



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***Listeria monocytogenes* στα τυριά**

Εισηγήτρια: Μαρία Κατσιμιλή (16041)

Επιβλέποντες: Ανθιμία Μπατρίνου, Σπυρίδων Κοντελής

ΑΘΗΝΑ 2021

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Αθήνα, 2021

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Ανθμία Μπατρίνου

Βιολόγος MSc, PhD, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και Λέκτορας Εφαρμογών Εργαστηρίου Μικροβιολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

2. Επιβλέπων Καθηγητής

Σπυρίδων Κοντελής

Γεωπόνος, PhD, Ακαδημαϊκός Υπότροφος Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

3. Μέλος επιτροπής

Βασίλης Σπηλιώτης

Βιολόγος MSc, PhD, Καθηγητής Μικροβιολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαι η αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας πτυχιακής εργασίας, η οποία δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής, ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν για την συγγραφή της περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί διαχρονικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Κατσιμιλή Μαρία

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα παθογόνο τροφιμογενές βακτήριο, που έχει συσχετιστεί με αρκετά κρούσματα λοίμωξης του ανθρώπου και ανακλήσεις τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο. Η λιστερίωση, η λοίμωξη δηλαδή από την *Listeria monocytogenes*, είναι μεν ασθένεια σποραδική και σπάνια, αλλά με μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας. Λόγω των ιδιαίτερων συνθηκών διαβίωσης και επιβίωσης του, το βακτήριο αυτό αποτελεί κίνδυνο τόσο για την βιομηχανία τροφίμων και την οικονομία, όσο και για την δημόσια υγεία. Η παρουσία του σε αρκετά είδη τυριών χρήζει της τήρησης προληπτικών μέτρων και της ύπαρξης ελέγχου σε επίπεδο παραγωγής, επεξεργασίας και διακίνησης, αλλά και της ενημέρωσης των καταναλωτών σχετικά με την συμβολή τους στην ασφάλεια των τροφίμων. Εντούτοις, ο μικροβιολόγος τροφίμων υποχρεούται να αναλύει κάθε τρόφιμο για την παρουσία *Listeria monocytogenes* και μάλιστα σε σύντομο χρονικό διάστημα, καθώς είναι δυνατόν το φαγητό που εμπλέκεται να έχει ήδη καταναλωθεί, πριν το πρωτόκολλο αναγνώρισης ολοκληρωθεί. Για τον σκοπό αυτό, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι ποσοτικής και ποιοτικής ανίχνευσης του βακτηρίου, με αρκετά καλές προοπτικές αξιοπιστίας και ακρίβειας. Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά του παθογόνου αυτού βακτηρίου το καθιστούν μοιραία αδύνατο να εξαλειφθεί από τα τρόφιμα. Επομένως, οι τρόποι αποτροπής και καταπολέμησής του σε περίπτωση παρουσίας του, αποτελούν ίσως την σημαντικότερη πρόκληση κατά της *Listeria monocytogenes*. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, δίνοντας ένα γενικό υπόβαθρο πληροφοριών περί αυτού, η έρευνα της παρουσίας του και του τρόπου ανάπτυξης του στα διάφορα τυριά, ενώ ιδιαίτερη μνεία γίνεται στις μεθόδους αποφυγής, ανίχνευσης και υποτύπωσής του.

Λέξεις κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, λιστερίωση, τυριά, ανίχνευση, υποτύπωση

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a pathogenic food-borne bacterium that has been associated with several cases of human infection and food recalls worldwide. Listeriosis, the infection caused by *Listeria monocytogenes*, is a sporadic and rare disease, but with high mortality rates. Due to its special living and survival conditions, this bacterium poses a risk to both food industry and economy, as well as to public health. Its presence in several types of cheese requires the observance of preventive measures and the existence of control at the level of production, processing and distribution, but also the informing of consumers about their contribution to food safety. However, the food microbiologist is obliged to analyze each food for the presence of *Listeria monocytogenes* and in a short time, as it is possible that the food involved has already been consumed, before the identification protocol is completed. For this purpose, various methods of quantitative and qualitative detection of bacterium have been developed, with quite good prospects of reliability and accuracy. However, the characteristics of this pathogenic bacterium make it almost impossible to eliminate from food. Therefore, the ways to prevent and control it, in case of its presence, are perhaps the most important challenges against *Listeria monocytogenes*. The aim of the present work is the study of the microorganism *Listeria monocytogenes*, giving a general background of information about it, the research of its presence and growth conditions in the variety of cheese, while special mention is made about the methods of its avoidance, detection and subtyping.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, cheese, detection, subtyping

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	14
Φυσιολογία της <i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.1 Ιστορικά στοιχεία.....	14
1.2 Χαρακτηριστικά της <i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.2.1 Μορφολογία	14
1.2.2 Καλλιέργεια	15
1.2.3 Ταξινόμηση	15
1.3 Ευαισθησία - Ανθεκτικότητα της <i>Listeria Monocytogenes</i> σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες	17
1.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας.....	17
1.3.2 Επίδραση του pH.....	17
1.3.3 Επίδραση της ενεργότητας νερού (a_w)	18
1.3.4 Επίδραση της συγκέντρωσης αλάτων	18
1.3.5 Επίδραση συνδυασμών των παραγόντων	18
1.4 Μεταβολισμός της <i>Listeria monocytogenes</i>	23
1.4.1 Διατροφικές απαιτήσεις της <i>L. Monocytogenes</i>	24
1.4.2 Μεταβολισμός υδατανθράκων.....	24
1.4.3 Μεταβολισμός αμινοξέων και πεπτιδίων.....	25
1.4.4 Μεταβολισμός σιδήρου (Fe).....	25
1.5 Βιοχημικές δοκιμές	25
1.6 Πηγές της <i>Listeria monocytogenes</i>	28
1.6.1 Περιβάλλον	28
1.6.2 Ζώα	28
1.6.3 Άνθρωποι	29
1.6.4 Εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων	29
1.7 Ανθρώπινη Λιστερίωση – Χαρακτηριστικά της ασθένειας.....	31
1.7.1 Επεμβατική νόσος σε ενήλικες	31
1.7.2 Λιστερίωση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.....	33
1.7.3 Λιστερίωση νεογνών	33
1.7.4 Μη επεμβατική νόσος στους ενήλικες	34
1.8 Λοιμώδης δράση της <i>Listeria monocytogenes</i> - Παθογένεια	34

1.9	Επιδημιολογία.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2		42
Παρουσία της <i>Listeria monocytogenes</i> στα τυριά.....		42
2.1	Τυρί: Ορισμός και Κατηγοριοποίηση.....	42
2.2	Συχνότητα εμφάνισης της <i>Listeria monocytogenes</i> στα τυριά	45
2.3	Τυριά που υποστηρίζουν την ανάπτυξη της <i>Listeria monocytogenes</i>	47
2.3.1	Ανάλογα με την σκληρότητα	47
2.3.2	Ανάλογα με τον τύπο τους	48
2.3.3	Ανάλογα με το είδος του γάλακτος	53
2.3.4	Ανάλογα με την εφαρμογή ή μη της παστερίωσης.....	53
2.3.5	Ανάλογα με το σημείο επιμόλυνσής τους	56
2.3.6	Ανάλογα με τον χειρισμό κατά την επεξεργασία, ωρίμανση, αποθήκευση και λιανική πώλησή τους.....	57
2.3.7	Ανάλογα με το περιβάλλον επεξεργασίας τους.....	59
2.4	Στατιστικά δεδομένα κρούσματος λιστερίωσης από τυριά	60
2.5	Νομοθεσία και όρια ανοχής για την <i>Listeria monocytogenes</i> στα τυριά.....	66
2.6	Τρόποι αποφυγής της <i>Listeria monocytogenes</i>	69
2.6.1.	Προληπτικά μέτρα στο περιβάλλον παραγωγής	69
2.6.2.	Νέες τεχνολογίες.....	71
2.6.3.	Ενημέρωση καταναλωτών.....	71
2.6.4.	Αντιμικροβιακά	72
2.6.5.	Θεραπεία.....	74
2.6.6.	Εμβόλιο.....	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3		76
Ανίχνευση της <i>Listeria monocytogenes</i>		76
3.1	Τεχνικές κυτταρικής καλλιέργειας	76
3.1.1	Πρότυπη μέθοδος αναφοράς (ISO 11290-1).....	78
3.1.2	Πρότυπη μέθοδος αναφοράς (ISO 11290-2).....	79
3.1.3	Μέθοδος πολλαπλών σωλήνων (MPN).....	80
3.2	Ανοσολογικές τεχνικές	80
3.2.1	Μέθοδος ELISA	81
3.2.2	Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (IMS).....	81
3.3	Μοριακές μέθοδοι.....	82
3.3.1	Μικροσυστοιχίες DNA	82
3.3.2	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	82

3.3.3	Υβριδισμός φθορισμού <i>in situ</i> (FISH)	84
3.4	Άλλες μέθοδοι.....	85
3.4.1	Τεχνικές με βιοαισθητήρα	85
3.4.2	Ανίχνευση μονόκλωνων πολυμορφισμών σε προϊόντα PCR	85
3.4.3	Ανιχνευτές DNA (DNA Probes)	85
3.4.4	Τεχνικές με βάση τη φασματοσκοπία.....	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	87
Υποτύπωση της <i>Listeria monocytogenes</i>	87
4.1	Συμβατικές μέθοδοι υποτύπωσης	87
4.1.1	Οροαποτύπωση (Serotyping)	87
4.1.2	Λυσιτυπία (Phage typing)	88
4.1.3	Ηλεκτροφόρηση ενζύμου πολλαπλής εστίασης (MLEE)	88
4.2	Μέθοδοι που βασίζονται στην χρήση περιοριστικών ενζύμων	89
4.2.1	Ριβοσωμική αποτύπωση (Ribotyping)	89
4.2.2	Ηλεκτροφόρηση πήγματος παλλόμενου πεδίου (PFGE).....	89
4.2.3	Πολυμορφισμός μήκους θραύσματος DNA με Πολυμερισμό (AFLP).....	90
4.2.4	Πολυμορφισμός μήκους θραύσματος DNA Περιορισμού (RFLP).....	90
4.3	Μέθοδοι που βασίζονται στην PCR.....	91
4.3.1	Τυχαία Πολυμερισμένο Πολυμορφικό DNA (RAPD)	91
4.3.2	Επαναλαμβανόμενη Εξωγονιδιακή Παλινδρομική PCR (REP-PCR)	91
4.3.3	Πολυτοπική Ανάλυση Αλληλουχίας DNA (MLST).....	92
4.3.4	Ανάλυση Μεγέθους Μεταβλητού Αριθμού Πολλαπλών Περιοχών (MLVA).....	92
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	93
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95
Ξένη Βιβλιογραφία	95
Ελληνική Βιβλιογραφία	102

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Μέσος χρόνος μεμονωμένων φάσεων προσαρμογής κυττάρων (h) του <i>L. monocytogenes</i> σε συνάρτηση με θερμοκρασία, pH, και aw.....	19
Πίνακας 2: Μέσος χρόνος μεμονωμένων φάσεων ανάπτυξης κυττάρων (h) του <i>L. monocytogenes</i> σε συνάρτηση με θερμοκρασία, pH, και aw	20
Πίνακας 3: Επίδραση του pH και της συγκέντρωσης άλατος στην ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i>	21
Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν τα είδη του γένους <i>Listeria</i>	26
Πίνακας 5: Προϊόντα μεταφορείς / ή όχι της <i>Listeria monocytogenes</i>	29
Πίνακας 6: Άτομα σε κίνδυνο.....	32
Πίνακας 7: Κλινικά σύνδρομα που περιγράφονται από λοίμωξη με <i>Listeria monocytogenes</i> ..	32
Πίνακας 8: Περίληψη των δεδομένων σχετικά με μεγάλες εκδηλώσεις λοιμώξεων του πληθυσμού από <i>Listeria monocytogenes</i> , 1980-1999	36
Πίνακας 9: Αναφερόμενα και δημοσιευμένα περιστατικά ανθρώπινης επεμβατικής λιστερίωσης, σχετικοί θάνατοι και ποσοστά θνησιμότητας κρουσμάτων στην Ε.Ε., 2008-2015	37
Πίνακας 10: Η κατανομή του αριθμού των κρουσμάτων ανθρώπινης επεμβατικής λιστερίωσης στην Ε.Ε. για 14 ομάδες υποπληθυσμού και του εκτιμώμενου σχετικού κινδύνου, την περίοδο 2008-2015	38
Πίνακας 11: Χαρακτηριστικά των συμβάντων λοίμωξης από <i>Listeria monocytogenes</i> που αναφέρονται στη βάση δεδομένων ProMED	40
Πίνακας 12: Ταξινόμηση των τυριών σε κατηγορίες.....	43
Πίνακας 13: Παρουσία της <i>L. monocytogenes</i> σε διάφορους τύπους τυριών.....	51
Πίνακας 14: Παρουσία της <i>L. monocytogenes</i> σε διάφορα είδη τυριών ανάλογα με τη σύνθεση των τυριών.....	52
Πίνακας 15: Παρουσία της <i>L. monocytogenes</i> σε τυριά διαφορετικών τύπων, διαφορετικής θερμικής επεξεργασίας και διαφορετικού είδους γάλακτος.....	54
Πίνακας 16: Επιβίωση ή/και ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i> σε διάφορα είδη τυριών κατά την παρασκευή και την ωρίμανση ή αποθήκευση.....	58
Πίνακας 17: Κρούσματα λιστερίωσης που προκλήθηκαν από τυρί κατά την περίοδο 1983-2017	62
Πίνακας 18: Κριτήρια ασφάλειας για τα τρόφιμα έναντι της <i>Listeria monocytogenes</i>	67

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σχηματισμός νηματίων της <i>Listeria monocytogenes</i> που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες περιβαλλοντικού stress. Τα κύτταρα έχουν φωτογραφηθεί (μεγέθυνση 412,5×) μετά από ανάπτυξη σε Tryptic Soy Broth: (A) χωρίς οξύ, (B) pH 6,0 με κιτρικό οξύ, (C) pH 9,2 με NaOH, (D) pH 9,4 με NaOH, (E) 1200mmol l ⁻¹ με NaCl (F) 1500mmol l ⁻¹ με NaCl	15
Σχήμα 2: Τα βήματα της διαδικασίας λοίμωξης από <i>Listeria monocytogenes</i>	35
Σχήμα 3: Αριθμός των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων ανθρώπινης επεμβατικής λιστερίωσης ανά 100.000 ανθρώπους ανά ηλικιακή ομάδα και φύλο στην Ε.Ε. το 2015	39
Σχήμα 4: Παρουσία περιστατικών λιστερίωσης ανά έτος που αναφέρονται στο ProMED	41
Σχήμα 6: Ποσοστό μεμονωμένων δειγμάτων κατά την επεξεργασία (a) και κατά τη λιανική πώληση (b) μη συμμορφούμενα με τα ευρωπαϊκά κριτήρια ασφάλειας τροφίμων για την <i>Listeria monocytogenes</i> , που βασίζονται στα δεδομένα παρακολούθησης της EFSA, 2008-2015.....	46
Σχήμα 7: Αριθμός θετικών δειγμάτων <i>L. monocytogenes</i> σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα για την περίοδο 2009-2014 εντός της ΕΕ.....	47
Σχήμα 8: Δυνατότητα ανάπτυξης <i>Listeria monocytogenes</i> σε μαλακά, ημιμαλακά και ημίσκληρα τυριά	49
Σχήμα 9: Αναλογία θετικών δειγμάτων σε <i>Listeria monocytogenes</i> από μαλακά και ημιμαλακά τυριά ωμού γάλακτος ή γάλακτος χαμηλής θερμικής επεξεργασίας, 2013.	55

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένας Gram-θετικός κοκκοβάκιλλος, αερόβιος και προαιρετικά αναερόβιος, που από τη μικροβιακή αφάνεια που βρισκόταν, έφτασε να αποτελεί σημαντικό τροφικό παθογόνο για τον άνθρωπο. Αναπτύσσεται σε διαφορετικούς τύπους οικοτόπων και επιβιώνει ακόμα και σε αντίξοες συνθήκες, όπως ξηρό περιβάλλον, υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού (10% w/v), χαμηλές θερμοκρασίες (-0,5°C έως 9,3°C) και ευρεία περιοχή pH (4,7-9,2). Έτσι, λόγω της ικανότητας ανάπτυξης του και της δυνατότητάς του να σχηματίζει βιοφίλμ σε αδρανείς επιφάνειες, μπορεί να αποικίσει εύκολα και να παραμείνει σε εγκαταστάσεις τροφίμων. Επομένως, ο έλεγχος και η εξάλειψή του αποτελούν πρόκληση για τη βιομηχανία τροφίμων και τη δημόσια υγεία (Paduro, et al., 2020).

Η λιστερίωση είναι μία λοίμωξη που προκαλείται από τη *Listeria monocytogenes* και θεωρείται πλέον μια σημαντική εμφάνιση τροφικής λοίμωξης. Τα περισσότερα παθογόνα που προέρχονται από τρόφιμα και προκαλούν σοβαρές ασθένειες στον ανθρώπινο πληθυσμό, συνήθως επιφέρουν σοβαρή νοσηρότητα και μικρή θνησιμότητα. Ωστόσο, η λιστερίωση είναι μία συχνά θανατηφόρα λοίμωξη της κυκλοφορίας του αίματος και του νευρικού συστήματος, καθώς η *Listeria monocytogenes* μπαίνει στα κύτταρα του ξενιστή, αναπτύσσεται μέσα στο κύτταρο και περνά απευθείας στα διπλανά κύτταρα. Η σημασία αυτού του μικροοργανισμού μπορεί να φανεί τόσο από την σκοπιά της ανθρώπινης νόσου, όσο και από οικονομικής άποψης, λόγω των πολλών ανακλήσεων τροφίμων που έχουν πραγματοποιηθεί ανά καιρούς. Έχουν αναφερθεί σποραδικές περιπτώσεις λιστερίωσης ως αποτέλεσμα τροφιμογενών κρουσμάτων, με το ενδιαφέρον για τον οργανισμό να αναπτύσσεται ραγδαία τη δεκαετία του 1980 μεταξύ των κατασκευαστών τροφίμων και των κυβερνητικών φορέων, με ταυτόχρονη αύξηση στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία (Schlech, 2000; Pagotto & Farber, 2003; Montville & Matthews, 2010).

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η κατανάλωση τυριών στην Ευρώπη, κυρίως λόγω της βελτίωσης της ποιότητας των διαδικασιών επεξεργασίας τους. Ωστόσο, σε εκτίμηση επικινδυνότητας, το τυρί έχει χαρακτηριστεί ως τροφή με μεγαλύτερη ανησυχία για τη δημόσια υγεία λόγω λιστεριώσεων. Η *Listeria monocytogenes* μπορεί να μολύνει τυριά που παρασκευάζονται είτε από ωμό, είτε από παστεριωμένο γάλα (Valero, Hernández, Esteban-Carbonero, & Rodríguez-Lázaro, 2018). Μεγαλύτερη επιμόλυνση εμφανίζουν

τα μαλακά και ημιμαλακά τυριά, ακολουθούμενα από τα ημίσκληρα (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017), τα τυριά άλμης, τα τυριά επιχρίσματος (Martinez-Rios & Dalgaard, 2018) και τα τυριά με ανάπτυξη μικροοργανισμών και βακτηρίων (Ryser, 2002). Εάν στις κατηγορίες αυτές εμπλακούν και άλλοι παράγοντες, όπως η παστερίωση ή το είδος γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή, η παραπάνω σειρά μπορεί να τροποποιηθεί.

Όσον αφορά την ανοχή του βακτηρίου στα τυριά, η κάθε χώρα ακολουθεί τη δική της πολιτική. Ενώ χώρες όπως οι Η.Π.Α. υποστηρίζουν την τακτική «μηδενικής ανοχής» για την *Listeria monocytogenes* (Montville & Matthews, 2010) και χώρες όπως αυτές της Ε.Ε. επιτρέπουν την παρουσία μέχρι 100 cfu/g το ανώτερο, σε προϊόντα που δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου ή με διάρκεια ζωής μικρότερη των πέντε ημερών σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 2073/2005 (Bernini, et al., 2016), υπάρχουν στον αντίποδα, χώρες όπως οι αναπτυσσόμενες, που δεν ακολουθούν καμία τακτική κατά της παρουσίας του μικροοργανισμού στα τρόφιμα. Ωστόσο, με εξαίρεση τα αναπτυσσόμενα κράτη, τα περιστατικά λιστερίωσης είναι ίδια σε χώρες με ανοχή μικρότερη των 100 cfu/g και σε χώρες με μηδενική ανοχή (Montville & Matthews, 2010). Εγείρεται, λοιπόν, ένα μεγάλο δίλημμα: ποια πολιτική είναι πράγματι η σωστή;

Είναι κοινώς παραδεκτό ότι η *Listeria monocytogenes* δεν επιβιώνει της παστερίωσης και επομένως δεν θα έπρεπε να βρίσκεται στα τυριά. Ωστόσο, η επιμόλυνση των τυριών μπορεί να συμβεί από επεξεργασίες μετά της παστερίωσης, όπως επιμόλυνση με ωμό γάλα και κακές πρακτικές υγιεινής κατά την επεξεργασία, ωρίμανση και αποθήκευσή τους ή ακόμα και μέσω της συντήρησής τους στο λιανεμπόριο και το οικιακό περιβάλλον των καταναλωτών (Oliver, Jayarao, & Almeida, 2005; Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012; Bernini, et al., 2013). Με την πάροδο των χρόνων έχουν εφαρμοστεί αρκετά μέτρα πρόληψης των εστιών του βακτηρίου και μείωσης της συχνότητας λιστερίωσης, όπως μέτρα παρακολούθησης σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας τυριών, εκπαίδευση καταναλωτών και έγκαιρη ανίχνευση εστιών και κρουσμάτων της *Listeria monocytogenes* (Lunden, Tolvanen, & Korkeala, 2004).

Η γενική διαδικασία για την ανίχνευση κρουσμάτων λιστερίωσης που προκαλείται από τυριά και γενικά από τρόφιμα, είναι η εξής. Ασθενείς με σοβαρά συμπτώματα εξετάζονται. Εάν απομονωθεί *Listeria monocytogenes* από το αίμα ή τα κόπρανα των ασθενών και εν συνεχεία το βακτήριο απομονωθεί και από μολυσμένα τρόφιμα που έχουν

καταναλώσει ο ίδιος, τότε γίνεται δειγματοληψία για περαιτέρω εξέταση και επιβεβαίωση της παρουσίας της *Listeria monocytogenes* (Makino, et al., 2005). Η βελτίωση των τεχνικών ποιοτικής και ποσοτικής ανίχνευσης του βακτηρίου είναι ένα θέμα μείζονος ανησυχίας στον τομέα της υγιεινής των τροφίμων. Οι κατάλληλες μέθοδοι είναι απαραίτητες για την παροχή αξιόπιστων δεδομένων για ερευνητικές μελέτες στην προγνωστική μικροβιολογία, την επιδημιολογία, την ποσοτική αξιολόγηση του κινδύνου και για αναλύσεις ρουτίνας ή προγράμματα παρακολούθησης σε εγκαταστάσεις τροφίμων (Auvolat & Besse, 2016). Οι παραδοσιακές μικροβιολογικές τεχνικές για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* απαιτούν περισσότερες από έξι ημέρες για την τελική επιβεβαίωση, με αποτέλεσμα να μην είναι αρκετά γρήγορες ώστε να βεβαιώσουν την ασφάλεια των τροφίμων κατά την κατανάλωση και να υπάρξει κίνδυνος καθυστέρησης απόσυρσης των μη συμμορφούμενων τρόφιμων. Παρά τις προκλήσεις αυτές, οι κλασικές τεχνικές παραμένουν η επίσημη πρότυπη μέθοδος που χρησιμοποιείται, αν και υπάρχουν ήδη εναλλακτικές μοριακές μέθοδοι. Η PCR είναι μια από τις περισσότερο υποσχόμενες τεχνικές για ταχεία ανίχνευση μικροοργανισμών με εξαιρετική αναλυτική ευαισθησία, βελτιώνοντας την πιθανότητα ανίχνευσης των παθογόνων. Μεγάλη χρήση, ιδιαίτερα σε δείγματα τυριών, έχει και η PFGE (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007; Gianfranceschi, et al., 2014). Ωστόσο, υπάρχουν πολλές ακόμα τεχνικές ανίχνευσης, τόσο φαινοτυπικές, όσο και γενετικές, που θα αναλυθούν στην παρούσα μελέτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Φυσιολογία της *Listeria monocytogenes*

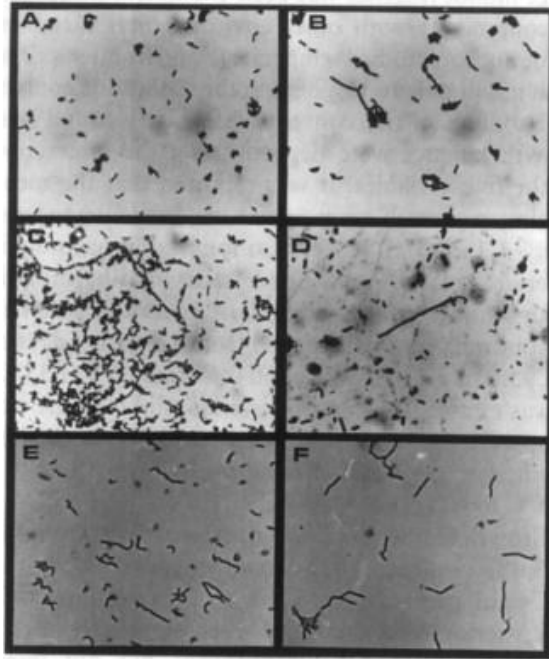
1.1 Ιστορικά στοιχεία

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένας από τους πιο μελετημένους μικροοργανισμούς των τελευταίων 25 ετών. Ταυτοποιήθηκε το 1940, ωστόσο μπορεί να χρονολογηθεί πιο πίσω στο χρόνο. Ένα βακτηριακό κρούσμα μηνιγγίτιδας το 1921 ήταν η αφορμή για την περιγραφή του βακτηρίου από τον Murray και τους συναδέλφους του, που αναφέρεται ως *Bacterium monocytogenes*. Ονομάστηκε έτσι λόγω της μονοπυρηνικής λευκοκυττάρωσης που προκάλεσε σε κουνέλια in vivo. Το 1940, ο Pirie απομόνωσε έναν οργανισμό, τον οποίο ονόμασε *Listerella hepatolytica*, προς τιμήν του χειρουργού λόρδου Lister. Η Listerellosis χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει την ασθένεια που προκαλείται από το βακτήριο. Όμως, με την πάροδο του χρόνου ανακαλύφθηκε ότι ο *Bacterium monocytogenes* και ο *Listerella hepatolytica* ήταν στην πραγματικότητα ο ίδιος μικροοργανισμός. Επειδή η *Listerella* είχε ήδη επιλεγεί για να περιγράψει μια ομάδα μονοκύτταρων ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, ο Pirie πρότεινε ο μικροοργανισμός να κληθεί *Listeria monocytogenes*. Εντούτοις, η πρώτη επιβεβαιωμένη απομόνωση του βακτηρίου από μολυσμένους ανθρώπους γίνεται από τον Nyfeldt, ενώ τέτοια βακτήρια είχαν απομονωθεί και σε ορισμένες άλλες περιπτώσεις από ζώα, τρόφιμα, καθώς και από το περιβάλλον (Farber & Peterkin, 1991; Pagotto & Farber, 2003).

