωσης ανα χώρα της Ε.Ε και εκτός μεταξύ 2006-09.....	10
Πίνακας 9. Δημογραφικά στοιχεία ασθενών που δεν σχετίζονται με εγκυμοσύνη.....	13
Πίνακας 10 Δημογραφικά στοιχεία ασθενών που σχετίζονται με εγκυμοσύνη.....	14
Πίνακας 11. Χαρακτηριστικά των βακτηριοφάγων που τείνουν να ευνοούν την χρησιμοποίησή τους για θεραπεία.....	19
Πίνακας 12. Προτεινόμενο πρόγραμμα καθαρισμού και απολύμανσης για τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση.....	30
Πίνακας 13. Προτεινόμενο πρόγραμμα καθαρισμού και απολύμανσης για επιφάνειες, περιοχές ή εξοπλισμό που δεν έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση.....	30
Πίνακας 14. Η σύσταση των σαλατών που χρησιμοποιήθηκαν .....	31
Πίνακας 15 Αντιδράσεις για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους <i>Listeria</i> spp .....	34
Πίνακας 16. Παρασκευή αραιώσεων σκευάσματος βακτηριοφάγου .....	40
Πίνακας 17. Οι αραιώσεις και οι όγκοι έγχυσης της νισίνης.....	41
Πίνακας 18 Οι πληθυσμοί <i>L.monocytogenes</i> σε τυροσαλάτα με την προσθήκη φορτίου βακτηριοφάγου κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας εβδομάδας στους 4 °C. ....	44
Πίνακας 19 Οι πληθυσμοί <i>L.monocytogenes</i> σε ταραμοσαλάτα με την προσθήκη φορτίου βακτηριοφάγου κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας εβδομάδας στους 4 °C. ....	46
Πίνακας 20 Πληθυσμοί <i>L.monocytogenes</i> με την προσθήκη Βακτηριοφάγου και νισίνης σε τυροσαλάτα έπειτα από αποθήκευση μιας ημέρας στους 4°C.....	47
Πίνακας 21 Πληθυσμοί <i>L.monocytogenes</i> με την προσθήκη Βακτηριοφάγου και νισίνης σε ταραμοσαλάτα έπειτα από αποθήκευση μιας ημέρας στους 4°C.....	48

## Κατάσταση σχημάτων

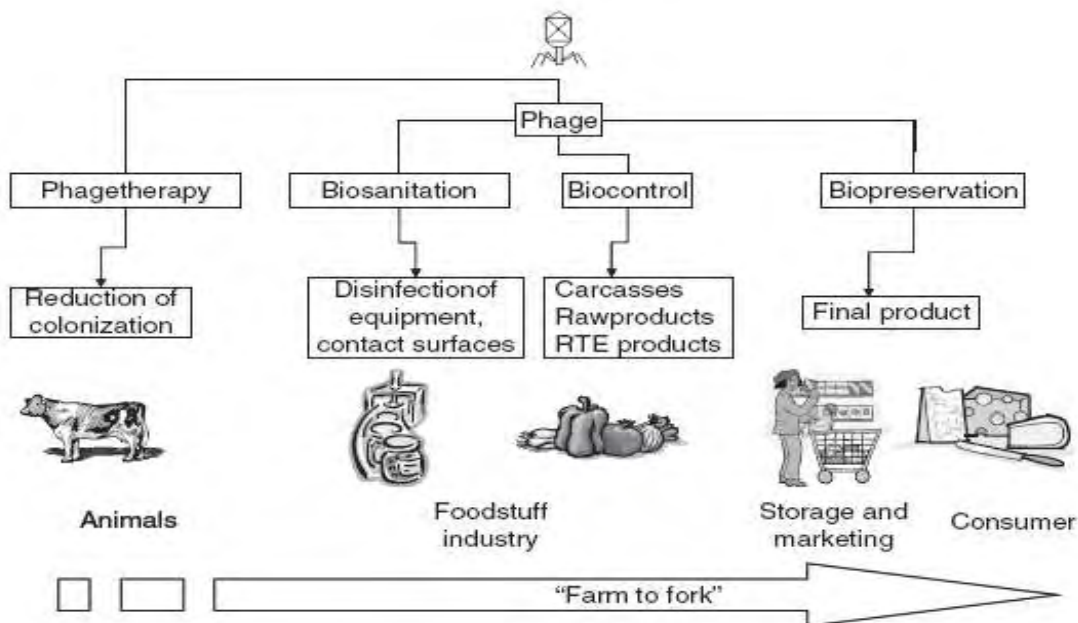
Σχήμα 1. Οι πιθανές χρήσεις των βακτηριοφάγων σε όλα τα στάδια της παραγωγής τροφίμων.....	v
Σχήμα 2. Η σχηματική αναπαράσταση επιλογής βακτηριοφάγου.....	v
Σχήμα 4. Φυλογενετικό δένδρο του γένους <i>Listeria</i> βασισμένο στο 16S και 23S rRna.....	2
Σχήμα 5. Η επιβίωση της <i>L.monocytogenes</i> στους -20 °C Σχήμα 6. Η επιβίωση <i>L.monocytogenes</i> .....	4
Σχήμα 7. Η ακολουθία των μοριακών γεγονότων που πραγματοποιείται κατά την διαδικασία ενεργοποίησης της αντοχής στο ψύχος από την <i>L.monocytogenes</i> .....	5
Σχήμα 8. Μοριακές δομές των λιπαρών οξέων των μεμβρανών της <i>L.monocytogenes</i> .....	5
Σχήμα 9. Η εποχικότητα των κρουσμάτων λιστερίωσης.....	9
Σχήμα 10. Η αλληλεπίδραση του λιπιδίου Π με την νισίνη για τον σχηματισμό πόρων.....	16
Σχήμα 11. TEM (transmission electron microscopy) σε κύτταρα <i>L.monocytogenes</i> .....	16
Σχήμα 12. Μοριακές δομές νισίνης A,Z,Q,U.....	17
Σχήμα 13. E.M (electron microscopy). Μορφολογικά χαρακτηριστικά του βακτηριοφάγου P-100.....	20
Σχήμα 14. Ακίνητοποίηση βακτηριοφάγων σε τροποποιημένες επιφάνειες SiO <sub>2</sub> .....	21
Σχήμα 15. Η επίδραση του βακτηριοφάγου.....	22
Σχήμα 16. Η επίδραση των επιπέδων της <i>L.monocytogenes</i> στον αριθμό θανάτων / έτος.....	24
Σχήμα 17. Η επίδραση της αλλαγής της συχνότητας (2,3%) στην διασταυρούμενη μόλυνση στους θανάτους / έτος.....	24
Σχήμα 18. Το μοντέλο ενδεχόμενης διασταυρούμενης μόλυνσης <i>L.monocytogenes</i> σε εργοστάσιο επεξεργασίας ψαριών.....	25
Σχήμα 19. Σχηματική αναπαράσταση των παραμέτρων που ελήφθησαν υπόψη για την ανάπτυξη του μαθηματικού μοντέλου διασταυρούμενης μόλυνσης <i>L.monocytogenes</i> σε εργοστάσιο επεξεργασίας ψαριών.....	26
Σχήμα 20. Παράγοντες που επηρεάζουν την μόλυνση των τροφίμων από <i>L.monocytogenes</i> .....	26
Σχήμα 21. Προτεινόμενη διαμόρφωση χώρου για την αποφυγή επιμόλυνσης από <i>L.monocytogenes</i> ανά διαμερίσματα σε βιομηχανία τροφίμων.....	29
Σχήμα 22. Διάγραμμα ροής για την ανίχνευση της <i>L.monocytogenes</i> κατά ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004.....	33
Σχήμα 23. Camp-test.....	36
Σχήμα 24. Διάγραμμα ροής για την απαρίθμηση της <i>L.monocytogenes</i> κατά ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004.....	37
Σχήμα 25. Απεικόνιση αραιώσεων του σκευάσματος βακτηριοφάγου.....	40
Σχήμα 26. Η επίδραση της συγκέντρωσης του βακτηριοφάγου στον πληθυσμό της <i>L.monocytogenes</i> κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας εβδομάδας στους 4 °C σε δείγματα τυροσαλάτας.....	45
Σχήμα 27. Η επίδραση της συγκέντρωσης του βακτηριοφάγου στον πληθυσμό της <i>L.monocytogenes</i> κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας εβδομάδας στους 4 °C σε δείγματα ταραμοσαλάτας.....	47
Σχήμα 28. Η επίδραση του συνδυασμού βακτηριοφάγου και νισίνης στον πληθυσμό της <i>L.monocytogenes</i> κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας ημέρας στους 4 °C σε δείγματα τυροσαλάτας.....	48
Σχήμα 29. Η επίδραση του συνδυασμού βακτηριοφάγου και νισίνης στον πληθυσμό της <i>L.monocytogenes</i> κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας ημέρας στους 4 °C σε δείγματα ταραμοσαλάτας.....	49



## Εισαγωγή

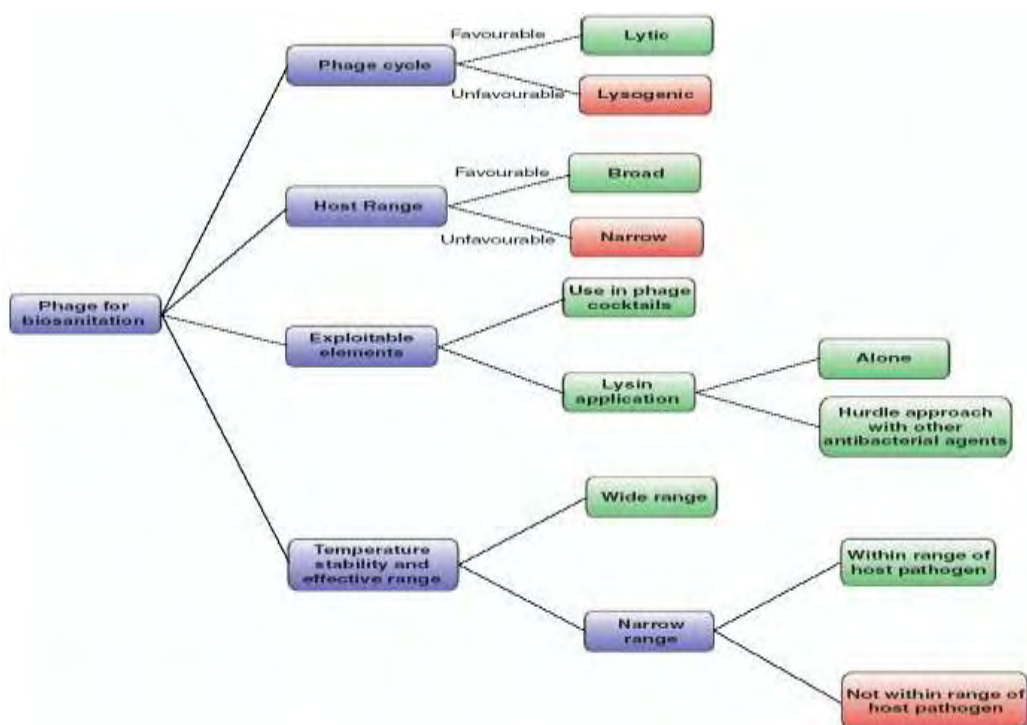
Υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο στις Η.Π.Α 1600 άτομα προσβάλλονται από την *L. monocytogenes* εκ των οποίων οι 260 πεθαίνουν (CDC.,2012c). Στην Ε.Ε το 2009 παρουσιάστηκαν 1657 κρούσματα λιστερίωσης με αποτέλεσμα τον θάνατο 8 ανθρώπων. Στην Δανία όπου και παρουσιάστηκε η μεγαλύτερη επίπτωση από τροφολοιμώξεις με *L. monocytogenes*, οι επιδημιολόγοι εντόπισαν πως αυτό οφείλεται στην αύξηση της κατανάλωσης σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση (ready to eat) από ηλικιωμένους ανθρώπους (ECDC.,2011). Το 99% από τα κρούσματα λιστερίωσης έχουν σαν πηγή τα τρόφιμα. Στις Η.Π.Α υπολογίζεται ότι το ετήσιο όφελος από την σωστή τήρηση των μέτρων ασφαλείας για τον περιορισμό της *L.monocytogenes* κυμαίνεται από 2,3 έως 22 δισεκατομμύρια δολάρια. Το κόστος τήρησης των μέτρων ασφαλείας αντίστοιχα κυμαίνεται από 0,1 έως 2,4 δισεκατομμύρια δολάρια.(Ivanek et al., 2004a). Το 2011 μια επιδημία λιστερίωσης σε 28 πολιτείες των Η.Π.Α η οποία προερχόταν από πεπόνια, είχε ως αποτέλεσμα τον θάνατο 30 ανθρώπων και κόστισε στους παραγωγούς 150 εκατομμύρια δολάρια (Food safety, 2011;CDC.,2012b). Στον Καναδά το 2008 ξέσπασε μια επιδημία λιστερίωσης με 57 επιβεβαιωμένα κρούσματα και 23 θανάτους (Hatt & Hatt.,2012). Η εταιρεία Maple leaf foods τα προϊόντα της οποίας ήταν υπεύθυνα για την επιδημία αποζημίωσε τους ασθενείς και τις οικογένειες των θυμάτων με 28 εκατομμύρια δολάρια (Canada listeriosis.,2008). Η *L.monocytogenes* είναι από τα παθογόνα, που θα πρέπει να αντιμετωπίζεται με μεγάλη προσοχή καθώς έχει δυνατότητα να επιζεί και να αναπτύσσεται σε πολλά τρόφιμα καθώς και σε διάφορες περιβαλλοντολογικές συνθήκες και να δημιουργεί βιομεβράνες με αποτέλεσμα την αντοχή στην απολύμανση (Arevalos-Sánchez et al.,2012 ;Hatt & Hatt.,2012; Truelstrup Hansen & Vogel.,2011).Μεταξύ των νέων τεχνολογιών που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα είναι: Παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία (PEF), υψηλή υδροστατική πίεση (HHP), ομοιογενοποίηση υψηλής πίεσης, παλλόμενο φως, ιονισμένη ακτινοβολία με ή χωρίς συνδυασμό με βακτηριοσίνες (Gálvez et al., 2010).

Η *L. monocytogenes* μπορεί να καταπολεμηθεί στα τρόφιμα με τη χρήση βακτηριοφάγων. Ο περιορισμός της *L. monocytogenes* με βακτηριοφάγους μπορεί να γίνει σε όλα τα στάδια παραγωγής των τροφίμων (σχήμα1) με τους εξής τρόπους: 1) με απευθείας χρήση τόσο στα ζώα όσο και στα τρόφιμα 2) με απολύμανση στις επιφάνειες μηχανημάτων, λαχανικών και φρούτων καθώς και σφάγιων των ζώων, 3) με επέκταση στο χρόνο ζωής ενός προϊόντος ως φυσικά συντηρητικά (García et al.,2008).



**Σχήμα 1.** Οι πιθανές χρήσεις των βακτηριοφάγων σε όλα τα στάδια της παραγωγής τροφίμων (από: García et al., 2008)

Μέχρι το 2006 το USDA είχε εγκρίνει δύο προϊόντα βακτηριοφάγων για την χρήση τους σε τρόφιμα, το List-Shield™, με τον βακτηριοφάγο LMP-102 και το Listex P100™. (Mahony et al., 2011). Η επιλογή του βακτηριοφάγου γίνεται βάση των διαδικασιών που απεικονίζονται στο Σχήμα 2



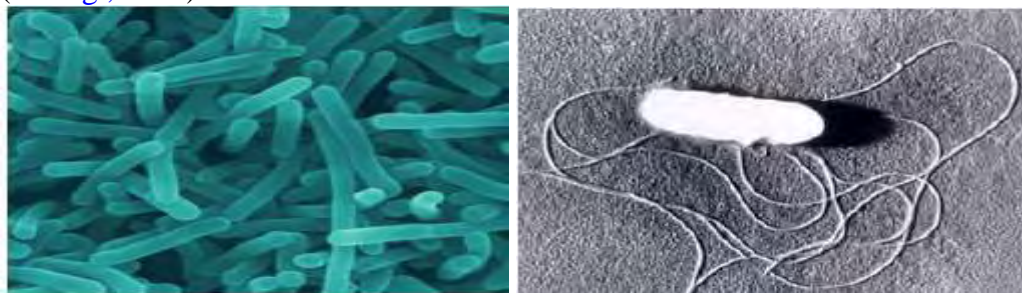
**Σχήμα 2.** Η σχηματική αναπαράσταση επιλογής βακτηριοφάγου, στα μπλε πλαίσια είναι οι ερωτήσεις που πρέπει να ληφθούν υπόψη στα πράσινα και στα κόκκινα είναι τα επιθυμητά και μη επιθυμητά αποτελέσματα αντίστοιχα (από :Mahony et al., 2011).

# 1. ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Listeria*

Υπάρχουν 9 είδη *Listeria* spp. τα οποία είναι: *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi*, *Listeria murrayi*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria marthii*, *Listeria rocourtiae* (Milillo et al.,2012; Zhang et al.,in press). Το παθογόνο είδος για τον άνθρωπο είναι η *L.monocytogenes*. Ο μικροοργανισμός περιγράφηκε πρώτη φορά ως βάκιλος το 1926 (Murray et al.,1926), με το πρώτο κρούσμα λιστερίωσης να αναφέρεται το 1929. Στους πληθυσμούς κινδύνου συμπεριλαμβάνονται τα άτομα που πάσχουν από AIDS, οι αλκοολικοί, οι διαβητικοί, άνθρωποι με καρδιολογικά προβλήματα, ασθενείς οι οποίοι κάνουν θεραπεία με κορτοστεροειδή και οι γυναίκες σε κατάσταση εγκυμοσύνης.(Ockerman & Basu, 1999; Pinar., 2011). Το ποσοστό θνησιμότητας σ'αυτές τις κατηγορίες κυμαίνεται από 20-40% (Kovačević et al.,2012; Lianou & Sofos.,2007). Από το 2001 ανήκουν στην οικογένεια *Listeriaceae* (Todar, 2012a).

## 1.1 Φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της *L.monocytogenes*

Η *L.monocytogenes* είναι ένα κινητό, Gram<sup>+</sup>, μικρο-αερόφιλο, μη σπορογόνο ραβδόμορφο βακτήριο του οποίου η διάμετρος κυμαίνεται από 0,4-0,5 μm και το μήκος του από 0,5-2 μm.(Σχήμα 3). Η *L.monocytogenes* είναι καταλάση θετική, ζυμώνει την ραμνόζη, δεξτρόζη και μαλτόζη αλλά δεν ζυμώνει την ξυλόζη και την μανιτόλη. Η κινητικότητα εκφράζεται καλύτερα σε θερμοκρασία 20 και 25 °C (Datta., 2003). Ενδοκυτταρικά κινείται χρησιμοποιώντας τον πολυμερισμό της ακτίνης (Young., 2006).

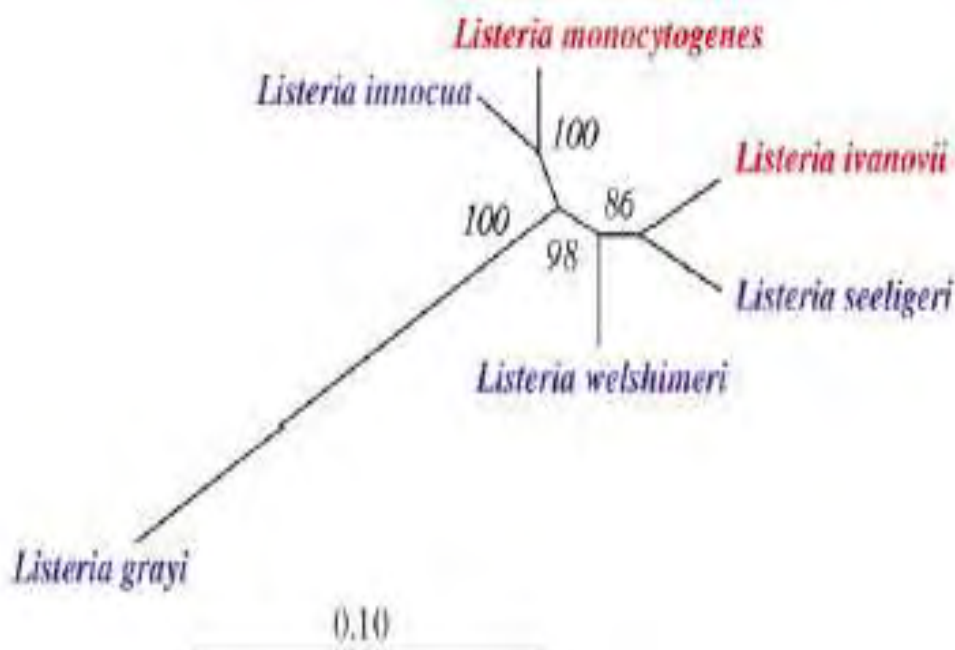


**Σχήμα 3.** *L.monocytogenes*, απεικόνιση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Στην δεξιά φωτογραφία είναι εμφανής τα όργανα κίνησης (βλεφαρίδες) (από: [The food safety file L.monocytogenes](#), 2008)

## 1.1.2 Γονιδίωμα και ορότυποι της *L.monocytogenes*

Οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ορότυποι που εμπλέκονται σε επιδημίες είναι κυρίως οι 1/2a, 1/2b και 4b (Low & Donachie., 1997; Wang et al.,2012; Thévenot et al.,2006; Clark et al.,2010). Τα στελέχη της *L.monocytogenes* χωρίζονται σε δύο ορότυπους βάσει του ειδικού θερμο-σταθερού σωματικού αντιγόνου O και του θερμο-ασταθούς βλεφαριδικού αντιγόνου H. Υπάρχουν 15 ορότυποι σωματικών αντιγόνων O (I-XV) και 4 ορότυποι βλεφαριδικών αντιγόνων H (A-D) (Jeyaletchumi et al., 2010). Οι ορότυποι των στελεχών καθορίζονται από έναν

μοναδικό συνδυασμό των αντιγόνων Ο και Η. Τουλάχιστον 13 ορότυποι (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab,4b, 4c, 4d, 4e και 7) έχουν βρεθεί για το γένος *Listeria* (Πίνακας 1). Η φυλογενετική ανάλυση βασισμένη στο 16S και 23S rRNA η οποία κωδικοποιεί τα γονίδια *prs*, *ldh*, *vclA*, *vclB* και *iap* υποδεικνύει ότι πέντε από τα έξι είδη *Listeria* χωρίζονται σε δύο ομάδες καταγωγής. Η *L.monocytogenes* και *L.innocua* αποτελούν τη μια ομάδα και οι *L.welshimeri*, *L. ivanovii*, και *L. Seeligeri* τη δεύτερη. Στο δεύτερη ομάδα η *L.welshimeri* φαίνεται να είναι το πιο μακρινό είδος ενώ η *L.grayi* δείχνει να είναι το πιο απόμακρο είδος μέσα στο γένος (Hain et al., 2006),(Σχήμα 4). Όλα τα είδη *Listeria* έχουν γονιδίωμα με μέγεθος από 2,7 έως 3,0 Mb. Σε σύγκριση με τα είδη *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L. Seeligeri*, και *L. Ivanovii* η *L.welshimeri* έχει το μικρότερο μέγεθος στο γονιδίωμα της, όπως και το μικρότερο περιεχόμενο σε G+C περίπου 36,4% (Hain et al.,2007). Η πλήρης αλληλούχηση του γονιδιώματος έχει πραγματοποιηθεί για τα στελέχη *Listeria innocua serovar 6a Clp11262*, *L.monocytogenes serovar 1/2a EGD-e*, *L.monocytogenes serovar 4b 4b F2365*, *Listeria welshimeri serovar 6b sv 6b SLCC5334* από το ινστιτούτο Pauster (An Integrated Environment for the Analysis of Microbial Genomes, nd ; Monk et al., 2008).



**Σχήμα 4.** Φυλογενετικό δένδρο του γένους *Listeria* βασισμένο στο 16S και 23S rRNA η οποία κωδικοποιεί τα γονίδια *prs*, *ldh*, *vclA*, *vclB* και *iap*. Με το κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα παθογόνα είδη και με το μπλε τα μη παθογόνα. (από: Hain et al., 2006)

Πίνακας 1. Ορότυποι του γένους *Listeria* (Low & Donachie., 1997)

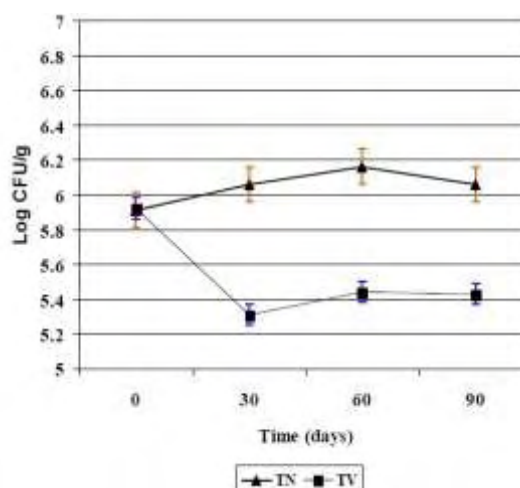
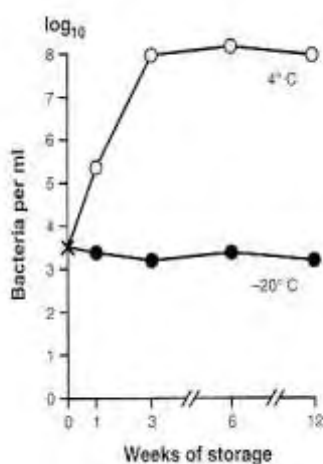
Προσδιορισμός		Αντιγόνο O	Αντιγόνο H
Κατά Paterson	Κατά Seeliger-Donker-Voet		
1	1/2a	I II (III)	AB
	1/2β	I II (III)	ABC
2	1/2c	I II (III)	BD
3	3a	II (III) IV	AB
	3b	II (III) IV(XII XIII)	ABC
	3c	II (III) IV(XII XIII)	BD
4	4a	(III) (V)VII IX	ABC
	4ab	(III) VVIVII IX X	ABC
	4b	(III) V VI	ABC
	4c	(III) V VII	ABC
	4d	(III) (V) VI VIII	ABC
	4e	(III) (V) VI (VIII X)	ABC
	5	(III) (V) VI (VIII) X	ABC
	7	(III) XII XIII	ABC
	6a(4f)	(III) V (VI VII) (IX) XV	ABC
	6b(4g)	(III) (V VI VII) IX X XI	ABC

## 1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της *L.monocytogenes*

Η συμπεριφορά των μικροοργανισμών που μπορούν να προκαλέσουν τροφικές δηλητηριάσεις ρυθμίζεται συνήθως από το βαθμό ανάπτυξής τους στα τρόφιμα. Ο ρυθμός με τον οποίο αναπτύσσονται επηρεάζεται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η ενεργότητα νερού (water activity-  $a_w$ ), η παρουσία αλατιού, η παρουσία οξυγόνου, η οξύτητα (pH) (McMeekin et al., 1997).

Η *L.monocytogenes* έχει την δυνατότητα να επιβιώνει σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και αυτό είναι ένα πρόβλημα στην βιομηχανία τροφίμων καθώς τρόφιμα που έχουν ψυχθεί σωστά μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη ή επιβίωση της (Ramaswamy et al. 2007; Cosentino et al., 2012; Collins et al., 2011). Στα σχήματα 5&6 φαίνεται η δυνατότητα που έχει να επιβιώνει ακόμα και στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Hof.,1996). Η Beverly.,(2004) με δείγμα καπνιστής γαλοπούλας απέδειξε ότι η *L.monocytogenes* έχει την δυνατότητα να επιζήσει σε μια περίοδο 90 ημερών στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ανεξαρτήτως τις συνθήκες ατμόσφαιρας (σε κενό και μη κενό). Για να γίνει αντιληπτό το τι ακριβώς βοηθάει την *L.monocytogenes* να επιζεί σε χαμηλές θερμοκρασίες μελετήθηκε ο μηχανισμός λειτουργίας της μεμβράνης του κυτταρικού

τοιχώματος και η δράση των ενώσεων του κυτταρικού τοιχώματος οι οποίες δρουν ωσμο-προστατευτικά και κρύο-προστατευτικά όπως η βεταΐνη και η καρνιτίνη (Ko et al., 1994; Angelidis & Smith., 2003a; Angelidis & Smith., 2003b). Σύμφωνα με την Lado., (2003) η δυνατότητα της *L.monocytogenes* να επιζεί σε τόσο χαμηλές θερμοκρασίες έχει την παρακάτω εξήγηση: Οι μεμβράνες των φωσφολιπιδίων βρίσκονται σε υγρο-κρυσταλλική κατάσταση για να παραμείνει η ρευστότητα τους αλλά και να μπορέσει να αναπτυχθεί σε χαμηλή θερμοκρασία. Η σύσταση των λιπαρών οξέων είναι αυτή που καθορίζει το πότε οι μεμβράνες βρίσκονται σε υγρο-κρυσταλλική κατάσταση. Η μεμβράνες της *L.monocytogenes* περιέχουν σε αναλογία περισσότερο από 96% διακλαδισμένες αλυσίδες λιπαρών οξέων (branch-chain fatty acids, σχήμα 8). Όταν αναπτύσσεται στους 37 °C η πλειονότητα των λιπαρών οξέων βρίσκεται στερεοχημικά σε κατάσταση ισομερούς C<sub>15:0</sub> (41-52%), C<sub>17:0</sub> (24-51%) και C<sub>15:0</sub> (2-18%). Όταν αναπτύσσεται στους 5 °C η στερεοχημική κατάσταση ισομερούς C<sub>15:0</sub> επικρατεί στο σύνολο των λιπαρών οξέων (65-85 % του συνόλου των λιπαρών οξέων). Αυτή η μείωση σε αναλογία των μεγάλων αλφατικών αλυσίδων (C<sub>17</sub>) και η αύξηση των ασυμμετρικών διακλαδώσεων μειώνει τις δυνάμεις Van den Waals. Αυτό το σφικτό «πακετάρισμα» των μεμβρανών των φωσφολιπιδίων σε χαμηλές θερμοκρασίες βοηθά τις μεμβράνες της *L.monocytogenes* να διατηρούν την ρευστότητα τους με αποτέλεσμα να μπορεί να επιβιώνει.