1.2 Χαρακτηριστικά της *Listeria monocytogenes*

1.2.1 Μορφολογία

Η *Listeria monocytogenes* είναι Gram-θετικό βακτήριο, αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο, μη σπορογόνο και έχει σχήμα κοκκοειδές ή κοντής ράβδου. Είναι επίσης κινητό σε θερμοκρασίες 20°-25°C και ακίνητο στους 37°C. Έχει διάμετρο 0,5μm και μήκος 1-2μm (Ryser & Marth, 2007; Τυμπής, Πετράκης, & Κοντελής, 2016). Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1) εμφανίζεται η απεικόνισή του σε μικροσκόπιο μετά από ανάπτυξη σε συνθήκες περιβαλλοντικού stress.



Σχήμα 1: Σχηματισμός νηματίων της *Listeria monocytogenes* που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες περιβαλλοντικού stress. Τα κύτταρα έχουν φωτογραφηθεί (μεγέθυνση 412,5×) μετά από ανάπτυξη σε Tryptic Soy Broth: (A) χωρίς οξύ, (B) pH 6,0 με κιτρικό οξύ, (C) pH 9,2 με NaOH, (D) pH 9,4 με NaOH, (E) 1200mmol l⁻¹ με NaCl (F) 1500mmol l⁻¹ με NaCl (Πηγή: Martin & Fisher, 1999)

1.2.2 Καλλιέργεια

Σε άγαρ θρεπτικών συστατικών, οι αποικίες έχουν διάμετρο 0,2-0,8mm, είναι λείες, στρογγυλές, χρώματος μπλε-γκρι, ημιδιαφανείς και ελαφρώς υψωμένες, με λεπτή υφή επιφάνειας και ολόκληρο περιθώριο, μετά από επώαση 24 ωρών. Μετά από 5-10 ημέρες, οι καλά διαχωρισμένες αποικίες μπορούν να φτάσουν διάμετρο από 5mm και πάνω. Αν οι αποικίες επωαστούν για 18 έως 24 ώρες στους 37°C σε διαυγές μέσο, οι λείες αποικίες εμφανίζουν μια χαρακτηριστική μπλε-γκρι εναλλαγή χρωμάτων μετά από εξέταση σε διοφθαλμικό μικροσκόπιο υπό λοξά μεταδιδόμενο φως (Ryser & Marth, 2007).

1.2.3 Ταξινόμηση

Η συγγένεια της *Listeria* με άλλα βακτήρια δεν ήταν ξεκάθαρη μέχρι το 1970. Μέχρι τότε θεωρείτο ότι το γένος *Listeria* ανήκε στην οικογένεια *Corynebacteriaceae*. Τελικά, με την πάροδο των χρόνων η *Listeria* βρέθηκε να εμφανίζει παρόμοια χαρακτηριστικά με τα βακτήρια: *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* και *Caryophanon*, ως κανονικά, μη σπορογόνα, Gram-θετικά ραβδία (Ryser & Marth, 2007).

Η σημερινή ταξινόμηση, λοιπόν, του είδους είναι η εξής:

- Βασίλειο: *Bacteria*

- Φύλο: *Firmicutes*
- Κλάση: *Bacilli*
- Τάξη: *Bacillales*
- Οικογένεια: *Listeriaceae*
- Γένος: *Listeria*

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* αποτελεί ένα εκ των δέκα αναγνωρισμένων ειδών του γένους *Listeria* που περιγράφηκε πρώτο, με τα υπόλοιπα είδη να ακολουθούν με χρονολογική σειρά αναφοράς: *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria marthii*, *Listeria rocouriae*, *Listeria fleischmannii* και *Listeria weihenstephanensis*. Δύο επιπλέον υποείδη έχουν αναγνωριστεί στο *L. ivanovii*: τα *ivanovii* και *londoniensis*, όπως και στο *Listeria fleischmannii*: τα *fleischmannii* και *coloradonensis* (Den Bakker, et al., 2014).

Από αυτούς, παθογόνοι των θηλαστικών είναι ο *L. ivanovii* και ο *L. monocytogenes*. Ωστόσο, ο *L. ivanovii* είναι σπάνιος και προκαλεί ασθένεια κυρίως σε μηρυκαστικά ζώα. Ο *L. monocytogenes* είναι αυτός που προκαλεί συχνότερα ασθένεια σε ανθρώπους, αλλά και ζώα. Ως παθογόνο σαπρότροφο, το βακτήριο *L. monocytogenes* μπορεί να ζήσει στο έδαφος και σε αποσυντεθειμένη βλάστηση και να προκαλέσει σοβαρή ασθένεια, εφόσον εισέλθει σε ζώο ή ανθρώπινο ξενιστή (Orsi, Den Bakker, & Wiedmann, 2011).

Βάσει των αντιγόνων Ο (σωματικά) και Η (βλεφαριδικά), ο *L. monocytogenes* ταξινομείται σε 13 ορότυπους. Τρεις από αυτούς (1/2a, 1/2b και 4b) προκαλούν τις περισσότερες περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης (Montville & Matthews, 2010). Ωστόσο, οι Paduro, et al. (2020) στη λίστα των οροτύπων με τις περισσότερες λιστεριώσεις κατατάσσουν και τον ορότυπο 1/2c.

Η *L. monocytogenes* αποτελείται από 4 εξελικτικές γενεές (I, II, III και IV). Τα περισσότερα προϊόντα απομόνωσης φαίνεται να ανήκουν στις γενεαλογικές σειρές I και II, τα οποία φιλοξενούν τους ορότυπους που σχετίζονται συνήθως με κλινικές περιπτώσεις του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων του ορότυπου 1/2a (γενεαλογία II) και των ορότυπων 1/2b και 4b (γενεαλογία I). Ωστόσο, τα περισσότερα κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης σχετίζονται με την απομόνωση της γενεαλογίας I (Orsi, Den Bakker, & Wiedmann, 2011).

1.3 Ευαισθησία - Ανθεκτικότητα της *Listeria monocytogenes* σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες

Η επίδραση των επιμέρους περιβαλλοντικών και χημικών παραγόντων, καθώς και οι συνδυασμοί αυτών, επηρεάζουν την ανάπτυξη και επιβίωση των μικροοργανισμών και κατ' επέκταση και της *L. monocytogenes*. Εξετάστηκε, λοιπόν, η φάση προσαρμογής και η φάση ανάπτυξης του συγκεκριμένου βακτηρίου σε σχέση με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του περιβάλλοντος ανάπτυξης (Robinson, Ocio, Kaloti, & Mackey, 1998; Francois, et al., 2006)

Ως φάση προσαρμογής ή φάση υστέρησης της μικροβιακής ανάπτυξης ορίζεται «το διάστημα μεταξύ του εμβολιασμού μιας βακτηριακής καλλιέργειας και του χρόνου έναρξης του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης» (Robinson, Ocio, Kaloti, & Mackey, 1998, pp. 83-84). Με πιο απλά λόγια, η φάση προσαρμογής είναι η περίοδος που τα κύτταρα προσαρμόζονται στο νέο τους περιβάλλον, ενώ φάση ανάπτυξης ή εκθετική φάση είναι η περίοδος που τα κύτταρα του μικροοργανισμού παρουσιάζουν λογαριθμική αύξηση.

Ακολουθεί η επίδραση των προαναφερθέντων παραγόντων στην *L. monocytogenes*.

1.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η *Listeria monocytogenes*, ως ψυχρότροφο βακτήριο, αναπτύσσεται αρκετά καλά σε θερμοκρασίες 0-45°C. Ωστόσο, σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 50°C θανατώνεται, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες αναπτύσσεται με αργό ρυθμό. Η ψύξη δεν μειώνει σημαντικά τον βακτηριακό πληθυσμό, ενώ η κατάψυξη αναστέλλει σχετικά την ανάπτυξη του, εξαρτωμένου πάντοτε του τροφίμου και του ρυθμού ανάπτυξης (Montville & Matthews, 2010). Ιδανική ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρατηρείται εντός του θερμοκρασιακού εύρους 30-37°C (Martin & Fisher, 1999).

1.3.2 Επίδραση του pH

Το βακτήριο εμφανίζει καλή ανάπτυξη ακόμα και σε όξινα pH (τιμές μέχρι και 4,4), ενώ σε τιμές pH μικρότερες του 4,3, τα κύτταρα δεν αναπτύσσονται, αλλά επιβιώνουν. Η ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* παρεμποδίζεται από τη δράση οργανικών οξέων, ακόμα και σε ποσοστό 0,1%, εξαρτωμένου και του βαθμού διάσπασής τους. Το βακτήριο έχει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο κιτρικό και το γαλακτικό, σε αντίθεση με το οξικό, στο οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία, σε ένα συγκεκριμένο pH. Το πιο αβλαβές οξύ για το βακτήριο είναι το υδροχλωρικό (HCl) (Montville & Matthews, 2010).

Επομένως, η ικανότητα του βακτηρίου να αναπτύσσεται σε τιμές χαμηλού pH επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του οξινιστικού. Σε μέσα οξινισμένα από HCl το ελάχιστο pH που σημειώθηκε ανάπτυξη ήταν 4,39 , ενώ σε μέσα οξινισμένα από γαλακτικό οξύ δεν σημειώθηκε ανάπτυξη σε pH 4,8. Επίσης, η αποτελεσματικότητα των ασθενών οξέων κατά της *L. monocytogenes* επηρεάζονται προβλέψιμα από το pH. Για παράδειγμα, σε pH 5,0 και 13°C, παρουσία βενζοϊκού νατρίου συγκέντρωσης 0,05%, το βακτήριο δεν μπορούσε να αναπτυχθεί, ενώ όταν το pH αυξήθηκε σε 5,6 υπήρξε ανάπτυξη του βακτηρίου, ακόμα και παρουσία συγκέντρωσης 0,1% βενζοϊκού νατρίου. Αντίστοιχα αποτελέσματα επί του βακτηρίου παρουσιάζει και το σορβικό οξύ (Cole, Jones, & Holyoak, 1990).

1.3.3 Επίδραση της ενεργότητας νερού (a_w)

Όσον αφορά την ενεργότητα νερού (a_w), η *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται καλύτερα σε $a_w \geq 0,97$, ενώ για τιμές μικρότερες από 0,90 δεν εμφανίζει ανάπτυξη. Ωστόσο, σε χαμηλότερες τιμές ενεργότητας νερού μέχρι και 0,83, το βακτήριο δεν αναπτύσσεται, αλλά μπορεί και επιβιώνει. Έχει παρατηρηθεί επίσης, πως η θερμοανθεκτικότητα του βακτηρίου αυξάνεται με την μείωση της a_w (Montville & Matthews, 2010). Αυτό δημιουργεί προβλήματα, ιδιαίτερα σε τρόφιμα που συνδυάζουν χαμηλή ενεργότητα νερού και θερμικούς χειρισμούς, όπως ορισμένα τυριά.

1.3.4 Επίδραση της συγκέντρωσης αλάτων

Η συγκέντρωση αλάτων, η οποία είναι πολύ σημαντική ιδιαίτερα στα τυριά, δεν αποτελεί καλό ανταγωνιστή για αναστολή της *Listeria monocytogenes*. Το βακτήριο σημειώνει καλή ανάπτυξη όταν βρίσκεται σε συγκεντρώσεις αλάτων μέχρι και 6,5%, ενώ αναπτύσσεται ακόμα και σε αλατοπεριεκτικότητες 10-12%. Επιβιώνει μάλιστα και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων, χωρίς να αναπτύσσεται (Montville & Matthews, 2010).

Η επιβίωση σε χαμηλό pH και υψηλή αλατοπεριεκτικότητα φαίνεται να εξαρτάται έντονα από τη θερμοκρασία. Συγκεκριμένα, η μείωση της θερμοκρασίας αυξάνει την επιβίωση σε περιβάλλοντα χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων (Cole, Jones, & Holyoak, 1990).

1.3.5 Επίδραση συνδυασμών των παραγόντων

Εντούτοις, η συμπεριφορά του μικροοργανισμού είναι πιο πολύπλοκη όταν οι παράγοντες αυτοί δρουν σε συνδυασμό.

Σύμφωνα με πείραμα των Francois et al. (2006) λήφθηκαν οι παρακάτω πίνακες με τα αποτελέσματα μετρήσεων που έγιναν σε *L. monocytogenes* (LMG 13305 – ορότυπος 4b) που απομονώθηκε από μαλακό τυρί, καλλιεργήθηκε για 24h στους 30°C, αναπτύχθηκε για 24h στους 30°C και αποθηκεύτηκε στους 7°C. Οι πίνακες αφορούν τον μέσο χρόνο φάσεων προσαρμογής (Πίνακας 1) και τον μέσο χρόνο φάσεων ανάπτυξης (Πίνακας 2) του μικροοργανισμού σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, το pH, και την ενεργότητα νερού (a_w).

Πίνακας 1: Μέσος χρόνος μεμονωμένων φάσεων προσαρμογής κυττάρων (h) του *L. monocytogenes* σε συνάρτηση με θερμοκρασία, pH, και a_w . (Πηγή: Francois et al., 2006)

pH (-)	a_w (-)	Θερμοκρασία (°C)				
		30°C	10°C	7°C	4°C	2°C
7,4	0,995	0,64	6,57	27,9	42,8	932,4
	0,97	-	33,0	49,1	55,9	-
	0,95	-	79,0	339,4	A/OA	-
6,0	0,995	1,61	25,5	79,0	83,7	-
	0,97	-	43,4	84,2	210,3	-
	0,95	-	-	243,6	A/OA	-
5,5	0,995	2,64	56,6	133,3	171,8	-
	0,97	-	79,0	229,8	A/KA	-
	0,95	-	346,1	A/KA	KA	-
5,0	0,995	8,19	A/KA	A/KA	KA	-
4,7	0,995	A/KA	KA	KA	-	-
4,4	0,995	KA	-	-	-	-

A/KA: Ανάπτυξη / Καμία ανάπτυξη δεν επιτεύχθηκε και μόνο ένα μικρό μέρος των μεμονωμένων κυττάρων αναπτύχθηκαν, η ανάπτυξη παρατηρήθηκε μόνο σε υψηλότερα επίπεδα εμβολίου
 KA: Καμία ανάπτυξη δεν παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος (90 ημέρες)
 -: το πείραμα δεν πραγματοποιήθηκε

Παρατηρείται πως η μέση διάρκεια της κυτταρικής προσαρμογής αυξάνεται, δηλαδή ο μικροοργανισμός προσαρμόζεται δυσκολότερα στο περιβάλλον, όταν αυξάνονται τα επίπεδα άγχους, κάτι που μπορεί να επιβεβαιωθεί για τη θερμοκρασία, το pH και την

ενεργότητα νερού. Για παράδειγμα, η μέση μεμονωμένη φάση προσαρμογής των κυττάρων αυξάνεται από 27,9 ώρες, σε 42,8 ώρες, έως 932,4 ώρες, όταν η θερμοκρασία μειώνεται από τους 7°C, στους 4°C και 2°C αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα της μείωσης του a_w είναι εξίσου σαφές, καθώς η μέση διάρκεια της κυτταρικής προσαρμογής αυξάνεται από 27,9 ώρες, σε 49,1 ώρες και 339,4 ώρες, όταν το a_w μειώνεται από 0,995, σε 0,97 και 0,95 αντίστοιχα, σε θερμοκρασία ανάπτυξης 7°C και pH 7,4 (Francois, et al., 2006).

Πίνακας 2: Μέσος χρόνος μεμονωμένων φάσεων ανάπτυξης κυττάρων (h) του *L. monocytogenes* σε συνάρτηση με θερμοκρασία, pH, και a_w (Πηγή: Francois et al., 2006)

pH (-)	a_w (-)	Θερμοκρασία (°C)				
		30°C	10°C	7°C	4°C	2°C
7,4	0,995	0,71	4,78	7,33	14,2	24,9
	0,97	-	6,23	14,4	20,8	-
	0,95	-	14,4	34,2	A/KA	-
6,0	0,995	0,72	4,81	7,52	16,9	-
	0,97	-	6,49	10,2	19,8	-
	0,95	-	-	24,4	A/KA	-
5,5	0,995	0,86	4,88	7,35	22,1	-
	0,97	-	8,84	21,8	A/KA	-
	0,95	-	23,6	A/KA	KA	-
5,0	0,995	1,18	A/KA	A/KA	KA	-
4,7	0,995	A/KA	KA	KA	-	-
4,4	0,995	KA	-	-	-	-

A/KA: Ανάπτυξη / Καμία ανάπτυξη δεν επιτεύχθηκε και μόνο ένα μικρό μέρος των μεμονωμένων κυττάρων αναπτύχθηκαν, η ανάπτυξη παρατηρήθηκε μόνο σε υψηλότερα επίπεδα εμβολίου
 KA: Καμία ανάπτυξη δεν παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος (90 ημέρες)
 -: το πείραμα δεν πραγματοποιήθηκε

Κατά την παρατήρηση της επίδρασης της θερμοκρασίας, οι χρόνοι ανάπτυξης αυξάνονται από 0,71 ώρες στους 30°C, στις 4,78 ώρες στους 10°C, στις 7,33 ώρες στους 7°C, στις 14,2 ώρες στους 4°C, στις 24,9 ώρες στους 2°C. Ωστόσο, η αύξηση του χρόνου

παραγωγής περιορίζεται, όταν το pH μειώνεται από 7,4 σε 6,0 , αλλά υπάρχει πιο σαφής μείωση της παραγωγής σε pH 5,5 και 5,0 (Francois, et al., 2006).

Σύμφωνα με πείραμα των Cole, Jones & Holyoak (1990) σε *Listeria monocytogenes* ATCC 19 115 (ανθρώπινο στέλεχος), λήφθηκαν τα δεδομένα του παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3), όπου δοκιμάστηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί pH και συγκεντρώσεως άλατος σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος και ψύξης, προκειμένου να μελετηθεί η ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* εντός 60 ημερών.

Πίνακας 3: Επίδραση του pH και της συγκέντρωσης άλατος στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* (Πηγή: Cole, Jones & Holyoak, 1990)

pH	Περιεκτικότητα άλατος (% προστιθέμενη)	Μέσος χρόνος για εμφανή ανάπτυξη (ημέρες) (n=3)		
		30°C	10°C	5°C
7,0	0	1,0	4,0	9,0
	2	1,0	4,0	8,6
	4	2,6	5,0	15,0
	6	3,0	7,0	28,0
	8	4,0	11,0	43,0
	10	25,0	45,0	KA
	12	38,3	KA	KA
	14	KA	KA	KA
	16	KA	KA	KA
5,13	0	2,0	11,3	KA
	2	2,0	11,0	KA
	4	2,0	12,0	KA
	6	4,3	21,6	KA
	8	12,0	KA	KA
	10	KA	KA	KA

pH	Περιεκτικότητα άλατος (% προστιθέμενη)	Μέσος χρόνος για εμφανή ανάπτυξη (ημέρες) (n=3)		
		30°C	10°C	5°C
	12	KA	KA	KA
	14	KA	KA	KA
	16	KA	KA	KA
	18	KA	KA	KA
4,83	0	4,0	25,0	KA
	2	4,0	24,3	KA
	4	4,0	KA	KA
	6	7,6	KA	KA
	8	19,5	KA	KA
	10	KA	KA	KA
	12	KA	KA	KA
	14	KA	KA	KA
	16	KA	KA	KA
	18	KA	KA	KA
4,66	0	5,0	KA	KA
	2	7,6	KA	KA
	4	8,0	KA	KA
	6	13,0	KA	KA
	8	KA	KA	KA
	10	KA	KA	KA
	12	KA	KA	KA
	14	KA	KA	KA
	16	KA	KA	KA

pH	Περιεκτικότητα άλατος (% προστιθέμενη)	Μέσος χρόνος για εμφανή ανάπτυξη (ημέρες) (n=3)		
		30°C	10°C	5°C
	18	KA	KA	KA

KA: Καμία ανάπτυξη δεν παρατηρήθηκε μέσα σε 60 ημέρες
Δεν σημειώθηκε ανάπτυξη στις δύο χαμηλότερες τιμές pH που δοκιμάστηκαν (pH 4,53 και 4,44)

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, παρατηρούμε ότι χαμηλές τιμές pH και υψηλές συγκεντρώσεις άλατος απενεργοποιούν την *Listeria monocytogenes*, αλλά εξαρτώνται και από τη θερμοκρασία. Οι χαμηλότερες τιμές pH που επιτρέπουν ανάπτυξη εντός 60 ημερών στους 30°C, 10°C και 5°C είναι pH 4,66 , pH 4,83 και pH 7,0 αντίστοιχα. Το άλας αύξησε τις ελάχιστες τιμές pH που υποστηρίζουν ανάπτυξη σε όλες τις θερμοκρασίες (Cole, Jones, & Holyoak, 1990).

1.4 Μεταβολισμός της *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* είναι αερόβιο, μικροαερόφιλο, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, που για να αποικίσει και να αναπτυχθεί, πρέπει να ξεπεράσει ορισμένα εμπόδια, συμπεριλαμβανομένης και της αναεροβίωσης, των μεταβολών του pH και της υψηλής ωσμωτικότητας, όπως επίσης και να ανταγωνιστεί άλλους μικροοργανισμούς που βρίσκονται σε αυτά τα περιβάλλοντα. Σύμφωνα με μελέτες, το συγκεκριμένο βακτήριο αναπτύσσεται καλά στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα βακτηριακά μέσα. Αυξημένοι ρυθμοί ανάπτυξης παρατηρήθηκαν παρουσία ζυμώσιμων σακχάρων και ιδιαίτερα της γλυκόζης. Διαπιστώθηκε επίσης ότι υπό αερόβιες συνθήκες και χαμηλό pH, το βακτήριο επέζησε για παρατεταμένες περιόδους σε χαμηλές θερμοκρασίες (5°C-10°C), αυξήθηκε η παραγωγή του σε ενδιάμεσες θερμοκρασίες (19°C-28°C), όμως απενεργοποιήθηκε στους 37°C. Ωστόσο, υπό αναερόβιες συνθήκες η *L. monocytogenes* ανακτήθηκε και επέζησε για παρατεταμένες περιόδους στους 37°C. Περιορισμός επίσης του O₂ αύξησε την ανάπτυξη στους 19°C. Τέλος, η ανάπτυξη και η παραγωγή μεταβολιτών ήταν πιο γρήγορη σε N₂ παρά σε CO₂. Εντούτοις, τα μεταβολικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου μπορεί να διαφέρουν κατά τη διάρκεια αερόβιων, χαμηλών σε O₂ ή αναερόβιων συνθηκών (Ryser & Marth, 2007; Lungu, Ricke, & Johnson, 2009).

1.4.1 Διατροφικές απαιτήσεις της *L. monocytogenes*

Έχουν διαμορφωθεί αρκετά χημικά καθορισμένα μέσα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, ωστόσο κανένα δεν ήταν ικανό να υποστηρίξει την ανάπτυξη όλων των στελεχών του βακτηρίου. Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι οι ανάγκες του μικροοργανισμού σε θρεπτικά μέσα (όπως αμινοξέα και βιταμίνες) διαφέρουν ανάλογα τα χρησιμοποιούμενα στελέχη, καθώς και στη γενετική ποικιλομορφία των στελεχών (Lungu, Ricke, & Johnson, 2009).

Για παράδειγμα, οι Lungu, Ricke & Johnson (2009) αναφέρουν πως το στέλεχος Scott A της *L. monocytogenes* απαιτεί γλυκόζη, γλουταμίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, αργινίνη, μεθειονίνη, βαλίνη, κυστεΐνη, ριβοφλαβίνη, βιοτίνη, θειαμίνη και λιποϊκό οξύ για ανάπτυξη, ενώ η φρουκτόζη, η μαννόζη, η κελοβιόζη, η τρεαλόζη, η γλυκερόλη, η γλυκοζαμίνη, η N-ακετυλογλυκοζαμίνη και το N-ακετυλομουαμικό οξύ υποστήριξαν ανάπτυξη απουσία γλυκόζης. Ωστόσο, το στέλεχος 10403 της *L. monocytogenes* φαίνεται να απαιτεί μόνο κυστεΐνη, μεθειονίνη και ανόργανες πηγές αζώτου για να αναπτυχθεί.

1.4.2 Μεταβολισμός υδατανθράκων

Η *L. monocytogenes* χρησιμοποιεί κυρίως τη γλυκόζη ως πηγή υδατανθράκων για παροχή ενέργειας. Είναι ζυμωτικό βακτήριο και χρησιμοποιεί σάκχαρα για την παραγωγή κι ανάπτυξη οξέων. Ωστόσο, σε αντίθεση με άλλους μικροοργανισμούς, ο αερόβιος μεταβολισμός του δεν περιλαμβάνει έναν πλήρη κύκλο τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA cycle) και δεν αναπτύσσεται με ενδιάμεσα προϊόντα πυροσταφιλικού και κιτρικού οξέος. Εντούτοις, κατά την αερόβια επώαση, η ανάπτυξη του δεν υποστηρίζεται από πυροσταφιλικό, οξικό, κιτρικό, ισοκιτρικό, α-κετογλουταρικό, φουμαρικό ή μηλικό, αλλά αναπτύσσεται καλύτερα σε υπόστρωμα που περιέχει μόνο γλυκόζη. Αναερόβιες και αερόβιες μελέτες έδειξαν ότι η *L. monocytogenes* αναπτύχθηκε στη γλυκόζη και παράγαγε γαλακτικό ή/και οξικό οξύ υπό αερόβιες συνθήκες με αυξημένη απόδοση παραγωγής κυττάρων, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες παράγαγε μόνο γαλακτικό οξύ με πολύ μικρότερες αποδόσεις κυτταρικής παραγωγής, αλλά μεγαλύτερης κυτταρικής λύσης (Lungu, Ricke, & Johnson, 2009).

Όσον αφορά επίσης την παραγωγή ενέργειας και σύνθεσης ATP για τις ανάγκες των κυττάρων, το βακτήριο χρησιμοποιεί το μοντέλο της κινητήριας δύναμης πρωτονίου. Τη δύναμη αυτή, όπως και την σύνθεση ATP, φαίνεται να εμποδίζουν οι βακτηριοσίνες,

όπως η νισίνη και η πεδιοκίνη, δυσχεραίνοντας επομένως και την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Lungu, Ricke, & Johnson, 2009).

1.4.3 Μεταβολισμός αμινοξέων και πεπτιδίων

Τα αμινοξέα και οι απαιτήσεις αζώτου για την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* ποικίλουν ανάλογα με το στέλεχος. Ενώ το ίδιο το βακτήριο δεν είναι σε θέση να υδρολύσει πρωτεΐνες, φαίνεται να μπορεί να αναπτυχθεί μέσω εξωτερικών πρωτεολυτικών συστημάτων, δηλαδή σε περιβάλλοντα όπου οι πρωτεΐνες υδρολύονται από άλλους μικροοργανισμούς. Άλλη μελέτη έδειξε ωστόσο, ότι η *L. monocytogenes* μπορεί να χρησιμοποιήσει ενδοκυτταρικά πεπτίδια ως πηγή αμινοξέων. Τέλος, διαπιστώθηκε πως η εξωγενής προλίνη, μαζί με βεταΐνη και καρνιτίνη βοήθησαν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού υπό συνθήκες ωσμωτικού stress (Lungu, Ricke, & Johnson, 2009).

1.4.4 Μεταβολισμός σιδήρου (Fe)

Η *L. monocytogenes*, όπως και τα περισσότερα βακτήρια, χρειάζονται σίδηρο για ανάπτυξη και επιβίωση κατά την παθογένεση. Ενώ ο σίδηρος στα σωματικά υγρά του ανθρώπου και των ζώων είναι άφθονος, η ποσότητα που είναι άμεσα διαθέσιμη για τα βακτήρια είναι πολύ μικρή. Έτσι, τα βακτήρια έχουν αναπτύξει συστήματα αποδόμησης σιδήρου. Οι Lungu, Ricke & Johnson (2009) αναφέρουν πως τα συστήματα που έχει αναπτύξει η *L. monocytogenes* είναι τα εξής: (α) πρόσληψη κιτρικού σιδήρου από επαγωγίμο κιτρικό υποδοχέα, (β) μείωση του σιδήρου από επιφανειακά συνδεδεμένη αναγωγάση ή εξωτερική αναγωγάση, (γ) απόκτηση σιδήρου από κυτταρική επιφάνεια πρωτεΐνης μεταφοράς-σύνδεσης και (δ) χρήση εξωγενών σιδηροφόρων μορίων. Συμπερασματικά, η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* και η θνησιμότητα από πειραματική λοίμωξη φαίνεται να σχετίζεται με τη διαθεσιμότητα του σιδήρου, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο μεταβολισμός του σιδήρου μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην έναρξη και πρόοδο της λιστερίωσης.

1.5 Βιοχημικές δοκιμές

Η *Listeria monocytogenes* υποβάλλεται σε βιοχημικές δοκιμές, προκειμένου να διαφοροποιηθεί από άλλα είδη του γένους *Listeria*, καθώς όλα τα είδη του γένους *Listeria* είναι παρόμοια φαινοτυπικά. Μέσω συνδυασμών των βιοχημικών tests, τα οποία εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4), αναγνωρίζονται τα διαφορετικά είδη (Pagotto & Farber, 2003; Ryser & Marth, 2007).

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν τα είδη του γένους *Listeria* (Πηγή: Pagotto & Farber, 2003)

Χαρακτηριστικά	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. gravi</i>	<i>L. murrayi</i>
Χρώση Gram ^α	+ ^β	+	+	+	+	+	+
β-αιμόλυση ^α	+ ^γ	-	+	-	+ ^δ	-	-
Μαννιτόλη ^α	-	-	-	-	-	+	+
L-ραμνόζη (παραγωγή οξέος) ^α	+ ^ε	d	-	d	-	-	d
D-ξυλόζη (παραγωγή οξέος) ^α	-	-	+	+	+	-	-
Δοκιμή CAMP (<i>S.aureus</i>) ^α	+	-	+	-	-	-	-
Δοκιμή CAMP (<i>R.equi</i>)	-	-	-	-	+	-	-
<i>Παραγωγή οξέος</i>							
<i>από:</i>							
L-αραβινόζη	-	-	-	-	-	-	-
Δεξτρίνη	d	-			-	+	+
Γαλακτόζη	d	-			d	+	+
Γλυκογόνο	-	-	-	-	-	-	-
Λακτόζη	d	+			+	+	+
D-λυξόζη	-	-	-			+	+
Μελισιτόζη	d	d			d	-	-
Μελιβιτόζη	-	-	-	-	-	-	-
α-μεθυλ-D-γλυκόζη	+	+			+	+	+
α-μεθυλ-D-μαννόζη	+	+	- ^{στ}	+	-		
Σορβιτόλη	d	-			-	-	-

Χαρακτηριστικά	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. gravi</i>	<i>L. murrayi</i>
Διαλυτό άμυλο	-	-			-	+	+
Σακχαρόζη	-	d			d	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+
<i>Υδρόλυση των:</i>							
Κυτταρίνη	-	-	-	-	-	-	-
Ιππουρικό οξύ	+	+			+	-	-
Άμυλο	d	d			-	-	-
Λεκιθινάση	d	d			+	-	-
Φωσφατάση	+	+	+	+	+	+	+
Αναγωγή NO ₃ σε NO ₂	-	-			-	-	+
Παθογένεια για ποντίκια	+	-	-	-	+	-	-

^α Τεστ πιο συχνά για τη διαφοροποίηση των ειδών της *Listeriae*

^β Σύμβολα: +: θετικό, -: αρνητικό, +: > ή ίσο με το 90% θετικό, -: > ή ίσο με το 90% αρνητικό, d: 11-89% των στελεχών είναι θετικά

^γ Δεν παρουσιάζουν όλα τα στελέχη του *Listeria monocytogenes* β-αιμόλυση. Το στέλεχος τύπου ATCC 15313 είναι ένα μη αιμολυτικό μετάλλαγμα σε άλογο, πρόβατα και βοοειδή

^δ Μία πολύ ευρεία ζώνη ή πολλαπλές ζώνες αιμόλυσης παρουσιάζονται συνήθως από τα στελέχη του *L. ivanovii*

^ε Από 30 στελέχη, το στέλεχος τύπου ATCC 15313 δεν έδωσε θετική αντίδραση

^{στ} Από τα 10 στελέχη που εξετάστηκαν, το ένα έδωσε θετική αντίδραση

Με βάση τις συνήθειες δοκιμές που πραγματοποιούνται για την ταυτοποίηση της *Listeria monocytogenes* και σύμφωνα με τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, προκύπτουν τα εξής: οι αποικίες της είναι θετικές κατά Gram, αρνητικές στην D-ξυλόζη (δεν παράγουν οξύ) και θετικές στην L-ραμνόζη (παραγωγή οξέος). Συγκεκριμένα για την δοκιμή ραμνόζης, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της L-ραμνόζης, οι αποικίες εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα, που δείχνει την παραγωγή οξέος, χωρίς την παραγωγή αερίου, χαρακτηριστικό γνώρισμα της *Listeria monocytogenes*. Οι αποικίες επίσης αναπτύσσονται σε άγαρ αίματος, όταν υποβληθούν σε δοκιμή β-αιμόλυσης (πλήρη ή μερική αιμόλυση). Αν οι αποικίες εμφανίσουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά, υπάρχει

έντονη υποψία πως ο μικροοργανισμός που εξετάζεται είναι η *Listeria monocytogenes*. Επομένως, το δείγμα οδηγείται για περαιτέρω έλεγχο μέσω άλλων μεθόδων (γενετικών ή ανοσολογικών) (Harakeh, et al., 2009).

Σήμερα, οι βιοχημικές δοκιμές έχουν αυτοματοποιηθεί με την χρήση έτοιμων kit, που αντικαθιστούν το κοινό τρυβλίο με άγαρ (Montville & Matthews, 2010) και έχουν χρησιμοποιηθεί αντί των κλασικών βιοχημικών tests σε τυριά (Filioussis, Johansson, Frey, & Perreten, 2009). Πρόκειται για έτοιμα kit ταυτοποίησης των μικροβίων του γένους *Listeria* με 10 έως 20 βιοχημικά υποστρώματα. Ένα από αυτά είναι το API *Listeria* system (BioMerieux-France) που ταυτοποιεί έξι είδη *Listeria* και ανάμεσα τους το είδος *Listeria monocytogenes* σε 18-24 ώρες.

1.6 Πηγές της *Listeria monocytogenes*

1.6.1 Περιβάλλον

Η *Listeria monocytogenes* βρίσκεται παντού στο περιβάλλον. Έχει απομονωθεί από το έδαφος, το νερό και από βλάστηση που αποσυντίθεται, με πιο συχνά εμφανιζόμενους τους ορότυπους 1/2b και 4b. Έχει εντοπιστεί επίσης σε δείγματα λυμάτων, υδάτων ποταμού και λυμάτων λάσπης. Μετά από πείραμα κατά το οποίο ψεκάστηκε γεωργική γη με λύματα λάσπης που περιείχαν ποσοτικές μετρήσεις του μικροοργανισμού, παρατηρήθηκε ότι παρέμειναν αμετάβλητες για τουλάχιστον 8 εβδομάδες. Η πρακτική της χρήσης περιττωμάτων ως γεωργικά λιπάσματα υποψιάστηκε ότι συνέβαλε στην μετάδοση της ανθρώπινης λιστερίωσης, μετά από μεγάλη επιδημία της ασθένειας στη Σκωτία (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991).

1.6.2 Ζώα

Στα θηλαστικά, το βακτήριο προκαλεί μηνιγγιοεγκεφαλίτιδα και αμβλώσεις. Επίσης, μπορούν και υγιή ζώα να είναι γαστρεντερικοί φορείς της *Listeria monocytogenes*. Ο μικροοργανισμός έχει απομονωθεί από βοοειδή, χοίρους, πρόβατα, κοτόπουλα, γαλοπούλες, πάπιες και διάφορα άλλα είδη. Η λιστερίωση θεωρείτο κτηνιατρική ασθένεια, ξεκινώντας από την περιγραφή του Murray ως βακτήριο που προκαλούσε ασθένεια σε κουνέλια και συνεχίζοντας με κρούσματα της λοίμωξης σε αγέλες βοοειδών και προβάτων, πολύ πριν αναγνωριστεί η ασθένεια στους ανθρώπους. Επικρατούσε για πολλά χρόνια η ιδέα πως η ανθρώπινη λοίμωξη από το βακτήριο οφειλόταν σε επαφή με μολυσμένα ζώα. Ωστόσο, μετά από απομονώσεις του μικροοργανισμού από πηγές ανεξάρτητες των ζώων (έδαφος, τρόφιμα) και μετά από επιδημιολογικά στοιχεία,

επιβεβαιώθηκε ότι η λιστερίωση αποτελεί τροφική ασθένεια (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991).

1.6.3 Άνθρωποι

Η γαστρεντερική οδός των ανθρώπων φαίνεται να είναι η πύλη εισόδου για το βακτήριο, το οποίο προκαλεί στη συνέχεια τη λοίμωξη. Οι άνθρωποι μπορούν να είναι τόσο δέκτες, όσο και δότες του βακτηρίου. Έχουν αναφερθεί απομονώσεις της *Listeria monocytogenes* από καλλιέργειες κοπράνων υγιών εργαζομένων σε σφαγεία, ασθενών που νοσηλεύονταν σε νοσοκομείο, ασθενών με διάρροια και ασθενών με λιστερίωση σε οικιακό περιβάλλον (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991).

1.6.4 Εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων

Μετά από μικροβιολογικές έρευνες, οι Ferreira, Wiedmann, Teixeira & Stasiewicz (2014) αναφέρουν πως παρατηρήθηκε αποικισμός της *Listeria monocytogenes* στην παραγωγή τροφίμων και τα περιβάλλοντα επεξεργασίας. Συγκεκριμένα, απομονώθηκε ο μικροοργανισμός από ακατέργαστα προϊόντα γάλακτος και μη γαλακτοκομικά προϊόντα από διάφορους παραγωγούς, καθώς το βακτήριο είναι ικανό να παραμείνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων και να επαναμολύνει το ωμό γάλα. Αναφορές έγιναν επίσης και από εργοστάσιο επεξεργασίας ιχθυηρών για μόλυνση καπνιστού σολωμού από *Listeria monocytogenes*. Ο μικροοργανισμός μάλιστα παρέμεινε για 8 μήνες κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του σολωμού, αλλά και της συσκευασίας του υπό κενό. Το βακτήριο βρέθηκε και σε ωμά πουλερικά, αλλά και στο περιβάλλον επεξεργασίας μαγειρεμένων πουλερικών, όπου η *Listeria monocytogenes* επιβίωσε για 6 μήνες. Η παρουσία του μικροοργανισμού έχει αναφερθεί σε ποικιλία εργοστασίων τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χειρίζονται κρέας, ψάρια, γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα έτοιμα προς κατανάλωση (τα γνωστά ως RTE – Ready To Eat), ενώ μερικά από τα τρόφιμα τα οποία είναι ύποπτα για παρουσία του βακτηρίου, εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Προϊόντα μεταφορείς / ή όχι της *Listeria monocytogenes* (Πηγή: Hof, 2003)

Προϊόντα τροφίμων που ίσως να περιέχουν <i>Listeria monocytogenes</i>	Προϊόντα τροφίμων που γενικά δεν έχουν κατηγορηθεί για μόλυνση από <i>Listeria monocytogenes</i>
Λουκάνικα, Σαλάμι, Πατέ	Γεύματα που καταναλώνονται απευθείας μετά τη θέρμανση

Προϊόντα τροφίμων που ίσως να περιέχουν <i>Listeria monocytogenes</i>	Προϊόντα τροφίμων που γενικά δεν έχουν κατηγορηθεί για μόλυνση από <i>Listeria monocytogenes</i>
Ωμό κρέας, κυρίως γαλοπούλας και κοτόπουλου	Παστεριωμένο γάλα, γιαούρτι (βιομηχανικά προϊόντα)
Σάντουιτς	Σκληρό τυρί
Μαρούλι, ωμά μανιτάρια	Σοκολάτα, μαρμελάδες, μπισκότα
Ωμό γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα	Ωμά καρότα
Μαλακό τυρί (Munster, Roquefort, Camembert, Brie)	Ωμά μήλα
Φρέσκο τυρί (ricotta, φέτα)	Ωμές τομάτες
Θαλασσινά (μύδια, σολωμός)	
Έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα που διατηρούνται και μετά τη θέρμανση (RTE)	

Επιπλέον, η *Listeria monocytogenes* μπορεί να εισέλθει στα εργαστήρια επεξεργασίας τροφίμων και μέσω ανθρώπινων φορέων. Συγκεκριμένα, έχει δυνατότητα να προσκολληθεί στην ενδυμασία, τα παπούτσια και τα χέρια των εργατών που χειρίζονται τον εξοπλισμό, αλλά και μέσω των οχημάτων που μεταφέρουν προϊόντα εντός του εργοστασίου. Προσκολλάται σε επιφάνειες όπως το λάστιχο, το γυαλί και το ανοξείδωτο ατσάλι, παραμένοντας εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα (Montville & Matthews, 2010).

Επίσης, έχουν γίνει αναφορές και για επιμόλυνση των τροφίμων εντός του περιβάλλοντος επεξεργασίας. Ανθεκτικά στελέχη του μικροοργανισμού απομονώνονται συχνά από περιοχές αυξημένης υγρασίας, όπως τα δάπεδα, ο εξοπλισμός επεξεργασίας, οι σχάρες των αποχετεύσεων, τα απόβλητα, περιοχές με συμπυκνωμένο ή στάσιμο νερό, αλλά και οι επιφάνειες επαφής των τροφίμων, όπως οι μηχανές κοπής. Η ανάκαμψη ορισμένων στελεχών στο περιβάλλον και τον εξοπλισμό ακόμα και μετά τον καθαρισμό και την απολύμανση, τονίζει τον κίνδυνο ανάπτυξης του βακτηρίου, ιδιαίτερα στις δύσκολα προσβάσιμες περιοχές, καθώς ο μικροοργανισμός δημιουργεί βιοφίλμ. Έτσι, ο μικροβιολογικός έλεγχος των εγκαταστάσεων γίνεται απαραίτητος για την επικύρωση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης. Εντούτοις, πολύ σημαντική είναι και η διασταυρούμενη επιμόλυνση των τροφίμων. Ακόμα και τρόφιμα τα οποία έχουν καταστεί

ασφαλή μέσω επεξεργασίας για εξάλειψη του βακτηρίου, μπορεί να επαναμολυνθούν μέσω επαφής τους με ωμά προϊόντα, με μολυσμένο εξοπλισμό, με μεταφορά του βακτηρίου από εργάτες και γενικά μέσω κακών πρακτικών υγιεινής του εργοστασίου (Montville & Matthews, 2010; Ferreira, Wiedmann, Teixeira, & Stasiewicz, 2014).

1.7 Ανθρώπινη Λιστερίωση – Χαρακτηριστικά της ασθένειας

Η λιστερίωση είναι μία σοβαρή λοίμωξη της κυκλοφορίας του αίματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος, που προκαλείται από το βακτήριο *Listeria monocytogenes*. Είναι τροφική ασθένεια και μεταδίδεται κυρίως μέσω της κατανάλωσης τροφίμων. Τα βακτήρια υπάρχουν σε πληθώρα περιβαλλοντικών πηγών και μπορούν να μολύνουν εύκολα τα τρόφιμα (Okro, et al., 2015).

1.7.1 Επεμβατική νόσος σε ενήλικες

Οι περισσότερες περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης φαίνεται να είναι σποραδικές, αν και ένα μέρος αυτών μπορεί να έχει κοινή πηγή. Συνήθως, η πηγή και η οδός της λοίμωξης είναι άγνωστη, λόγω των μεγάλων χρόνων επώασης του βακτηρίου εντός του οργανισμού, που φτάνει και τις 5 εβδομάδες. Ωστόσο, η συσχέτιση της *Listeria monocytogenes* με πολλά περιστατικά τροφογενών κρουσμάτων, υποδηλώνει ότι μολυσμένα τρόφιμα είναι η πρωταρχική πηγή (Farber & Peterkin, 1991; Montville & Matthews, 2010).

Αν και μπορεί να εμφανιστεί ανθρώπινη λιστερίωση και σε υγιή άτομα, ο κίνδυνος μόλυνσης είναι μεγαλύτερος σε άτομα όπως: ηλικιωμένους, έγκυες γυναίκες, ανοσοκατεσταλμένα άτομα, κ.ά. (Πίνακας 6). Στα άτομα αυτά, η μόλυνση μπορεί να οδηγήσει συχνότερα σε σηψαιμία, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα και απώλεια εμβρύου στις εγκύους γυναίκες, αλλά και πολλές άλλες κλινικές περιπτώσεις (Πίνακας 7). Αυτά τα κλινικά σύνδρομα περιλαμβάνουν κυρίως λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος και πρωτοπαθή βακτηριαιμία, αλλά μπορεί επίσης να περιλαμβάνουν ενδοκαρδίτιδα. Η μηνιγγίτιδα εμφανίζεται συνήθως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Συμπτώματα που προδιαθέτουν μόλυνση του κεντρικού νευρικού συστήματος από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό, είναι πονοκέφαλος, εμετός, πυρετός και αδιαθεσία. Ωστόσο, άτομα με φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα μπορούν να ξεπεράσουν την επίθεση από *Listeria monocytogenes* μέσω απόρριψης του βακτηρίου στα κόπρανα, το οποίο θα αποβληθεί μετά από μερικές μέρες. Είναι δηλαδή δυνατό το βακτήριο να μην προκαλέσει λοίμωξη,

αλλά μια μόλυνση χαμηλού βαθμού, που μοιάζει με ελαφριά γρίπη (Farber & Peterkin, 1991; Hof, 2003; Pagotto & Farber, 2003; Montville & Matthews, 2010).