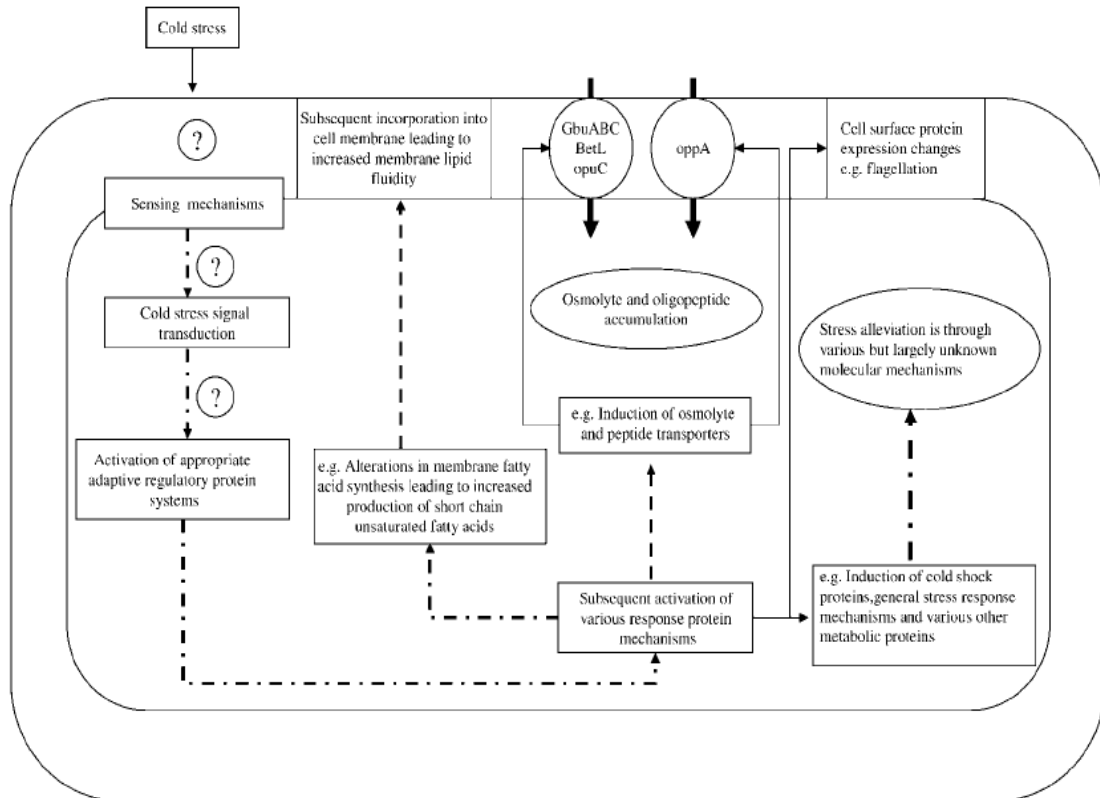
Σχήμα 5. Η επιβίωση της *L.monocytogenes* στους -20 °C

(Hof.,1996)

Σχήμα 6. Η επιβίωση *L.monocytogenes* στους -20 °C υπό κενό και μη

(Beverly.,2004)

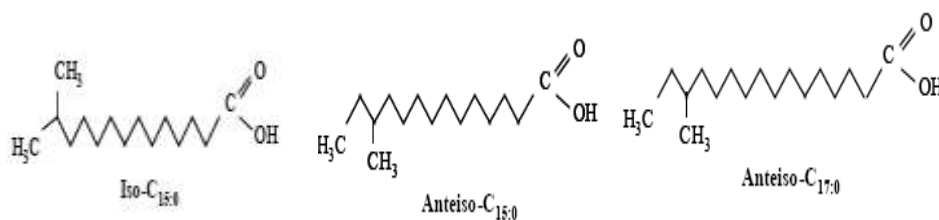
Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται συγκεντρωτικά οι παράγοντες που επιδρούν στην αντοχή της *L.monocytogenes* στο ψύχος.



**Σχήμα 7.** Η ακολουθία των μοριακών γεγονότων που πραγματοποιείται κατά την διαδικασία ενεργοποίησης της αντοχής στο ψύχος από την *L.monocytogenes*. Όταν το ψύχος γίνεται αντιληπτό από τα ριβοσώματα ενεργοποιείται ένα δίκτυο πρωτεϊνών το οποίο συμμετέχει στην αντοχή της *L.monocytogenes* στο ψύχος. Τα μη συνεχή βέλη υποδηλώνουν στάδια που πιθανώς εμπλέκονται στην εφαρμογή των μηχανισμών που αντιστέκονται στο ψύχος. Τα συνεχή βέλη υποδηλώνουν τα στάδια τα οποία ευθύνονται για την αλλαγή της δομής των λιπαρών οξέων αλλά και τους μηχανισμούς συσσώρευσης των οσμοπροστατευτικών ουσιών. (από: [Tasara & Stephan.,2006](#)). Τα γονίδια που ενεργοποιούν αυτές τις λειτουργίες φαίνονται στο πίνακα 2.

**Πίνακας 2.** Γονίδια που συμμετέχουν στον μηχανισμό αντοχής στο ψύχος της *L.monocytogenes* ([Tasara & Stephan.,2006](#))

Τύποι γονιδίων	Γονίδια
Γονίδια που σχετίζονται με τις κυτταρικές μεμβράνες	oppA, glubABC, betL, opuC, flaA, fbp
Προσαρμοστικά γονίδια σε ψυχτικό στρες	Orxf, sigB, rpoN, blgG, hfq, degU, yycJ
Γονίδια πρωτεϊνών υπό καθεστώς ψυκτικού Σοκ	cspLA, fri
Γονίδια που απαντώνται σε καθεστώς ψύχους	groEL, clpP, clpB



**Σχήμα 8.** Μοριακές δομές των λιπαρών οξέων των μεμβρανών της *L.monocytogenes* ([Lado.,2003](#))

Τον σημαντικό ρόλο του anteiso C<sub>15:0</sub> ανέδειξαν οι [Miladi et al., in press](#) οι οποίοι σύγκριναν τρία στελέχη *L.monocytogenes* τα οποία και αποθήκευσαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες (37, +4, -20 °C) τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα τρία στελέχη παρουσίασαν διαφορετική αύξηση του anteiso C<sub>15:0</sub> και αντίστοιχη μείωση του (C<sub>17</sub>) αποδεικνύοντας ότι η αναπροσαρμογή των μεμβρανών μετά την κατάψυξη διαφέρει από στέλεχος σε στέλεχος.

Ο οργανισμός υγείας του Καναδά (Health Canada) σε πρόσφατη έκδοση πολιτικής (Απρίλιος, 2011) για την *L.monocytogenes* στα τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση (ready to eat) σημειώνει το εύρος ανάπτυξης μεταξύ -0,4 – 45 °C. ([Canadian Health Federal Department, 2011](#)). Ο [Torad., \(2012b\)](#) ορίζει την ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 1 °C την καλύτερη στους 30-37 °C και την μέγιστη στους 45 °C. Σε επιστημονική επιτροπή για μέτρα που αφορούσαν την δημόσια υγεία υπό την εντολή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής υγείας το 1999 οι επιστήμονες της επιτροπής σημείωσαν τους παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη της *L.monocytogenes* (πίνακας 3)

**Πίνακας 3.** Όρια ανάπτυξης *L.monocytogenes* ([European Commission, 1999](#))

Παράγοντας	Ελάχιστο	Βέλτιστο	Μέγιστο
Θερμοκρασία °C	-0,4	37	45
pH	4,39	7,0	9,4
NaCl	-	-	10%
a <sub>w</sub>	(0,90) γλυκερόλη 30°C	-	-
a <sub>w</sub>	0,92 (NaCl)	-	-
a <sub>w</sub>	0,93 (σουκρόζη)	-	-

Οι κύριες πηγές λιστερίωσης είναι, το ωμό κρέας, τα απαστερίωτα γαλακτοκομικά, τα τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση και τα άπλυτα φρούτα ή λαχανικά ([Taillefer et al., 2010](#)). Όπως γίνεται αντιληπτό η ανάπτυξη της *L.monocytogenes* διαφέρει από τρόφιμο σε τρόφιμο καθώς επιδρούν πολλοί παράγοντες που έχουν να κάνουν με την πολυπλοκότητα του υποστρώματος αλλά και τις συνθήκες αποθήκευσης. Τόσο η Ε.Ε όσο και το FDA (Food and Drug Administration) των Η.Π.Α έχουν εκδώσει πίνακες με διάφορα τρόφιμα και παράγοντες που επιδρούν για την ανάπτυξη της.

**Πίνακας 4.** Χρόνος διπλασιασμού *L.monocytogenes* σε γαλακτοκομικά είδη ([European Commission, 1999](#))

Προϊόν	Χρόνος διπλασιασμού (h)	Θερμοκρασία °C	pH*	NaCl g/L*
Αποβουτυρωμένο γάλα	12,5	8	6,40	0,5
Κρέμα γάλακτος	6	13	6,40	0,5
Γάλα UHT	18,5 <sup>1</sup>	5	6,60	0,5
Χάλα χαμηλών λιπαρών	12	7	6,40	0,5
Τυρί camembert	18	6	6,10	2,4

1: Μέσος όρος σε διάστημα 13-24 h; \* Υποθετικά υπολογιζόμενα



**Πίνακας 5.** Χρόνος διπλασιασμού *L.monocytogenes* σε κρεατοσκευάσματα (European Commission, 1999)

Προϊόν	Χρόνος διπλασιασμού (h)	Θερμοκρασία °C	pH	NaCl g/L	NaNO <sub>2</sub> mg/L
Μπιφτέκι σε κενό	30	5,3	5,60	0,5*	0
Μαγειρεμένος κιμάς	10,8	8	5,80	0,5*	0
Ακατέργαστο κρέας χοιρινού	3,6	15	6,30	2	40
Κιμάς μπιφτεκιού	18,1	5	6,27	0,5*	0
Ζαμπόν σε κενό	16,4	10	6,63	2,77	170
Λουκάνικα Φρανκφούρτης	9	15	5,80	3,2	156
Μπούτι κοτόπουλο	19,3	6	6,52	0,5*	0

\* Υποθετικά υπολογιζόμενα

**Πίνακας 6.** Ρυθμός ανάπτυξης *L.monocytogenes* σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων (FDA, 2003)

Προϊόν	Θερμοκρασία °C	Ρυθμός ανάπτυξης (Log Cfu/g)	Εκθετικός ρυθμός ανάπτυξης στους 5 °C (Cfu/ημέρα)
<b>Καπνιστά Θαλασσινά</b>			
Σολωμός (Ψ)	4	2,1 log σε 28 ημέρες	0,107
Σολωμός (Ψ)	8	5,4 log σε 21 ημέρες	0,116
Πέστροφα (Θ)	4	0,5 log σε 20 ημέρες	0,035
Πέστροφα (Θ)	8-10	6,5 log σε 20 ημέρες	0,120

όπου Ψ: ψυχρό κάπνισμα, Θ: Θερμό κάπνισμα

Πίνακας 7. Ρυθμός ανάπτυξης *L.monocytogenes* σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων (FDA, 2003)

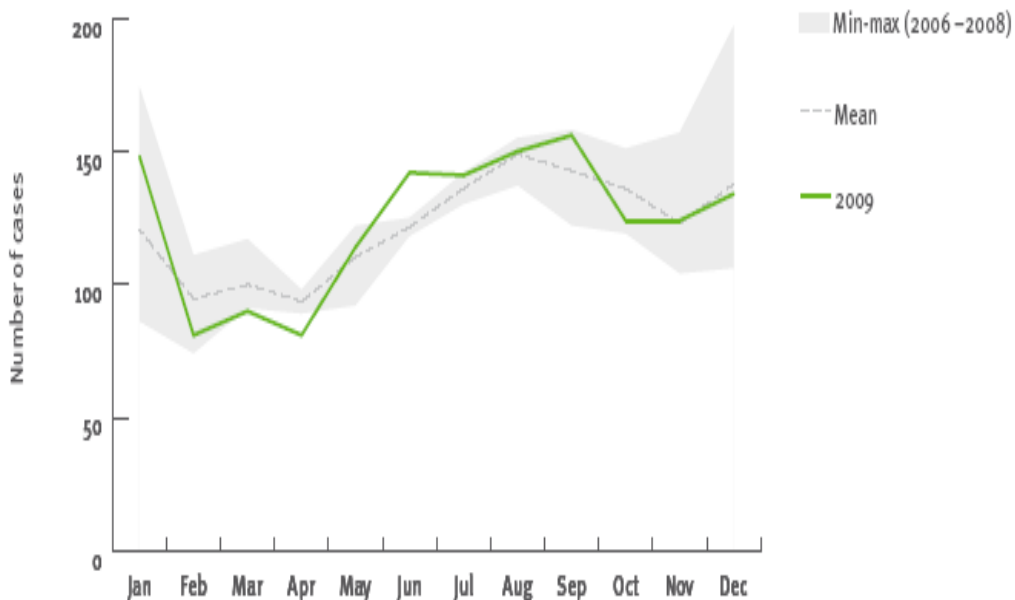
Προϊόν	Θερμοκρασία °C	Ρυθμός ανάπτυξης (Log Cfu/g)	Εκθετικός ρυθμός ανάπτυξης στους 5°C(Cfu/ημέρα)
<b>Έτοιμα για κατανάλωση</b>			
Καβουρόψιχα παστεριωμένη	5	3 log σε 10 ημέρες	0,300
<b>Λαχανικά</b>			
Βρόκολο	4	0,25 έως 0,5 log από 14 σε 21 ημέρες	0,059
Σαλάτα φρούτων	4	0,30 log σε 10 ημέρες	0,160
<b>Φρούτα</b>			
Χυμός πορτοκαλιού	4	1 log σε 35 ημέρες(pH=5)	0.041
Φέτες μήλου	10	2 log σε 6 ημέρες	0,102 (συσκευασμένα σε αέρα)
Φέτες μήλου	10	2,8 log σε 10 ημέρες	0,086(0,5% O <sub>2</sub> , 15% CO <sub>2</sub> )
<b>Γαλακτοκομικά</b>			
Τυρί cottage	8	0,59 log σε 18 ημέρες	0,015
Τυρί cottage	4	0,39 log σε 24 ημέρες	0,023
Τελεμές	8	2,2 log σε 36ημέρες	0,028
Τελεμές	4	0,42 log μείωση σε 36ημέρες	-0,017
Κρέμα τυριού	4	2 log μείωση σε 36ημέρες	-0,030
Φέτα	4	Επιβίωση >90 ημερών, 3,07 log μείωση σε 90ημέρες	0 -0,034
Φέτα	4	>2 log μείωση σε 8ημέρες	-0,250
Blue cheese	5	>2 log μείωση σε 36ημέρες	-0,056
Cheddar	4	1.17 log μείωση σε 34ημέρες	-0,049
Παστεριωμένο γάλα	4	2 log σε 7 ημέρες	0,407

### 1.3 Επιδημιολογικά δεδομένα λιστερίωσης στην Ε.Ε (2006-2009)

Τα επιδημιολογικά δεδομένα για την Ευρώπη καταγράφονται από το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου Λοιμώξεων (ECDC). Τα παρακάτω στοιχεία βασίζονται σε στοιχεία της επιδημιολογικής επιτήρησης του 2009 και σε στοιχεία και δεδομένα του έτους 2010. Η αναφορά δημοσιοποιήθηκε το 2011 (ECDC.,2011)

Το 2009 επιβεβαιώθηκαν 1685 κρούσματα λιστερίωσης από τα 1688 συνολικά που δηλώθηκαν από 28 χώρες. Η Πορτογαλία και το Λιχτενστάιν δεν ανέφεραν καθόλου κρούσματα ενώ η Κύπρος η Μάλτα και η Ισλανδία ανέφεραν μηδενικά κρούσματα. Η επίπτωση ανά 100000 πληθυσμού επιβεβαιώθηκε στο 0,35 που είναι ελαφρώς μεγαλύτερο σε σχέση με το 2008 αλλά καμία σημαντική τάση δεν παρατηρήθηκε σε σχέση με τις χρονολογίες 2006-09. Η υψηλότερη επίπτωση εμφανίστηκε στις σκανδιναβικές χώρες, Δανία (1,76/100000), Σουηδία (0,79/100000), Νορβηγία (0,65/10000) και Φινλανδία (0,64/10000) ακολουθημένη από το Λουξεμβούργο (0,61/10000). Όλες οι άλλες χώρες παρουσίασαν κάτω του 0,60. Τα περισσότερα επιβεβαιωμένα κρούσματα συνολικά τα παρουσίασαν η Γαλλία και Γερμανία.

Από τα 1676 επιβεβαιωμένα κρούσματα τα οποία παρουσίασαν και ηλικιακά στοιχεία η πλειοψηφία(58%) αυτών εμφανίστηκαν σε ηλικίες >65 ετών. Αυτό το ηλικιακό γκρουπ παρουσίασε επίπτωση 1,21/100000 με τα παιδιά κάτω των 5 ετών όπως και οι ηλικίες 45-64 να ακολουθούν με 0,31/100000. Η εποχικότητα φαίνεται στο σχήμα 9. Παρουσιάστηκε μόνο μία πολυεθνική έξαρση κρουσμάτων λιστερίωσης στην Ε.Ε λόγω κατανάλωσης ημίσκληρου τυριού. Από τα 34 κρούσματα που επιβεβαιώθηκαν 25 ήταν στην Αυστρία, 8 στην Γερμανία και ένα στην Τσεχία. Η διάμεσος της ηλικίας ήταν 72 ετών και 8 από τα κρούσματα είχαν θανατηφόρα κατάληξη.



Σχήμα9. Η εποχικότητα των κρουσμάτων λιστερίωσης

**Πίνακας 8.** Κρούσματα λιστερίωσης ανα χώρα της Ε.Ε και εκτός μεταξύ 2006-09 (ECDC.,2011) (συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα)

Χώρα	2009			2008			2007		2006		
	Εθνική κάλυψη	Τύπος αναφοράς	Σύνολο κρουσμάτων	Επιβεβαιωμένα		Επιβεβαιωμένα		Επιβεβαιωμένα		Επιβεβαιωμένα	
				κρούσματα και ποσοστό κοινοποίησης		κρούσματα και ποσοστό κοινοποίησης		κρούσματα και ποσοστό κοινοποίησης		κρούσματα και ποσοστό κοινοποίησης	
				Κρούσματα	ποσοστό	Κρούσματα	ποσοστό	Κρούσματα	ποσοστό	Κρούσματα	ποσοστό
Αυστρία	Y	C	46	46	0,55	31	0,37	20	0,24	10	0,12
Βέλγιο	Y	C	58	58	0,54	64	0,60	57	0,54	67	0,64
Βουλγαρία	Y	A	5	5	0,07	5	0,07	11	0,14	6	0,08
Κύπρος	Y	C	0	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,13
Τσεχία	Y	C	32	32	0,31	37	0,36	51	0,50	78	0,76
Δανία	Y	C	97	97	1,76	51	0,93	58	1,06	56	1,03
Εσθονία	Y	C	3	3	0,22	8	0,60	3	0,22	1	0,07
Φιλανδία	Y	C	34	34	0,64	40	0,75	40	0,76	46	0,88
Γαλλία	Y	C	328	328	0,51	276	0,43	319	0,50	290	0,46
Γερμανία	Y	C	394	394	0,48	306	0,37	356	0,43	508	0,62
Ελλάδα	Y	C	4	4	0,04	1	0,01	10	0,09	7	0,06
Ουγγαρία	Y	C	16	16	0,16	19	0,19	9	0,09	14	0,14
Ιρλανδία	Y	C	10	10	0,22	13	0,30	21	0,49	7	0,17
Ιταλία	Y	C	88	88	0,15	118	0,20	89	0,15	59	0,10
Λετονία	Y	C	4	4	0,18	5	0,22	5	0,22	2	0,09

Όπου :Αναφορά χώρας, Y= ναι, N= όχι, A= Συγκεντρωτικές αναφορές, C= βασισμένο σε αναφορά κρούσματος, <-> καθόλου αναφορά, U=απροσδιόριστο, (a) το σύστημα καλύπτει ποσοστό επιδημιολογικής επιτήρησης 25% του συνολικού πληθυσμού, (b)= το συνολικό ποσοστό αποκλείει δεδομένα από την Ισπανία

Πίνακας 7.(συνέχεια) (συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα)

Χώρα	2009					2008		2007		2006	
	Εθνική κάλυψη	Τύπος αναφοράς	Σύνολο κρούσμάτων	Επιβεβαιωμένα κρούσματα και ποσοστό κοινοποίησης		Επιβεβαιωμένα κρούσματα και ποσοστό κοινοποίησης		Επιβεβαιωμένα κρούσματα και ποσοστό κοινοποίησης		Επιβεβαιωμένα κρούσματα και ποσοστό κοινοποίησης	
				Κρούσματα	ποσοστό	Κρούσματα	ποσοστό	Κρούσματα	ποσοστό	Κρούσματα	ποσοστό
Λιθουανία	Y	A	5	5	0,15	7	0,21	4	0,12	0	0,00
Λουξεμβούργο	Y	C	3	3	0,61	1	0,21	6	1,26	4	0,85
Μάλτα	Y	C	0	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Ολλανδία	Y	C	47	44	0,27	45	0,27	68	0,42	64	0,39
Πολωνία	Y	C	32	32	0,08	33	0,09	43	0,11	28	0,07
Πορτογαλία	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ρουμανία	Y	C	6	6	0,03	0	0,00	0	0,00	-	-
Σλοβακία	Y	C	10	10	0,18	8	0,15	9	0,17	12	0,22
Σλοβενία	Y	C	6	6	0,30	3	0,15	4	0,20	7	0,35
Ισπανία <sup>a</sup>	N	C	121	121	-	88	-	82	-	79	-
Σουηδία	Y	C	73	73	0,79	60	0,65	56	0,61	42	0,46
Αγγλία	Y	C	235	235	0,38	206	0,34	260	0,43	209	0,35
<b>Ε.Ε Σύνολο</b>	-	-	1657	1654	0,35 <sup>b</sup>	1425	0,30 <sup>b</sup>	1581	0,34 <sup>b</sup>	1597	0,36 <sup>b</sup>

Όπου :Αναφορά χώρας, Y= ναι, N= όχι, A= Συγκεντρωτικές αναφορές, C= βασισμένο σε αναφορά κρούσματος, <-> καθόλου αναφορά, U=απροσδιόριστο, (a) το σύστημα καλύπτει ποσοστό επιδημιολογικής επιτήρησης 25% του συνολικού πληθυσμού, (b)= το συνολικό ποσοστό αποκλείει δεδομένα από την Ισπανία

Πίνακας 7.(συνέχεια)

Χώρα (εκτός Ε.Ε)	2009					2008		2007		2006	
	Εθνική κάλυψη	Τύπος αναφοράς	Σύνολο κρούσμάτων	Επιβεβαιωμένα κρούσματα και ποσοστό κοινοποίησης		Επιβεβαιωμένα κρούσματα και ποσοστό κοινοποίησης		Επιβεβαιωμένα κρούσματα και ποσοστό κοινοποίησης		Επιβεβαιωμένα κρούσματα και ποσοστό κοινοποίησης	
				Κρούσματα	ποσοστό	Κρούσματα	ποσοστό	Κρούσματα	ποσοστό	Κρούσματα	ποσοστό
Ισλανδία	Y	C	0	0	0,00	0	0,00	4	1,30	0	0,00
Λιχτενστάιν	-	-	-	-	-	0	0,00	0	0,00	-	-
Νορβηγία	Y	C	31	31	0,65	34	0,72	49	1,05	27	0,58
<b>Σύνολο</b>	-		1688	1685	0,35 <sup>b</sup>	1459	0,31 <sup>b</sup>	1634	0,35 <sup>b</sup>	1624	0,37 <sup>b</sup>

Όπου :Αναφορά χώρας, Y= ναι, N= όχι, A= Συγκεντρωτικές αναφορές, C= βασισμένο σε αναφορά κρούσματος, <-> καθόλου αναφορά, U=απροσδιόριστο, (a) το σύστημα καλύπτει ποσοστό επιδημιολογικής επιτήρησης 25% του συνολικού πληθυσμού, (b)= το συνολικό ποσοστό αποκλείει δεδομένα από την Ισπανία

### 1.3.1 Επιδημιολογικά δεδομένα λιστερίωσης στις Η.Π.Α (2010)

Στις Η.Π.Α το έτος 2010 το CDC κατέγραψε (CDC.,2012a) 568 επίσημα κρούσματα λιστερίωσης. Τα 468 κρούσματα (87%) δεν σχετίζονται με γυναίκες σε κατάσταση εγκυμοσύνης. 72 κρούσματα (13%) σχετίζονται με γυναίκες σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Η διάμεσος της ηλικίας ήταν τα 72 έτη για τις περιπτώσεις που δεν σχετίζονται γυναίκες σε κατάσταση εγκυμοσύνης και τα 28 για τις περιπτώσεις που σχετίζονται. Στους ασθενείς (γυναίκες) με ισπανική εθνικότητα το 43% σχετιζόταν με γυναίκες σε κατάσταση εγκυμοσύνης και 13% δεν σχετιζόταν. Το 20% των ασθενών που δεν σχετιζόταν με εγκυμοσύνη πέθαναν, όπως και το 19% των γυναικών σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Στα νεογνά το ποσοστό θανάτων άγγιξε το 6%. Το 49% των κρουσμάτων οφείλεται στον ορότυπο 4b και ακολουθούν, ο ορότυπος 1/2a (26%), ο ορότυπος 1/2b (16%), άλλοι ορότυποι (5%) και 3% χωρίς οροτυπία. Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών.