Πίνακας 6: Άτομα σε κίνδυνο (Πηγή: Hof, 2003)

Άτομα σε κίνδυνο	Επίπτωση λιστερίωσης σε ορισμένους πληθυσμούς σε κίνδυνο (ανά 100.000 άτομα ετησίως)
Κανονικός πληθυσμός	0,7
Ηλικιωμένα άτομα (>70 ετών)	2
Αλκοολικοί άνθρωποι	5
Διαβητικοί άνθρωποι	5
Άτομα με αυξημένα επίπεδα σιδήρου	5
Έγκυες γυναίκες	12
Ασθενείς με καρκίνο	15
Άτομα με στεροειδή θεραπεία	20
Ερυθματώδης λύκος	50
Δέκτες μεταμόσχευσης νεφρού	100
Χρόνια λεμφική λευχαιμία	200
AIDS	600
Λευχαιμία (οξεία μονοκυτταρική + οξεία λεμφοβλαστική)	1000

Πίνακας 7: Κλινικά σύνδρομα που περιγράφονται από λοίμωξη με *Listeria monocytogenes* (Πηγή: Schlech, 2000)

Κλινικά σύνδρομα
Σήψη και μηνιγγίτιδα νεογνών (και πρώιμης έναρξης και καθυστερημένης εμφάνισης λιστερίωσης)
Βακτηριακή μηνιγγίτιδα σε ενήλικες
Ρομβοεγκεφαλίτιδα σε ενήλικες

Σύνδρομο σήψης σε ενήλικες

Ενδοκαρδίτιδα (φυσική ή προσθετικής βαλβίδας)

Αρτηριακές λοιμώξεις

Πνευμονία

Ηπατίτιδα

Απόστημα ήπατος

Εμπύρετη γαστρεντερίτιδα

Αυθόρμητη βακτηριακή περιτονίτιδα

Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση

Οστεομυελίτιδα

Σηπτική αρθρίτιδα

1.7.2 Λιστερίωση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης

Η λιστερίωση μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιαδήποτε στιγμή της εγκυμοσύνης, αν και οι περισσότερες λοιμώξεις εντοπίζονται στο τρίτο τρίμηνο. Έγκυες γυναίκες που έχουν μολυνθεί με το βακτήριο, μπορεί να εμφανίσουν μόνο μία ήπια φλεγμονώδη ασθένεια, με πυρετό, κεφαλαλγία, μυαλγίες και περιστασιακά γαστρεντερικά συμπτώματα. Η πρόδρομη ασθένεια επηρεάζει συνήθως τα 2/3 των γυναικών και περιπλέκει την εγκυμοσύνη. Συγκεκριμένα, προκαλείται ενδομήτρια λοίμωξη, που μπορεί να επιφέρει αμνιονίτιδα, πρόωρο τοκετό, αυθόρμητη άμβλωση, θάνατο του εμβρύου ή πρώιμη λοίμωξη του νεογνού (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991).

1.7.3 Λιστερίωση νεογνών

Τα νεογνά φαίνεται να έχουν από τις υψηλότερες συχνότητες εμφάνισης λοίμωξης από τη *Listeria monocytogenes*. Η νεογνική λιστερίωση χωρίζεται σε σύνδρομα πρώιμης και καθυστερημένης νόσου. Αφενός η πρώιμη έναρξη της λιστερίωσης, προκύπτει από ενδομήτρια λοίμωξη, που μπορεί να προκαλέσει ασθένεια στο νεογνό κατά τη γέννηση ή λίγο αργότερα. Αυτός ο τύπος λιστερίωσης μπορεί να οδηγήσει σε άμβλωση, θνησιγένεια ή πρόωρη γέννηση ενός σοβαρά προσβεβλημένου βρέφους, που ίσως

εμφανίσει κοκκιωματώδη ηπατίτιδα. Αφετέρου, η λιστερίωση καθυστερημένης έναρξης είναι πιθανό να εμφανιστεί ως νεογνική μηνιγγίτιδα 7-20 ημέρες μετά τη γέννηση. Ωστόσο, τα ποσοστά θνησιμότητας από την ασθένεια όψιμης έναρξης φαίνεται να είναι χαμηλότερα από την ασθένεια πρώιμης έναρξης (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991; Schlech, 2000).

1.7.4 Μη επεμβατική νόσος στους ενήλικες

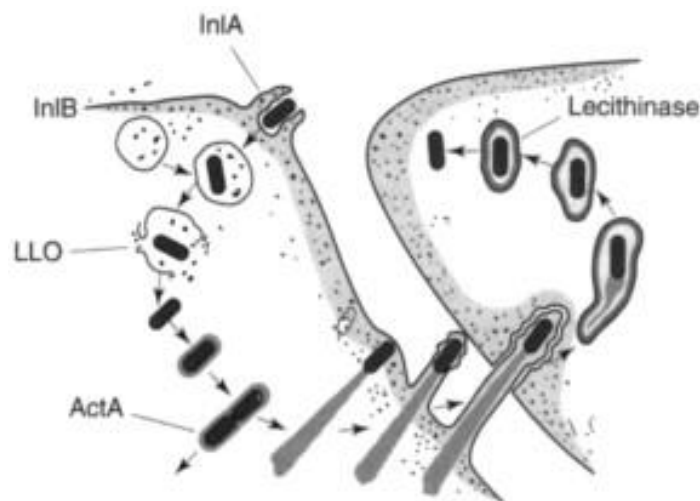
Αν και το πιο συχνό κλινικό σύνδρομο που εντοπίζεται στους ανθρώπους λόγω της *Listeria monocytogenes* είναι η επεμβατική λιστερίωση, έχουν αναφερθεί αρκετά κρούσματα εμπύρετης γαστρεντερίτιδας. Από αυτά τα κρούσματα φαίνεται ότι μια μεγάλη ποσότητα του βακτηρίου που χορηγείται στον γαστρεντερικό σωλήνα υγιών ατόμων, μπορεί να προκαλέσει πυρετό και διάρροια ταχείας έναρξης και περιορισμένης διάρκειας. Οι ασθενείς αρρωσταίνουν εντός 24-48 ωρών από την έκθεση στα μολυσμένα τρόφιμα. Σε μερικές περιπτώσεις λιστερικής γαστρεντερίτιδας, έχει σημειωθεί σήψη και προκαλείται αυξημένη νοσηρότητα και περιστασιακή θνησιμότητα (Schlech, 2000).

1.8 Λοιμώδης δράση της *Listeria monocytogenes* - Παθογένεια

Παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την εμφάνιση της επεμβατικής ασθένειας είναι η μολυσματικότητα του στελέχους της *Listeria monocytogenes*, η ευαισθησία του ξενιστή και το μέγεθος του εμβολίου. Η λοιμώδης δράση του μικροοργανισμού ξεκινά με τη μετάδοση του στον άνθρωπο μέσω της στοματικής οδού και τη διείσδυση του στο έντερο (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991). Στη συνέχεια, τα βακτήρια εισάγονται στους μακροφάγους, όπου και διπλασιάζονται. Έπειτα, μεταφέρονται στους λεμφαδένες μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και όταν φτάσουν στο σπ्लीν και τον σπλήνα, τα περισσότερα βακτήρια πεθαίνουν γρήγορα. Όσα από αυτά επιβιώσουν, μεταφέρονται στον εγκέφαλο ή τον πλακούντα (αν πρόκειται για εγκύους), πάλι μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Έτσι, τα κύτταρα της *Listeria monocytogenes* έχοντας πλέον προκαλέσει τη λοίμωξη, μπορούν να προσβάλλουν και μη φαγοκυτταρικά ανθρώπινα κύτταρα (Montville & Matthews, 2010).

Η διαδικασία που περιγράφεται από τους Montville & Matthews (2010) για να επιτευχθεί η παθογένεια έχει ως εξής. Η πρωτεΐνη ιντερναλίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *inlA*, ξεκινώντας τη διαδικασία. Το γονίδιο αυτό ρυθμίζεται μέσω της θερμοκρασίας και εκφράζεται περισσότερο στους 37°C. Στη συνέχεια, το ένζυμο λιστεριοσίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *hly*, το οποίο δίνει οδηγίες για άνοιγμα του φαγοσώματος,

απελευθέρωση των λιστεριών από αυτό και έξοδο τους προς το κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Επίσης, το γονίδιο αυτό προκαλεί αιμόλυση, καθώς σπάζει τα ερυθροκύτταρα. Έπειτα, για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων απαιτείται η παρουσία της πρωτεΐνης ακτίνης, η οποία βοηθά στη μετακίνηση των κυττάρων του μικροβίου εντός του ξενιστή. Το γονίδιο *actA* κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη ActA, η οποία προωθεί την ακτίνη να πιέσει το κύτταρο της *Listeria* διαμέσου της μεμβράνης του μολυσμένου ξενιστή και της μεμβράνης του γειτονικού κυττάρου ξενιστή. Τέλος, το γονίδιο *plcB* κωδικοποιεί για ένα υδρολυτικό ένζυμο των μεμβρανών, που βοηθά τη λιστεριοσίνη O να απελευθερώσει το βακτήριο μέσα στο κυτόπλασμα του γειτονικού ανθρώπινου κυττάρου. Χωρίς την παρουσία των προαναφερθέντων γονιδίων δεν είναι δυνατή η επίτευξη της παθογένειας του μικροοργανισμού. Η διαδικασία λοίμωξης φαίνεται και στο Σχήμα 2.



Σχήμα 2: Τα βήματα της διαδικασίας λοίμωξης από *Listeria monocytogenes* (Πηγή: Martin & Fisher, 1999)

1.9 Επιδημιολογία

Μέχρι το 2000, τα ποσοστά προσβολής από λιστερίωση ήταν περίπου 0,7 περιστατικά ανά 100.000 ανθρώπους, με τη λοίμωξη να είναι πιο συχνή σε βρέφη (10 περιστατικά ανά 100.000 ανθρώπους) και ηλικιωμένους (1,4 περιστατικά ανά 100.000 ανθρώπους). Στον Πίνακα 8, αναφέρονται μεγάλα κρούσματα λιστερίωσης από το 1980 μέχρι και το 1999, καθώς και οι πηγές των τροφίμων με τις οποίες συνδέονται τα κρούσματα (Schlech, 2000).

Πίνακας 8: Περίληψη των δεδομένων σχετικά με μεγάλες εκδηλώσεις λοιμώξεων του πληθυσμού από *Listeria monocytogenes*, 1980-1999 (Πηγή: Schlech, 2000)

Έτος	Τοποθεσία	Αριθμός περιστατικών	Περιγεννητικά περιστατικά (%)	Ποσοστό θνησιμότητας (%)	Πηγή
1980-1981	Καναδάς (ΗΠΑ)	41	83	34	Λαχανοσαλάτα coleslaw
1983	Αγγλία	49	14	29	Παστεριωμένο γάλα
1983-1984	Ελβετία	57	9	32	Μαλακό τυρί
1985	Δυτικές Ηνωμένες Πολιτείες	142	65	34	Μεξικάνικο τυρί
1986-1987	Πενσυλβάνια (ΗΠΑ)	36	11	44	Άγνωστη πηγή
1989	Κονέκτικατ (ΗΠΑ) ^α	10	20	10	Γαρίδες
1992	Γαλλία	38	82	32	Rillettes (χοιρινά)
1993	Ιταλία ^α	39			Σαλάτα ρυζιού
1994	Ιλινόι (ΗΠΑ) ^α	45			Σοκολατούχο γάλα
1997	Ιταλία ^α	1566			Σαλάτα καλαμποκιού
1998-1999	ΗΠΑ	101	12	21	Hot dogs, αλλαντικά
1999	Γαλλία	32	28	31	Χοιρινή γλώσσα

^α Κρούσματα βραχείας επώασης (εμπύρετη γαστρεντερίτιδα)

Σύμφωνα με πιο πρόσφατες έρευνες της EFSA (2018), το ποσοστό παρατήρησης της λιστερίωσης έχει μειωθεί σχετικά με τα παλαιότερα χρόνια, αλλά εμφανίζει αυξητική τάση την χρονική περίοδο 2008-2015. Συγκεκριμένα, το ποσοστό παρατήρησης από 0,30

περιπτώσεις ανά 100.000 ανθρώπους που βρισκόταν το 2008, αυξήθηκε σε 0,46 περιπτώσεις ανά 100.000 ανθρώπους το 2015. Μάλιστα, το 2015 σημειώθηκαν 270 θάνατοι από λιστερίωση στην Ε.Ε., αριθμός που ήταν ο υψηλότερος από αυτούς που έχουν αναφερθεί από το 2008. Τα στατιστικά αυτά στοιχεία εμφανίζονται πιο αναλυτικά στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Αναφερόμενα και δημοσιευμένα περιστατικά ανθρώπινης επεμβατικής λιστερίωσης, σχετικοί θάνατοι και ποσοστά θνησιμότητας κρουσμάτων στην Ε.Ε., 2008-2015 (Πηγή: EFSA, 2018)

Έτος	Επιβεβαιωμένα κρούσματα	Ποσοστό παρατήρησης ανά 100.000 ανθρώπους	Περιπτώσεις με		Ποσοστό θνησιμότητας κρουσμάτων (CRF) ^a
			Ποσοστό δεδομένα αποτελεσμάτων (% των επιβεβαιωμένων περιπτώσεων)	Θάνατοι	
2008	1.381	0,30	653 (47,3%)	134	20,5%
2009	1.645	0,36	757 (46,0%)	126	16,6%
2010	1.601	0,35	1.063 (66,3%)	181	17,0%
2011	1.476	0,32	1.054 (71,4%)	134	12,7%
2012	1.642	0,41	1.112 (67,7%)	198	17,8%
2013	1.763	0,44	1.228 (69,7%)	191	15,6%
2014	2.161	0,52	1.401 (64,8%)	210	15,0%
2015	2.206	0,46	1.524 (69,1%)	270	17,7%

^a CRF= Case Fatality Rate

Μετά από στρωματοποίηση των κρουσμάτων σε ηλικία και φύλο την ίδια χρονική περίοδο, βρέθηκε ότι για τις γυναίκες το ποσοστό επίπτωσης αυξήθηκε σημαντικά για τις ηλικιακές ομάδες 25–44 και ≥ 75 ετών, ενώ για τους άνδρες η επίπτωση στο ποσοστό αυξήθηκε για τις ηλικίες ≥ 75 ετών (Lere, 2020). Η αύξηση στις γυναίκες ηλικίας 25-44, πιθανόν οφείλεται στις εγκύους που εμφανίζονται περισσότερο σε αυτήν την ηλικιακή ομάδα. Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν και δεδομένα του Πίνακα 10 από την EFSA (2018).

Πίνακας 10: Η κατανομή του αριθμού των κρουσμάτων ανθρώπινης επεμβατικής λιστερίωσης στην Ε.Ε. για 14 ομάδες υποπληθυσμού και του εκτιμώμενου σχετικού κινδύνου, την περίοδο 2008-2015 (Πηγή: EFSA, 2018)

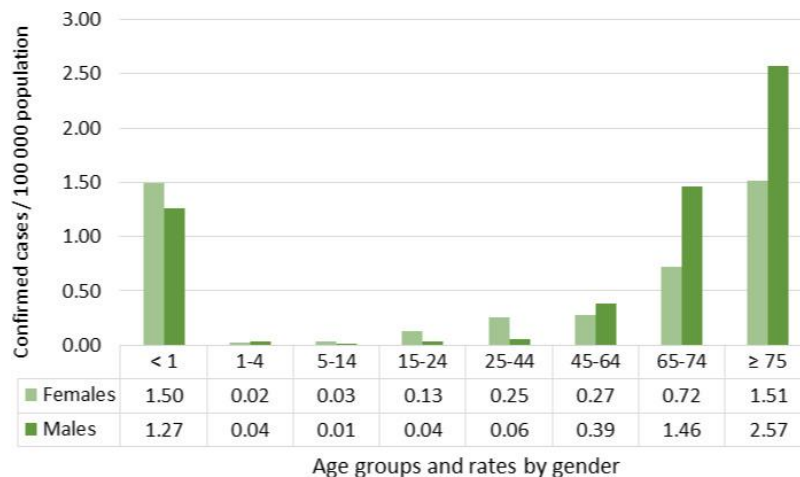
Ομάδα υποπληθυσμού	Πληθυσμός στην Ε.Ε. (2008-2015) ^α	Αναλογία του υποπληθυσμού στην Ε.Ε.	Περιπτώσεις επεμβατικής λιστερίωσης στην Ε.Ε. (2008-2015) ^β	Σχετικός Κίνδυνος ^γ
Γυναίκες 1-4 ετών	9.981.292	0,021	49	0,17
Άνδρες 1-4 ετών	10.507.387	0,022	62	0,20
Γυναίκες 5-14 ετών	24.769.674	0,052	52	0,07
Άνδρες 5-14 ετών	26.071.451	0,054	51	0,07
Γυναίκες 15-24 ετών	24.917.371	0,058	209	0,26
Άνδρες 15-24 ετών	29.107.545	0,061	72	0,08
Γυναίκες 25-44 ετών	67.013.021	0,140	1.067	0,54
Άνδρες 25-44 ετών	68.019.328	0,142	351	0,18
Γυναίκες 45-64 ετών	65.803.889	0,137	1.219	0,63
Άνδρες 45-64 ετών	63.791.535	0,133	2.001	1,07
Γυναίκες 65-74 ετών	24.249.576	0,051	1.328	1,87
Άνδρες 65-74 ετών	20.921.720	0,044	2.142	3,50
Γυναίκες ≥75 ετών	25.539.929	0,053	2.537	3,40
Άνδρες ≥75 ετών	15.476.863	0,032	2.862	6,33
Συνολικός πληθυσμός	479.170.581	1	14.002	1

^α Χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των ετήσιων αριθμών πληθυσμού τη χρονική περίοδο 2008-2015.

^β Με βάση το τελικό σύνολο δεδομένων, που αποτελείται από 14.002 επιβεβαιωμένες ανθρώπινες επεμβατικές λιστερίώσεις για την περίοδο 2008-2015, από 24 κράτη-μέλη της Ε.Ε.

^γ Αναλογία του ποσοστού επίπτωσης που παρατηρήθηκε σε έναν υποπληθυσμό προς το ποσοστό επίπτωσης που παρατηρήθηκε στο συνολικό πληθυσμό. Σχετικός Κίνδυνος >1 σημαίνει πως η επεμβατική λιστερίωση είναι πιο πιθανό να συμβεί στον υποπληθυσμό παρά στον συνολικό πληθυσμό, ενώ Σχετικός Κίνδυνος <1 σημαίνει ότι η επεμβατική λιστερίωση είναι λιγότερο πιθανό να συμβεί στον υποπληθυσμό από ότι στον συνολικό πληθυσμό. Σχετικός Κίνδυνος=1 σημαίνει ότι δεν υπάρχει διαφορά στον κίνδυνο μεταξύ υποπληθυσμού και συνολικού πληθυσμού.

Το 2015, τα μεγαλύτερα ποσοστά παρατήρησης της λιστερίωσης εμφανίζονται στους ηλικιωμένους άνω των 65 ετών και στα παιδιά κάτω του 1 έτους. Επίσης, το ποσοστό λιστερίωσης των ανδρών ηλικίας 65-74 ήταν πολύ μεγαλύτερο από αυτό των γυναικών αντίστοιχης ηλικίας, όπως και από αυτό των ανδρών ηλικίας 5-14. Εν γένει, οι λοιμώξεις μεταξύ ηλικιών 1-44 ήταν σε χαμηλά επίπεδα (Σχήμα 3) (EFSA, 2018).



Σχήμα 3: Αριθμός των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων ανθρώπινης επεμβατικής λιστερίωσης ανά 100.000 ανθρώπους ανά ηλικιακή ομάδα και φύλο στην Ε.Ε. το 2015 (Πηγή: EFSA, 2018)

Έχουν αναφερθεί, όμως, και πιο πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με τις λιστερίώσεις. Όπως αναφέρει ο Lepe (2020), τα κράτη-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το 2017 σημείωσαν 2480 επιβεβαιωμένα κρούσματα λιστερίωσης, που αντιστοιχούν σε 0,48 περιπτώσεις ανά 100.000 ανθρώπους. Το 2016 το ποσοστό θνησιμότητας ήταν 15,0%, ενώ το 2017 μειώθηκε σε 13,8%. Όμως, μετά από στρωματοποίηση των αποτελεσμάτων ανάλογα με την ηλικία, αυξήθηκαν οι θάνατοι σε ηλικίες ≥ 64 ετών (Lepe, 2020).

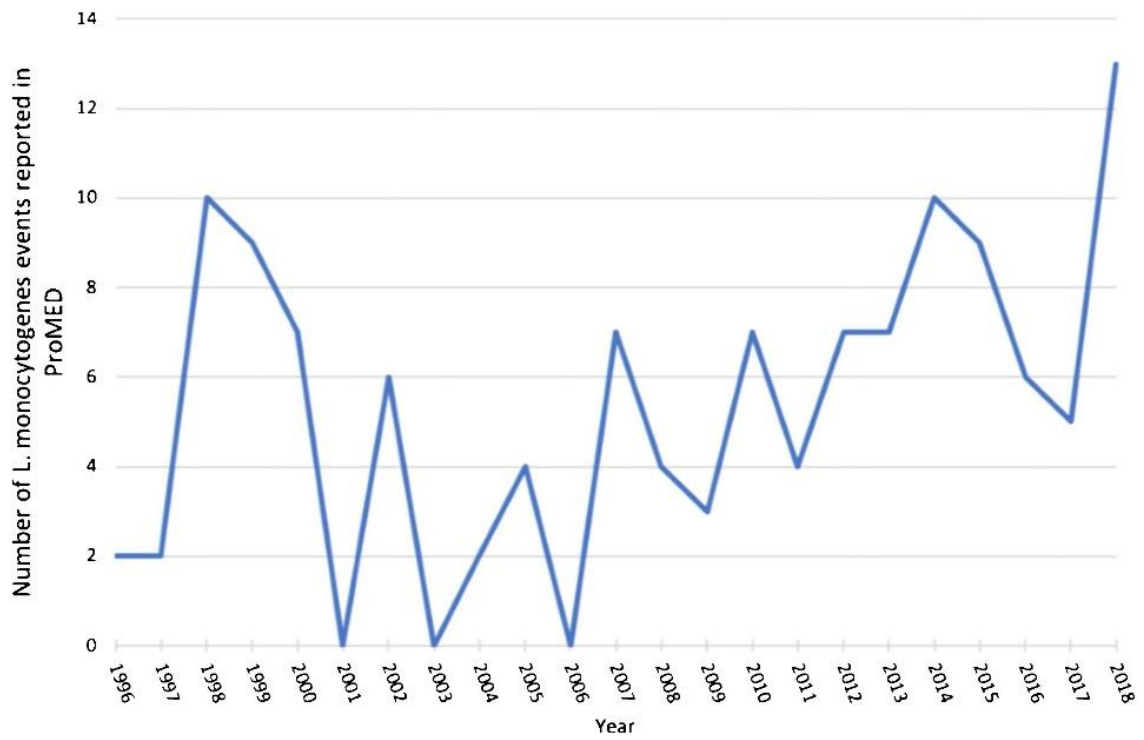
Σύμφωνα με επίσης δεδομένα του ProMED (Program for Monitoring Emerging Diseases), το οποίο είναι ένα πρόγραμμα παρακολούθησης μολυσματικών νόσων που ιδρύθηκε το 1994, έχει παρουσιαστεί μία πιο ευρεία εικόνα των επιδημιολογικών

δεδομένων για λοιμώξεις από τη *Listeria monocytogenes* στην πάροδο των ετών. Συγκεκριμένα, λήφθηκαν δεδομένα λιστερίωσης για τη χρονική περίοδο μεταξύ Ιανουάριο 1996 και Δεκέμβριο 2018. Εντοπίστηκαν 123 κρούσματα από 30 χώρες της βάσης δεδομένων της ProMED, των οποίων τα χαρακτηριστικά φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11), ενώ στο Σχήμα 4 εμφανίζεται ο αριθμός των περιστατικών ανά έτος που σχετίζονται με τη *Listeria*. Εντούτοις, τη χρονική περίοδο 1996-2018 τα περιστατικά λιστερίωσης που σχετίζονται με τρόφιμα εμφανίζουν αυξητική τάση (Desai, Anyoha, Madoff, & Lassmann, 2019).

Πίνακας 11: Χαρακτηριστικά των συμβάντων λοίμωξης από *Listeria monocytogenes* που αναφέρονται στη βάση δεδομένων ProMED (Πηγή: Desai, Anyoha, Madoff & Lassmann, 2019)

Περιστατικά	Αριθμός περιστατικών (Ποσοστό περιστατικών %)
Σύνολο περιστατικών	123 (100%)
Κρούσματα (2 ή περισσότερα περιστατικά σε ανθρώπους)	81 (65%)
Σποραδικές περιπτώσεις	13 (11%)
Προληπτικές ανακλήσεις τροφίμων ^α	29 (24%)
Περιστατικά που σχετίζονται με φαγητό σερβιρισμένο σε νοσοκομείο	10/123 (8%)
Περιστατικά με συμμετοχή πολλών χωρών	21/123 (17%)
Θνησιμότητα περιστατικών (συνολικά)	487/2383 (20%)

^α Προληπτικές ανακλήσεις μόνο χωρίς σχετικές ανθρώπινες περιπτώσεις



Σχήμα 4: Παρουσία περιστατικών λιστερίωσης ανά έτος που αναφέρονται στο ProMED (Πηγή: Desai, Anyoha, Madoff & Lassmann, 2019)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Παρουσία της *Listeria monocytogenes* στα τυριά

2.1 Τυρί: Ορισμός και Κατηγοριοποίηση

Οι Κεχαγιάς & Τσάκαλη (2017, σ. 235) αναφέρουν πως σύμφωνα με τον Codex Alimentarius και το γενικό standard για τα τυριά «το τυρί είναι προϊόν που μπορεί να προκύψει από ωρίμανση ή μη και να είναι μαλακό, ημίσκληρο, σκληρό ή πολύ σκληρό. Η επιφάνεια του τυριού μπορεί να καλυφθεί με υλικά επικάλυψης και η αναλογία πρωτεϊνών τυρογάλακτος προς καζεΐνη δεν πρέπει να υπερβαίνει τη σχετική αναλογία που υπάρχει στο γάλα. Το τυρί μπορεί να προέλθει από πήξιμο γάλακτος, αποβουτυρωμένου γάλακτος, μερικώς αποβουτυρωμένου γάλακτος, κρέμας, κρέμας από τυρόγαλα ή από παρασκευή βουτύρου ή μετά από συνδυασμό των ανωτέρω υλών, μετά από δράση πυτιάς ή κατάλληλων πηκτικών παραγόντων και με τη μερική στράγγιση του τυρογάλακτος μετά το πήξιμο».