**Πίνακας 9.** Δημογραφικά στοιχεία ασθενών που δεν σχετίζονται με εγκυμοσύνη.

Χαρακτηριστικά (αριθμοί με πληροφορίες)	n	%
Ηλικία σε χρόνια (n=496)		
Διάμεσος (εύρος)	72(0-102)	
Θήλυ γένος (n=494)	220	45
Ισπανική εθνικότητα (N=393)*	51	13
Φυλή (N=418)*		
Λευκοί	340	81
Αφρικο-αμερικανοί	48	12
Ασιάτες	30	7
Πηγή απομόνωσης †		
Αίμα	417	85
CSF	69	14
Κόπρανα	2	<1
Άλλο§	40	8
Νοσηλεύτηκαν (n=464)	425	94
Πέθαναν(n=387)	76	20
* Δεν συμπεριλαμβάνει αναφορές με μη δηλωμένη εθνικότητα (n=101) ή φυλή (n=76)		
† 36 κρούσματα είχαν περισσότερες πηγές απομόνωσης		
§ Περιτοναϊκό υγρό, Τραύμα ή από άλλες πηγές		

**Πίνακας 10** Δημογραφικά στοιχεία ασθενών που σχετίζονται με εγκυμοσύνη

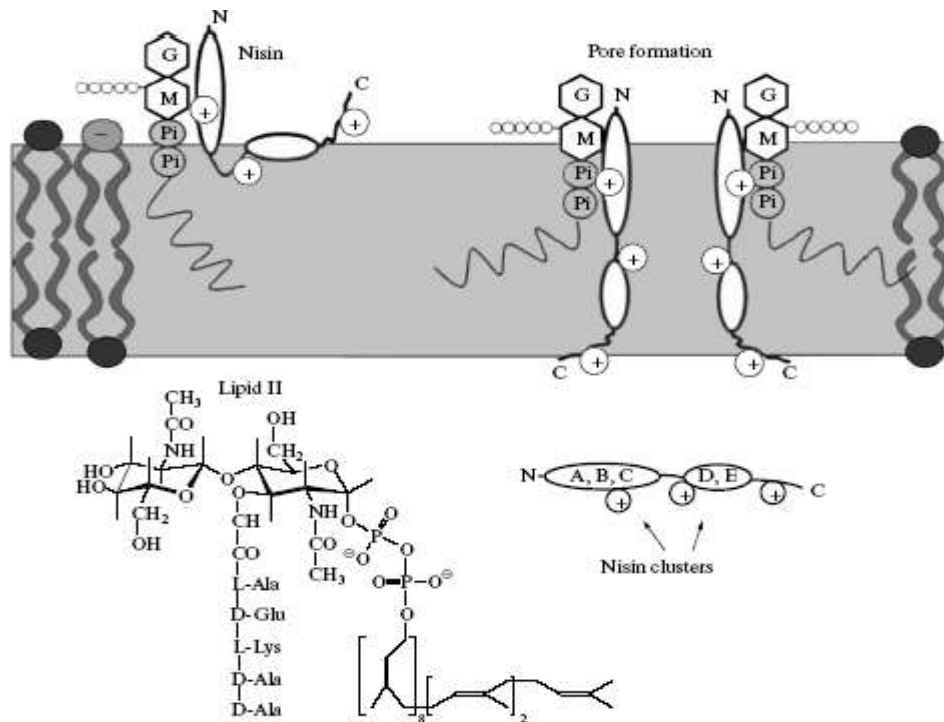
<b>Χαρακτηριστικά (αριθμοί με πληροφορίες)</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Ηλικία μητέρας σε χρόνια (n=52)		
Διάμεσος (εύρος)	28(7-39)	
Ισπανική εθνικότητα (N=65)*	28	43
Φυλή (n=57)*		
Λευκοί	45	79
Αφρικο-αμερικανοί	8	14
Ασιάτες	3	5
Άλλη /ες	1	2
Πηγή απομόνωσης †		
Αίμα νεογνού	33	45
Αίμα μητέρας	24	33
Πλακούντας	19	26
CSF από το νεογνό	9	12
Αμνιακό υγρό	1	1
Άλλο §	12	10
Νοσηλεύτηκαν (n=464)**		
Μητέρες(n=74)	38	51
Νεογέννητα(n=52)	47	90
Μετά την γέννηση (n=72)		
Γεννήθηκαν ζωντανά, επέζησαν	34	47
Γεννήθηκαν ζωντανά, πέθαναν	2	3
Γεννήθηκαν ζωντανά, άγνωστη κατάληξη	16	22
Θάνατος εμβρύου	14	19
Σε κατάσταση εγκυμοσύνης κατά την διάρκεια δημοσίευσης της έρευνας	6	8
<p>* Δεν συμπεριλαμβάνει αναφορές με μη δηλωμένη εθνικότητα (n=9) ή φυλή (n=17)</p> <p>† σε 1 κρούσμα αναφέρθηκαν 4 πηγές, σε 3 κρούσματα 3 πηγές και σε 16 κρούσματα 2 πηγές</p> <p>§ ουρά και άλλες πηγές</p> <p>** Νοσηλεία σχετικά με την <i>L.monocytogenes</i></p>		



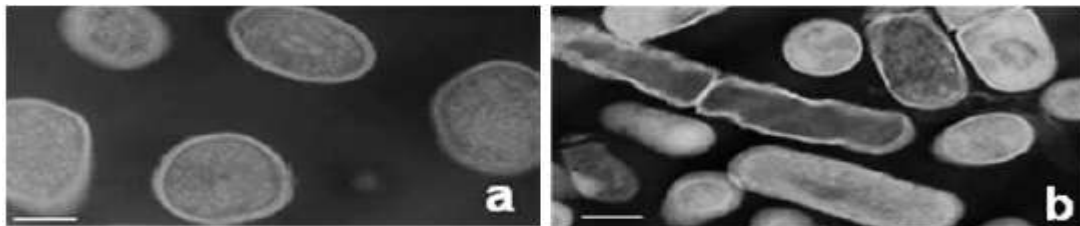
## 1.4 Νισίνη (E-234)

Η νισίνη παράγεται από οξυγαλακτικά βακτήρια και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική εναντίον των Gram<sup>+</sup> βακτηρίων. Η νισίνη είναι ποιο αποτελεσματική σε χαμηλά pH και είναι η μόνη εμπορικά διαθέσιμη βακτηριοκίνη που είναι αναγνωρισμένη ως συντηρητικό τροφίμων από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), από τον οργανισμό τροφίμων και γεωργίας (FAO) των Ηνωμένων Εθνών και το FDA. Έχει εγκριθεί σε πάνω από 70 χώρες για χρήση σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων όπως: γαλακτοκομικά, προϊόντα ζύμωσης, λαχανικά, κρέας, προϊόντα αρτοποιίας, προϊόντα υγρού αβγού, κονσερβοποιημένα τρόφιμα και μπίρα (Leverentz et al., 2003). Είναι ένα πολυπεπτίδιο μικρού M.B το οποίο έχει τη δυνατότητα να δράσει όχι μόνο σε κύτταρα αλλά και σε σπόρους μικροβίων. Οι σπόροι γίνονται πιο ευαίσθητοι παρουσία νισίνης. Ο μηχανισμός δράσης της έναντι των σπόρων είναι διαφορετικός από αυτόν των βακτηριακών κυττάρων καθώς έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με σουφλουδροξυλικές ομάδες που απατώνται σε ορισμένες πρωτεΐνες των βακτηρίων (Delves-Broughton, 1996). Η μεγαλύτερη διαλυτότητα παρατηρείται σε pH 2 (57 mg/mL) και η μικρότερη σε pH 8-12 (0,25 mg/mL) (Liu & Hansen, 1990).

Η νισίνη δεν απαιτεί κάποιον ειδικό πρωτεϊνικό υποδοχέα για να συνδεθεί καθώς έχει την δυνατότητα να συνδέεται με το λιπίδιο II (undecaprenyl- pyrophosphoryl-MurNAs-(pentapeptide)- GlcNAc, το λιπίδιο II συμμετέχει στην παραγωγή της πεπτιδογλυκάνης, είναι υπεύθυνο για την μεταφορά των υποομάδων του κυτταρικού τοιχώματος κατά το μήκος της κυταροπλασματικής μεμβράνης). Η δράση της νισίνης στο κυτταρικό τοίχωμα εξαρτάται με τους παρακάτω παράγοντες: 1) Την παρουσία αρνητικών φορτισμένων λιπιδίων, 2) Το δυναμικό της μεμβράνης 3) το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος και η παρουσία του λιπιδίου II. Η νισίνη έχει διπλή δράση στο κυτταρικό τοίχωμα, όταν συνδέεται με το λιπίδιο II μπλοκάρει την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιεί το λιπίδιο II για να προσκολληθεί η ίδια μέσα στην κυτταρική μεμβράνη όπου και «πυροδοτεί» τον σχηματισμό πόρων. Σε μεγάλη συγκέντρωση νισίνης μπορούν να σχηματιστούν πόροι χωρίς την παρουσία του λιπιδίου II. Ο μηχανισμός δράσης της, που προτείνεται είναι ο εξής: Στην αρχή η νισίνη συνδέεται με την φωσφορική ομάδα του λιπιδίου II, τότε το C-τερματικό του μορίου μεταφέρεται μέσα στην μεμβράνη και εμφανίζεται στην εσωτερική της μεριά. Σ' αυτό το σημείο το σημαντικότερο πράγμα είναι η κινητικότητα μεταξύ των τομέων A, B, C και D του μορίου της νισίνης. Η αλληλεπίδραση του μορίου της νισίνης με το λιπίδιο II έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό πόρων της τάξης των 2nm σε διάμετρο στην κυτταρική μεμβράνη. Για να σχηματιστεί ένας πόρος συμμετέχουν 8 μόρια νισίνης και 4 μόρια του λιπιδίου II (Stoyanova et al., 2012) (σχήμα 10).

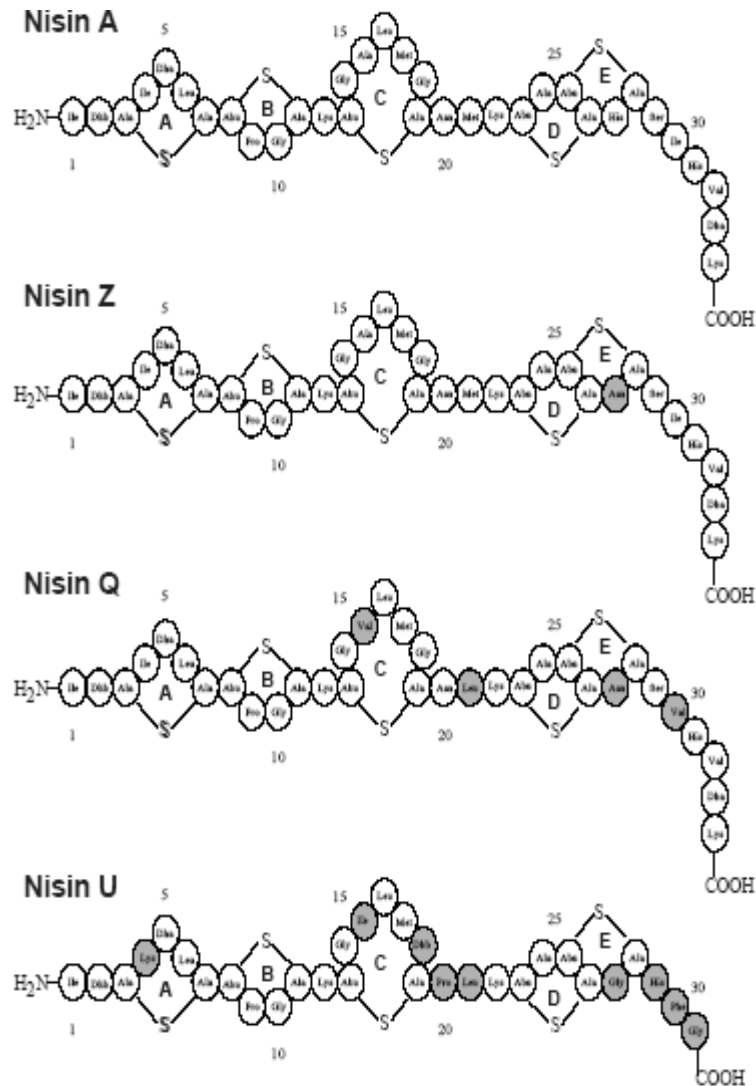


**Σχήμα 10.** Η αλληλεπίδραση του λιπιδίου II με την νισίνη για τον σχηματισμό πόρων. Όπου G: glutamine N<sub>2</sub>-acetylglucosamine ; M: N<sub>2</sub>-acetylmuramic pentapeptide (από: [Stoyanova et al., 2012](#))



**Σχήμα 11.** TEM (transmission electron microscopy) σε κύτταρα *L.monocytogenes*. a:μάρτυρας ; b: με συγκέντρωση νισίνης 6400 IU/mL σε TSBYE με επώαση για 3 ώρες στους 37°C. Φαίνεται η αλλαγή-ρήξη στην δομή της κυτταρικής μεμβράνης από την επίδραση της νισίνης (από: [Sivaroooban et al.,2008](#))

Ο σχηματισμός πόρων στην κυτταρική μεμβράνη έχει σαν αποτέλεσμα την διαρροή κυταροπλασματικών ουσιών από το κύτταρο (σχήμα11) ([Gandhi&Chikindas.,2007](#)). Έχουν αναφερθεί 4 διαφορετικές παραλλαγές της νισίνης, η νισίνη A, Z, Q και U. Εκτός από την U που παράγεται από τον *Streptococcus uberis* οι άλλες παραλλαγές παράγονται από τον *Lactococcus lactis*. Οι παραλλαγές A,Z,Q αποτελούνται από 34 αμινοξέα εκ των οποίων τα 8 είναι χημικά τροποποιημένα (μετά την βιολογική μετάφραση-posttranslational modification). Κάθε ένα από αυτά τα μόρια περιέχουν μία λανθιονίνη, τέσσερις μέθυλολανθιονίνες, δύο δυ-δέυδροαλανίνες και μία δυ-δέυδροβουτιρίνη. Οι λανθιονίνες σχηματίζουν έναν πενταμελή δακτύλιο (σχεδιάζονται ως δακτύλιοι A,B,C,D,E) και δύο από αυτούς τους δακτυλίους (D,E) συνδυάζονται για να σχηματίσουν έναν διπλό δακτύλιο. Η δομή της νισίνης U είναι σχεδόν το ίδιο μόνο που έχει 31 αμινοξέα και έχει μία δυ-δέυδροαλανίνη και δύο δέυδροβουτιρίνες ([Reunanen., 2007](#))(Σχήμα 12).



Σχήμα 12. Μοριακές δομές νισίνης A,Z,Q,U (από: [Reunanen., 2007](#))

Το μοριακό βάρος της νισίνης είναι 3357,07 Da με χημικό τύπο (νισίνη A)  $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ . Η νισίνη για εμπορικά σκευάσματα κυκλοφορεί σε μίγμα με χλωριούχο νάτριο και πρωτεΐνες (μη λιπαρά στερεά γάλακτος) με χαμηλότερη συγκέντρωση νισίνης έως και 2,25%. Η διεθνής μονάδα (IU) δίνεται για την νισίνη από τον WHO και αναφέρεται στην δραστηριότητα 0,001 mg προτεινόμενης προετοιμασίας (standard preparation of nisin,  $10^6$  IU/g) το οποίο περιέχει 25 ng νισίνης, ή η ποσότητα νισίνης που απαιτείται για να παρεμποδίσει την ανάπτυξη ενός κυττάρου *Streptococcus agalactiae* σε 1 mL broth ([FAO., 2007](#)). 1μg καθαρής νισίνης ισοδυναμεί με 40 IU ([Shannon et al., 2011](#)). Βάση της οδηγίας 96/77/EC, τα σκευάσματα της πρέπει να τηρούν κριτήρια καθαρότητας τα οποία ορίζουν ότι σε ένα μίγμα νισίνης με χλωριούχο νάτριο (ελάχιστο 50%) και πρωτεΐνες (μη λιπαρά στερεά γάλακτος) η δραστηριότητα δεν πρέπει να είναι μικρότερη από 900 IU/ mg. Η παραγωγή της γίνεται από τα στελέχη του *L.Lactis* κατά τη ανάπτυξή τους σε αποβουτυρωμένο γάλα, σε pH 6-7. Παράγεται κατά την λογαριθμική φάση ανάπτυξης και φτάνει στο μέγιστο παραγωγής στο τέλος αυτής όπου απομονώνεται (συμπυκνώνεται) με φιλτράρισμα μέσω μεμβρανών ([EFSA., 2006](#)).

Οι [Wan Norhana et al., \(2012\)](#) χρησιμοποιώντας νισίνη σε όξινα διαλύματα κατάφεραν να μειώσουν το πληθυσμό της *L.monocytogenes* κατά  $0,95 \log_{10}$  σε

γαρίδες υπό κενό αποθηκευμένες στους 4 °C. Οι Solomakos et al., (2008) με νισίνη (1000 IU/g) μείωσαν τον πληθυσμό της *L.monocytogenes* σε κιμά βοδινού κρέατος κατά 1,4 έως 1,6 log<sub>10</sub> σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 4 και 10 °C, αντίστοιχα. Για να αυξηθεί η σταθερότητα και η αποτελεσματικότητα της νισίνης χρησιμοποιείται η τεχνολογία της ενθυλάκωσης (encapsulation) όπου η νισίνη ενθυλακώνεται σε λιποσώματα – σωματίδια κολλοειδούς διασποράς τα οποία δημιουργούν «δίκτυα» από λιπιδικές διπλοστοιβάδες ικανές να εγκλωβίσουν τα διαλύματα της νισίνης (Malheiros et al., 2012; Zou et al., 2012). Μία ακόμα τεχνολογία είναι ο συνδυασμός ενθυλάκωσης της νισίνης από λιποσώματα και ακινητοποίησης πάνω σε βιοδιασπώμενο φιλμ συσκευασίας (Imran et al., 2012). Εκτός από τις παραπάνω, τεχνολογίες η νισίνη, μπορεί να συνδυαστεί και με αιθέρια έλαια από φυτά. Οι Razavi Rohani et al.,(2011) συνδύασαν αιθέρια έλαια από σκόρδο και νισίνη και παρατήρησαν μείωση στον πληθυσμό της *L.monocytogenes*.

## 1.5 Βακτηριοφάγοι

Οι βακτηριοφάγοι είναι ιοί που σαν στόχο έχουν βακτήρια και μάλιστα συγκεκριμένου είδους. Μερικοί βακτηριοφάγοι έχουν τόση ειδικότητα που προσβάλλουν συγκεκριμένα στελέχη κάποιου βακτηριακού είδους (Jagow & Teufer., 2007). Οι βακτηριοφάγοι αποτελούν «οργανισμούς» με την μεγαλύτερη αφθονία στην γή, υπολογίζεται ότι κάθε δευτερόλεπτο 10<sup>25</sup> βακτηριοφάγοι ξεκινούν ένα κύκλο μόλυνσης (McNerney & Traoré., 2005). Αυτή η ειδικότητα και ικανότητα να σκοτώνουν τα βακτήρια τους κατατάσσει στους φυσικούς εχθρούς των βακτηρίων. Ο όρος βακτηριοφάγος δόθηκε πρώτη φορά από τον μικροβιολόγο Félix d'Herelle το 1917 ο οποίος έκανε και την πρώτη θεραπεία με βακτηριοφάγο σε ένα μικρό αγόρι που έπασχε από δυσεντερία (Stone.,2002). Στα μέσα της δεκαετίας του 40 δημοσιεύτηκαν πολλές εργασίες σχετικά με την θεραπεία με βακτηριοφάγους εναντίον της δυσεντερίας όπως και για άλλου είδους ασθένειες.

Τα ινίδια της ουράς του βακτηριοφάγου αναγνωρίζουν την επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου, στην συνέχεια γίνεται ενσωμάτωση του γεννητικού υλικού στο γεννητικό υλικό του βακτηρίου, το οποίο με την βοήθεια του μηχανισμού αναπαραγωγής του βακτηρίου, κωδικοποιεί την δημιουργία των νέων σωματίων του βακτηριοφάγου. Αφού ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία ο νέος βακτηριοφάγος με την βοήθεια ενζύμων λύει το κύτταρο και εξέρχεται (Bradbury., 2004). Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται ενδο-λυσίνες και παράγονται κατά το τέλος του λυτικού κύκλου. Οι ενδο-λυσίνες δρουν μαζί με την χολίνη (πρωτεΐνη μικρού Μ.Β) και μπορούν να δράσουν και ως αυτόνομα αντιβιοτικά (Eugster et al., 2011; Schmelcher et al., 2012; Turner et al.,2007). Οι βακτηριοφάγοι που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο παθογόνων στα τρόφιμα απομονώνονται από περιβαλλοντολογικά δείγματα και από πηγές που δεν εμπλέκονται τρόφιμα (Greer.,2005). Τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχει ένας βακτηριοφάγος για την εφαρμογή του στα τρόφιμα είναι (Hagens & Loessne., 2010):

1. Ευρύ φάσμα στους ξενιστές (μόλυνση των στελεχών των στοχευόμενων ειδών και / ή γένους).
2. Αυστηρά λυτικό κύκλο.
3. Να μην μεταφέρει χαρακτηριστικά (DNA) από παθογόνους μικροοργανισμούς.
4. Πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματος.

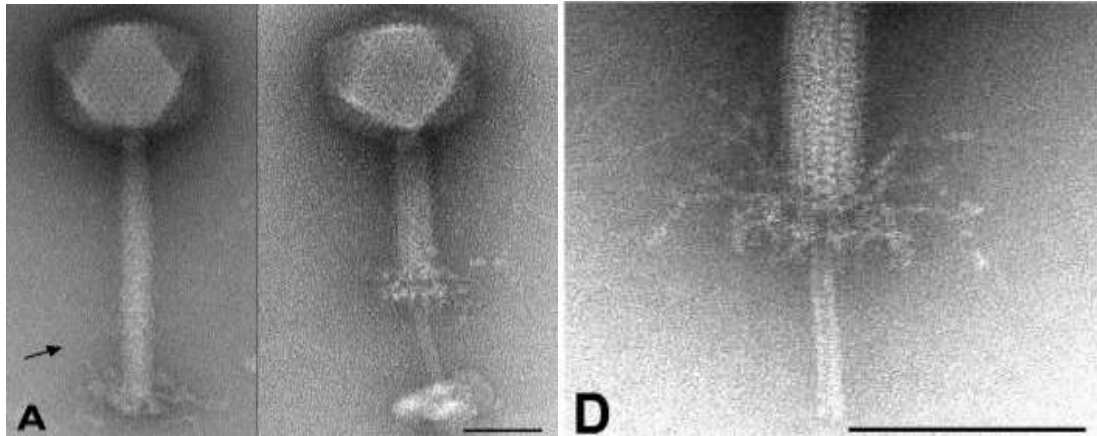
5. Απουσία γονιδίων που κωδικοποιούν αλλεργιογόνες πρωτεΐνες ή τυχόν παθογένεια
6. Μελέτες που να αποδεικνύουν μη παρενέργειες από την κατάποσή τους.
7. Αναγνωρισμένος για την ασφαλή χρήση σε τρόφιμα
8. Σταθερότητα κατά την χρήση και αποθήκευση.
9. Να μπορεί να παραχθεί σε εμπορική κλίμακα.

**Πίνακας 11.** Χαρακτηριστικά των βακτηριοφάγων που τείνουν να ευνοούν την χρησιμοποίησή τους για θεραπεία (Carlton., 1999)

Το «πρόβλημα»	Περιορισμοί αντιβιοτικών	Πλεονεκτήματα βακτηριοφάγων
Η κατάληξη του μορίου του αντιβιοτικού	Μεταβολική καταστροφή κατά την δράση του	Εκθετική ανάπτυξη, έτσι το «φάρμακο» κάνει τα περισσότερα από μόνο του όταν το απαιτεί η λοίμωξη
Η συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται να σκοτώσει ένα βακτήριο σε συγκεκριμένο φάσμα δράσης	Χρειάζονται πολλά μόρια αντιβιοτικού για να σκοτώσουν ένα βακτήριο. Μεταξύ των θεραπειών η υποθανάτια δόση που παίρνουν τα βακτήρια τα κάνει να αναπτύξουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά	Το φαινόμενο «όλα ή τίποτα». Ένα υϊκό σωματίδιο μπορεί να σκοτώσει ένα βακτηριακό κύτταρο
Η ικανότητα να υπερνικηθεί η βακτηριακή αντίσταση	Τα αντιβιοτικά είναι χημικός αμετάβλητα μόρια και δεν μπορούν να υιοθετήσουν την αλλαγή του βακτηρίου. Βακτήρια που μπορούν να αντισταθούν μπορούν να μεταφέρουν την ιδιότητα αυτή και σε άλλα είδη.	Οι βακτηριοφάγοι είναι «ζωντανό» «μικροοργανισμοί» όπου μπορούν να ανταποκριθούν στις αλλαγές των βακτηρίων. Π.Χ οι φίβρες τις ουράς μπορούν να ανταποκριθούν στην αλλαγή του υποδοχέα σε ένα βακτηριακό κύτταρο.
Η εξάπλωση της βακτηριακής αντίστασης	Τα αντιβιοτικά τείνουν να είναι ευρέως φάσματος έτσι, προκαλεί την αντίδραση και σε άλλα είδη εκτός του μικροοργανισμού στόχου	Και ένα είδος να γίνει ανθεκτικό σε ένα βακτηριοφάγο δεν σημαίνει ότι και τα άλλα είδη θα γίνουν

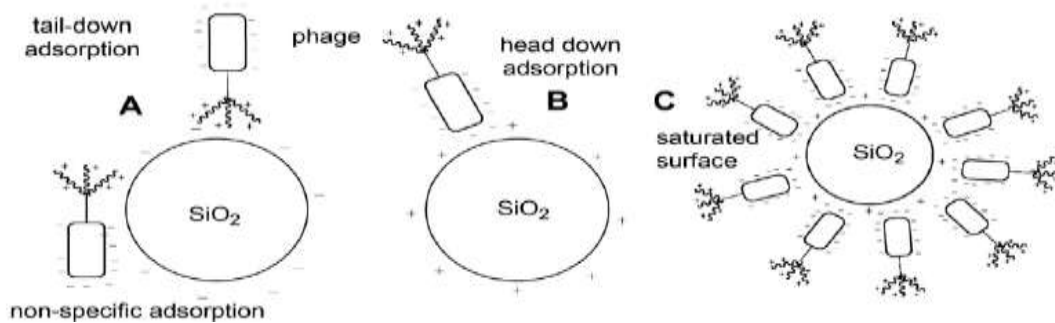
### 1.5.1 Μορφολογία, γονιδίωμα και χρήση βακτηριοφάγου P-100

Ο βακτηριοφάγος P-100 βάση την μορφολογία του ανήκει στην ομάδα SPO1 της οικογένειας Myoviridae (ds DNA, Hagens & Loessner., 2007) της τάξης Caudovirales και αποτελείται από ισομετρική κεφαλή και μακριά ουρά (σχήμα 13). Η διάμετρος της κεφαλής είναι  $89,55 \pm 2,37$  nm το μήκος της ουράς  $198,24 \pm 5,48$  nm και η διάμετρος της ουράς  $19 \pm 0,74$  nm. Έχει μακριά ινίδια τα οποία ξεχωρίζουν από τις κοντές απολήξεις (spikes) της βάσης. Ο σωλήνας-θήκη που περιβάλλει την ουρά έχει την δυνατότητα να ανεβαίνει με αποτέλεσμα να αποκαλύπτεται η ουρά. (Klumpp et al., 2008). Το γονιδίωμα του βακτηριοφάγου P-100 είναι DNA με σύνολο 1405715 bp. Στο δεξιό άκρο του γονιδιώματος κωδικοποιεί 18 tRNAs. Το γονιδίωμα έχει ομοιότητες με τον βακτηριοφάγο A511 και αποτελείται από χαμηλό σε G+C περιεχόμενο. Επίσης παρουσιάζει ομοιότητες με τους βακτηριοφάγους *Staphylococcus aureus phage K* και *Lactobacillus plantarum phage LP65*. (Carlton et al., 2005)



**Σχήμα 13.** E.M (electron microscopy). Μορφολογικά χαρακτηριστικά του βακτηριοφάγου P-100, διακρίνονται η κεφαλή, η ουρά και η θήκης της (A) και οι φίβρες (D). (από: Klumpp et al., 2008)

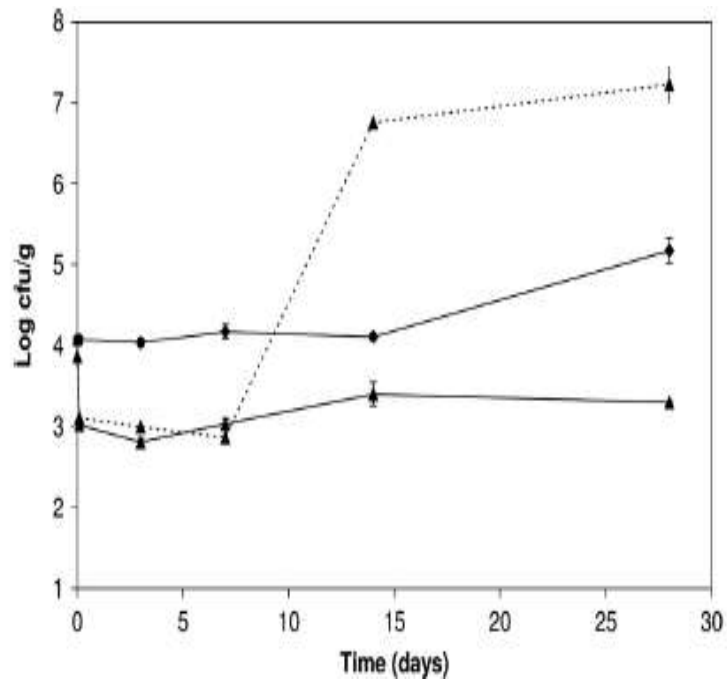
Ο βακτηριοφάγος P-100 εκτός από την χρήση του για τον έλεγχο της *L.monocytogenes* με τη προσθήκη του σε τρόφιμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την καταπολέμηση των βιομεμβρανών που δημιουργεί ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός σε επιφάνειες του εξοπλισμού στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων. Οι [Vanessa et al.,\(2012\)](#) κατάφεραν με την χρήση του P-100 να διαχωρίσουν με επιτυχία βιομεμβράνες *L.monocytogenes* σε επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα, η συγκέντρωση του φορτίου που χρησιμοποίησαν ήταν  $10^7$  rfu/mL. Οι [Hagens & Loessner.,\(2007\)](#); [Guenther & Loessner.,\(2011\)](#) σύγκριναν την δράση του βακτηριοφάγου A511 σε διάφορα είδη Λιστέριας και βρήκαν ότι ο συγκεκριμένος βακτηριοφάγος έχει ειδικότητα σε όλο το γένος *Listeria*. Οι [Guenther et al., \(2009\)](#) εξουδετέρωσαν την *L.monocytogenes* με την δράση του P-100 σε διάφορα τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση μεταξύ των οποίων, σοκολάτα, γάλα, τυρί mozzarella σε άλμη, hot dog, φέτες γαλοπούλας, καπνιστό σολομό, θαλασσινά, λάχανο και μαρούλι. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι βακτηριοφάγος P-100 έχει παρόμοια δραστηριότητα σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Η μείωση του πληθυσμού του παθογόνου για τα υγρά τρόφιμα ήταν κάτω από το όριο της απευθείας ανίχνευσης ( $10$  cfu/ mL για τα στερεά-από την αρχική αραίωση και  $1$  cfu/ mL για τα υγρά) και για τα στερεά η μείωση ξεπέρασε τους  $5$  log, ενώ η πιο δραστική συγκέντρωση φορτίου του ιού ήταν τα  $3 \cdot 10^8$  rfu/mL. Οι [Rossi et al.,\(2011\)](#) μόλυναν με *L.monocytogenes* λουκάνικα κοτόπουλου από την αγορά της Βραζιλίας για να παρατηρήσουν την μεταβολή του πληθυσμού της υπό την επίδραση του βακτηριοφάγου P-100. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους  $4$  °C για  $10$  ημέρες, ο βακτηριοφάγος κατάφερε να μειώσει κατά  $2,5$  log τον πληθυσμό της *L.monocytogenes* και να τον φθάσει κάτω από το όριο ανίχνευσης του μικροβίου. Μια άλλη προοπτική με για τους βακτηριοφάγους είναι η ηλεκτροστατική απορρόφηση (electrostatically- facilitated physisorption) επάνω σε τροποποιημένες επιφάνειες  $\text{SiO}_2$ . Οι [Cademartiri et al.,\(2010\)](#) αλλάζοντας το φορτίο στην επιφάνεια του  $\text{SiO}_2$  σε κατιονική (+) από ανιονική (-) με ειδικές χημικές ουσίες, κατάφεραν να απορροφήσουν διάφορους βακτηριοφάγους με την κεφαλή τους στο  $\text{SiO}_2$  εκθέτοντας έτσι την ελεύθερη την ουρά τους και να αδρανοποιήσουν βακτήρια μεταξύ αυτών και την *L.monocytogenes* (σχήμα 14).



**Σχήμα 14.** Ακινητοποίηση βακτηριοφάγων σε τροποποιημένες επιφάνειες SiO<sub>2</sub> (από: [Cademartiri et al.,2010](#))

## 1.6 Περιορισμός επιμόλυνσης *L.monocytogenes* με τη χρήση βακτηριοσίνης (νισίνης –E234) και βακτηριοφάγου

Η [Shannon et al.,\(2011\)](#) μελέτησαν την χρήση της νισίνης και λάδι τύπου Valencia το ψυχρής εκχύλισης χωρίς τερπενοειδή για τον περιορισμό της *L.monocytogenes*. Ο συνδυασμός των παραπάνω που μπορεί να προταθεί ως φυσικός τρόπος για την αναστολή της *L.monocytogenes* καθώς δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του παθογόνου. Οι [Soni et al.,\(2010a\)](#) μελέτησαν την επίδραση του βακτηριοφάγου P-100 στον πληθυσμό της *L.monocytogenes* σε φιλέτα γατόψαρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πληθυσμός μειώθηκε από 1-2 log στους 4 °C από 1,7-2,1 log στους 10 °C και από 1,6-2,31-2 log σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (22 °C). Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης και την δράση του βακτηριοφάγου και πάνω από 10 ημέρες (χρόνος ζωής του προϊόντος). Οι [Soni & Nannapaneni.,\(2010\)](#) χρησιμοποίησαν τον βακτηριοφάγο P-100 για να δουν την επίδραση του στην μείωση του πληθυσμού της *L.monocytogenes* σε φιλέτα σολομού. Ο βακτηριοφάγος κατάφερε να μειώσει το πληθυσμό της *L.monocytogenes* όπως επίσης να επιδείξει σταθερότητα πέρα από την διάρκεια ζωής του προϊόντος, η μείωση που επήρθε ήταν από 2,3 και 4,5 log σε 1,8 2,5 3,5 log στους 4 και 10 °C. Οι [Holck & Berg.,\(2009\)](#) μελέτησαν την δράση του βακτηριοφάγου P-100 και προστατευτική καλλιέργεια *Lactobacillus Sakei* TH1 κατά της *L.monocytogenes*. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 15.



**Σχήμα 15.** Η επίδραση του βακτηριοφάγου (▲;◇ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις) και της προστατευτικής καλλιέργειας (διακεκομμένη)



## 1.7 Διασταυρούμενη μόλυνση και αποφυγή αυτής

Ως διασταυρούμενη μόλυνση (cross contamination) εννοείται η μεταφορά άμεση ή έμμεση, βακτηριών ή ιών από ένα μολυσμένο τρόφιμο σε ένα μη μολυσμένο. Η έννοια μεταφορά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει τρεις πιθανές διαδρομές μόλυνσης, α) από τον αέρα στο προϊόν, β) από μια επιφάνεια σε ένα τρόφιμο μέσω υγρών, γ) από μία επιφάνεια σε ένα τρόφιμο μέσω επαφής. Το ποσοστό μεταφοράς (TR- transfer Rate) είναι το ποσοστό μεταφοράς βακτηριακών κυττάρων από την επιφάνεια δότη στην επιφάνεια αποδέκτη και δίνεται από τους παρακάτω τύπους (Pérez-Rodríguez et al., 2008):

$$TR = \frac{CFU_{\text{αποδέκτη}}}{CFU_{\text{δότη}}} * 100$$

Η αποδοτικότητα ανάκτησης των μικροοργανισμών από την επιφάνεια δότη στην επιφάνεια αποδέκτη επικυρώνεται χρησιμοποιώντας μια επιφάνεια αναφοράς (μάρτυρας) όπου εμβολιάζεται με την ίδια ποσότητα μικροοργανισμών χωρίς να συμμετέχει όμως στην μεταφορά. Υπολογίζεται το:

$$\text{Log μεταφερόμενων μικροοργανισμών} = \frac{\log(CFU_{\text{δότη}} + CFU_{\text{αποδέκτη}})}{\log(CFU_{\text{control}})}$$

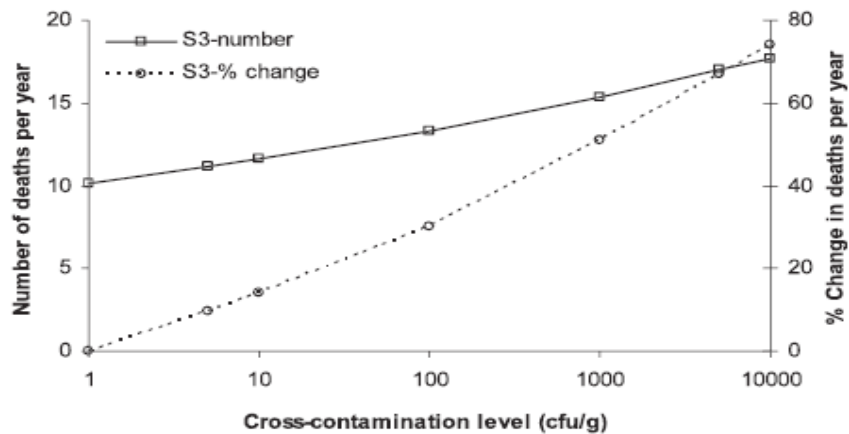
Όταν ο log λόγος είναι σημαντικά χαμηλό, σημαίνει ότι η απόδοση της ανάκτησης είναι χαμηλή ή υπήρξε λόγω περιβαλλοντολογικού στρες μείωση στον αριθμό των βακτηρίων, όταν αυτό δεν λαμβάνεται υπόψη (περιβαλλοντολογικό στρες) τότε υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να υποεκτιμηθεί η δυνατότητα μεταφοράς. Για αυτό τον λόγο θεσπίζεται ο «βαθμός ανάπτυξης» (baseline) ως ο λόγος:

$$\text{Βαθμός ανάπτυξης} = \frac{CFU_{\text{control}} \text{ μετά την επώαση}}{CFU_{\text{control}} \text{ προτού την επώαση}}$$

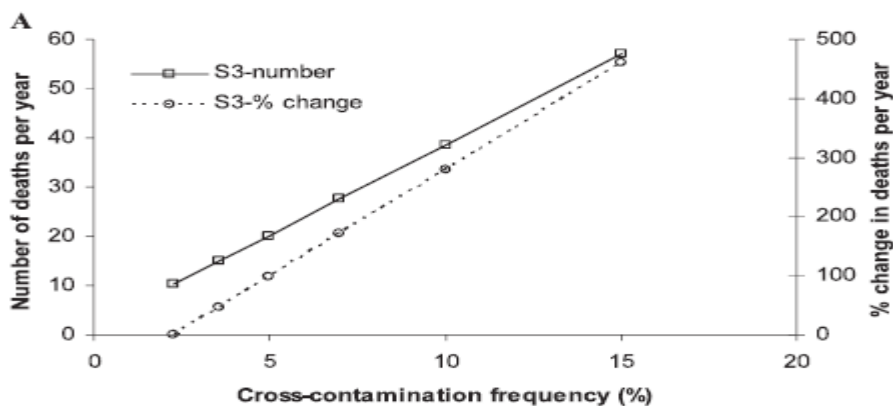
Και στην συνέχεια το νέο TR

$$TR = \frac{CFU_{\text{αποδέκτη}}}{\text{baseline}} * 100$$

Οι Pradhan et al., (2011) οι οποίοι έχοντας δεδομένα του ρυθμού ανάπτυξης της *L.monocytogenes* από προηγούμενες έρευνες (τα δεδομένα βρίσκονται στον διαδικτυακό τόπο του πανεπιστήμιου Cornell, Pradhan et al., (2008) προσομοίωσαν 3 σενάρια διασταυρούμενης μόλυνσης σε καταστήματα λιανικής για να προβλέψουν και τον ενδεχόμενο αριθμό θανάτων (σε ηλικιωμένους) λόγω λιστερίωσης. Το πρώτο σενάριο προέβλεπε καμία επιπρόσθετη επιμόλυνση στο μαγαζί, το δεύτερο ότι 2,3 % το προϊόντων (γαλοπούλα και ζαμπόν) επιμολύνθηκαν από είδη μολυσμένα προϊόντα και το τρίτο ότι το 2,3% των προϊόντων (γαλοπούλα και ζαμπόν) επιμολύνθηκαν από το περιβάλλον του καταστήματος. Ο σχετικός κίνδυνος λιστερίωσης όπου σχετιζόταν με θάνατο υπολογίστηκε για το δεύτερο σενάριο στο 5,9 και 6,1 για την γαλόπουλα και ζαμπόν αντίστοιχα. Ο σχετικός κίνδυνος λιστερίωσης για το τρίτο σενάριο (Σχήμα 16&17) υπολογίστηκε για την γαλόπουλα και ζαμπόν στο 4,9 και 5,8 αντίστοιχα. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η συχνότητα της διασταυρούμενης μόλυνσης στα μαγαζιά λιανικής είναι και ο κύριος παράγοντας ο οποίος επηρεάζει και τον σχετικό κίνδυνο λιστερίωσης η οποία συνδέεται με θάνατο.



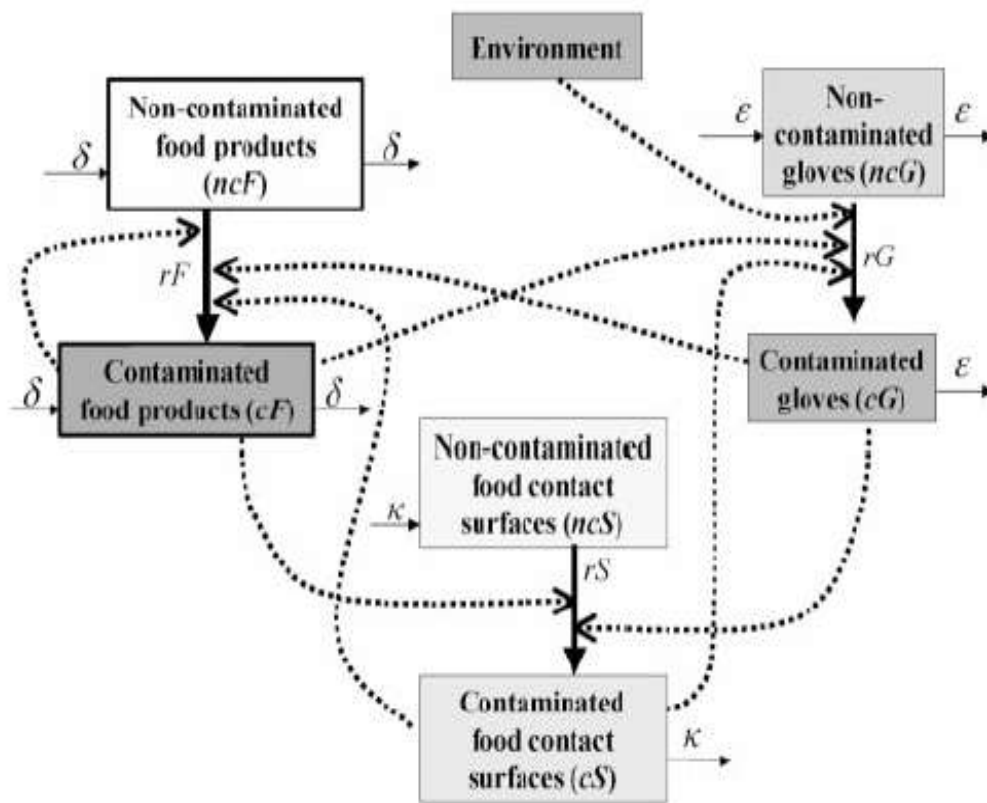
**Σχήμα 16.** Η επίδραση των επιπέδων της *L.monocytogenes* στον αριθμό θανάτων / έτος και η επίδραση μιας ενδεχόμενης αλλαγής στα επίπεδα διασταυρούμενης μόλυνσης, υπολογισμένα για το τρίτο σενάριο (S3) (από: Pradhan et al., 2011)



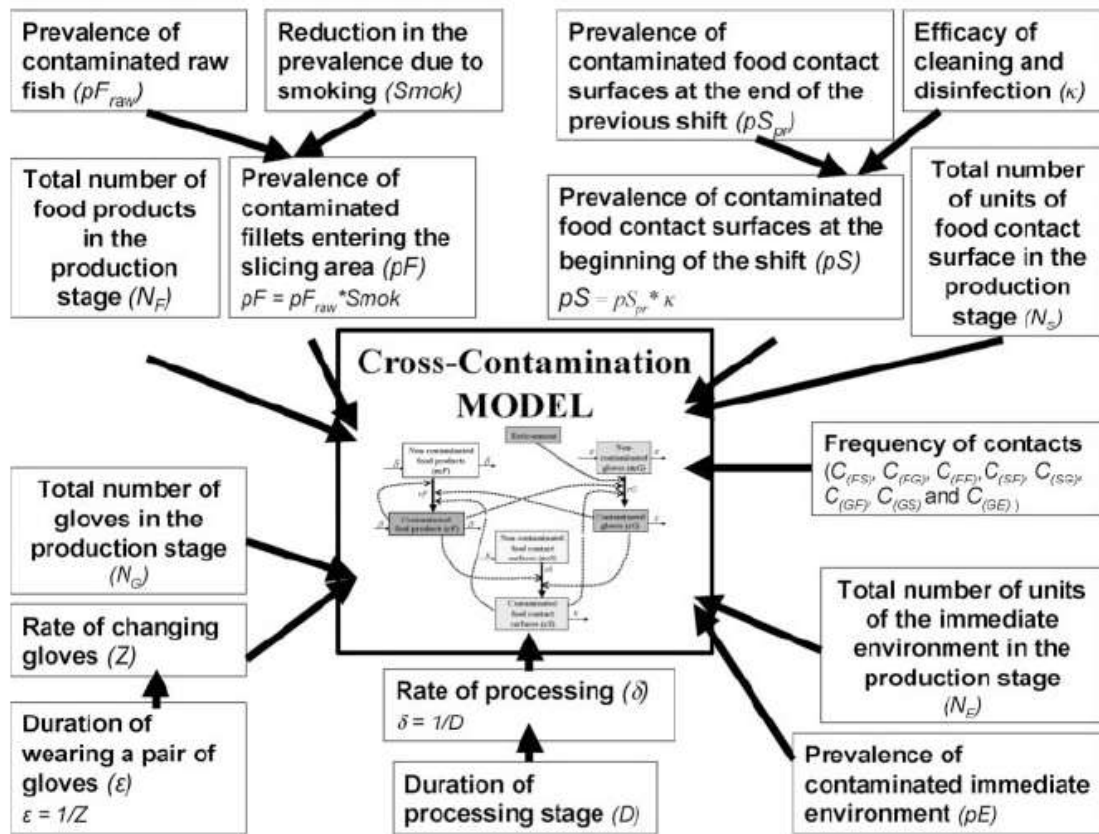
**Σχήμα 17.** Η επίδραση της αλλαγής της συχνότητας (2,3%) στην διασταυρούμενη μόλυνση στους θανάτους / έτος υπολογισμένη για το τρίτο σενάριο(S3). Μια αύξηση της τάξης του 2,7% (2,3 στο 5%) στην συχνότητα της διασταυρουμένης μόλυνσης έχει ως αντίκτυπο την αύξηση των θανάτων / έτος κατά 100+ %.(από: Pradhan et al., 2011)

Σε μια άλλη μελέτη για την διασταυρούμενη μόλυνση και την ανάλυση επικινδυνότητας σχετικά με την *L.monocytogenes* και τις περιπτώσεις που σχετίζονται με θάνατο από λιστερίωση, υπολογίστηκε ότι η επιμόλυνση που οφείλονται από τα μαγαζιά λιανικής πώλησης οφείλεται για το 76 και 63% των κρουσμάτων λιστερίωσης και των θανάτων αυτών σε ηλικιωμένους από προϊόντα ζαμπόν και γαλοπούλας αντίστοιχα τα οποία δεν περιείχαν αναστολείς ανάπτυξης. Επίσης η θερμοκρασία αποθήκευσης κάτω των 7 °C στα σπιτικά ψυγεία μειώνει την κίνδυνο θανάτου από λιστερίωση (Pradhan et al., 2010). Για να αξιολογήσουν την μεταφορά της *L.monocytogenes* και την ενδεχόμενη διασταυρούμενη μόλυνση που μπορεί να πραγματοποιηθεί σε φιλέτα μπιφτεκιών από μια μηχανή του κιμά οι Papadopoulou et al., (2012) επιμόλυναν με το παθογόνο σε τρία επίπεδα πληθυσμών 3,5,7 log/g δείγματα μπιφτεκιών. Μετά από 30 min εισήγαγαν το μολυσμένο δείγμα στην μηχανή και στην συνέχεια (ανά επίπεδο) εισήγαγαν άλλα 6 διαδοχικά μη μολυσμένα δείγματα μπιφτεκιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε όλα τα επίπεδα μόλυνσης έως και το τελευταίο δείγμα (7<sup>ο</sup>) είχε προκληθεί διασταυρούμενη μόλυνση με μόλις 2 log/g μείωση από το πρώτο έως το τελευταίο δείγμα. Ένα μαχαίρι μολυσμένο με *L.monocytogenes* μπορεί να μεταφέρει σε πολλά τρόφιμα τον μικροοργανισμό, το ποσοστό μεταφοράς από τις επιφάνειες των μαχαιριών

κυμαίνεται από 1-15% (Hoelzer et al., 2012). Οι Ivanek et al., (2004b) ανέπτυξαν ένα μαθηματικό μοντέλο για εντοπιστούν οι πιθανές διαδρομές της διασταυρούμενης μόλυνσης από *L.monocytogenes* σε εργοστάσιο επεξεργασίας ψαριών. Οι σημαντικότεροι παράγοντες είναι α) η συχνότητα που τα γάντια των εργαζομένων έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα, β) η συχνότητα αλλαγής των γαντιών, γ) η επαφή των τροφίμων με τις επιφάνειες. Το μοντέλο αυτό είναι σε θέση να υπολογίσει α) Τον αριθμό των μη μολυσμένων τροφίμων, β) τον αριθμό των μολυσμένων τροφίμων, γ) την πρόληψη μολυσμένων τροφίμων, επιφανειών και γαντιών προς το σύνολο αυτών/ χρόνο βάρδιας (διαθέσιμο από τον διαδικτυακό τόπο του πανεπιστημίου Cornell, Ivanek et al., 2004c). Το μοντέλο προβλέπει ότι η επιμόλυνση οφείλεται περισσότερο στις επαφές των γαντιών με τρόφιμα και επιφάνειες και πως ο καλύτερος χρόνος συλλογής για έλεγχο τελικών προϊόντων επιφανειών και γαντιών είναι στο τέλος της βάρδιας.

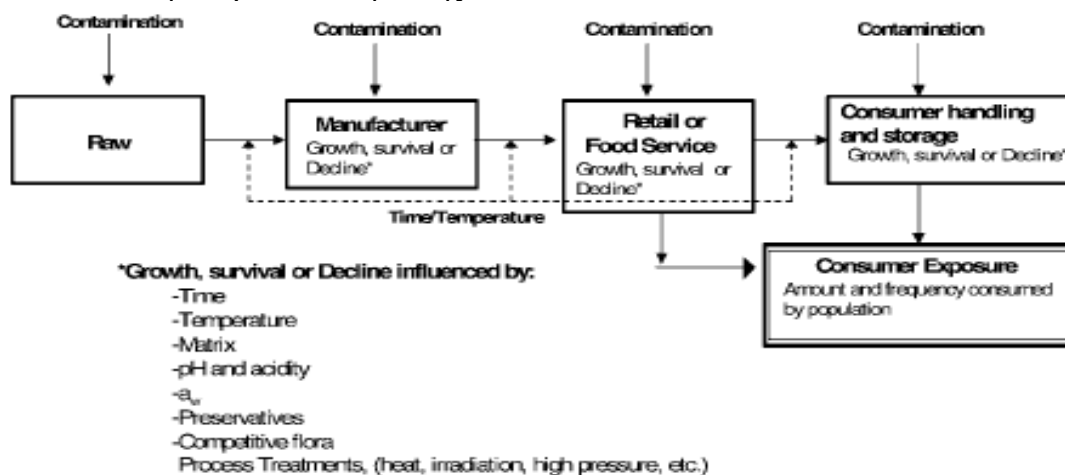


**Σχήμα 18.** Το μοντέλο ενδεχόμενης διασταυρούμενης μόλυνσης *L.monocytogenes* σε εργοστάσιο επεξεργασίας ψαριών. Η συμπαγής γραμμές αναπαριστούν την αλλαγή από μη επιμολυσμένη κατάσταση σε επιμολυσμένη. Οι διακεκομμένες γραμμές αναπαριστούν τις επιρροές από αυτές τις αλλαγές (από: Ivanek et al., 2004b).



Σχήμα 19. Σχηματική αναπαράσταση των παραμέτρων που ελήφθησαν υπόψη για την ανάπτυξη του μαθηματικού μοντέλου διασταυρούμενης μόλυνσης *L.monocytogenes* σε εργοστάσιο επεξεργασίας ψαριών. (από: Ivanek et al.,2004b)

Σύμφωνα με τον Walls.,(2005) μια μόλυνση από *L.monocytogenes* σε ένα προϊόν μπορεί να συμβεί σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα και προτείνει τρόπους για να μειωθούν τα κρούσματα λιστερίωσης.



Σχήμα 20. Παράγοντες που επηρεάζουν την μόλυνση των τροφίμων από *L.monocytogenes* (από: Walls.,2005)

Οι προτάσεις για την αποφυγή των κρουσμάτων λιστερίωσης είναι

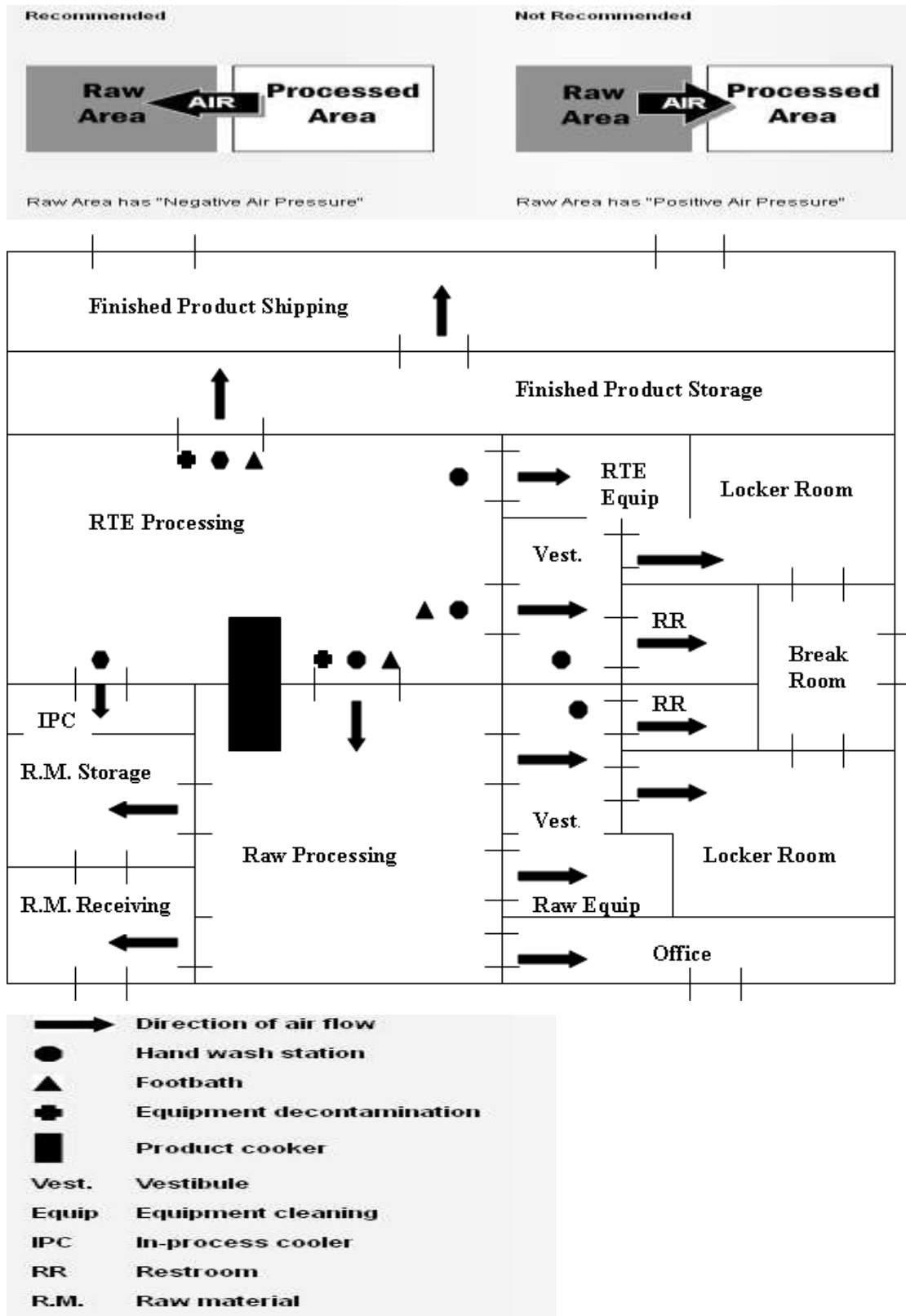
1. Οι ομάδες κινδύνου πρέπει να γνωρίζουν τα τρόφιμα υψηλού ρίσκου, τις θερμοκρασίες συντήρησης και πως να αποφεύγουν την διασταυρούμενη μόλυνση.
2. Οι ομάδες κινδύνου πρέπει να γνωρίζουν τις ιδιότητες των τροφίμων υψηλού ρίσκου οι οποίες είναι: α) έχουν την πιθανότητα να έρθουν σε επαφή με κύτταρα *L.monocytogenes*, β) μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της *L.monocytogenes*, γ) είναι έτοιμα προς κατανάλωση, δ) απαιτούν ψυγείο, ε) αποθηκεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα.
3. Θα πρέπει να γίνει διαχωρισμός μεταξύ τροφίμων υψηλού και χαμηλού κινδύνου.
4. Για να μειωθούν τα κρούσματα λιστερίωσης θα πρέπει να δοθεί βαρύτητα στις βιομηχανίες τροφίμων, και καταστήματα λιανικής πώλησης. Τρεις βασικές πολιτικές πρέπει να εφαρμοστούν α) πρόληψη για αποφυγή μόλυνσης των τροφίμων από *L.monocytogenes*, β) πρόληψη για την αποφυγή ανάπτυξης μεγάλου πληθυσμού *L.monocytogenes* στα τρόφιμα, γ) επιστημονικά βασισμένα σεμινάρια για την εκπαίδευση των πληθυσμών κινδύνου.
5. Οι βιομηχανίες τροφίμων και τα μαγαζιά λιανικής πώλησης θα πρέπει να διασφαλίσουν ότι το προσωπικό τους είναι σε θέση να καταλάβει στρατηγικές και συστήματα ελέγχου όπως, ορθής υγιεινής πρακτικής (GMP), ανάλυσης κινδύνου και έλεγχος των κρίσιμων σημείων (HACCP), ώστε να ελαχιστοποιήσει την περιβαλλοντολογική μόλυνση για αποτρέψει την διασταυρούμενη μόλυνση.
6. Ένα εντατικό πρόγραμμα για την λήψη δειγμάτων από τους χώρους επεξεργασίας τροφίμων είναι απαραίτητο, ώστε να ελέγχεται πιθανή μόλυνση σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση και ειδικά το πρόγραμμα θα πρέπει να εφαρμόζεται από εταιρείες που παράγουν τρόφιμα υψηλού ρίσκου.
7. Η παρακολούθηση για τον καθορισμό της πρόληψης και συγκέντρωσης του πληθυσμού της *L.monocytogenes* πρέπει να είναι συνεχής και πρέπει να επικεντρώνεται κυρίως στα τρόφιμα υψηλού κινδύνου.
8. Αποτελεσματικά εκπαιδευτικά προγράμματα θα πρέπει να επικεντρωθούν στα τρόφιμα υψηλού κινδύνου έτοιμα προς κατανάλωση, ο καθαρισμός, η απολύμανση, ο τρόπος αποθήκευσης και ο χρόνος ζωής θα πρέπει να γνωστοποιούνται στον τελικό χρήστη.
9. Τα εκπαιδευτικά εφόδια θα πρέπει να υπάρχουν για να βεβαιώνουν την σωστή θερμοκρασία ψύξης η οποία πρέπει να διατηρείται στους 4 °C ή και χαμηλότερα. Ενδείκνυται η χρήση θερμομέτρων για την επιβεβαίωση της θερμοκρασίας
10. Οι χειριστές τροφίμων σε ειδικές περιπτώσεις (νοσοκομεία, μαζική εστίαση) θα πρέπει να έχουν σαφής γνώση και κατανόηση όπως και τις κατάλληλες εγκαταστάσεις για εξασφαλίσουν την ασφάλεια των τροφίμων και αυτών που σερβίρουν.
11. Οι γιατροί, οι νοσοκόμες και οι διαιτολόγοι θα πρέπει να δίνουν κατάλληλες συμβουλές για τα τρόφιμα στους ασθενείς υψηλού κινδύνου.