Εκτός από τα τυριά ωρίμανσης, υπάρχουν και αυτά που δεν υφίστανται ωρίμανση του τυροπήγματος, καταναλώνονται αμέσως μετά την παραγωγή τους και χαρακτηρίζονται ως φρέσκα τυριά. Τέτοια τυριά είναι τα τυριά κρέμας και τα cottage, και έχουν αυξημένη υγρασία. Στην ίδια κατηγορία εντάσσεται και η Mozzarella, παρόλο που είναι ημίσκληρο τυρί (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

Η κατηγοριοποίηση των τυριών που επικρατεί σήμερα, εκφράζεται μέσω τριών βασικών χαρακτηριστικών: α) τη σκληρότητα, με κριτήριο την υγρασία (βάσει σκληρότητας τα τυριά ταξινομούνται σε πολύ σκληρά, σκληρά, ημίσκληρα και μαλακά), β) το λίπος, με κριτήριο τη λιποπεριεκτικότητα, και γ) τον ιδιαίτερο τρόπο ωρίμανσης (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 12) παρατίθενται διάφορα τυριά που ταξινομούνται βάσει σκληρότητας ή και άλλων χαρακτηριστικών, μαζί με την περιεκτικότητά τους σε υγρασία.

Πίνακας 12: Ταξινόμηση των τυριών σε κατηγορίες (Πηγή: Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017)

Κατηγορίες	Μέγιστη Υγρασία (%)	Ονομασία τυριού	Παρατηρήσεις
Πολύ σκληρά	32	Parmigiano-Reggiano, Romano, Asiago	Τυριά ωρίμανσης
Σκληρά	38	Κεφαλοτύρι, Κασέρι, Γραβιέρα, Cheddar, Colby, Cacciocavallo, Gruyere	Τυριά ωρίμανσης
Ημίσκληρα	46	Emmental, Edam, Gouda, Brick, Provolone, Roquefort, Gorgonzola	Τυριά ωρίμανσης
Μαλακά	58	Φέτα, Τελεμές, Κοπανιστή, Mozzarella, Scarmorza	Τυριά ωρίμανσης
Τυριά από τυρόγαλα	70	Μυζήθρα, Μανούρι, Μανουρομυζήθρα, Ανθότυρος	Παρασκευάζονται μετά από αναθέρμανση τυρογάλακτος
Τυριά κρέμα	60±5	Cream cheese (Neufchatel)	Τύπος μαλακού τυριού με μίγμα κρέμας και αποβουτυρωμένου γάλακτος
Ανακατεργασμένα ή λιωμένα τυριά ή τυριά τρόφιμα	47-71	Processed cheeses, cheese foods	Παρασκευάζονται μετά από ανάμιξη και λιώσιμο πολλών ειδών τυριών
Τυριά που αλείφονται	75	Cheese spreads	Παρασκευάζονται όπως και τα cheese foods με λιγότερο όμως λίπος

Τέλος, ταξινόμηση των τυριών γίνεται και βάσει ειδικών χαρακτηριστικών. Οι περιπτώσεις αυτές είναι οι εξής: α) πλαθόμενα τυριά (Mozzarella, Provolone, Κασέρι), β) τυριά τυρογάλακτος (μυζήθρα, ανθότυρος, μανούρι, ricotta, σκανδιναβικά τυριά), γ) τυριά άλμης (φέτα, τελεμές, dormiati), δ) τυριά με οπές (Emmental, Γραβιέρα), ε) τυριά με εμφανή ανάπτυξη μικροοργανισμών στην επιφάνεια (Camembert, Brie, Limburger) ή στο εσωτερικό (Roquefort, Μπλε, Stilton, Gorgonzola) και στ) ανακατεργασμένα τυριά (processed cheeses) ή τηγμένα τυριά (fromages fondus) και ανακατεργασμένα τυριά με αλοιφώδη υφή (spreadable processed cheeses).

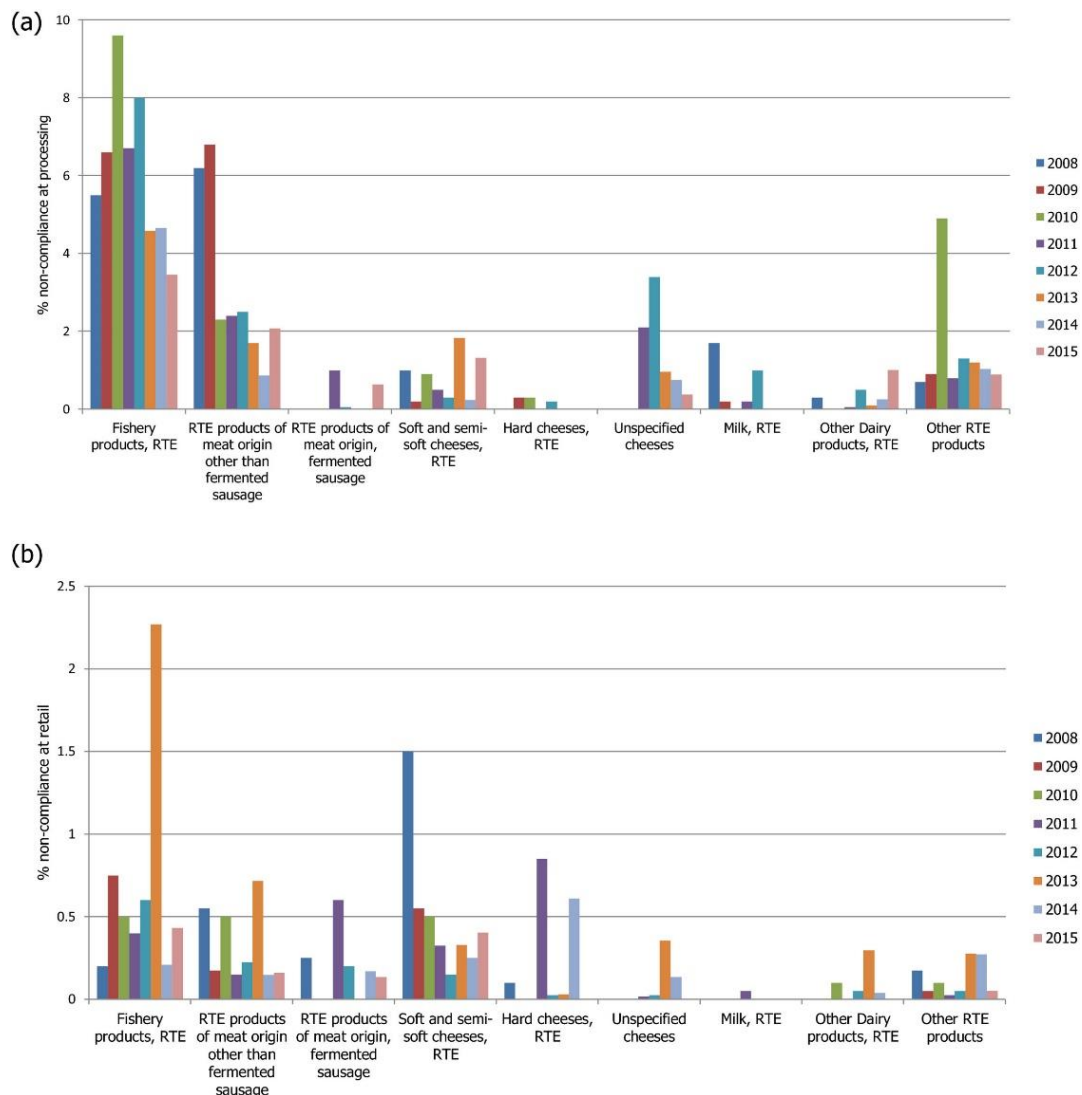
Ανά τον κόσμο, υπάρχουν περισσότερα από 500 είδη τυριών, με διαφορετικά ονόματα και χαρακτηριστικά. Η ποικιλομορφία αυτή οφείλεται στο χρησιμοποιούμενο είδος γάλακτος (αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο), στο είδος των μικροοργανισμών και ενζύμων που χρησιμοποιούνται, στην ποσότητα και ρυθμό σχηματισμού του γαλακτικού οξέος, στον βαθμό αφυδάτωσης του τυροπήγματος, στην ποσότητα αλατιού που προστίθεται και στον τρόπο αλατίσματος, στο μέγεθος και σχήμα του τυριού, στη θερμοκρασία ωρίμανσης, στην υγρασία του χώρου ωρίμανσης, στη μεταχείριση της επιφάνειας του τυριού και στη διάτρηση της τυρομάζας για είσοδο του αέρα (Martinez-Rios & Dalgaard, 2018).

Τα τυριά, όσον αφορά τον τύπο και τον τρόπο επεξεργασίας τους, χωρίζονται σε φρέσκα τυριά, τυριά ωρίμανσης, τυριά μούχλας, τυριά με επίχρισμα και τυριά άλμης. Τα φρέσκα τυριά, όπως το queso fresco, το cottage cheese, η Mozzarella και η Ricotta, μοιάζουν με τυρόπηγμα, έχουν αλοιφώδη υφή και δεν υπόκεινται σε ωρίμανση. Τα τυριά ωρίμανσης, όπως το Gooda, το Edam, το Cheddar και η παρμεζάνα, είναι έτοιμα για κατανάλωση μόνο όταν υποστούν κατεργασία και ωρίμανση μέχρις ότου αναπτυχθούν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους. Τα τυριά μούχλας, όπως το Roquefort, το Gorgonzola, το Cabrales, το Stilton και το Danablu, είναι τυριά ωρίμανσης, στα οποία η ωρίμανση έχει επέλθει κυρίως με την ανάπτυξη του βακτηρίου *Penicillium roqueforti* σε όλο το εσωτερικό ή/και την επιφάνεια του τυριού (Martinez-Rios & Dalgaard, 2018). Έχουν εύρος pH 4,5-6,5 και περιεκτικότητα άλατος 2,3-7% (Bernini, et al., 2013). Τα τυριά με επίχρισμα, όπως το Brie, το Camembert, το Limburger και το Taleggio, είναι τυριά ωρίμανσης, των οποίων η επιφάνεια προσβάλλεται με *Penicillium candidum*, *Penicillium camemberti* ή *Brevi-bacterium linens*. Τέλος, τα τυριά άλμης, όπως η Φέτα ή η Ricotta, είναι τυριά που ωριμάζουν και αποθηκεύονται εντός άλμης μέχρι να πωληθούν ή να συσκευαστούν (Martinez-Rios & Dalgaard, 2018).

Ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί και στην προστασία της ονομασίας και της προέλευσης των τυριών, προκειμένου η κάθε χώρα να προστατεύσει την παραγωγή των παραδοσιακών της τυριών. Με πρωτοβουλίες της ΕΕ και μέσω σχετικών κανονισμών, κατοχυρώθηκε η ονομασία Π.Ο.Π. (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης) για ορισμένα τυριά που παρασκευάζονται από γάλα που παράγεται και επεξεργάζεται από περιοχές με μικρά τυροκομεία, βοηθώντας τα να παραμείνουν στην περιοχή τους. Χαρακτηριστικά τυριά Π.Ο.Π. είναι η Φέτα για την Ελλάδα, το Roquefort για την Γαλλία και το Gorgonzola για την Ιταλία (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

2.2 Συχνότητα εμφάνισης της *Listeria monocytogenes* στα τυριά

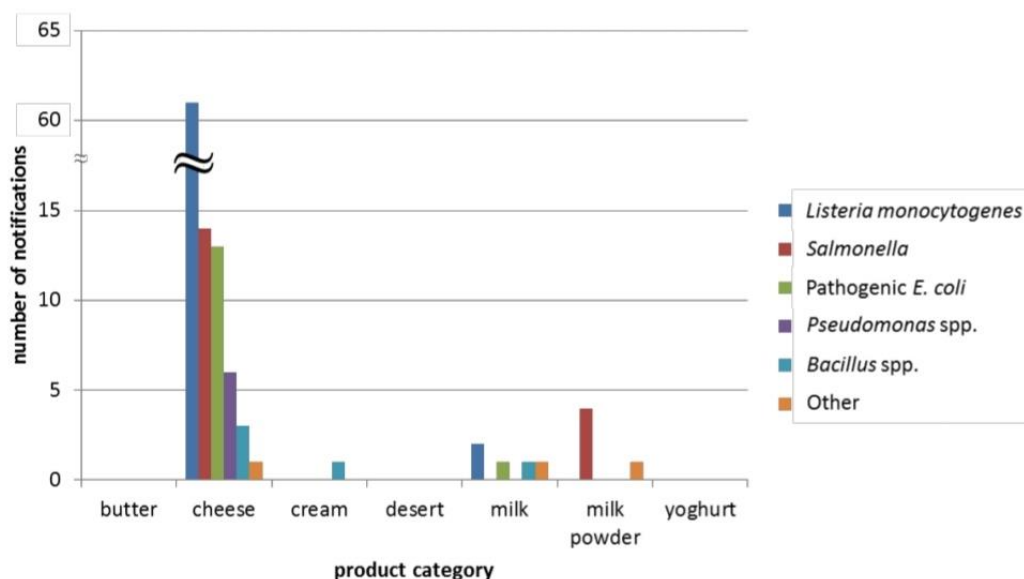
Σύμφωνα με δεδομένα της EFSA (European Food Safety Authority) για την χρονική περίοδο 2008-2015 σχετικά με την παρουσία της *Listeria monocytogenes* σε ορισμένα τρόφιμα κατά την επεξεργασία και κατά την λιανική πώλησή τους, το ποσοστό των θετικών δειγμάτων στο παθογόνο απεικονίζεται στο Σχήμα 6. Η δειγματοληψία των τροφίμων έγινε τόσο από το λιανικό εμπόριο (συμπεριλαμβανομένων νοσοκομείων και catering), όσο και από τα περιβάλλοντα επεξεργασίας (συμπεριλαμβανομένου του εξοπλισμού κοπής). Μεγαλύτερο επίπεδο μόλυνσης κατά την επεξεργασία την χρονική περίοδο αυτή εμφάνισαν εν γένει τα προϊόντα αλιείας, με ποσοστά μη συμμόρφωσης 3,5% έως 9,6%, ακολουθούμενα από τα προϊόντα κρέατος, με ποσοστά μη συμμόρφωσης 0% έως 6,8%. Τρίτα κατατάχθηκαν τα τυριά, με πρώτα σε μολύνσεις να είναι τα μαλακά και ημιμαλακά (0,2-1,8%), ακολουθούμενα από το γάλα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα (0-1,7%) και τα σκληρά τυριά (0-0,3%). Ωστόσο, δεν ισχύει η ίδια σειρά για την επιμόλυνση κατά τη λιανική πώληση. Στην περίπτωση αυτή, τα τυριά και ιδίως τα μαλακά και ημιμαλακά έρχονται δεύτερα σε σειρά επιμόλυνσης μετά τα είδη αλιείας (EFSA, 2018).



Σχήμα 5: Ποσοστό μεμονωμένων δειγμάτων κατά την επεξεργασία (a) και κατά τη λιανική πώληση (b) μη συμμορφούμενα με τα ευρωπαϊκά κριτήρια ασφάλειας τροφίμων για την *Listeria monocytogenes*, που βασίζονται στα δεδομένα παρακολούθησης της EFSA, 2008-2015. RTE= Ready To Eat (Πηγή: EFSA, 2018)

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν βασικό όχημα για πρόκληση λιστερίωσης στον άνθρωπο. Από τα προϊόντα αυτά, το τυρί είναι το πρώτο σε αναφορές ασθενειών. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί επίπεδα επιμόλυνσης μέχρι και 10^7 cfu/g σε τυριά μολυσμένα με φυσικό τρόπο από το βακτήριο (Farber & Peterkin, 1991). Σύμφωνα με τους Van Bokhorst-Van de Veen, Minor, Zwietering, & Groot (2015), παρόλο που οι μολύνσεις από *Listeria monocytogenes* μέσω κατανάλωσης τυριού αντιπροσωπεύουν μόνο 14 από τα συνολικά 55.000 περιστατικά ασθένειας που σημειώθηκαν την περίοδο 2009-2014, το παθογόνο δείχνει να κατέχει υψηλή θέση στη θνησιμότητα μετά από τη λοίμωξη (ποσοστά θνησιμότητας έως 20% για τα τυριά). Συγκεκριμένα, έρχεται δεύτερο σε ποσοστά θνησιμότητας μετά το *Campylobacter*, ως αιτία θανάτου από μόλυνση μέσω

κατανάλωσης τροφίμου. Τα παραπάνω φαίνονται και στο Σχήμα 7, όπου η *Listeria monocytogenes* είναι το πρώτο βακτήριο που ευθύνεται για μολύνσεις στα τυριά.



Σχήμα 6: Αριθμός θετικών δειγμάτων *L. monocytogenes* σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα για την περίοδο 2009-2014 εντός της ΕΕ (Πηγή: Van Bokhorst-Van de Veen, Minor, Zwietering, & Groot, 2015).

2.3 Τυριά που υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*

Η επιβίωση ή και ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* στα τυριά εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η σκληρότητα και ο τύπος του τυριού, το είδος γάλακτος που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη, η εφαρμογή ή μη της παστερίωσης στην πρώτη ύλη, ο τρόπος επεξεργασίας του τυριού, καθώς και το στάδιο επεξεργασίας στο οποίο βρίσκεται το τυρί. Οι παράγοντες αυτοί αναλύονται παρακάτω.

2.3.1 Ανάλογα με την σκληρότητα

Τα τυριά που υποστηρίζουν καλύτερα την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* και έχουν συνδεθεί με περιστατικά λιστερίωσης, είναι τα μαλακά, τα ημιμαλακά και τα ημίσκληρα τυριά, που έχουν παρασκευαστεί από μη παστεριωμένο γάλα ή έχουν επιμολυνθεί κατά την ωρίμανση και την αποθήκευση. Οι συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη του βακτηρίου στα παραπάνω τυριά είναι τα υψηλά ποσοστά υγρασίας των τυριών, το υψηλό τους pH, καθώς οι υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού (μέχρι και 16% NaCl), στις οποίες ο μικροοργανισμός έχει αντοχή (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

Αντίθετα, τα σκληρά τυριά, συνήθως δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Lahou & Uyttendaele, 2017). Το παθογόνο σπάνια συναντάται σε

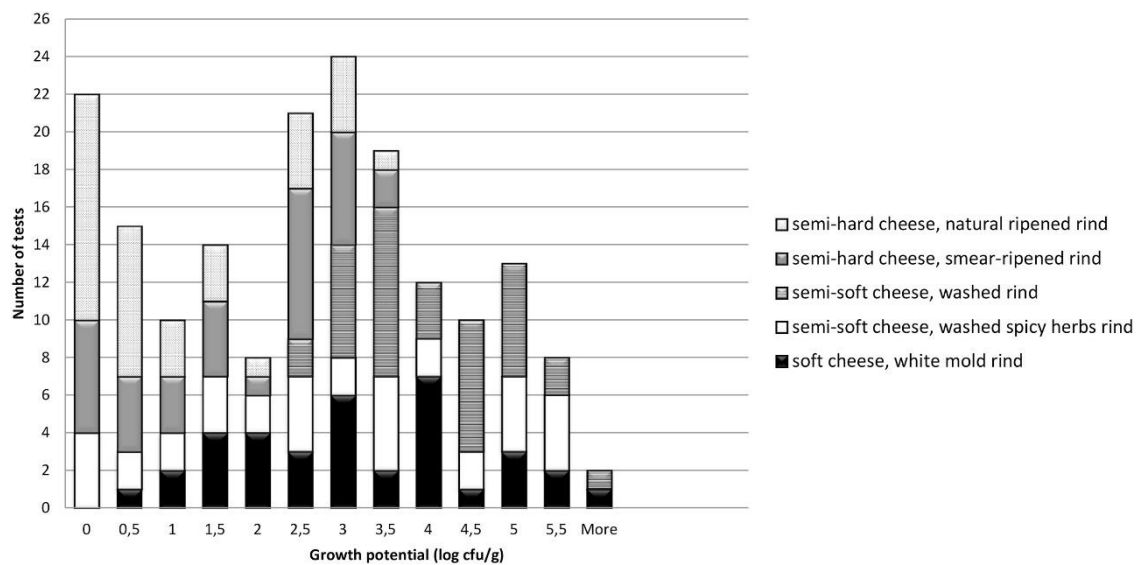
σκληρά τυριά μακράς ωρίμανσης που παρασκευάζονται από ωμό γάλα, όπως το Cheddar, το Colby, το Parmigiano και το Provolone. Εντούτοις, οι Panebianco, et al (2020) μελέτησαν ορισμένα παραδοσιακά σκληρά ιταλικά τυριά από την Καλαβρία, όπως το Pecorino del Poro και το Caprino d' Aspromonte. Διαπίστωσαν ότι τα γαλακτικά βακτήρια που απομονώθηκαν από τυριά αυτά, δρουν ανταγωνιστικά προς άλλα βακτήρια και σε συνδυασμό με την μακράς διάρκειας ωρίμανσή τους, εμποδίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*.

Ωστόσο, έχουν γίνει ορισμένες αναφορές για παρουσία της *L. monocytogenes* σε σκληρά τυριά, λόγω διασταυρούμενης επιμόλυνσης κατά την επεξεργασία τους, αν πρόκειται για σκληρά τυριά παστεριωμένου γάλακτος, ή αρχική επιμόλυνση αν πρόκειται για τυριά ωμού γάλακτος, και αφορούν επιβίωση του βακτηρίου σε αυτά και όχι ανάπτυξη του (Ryser, 2002; Oliver, Jayarao, & Almeida, 2005; Chon, et al., 2020). Συγκεκριμένα, ο Ryser (2002) αναφέρει επιβίωση του παθογόνου σε τυρί Cheddar μέχρι και 434 μέρες μετά την επιμόλυνση. Το γεγονός αυτό εγείρει ανησυχίες σχετικά με την επάρκεια των 60 ημερών ωρίμανσης για τα σκληρά τυριά από ωμό ή θερμισμένο (LHT) γάλα και την παραμονή τους σε θερμοκρασίες αποθήκευσης άνω των 1,7°C. Ωστόσο, οι Chon, et al. (2020) διαπιστώνουν ότι μετά από ωρίμανση των τυριών, συνήθως η παρουσία του βακτηρίου δεν είναι ανιχνεύσιμη και δεν ξεπερνά τα 20 CFU/g.

2.3.2 Ανάλογα με τον τύπο τους

Συχνά, έχουν αναφερθεί περιστατικά και από τυριά με ανάπτυξη μικροοργανισμών και συγκεκριμένα μούχλας (όπως το Camembert, το Roquefort, το Gorgonzola και το Brie), ή με ανάπτυξη βακτηρίων (γαλλικά τυριά, Brick) και ορισμένα τυριά μεξικάνικου τύπου (queso fresco) (Ryser, 2002). Μετά από έρευνα των Martinez-Rios & Dalgaard (2018) βρέθηκε ότι τα φρέσκα τυριά έχουν το χαμηλότερο ποσοστό ανάπτυξης της *L. monocytogenes* (0,8%), ακολουθούμενα από τα τυριά ωρίμανσης (2,0%), τα τυριά μούχλας (2,4%) και τα τυριά με επίχρισμα (5,1%). Τη μεγαλύτερη ανάπτυξη του βακτηρίου υποστήριξαν τα τυριά άλμης (11,8%). Τα φρέσκα τυριά εμφανίζουν την μικρότερη ανάπτυξη του βακτηρίου, καθώς ο μόνος τρόπος επιμόλυνσης τους είναι η διασταυρούμενη επιμόλυνση. Αντίθετα, τα τυριά άλμης έχουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης του βακτηρίου, καθώς δέχονται μεγάλη επεξεργασία και εκτίθενται σε περιβάλλοντα επικίνδυνα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, όπως είναι η άλμη. Επιπλέον, οι Martinez-Rios, Gkogka & Dalgaard (2020) αναφέρουν πως τα τυριά που ωριμάζουν με ανάπτυξη μικροοργανισμών (τυριά μούχλας και επιχρίσματος)

υποστηρίζουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, λόγω των οργανικών οξέων που παράγονται από την δραστηριότητα της μικροβιακής αυτής χλωρίδας και λόγω της αύξησης του pH τους κατά την ωρίμανση και την αποθήκευση. Ανάλογα μάλιστα με την θερμοκρασία και τη χρονική διάρκεια αποθήκευσης, μπορούν να επιτευχθούν συγκεντρώσεις άνω των 100 cfu/g. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τους Bernini et al. (2016) ο χειρισμός των τυριών αυτών και οι διαδικασίες επεξεργασίας τους (διάτρηση με τροχούς, υγρό βούρτσισμα) μπορούν να επιμολύνουν το τελικό προϊόν. Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται στο επόμενο σχήμα (Σχήμα 8).