Μερικά από τα ενδεχόμενα σενάρια για την επιμόλυνση από την *L.monocytogenes* σε μια βιομηχανία τροφίμων είναι τα παρακάτω (FDA.,2008).

1. Μια γραμμή συσκευασίας μεταφέρθηκε ή τροποποιήθηκε σημαντικά
2. Μεταχειρισμένα ή χρησιμοποιημένα μηχανήματα από άλλο εργοστάσιο χρησιμοποιήθηκαν στο διάγραμμα ροής
3. Μηχανική βλάβη ενός μηχανήματος

4. Επισκευές ή τροποποιήσεις στον χώρο παραγωγής τροφίμων έτοιμων προς κατανάλωση (π.χ αντικατάσταση καταψυκτικών, πατωμάτων ή τοίχων)
5. Ένας μη σχετικός με την *L.monocytogenes* καινούργιος υπάλληλος προσλήφθηκε στον χώρο παρασκευής φαγητών έτοιμα προς χρήση ή προσλήφθηκε για καθαρισμό των μηχανημάτων σε κρίσιμους χώρους.
6. Προσωπικό που χειρίζεται τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση άγγιξε επιφάνειες (π.χ κάδους, πάτωμα) και δεν άλλαξε τα γάντια ή δεν έκανε άλλες απαιτούμενες ενέργειες προτού έρθει σε επαφή με τα τρόφιμα.
7. Σε περιόδους μεγάλης παραγωγής εξαιτίας μη καθαρισμού.
8. Από μια διαρροή
9. Από μολυσμένα αιωρούμενα σωματίδια που έρχονται σε επαφή με συσκευές.
10. Ωμά προϊόντα ή προϊόντα υπό επεξεργασία αποθηκεύτηκαν σε χώρους για μαγειρεμένα.
11. Συχνές αλλαγές προϊόντων στην γραμμή συσκευασίας, με αποτέλεσμα την αλλαγή φιλμ συσκευασίας, καλουπιών, ταχύτητας γραμμής.
12. Το προσωπικό χρησιμοποιείται εναλλακτικά από την περιοχή των μη επεξεργασμένων προϊόντων στην περιοχή των επεξεργασμένων.
13. Η αυξημένη παραγωγή αναγκάζει να γίνει υγρός καθαρισμός σε ορισμένα μηχανήματα τα οποία μπορούν να συνυπάρχουν σε χώρο όπου άλλα μηχανήματα δουλεύουν.
14. Μέρη του εξοπλισμού, όπως κόσκινα και σκάφες πλένονται στο πάτωμα.
15. Κάδοι απορριμμάτων στον χώρο παραγωγής δεν είναι σωστά καθαρισμένοι ή διατηρημένοι.
16. Αντλίες επανακυκλοφορίας και γραμμές δεν είναι κατάλληλα καθαρισμένες και απολυμασμένες.
17. Ακατάλληλη χρήση των συστημάτων υψηλής πίεσης καθαρισμού.
18. Σπρέι νερού από τα οχήματα (τροχούς) μεταφοράς στα υπό επεξεργασία τρόφιμα.

Η προτεινόμενη διαμόρφωση του χώρου για την αποφυγή επιμόλυνσης από *L.monocytogenes* φαίνεται στο σχήμα 21. Ο προτεινόμενος καθαρισμός παρουσιάζεται στους πίνακες (11) & (12).



Σχήμα 21. Προτεινόμενη διαμόρφωση χώρου για την αποφυγή επιμόλυνσης από *L.monocytogenes* ανά διαμερίσματα σε βιομηχανία τροφίμων (από:FDA.,2008).

**Πίνακας 12.** Προτεινόμενο πρόγραμμα καθαρισμού και απολύμανσης για τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση. (FDA.,2008)

Θερμοκρασία δωματίου όπου βρίσκεται η επιφάνεια ( °C)	Συχνότητα καθαρισμού
≤ 5	Μικρότερη ή ίση με 24 ώρες
5-7	Μικρότερη ή ίση με 20 ώρες
7-10	Μικρότερη ή ίση με 16 ώρες
10-13	Μικρότερη ή ίση με 10 ώρες
Μεγαλύτερη από 13	Μικρότερη ή ίση με 4 ώρες

**Πίνακας 13.** Προτεινόμενο πρόγραμμα καθαρισμού και απολύμανσης για επιφάνειες, περιοχές ή εξοπλισμό που δεν έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση. (Tomprkin et al,1999)

Τύπος επιφανείας ή περιοχής	Συχνότητα καθαρισμού*
Αποχέτευση ή τοίχοι	Καθημερινά
Παλέτες	Καθημερινά
Κάδοι απορριμμάτων	Καθημερινά
Εργαλεία καθαρισμού	Καθημερινά
Δίσκοι συμπυκνωμάτων	Εβδομαδιαία
Θέσεις μοτέρ, σωληνώσεις, εξωτερικές επιφάνειες και κλειστά συστήματα επεξεργασίας	Μηνιαία
Οροφές και τοίχοι**	Μηνιαία
Καταψύκτες ωμών τροφίμων έτοιμα για κατανάλωση	Εξαμηνιαία
Παγομηχανές***	Εξαμηνιαία
Επιφάνειες όπου μπορούν δυναμικά να γίνουν πηγές επιμόλυνσης από <i>L.monocytogenes</i> , επιφάνειες όπου αγγίζονται από τους εργαζόμενους κατά την διάρκεια παραγωγής ή μπορεί να υπάρξει συσσώρευση υγρασίας	Καθημερινά

\*: Αν η περιβαλλοντολογικές αναλύσεις ή ο έλεγχος υποδηλώνουν πρόβλημα με την παρουσία *L.monocytogenes* προτείνεται η αύξηση της συχνότητας

\*\* : Αν οι επιφάνειες μπορούν δυναμικά να γίνουν πηγές επιμόλυνσης από *L.monocytogenes* προτείνεται η αλλαγή της συχνότητας σε καθημερινή βάση

\*\*\* : Αν ο κατασκευαστής προτείνει άλλη συχνότητα καθαρισμού, θα πρέπει να υπάρχει ταύτιση



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Δείγματα

Δείγματα τυροσαλάτας και Ταραμοσαλάτας (συσκευασίες των 500 g) πάρθηκαν με τυχαία δειγματοληψία από υπέρ αγορά της πόλης της Λάρισας και μεταφέρθηκαν υπό ψύξη στο εργαστήριο. Για την αποφυγή σφαλμάτων κατά την μέτρηση του πληθυσμού της *L.monocytogenes* τα δείγματα υποβλήθηκαν σε μικροβιολογικό έλεγχο για παρουσία του μικροοργανισμού με την μέθοδο 11290-1:1996/Amd.1:2004. Η σύσταση των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στο πίνακα 14. Από τις αρχικές συσκευασίες δημιουργήθηκαν σε αποστειρωμένες σακούλες stomacher 88 δείγματα των 30g.

**Πίνακας 14.** Η σύσταση των σαλατών που χρησιμοποιήθηκαν

Θρεπτικά στοιχεία/100 g	Ταραμοσαλάτα- taramasalad“Salvis”	Τυροσαλάτα- Hot cheese salad “Salvis”
Πρωτεΐνες <sup>a</sup>	2,3 g	8,2 g
Υδατάνθρακες <sup>a</sup>	6,0 g	4,6 g
Εκ των οποίων σάκχαρα	1,6 g	2,3 g
Λιπαρές ύλες <sup>a</sup>	52 g	18,6 g
Εκ των οποίων κορεσμένα λιπαρά οξέα	3,7g	3,3 g
Εδώδιμες ίνες <sup>a</sup>	2,0 g	0,7
Νάτριο <sup>a</sup>	0,7 g	0,8
pH <sup>b</sup>	4,40	4,55
Ιξώδες (mPa.S) <sup>c</sup> στους 10 <sup>0</sup> C	291710	222970
% υγρασία <sup>d</sup>	35,24	68,82

<sup>a</sup>: Σύμφωνα με την ετικέτα διατροφικής επισήμανσης; <sup>b</sup> Hanna pH 210 (Hanna Instruments, Athens, Greece); <sup>c</sup>δυναμικό ιξώδες- Raypa RP1 L4 2 rpm 10<sup>0</sup>C (Raypa - R. Espinar, S.L., Terrassa, Spain); <sup>d</sup> Telstar Cryodos 80 freeze dryer (Telstar Industrial, S.A., Terrassa, Spain)

### 2.2 Πρότυπα στελέχη *L.monocytogenes*

Για τον πολλαπλασιασμό του προτύπου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τους [Soniet al., \(2010α\)](#).

Πραγματοποιήθηκε ανασύσταση των προτύπων στελεχών *L.monocytogenes* 1/2a (NCTC 7973) (2.12-21) και 4b (NCTC 11994) (2.12-21) με 1-1,5 mL tryptic soy broth. Στην συνέχεια ανά στέλεχος οι ανασυστάσεις μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρησης των 15 mL όπου συμπληρώθηκε ο όγκος έως 10 mL με tryptic soy broth. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 24 h. Μετά το πέρας της επώασης

πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 1600 rpm και 4 °C για 10 min έως ότου επιτευχθεί συσσωμάτωση των κυττάρων. Τα κύτταρα και από τους δυο σωλήνες μεταφέρθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρησης ο οποίος περιείχε 20 mL 0,8% NaCl (2.12-15). Η συγκέντρωση (Cfu/mL) μετρήθηκε με την μέθοδο καταμέτρησης κατά ISO 11920-2:1998 (ενοφθαλμισμός απευθείας στο εκλεκτικό υπόστρωμα ALOA(2.7-3) μετά από αραιώσεις του εύρους  $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ). Μετά την μέτρηση προστέθηκαν 20 mL BPW(2.7-14) για αποφευχθεί το στρεσάρισμα του μικροοργανισμού κατά την αποθήκευση προτού την χρήση. Το εναιώρημα (40 mL) ήταν και το αρχικό εναιώρημα από το οποίο έγινε και η περαιτέρω αραιώση για την δημιουργία του ενοφθαλμίσματος (Βλέπε παράτημα υπολογισμών § 1ΠΥ).

### 2.3 Παρασκευή ενοφθαλμίσματος

Ως πληθυσμό ενοφθαλμίσματος χρησιμοποιήθηκαν 100 Cfu/g δείγματος το οποίο είναι και το όριο που θέτει η Ε.Ε. για την *L. monocytogenes* για τρόφιμα που διατίθενται στην αγορά κατά την διάρκεια συντήρησης τους σύμφωνα με τον κανονισμό 2073/2005/EC περί μικροβιολογικών κριτηρίων στα τρόφιμα. Για να αντιμετωπιστεί το προβλήματα σωστής ομογενοποίησης καθώς η σαλάτες εμφανίζουν υψηλό ιξώδες και ενδεχόμενη «παγίδευση» του εναιωρήματος από οπές στην μάζα χρησιμοποιήθηκαν 500 mL ως όγκο εμβολιασμού.

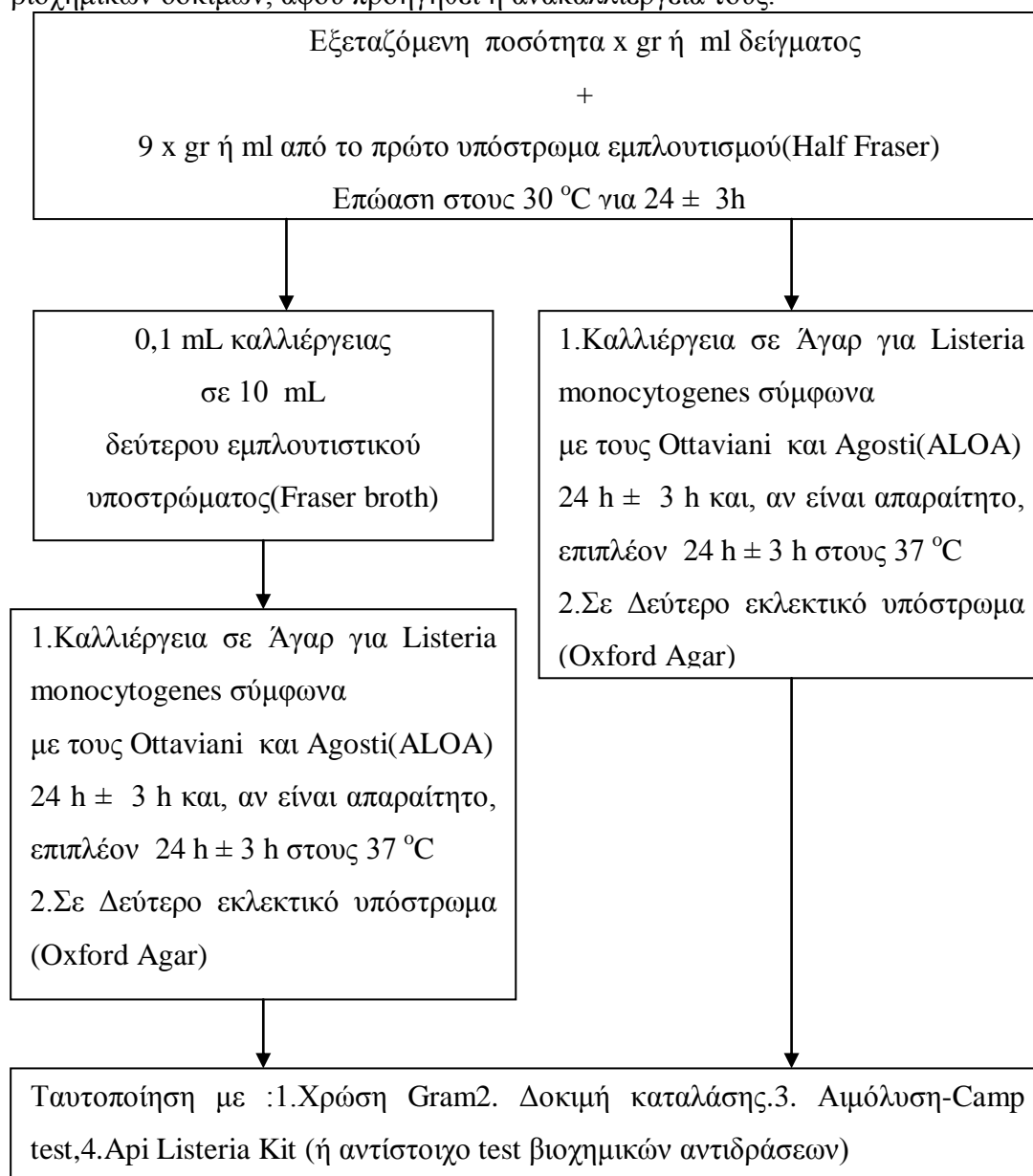
### 2.4 Μεταχείριση δειγμάτων με τη προσθήκη βακτηριοφάγου P-100

Δείγματα 30g επιμολύνθηκαν με 100 Cfu/g *L.monocytogenes*. Στα δείγματα προστέθηκαν 3 επίπεδα συγκεντρώσεως του φορτίου βακτηριοφάγου P-100 0,(μάρτυρας),  $10^3$ ,  $10^7$  Pfu/g. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4 °C για συνολικό χρόνο 1 εβδομάδας. Ενδιάμεσα (1<sup>η</sup> ημέρα αποθήκευσης και 3<sup>η</sup> ημέρα αποθήκευσης) όπως και την 7<sup>η</sup> τα δείγματα ελέγχθησαν για τον πληθυσμό της *L.monocytogenes* με την μέθοδο κατά ISO 11920-2:1998. Κάθε δείγμα ανά επίπεδο φορτίου βακτηριοφάγου υποβλήθει σε 4 επαναλήψεις (βλέπε πίνακα 18).

## 2.5 Μικροβιολογική ανάλυση κατά 11290-1:1996/Amd.1:2004

Η ανίχνευση των βακτηρίων του γένους *L. monocytogenes* περιλαμβάνει 4 διαδοχικά στάδια:

1. τον πρώτο εμπλουτισμό σε εκλεκτικό υπόστρωμα χαμηλής συγκέντρωσης σε εκλεκτικούς παράγοντες (Half Fraser broth)(2.12-1)
2. τον δεύτερο εμπλουτισμό σε εκλεκτικό υπόστρωμα πλήρους συγκέντρωσης σε εκλεκτικούς παράγοντες (Fraser broth),(2.12-2.)
3. τον ενοφθαλμισμό σε δύο στερεά εκλεκτικά υποστρώματα (ALOA και Oxford agar).(2.12-3, 2.12-4)
4. την επιβεβαίωση του είδους μέσω μορφολογικών, φυσιολογικών και βιοχημικών δοκιμών, αφού προηγηθεί η ανακαλλιέργεια τους.



**Σχήμα 22.** Διάγραμμα ροής για την ανίχνευση της *L.monocytogenes* κατά ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004

### 2.5.1 Ταυτοποίηση *L.monocytogenes*

Τα στελέχη του γένους *L.monocytogenes* είναι μικρά, Gram+ βακτήρια, που εμφανίζουν κινητικότητα(2.12-9) και είναι καταλάση θετικά. Διαχωρίζονται από τα άλλα είδη βάσει των χαρακτηριστικών που αναφέρονται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15 Αντιδράσεις για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Listeria* spp

Είδη	Παραγωγή όξeos			Δοκιμή Camp	
	Αιμόλυση	Ραμζόζη	Ξυλόζη	<i>S.aureus</i>	<i>R.equi</i>
<i>L.monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L.seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L.welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L.grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L.grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	-	V	-	-	-
V:ποικίλη αντίδραση (+):ασθενής αντίδραση +:>90%θετικές αντιδράσεις -: καμία αντίδραση	Σημείωση: υπάρχουν σπάνια στελέχη <i>L. monocytogenes</i> που δε παρουσιάζουν β- αιμόλυση ή θετική αντίδραση στη δοκιμή CAMP				

### 2.5.2 Επιλογή αποικιών για την επιβεβαίωση.

Για την επιβεβαίωση, λαμβάνονται από κάθε τρυβλίο ανά εκλεκτικό υπόστρωμα πέντε αποικίες που θεωρούνται ύποπτες *L.monocytogenes*. Αν σε ένα τρυβλίο υπάρχουν λιγότερο από πέντε πιθανές αποικίες, λαμβάνονται όλες για επιβεβαίωση. Ενοφθαλμίζονται οι επιλεγμένες αποικίες σε τρυβλία με TSYEA(2.12-5) άγαρ 90mm (tryptone soya yeast extract άγαρ) των οποίων η επιφάνεια έχει προηγουμένως στεγνωθεί, με τρόπο ώστε να αναπτυχθούν μεμονωμένες αποικίες. Γίνεται τοποθέτηση των τρυβλίων σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C για 18h με 24h, ή μέχρις ότου η ανάπτυξη αποικιών θεωρηθεί ικανοποιητική. Οι τυπικές αποικίες που αναπτύσσονται είναι 1 με 2mm σε διάμετρο, κυρτές, άχρωμες, και αδιαφανείς με πλήρη χείλη( ένα ακέραιο χείλος). Αν οι αποικίες δεν είναι σαφώς διαχωρισμένες, γίνεται εκλογή μιας τυπικής αποικίας *L.monocytogenes* ενός άλλου τρυβλίου με TSYEA. Διενεργούνται στη συνέχεια οι παρακάτω δοκιμές από αποικίες μιας καθαρής καλλιέργειας σε TSYEA.

#### 2.5.2.1 Δοκιμή καταλάσης

Γίνεται λήψη μιας απομονωμένης αποικίας από αυτές που προέκυψαν στη παράγραφο 2.5.2 και αναμιγνύεται με μια σταγόνα υπεροξειδίου του υδρογόνου (2.12-11)πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Ο άμεσος σχηματισμός φυσαλίδων αερίου υποδεικνύει θετική αντίδραση

### 2.5.2.2 Επιβεβαίωση

Αν τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και η αντίδραση καταλάσης υποδεικνύουν *L.monocytogenes*, γίνεται ενοφθαλμισμός τρυβλίων που έχουν αιματούχο άγαρ προβάτου για να προσδιοριστεί η αιμολυτική αντίδραση. Πριν τη χρήση πρέπει να στεγνώσει καλά η επιφάνεια του άγαρ. Γίνεται λήψη μιας αποικίας από αυτές που απομονώθηκαν στη παράγραφο 2.5.2 και ενοφθαλμίζεται κάθε καλλιέργεια με τρόπο ώστε να σημειωθεί ένα διάστημα για κάθε μία χρησιμοποιώντας υάλινη ακίδα. Ταυτόχρονα ενοφθαλμίζουμε από θετικές (*L.monocytogenes*) και αρνητικές καλλιέργειες μάρτυρες (*L.innocua*). Μετά από επώαση στους 37 °C για 24 h ± 3h γίνεται εξέταση των εξεταζόμενων στελεχών και των στελεχών ελέγχου. Η *L.innocua* δεν εμφανίζει ζώνη γύρω από το σημείο ενοφθαλμισμού. (Η *L.seeligeri* εμφανίζει μια ασθενή ζώνη αιμόλυσης. Η *L.ivanovi* συνήθως παρουσιάζει ευρύτατες, σαφώς περιγεγραμμένες ζώνες β-αιμόλυσης). Γίνεται εξέταση των τρυβλίων σε άπλετο φωτισμό για να γίνει σύγκριση των εξεταζόμενων καλλιέργειών με τις καλλιέργειες μάρτυρες (σχήμα 24).

### 2.5.2.3 Ζύμωση ζαχάρων

Η ζύμωση ζαχάρων πραγματοποιείται στα βιοχημικά ΚΙΤ(2.12-8). Τα αποτελέσματα των τεστ ερμηνεύονται με ειδική βάση δεδομένων.

### 2.5.2.4 Camp –test

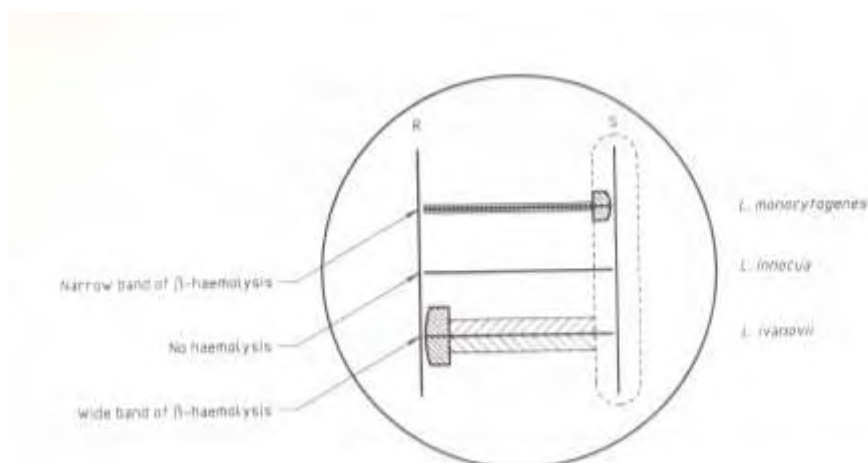
Ακολουθεί γραμμικός ενοφθαλμισμός καλλιέργειας *Staphylococcus aureus* και *Rhodococcus equi* σε παράλληλες γραμμές στο τρυβλίο πετρί 90 mm με το αιματούχο άγαρ(2.12-10 ή 2.12-7 ), με τρόπο ώστε οι δυο καλλιέργειες να είναι παράλληλες και διαμετρικά αντίθετες. Ένα λεπτό, ομοιόμορφο ενοφθαλμισμα είναι απαραίτητο για αυτή τη διαδικασία. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας μια ακίδα ενοφθαλμισμού ή ένα σύρμα. Ενοφθαλμίζονται με τον ίδιο τρόπο τα εξεταζόμενα στελέχη που απομονώθηκαν στο 2.5.2, ώστε η εξεταζόμενη καλλιέργεια και αυτές του *St. aureus* και *R. Equi* να μη διασταυρώνονται, αλλά να βρίσκονται οι γραμμές ενοφθαλμισμού σε απόσταση 1mm με 2mm μεταξύ τους. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να γίνει σπορά πολλών εξεταζόμενων στελεχών στο ίδιο τρυβλίο.

1.Γίνεται ενοφθαλμισμός τρυβλίων που περιέχουν λεπτό στρώμα αιματούχο άγαρ, όπως φαίνεται στο διάγραμμα. Οι κατακόρυφες γραμμές παρουσιάζουν σπορές

(ρίγες, γραμμές) του *S.aureus* (S) και του *R.equi*. Οι οριζόντιες γραμμές αντιπροσωπεύουν γραμμικούς ενοφθαλμισμούς των εξεταζόμενων καλλιέργειών.

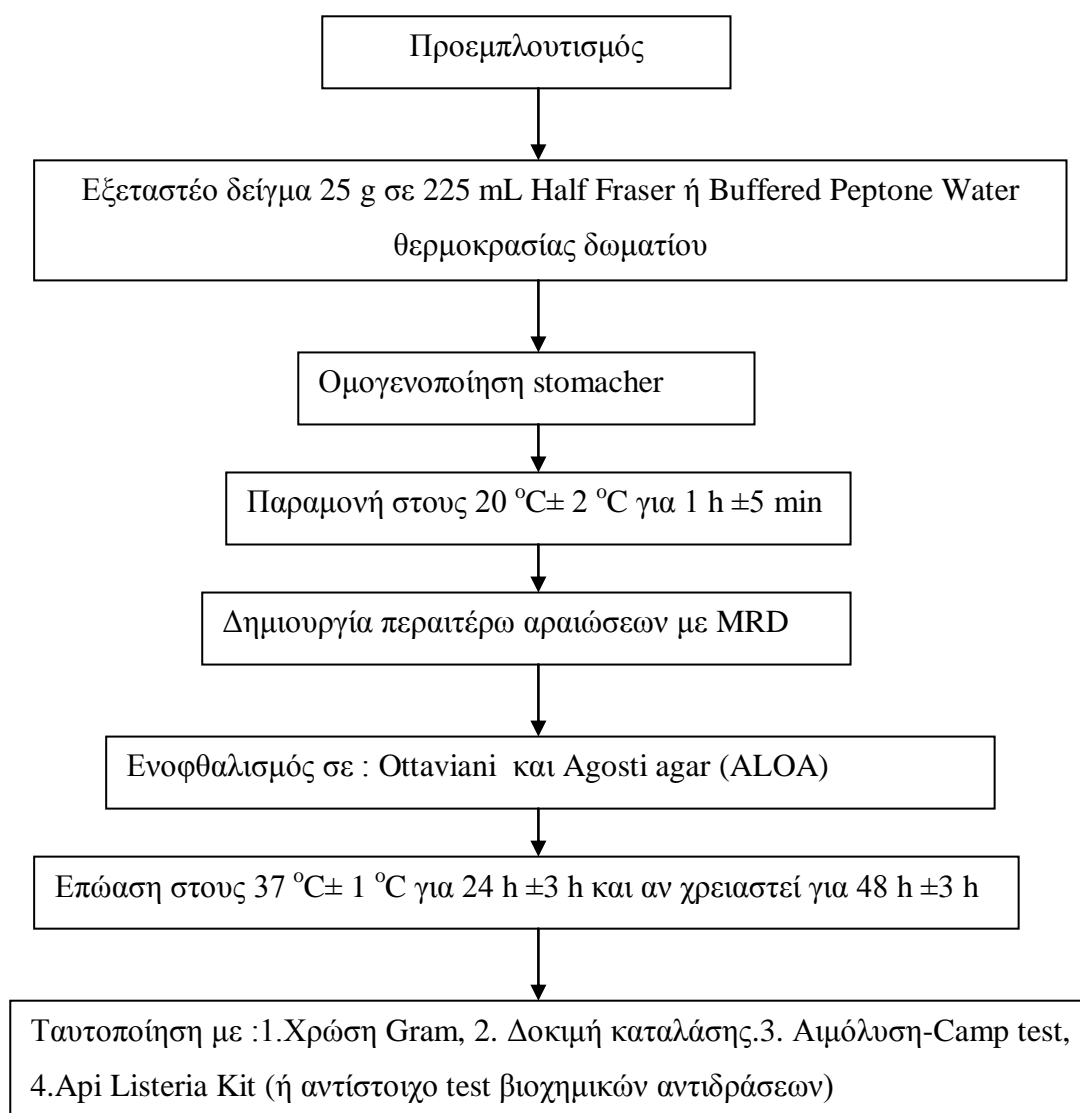
2. Η στιγματισμένη περιοχή υποδεικνύει τη ζώνη ανάπτυξης της καλλιέργειας του *S.aureus*. Ταυτόχρονα, ενοφθαλμίζονται γραμμικά καλλιέργειες μάρτυρες *L.monocytogenes*, *L.innocua* και *L.ivanovii*. Αν χρησιμοποιείται αιματούχο άγαρ γίνεται επώαση των τρυβλίων στους 37<sup>0</sup> C για 18 h με 24 h. Αν χρησιμοποιείται διπλής στοιβάδας αιματούχο άγαρ ,τότε γίνεται επώαση στους 37<sup>0</sup> C για 12 h με 18 h. Η ύπαρξη έντονης ζώνης β-αιμόλυσης στα όρια διασταύρωσης των καλλιεργειών *S.aureus* και *R.equi* με αυτές των εξεταζόμενων στελεχών θεωρείται ως θετική

αντίδραση (σχήμα 23). Η θετική αντίδραση γύρω από την καλλιέργεια *R.equi* εμφανίζεται ως μια ευρεία, 5mm με 10mm ζώνη αιμόλυσης. Η αντίδραση θεωρείται αρνητική αν μια μικρή ζώνη, αδράς αιμόλυσης, διαμέτρου μόλις 1mm, εκτείνεται στα όρια διασταύρωσης του εξεταζόμενου στελέχους και της ζώνης διάχυσης της αποικίας *R.equi*. Η θετική αντίδραση *S.aureus* δίνει μια μικρή ζώνη έντονης αιμόλυσης, η οποία εκτείνεται μόνο 2mm από τα όρια της καλλιέργειας του εξεταζόμενου στελέχους και μέσα στην αιμολυτική ζώνη που δημιουργήθηκε χάρη στην ανάπτυξη της καλλιέργειας του *S.aureus*. Στη περιοχή του *S.aureus* και της *L.monocytogenes* δε προκύπτουν μεγάλες ζώνες αιμόλυσης.



**Σχήμα 23. Camp-test**

## 2.6 Μικροβιολογική ανάλυση κατά ISO 11290-2:1998



Σχήμα 24. Διάγραμμα ροής για την απαρίθμηση της *L. monocytogenes* κατά ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004

## 2.7 Έκφραση αποτελεσμάτων (ISO 11290-2:1998 και ISO 7218)

### 2.7.1 Μέτρηση αποικιών *L. monocytogenes*

Ο αριθμός των αποικιών ( $a$ ) της *L. monocytogenes* από κάθε τρυβλίο (διαφορετικές αραιώσεις) δίνεται από τον παρακάτω τύπο

$$a = \frac{b}{A} * C$$

Όπου :

b: Ο αριθμός των αποικιών που συμμορφώνονται στα κριτήρια επιβεβαίωσης

A : Ο αριθμός των αποικιών που δεν συμμορφώνονται στα κριτήρια επιβεβαίωσης

C: Ο αριθμός των χαρακτηριστικών αποικιών, (γίνεται στρογγυλοποίηση του a)

### 2.7.2 Μέθοδος υπολογισμού για τρυβλία με μικρότερο από 150 αποικίες

#### L.monocytogenes ένα εκ των οποίων περιέχει λιγότερες από 15 αποικίες

Ο αριθμός της *L.monocytogenes* σε 1 mL ή g δίνεται από τον παρακάτω τύπο

$$N = \frac{\Sigma a}{V * (n1 + 0,1 * n2) * d}$$

Όπου

$\Sigma a$ : Το σύνολο των αποικιών της *L.monocytogenes* το οποίο υπολογίστηκε μετά την επιβεβαίωση μεταξύ δύο διαδοχικών αραιώσεων, μία εκ των οποίων περιέχει το λιγότερο 15 επιβεβαιωμένες αποικίες.

V: Ο όγκος ενοφθαλισμού σε mL

n<sub>1</sub>: Ο αριθμός των τρυβλίων της πρώτης αραιώσης

n<sub>2</sub>: Ο αριθμός των τρυβλίων της δεύτερης(διαδοχικής) αραιώσης

d: Η πρώτη αραιώση π.χ 10<sup>-1</sup>

Η στρογγυλοποίηση του αποτελέσματος πραγματοποιείται στα δύο σημαντικά ψηφία, η έκφραση του αποτελέσματος ανά mL (υγρά τρόφιμα) ή ανά g σε αλλά τρόφιμα εκφράζεται ως αριθμός μεταξύ 1,0-9,9 πολλαπλασιαζόμενος με το 10 στην κατάλληλη δύναμη

#### 2.7.2.1 Εκτίμηση μικρού αριθμού

Αν δύο τρυβλία στο επίπεδο της αρχικής αραιώσης περιέχουν λιγότερο από 15 αποικίες *L.monocytogenes*, γίνεται ο υπολογισμός των επιβεβαιωμένων αποικιών από κάθε τρυβλίο, με τον παρακάτω τύπο.

Αφού γίνει ο υπολογισμός του μέσου όρου των αποικιών (y) των δύο τρυβλίων η εκτίμηση του αριθμού της *L.monocytogenes* ανά mL (υγρά τρόφιμα) ή ανά g σε αλλά τρόφιμα Δίνεται από τον τύπο

$$N_E = \frac{y}{(d * V)}$$

Όπου

d: Η πρώτη αραιώση π.χ 10<sup>-1</sup>

V: Ο όγκος ενοφθαλισμού σε mL

Αν σε δύο τρυβλία στο επίπεδο της αρχικής αραιώσης δεν περιέχουν καθόλου αποικίες το αποτέλεσμα εκφράζεται ως

Μικρότερο από 1/( d\*V) ανά mL (υγρά τρόφιμα) ή ανά g σε αλλά τρόφιμα

Όπου d: Η πρώτη αραιώση π.χ 10<sup>-1</sup>

V: Ο όγκος ενοφθαλισμού σε mL



### 2.7.2.2 Παραδείγματα υπολογισμών (ISO 7218:2007)

#### Παράδειγμα 1

Έστω ότι στη διαδικασία καταμέτρησης μετρήθηκαν :

Στην αραιώση ( $10^{-2}$ ) : 168 αποικίες

Στην αραιώση ( $10^{-3}$ ) : 14 αποικίες

Με όγκο ενοφθαλμισμού 1 mL (σε τρυβλία των 140 mm)

$$N = \frac{\Sigma a}{V * (n1 + 0,1 * n2) * d} = \frac{168 + 14}{1 * 1,1 * 10^{-2}} = 1,7 * 10^4 \text{ Cfu/g ή mL}$$

#### Παράδειγμα 2 με βιοχημική επιβεβαίωση αποικιών (βλέπε § 2.7.1)

Έστω ότι στη διαδικασία καταμέτρησης μετρήθηκαν :

Στην αραιώση ( $10^{-3}$ ) : 66 αποικίες

Στην αραιώση ( $10^{-4}$ ) : 4 αποικίες

Ο βιοχημικός έλεγχος των αποικιών έδειξε ότι:

Από τις 66 αποικίες, πάθθηκαν 8 και οι 6 πέρασαν τα κριτήρια επιβεβαίωσης

$$a = \frac{6}{8} * 66 = 50$$

Από τις 4 αποικίες όλες πέρασαν τα κριτήρια επιβεβαίωσης

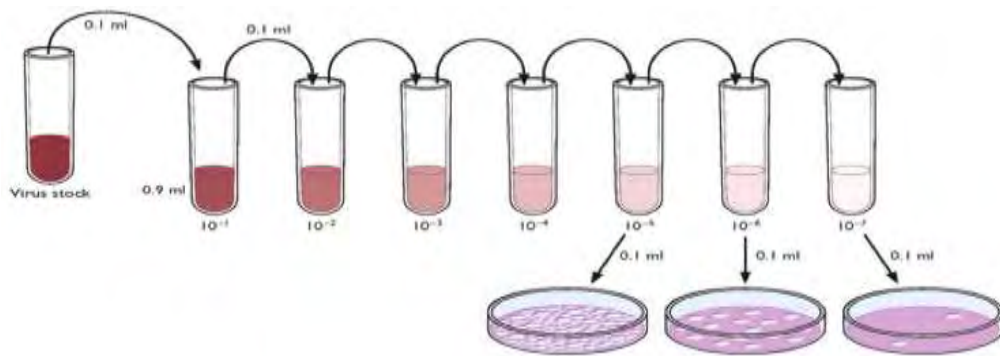
$$a = \frac{4}{4} * 4 = 4$$

$$\text{Άρα: } N = \frac{\Sigma a}{V * (n1 + 0,1 * n2) * d} = \frac{50 + 4}{1 * 1,1 * 10^{-3}} = 4,9 * 10^4 \text{ Cfu/g ή mL}$$

### 2.8 Υπολογισμός πληθυσμού βακτηριοφάγου

Χρησιμοποιήθηκε μέθοδος που περιγράφεται από τους [Soni et al., \(2010b\)](#).

0,100 mL από το σκεύασμα του βακτηριοφάγου (2.12-20) αραιώθηκαν με 0,900 mL σε διαδοχικές αραιώσεις ορού (2.8.1) σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα. Από κάθε αραιώση 0,100 mL αναμίχθηκαν με 0,150 mL αρχικού εναιωρήματος *L.monocytogenes* και στην συνέχεια με 4 mL soft agar αποτελούμενο από Tryptic Soy Broth (2.12-12) με 0,4% άγαρ (2.12-18) θερμοκρασίας 42 °C. Το μείγμα αναδεύτηκε ελαφρώς και στην συνέχεια επιστρώθηκε με προσοχή σε τρυβλίο Tryptic Soy Agar (2.12-13). Το τρυβλίο παράμεινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να σταθεροποιηθεί το άγαρ και επώαστηκε στους 30 °C για 18-24 h. (Βλέπε παράτημα υπολογισμών § 2ΠΥ).



**Σχήμα 25.** Απεικόνιση αραιώσεων του σκευάσματος βακτηριοφάγου (από: [Detecting viruses: plaque assay.,2009](#))

## 2.9 Όγκος ενοφθαλμίσματος και υπολογισμός φορτιού βακτηριοφάγου (Pfu/g δείγματος)

Στην αρχή (βλέπε 2.4) εντοπίστηκε το πλέον «αποτελεσματικό» φορτίο του βακτηριοφάγου ως προς την *L.monocytogenes*. Ελέγχθησαν τρία επίπεδα 0,(μάρτυρας), 10<sup>3</sup>, 10<sup>7</sup> Pfu/g. Λόγο υψηλούς ιξώδες και για λόγους καλής ομογενοποίησης όλα τα δείγματα ανεξαρτήτως συγκέντρωσης εμβολιαστήκαν με 300 μL. Για να δημιουργηθούν τα κατάλληλα φορτία του βακτηριοφάγου (10<sup>3</sup>,10<sup>7</sup> Pfu/g) τα δείγματα εμβολιάστηκαν με 300 μL από συγκέντρωση φορτιού του βακτηριοφάγου (Pfu/mL) μίας εκθετικής δύναμης παραπάνω (10<sup>4</sup>,10<sup>8</sup> Pfu/mL αντίστοιχα) (Βλέπε παράτημα υπολογισμών § 3ΠΥ).

**Πίνακας 16.** Παρασκευή αραιώσεων σκευάσματος βακτηριοφάγου

Pfu/mL σκευάσματος	*Όγκος εμβολιασμού (mL)	Όγκος ορού (mL)	Συντελεστής αραιώσης σκευάσματος	Pfu/mL αραιώσης	Συνολικός όγκος αραιώσης (mL)
5,8*10 <sup>10</sup> (Αποτέλεσμα ανάλυσης σκευάσματος)	0,200	9,800	50	10 <sup>9</sup>	10
	2,00	18,00	500	10 <sup>8</sup>	20
	2,00	18,00	5000	10 <sup>7</sup>	20
	2,00	18,00	50000	10 <sup>6</sup>	20
	2,00	18,00	500000	10 <sup>5</sup>	20
	2,00	18,00	5000000	10 <sup>4</sup>	20
	2,00	18,00	50000000	10 <sup>3</sup>	20

\* όγκος εμβολιασμού από την προηγούμενη αραιώση εκτός από την πρώτη που είναι από το σκεύασμα του βακτηριοφάγου(2.12-20)

## 2.9.1 Ορός βακτηριοφάγου

Σε γυάλινη κωνική φιάλη με πόμα των 250mL διαλύθηκαν 100 mM NaCl(2.12-15), 10 mM MgSO<sub>4</sub>(2.12-16), 50 mM tris-Hcl(2.12-17). (pH=7,5) σε 200 mL νερό  
Υπολογισμοί μάζας σε % αναλογία

$$\text{Mole} = \frac{M}{MB} \Rightarrow M = \text{mole} * MB = 0,100 * 58,44 = 5,84\text{g/L} = 0,584\text{g}/100\text{mL NaCl}$$

$$\text{Mole} = \frac{M}{MB} \Rightarrow M = \text{mole} * MB = 0,010 * 120,366 = 1,20\text{g/L} = 0,120\text{g}/100\text{mL MgSO}_4$$

$$\text{Mole} = \frac{M}{MB} \Rightarrow M = \text{mole} * MB = 0,050 * 156,60 = 7,83\text{g/L} = 0,783\text{g}/100\text{mL tris-Hcl}$$

Για συνολικό όγκο ορού 200 mL απαιτούνται, 1,16g, 0,240g, 1,56g NaCl, MgSO<sub>4</sub>, tris-Hcl αντίστοιχα. Ακολουθεί αποστείρωση για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο στους 121<sup>0</sup> C.

## 2.10 Προετοιμασία νισίνης

Σε 10 mL 0,02 N Hcl (pH~2,00) διαλύθηκαν 360 mg nisaplin 2.5% (2.12-19). Ακολούθησε διήθηση με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,2 μm.

Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα της χρησιμοποίησής του.

Διεθνής μονάδες (IU/mL)

$$1 \mu\text{g καθαρής νισίνης περιέχει } 40 \text{ IU άρα: } \text{IU/mL} = \frac{360 * 0,025 * 1000 * 40}{10} = 36000$$

Βάση τον κανονισμό 95/2/EC για τα πρόσθετα και τις γλυκαντικές ύλες στα τρόφιμα η νισίνη επιτρέπεται σε συγκεντρώσεις από 3-12,5 mg/Kg σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων κυρίως διαφόρων ειδών τυριών. Η συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι από 0,3,12 mg/Kg. Οι αραιώσεις και οι όγκοι έγχυσης σε δείγμα 30 g φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 17.** Οι αραιώσεις και οι όγκοι έγχυσης της νισίνης.

Αρχικό διάλυμα Νισίνης	Όγκος έγχυσης (mL)	Συγκέντρωση στο δείγμα (mg/g)	Συγκέντρωση στο δείγμα (mg/Kg)	IU/g
360 mg/10 mL	0	0 (μάρτυρας)	0(μάρτυρας)	0(μάρτυρας)
Nisaplin 2,5%	0,100	0,0030	3	120
(2.10)	0,400	0,0120	12	480

## 2.11 Μεταχείριση δειγμάτων και νισίνης

Δείγματα 30g επιμολύνθηκαν με 100 Cfu/g *Lmonocytogenes*. Στα δείγματα προστέθηκαν συγκέντρωση φορτίου του βακτηριοφάγου 10<sup>7</sup> Pfu/g και νισίνη σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης 0 (μάρτυρας), 3, 12 mg/Kg. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4 °C για μια ημέρα όπου ελέγχθησαν για τον πληθυσμό της *L.monocytogenes* με την μέθοδο κατά ISO 11920-2:1998 (βλέπε πίνακα 20)

## 2.12 Θρεπτικά υποστρώματα και αντιδραστήρια

1. Ζωμός Fraser μισής συγκέντρωσης εκλεκτικών παραγόντων (Half Fraser broth) (Lab M, UK)
2. Ζωμός Fraser πλήρους συγκέντρωσης εκλεκτικών παραγόντων (Fraser broth)
3. Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti(ALOA) (Lab M, UK)
4. Oxford agar (Lab M, UK)
5. Στερεό υπόστρωμα : Tryptone soya yeast extract άγαρ (TSYEA)(Fluka, India)
6. Υγρό υπόστρωμα: Tryptone soya yeast extract ζωμός (TSYEB)(Fluka, India)
7. Αιματούχο άγαρ από αίμα προβάτου(Bioprepure, Greece)
8. API listeria (Biomerieux, France)
9. Άγαρ ανίχνευσης κινητικότητας(Lab M, UK)
10. Δοκιμή CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen).(Biomerieux, France)
11. ID color katalase(Biomerieux, France)
12. Tryptic soy broth (Lab M, UK)
13. Typtic Soy Agar(Lab M, UK)
14. Buffered Peptone Water (Lab M, UK)
15. NaCl (Merck, Germany)
16. MgSO<sub>4</sub>(Merck, Germany)
17. tris-HCl (Merck, Germany)
18. Agar (Lab M, UK)
19. Nisin (Nisaplin 2,5%, 10<sup>6</sup> IU/g Danisco, Denmark)
20. Βακτηριοφάγος P-100(Listex<sup>TM</sup>, Microcos Food Safety, Netherlands)
21. *Listeria monocytogenes* ,1/2a (NCTC7973) και 4b (NCTC 11994)(National Collection of Type Cultures (NCTC), a Health Protection Agency Culture Collection-HPA, UK)

## 2.13 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση που εφαρμόστηκε είναι η ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two way ANOVA). Μετά και την προσθήκη της νισίνης εφαρμόζεται η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (One way ANOVA). Η ανάλυση της διακύμανσης εντοπίζει αν οι παράγοντες επιδρούν στην ποσοτική μεταβλητή (Cfu/g), πως επιδρούν, αν υπάρχει αλληλεπίδραση (interaction) μεταξύ των παραγόντων και πως αυτή η αλληλεπίδραση επιδρά στην ποσοτική μεταβλητή. Η  $H_0$  δηλώνει μη επίδραση και η  $H_a$  επίδραση των παραγόντων και αντίστοιχα μη αλληλεπίδραση ή αλληλεπίδραση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS 15 for windows. Οι τιμές υπέστησαν λογαριθμικό μετασχηματισμό και εμφανίζονται μ' αυτή τη μορφή. Θεωρούμε (λόγω των επαναλήψεων) και μετά τον λογαριθμικό μετασχηματισμό ότι οι τιμές τηρούν τα κριτήρια εφαρμογής της ANOVA.

### 2.13.1 Χαρακτηριστικά στατιστικής ανάλυσης

Επαναλήψεις: 4 /δείγμα/ παράγοντα (διαφορετικό δείγμα),

Ποσοτική μεταβλητή: Cfu/g *L.monocytogenes*

Παράγοντες :

1) **Συγκέντρωση φορτίου βακτηριοφάγου:** 3 επίπεδα (0,  $10^3$ ,  $10^7$  Pfu/g)

2) **Μέρες αποθήκευσης στους 4 °C:** 3 επίπεδα (1<sup>η</sup> ημέρα, 3<sup>η</sup> ημέρα, 7<sup>η</sup> ημέρα)

CI=95%,  $H_0: P_{value} > 0,05$ ,  $H_a: P_{value} < 0,05$

### 2.13.2 Χαρακτηριστικά στατιστικής ανάλυσης μετά την προσθήκη νισίνης

Επαναλήψεις: 4 /δείγμα/ παράγοντα (διαφορετικό δείγμα)

Ποσοτική μεταβλητή: Cfu/g *L.monocytogenes*

Παράγοντες :

1) **Δείγματα :** 3 επίπεδα ( $10^7$  Pfu/g με νισίνη 0,3, 12 mg/Kg)

CI=95%,  $H_0: P_{value} > 0,05$ ,  $H_a: P_{value} < 0,05$

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

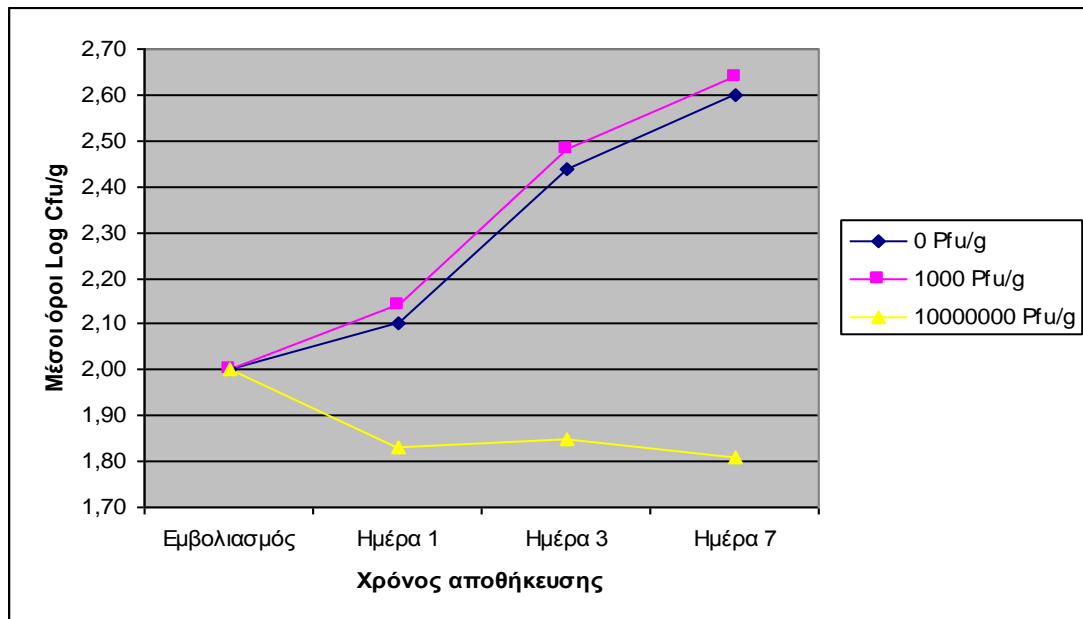
**Πίνακας 18** Οι πληθυσμοί *L.monocytogenes* σε τυροσαλάτα με την προσθήκη φορτίου βακτηριοφάγου κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας εβδομάδας στους 4 °C.

Συγκέντρωση φορτιού βακτηριοφάγου (Pfu/g)	Μέρες αποθήκευσης στους 4 °C		
	1	3	7
0 (μάρτυρας)	2,11	2,41	2,57
	2,11	2,49	2,64
	2,15	2,41	2,56
	2,04	2,46	2,64
M.O±SD	2,10 ±0,046(a, A)	2,44±0,039(b, C)	2,60±0,043(c,E)
10 <sup>3</sup>	2,11	2,51	2,64
	2,15	2,45	2,66
	2,11	2,49	2,67
	2,18	2,48	2,58
M.O±SD	2,14±0,034(a, A)	2,48±0,025(b,C)	2,64±0,040(c,E)
10 <sup>7</sup>	1,83	1,85	1,80
	1,86	1,80	1,81
	1,83	1,89	1,81
	1,80	1,84	1,83
M.O±SD	1,83±0,024(a,B)	1,85±0,037(a,D)	1,81±0,013(a, F)

Οι μέσες τιμές στην ίδια γραμμή ακολουθούν από διαφορετικά μικρά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ( $p<0,05$ ). Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη ακολουθούν από διαφορετικά κεφαλαία γράμματα διαφέρουν σημαντικά ( $p<0,05$ ).

Στον πίνακα 18 παρουσιάζονται οι πληθυσμοί του παθογόνου κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας εβδομάδας στους 4°C. Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης στον μάρτυρα ο πληθυσμός του παθογόνου διαφέρει σημαντικά ( $p<0,05$ ). Η προσθήκη βακτηριοφάγου στην συγκέντρωση 10<sup>3</sup> Pfu/g δεν είχε ουσιαστική επίδραση αφού οι πληθυσμοί του παθογόνου αναπτύχθηκαν. Αξίζει να σημειωθεί οι πληθυσμοί στην συγκέντρωση 10<sup>3</sup> Pfu/g διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ( $p<0,05$ ) ανά ημέρα αποθήκευσης. Αντίθετα η προσθήκη του βακτηριοφάγου σε συγκέντρωση 10<sup>7</sup> Pfu/g είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική πτώση του πληθυσμού της *L.monocytogenes* από την πρώτη μέρα της μέτρησης ( $p<0,05$ ). Οι πληθυσμοί της *L.monocytogenes* με την προσθήκη 10<sup>7</sup> Pfu/g δεν μετεβλήθησαν σημαντικά ( $p<0,05$ ) κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Στα αρχικά δείγματα έγινε μικροβιολογικός έλεγχος παρουσίας *L.monocytogenes* ο οποίος απέβη αρνητικός το pH των δειγμάτων ήταν 4,55. Στο

σχήμα 26 φαίνεται επίσης η επίδραση της συγκέντρωσης του βακτηριοφάγου στους πληθυσμούς της *L.monocytogenes*



Σχήμα 26 Η επίδραση της συγκέντρωσης του βακτηριοφάγου στον πληθυσμό της *L.monocytogenes* κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας εβδομάδας στους 4 °C σε δείγματα τυροσαλάτας

**Πίνακας 19** Οι πληθυσμοί *L.monocytogenes* σε **ταραμοσαλάτα** με την προσθήκη φορτίου βακτηριοφάγου κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας εβδομάδας στους 4 °C.

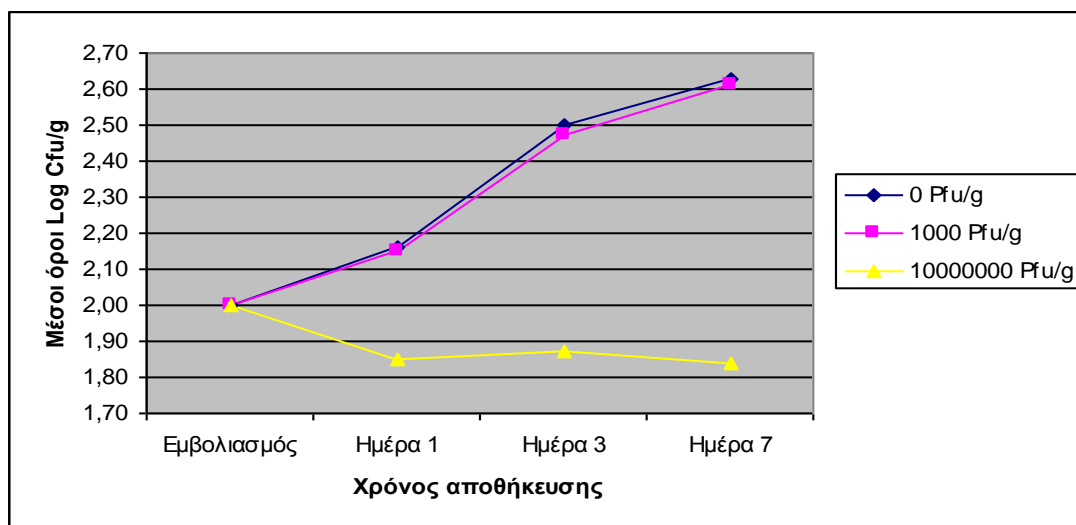
Συγκέντρωση φορτίου βακτηριοφάγου (Pfu/g)	Μέρες αποθήκευσης στους 4 °C		
	1	3	7
0 (μάρτυρας)	2,18	2,48	2,57
	2,15	2,49	2,61
	2,18	2,51	2,68
	2,11	2,51	2,67
M.O±SD	2,16±0,033(a, A)	2,5±0,015(b, C)	2,63±0,052(c,E)
10 <sup>3</sup>	2,11	2,49	2,59
	2,15	2,49	2,62
	2,18	2,45	2,63
	2,15	2,46	2,61
M.O±SD	2,15±0,029(a, A)	2,47±0,021(b,C)	2,61±0,017(c,E)
10 <sup>7</sup>	1,89	1,87	1,83
	1,82	1,88	1,79
	1,81	1,82	1,89
	1,88	1,89	1,85
M.O±SD	1,85±0,041(a,B)	1,87±0,031(a,D)	1,84±0,042(a, F)

Οι μέσες τιμές στην ίδια γραμμή ακολουθούμενες από διαφορετικά μικρά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ( $p<0,05$ ). Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη ακολουθούμενες από διαφορετικά κεφαλαία γράμματα διαφέρουν σημαντικά ( $p<0,05$ ).