Σχήμα 7: Δυνατότητα ανάπτυξης *Listeria monocytogenes* σε μαλακά, ημιμαλακά και ημίσκληρα τυριά (Πηγή: Lahou & Uyttendaele, 2017)

Παρακάτω ακολουθούν δεδομένα από συγκεκριμένα είδη τυριών, καθώς και η δυνατότητα ανάπτυξης του βακτηρίου σε αυτά μαζί με τις αιτίες ανάπτυξης.

Το Gorgonzola, ένα από τα πιο σημαντικά ιταλικά Π.Ο.Π. τυριά, είναι ένα μπλε τυρί, ωριμασμένο με μικροοργανισμούς, φτιαγμένο από παστεριωμένο αγελαδινό γάλα, με τελικό pH 4,5-6,5, περιεκτικότητα αλάτων 2,3-7% και αποτελεί ένα πολύ καλό υπόστρωμα για την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*. Το 2006 σημειώθηκε το πρώτο περιστατικό λιστερίωσης που σχετιζόταν με την κατανάλωση μολυσμένου τυριού Gorgonzola. Επίσης, σύμφωνα με δεδομένα της EFSA (2018), κατεψυγμένο αλλά και κανονικό τυρί Gorgonzola έφτασε τις μέγιστες συγκεντρώσεις που εμφανίστηκαν σε τυριά την περίοδο 2008-2016. Συγκεκριμένα, για το τυρί Gorgonzola οι συγκεντρώσεις της *Listeria monocytogenes* έφτασαν τα 5,28 log cfu/g το 2014, ενώ το 2015 σε κατεψυγμένο Gorgonzola βρέθηκαν συγκεντρώσεις μέχρι και 6,26 log cfu/g. Παρόλο που

η παστερίωση θανατώνει το βακτήριο, αυτό μπορεί να εισέλθει στο προϊόν από το περιβάλλον κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Αυτή η μόλυνση συνήθως περιορίζεται στο φλοιό του τυριού, ο οποίος για το λόγο αυτό έχει κηρυχθεί ως μη βρώσιμος. Ωστόσο, το πρόβλημα της μόλυνσης από το παθογόνο εξακολουθεί να υπάρχει, καθώς είναι πιθανό να μεταφερθεί στο εσωτερικό του προϊόντος κατά τη διάρκεια της κοπής. Το βακτήριο μάλιστα είναι ικανό να επιβιώσει μέχρι και 55 μέρες σε συνθήκες ψύξης (4°C), ξεπερνώντας το κριτήριο ασφάλειας για το τρόφιμο και καθιστώντας το μη ασφαλές για κατανάλωση (Bernini, et al., 2016).

Αναφορές των Ramsaran, Chen, Brunke, Hill, & Griffiths (1998) για το τυρί Camembert, ένα τυρί που ωριμάζει με επίχρισμα μικροοργανισμών και παράγεται είτε από ωμό είτε από παστεριωμένο γάλα, έδειξαν αύξηση της *L. monocytogenes* κατά 0,3-0,7 log cfu/g στο στραγγισμένο τυρόπηγμα του Camembert κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του, με μεγαλύτερα ποσοστά ανάπτυξης του βακτηρίου στην επιφάνεια του τυριού. Τα παραπάνω πιθανόν οφείλονται στην αύξηση του pH και την πρωτεολυτική δραστηριότητα της μούχλας στο τυρί αυτό.

Αναφορές των ίδιων για την Φέτα, ένα από τα γνωστότερα παραδοσιακά ελληνικά Π.Ο.Π. τυριά άλμης, δείχνουν πως παρατηρήθηκε αύξηση της *L. monocytogenes* κατά ένα λογαριθμικό κύκλο κατά την επεξεργασία του τυριού. Η αντοχή του βακτηρίου για 24 έως 40 ημέρες, είτε η Φέτα προέρχεται από παστεριωμένο είτε από ωμό γάλα, οφείλεται στο συνδυασμό της θερμοκρασίας αποθήκευσης (2°C), στην περιεκτικότητα άλατος (3% NaCl) και στο χαμηλό pH του τυριού (pH 5,5) (Ramsaran, Chen, Brunke, Hill, & Griffiths, 1998).

Η Ricotta, ένα ιταλικό μαλακό τυρί άλμης που παρασκευάζεται από τυρόγαλα, υποστηρίζει την ανάπτυξη του παθογόνου, λόγω της μεγάλης επεξεργασίας που δέχεται εντός της άλμης, η οποία αυξάνει τον κίνδυνο επιμόλυνσης (Martinez-Rios & Dalgaard, 2018).

Έρευνα για την επιμόλυνση παραδοσιακών λιβανέζικων τυριών από τη *L. monocytogenes*, έκαναν οι Harakeh, et al. (2009) σε δύο λιβανέζικα τυριά ωμού γάλακτος: το Baladi (λιβανέζικες μπάλες τυριού) και το Shankleesh (τυρί ωριμασμένο με μούχλα). Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερη επιμόλυνση στο Baladi (36%) από ότι στο Shankleesh (16%). Το πρώτο τυρί εμφάνισε μεγαλύτερα ποσοστά από το βακτήριο που οφείλονται στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα υγρασίας, στο χαμηλό pH 4,4 και στην

υψηλή αλατοπεριεκτικότητα του τυριού μέχρι και 20%. Αντίθετα, το δεύτερο τυρί εμφάνισε μικρότερη επιμόλυνση, πιθανόν λόγω της προσθήκης ρίγανης που γίνεται παραδοσιακά και δρα ως αντιμικροβιακό, και της συντήρησής του σε ελαιόλαδο, η οποία προσφέρει αναερόβιες συνθήκες περιβάλλοντος.

Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται από τους Valero, Hernández, Esteban-Carbonero, & Rodríguez-Lázaro (2018) στα τριμμένα τυριά, τα οποία είναι ευρέως διαδομένα στην αγορά και αποτελούνται από ένα ή και περισσότερα είδη τυριών μαζί. Αυτά τα τυριά υπόκεινται σε διάφορους χειρισμούς στις βιομηχανίες, όπως η κοπή και η συσκευασία, κάτι που τα κάνει ευαίσθητα στην επιμόλυνση από *L. monocytogenes*. Ωστόσο, οι επιστημονικές πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά του βακτηρίου στα τυριά αυτά κατά την αποθήκευση, είναι περιορισμένες.

Σπάνια συναντάται το βακτήριο σε τυριά που υποβάλλονται σε ισχυρές θερμικές επεξεργασίες κατά την παρασκευή, όπως το cottage, η Mozzarella, το Parmigiano, το ελβετικό και το ανακατεργασμένο τυρί (Ryser, 2002). Ωστόσο για την Mozzarella, ένα από τα πιο γνωστά φρέσκα ιταλικά τυριά, που φτιάχνεται είτε από παστεριωμένο είτε από ωμό γάλα αγελάδας ή βούβαλου, έχουν γίνει αναφορές πως μπορεί να επιμολυνθεί. Οι Tirloni, Bernardi, Rosshaug, & Stella (2019) και Martinez-Rios & Dalgaard (2018) μιλούν για επιμόλυνσή της μετά την παστερίωση του γάλακτος (αν αυτή εφαρμόζεται) και κατά την επεξεργασία του τυριού, φτάνοντας σε ποσοστά παρουσίας του βακτηρίου έως και 24%. Η επιμόλυνση μπορεί να συμβεί και από λάθη στη συσκευασία του προϊόντος, εάν αυτή δεν προσφέρει πλήρη στεγανότητα.

Τα ανωτέρω φαίνονται στους επόμενους πίνακες (Πίνακες 13, 14).

Πίνακας 13: Παρουσία της *L. monocytogenes* σε διάφορους τύπους τυριών (Πηγή: Farber & Peterkin, 1991)

Τύπος τυριού	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός θετικών δειγμάτων σε <i>L. monocytogenes</i> (%)
Σκληρό τυρί	66	1 (1,5)
Ημίσκληρο τυρί	205	4 (2,0)
Τυρί με κρούστα λευκής μούχλας	261	7 (2,7)
Τυρί κόκκινου επιχρίσματος	343	33 (9,6)

Τύπος τυριού	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός θετικών δειγμάτων σε <i>L. monocytogenes</i> (%)
Μαλακά τυριά	222	23 (10,0)
Μαλακά και ημιμαλακά τυριά	374	2 (0,5)
Μαλακό τυρί ωρίμανσης	769	63 (8,2)
Μαλακό τυρί χωρίς ωρίμανση	366	4 (1,1)
Τυρί από κατσικίσιο γάλα	476	22 (4,6)
Τυρί από πρόβειο γάλα	141	1 (0,7)

Πίνακας 14: Παρουσία της *L. monocytogenes* σε διάφορα είδη τυριών ανάλογα με τη σύνθεση των τυριών (Πηγή: Ryser, 2002)

Είδος τυριού	Υγρασία (%) ^a	NaCl στην υδατική φάση (%) ^a	pH		Ανάπτυξη
			Αρχικό	Τελικό	
Μπλε τυρί	39	11,5	4,6	6,3	-
Brie/Camembert	55	4,7	4,6	7,5	+
Cheddar	37	4,6	5,1	5,1	-
Cottage	79	1,2	5,0	5,0	-
Φέτα	55	4,6	4,6	5,1	-
Mexican-style	51	4,0	6,2	6,2	+
Mozzarella	47	4,4	5,4	5,4	-
Parmigiano	32	5,0	5,1	5,1	-
Ricotta	72	0,5	6,0	6,0	+
Ελβετικό	33	2,7	5,5	5,5	-

2.3.3 Ανάλογα με το είδος του γάλακτος

Σημαντικό ρόλο στην παρουσία του μικροοργανισμού παίζει και το είδος του ζώου από το οποίο λαμβάνουμε το γάλα για να παρασκευάσουμε το τυρί. Για τα μαλακά και ημιμαλακά τυριά που παράγονται είτε από ωμό γάλα, είτε από γάλα μικρής θερμικής επεξεργασίας, το ποσοστό των θετικών δειγμάτων στη *Listeria monocytogenes* σε επίπεδα ανίχνευσης ήταν μεγαλύτερο στα τυριά από αγελαδινό γάλα σε σύγκριση με αυτά που παράγονται από άλλο είδος γάλακτος. Ωστόσο, το ποσοστό των δειγμάτων που περιείχαν το βακτήριο σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 cfu/g, ήταν μεγαλύτερο στα πρόβεια τυριά, ενώ δεδομένα του EFSA (2018) αναφέρουν πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις του βακτηρίου (5,87 log cfu/g) σε τυρί ωμού βουβαλίσσιου γάλακτος το 2008. Όσο για τα σκληρά τυριά που παράγονται είτε από ωμό γάλα, είτε από γάλα μικρής θερμικής επεξεργασίας, η *Listeria monocytogenes* υπήρχε σε μεγαλύτερα ποσοστά σε τυριά από πρόβειο γάλα, ακολουθούμενα από τυριά κατσικίσσιου γάλακτος, ενώ σπάνια ανιχνεύθηκε σε αγελαδινά τυριά ή τυριά με περισσότερα από ένα είδη γάλακτος. Επίσης, οι διαφορές στην ανίχνευση του βακτηρίου στα τυριά από διαφορετικά είδη γάλακτος ήταν μικρές όταν το γάλα ήταν παστεριωμένο (Todd & Notermans, 2011; EFSA & ECDC, 2015). Σχετικά δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

2.3.4 Ανάλογα με την εφαρμογή ή μη της παστερίωσης

Όσον αφορά την ασφάλεια των τυριών από παστεριωμένο γάλα σε σύγκριση με τα τυριά από ωμό γάλα ή γάλα χαμηλής θερμικής επεξεργασίας, φαίνεται τα αποτελέσματα ανά τις έρευνες να δίστανται.

Αφενός, σύμφωνα με δεδομένα του 2013 από τον EFSA, όσον αφορά τα μαλακά και τα ημιμαλακά τυριά, η *L. monocytogenes* ανιχνεύεται περισσότερο σε αυτά που παρήχθησαν από ωμό ή χαμηλής θερμικής επεξεργασίας γάλα (Low Heat Temperature ή LHT γάλα) από ότι στα τυριά από παστεριωμένο γάλα, ενώ το ποσοστό των δειγμάτων που ξεπέρασε το όριο ανοχής των 100 cfu/g ήταν σχετικά μικρό. Επίσης, για τα σκληρά τυριά αναφέρεται ότι το ποσοστό των δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκε το βακτήριο ήταν παρόμοιο για αυτά που παρήχθησαν από παστεριωμένο γάλα με αυτά που παρήχθησαν από ωμό, ενώ δεν βρέθηκαν δείγματα να ξεπερνούν το όριο των 100 cfu /g. Τα παραπάνω δεδομένα παρουσιάζονται και στο Σχήμα 9 (Almeida, et al., 2013; EFSA & ECDC, 2015; Van Bokhorst-Van de Veen, Minor, Zwietering, & Groot, 2015). Οι Jackson, Gould, Hunter, Kucero, & Jackson (2018) αναφέρουν μάλιστα ότι για τα μαλακά ωριμασμένα τυριά, ο κίνδυνος λιστερίωσης ανά μερίδα εκτιμάται ότι είναι 50 με 160

φορές μεγαλύτερος για τυριά ωμού γάλακτος απ' ότι για τυριά παστεριωμένου γάλακτος. Ακόμα και σε τυριά με χαμηλές τιμές pH (μικρότερες του 5,5) που προέρχονται από απαστερίωτο γάλα, έχει βρεθεί ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να επιβιώσει για μεγάλα χρονικά διαστήματα, ακόμα και μετά από δύο μήνες συντήρησης σε συνθήκες ψύξης, μιας και είναι ψυχρότροφος (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017). Αφετέρου, αρκετές πηγές (Schlech, 2000; EFSA, 2009; Lahou & Uyttendaele, 2017) αναφέρουν πως βρέθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά σε μαλακά και ημιμαλακά τυριά παστεριωμένου γάλακτος από ότι σε αυτά από ωμό γάλα. Αν και είναι γενικά παραδεκτό ότι η *Listeria monocytogenes*, παρόλο που είναι θερμοάντοχος μικροοργανισμός, θανατώνεται με την παστερίωση, (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017), φαίνεται τα αυξημένα αυτά ποσοστά να οφείλονται σε διασταυρούμενες επιμολύνσεις μετά την παστερίωση του γάλακτος και κατά την διαδικασία παρασκευής του τυριού (Pini & Gilbert, 1988). Όσο για τα σκληρά τυριά, οι παραπάνω πηγές συμφωνούν πως τα τυριά αυτά υποστηρίζουν την επιβίωση του βακτηρίου, αλλά σπάνια την ανάπτυξη. Τα δεδομένα αυτά πιστοποιεί και ο Πίνακας 15.

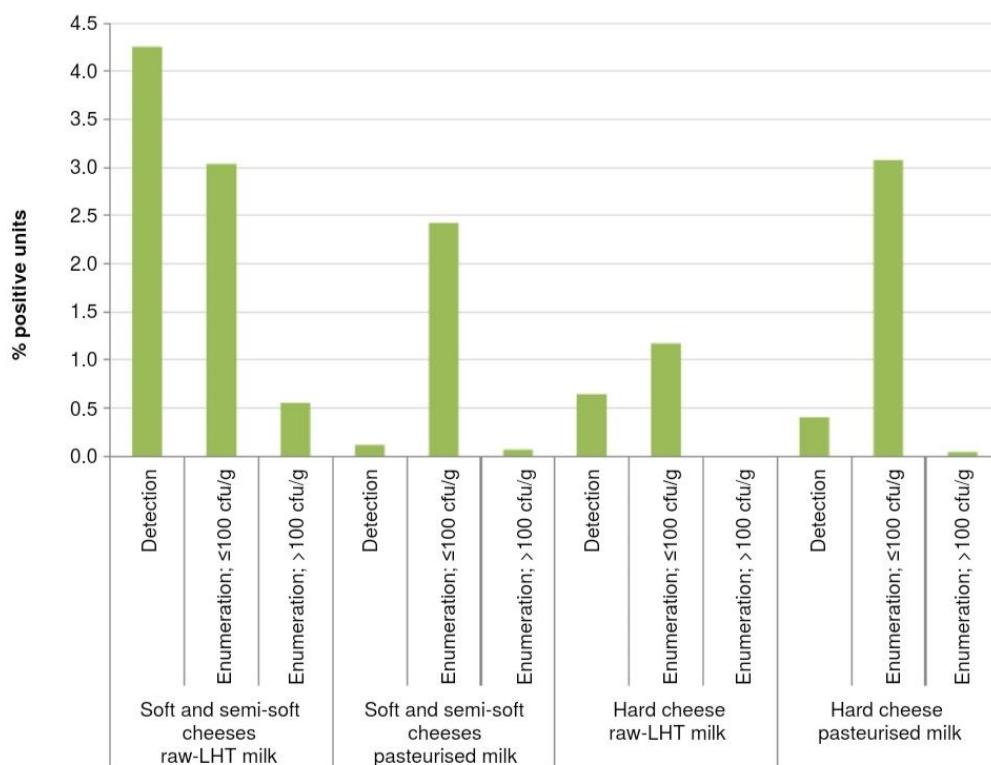
Πίνακας 15: Παρουσία της *L. monocytogenes* σε τυριά διαφορετικών τύπων, διαφορετικής θερμικής επεξεργασίας και διαφορετικού είδους γάλακτος (Πηγή: Rudolf & Scherer, 2000)

Χώρα παραγωγής	Αριθμός δειγμάτων	Θερμική επεξεργασία του γάλακτος							
		Τύπος τυριού			Παστεριωμένο		Τύπος γάλακτος		
		Μαλακό	Ημιμαλακό	Σκληρό	Ωμό	Αγελαδινό	Πρόβειο	Κατσίκισιο	
Αυστρία	10 (1) ^a	4 (1)	4 (-)	2 (-)	2 (-)	8 (1)	9 (1)	- (-)	1 (-)
Δανία	4 (-)	3 (-)	1 (-)	- (-)	4 (-)	- (-)	4 (-)	- (-)	- (-)
Γαλλία	150 (5)	124 (5)	25 (-)	1 (-)	59 (1)	91 (4)	128 (5)	10 (-)	12 (-)
Γερμανία	120 (11)	52 (6)	42 (4)	26 (1)	73 (10)	47 (1)	106 ^b (9)	5 ^b (-)	12 ^b (2)
Ιταλία	23 (4)	5 (-)	14 (3)	4 (1)	17 (2)	6 (2)	21 (3)	2 (1)	- (-)
Σουηδία	22 (-)	4 (-)	6 (-)	12(-)	8 (-)	14 (-)	21 (-)	- (-)	1 (-)

Χώρα παραγωγής	Αριθμός δειγμάτων	Τύπος τυριού			Θερμική επεξεργασία του γάλακτος		Τύπος γάλακτος		
		Μαλακό	Ημιμαλακό	Σκληρό	Παστεριωμένο	Ωμό	Αγλαδινό	Πρόβειο	Κατσικίσιο
Σύνολο	329 (21)	192 (12)	92 (7)	45 (2)	163 (13)	166(8)	289 ^β (18)	17 ^β (1)	26 ^β (2)
% <i>L. monocytogenes</i>	6,4	6,3	7,6	4,4	8,0	4,8	6,2	5,9	7,7

^α Αριθμός των θετικών δειγμάτων στη *L. monocytogenes*

^β Δύο δείγματα τυριών είχαν παραχθεί από παραπάνω από ένα είδος γάλακτος



Σχήμα 8: Αναλογία θετικών δειγμάτων σε *Listeria monocytogenes* από μαλακά και ημιμαλακά τυριά ωμού γάλακτος ή γάλακτος χαμηλής θερμικής επεξεργασίας, 2013. LHT= Γάλα Χαμηλής Θερμικής Επεξεργασίας. Τα αποτελέσματα των δοκιμών που λήφθηκαν από μεθόδους ανίχνευσης και καταμέτρησης παρουσιάζονται ξεχωριστά (Πηγή: EFSA & ECDC, 2015)

Ωστόσο, αναφέρεται σε πιο πρόσφατες μελέτες (Martinez-Rios & Dalgaard, 2018; Panebianco, et al., 2020) πως δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην παρουσία της *L. monocytogenes* ανάμεσα σε τυριά από παστεριωμένο ή από απαστερίωτο γάλα, είτε για τα σκληρά, είτε για τα μαλακά/ημιμαλακά τυριά. Το γεγονός ότι τα τυριά από ωμό γάλα μπορούν να είναι το ίδιο ασφαλή όσο τα τυριά παστεριωμένου γάλακτος, οφείλεται αφενός στην χρήση καλής μικροβιολογικής ποιότητας γάλακτος, μιας και αυτό δεν υφίσταται παστερίωση και αφετέρου στη φυσική ύπαρξη βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria, LAB), που προστατεύουν το τυρί μέσω μείωσης του pH, μέσω παραγωγής ανασταλτικών ενώσεων, των λεγόμενων βακτηριοκινών και μέσω παραγωγής οργανικών οξέων (π.χ. ακετικό οξύ) ενάντια σε ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς. Επίσης, η μικρή διαφορά στα ποσοστά ανίχνευσης του βακτηρίου μεταξύ των τυριών παστεριωμένου και ωμού γάλακτος, οφείλεται και στο γεγονός ότι τα παστεριωμένα τυριά, παρόλο που θεωρούνται ασφαλή εάν εφαρμοστεί στην πρώτη ύλη τους επαρκής παστερίωση HTST (High Temperature Short Time) (Pini & Gilbert, 1988), είναι πολύ πιθανό να επιμολυνθούν κατά τις διαδικασίες που ακολουθούν μετά την παστερίωση, δηλαδή κατά τα στάδια επεξεργασίας ή μέσω διασταυρούμενης επιμόλυνσης από άλλη μολυσμένη πηγή.

2.3.5 Ανάλογα με το σημείο επιμόλυνσής τους

Σύμφωνα με τους Farber & Peterkin (1991), στα μαλακά τυριά η επιμόλυνση από τη *L. monocytogenes* εντοπίζεται περισσότερο στην επιφάνεια του φλοιού από ότι στο εσωτερικό του τυριού. Επίσης, οι Rudolf & Scherer (2001) αναφέρουν πως σε δείγματα τυριών, μετά από ποσοτική μέτρηση του βακτηρίου, έχουν σημειωθεί αριθμοί κυττάρων έως και 400 φορές μεγαλύτεροι στον φλοιό απ' ότι στον πυρήνα του προϊόντος. Αυτό οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στις μεγάλες διακυμάνσεις που δέχεται το pH των τυριών αυτών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Η *L. monocytogenes* φαίνεται μάλιστα να συμβάλλει στην αύξηση του pH των τυριών. Επίσης, η δυνατότητα του βακτηρίου να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, η μεγάλη χρονική διάρκεια που χρειάζονται ορισμένα τυριά για ωρίμανση και η παρατεταμένη και απροσδιόριστη ζωή στο ράφι, τείνουν να αυξάνουν τα κύτταρα του παθογόνου στον φλοιό του τυριού κοντά στο τέλος της εμπορικής του ζωής. Ωστόσο, αντίθετη άποψη εκφέρουν οι Lahou & Uyttendaele (2017), που μετά από έρευνα διαπίστωσαν ότι η κομμένη επιφάνεια δειγμάτων τυριού περιείχε μεγαλύτερα ποσοστά του βακτηρίου απ' ότι ο φλοιός. Παρόλο που η ανάπτυξη του μικροοργανισμού περιορίζεται στην επιφάνεια και μειώνεται οδεύοντας προς το

εσωτερικό, μπορούν να συμβούν μεγαλύτερα ποσοστά επιμόλυνσης στο εσωτερικό του τυριού, λόγω επιμόλυνσης κατά την κοπή. Έτσι, τυριά που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου στον φλοιό τους, είναι τα ωριμασμένα τυριά με επίχρισμα, τα ωριμασμένα τυριά με μούγλα και τα πλυμένα τυριά άλμης.

Το Gooda, γνωστό ολλανδικό ημίσκληρο τυρί, μελετήθηκε από τους Van Bokhorst-Van de Veen, Minor, Zwietering, & Groot (2015) ως προς την δυνατότητα επιμόλυνσής του από την *L. monocytogenes*, με πορεία του βακτηρίου από την άλμη προς τον φλοιό του τυριού κατά την κατεργασία. Βρέθηκε πως, ανάλογα με το χρόνο παραμονής στην άλμη, υπήρξε μείωση του βακτηρίου κατά την διαδικασία αυτή, με το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηρίων να συγκεντρώνεται στην άλμη και όχι στον φλοιό του τυριού. Υπήρξε μάλιστα και σημαντική μείωση του μικροοργανισμού μετά από 12 εβδομάδες ωρίμανσης, κάτι που προστατεύει το τυρί στην περαιτέρω του ζωή στο ράφι.