Στον πίνακα 19 παρουσιάζονται οι πληθυσμοί του παθογόνου κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας εβδομάδας στους 4°C. Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης στον μάρτυρα ο πληθυσμός του παθογόνου διαφέρει σημαντικά ( $p<0,05$ ). Η προσθήκη βακτηριοφάγου στην συγκέντρωση 10<sup>3</sup> Pfu/g δεν είχε ουσιαστική επίδραση αφού οι πληθυσμοί του παθογόνου αναπτύχθηκαν. Αξίζει να σημειωθεί οι πληθυσμοί στην συγκέντρωση 10<sup>3</sup> Pfu/g διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ( $p<0,05$ ) ανά ημέρα αποθήκευσης. Αντίθετα η προσθήκη του βακτηριοφάγου σε συγκέντρωση 10<sup>7</sup> Pfu/g είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική πτώση του πληθυσμού της *L.monocytogenes* από την πρώτη μέρα της μέτρησης ( $p<0,05$ ). Οι πληθυσμοί της *L.monocytogenes* με την προσθήκη 10<sup>7</sup> Pfu/g δεν μετεβλήθησαν σημαντικά ( $p<0,05$ ) κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Στα αρχικά δείγματα έγινε μικροβιολογικός έλεγχος παρουσίας *L.monocytogenes* ο οποίος απέβη αρνητικός το pH των δειγμάτων ήταν 4,40. Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης για 7 ημέρες στους 4 °C οι πληθυσμοί της *L.monocytogenes* στο μάρτυρα αναπτύχθηκαν από 100 CfU/g (2log/g) και έφθασαν



έως και ~400 Cf<sub>u</sub>/g (2,6log/g). Στο σχήμα 27 φαίνεται γραφικά η επίδραση της συγκέντρωσης του βακτηριοφάγου στους πληθυσμούς της *L.monocytogenes*



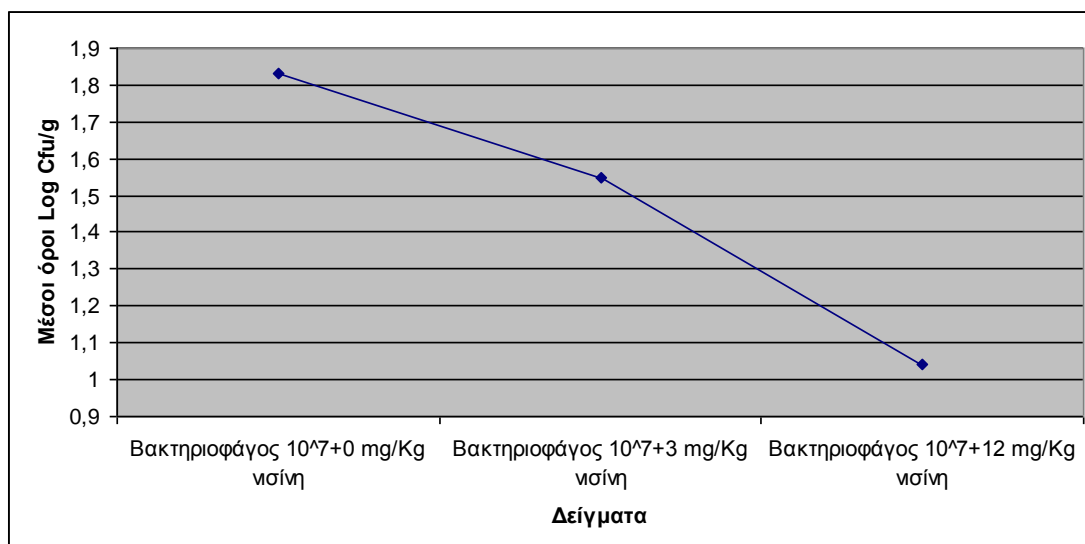
**Σχήμα 27** Η επίδραση της συγκέντρωσης του βακτηριοφάγου στον πληθυσμό της *L.monocytogenes* κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας εβδομάδας στους 4 °C σε δείγματα ταρταροσαλάτας

**Πίνακας 20** Πληθυσμοί *L.monocytogenes* με την προσθήκη Βακτηριοφάγου και νισίνης σε τυροσαλάτα έπειτα από αποθήκευση μιας ημέρας στους 4°C.

Δείγματα (αριθμός)	Προσθήκη βακτηριοφάγου P-100 10 <sup>7</sup> Pfu/g και νισίνης 0 mg/Kg (μάρτυρας-από το Α μέρος)	Προσθήκη βακτηριοφάγου P-100 10 <sup>7</sup> Pfu/g και νισίνης 3 mg/Kg	Προσθήκη βακτηριοφάγου P-100 10 <sup>7</sup> Pfu/g και νισίνης 12 mg/Kg
1	1,79	1,57	1,04
2	1,82	1,60	1,00
3	1,84	1,59	1,08
4	1,80	1,43	1,04
M.O±SD	1,83±0,024a	1,55±0,079b	1,04±0,33c

Μέσες τιμές με διαφορετικά μικρά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (P<0,05)

Η επίδραση του βακτηριοφάγου P-100 σε συνδυασμό με την νισίνη σε τρεις συγκεντρώσεις 0(μάρτυρας), 3 mg/Kg, 12 mg/Kg φαίνεται στον πίνακα 20. Ο συνδυασμός είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του πληθυσμού του παθογόνου. Ο συνδυασμός βακτηριοφάγου και νισίνης 12 mg/Kg είχε και την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Όσο αφορά τον συνδυασμό βακτηριοφάγου νισίνης τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τρεις συνδυασμοί: 10<sup>7</sup> Pfu/g & 0mg/Kg νισίνης, 10<sup>7</sup> Pfu/g & 3 mg/Kg νισίνης και 10<sup>7</sup> Pfu/g & 12 mg/Kg νισίνης διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά με τον πρώτο συνδυασμό να υπολείπεται από τον δεύτερο και ο δεύτερος από τον τρίτο όσο αφορά την αποτελεσματικότητά τους έναντι στην ανάπτυξη της *L.monocytogenes*. Στο σχήμα 28 φαίνεται γραφικά η επίδραση της συγκέντρωσης του βακτηριοφάγου στους πληθυσμούς της *L.monocytogenes*.



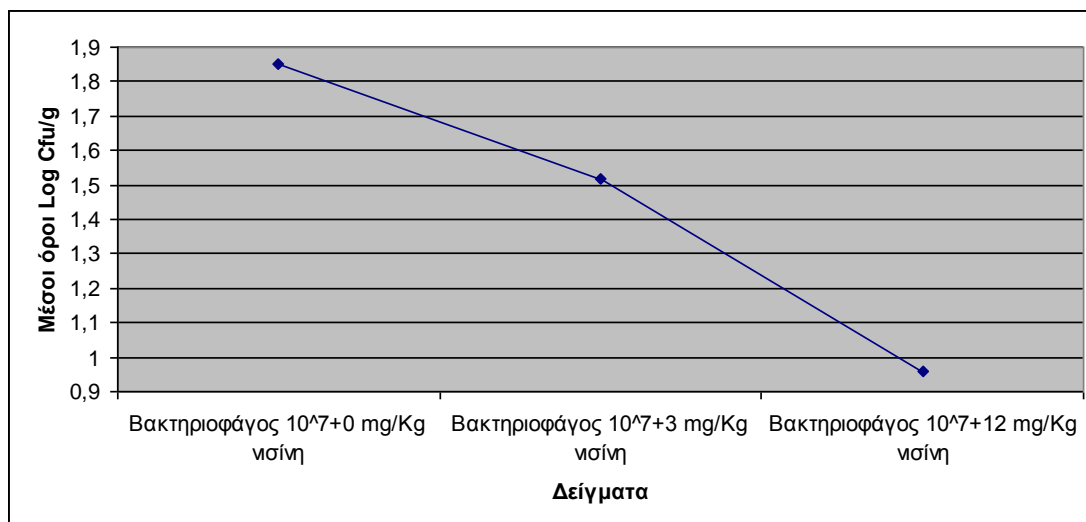
**Σχήμα 28** Η επίδραση του συνδυασμού βακτηριοφάγου και νισίνης στον πληθυσμό της *L.monocytogenes* κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας ημέρας στους 4 °C σε δείγματα τυροσαλάτας

**Πίνακας 21** Πληθυσμοί *L.monocytogenes* με την προσθήκη Βακτηριοφάγου και νισίνης σε **ταραμοσαλάτα** έπειτα από αποθήκευση μιας ημέρας στους 4°C.

Δείγματα (αριθμός)	Προσθήκη βακτηριοφάγου P-100 10 <sup>7</sup> Pfu/g και νισίνης 0 mg/Kg (μάρτυρας-από το Α μέρος)	Προσθήκη βακτηριοφάγου P-100 10 <sup>7</sup> Pfu/g και νισίνης 3 mg/Kg	Προσθήκη βακτηριοφάγου P-100 10 <sup>7</sup> Pfu/g και νισίνης 12 mg/Kg
1	1,79	1,60	0,95
2	1,89	1,38	0,90
3	1,82	1,52	1,00
4	1,86	1,56	1,00
M.O±SD	1,85±0,024a	1,52±0,096b	0,96±0,048c

Μέσες τιμές με διαφορετικά μικρά γράμματα διαφέρουν σημαντικά (P<0,05)

Η επίδραση του βακτηριοφάγου P-100 σε συνδυασμό με την νισίνη σε τρεις συγκεντρώσεις 0(μάρτυρας), 3 mg/Kg, 12 mg/Kg φαίνεται στον πίνακα 21. Ο συνδυασμός είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του πληθυσμού του παθογόνου. Ο συνδυασμός βακτηριοφάγου και νισίνης 12 mg/Kg είχε και την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Όσο αναφορά τον συνδυασμό βακτηριοφάγου νισίνης τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τρεις συνδυασμοί: 10<sup>7</sup> Pfu/g & 0 mg/Kg νισίνης, 10<sup>7</sup> Pfu/g & 3 mg/Kg νισίνης και 10<sup>7</sup> Pfu/g & 12 mg/Kg νισίνης διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά με τον πρώτο συνδυασμό να υπολείπεται από τον δεύτερο και ο δεύτερος από τον τρίτο όσο αναφορά την αποτελεσματικότητα τους έναντι στην ανάπτυξη της *L.monocytogenes*. Στην παρούσα εργασία ο συνδυασμός βακτηριοφάγου 10<sup>7</sup> Pfu/g & 3 mg/Kg νισίνης κατέφεραν να μειώσουν τον πληθυσμό κατά 0,5 log σε μία ημέρα στους 4°C. Στο σχήμα 29 φαίνεται γραφικά η επίδραση της συγκέντρωσης του βακτηριοφάγου στους πληθυσμούς της *L.monocytogenes*



**Σχήμα 29** Η επίδραση του συνδυασμού βακτηριοφάγου και νισίνης στον πληθυσμό της *L.monocytogenes* κατά την διάρκεια αποθήκευσης μιας ημέρας στους 4 °C σε δείγματα ταρταροσαλάτας.

## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρυθμός ανάπτυξης της *L.monocytogenes* και στα δύο τρόφιμα ήταν στατιστικά ο ίδιος. Παρατηρήθηκε ότι η *L.monocytogenes* παρουσίασε ανάπτυξη και στην τυροσαλάτα και στην ταραμοσαλάτα κατά την διάρκεια της συντήρησης. Αυτό είναι σε συμφωνία και με άλλους ερευνητές (Soni et al.,2010a, Rossi et al.,2011) ότι η *L.monocytogenes* αναπτύχθηκε σε συνθήκες ψύξης λόγω του ψυχρόφιλου χαρακτήρα της.

Το πλέον αποτελεσματικό φορτίο του βακτηριοφάγου εντοπίστηκε στα  $10^7$  Pfu/g με μείωση στο πληθυσμό σε σχέση με το μάρτυρα κατά 0,79 log και με τελικό πληθυσμό  $1,88 \log < 2$  (100Cfu/g) που είναι και το νομοθετικό όριο. Το φορτίο του βακτηριοφάγου  $10^3$  Pfu/g δεν κατάφερε να μειώσει τον πληθυσμό καθώς δεν έδειξε στατιστικές διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα, μια αιτία αυτού μπορεί να είναι και ο λόγος μεγέθους βακτηριοφάγου και βακτηριακού κυττάρου. Ο βακτηριοφάγος έδρασε το ίδιο και στα δυο τρόφιμα καθώς δεν εντοπίστηκε καμία αλληλεπίδραση με το είδος της σαλάτας. Το αποτελεσματικό φορτίο του βακτηριοφάγου ( $10^7$  Pfu/g) έδρασε από την πρώτη μέρα καθώς στο ίδιο επίπεδο ο πληθυσμός της *L.monocytogenes* δεν διαφέρει κατά την διάρκεια της εβδομάδας. Από την πρώτη μέρα το ίδιο φορτίο ( $10^7$  Pfu/g) μπόρεσε να μειώσει τον πληθυσμό κάτω από το νομοθετικό όριο. Οι Soni & Nannapaneni., (2010) παρατήρησαν ότι ο βακτηριοφάγος P-100 παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά της *L.monocytogenes* σε φιλέτα σολομού. Ο βακτηριοφάγος κατάφερε να μειώσει το πληθυσμό της *L.monocytogenes* από 2,3 και 4,5 log σε 1,8, 2,5, 3,5 log στους 4 και 10 °C, με μείωση που είναι πολύ κοντά στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, όπως επίσης να επιμυκύνει την διάρκεια ζωής του προϊόντος,

Σε σχέση με την μεμονωμένη δράση του βακτηριοφάγου σε συγκέντρωση  $10^7$  Pfu/g η προσθήκη του συνδυασμού της νισίνης τόσο στην συγκέντρωση 3 mg/Kg και 12 mg/Kg αποδείχτηκε πιο αποτελεσματική με ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση. Οι Leverentz et al., (2003) δοκίμασαν την δράση βακτηριοφάγου (LM-103, LMP-102) και την νισίνη για να δουν την επίδραση τους στον πληθυσμό της *L.monocytogenes* σε διάφορα φρούτα. Χρησιμοποίησαν μήλα και πεπόνια τα οποία προηγούμενος τα είχαν ενοφθαλμίσει με *L.monocytogenes*. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση στον πληθυσμό της *L.monocytogenes* από 2 έως 4,6  $\log_{10}$ (Cfu/g) για τα πεπόνια και 0,4  $\log_{10}$  για τα μήλα. Σε συνδυασμό με την νισίνη η μείωση ανήρθε στους 5,7  $\log_{10}$  για τα πεπόνια και 2,3  $\log_{10}$  για τα μήλα, αντίστοιχα.

Ο συνδυασμός  $10^7+12\text{mg/Kg}$  νισίνης έδειξε και την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα με μείωση από 2 log σε 1 log. Παρόλο που ο συνδυασμός  $10^7+3\text{mg/Kg}$  και ο συνδυασμός  $10^7+12\text{mg/Kg}$  διαφέρουν μεταξύ στατιστικά και ο συνδυασμός  $10^7+3\text{mg/Kg}$  αποδεικνύεται ικανός να ανταποκριθεί στην μείωση του πληθυσμού της *L.monocytogenes* καθώς η μείωση που προκάλεσε είναι κάτω από το νομοθετικό όριο των 100 Cfu/g (2 log/g) σε 30Cfu/g (1,51 log/g).

Ο συνδυασμός της νισίνης με άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες όπως φυτικά εκχυλίσματα έχει αποδείξει την αύξηση της αντιμικροβιακής δράσης. Η αντιμικροβιακή δράση του αιθερίου ελαίου (EO) του θυμαριού σε συγκέντρωση 0.6% και νισίνης σε συγκεντρώσεις 500 ή 1000 IU/g και του συνδυασμού αυτών κατά της *Listeria monocytogenes* μελετήθηκε από τους Solomakos et al., (2008a) σε κιμά βοείου κρέατος. Η προσθήκη της νισίνης σε συγκεντρώσεις 500 ή 1000 IU/g στο βόειο κιμά παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση κατά της *L. monocytogenes*, η οποία ήταν σε εξάρτηση τόσο από την συγκέντρωση της νισίνης όσο και από τα στελέχη

του παθογόνου που χρησιμοποιήθηκαν. Η προσθήκη στο βόειο κιμά του ΕΟ 0.6% παρουσίασε ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση κατά του παθογόνου από εκείνη της προσθήκης της νισίνης 500 ή 1000 IU/g. Όλοι οι χειρισμοί του βόειου κιμά με το ΕΟ του θυμαριού και την νισίνη έδειξαν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση στη συντήρηση στους 10° C από εκείνη στους 4° C. Ο συνδυασμός του ΕΟ του θυμαριού 0.6% με την νισίνη 500 ή 1000 IU/g παρουσίασε συνεργό αντιμικροβιακή δράση κατά του παθογόνου. Ανάμεσα σ' όλους τους εξετασθέντες χειρισμούς, ο πλέον αποτελεσματικός για την μείωση του παθογόνου ήταν ο συνδυασμός του ΕΟ του θυμαριού 0.6% με την νισίνη 1000 IU/g, που μείωσε τους πληθυσμούς της *L. monocytogenes* κάτω από το επίσημο όριο που θέτει η ΕΕ τους 2 log Cfu/g, στη διάρκεια της συντήρησης στους 4° C.

Ο συνδυασμός νισίνης και αιθέριων ελαίων θυμαριού αποδείχτηκε αποτελεσματικός και έναντι άλλων τροφιμογενών παθογόνων όπως της *Escherichia coli* O157:H7. Έτσι, οι [Solomakos et al., \(2008b\)](#) χρησιμοποίησαν συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου 0.6%, νισίνης σε συγκεντρώσεις 500 ή 1000 IU/g και του συνδυασμού αυτών κατά της *Escherichia coli* O157:H7 σε κιμά βοείου κρέατος. Ο συνδυασμός του ΕΟ του θυμαριού 0.6% με την νισίνη 500 ή 1000 IU/g παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά του παθογόνου, η οποία ήταν μεγαλύτερη στους 10° C από εκείνη στους 4° C.

Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η προσθήκη του συνδυασμού βακτηριοφάγου P100 και της νισίνης σε συγκεντρώσεις 3 mg/Kg νισίνης (120 IU/g) και 12 mg/Kg νισίνης (480 IU/g) κατάφερε να μειώσει τον πληθυσμό της *L.monocytogenes* κάτω από το επίσημο όριο της Ευρωπαϊκής Ένωσης που θέτει σαν όριο τους 2 logCfu/g στα τρόφιμα (EC regulation 2073, 2005).

## 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Το πλέον αποτελεσματικό φορτίο του βακτηριοφάγου εντοπίστηκε στα  $10^7$  Pfu/g.
2. Ο βακτηριοφάγος σε συγκέντρωση  $10^3$  Pfu/g δεν μπορεί να μειώσει τον πληθυσμό της *L.monocytogenes*.
3. Ο βακτηριοφάγος παρουσιάζει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση κατά της *L.monocytogenes*, όταν συνδυάζεται με νισίνη 3ppm και 12ppm νισίνης.
4. Ο καταλληλότερος συνδυασμός είναι  $10^7$  Pfu/g & 12ppm νισίνης με την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση.
5. Ο συνδυασμός  $10^7$  Pfu/g & 3ppm νισίνης παρόλο που δεν ήταν ο πλέον αποτελεσματικός σε σχέση με τα 12 νισίνης, αποδείχτηκε ότι μπορεί να μειώσει τον πληθυσμό της *L.monocytogenes* κάτω από το νομοθετικό όριο της ΕΕ που είναι  $2 \log$  Cfu/g τροφίμου.

## 6 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

1. Συνδυασμός νισίνης βακτηριοφάγου και φυτικών εκχυλισμάτων για τον έλεγχο της *L.monocytogenes* και εύρεση των πλέον αντιμικροβιακών συνθηκών
2. Χρήση βακτηριοφάγων σε είδη έτοιμα προς κατανάλωση.
3. Συνδυασμός βακτηριοφάγου, τροποποιημένης ατμόσφαιρας.
4. Εφαρμογή βακτηριοφάγου με ψεκάσμο σε τρόφιμα υψηλού κίνδυνου.
5. Οι βακτηριοφάγοι ως προληπτικό μέτρο άμυνας κατά της διασταυρουμένης μόλυνσης σε μονέδες εστίασης.
6. Αντικατάσταση χημικών συντηρητικών από βακτηριοφάγους ως φυσικά συντηρητικά.
7. Ενθυλάκωση νισίνης σε βιοδιασπώμενο φιλμ συσκευασίας.

## Βιβλιογραφία ξένη

1. An Integrated Environment for the Analysis of Microbial Genomes, nd, viewed 6 January 2013, <http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList.woa/9/wa/goToTaxoRank?level=Listeria>
2. Arevalos-Sánchez, M., Regalado, C., Martin, S.E., Domínguez-Domínguez, J & García-Almendárez, B.E.(2012).Effect of neutral electrolyzed water and nisin on *Listeria monocytogenes* biofilms, and on listeriolysin O activity. *Food Control*, 24 (1-2), 116-122.
3. Angelidis, A.S & Smith, G.M.(2003a).Role of the Glycine Betaine and Carnitine Transporters in Adaptation of *Listeria monocytogenes* to Chill Stress in Defined Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12), 7492-7498
4. Angelidis, A.S & Smith, G.M.(2003b).Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2), 1013-1022
5. Beverly.R.L,2004,'The control, survival, and growth of listeria monocytogenes on food products', PhD thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College,Louisiana
6. Bradbury, J."My enemy's enemy is my friend": Using phages to fight bacteria. (2004). *Lancet*, 363 (9409), 624-625
7. Cademartiri, R., Anany, H., Gross, I., Bhayani, R& Griffiths, M., Brook, M.A.(2010).Immobilization of bacteriophages on modified silica particles. *Biomaterials*, 31 (7), 1904-1910
8. Canadian Health Federal Department, 2011, Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods, Identification number:FD-FSNP-2011, Canadian Health Federal Department, Ontario
9. Canadalisteriosis“2008”,viewed 6 February 2013, [https://en.wikipedia.org/wiki/2008\\_Canada\\_listeriosis\\_outbreak](https://en.wikipedia.org/wiki/2008_Canada_listeriosis_outbreak)
10. Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., De Meester, E.D. & Loessner, M.J. (2005). "Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43(3), 301-312.
11. Carlton,M.R.(1999).Phage Therapy:Past History and Future Prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 47, 267–274
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).National *Listeria* Surveillance Annual Summary, 2010. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2012a
13. Centre for Disease Prevention and Control,2012(b), Multistate Outbreak of *Listeriosis* Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado, viewed 29 June 2012 <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/120811/index.html>
14. Centre for Disease Prevention and Control,2012(c), People at Risk, viewed 13 June 2012 <http://www.cdc.gov/listeria/risk.html>
15. Clark, C.G., Farber, J., Pagotto, F., Ciampa, N., Dor, K., Nadon, C., Bernard, K & Ng, L.-K.(2010).Surveillance for *Listeria monocytogenes* and listeriosis, 1995-2004.*Epidemiology and Infection*, 138 (4), 559-572
16. Collins, B., Cotter, P.D., Hill, C& Ross, R.P.(2011).The impact of nisin on sensitive and resistant mutants of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 110 (6), 1509-1514.



17. Cosentino, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Melis, R., Pomata, R & Pisano, M.B.(2012). Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, art. no. 376428
18. Datta.A.R(2003). *Listeria monocytogenes*, in Miliotis M.D & Bier J.W (Ed's), *International Handbook Of Foodborne Pathogens*, Marcel Dekker Inc,NY., 100-103
19. Delves-Broughton, J.Applications of the bacteriocin, nisin.(1996) Antonie van Leeuwenhoek, *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 69 (2), 193-202.
20. Detecting viruses: the plaque assay, 2008, viewed June 13 2012<http://www.virology.ws/2009/07/06/detecting-viruses-the-plaque-assay/>
21. Eugster, M.R., Haug, M.C., Huwiler, S.G. & Loessner, M.J. (2011), "The cell wall binding domain of *Listeria* bacteriophage endolysin PlyP35 recognizes terminal GlcNAc residues in cell wall teichoic acid", *Molecular microbiology*, 81(6), 1419-1432.
22. European Centre for Disease Prevention and Control, 2011. Annual Epidemiological Report. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC
23. European commission, 1999,opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*, european commission health & consumer protection directorate-general
24. European Food Safety authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to the use of nisin (E 234) as a food additive. Question number EFSA-Q-2005-031, 2006. *The EFSA Journal* 314, 1-16
25. European Parliament And Council Directive No 95/2/EC of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners (OJ No L 61, 18. 3. 1995, 1)
26. Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO), 2007, COMPENDIUM OF FOOD ADDITIVE SPECIFICATIONS, Nisin preparation, *FAO JECFA monographs*, 4, 29
27. Food and Drug Administration(FDA),(2003),Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods, Appendix 8: Growth of *Listeria monocytogenes*viewed30may2012<http://www.fda.gov/downloads/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/RiskAssessmentSafetyAssessment/UCM197321.pdf>
28. Food and Drug Administration(FDA), 2008, Guidance for Industry: Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated or Frozen Ready To Eat Foods;Draft Guidance,viewed, August,6,2012,[www.fda.gov/food/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidancedocuments/foodprocessinghaccp/ucm073110.htm](http://www.fda.gov/food/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidancedocuments/foodprocessinghaccp/ucm073110.htm)  
FDA
29. Food safety,Listeriosis outbreak causes 29 deaths, costs producer \$150 million,2011,viewed6February2013,<http://www.homelandsecuritynewswire.com/dr20111123-listeriosis-outbreak-causes-29-deaths-costs-producer-150-million>

30. Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N & Lucas, R.(2010) .Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, 21 (2), 142-148
31. Gandhi, M & Chikindas, M.L.(2007).Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113 (1), 1-15
32. García, P., Martínez, B., Obeso, J.M & Rodríguez, A.(2008).Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*, 47 (6), 479-485
33. Greer., G.G. (2005). "Bacteriophage control of food borne bacteria", *Journal of food protection*, 68(5)1102-111
34. Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S. & Loessner, M.J. (2009), "Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of listeria monocytogenes in ready-to-eat foods", *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 93-100
35. Guenther,S & Loessner, J.M.(2011).Bacteriophage biocontrol of Listeria monocytogenes on soft ripened white mold and red-smear cheeses. *Bacteriophage*, 1, 94-100
36. Hagens, S. & Loessner, M.J.(2007). "Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), 513-519.
37. Hagens, S. & Loessner, M.J.(2010). Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: Calculations and considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 58-68.
38. Hain, T., Chatterjee, S.S., Ghai, R., Kuenne, C.T., Billion, A., Steinweg, C., Domann, E., Kärst, U., Jänsch, L., Wehland, J., Eisenreich, W., Bacher, A., Joseph, B., Schär, J., Kreft, J., Klumpp, J., Loessner, M.J., Dorscht, J., Neuhaus, K., Fuchs, T.M., Scherer, S., Doumith, M., Jacquet, C., Martin, P., Cossart, P., Rusniok, C., Glaser, P., Buchrieser, C., Goebel, W& Chakraborty, T.(2007).Pathogenomics of Listeria spp. *International Journal of Medical Microbiology*, 297 (7-8), 541-557
39. Hain, T., Steinweg, C & Chakraborty, T.(2006) Comparative and functional genomics of Listeria spp.*Journal of Biotechnology*, 126 (1), 37-51
40. Hatt, K & Hatt, K.(2012).Neoliberalizing food safety and the 2008 Canadian listeriosis outbreak. *Agriculture and Human Values*, 29 (1),17-28.
41. Hoelzer, K., Pouillot, R., Gallagher, D., Silverman, M.B., Kause, J. & Dennis, S. (2012). "Estimation of Listeria monocytogenes transfer coefficients and efficacy of bacterial removal through cleaning and sanitation", *International journal of food microbiology*, 157(2), 267-277.
42. Hof H.(1996) Miscellaneous Pathogenic Bacteria. In: Baron S, (ed). Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston
43. Holck, A& Berg, J.(2009).Inhibition of Listeria monocytogenes in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (21), 6944-6946
44. Imran, M., Revol-Junelles, A.-M., René, N., Jamshidian, M., Akhtar, M.J., Arab-Tehrany, E., Jacquot, M & Desobry, S.(2012).Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films.*Food Hydrocolloids*, 29 (2), 407-419

45. International Organization for Standardization 1996, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 1: Detection method, ISO 11290-1:1996, International Organization for Standardization, Geneva
46. International Organization for Standardization 1998, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 2: Enumeration method, ISO 11290-2:1998, International Organization for Standardization, Geneva
47. International Organization for Standardization 2004, Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data, ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004, International Organization for Standardization, Geneva
48. International Organization for Standardization 2007, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations, ISO 7218:2007, International Organization for Standardization, Geneva
49. Ivanek, R., Gröhn, Y.T., Tauer, L.W & Wiedmann, M. (2004a). The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (7-8), 513-523
50. Ivanek, R., Gröhn, Y.T., Wiedmann, M. & Wells, M.T. (2004b). Mathematical model of *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a fish processing plant, *Journal of food protection*, 67(12), 2688-2697.
51. Ivanek, R., Gröhn, Y.T., Wiedmann, M. & Wells, M.T. (2004c). Mathematical model of *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a fish processing plant., viewed November 20, 2012 <<http://author.cals.cornell.edu/cals/foodsci/research/labs/wiedmann/links/upload/Ivanek2004.xls>>
52. Jagow, C & Teufer, T (2007). Which Path to go? On how to find a Passage for Innovations through the Jungle of EU-Food Law – discussed by the Example of Bacteriophages. *EFFL*, 3, 136-145
53. Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Margaret, S.P., Son, R., Farinazleen, M.G & Cheah, Y.K. (2010). Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Food Research Journal*, 17 (1), 1-11
54. Klumpp, J., Dorscht, J., Lurz, R., Biemann, R., Wieland, M., Zimmer, M., Calendar, R. & Loessner, M.J. (2008). "The terminally redundant, nonpermuted genome of *Listeria* bacteriophage A511: A model for the SPO1-like myoviruses of gram-positive bacteria", *Journal of Bacteriology*, 190(17), 5753-5765
55. Ko R, Smith L & T, Smith G M. (1994). Glycine Betaine Confers Enhanced Osmotolerance Cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*. 176(2): 426-431.
56. Kovačević, J., Mesak, L.R & Allen, K.J. (2012). Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia. *Food Microbiology*, 30 (2), 372-378.
57. Labo. B.H, 2003, 'Characteristics of *Listeria monocytogenes* important for pulsed electric field process optimization', PhD thesis, Ohio State University, Ohio

58. Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R & Sulakvelidze, A.(2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8), 4519-4526
59. 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 (9), 2172-2198
60. Liu,W & Hansen,J N. (1990.) Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology* 56(8), 2551-2558.
61. Low.J.C & Donachie.W.(1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis, *The Veterinary Journal*, 153,(1), 9-29
62. Mahony,J., McAuliffe, O., Ross, R.P& van Sinderen, D.(2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens.*Current Opinion in Biotechnology*, 22 (2), 157-163
63. Malheiros, P.D.S., Sant'Anna, V., Barbosa, M.D.S., Brandelli, A & Franco, B.D.G.D.M.(2012).Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 156 (3), 272-277.
64. McMeekin,T.A.,Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeier, K., Nichols, D.S.,Olley,J., Presser, K., Ratkowsky, D.A., Ross, T., Salter, M & Soontranon,S. (1997).Quantitative Microbiology: *A Basis for Food Safety Emerging Infectious Diseases*, 3 (4), 541-549
65. McNerney, R & Traoré, H.(2005).A review: Mycobacteriophage and their application to disease control. *Journal of Applied Microbiology*, 99 (2), 223-233.
66. Miladi., H.a b ., Bakhrouf, A.a & Ammar, E.b Cellular lipid fatty acid profiles of reference and food isolates *Listeria monocytogenes* as a response to refrigeration and freezing stress *Journal of Food Biochemistry*, Article in Press.
67. Milillo, S.R., Friedly, E.C., Saldivar, J.C., Muthaiyan, A., O'Bryan, C., Crandall, P.G., Johnson, M.G& Ricke, S.C.(2012)A Review of the Ecology, Genomics, and Stress Response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*.*Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52 (8),712-725
68. Monk, I.R., Gahan, C.G.M & Hill, C.(2008).Tools for functional postgenomic analysis of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (13), 3921-3934
69. Murray, E.G.D., Webb, R.A& Swann, H.B.R.,(1926). A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by ahitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *Journal Pathology Bacteriology*. 29, 407–439
70. Ockerman.H.W& Basu.L (1999). A Review of *Listeria monocytogenes* –A Pathogen That Likes Refrigerated Temperatures, *research and reviews: meat*, 172, viewed 28 may 2012.[http://ohioline.osu.edu/sc172/sc172\\_16.html](http://ohioline.osu.edu/sc172/sc172_16.html)
71. Papadopoulou, O.S., Chorianopoulos, N.G., Gkana, E.N., Grounta, A.V., Koutsoumanis, K.P. & Nychas, G.-E. (2012). "Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine", *Meat Science*, 90(3), 865-869

72. Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R.M. & Zurera, G.(2008) "Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review", *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 131-144
73. Pinar, H.(2011).Listeriosis .*Pathology Case Reviews*, 16 (5), 189-194.
74. Pradhan, A.K., Ivanek, R., Gröhn, Y.T., Bukowski, R. & Wiedmann, M. (2011), "Comparison of public health impact of *Listeria monocytogenes* product-to-product and environment-to-product contamination of deli meats at retail". *Journal of food protection*, 74, (11), 1860-1868.
75. Pradhan, A.K., Renata, I., Gröhn, Y.T., Robert, B., Ifigenia, G., Sofos, J.N. & Martin, W. (2010). "Quantitative risk assessment of listeriosis-associated deaths due to *Listeria monocytogenes* contamination of deli meats originating from manufacture and retail", *Journal of food protection*, 73(4), 620-630.
76. Pradhan A.K., Ivanek R., Grohn.T.Y., Geonaras I.,Sofos J, & Wiedmann.M.- Cornell University, 2008 *mgg53 Pradhan et al Deli Meat Risk*, viewed 6 February2013,<http://foodscience.cornell.edu/cals/foodsci/research/labs/wiedmann/links/pradhan-et-al-deli-meat-risk.cfm>
77. Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P & Vijila, H.M.(2007).*Listeria* - Review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 40 (1), 4-13
78. Razavi Rohani, S.M., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S & Griffiths, M.W.(2011).The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*.*LWT - Food Science and Technology*, 44 (10), 2260-2265
79. Reunanen.J,2007,'Lantibiotic Nisin and Its Detection Methods', thesis, Department of Applied Chemistry and Microbiology Division of Microbiology Faculty of Agriculture and Forestry and Viikki Graduate School in Biosciences,University of Helsinki
80. Rossi, L.P.R., Almeida, R.C.C., Lopes, L.S., Figueiredo, A.C.L., Ramos, M.P.P & Almeida, P.F.(2011).Occurrence of *Listeria* spp. in Brazilian fresh sausage and control of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100 *Food Control*, 22 (6), 954-958
81. Schmelcher, M., Waldherr, F. & Loessner, M.J. (2012). "*Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93( 2), 633-64
82. Shannon, E.M., Milillo, S.R., Johnson, M.G & Ricke, S.C.(2011).Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Exposure to a Combination of Nisin and Cold-Pressed Terpeneless Valencia Oil. *Journal of Food Science*, 76 (9), M600-M604
83. Sivarooban, T., Hettiarachchy, N.S & Johnson, M.G.(2008).Transmission electron microscopy study of *Listeria monocytogenes* treated with nisin in combination with either grape seed or green tea extract. *Journal of Food Protection*, 71 (10), 2105-2109
84. Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P & Botsoglou, N.(2008a). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage.*Food Microbiology*, 25 (1), 120-127

85. Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P & Botsoglou, N.(2008b).The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science* 80 (2), 159-166
86. Soni, K.A., Nannapaneni, R& Hagens, S.(2010a).Reduction of listeria monocytogenes on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage listex p100 *Foodborne Pathogens and Disease*, 7 (4), 427-434.
87. Soni, K.A& Nannapaneni, R.(2010b). Bacteriophage significantly reduces listeria monocytogenes on raw salmon fillet tissue. *Journal of Food Protection*, 73 (1), 32-38
88. Stone,R.(2002). Stalin's Forgotten Cure. *Science magazine*, 298, 728-731
89. Stoyanova, L.G., Ustyugova, E.A& Netrusov, A.I.(2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48 (3), 229-243
90. Taillefer, C., Boucher, M., Laferrière, C& Morin, L.(2010) Perinatal listeriosis: Canada's 2008 outbreaks. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstétrique et gynécologie du Canada : JOGC*, 32 (1), 45-48.
91. Tasara, T& Stephan, R.(2006).Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: A review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *Journal of Food Protection*, 69 (6), 1473-1484.
92. The food safety file *L.monocytogenes* , 2008, viewed 28 may 2012<http://www.fooddoctors.com/FSF/L.%20monocytogenes.pdf>
93. Thévenot, D., Dernburg, A & Vernozy-Rozand, C.(2006).An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology*, 101 (1), 7-17
94. Tompkin RB, Scott VN, Bernard DT, Sveum WH, & Gombas KS. (1999). Guidelines to Prevent Post-Processing Contamination from *Listeria monocytogenes*. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 19 (8), 551-562.
95. Todar.K.(2012,a).*Listeria monocytogenes*, Todar's on line textbook of microbiology,viewed29may2012. <http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>
96. Todar.K. (2012,b). Nutrition and Growth of Bacteria, Todar's on line textbook ofmicrobiology,viewed29may2012. [http://www.textbookofbacteriology.net/nutgro\\_5.html](http://www.textbookofbacteriology.net/nutgro_5.html)
97. Truelstrup Hansen, L. & Vogel, B.F. (2011). "Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: Survival and transfer to salmon products", *International journal of food microbiology*, 146, (1), 88-93.
98. Turner,M.S., Waldherr, F., Loessner, M.J & Giffard, P.M.(2007). Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 30 (1), 58-67
99. Vanessa Y. Montañez-Izquierdo., Dora I. Salas-Vázquez & José J. Rodríguez-Jerez (2012). Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces,*Food Control*,23(2), 470-477
100. Walls,I.(2005)."Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis - A risk-based approach", *Journal of food protection*, 68(9), 1932-1994.

101. Wan Norhana, M.N., Poole, S.E., Deeth, H.C & Dykes, G.A.(2012).Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4 °C. *Food Microbiology*, 31 (1), 43-50.
102. Wang, P., Yang, H., Hu, Y., Yuan, F., Zhao, G., Zhao, Y & Chen, Y.(2012) Characterization of *Listeria Monocytogenes* Isolates in Import Food Products of China from 8 Provinces Between 2005 and 2007.*Journal of Food Science*, 77 (4), M212-M216
103. Young., K.D.(2006).The selective value of bacterial shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70 (3), 660-703
104. Zhang, X., Wu, S., Li, K., Shuai, J., Dong, Q & Fang, W.(2012).Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for identification of *Listeria* genus, *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* *International Journal of Food Microbiology*, . Article in Press.
105. Zou,Y.,Lee, H.-Y.,Seo, Y.-C & Ahn, J.(2012).Enhanced Antimicrobial Activity of Nisin-Loaded Liposomal Nanoparticles against Foodborne Pathogens. *Journal of Food Science*, 77 (3), M165-M170

#### ***Βιβλιογραφία ελληνική***

1. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα L338/1

## ***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ***



### **1ΠΥ. Υπολογισμός της αρχικής συγκέντρωσης του εναιωρήματος εμβολιασμού και απαιτούμενες αραιώσεις.**

Βάση των 30 g δείγματος για κάθε δείγμα απαιτείται  $30 \cdot 100 = 3000$  CfU/ δείγμα, συνεπώς θα πρέπει το εναιώρημα εμβολιασμού να έχει 6000 CfU/mL ώστε τα 500  $\mu$ L να περιέχουν 3000 CfU. Η αύξηση του πληθυσμού μετά την επώαση σε tryptic soy broth έφτασε στον πληθυσμό  $7,6 \cdot 10^7$  CfU/mL ( $3,8 \cdot 10^7$  CfU/mL μετά και την αραιώση με ίδιο όγκο BPW). Ο συνολικός όγκος που απαιτήθηκε για τους εμβολιασμούς ήταν  $88(\text{δείγματα}) \cdot 0,500 = 44$  mL εναιωρήματος, δηλαδή 88 mL εναιωρήματος 6000 CfU/mL ( $3000 \text{ CfU}/0,5 \text{ mL}$ ). Για την αποφυγή απωλειών (λόγο χαμηλού όγκου) και καλής κατανομής των βακτηριακών κυτάρων το εναιώρημα των  $3,8 \cdot 10^7$  CfU/mL αραιώθηκε 200 φορές ώστε ο τελικός όγκος για την δημιουργία του εναιωρήματος εμβολιασμών των δειγμάτων να είναι της τάξης των mL. Έτσι: Σε 199 mL ορού (0,8% NaCl) προστέθηκαν 1 mL εναιωρήματος  $3,8 \cdot 10^7$  CfU/mL δηλαδή  $3,8 \cdot 10^7$  CfU/200 mL = 190000 cfu/ mL. Για την δημιουργία 100 mL εναιωρήματος 6000 CfU/mL ( $3000 \text{ CfU}/0,5 \text{ mL}$ ) 3,16 mL της παραπάνω αραιώσης προστέθηκαν σε 96,84 mL ορού(0,8% NaCl).

### **2ΠΥ. Παράδειγμα υπολογισμού των Pfu/mL**

Μετά το πέρας της επώασης τα τρυβλία τοποθετούνται σε στερεοσκόπιο όπου καταμετρούνται οι πλάκες λύσης. Καταμετρούνται τα τρυβλία από 10-300 πλάκες λύσης(σχήμα 1ΠΥ).

Ο υπολογισμός σε Pfu/ mL γίνεται ως εξής: έστω ότι στην  $10^{-8}$  μετρήθηκαν 58 πλάκες λύσης. Ο συντελεστής αραιώσης για την  $10^{-8}$  είναι  $10^8$  (δηλαδή αραιώθηκε  $10^8$  φορές) όμως το τρυβλίο «εμβολιάστηκε» με 0,100 mL από την  $10^{-8}$  που είναι σαν να το αραιώθηκε ακόμα μια φορά δηλαδή  $10^{-9}$ . Άρα  $(58/10^{-9}) = 5,8 \cdot 10^{10}$  Pfu./mL

Συμπερασματικά: 
$$\text{Pfu/ mL} = \frac{\text{Αριθμός πλακών λύσης}}{10^{n+1 \text{ αραιώση εμβολιασμού}}}$$



**Σχήμα 1 ΠΥ.** Η μορφή που σχηματίζουν οι πλάκες λύσης στο TSA (Εργαστήριο υγιεινής και επιδημιολογίας, 2012)

**3ΠΥ. Παράδειγμα υπολογισμού όγκου εμβολιασμού βακτηριοφάγου και τελικής συγκέντρωσης φορτίου (Pfu/g δείγματος)**

Έστω ότι επιθυμείται τελική συγκέντρωση φορτίου βακτηριοφάγου  $10^7$  Pfu/g δείγματος

Ανά δείγμα:

1 mL αραιώσεως περιέχουν  $10^8$  Pfu

0,100 mL αραιώσεως περιέχουν ?  $((0,100 \cdot 10^8)/10 = 10^7$  Pfu

Αν γινόταν εμβολιασμός 0,100 mL από την  $10^8$  Pfu/mL στο δείγμα των 30 g τότε η συγκέντρωση φορτίου βακτηριοφάγου στο δείγμα θα ήταν  $10^7$  Pfu που σημαίνει  $10^7/30 = 3,3 \cdot 10^6$  Pfu/g δείγματος. Η επιθυμητή συγκέντρωση είναι  $10^7$  Pfu/g δείγματος  
Άρα :

$3,3 \cdot 10^6$  Pfu/g δείγματος περιέχονται σε όγκο 0,100 mL

$10^7$  Pfu/g δείγματος περιέχονται σε όγκο ?  $(0,100 \cdot 10^7 / 3,3 \cdot 10^6) = 0,300$  mL

Συμπερασματικά: Για να αποκτηθεί συγκέντρωση  $10^7$  Pfu/g δείγματος θα πρέπει να εμβολιαστεί το δείγμα με 0,300 mL συγκέντρωσης  $10^8$  Pfu/mL. Τα δείγματα όμως που επιμολύνθηκαν με συγκέντρωση φορτίου βακτηριοφάγου  $10^7$  Pfu/g ήταν 40 επομένως χρησιμοποιηθήκαν  $40 \cdot 0,300 = 12$  mL. Έτσι παρασκευάστηκαν 20 mL συγκέντρωσης φορτίου βακτηριοφάγου  $10^8$  Pfu/mL ώστε να επιμολυνθούν τα δείγματα άλλα και να περισσεύσει και για την δημιουργία της συγκέντρωσης φορτίου βακτηριοφάγου  $10^7$  Pfu/mL.

## ***ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ***

### Στατιστική ανάλυση two way ANOVA

	Τυροσαλάτα1		Τυροσαλάτα3		Τυροσαλάτα7		1-3	1-7	3-7
	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation			
Βακτηριοφάγος 0 (μάρτυρας)	2,10	0,046	2,44	0,039	2,60	0,043	<0,001	<0,001	<0,001
Βακτηριοφάγος 1.000	2,14	0,034	2,48	0,025	2,64	0,040	<0,001	<0,001	<0,001
Βακτηριοφάγος 10.000.000	1,83	0,024	1,85	0,037	1,81	0,013	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	<b>0,356</b>
Βακ. 0 vs 1.000	<b>0,601</b>		<b>0,403</b>		<b>0,573</b>				
Βακ. 0 vs 10.000.000	<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>				
Βακ. 1.000 vs 10.000.000	<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>				

	Ταραμοσαλάτα_1		Ταραμοσαλάτα_3		Ταραμοσαλάτα_7		1-3	1-7	3-7
	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation			
Βακτηριοφάγος 0 (μάρτυρας)	2,16	0,033	2,5	0,015	2,63	0,052	<0,001	<0,001	<b>0,001</b>
Βακτηριοφάγος 1.000	2,15	0,029	2,47	0,021	2,61	0,017	<0,001	<0,001	<b>0,001</b>
Βακτηριοφάγος 10.000.000	1,85	0,041	1,87	0,031	1,84	0,042	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	<b>0,989</b>
Βακ. 0 vs 1.000	<b>0,999</b>		<b>0,486</b>		<b>0,999</b>				
Βακ. 0 vs 10.000.000	<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>				
Βακ. 1.000 vs 10.000.000	<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>				

### Στατιστική ανάλυση one way ANOVA

	Ομάδα Βακτηριοφάγος 10_7		Βακτηριοφάγος 10_7 + νισίνη 3		Βακτηριοφάγος 10_7 + νισίνη 12		νισίνη 0-3	νισίνη 0-12	νισίνη 3-12
	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation			
Τυροσαλάτα	1,83	0,024	1,55	0,079	1,04	0,033	<0,001	<0,001	<0,001
Ταραμοσαλάτα	1,85	0,041	1,52	0,096	0,96	0,048	<0,001	<0,001	<0,001

***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ***

### **Εκλεκτικό πρωτογενές υπόστρωμα εμπλουτισμού: Half Fraser**

Διαλύονται τα συστατικά της αφυδατωμένης πλήρους βάσης σε νερό και αν απαιτείται θερμαίνονται. Γίνεται ρύθμιση του pH, αν είναι απαραίτητο, έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι  $7.2 \pm 0.2$  στους  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Διανέμεται το υπόστρωμα σε κωνικές φιάλες κατάλληλου όγκου για να μπορούν να ληφθούν οι απαραίτητες ποσότητες για τη δοκιμή. Γίνεται αποστείρωση για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο στους  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Τα διαλύματα χλωριούχου λίθιου και ναλιδοξικού οξέος μπορούν να προστεθούν στη βάση του υποστρώματος πριν το αυτόκαυστο.

#### **Σύνθεση (g/L)**

Peptone mixture	15.00
Yeast extract	5.00
Aesculin	1.00
Disodium hydrogen phosphate	9.60
Potassium dihydrogen phosphate	1.35
Sodium chloride	20.00
Lithium chloride	3.00
Acriflavine	0.0125
Nalidixic acid	0.01

### **Εκλεκτικό δευτερογενές υπόστρωμα εμπλουτισμού: ζωμός Fraser (Fraser broth)**

Διαλύονται τα συστατικά της αφυδατωμένης πλήρους βάσης σε νερό και αν απαιτείται θερμαίνονται. Γίνεται ρύθμιση του pH, αν είναι απαραίτητο, έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι  $7.2 \pm 0.2$  στους  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Διανέμεται το υπόστρωμα σε κωνικές φιάλες κατάλληλου όγκου για να μπορούν να ληφθούν οι απαραίτητες ποσότητες για τη δοκιμή. Γίνεται αποστείρωση για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο στους  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Τα διαλύματα χλωριούχου λίθιου και ναλιδοξικού οξέος μπορούν να προστεθούν στη βάση του υποστρώματος πριν το αυτόκαυστο. Τα αντιδραστήρια που ακλουθούν συνοδεύονται με την πλήρη βάση κατά την αγορά.

#### **Σύνθεση**

Αμέσως πριν τη χρήση, προστίθενται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα βάσης υποστρώματος (10ml όγκο) ποσότητα 0.1 ml των διαλυμάτων Acriflavine hydrochloride και Ammonium iron (III) citrate αντίστοιχα. Ακολουθεί ήπια ανάμιξη του μίγματος των διαλυμάτων

### **Πρώτο εκλεκτικό υπόστρωμα καλλιέργειας (ALOA)**

Γίνεται διάλυση αφυδατωμένης πλήρους βάσης στο νερό με βρασμό. Ακολουθεί αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Γίνεται ρύθμιση του pH, αν είναι απαραίτητο, έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι  $7.2 \pm 0.2$ . Τα αντιδραστήρια που ακλουθούν συνοδεύονται με την πλήρη βάση κατά την αγορά.

### Σύνθεση (g/L)

Meat peptone	18.0
Tryptone	6.0
Yeast extract	10.0
Lithium chloride	10.0
Sodium chloride	5.0
Disodium hydrogen orthophosphate anhydrous	2.5
Sodium pyruvate	2.0
Glucose	2.0
Glycerophosphate	1.0
Magnesium sulphate	0.5
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	0.05
Agar	13.5
Meat peptone	18.0
Tryptone	6.0
Yeast extract	10.0
Lithium chloride	10.0
Sodium chloride	5.0
Disodium hydrogen orthophosphate anhydrous	2.5
Sodium pyruvate	2.0
Glucose	2.0
Glycerophosphate	1.0
Magnesium sulphate	0.5
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	0.05
Agar	13.5

Απαραίτητα supplements X072, X010

#### 2.1.3.4 Δεύτερο εκλεκτικό υπόστρωμα καλλιέργειας(Oxford agar)

Διαλύονται πλήρης αφυδατωμένη σκόνη στο νερό με βρασμό. Το pH ρυθμίζεται, αν χρειαστεί, ώστε μετά την αποστείρωση να είναι  $7,0 \pm 0,2$  στους  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ακολουθεί αποστείρωση στους  $125\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά. Τα αντιδραστήρια που ακλουθούν συνοδεύονται με την πλήρη βάση κατά την αγορά.

### Σύνθεση (g/L)

Columbia Agar Base	41.0
Aesculin	1.0
Ferric ammonium citrate	0.5
Lithium chloride	15.0

Απαραίτητα supplements X0123

#### 2.1.3.5 Στερεά υποστρώματα: Tryptone soya yeast extract άγαρ (TSYEA)

Διαλύονται πλήρης αφυδατωμένη σκόνη στο νερό με βρασμό. Το pH ρυθμίζεται, αν χρειαστεί, ώστε μετά την αποστείρωση να είναι  $7,0 \pm 0,2$  στους  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ακολουθεί αποστείρωση για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο στους  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Αφήνεται να στερεοποιηθεί σε πλάγια θέση. Για τη προετοιμασία των τρυβλίων με το άγαρ, γίνεται διανομή του υποστρώματος σε αποστειρωμένα Petri σε ποσότητες τέτοιες που να είναι κατάλληλες για τη δοκιμή. Ακολούθως αφήνεται να στερεοποιηθεί

## **Υγρά υποστρώματα: Tryptone soya yeast extract ζωμός(TSYEB)**

Διαλύονται το αφυδατωμένο πλήρες υπόστρωμα σε νερό, με θέρμανση αν είναι απαραίτητο. Γίνεται ρύθμιση του pH, αν είναι απαραίτητο, έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι  $7.3 \pm 0.2$  στους  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Διανέμεται το υπόστρωμα σε κωνικές φιάλες ή δοκιμαστικούς σωλήνες κατάλληλης χωρητικότητας, ώστε να μπορούν να προκύψουν οι απαραίτητες ποσότητες για τη δοκιμή. Ακολουθεί αποστείρωση για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο στους  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **Αιματούχο άγαρ προβάτου**

Διαλύονται τα συστατικά ή το αφυδατωμένο πλήρες υπόστρωμα σε νερό με βρασμό. Γίνεται ρύθμιση του pH, αν είναι απαραίτητο, έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι  $7.2 \pm 0.2$  στους  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Διανέμεται το υπόστρωμα σε κωνικές φιάλες κατάλληλης χωρητικότητας, ώστε να μπορούν να προκύψουν οι απαραίτητες ποσότητες για τη δοκιμή. Ακολουθεί αποστείρωση για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο στους  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$

### **Σύνθεση (g/L)**

Columbia Peptone Mixture	23.0
Corn Starch	1.0
Sodium chloride	5.0
Agar No. 2	12.0
Sheep Blood	70ml

## **Άγαρ κινητικότητας**

Διαλύονται τα συστατικά σε νερό με βρασμό. Γίνεται ρύθμιση του pH, αν είναι απαραίτητο, έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι  $7,3 \pm 0.2$  στους  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Διανέμεται το υπόστρωμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες σε ποσότητες περίπου 5ml. Ακολουθεί αποστείρωση για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο στους  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **CAMP(Christie, Atkins, Munch-Petersen) υπόστρωμα και εξεταζόμενα στελέχη.**

Για το σκοπό αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρυβλία με αιματούχο άγαρ προβάτου αλλά είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθούν τρυβλία διπλής στρώσης άγαρ με ένα πολύ λεπτό layer

## **Πλήρες υπόστρωμα**

Διανέμεται η βάση του υποστρώματος σε τρυβλία Petri σε ποσότητες των 10 ml και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Ακολουθεί έκχυση πολύ λεπτού στρώματος αιματούχου υποστρώματος χρησιμοποιώντας ποσότητα που να μην υπερβαίνει τα 3ml ανά τρυβλίο. Αφήνεται να στερεοποιηθεί. Αν το αιματούχο υπόστρωμα προστίθεται σε



τρυβλία με βάση υποστρώματος πρωτύτερα παρασκευασμένη, μπορεί να είναι απαραίτητο να θερμανθούν για 20 λεπτά με τοποθέτηση τους σε κλίβανο στους 37 °C πριν την έκχυση του αιματούχου υποστρώματος.

### **ID color katalase**

Γίνεται χρήση μερικών σταγόνων ID color katalase

### **Tryptic soy broth**

Διαλύονται το αφυδατωμένο πλήρες υπόστρωμα σε νερό, με θέρμανση αν είναι απαραίτητο. Γίνεται ρύθμιση του pH, αν είναι απαραίτητο, έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι  $7.3 \pm 0.2$  στους 25 °C. Διανέμεται το υπόστρωμα σε κωνικές φιάλες ή δοκιμαστικούς σωλήνες κατάλληλης χωρητικότητας, ώστε να μπορούν να προκύψουν οι απαραίτητες ποσότητες για τη δοκιμή. Ακολουθεί αποστείρωση για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο στους 121 °C

#### **Σύνθεση (g/L)**

Tryptone (Casein Digest USP) 17.0  
Soy Peptone 3.0  
Sodium chloride 5.0  
Dipotassium phosphate 2.5  
Dextrose 2.5

### **Tryptic Soy Agar**

Διαλύονται πλήρης αφυδατωμένη σκόνη στο νερό με βρασμό. Το pH ρυθμίζεται, αν χρειαστεί, ώστε μετά την αποστείρωση να είναι  $7,0 \pm 0,2$  στους 25 °C. Ακολουθεί αποστείρωση για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο στους 121 °C. Αφήνεται να στερεοποιηθεί σε πλάγια θέση. Για τη προετοιμασία των τρυβλίων με το άγαρ, γίνεται διανομή του υποστρώματος σε αποστειρωμένα Petri σε ποσότητες τέτοιες που να είναι κατάλληλες για τη δοκιμή. Ακολούθως αφήνεται να στερεοποιηθεί

#### **Σύνθεση (g/L)**

Tryptone (Casein Digest USP) 15.0  
Soy Peptone 5.0  
Sodium chloride 5.0  
Agar No. 2 12.0

### **Buffered Peptone Water(BPW)**

Διαλύονται το αφυδατωμένο πλήρες υπόστρωμα σε νερό, με θέρμανση αν είναι απαραίτητο. Γίνεται ρύθμιση του pH, αν είναι απαραίτητο, έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι  $7.3 \pm 0.2$  στους 25 °C. Διανέμεται το υπόστρωμα σε κωνικές φιάλες ή δοκιμαστικούς σωλήνες κατάλληλης χωρητικότητας, ώστε να μπορούν να

προκύψουν οι απαραίτητες ποσότητες για τη δοκιμή. Ακολουθεί αποστείρωση για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο στους 121 °C

**Σύνθεση (g/L)**

Peptone 10.0

Sodium chloride 5.0

Disodium hydrogen phosphate 3.7

Potassium dihydrogen phosphate 1.5