2.3.6 Ανάλογα με τον χειρισμό κατά την επεξεργασία, ωρίμανση, αποθήκευση και λιανική πώλησή τους

Η επιμόλυνση των τυριών από την *L. monocytogenes* μπορεί να συμβεί σε διάφορα στάδια της παραγωγής τυριών. Έχουν αναφερθεί επιμολύνσεις από πηγές όπως: καλλιέργειες εκκίνησης, αποχετεύσεις, δάπεδα, υλικά συσκευασίας, δοχεία τυριών, ράφια, πανιά τυριών, μαχαίρια κοπής τυροπήγματος, βούρτσες και ψύκτες. Σε τυριά όπως το Gooda, φαίνεται να υπάρχει μια μικρή αύξηση του βακτηρίου κατά τον σχηματισμό του τυροπήγματος, λόγω της απώλεια νερού, η οποία όμως μετατρέπεται σε επερχόμενη μείωση κατά την διάρκεια της ωρίμανσης. Με την πάροδο μάλιστα της ωρίμανσης, τα ποσοστά γίνονται ακόμη πιο μικρά (Van Bokhorst-Van de Veen, Minor, Zwietering, & Groot, 2015).

Ωστόσο, η *L. monocytogenes* έχει τη δυνατότητα να επιβιώνει κατά την παρασκευή και την ωρίμανση άλλων τυριών, με καλύτερη επιβίωση σε τυριά όπως το Camembert και χειρότερη επιβίωση σε τυριά όπως το cottage (Πίνακας 16). Κατά την παρασκευή του τυριού, το βακτήριο συγκεντρώνεται συνήθως στο τυρόπηγμα και ελάχιστα στον ορό του γάλακτος (Ryser, 2002). Έτσι, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού φαίνεται να μειώνεται, αλλά όχι να αναστέλλεται πλήρως από την γαλακτική καλλιέργεια-εκκινητή, που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία παρασκευής του τυριού (Farber & Peterkin, 1991). Επίσης, η επιβίωση και η ανάπτυξη του βακτηρίου εξαρτάται και από τους χρόνους και τη θερμοκρασία ωρίμανσης, καθώς και από τις βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια αυτής (Γαϊτης, 2010).

Πίνακας 16: Επιβίωση ή/και ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε διάφορα είδη τυριών κατά την παρασκευή και την ωρίμανση ή αποθήκευση (Πηγή: Farber & Peterkin, 1991)

Είδος τυριού	Παρασκευή		Ωρίμανση ή αποθήκευση	
	Επιβίωση ^α	Ανάπτυξη ^β	Επιβίωση ^α	Ανάπτυξη ^β
Gouda, Maasdam	+	+	+	-
Μπλε τυρί	+	+	+	-
Cheddar	+	+	±	- ^γ
Brick	+	++ ^δ	+	+
Colby	+	-	±	-
Φέτα	+	++	±	+ ^ε
Camembert	+	++	+	++ ^{στ}
Cottage	+	-	±	-

^α±: μείωση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης

^β -: όχι ανάπτυξη, +: περιορισμένη ανάπτυξη, ++: καλή ανάπτυξη

^γ Κάποια ανάπτυξη του βακτηρίου μπορεί να είχε συμβεί κατά τα αρχικά στάδια ωρίμανσης σε τυρί Cheddar σε pH 5,0 με 5,1

^δ Μόνο μερικά στελέχη του βακτηρίου

^ε Περιορισμένη ανάπτυξη συνέβη μόνο κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων ωρίμανσης με μερικά μόνο στελέχη του βακτηρίου

^{στ} Μετά από 18 μέρες ωρίμανσης

Επίσης, η έκταση της ανάπτυξης των οξέων και η μεταχείριση του τυροπήγματος, σε συνδυασμό με το pH, την αλατοπεριεκτικότητα, την περιεκτικότητα υγρασίας, τον τύπο και την έκταση της ωρίμανσης, είναι οι παράγοντες που θα καθορίσουν την συγκέντρωση της *L. monocytogenes* στο τελικό προϊόν (Ryser, 2002).

Επιπλέον, επιμόλυνση μπορεί να συμβεί και εκτός εργοστασίου, κατά τη διάρκεια παραμονής στον λιανέμπορο ή ακόμα και κατά την αποθήκευσή του από τον καταναλωτή. Μετά από δειγματοληψία και έρευνα των Lahou & Uyttendaele (2017) από καταστήματα λιανικής πώλησης τυριού, γνωστά ως *delicatessen*, βρέθηκε θετικό δείγμα σε *L. monocytogenes* από τυρί ωμού γάλακτος ωριμασμένο με λευκή μούχλα, με το βακτήριο να φτάνει το επίπεδο των 5 log cfu/g τυριού. Τα τυριά πωλούνταν χύμα και στο χαρτί περιτυλίγματος δεν αναφερόταν κάποια από τις γνωστές ενδείξεις «Ανάλωση έως» ή «Ανάλωση κατά προτίμηση πριν από». Πριν την μικροβιολογική τους ανάλυση τα τυριά εξετάστηκαν οπτικά. Παραδόξως, δεν παρατηρήθηκαν αποκλίνουσα οσμή, ίχνη

αφυδάτωσης (ρωγμές στο φλοιό του τυριού) ή άλλα χαρακτηριστικά αλλοίωσης που να έδειχναν ότι το τυρί είναι ακατάλληλο για κατανάλωση, ενώ ο λιανέμπορος ισχυρίστηκε πως το τυρί πωλήθηκε λίγο πριν την προτεινόμενη ημερομηνία ανάλωσης. Εντούτοις, ο καταναλωτής μπορεί να καταναλώσει τέτοιο προϊόν, χωρίς να είναι σε θέση να καταλάβει την παρουσία του βακτηρίου οπτικά ή οσφρητικά. Έτσι, μιας και το τυρί αποτελεί ένα RTE (Ready To Eat) προϊόν και δεν δέχεται θερμική επεξεργασία πριν την κατανάλωσή του, ο καταναλωτής δεν είναι σε θέση να περιορίσει την παρουσία του βακτηρίου με το μαγείρεμα (Todd & Notermans, 2011).

Επιπροσθέτως, κρίσιμη για την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* είναι και η αποθήκευση των τυριών και συγκεκριμένα, η θερμοκρασία συντήρησής τους, είτε από τους λιανέμπορες, είτε από τους καταναλωτές. Μετά από έρευνα σε τυρί μούχλας (pH 6,3, a_w 0,973 και συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0,15%), ο προβλεπόμενος χρόνος για να φτάσει η *L. monocytogenes* την κρίσιμη συγκέντρωση κυττάρων ήταν 11-22 ημέρες στους 4,5°C, αν το τυρί επιμολυνόταν με 1 log cfu/g (υψηλή επιμόλυνση) ή 1 log cfu/125 g (χαμηλή επιμόλυνση). Αυτή η επιμόλυνση μπορεί να προκύψει είτε από τον λιανέμπορο, είτε από τον καταναλωτή κατά τον χειρισμό του τυριού ή μέσω διασταυρούμενης επιμόλυνσης από άλλο προϊόν. Αντίθετα, αν το τυρί αποθηκευόταν σε υψηλότερη θερμοκρασία, π.χ. στους 8°C, τότε ο προβλεπόμενος χρόνος για να φτάσει το βακτήριο την κρίσιμη συγκέντρωση κυττάρων μειώνεται σε 5-10 ημέρες, όταν επιμολυνθεί με υψηλή ή χαμηλή συγκέντρωση των κυττάρων του βακτηρίου. Έτσι, η προτεινόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης για τους καταναλωτές είναι μέχρι 5°C (Martinez-Rios, Gkogka, & Dalgaard, 2020).

2.3.7 Ανάλογα με το περιβάλλον επεξεργασίας τους

Οι Almeida, et al. (2013) μελέτησαν τρία περιβάλλοντα παραγωγής τυριών που έδρευαν στην Πορτογαλία και το ποσοστό επιμόλυνσης των προϊόντων τους από την *L. monocytogenes*. Το πρώτο ήταν μια βιοτεχνία, το δεύτερο μια μικρής κλίμακας βιομηχανία και το τρίτο μία μεγάλη βιομηχανία παραγωγής τυριών. Βρέθηκε ότι το ποσοστό των θετικών δειγμάτων στο βακτήριο ήταν μεγαλύτερο όσο μειωνόταν το περιβάλλον παραγωγής τυριού, επιστώντας την προσοχή για επιμολύνσεις σε βιοτεχνίες και εργοστάσια μικρής κλίμακας. Οι Rudolf & Scherer (2001) αναφέρουν μάλιστα την επικράτηση του βακτηρίου σε περιβάλλοντα επεξεργασίας έως και 7 χρόνια, λόγω της δυνατότητας της *L. monocytogenes* για δημιουργία βιοφίλμ.

2.4 Στατιστικά δεδομένα κρουσμάτων λιστερίωσης από τυριά

Το πρώτο κρούσμα ανθρώπινης λιστερίωσης που έχει αναφερθεί και σχετίζεται με κατανάλωση τυριού, συνέβη στις Η.Π.Α. και συγκεκριμένα στην Καλιφόρνια το 1985 και προκλήθηκε από φρέσκο μεξικάνικο τυρί. Έκτοτε, η *L. monocytogenes* ξεκίνησε να θεωρείται ως ένα σημαντικό παθογόνο που προκαλεί τροφογενείς ασθένειες (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007; Martinez-Rios & Dalgaard, 2018). Το κρούσμα στην Καλιφόρνια από το μολυσμένο μεξικάνικο τυρί, με την ονομασία queso blanco, προκάλεσε 142 περιστατικά μέσα σε 8 μήνες, εκ των οποίων τα 93 περιστατικά αφορούσαν εγκύους γυναίκες, ενώ τα υπόλοιπα 49 ήταν μη έγκυοι ενήλικες. Σημειώθηκαν επίσης 48 θάνατοι (Montville & Matthews, 2010; Martinez-Rios & Dalgaard, 2018). Το κρούσμα προκλήθηκε λόγω ανεπαρκούς παστερίωσης το γάλακτος και ανάμιξης ωμού γάλακτος με παστεριωμένο (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007; Montville & Matthews, 2010), ενώ μετά από ελέγχους βρέθηκε πως το στέλεχος της *L. monocytogenes* που προκάλεσε το κρούσμα, ανήκε στον ορότυπο 4b (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991).

Ένα μαλακό τυρί ήταν υπεύθυνο για άλλο ένα κρούσμα λιστερίωσης στην Ελβετία το 1987. Το κρούσμα συνδέθηκε με την κατανάλωση ενός τοπικού μαλακού τυριού επιχρίσματος, το οποίο προκάλεσε 122 περιστατικά, εκ των οποίων τα 31 ήταν θανατηφόρα (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991; Ferreira, Wiedmann, Teixeira, & Stasiewicz, 2014). Η ταυτοποίηση του παθογόνου στο τυρί αυτό, οδήγησε σε παγκόσμια ανάκληση του, ενώ το κρούσμα διήρκησε 4 έτη (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991; Montville & Matthews, 2010). Μετά από δειγματοληψίες, παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος της *L. monocytogenes* ήταν του οροτύπου 4b και απομονώθηκε τόσο από το τυρί και τους ασθενείς, όσο και από ξύλινα ράφια και βούρτσες των χώρων ωρίμανσης του τυριού στο εργοστάσιο παραγωγής (Ryser, 2002).

Στη Δανία την περίοδο 1989-1990, διαγνώστηκαν 26 περιστατικά λιστερίωσης. Ως όχημα της ασθένειας κατηγορήθηκε ένα μπλε τυρί μούχλας, αν και υπάρχουν πηγές που αναφέρουν και παρουσία του παθογόνου σε σκληρά τυριά την ίδια (Lunden, Tolvanen, & Korkeala, 2004).

Δύο ακόμα μεγάλα κρούσματα λιστερίωσης συνέβησαν στη Γαλλία και συνδέθηκαν με δύο διαφορετικούς τύπους μαλακών τυριών επιχρίσματος. Το 1995, 37 άτομα, εκ των οποίων οι 11 ήταν έγκυες γυναίκες, εμφάνισαν συμπτώματα λιστερίωσης μετά από

κατανάλωση του τυριού Brie de Meaux, το οποίο παρήχθη από ωμό γάλα που περιείχε το παθογόνο. Επίσης, το 1997, 14 περιστατικά λιστερίωσης συνδέθηκαν με την κατανάλωση τυριού Pont l'Éveque από τη Νορμανδία. Το εμπλεκόμενο τυρί ήταν φτιαγμένο από ακατέργαστο γάλα και περιείχε *L. monocytogenes* ορότυπου 4b σε ποσά μεγαλύτερα των 1000 cfu/g. (Ryser, 2002; Lunden, Tolvanen, & Korkeala, 2004).

Το 2006 στη Γερμανία σημειώθηκε κρούσμα λιστερίωσης εξαιτίας ενός τυριού όξινης πήξης, του λεγόμενου Harz. Δείγματα από το μολυσμένο τυρί περιείχαν το παθογόνο σε αριθμούς που έφταναν τις 52.000-120.000 cfu/g. Ακόμη, μαλακό τυρί αναφέρθηκε ως όχημα της *L. monocytogenes* σε κρούσμα της Τσεχίας το ίδιο έτος, όπου σημειώθηκαν 78 περιστατικά, εκ των οποίων τα 13 ήταν θανατηφόρα (Todd & Notermans, 2011).

Το 2007 στη Νορβηγία εμφανίστηκε επίσης κρούσμα από την *L. monocytogenes* εξαιτίας της κατανάλωσης μαλακού τυριού Camembert. Βρέθηκαν πολύ υψηλά ποσοστά του παθογόνου τόσο στο τυρί, όσο και στις εγκαταστάσεις παραγωγής του (Todd & Notermans, 2011).

Δύο μεγάλα κρούσματα σημειώθηκαν και στον Καναδά το 2008. Το ένα συνδέθηκε με μαλακό τυρί από ακατέργαστο γάλα, που παρήχθη σε μικρή βιοτεχνία. Ωστόσο, ενεπλάκησαν και άλλα τυριά, καθώς το παθογόνο απομονώθηκε και από το λιανικό εμπόριο σε καταστήματα πώλησης, είτε από μολυσμένο τυρί, είτε από τον εξοπλισμό επεξεργασίας του (Todd & Notermans, 2011).

Από το 2009 έως το 2012, εμφανίστηκε κρούσμα στην Πορτογαλία που συνδεόταν με 30 περιστατικά λιστερίωσης, συμπεριλαμβανομένων 11 θανάτων. Συνδέθηκε με την κατανάλωση φρέσκων τυριών (ωριμασμένων τυριών και queijo fresco). Επιπλέον, το 2012 στην Αμερική, μολυσμένο ιταλικό τυρί με το όνομα ricotta salata προκάλεσε 22 νοσηλείες σε νοσοκομείο και 4 θανάτους (Martinez-Rios & Dalgaard, 2018).

Ωστόσο, αν και τα παραπάνω κρούσματα αναφέρονται σε επεμβατική λιστερίωση, έχουν σημειωθεί κατά και καιρούς και περιστατικά εμπύρετης γαστρεντερίτιδας. Συγκεκριμένα, το 2001 στη Σουηδία, 48 άνθρωποι υπέφεραν από εμπύρετη γαστρεντερίτιδα μετά από κατανάλωση ενός φρέσκου τυριού από ωμό γάλα που παρασκευαζόταν στο αγρόκτημα (Lunden, Tolvanen, & Korkeala, 2004). Το ίδιο έτος στην Ιαπωνία, προέκυψε κρούσμα εμπύρετης γαστρεντερίτιδας λόγω κατανάλωσης ενός τυριού επιχρίσματος (Makino, et al., 2005). Και τα δύο τυριά περιείχαν *L. monocytogenes* ορότυπου 1/2 (Martinez-Rios & Dalgaard, 2018).

Τα προαναφερθέντα κρούσματα λιστερίωσης, καθώς και μερικά άλλα, αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 17 για την περίοδο 1983-2017.

Πίνακας 17: Κρούσματα λιστερίωσης που προκλήθηκαν από τυρί κατά την περίοδο 1983-2017

Τοποθεσία	Έτος	Ορότυπος	Αριθμός ^α περιστατικών (θάνατοι)	Εμπλεκόμενο τρόφιμο	Πηγή αναφοράς
Η.Π.Α. (Καλιφόρνια)	1985	4b	142 (48)	Φρέσκο τυρί (Queso Fresco)	Swaminathan & Gerner-Smidt (2007)
Ελβετία	1983-1987	4b	122 (31)	Τυρί με επίχρισμα (Vacherin Mont d'Or)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Λουξεμβούργο	1989	ΔΑ ^β	2 (0)	Τυρί με επίχρισμα (Camembert)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Δανία	1989-1990	4b	26 (7)	Μπλε τυρί μούγλας	Swaminathan & Gerner-Smidt (2007)
Γαλλία	1995	4b	37 (11)	Τυρί με επίχρισμα (Brie de Meaux)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Γαλλία	1997	4b	14 (? ^γ)	Τυρί με επίχρισμα (Pont l'Eveque)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Η.Π.Α.	2000	4b	13 (5)	Μη εμπορικό φρέσκο τυρί (Queso Fresco)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Σουηδία	2001	1/2a	≥120 (0)	Φρέσκο τυρί	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)

Τοποθεσία	Έτος	Ορότυπος	Αριθμός ^α περιστατικών (θάνατοι)	Εμπλεκόμενο τρόφιμο	Πηγή αναφοράς
Ιαπωνία	2001	1/2b	38 (0)	Τυρί με επίχρισμα	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Καναδάς	2002	4b	47 (0)	Μαλακό και ημιμαλακό τυρί	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Καναδάς	2002	4b	86 (0)	Τυρί παστεριωμένου γάλακτος	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Ελβετία	2005	1/2a	10 (3+2 ^δ)	Τυρί με επίχρισμα (Μαλακό «Tomme»)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Η.Π.Α.	2005	ΔΑ ^β	9 (? ^γ)	Φρέσκο τυρί (Queso Fresco)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Τσεχία	2006	ΔΑ ^β	78 (13)	Μαλακό τυρί	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Γερμανία	2006-2007	4b	189 (26)	Τυρί όξινης πήξης	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Νορβηγία	2007	ΔΑ ^β	17 (3)	Τυρί με επίχρισμα (Camembert)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Χιλή	2008	ΔΑ ^β	91 (5)	Τυρί με επίχρισμα (Brie)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)

Τοποθεσία	Έτος	Ορότυπος	Αριθμός ^α περιστατικών (θάνατοι)	Εμπλεκόμενο τρόφιμο	Πηγή αναφοράς
Καναδάς	2008	ΔΑ ^β	38 (5)	Τυριά	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Η.Π.Α.	2008	1/2a	8 (0)	Φρέσκο τυρί (Oaxaca)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Αυστρία-Γερμανία-Τσεχία	2009-2010	1/2a	34 (8)	Φρέσκο τυρί (Quargel)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Πορτογαλία	2009-2012	4b	30 (11)	Φρέσκο τυρί (ωριμασμένο και queijo fresco)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Η.Π.Α.	2010	ΔΑ ^β	5 (0)	Φρέσκο τυρί (Panela, queso fresco, Requeson)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Η.Π.Α.	2010-2015	ΔΑ ^β	28 (3)	Φρέσκα τυριά	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Η.Π.Α.	2011	ΔΑ ^β	2 (? ^γ)	Φρέσκο τυρί (Chives)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Αυστρία-Γερμανία	2011-2013	1/2b	7 (? ^γ)	Φρέσκο τυρί	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Ισπανία	2012	1/2a	2 (0)	Φρέσκο τυρί (Queso fresco)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)

Τοποθεσία	Έτος	Ορότυπος	Αριθμός ^α περιστατικών (θάνατοι)	Εμπλεκόμενο τρόφιμο	Πηγή αναφοράς
Η.Π.Α.	2012	ΔΑ ^β	22 (4)	Τυρί άλμης (Ricotta salata)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Η.Π.Α.	2013	ΔΑ ^β	5 (1)	Τυρί με επίχρισμα (Les Feres)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Αυστραλία	2013	ΔΑ ^β	18 (? ^γ)	Τυρί με επίχρισμα	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Η.Π.Α.	2013-2014	ΔΑ ^β	4 (1)	Φρέσκο τυρί	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Η.Π.Α.	2014	ΔΑ ^β	7 (1)	Φρέσκο τυρί	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Η.Π.Α.	2015	ΔΑ ^β	3 (1)	Φρέσκο τυρί (Panela, queso fresco, Requeson, Cotija)	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)
Η.Π.Α.	2017	ΔΑ ^β	8 (2)	Τυρί με επίχρισμα	Martinez-Rios & Dalgaard (2018)

^αΑριθμός περιστατικών λιστερίωσης

^βΟ ορότυπος δεν αναφέρεται (ΔΑ)

^γΜη συγκεκριμένοι θάνατοι

^δΘάνατος από σηπτική άμβλωση

Παρατηρούμε, λοιπόν, πως στην Αμερική από το 2006 και έπειτα, εμφανίζεται μία αύξηση στις λιστερίώσεις που συνδέονται με τυριά (Jackson, Gould, Hunter, Kucero, & Jackson, 2018), το ίδιο και στην Ευρώπη, όπου την περίοδο 2009-2011 το τυρί (και

περισσότερο το μαλακό τυρί) αποτελεί το βασικό όχημα για μετάδοση λιστεριώσεων στον άνθρωπο (Van Bokhorst-Van de Veen, Minor, Zwietering, & Groot, 2015).

Με τα παραπάνω, όσον αφορά την Ευρώπη, συμφωνούν και τα στατιστικά δεδομένα της EFSA για την περίοδο 2008-2015, όπου εκ των τεσσάρων κρουσμάτων που σημειώθηκαν στην κατηγορία των γαλακτοκομικών προϊόντων, και τα τέσσερα αφορούσαν τυριά (τοπικά παραγόμενα μαλακά τυριά, τυριά όξινης πήξης, είτε από παστεριωμένο, είτε από ωμό γάλα). Τα τρία περιστατικά ήταν του ορότυπου 1/2a και το τέταρτο του ορότυπου 1/2b. Ο τύπος έκθεσης στην *Listeria monocytogenes* αφορούσε στο μεγαλύτερο ποσοστό τα νοικοκυριά, ενώ τύπος προέλευσης του βακτηρίου ήταν τα εργοστάσια επεξεργασίας και οι χώροι του λιανικού εμπορίου. Σημειώθηκαν 44 ανθρώπινα περιστατικά λοιμώξεων, εκ των οποίων τα 42 άτομα υπέστησαν νοσηλεία, ενώ καταγράφηκαν και 11 θάνατοι. Οι εμπλεκόμενες χώρες ήταν η Γερμανία και η Αυστρία το 2009 και το Βέλγιο το 2011 και το 2013 (EFSA, 2018).

2.5 Νομοθεσία και όρια ανοχής για την *Listeria monocytogenes* στα τυριά

Τα τυριά, σύμφωνα με τους Van Bokhorst-Van de Veen, Minor, Zwietering, & Groot (2015), εντάσσονται στα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα (Ready To Eat - RTE), που δεν υποστηρίζουν περαιτέρω επεξεργασία από τον καταναλωτή για μείωση των παθογόνων πριν από την κατανάλωση. Επομένως, οφείλουν να συμμορφώνονται με τους κανονισμούς που αναφέρονται στα RTE προϊόντα.

Επειδή η ελάχιστη μολυσματική δόση για λοίμωξη από την *Listeria monocytogenes* είναι άγνωστη, αλλά φαίνεται να είναι σχετικά μεγάλη για τον μέσο καταναλωτή, οι ρυθμιστές ήταν σε δίλημμα για το αν πρέπει να εφαρμόσουν πολύ σκληρά όρια ανοχής ή να επιτρέψουν μικρή παρουσία του, μιας και η *Listeria monocytogenes* είναι αδύνατον να αποκλειστεί εντελώς. Έτσι, αναπτύχθηκαν διαφορετικές πολιτικές ανοχής για κάθε χώρα, ανάλογα με το είδος του προϊόντος (Todd & Notermans, 2011).

Όσον αφορά την Ευρώπη και σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 2073/2005, για τρόφιμα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια ζωής τους, είναι επιτρεπτή η παρουσία του βακτηρίου μέχρι και 100 cfu/g (στα 25g δείγματος) στα σημεία πώλησης και καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους, ενώ όταν το τρόφιμο φεύγει από τον παραγωγό πρέπει να έχει απουσία του βακτηρίου στα 25g. Σε τρόφιμα που δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*, τα όρια ανοχής του βακτηρίου είναι έως 100 cfu/g (στα 25g δείγματος) στα σημεία πώλησης και

καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους. Ωστόσο, σε παιδικές τροφές επιβάλλεται απουσία του βακτηρίου στα 25g δείγματος στα σημεία πώλησης και καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους (μηδενική ανοχή) (Τυμπής, Πετράκης, & Κοντελές, 2016). Τα παραπάνω φαίνονται και στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18: Κριτήρια ασφάλειας για τα τρόφιμα έναντι της *Listeria monocytogenes* (Πηγή: ΕΚ 2073/2005)

Κατηγορία τροφίμων	Πλάνο				Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
	δειγματοληψία ^α		Όρια ^β		
	n	c	m	M	
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	10	0	Απουσία σε 25g		Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> , διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	5	0	100 cfu/g ^γ		Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> , διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	5	0	Απουσία σε 25g ^δ		Πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπευθύνου της επιχείρησης τροφίμων που το παρήγαγε
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> , διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	5	0	100 cfu/g		Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

^α n=αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα, c=αριθμός μονάδων δειγματοληψίας με τιμές μεγαλύτερες του m ή μεταξύ m και M

^β m=άνωτατη αποδεκτή συγκέντρωση, κάτω από συνθήκες Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής, M=συγκέντρωση μικροοργανισμού πάνω από την οποία το προϊόν είναι μη αποδεκτό

^γ Αυτό το κριτήριο εφαρμόζεται εάν ο παρασκευαστής μπορεί να αποδείξει, ικανοποιώντας την αρμόδια αρχή, ότι το προϊόν δεν θα υπερβεί το όριο των 100 cfu/g καθ' όλη τη διάρκεια

διατήρησης. Ο υπεύθυνος της επιχείρησης τροφίμων μπορεί να ορίσει ενδιάμεσα όρια κατά τη διάρκεια της διαδικασίας τα οποία πρέπει να είναι αρκετά χαμηλά, ώστε να εξασφαλίζεται ότι δεν υπερβαίνεται το όριο των 100 cfu/g κατά τη λήξη της διάρκειας διατήρησης

^δ Το κριτήριο αυτό εφαρμόζεται για τα προϊόντα πριν αποδεσμευτούν από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης τροφίμων που τα παρήγαγε, όταν δεν μπορεί να αποδείξει, ικανοποιώντας την αρμόδια αρχή, ότι το προϊόν δεν θα υπερβαίνει το όριο των 100 cfu/g καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησης

Σε αναφορά του Γαϊτή (2010) για τα ευρωπαϊκά μικροβιολογικά κριτήρια σύμφωνα με τον Κανονισμό 2073/2005 που αφορούν διαφορετικά είδη τυριών, λέγεται ότι για τυριά φρέσκα (μη ωριμασμένα) από παστεριωμένο γάλα ή ορό γάλακτος, για τυριά από γάλα που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία ηπιότερη της παστερίωσης, για ωριμασμένα τυριά από γάλα ή ορό γάλακτος που έχουν υποστεί παστερίωση ή ισχυρότερη θερμική επεξεργασία και για τυριά από ωμό γάλα, επιβάλλονται τα εξής: (α) απουσία της *Listeria monocytogenes* στα 25g δείγματος, πριν από την αποδέσμευση του τυριού από την παραγωγική μονάδα και (β) παρουσία μέχρι και 100 cfu/g, για προϊόντα που διατίθενται στο εμπόριο και για τον χρόνο ζωής τους.

Αντίθετα, η Αμερική έχει αναπτύξει την πιο αυστηρή τακτική της «μηδενικής ανοχής» στην παρουσία της *Listeria monocytogenes* στα τυριά και γενικότερα στα RTE προϊόντα. Από το 1985 μέχρι το 2002, έχουν δημοσιευτεί πάνω από 100 ανακλήσεις γαλακτοκομικών προϊόντων, που αφορούν κυρίως τυριά, κάτι που επιφέρει μεγάλη οικονομική απώλεια στις επιχειρήσεις γαλακτοκομικών προϊόντων (Ryser, 2002; Lepe, 2020).

Ωστόσο, οι κυβερνητικές αρχές τροφίμων Αυστραλίας-Νέας Ζηλανδίας (Australia New Zealand Food Authority, ANZFA) ακολουθούν διαφορετική πολιτική ανοχής ανάλογα με το είδος του τροφίμου και το αν αυτό υποστηρίζει την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*. Για τρόφιμα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του βακτηρίου έχουν επιβάλλει απουσία του από αυτά, ενώ για τρόφιμα που δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου επιτρέπουν παρουσία του βακτηρίου έως και 100 cfu/g σε ένα εκ των πέντε ληφθέντων δειγμάτων, με το βακτήριο να μην ανιχνεύεται στα υπόλοιπα τέσσερα δείγματα (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

Βέβαια, υπάρχουν και χώρες, κυρίως αναπτυσσόμενες, στις οποίες δεν υπάρχουν εθνικά συστήματα επιτήρησης για λιστεριώσεις, με αποτέλεσμα σπάνια να αναφέρονται περιστατικά λιστερίωσης. Θεωρείται, λανθασμένα, πως λόγω των παραδοσιακών συνθηκών αποθήκευσης και παρασκευής των τροφίμων, αποκλείεται η ανάπτυξη του βακτηρίου στα προϊόντα. Για παράδειγμα, σε μέρη της Μέσης Ανατολής, όπως το

Ντουμπάι, αν και υπάρχει ποικιλία προϊόντων και ιδιαίτερα τυριών που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου, τα προϊόντα αυτά δεν ελέγχονται για παρουσία της *Listeria monocytogenes*, καθώς τα μικροβιολογικά κριτήρια των Ηνωμένων Αραβικών Εμιράτων δεν έχουν θέσει κάποιο όριο για τον μικροοργανισμό αυτό (Todd & Notermans, 2011). Το ίδιο συμβαίνει και στον Λίβανο, όπου τα παραδοσιακά τους τυριά θεωρείται πως δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη του βακτηρίου, σύμφωνα με το Libnor (Lebanese Standard Institution) (Harakeh, et al., 2009). Στην Ινδία και την Αφρική, επίσης δεν υπάρχει έλεγχος για λιστεριώσεις, παρόλο που τα κρύα φαγητά είναι αρκετά διαδομένα και τα συστήματα ψύξης που διαθέτουν οι καταναλωτές είναι ελλιπή, γεγονός που ενισχύει τα ποσοστά επιμόλυνσης (Todd & Notermans, 2011). Επίσης, ούτε η Ιαπωνία έχει δημιουργήσει κάποιο σύστημα επιτήρησης έναντι των λοιμώξεων από την *Listeria monocytogenes* (Baba, et al., 2020), παρόλο που το 2001 είχε σημειωθεί κρούσμα από τυρί επιχρίσματος με 38 περιστατικά (Martinez-Rios & Dalgaard, 2018).

2.6 Τρόποι αποφυγής της *Listeria monocytogenes*

2.6.1. Προληπτικά μέτρα στο περιβάλλον παραγωγής

Δεν είναι ρεαλιστικό να περιμένουμε πλήρη απουσία της *Listeria monocytogenes* από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων, καθώς το παθογόνο βρίσκεται σχεδόν παντού στο περιβάλλον και είναι πολύ εύκολο να επανεισαχθεί στις εγκαταστάσεις. Ωστόσο, αυτό που μπορεί να γίνει, είναι να θεσπιστούν οργανωμένα προγράμματα ελέγχου και αποφυγής του βακτηρίου σε όλη την αλυσίδα τροφίμων και όχι μόνο κατά την επεξεργασία τους (Farber & Peterkin, 1991; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

Η βιομηχανία τροφίμων έχει εισαγάγει προληπτικά προγράμματα, όπως το HACCP (Hazard Analysis at Critical Control Points), σε συνδυασμό με τα GHP (Good Hygiene Practices) και GMP (Good Manufacturing Practices), που αφορούν τη μικροβιολογική ασφάλεια όπως αυτή περιγράφεται στον Ευρωπαϊκό Κανονισμό και την υγιεινή της επεξεργασίας των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος και των προϊόντων του, όπως το τυρί. Συγκεκριμένα, το πρόγραμμα αυτό εντοπίζει τα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου (Critical Control Points), ή αλλιώς CCPs, κάθε βιομηχανίας τροφίμων, τα οποία όσον αφορά τα τυριά, αναφέρονται στην προσωπική υγιεινή και εκπαίδευση του προσωπικού και στις στρατηγικές καθαρισμού και απολύμανσης του εργοστασιακού περιβάλλοντος (Van Bokhorst-Van de Veen, Minor, Zwietering, & Groot, 2015).

Συγκεκριμένα, ο έλεγχος της *Listeria* θα πρέπει να ξεκινά από επίπεδο αγροκτήματος, με προσοχή στις καλές πρακτικές κτηνοτροφίας, όπως η χρήση υψηλής ποιότητας ζωοτροφών, υγιεινές πρακτικές αρμέγματος και κατάλληλη ψύξη για την χύδη αποθήκευση του γάλακτος σε δεξαμενές, με σκοπό την παραλαβή καλής πρώτης ύλης για την παρασκευή τυριού (Ryser, 2002). Εν συνεχεία, η σωστή παστερίωση του ωμού γάλακτος (Παστερίωση HTST: 71,7°C για 15 sec, ή UHT: 135-150°C για 2-20 sec) για τυριά παστεριωμένου γάλακτος ή το θέρμισμα του ωμού γάλακτος (64,5°C για 16sec) σε συνδυασμό με την ωρίμανση πολλών ημερών για τυριά ωμού γάλακτος (Chon, et al., 2020), προσφέρουν ασφαλή αποτελέσματα στην εξάλειψη της *Listeria monocytogenes*. Το εκάστοτε τυρί, όμως, είναι δυνατόν να μολυνθεί μετά την θερμική επεξεργασία. Σε αυτήν την περίπτωση πρέπει το εργοστάσιο να επιμελείται του καθαρισμού του εξοπλισμού μετά την επεξεργασία των τυριών, όπως τις μηχανές συσκευασίας και τους μεταφορείς, ο οποίος καθαρισμός θα είναι ειδικός για κάθε ζώνη επεξεργασίας, ενώ η τακτική αποσυναρμολόγηση των μηχανημάτων αποτελεί καλή τακτική (Lunden, Tolvanen, & Korkeala, 2004). Θα πρέπει να γίνει εντοπισμός των μεμονωμένων «θέσεων» της εγκατάστασης, στις οποίες ο μικροοργανισμός παραμένει για περισσότερο χρονικό διάστημα και δημιουργεί βιοφίλμ, με σκοπό την εφαρμογή αποτελεσματικού καθαρισμού/απολύμανσης των συγκεκριμένων χώρων (Almeida, et al., 2013). Παρόλα αυτά, οι παραπάνω παράγοντες είναι δυστυχώς πιο δύσκολο να ελεγχθούν για μικρής κλίμακας εργοστάσια τυριών και για διαδικασίες παραγωγής που δεν εκτελούνται σε καθημερινή βάση (Van Bokhorst-Van de Veen, Minor, Zwietering, & Groot, 2015). Επιπλέον, ο έλεγχος αποφυγής της *Listeria* πρέπει να συνεχίζεται και στο λιανικό εμπόριο όπου πωλούνται τα τυριά, με στόχο αυτά να διατηρούνται στους ψυκτικούς θαλάμους σε όσο το δυνατόν χαμηλότερη θερμοκρασία, καθώς και να τηρούνται τα μέτρα υγιεινής και η καθημερινή καθαριότητα των χώρων και να γίνονται βακτηριολογικοί έλεγχοι. Τέλος, την ίδια προσοχή πρέπει να δείξουν και οι καταναλωτές κατά την αποθήκευση των τυριών, όσον αφορά τη θερμοκρασία αποθήκευσής τους στα ψυγεία, αλλά και την καθαριότητα των χώρων και του εξοπλισμού που χρησιμοποιούν, για αποφυγή οποιασδήποτε διασταυρούμενης επιμόλυνσης (Farber & Peterkin, 1991; Filiouis, Johansson, Frey, & Perreten, 2009).

Συνοπτικά, οι Swaminathan & Gerner-Smidt (2007) προτείνουν ένα πρόγραμμα ελέγχου έναντι της *Listeria* που βοηθά στην έγκαιρη ανίχνευση της εστίας του βακτηρίου και στην αποτελεσματική παρέμβαση της βιομηχανίας για την αποφυγή μολύνσεων. Αποτελείται

από έξι βήματα: (α) πρόληψη και αποφυγή της εγκατάστασης και ανάπτυξης του παθογόνου σε περιοχές ή «επικίνδυνα σημεία» της παραγωγής που μπορεί να οδηγήσει στη μόλυνση των τυριών, (β) εφαρμογή προγράμματος δειγματοληψίας για να αξιολογηθεί η αξιοπιστία και η επιτυχία του προγράμματος ελέγχου, (γ) ταχεία και αποτελεσματική απόκριση με ανακλήσεις προϊόντων, όταν το πρόγραμμα δειγματοληψίας φέρει θετικά αποτελέσματα σε δείγματα για την *Listeria*, (δ) επαλήθευση με δειγματοληψία παρακολούθησης για να διασφαλιστεί ότι έχει εντοπιστεί η πηγή και έχει διορθωθεί το πρόβλημα, (ε) βραχυπρόθεσμη αξιολόγηση των τελευταίων 4-8 δειγμάτων για τη διευκόλυνση της έγκαιρης ανίχνευσης προβλημάτων, (στ) μακροπρόθεσμη αξιολόγηση σε κατάλληλα διαστήματα (τριμηνιαία, ετήσια, κλπ.) για να εντοπιστούν διεσπαρμένα συμβάντα μόλυνσης και να μετρηθεί η συνολική πρόοδος προς τη συνεχή βελτίωση.

2.6.2. Νέες τεχνολογίες

Οι Bernini, et al. (2016) αναφέρουν στα πλαίσια καλής υγιεινής πρακτικής, την εφαρμογή νέων τεχνολογιών ως τεχνικών μετεπεξεργασίας, όπως υψηλές πιέσεις και ακτινοβολία υπέρυθρου (IR technologies), που θα βοηθήσουν στην αποφυγή της *L. monocytogenes*. Οι τεχνολογίες αυτές προλαμβάνουν την εκ των υστέρων επιμόλυνση των τυριών και ιδιαίτερα της επιφάνειας αυτών, καθώς με την εφαρμογή υψηλής πίεσης ή την εφαρμογή υπέρυθρης ακτινοβολίας, το βακτήριο θανατώνεται εάν βρίσκεται στην επιφάνεια του τυριού. Ωστόσο, οι τεχνικές αυτές, ως τρόποι αποφυγής του παθογόνου, βρίσκονται ακόμα υπό συζήτηση.

2.6.3. Ενημέρωση καταναλωτών

Βασικός παράγοντας για την αποφυγή των λιστεριώσεων είναι η ενημέρωση των καταναλωτών. Για τη σωστή συντήρηση και αποθήκευση των τυριών σε οικιακό επίπεδο μέχρι την κατανάλωσή τους, οι καταναλωτές οφείλουν να τηρούν ορισμένα μέτρα, όπως: (α) μελέτη και τήρηση των ενδείξεων «διατήρηση στο ψυγείο» και «ανάλωση μέχρι» που αναγράφονται στην ετικέτα του προϊόντος, (β) διατήρηση των τυριών σε χαμηλές θερμοκρασίες (μέχρι 4,5°C) και όχι διατήρησή τους σε θερμοκρασίες δωματίου για περισσότερο από δύο ώρες, (γ) πλύσιμο μαχαιριών και επιφανειών επαφής με τυριά μετά τον χειρισμό τους, (δ) ψύξη μικρών ποσοτήτων τυριών για γρήγορη και ομοιόμορφη ψύξη (Martin & Fisher, 1999).

Επίσης, πρέπει να γίνει ιδιαίτερη μνεία για την ενημέρωση των ευαίσθητων ομάδων ατόμων, όπως οι έγκυες γυναίκες, οι ηλικιωμένοι και οι ανοσοκατεσταλμένοι. Προτείνεται: (α) αποφυγή κατανάλωσης μαλακών τυριών, όπως: τυριά μεξικάνικου τύπου, Φέτας, Brie, Camembert και μπλε τυριών, (β) αν τα μαλακά τυριά καταναλωθούν κατά την εγκυμοσύνη, να μαγειρευτούν μέχρι βρασμού, (γ) αποφυγή κατανάλωσης σκληρών τυριών από ακατέργαστο γάλα, προτίμηση σκληρών τυριών παστεριωμένου γάλακτος και μάλιστα μακράς ωρίμανσης (το λιγότερο 60 ημερών) (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991; Martin & Fisher, 1999). Μαλακά τυριά από παστεριωμένο γάλα, συμπεριλαμβανομένων των: εμπορικό τυρί cottage, τυρί κρέμα και επεξεργασμένη Mozzarella, θεωρούνται εν γένει ασφαλή (Jackson, Gould, Hunter, Kucero, & Jackson, 2018).

2.6.4. Αντιμικροβιακά

Ένας τρόπος αποφυγής της *Listeria monocytogenes*, είναι τα αντιμικροβιακά που μπορούν να προστεθούν κατά την παρασκευή των τυριών. Αυτά μπορεί να είναι φυσικά ή χημικά αντιμικροβιακά.

Συχνά αναφερόμενες για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες είναι οι βακτηριοσίνες, εκ των οποίων η νισίνη φαίνεται να εμφανίζει καλή δράση έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων και ειδικά της *Listeria monocytogenes*. Η νισίνη παράγεται από συγκεκριμένα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων και είναι εμπορικά διαθέσιμη. Η χρήση της επιτρέπεται για συγκεκριμένες εφαρμογές στα τρόφιμα, ενώ έχει απαγορευτεί η χρήση της στον Καναδά (Ramsaran, Chen, Brunke, Hill, & Griffiths, 1998). Έρευνες μάλιστα των ίδιων έδειξαν ότι η προσθήκη νισίνης κατά την παραγωγή Φέτας παίζει σημαντικό ρόλο στην παρεμπόδιση της δράσης του βακτηρίου. Η *Listeria monocytogenes* μειώθηκε έως και έναν λογαριθμικό κύκλο τόσο στην άλμη, όσο και στο τυρί, σε σύγκριση με την Φέτα ωμού ή παστεριωμένου γάλακτος χωρίς νισίνη. Η βακτηριοκτόνος δράση της νισίνης φαίνεται να αυξάνεται με την προσθήκη άλατος στην Φέτα και με την μικρή πτώση του pH, που βρίσκεται κοντά στο 5,5. Ωστόσο, οι Ramsaran, Chen, Brunke, Hill, & Griffiths (1998) παρατήρησαν πως στο Camembert η προσθήκη της νισίνης δεν είχε τα ίδια αποτελέσματα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο συνδυασμό της θερμοκρασίας αποθήκευσης, στην περιεκτικότητα άλατος και στο χαμηλό pH του Camembert.

Υπάρχουν βέβαια και βακτηριοσίνες φυσικής προέλευσης, όπως αυτές που παράγουν τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria – LAB), τα οποία υπάρχουν ως

φυσική χλωρίδα στο ακατέργαστο γάλα και επομένως και στα τυριά που παράγονται από ακατέργαστο γάλα. Τα LAB δρουν ως ανταγωνιστές έναντι της *Listeria*, μειώνοντας ελάχιστα το pH και παράγοντας χαμηλά επίπεδα οργανικών οξέων, καθώς και ικανοποιητικές ποσότητες βακτηριοσινών. Οι βακτηριοσίνες αυτές παράγονται από τα στελέχη *Lb. plantarum* και *Lb. sakei*, τα οποία δρουν κατά της *Listeria monocytogenes*, με αποτέλεσμα κατά την αποθήκευση του των τυριών να παρατηρείται αναστολή της δράσης του παθογόνου (Panebianco, et al., 2020).

Καλή προστασία ενάντια της *Listeria monocytogenes* φαίνεται να προσφέρει και η προσθήκη φωσφορικών στα τυριά και συγκεκριμένα στα αλειφόμενα (spreadable processed cheeses). Έρευνα των Martinez-Rios, Jorgensen, Koukou, & Gkogka (2019) έδειξε ότι η αύξηση των συγκεντρώσεων των φωσφορικών αλάτων μειώνει την ανάπτυξη του παθογόνου. Σε αναφορά των ίδιων, ένα επεξεργασμένο τυρί με pH 6,3, a_w 0,972 και συγκεντρώσεις οργανικών οξέων σε υδατική φάση: 0,8% γαλακτικό οξύ, 0,1% οξικό οξύ, 0,3% κιτρικό οξύ και 2,0% ορθοφωσφορικό, ο προβλεπόμενος χρόνος για να φτάσει η *Listeria monocytogenes* την κρίσιμη συγκέντρωση των 100 cfu/g ήταν 4-8 ημέρες, εάν το προϊόν είχε μολυνθεί με 1-10 cfu/g από χειρισμούς του καταναλωτή (άνοιγμα συσκευασίας και αποθήκευση στους 8°C). Αντικαθιστώντας, όμως, το ορθοφωσφορικό με 2,0% τριφωσφορικό, το αναδιαμορφωμένο προϊόν τυριού χρειάζεται 13-17 ημέρες για να φτάσει την ίδια κρίσιμη συγκέντρωση της *Listeria monocytogenes* στους 8°C.

Καλά φυσικά αντιμικροβιακά για το τυρί αποτελούν και τα βότανα, τα μπαχαρικά και τα διάφορα πρόσθετα, που συμπεριλαμβάνονται στην παρασκευή ορισμένων προϊόντων. Από έρευνες των Harakeh, et al. (2009) σε λιβανέζικα τυριά, όπως το Shankleesh, παρατηρείται πως η ύπαρξη θυμαριού στο προϊόν επέφερε μικρότερο ποσοστό επιμόλυνσης από το παθογόνο. Το ίδιο συνέβη και με την αποθήκευση του τυριού σε ελαιόλαδο, το οποίο προσέφερε αναερόβιες συνθήκες. Αντίθετα, άλλες πηγές (Van Bokhorst-Van de Veen, Minor, Zwietering, & Groot, 2015) αναφέρουν πως βότανα και μπαχαρικά όπως το κύμινο, η τριγωνέλλα και το μαύρο πιπέρι, μπορούν να αποτελέσουν μικροβιακό κίνδυνο για το τυρί. Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί κρούσματα που να σχετίζονται με μπαχαρικά λόγω της *Listeria monocytogenes*.

Καινοτόμο προσέγγιση αποτελεί και το έλαιο μορίνγκας, ή κοινώς moringa oil, ως φυσικός αντιβακτηριδιακός παράγοντας και κατατάσσεται στα αιθέρια έλαια. Το έλαιο μορίνγκας εξάγεται από το φυτό *Moringa oleifera* και αναγνωρίζεται ως βρώσιμο από το

Υπουργείο Υγείας της Κίνας. Είναι ασφαλές, υψηλής απόδοσης, μη τοξικό και φυσικό αντιμικροβιακό, που αντικαθιστά τα χημικά συντηρητικά και αποτελείται κυρίως από παλμιτικό, στεατικό και ελαϊκό οξύ. Αποτελεί οικονομική λύση για αποφυγή της *Listeria monocytogenes* από τα τυριά, ενώ μετά από έρευνες σε Mozzarella, Cheddar, Camembert και Παρμεζάνα φαίνεται πως δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στο χρώμα, την υφή, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τα θρεπτικά συστατικά του τυριού (Cui, Li, Li, Abdel-Samie, & Lin, 2020).

2.6.5. Θεραπεία

Σε περίπτωση που κάποιο άτομο μολυνθεί από τη *Listeria monocytogenes* έχουν αναφερθεί αρκετά αντιβιοτικά για τη θεραπεία της λιστερίωσης. Αυτά είναι η πενικιλίνη ή η αμπικιλίνη, μόνες τους, ή σε συνδυασμό με γενταμικίνη ή με αμινογλυκοσίδες, και αποτελούν τη συνηθέστερα επιλεγόμενη θεραπεία με διάρκεια 2-4 εβδομάδες. Ωστόσο, η συνδυασμένη θεραπεία με γενταμικίνη είναι ακόμα υπό συζήτηση, λόγω κακής ενδοκυτταρικής δραστηριότητας και ασαφούς αντίκτυπου στην θνησιμότητα. Επίσης, η κοτριμοξαζόλη (γνωστή και ως τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη) θεωρείται καλό αντιβιοτικό με βακτηριοκτόνο δράση, σε περίπτωση που ο ασθενής έχει αλλεργία στις β-λακτάμες (Ryser, 2002; Lere, 2020). Άλλα αντιβιοτικά που αναφέρονται για καταπολέμηση της λιστερίωσης είναι η ερυθρομικίνη, η χλωραμφενικόλη, η ριφαμπίνη, οι τετρακυκλίνες και οι αμινογλυκοσίδες. Ωστόσο, οι κεφαλοσπορίνες δεν ενδείκνυται για θεραπεία έναντι της λιστερίωσης, παρόλη την βακτηριοστατική δράση τους κατά της *Listeria monocytogenes* (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991).

Ωστόσο, το παθογόνο έχει εμφανίσει αντίσταση σε μεγάλο ποσοστό αντιβιοτικών. Η οξακιλλίνη, η πενικιλίνη, η αμπικιλίνη, η χλωραμφαινικόλη, η κλινδαμικίνη και η τετρακυκλίνη είναι τα περισσότερα από αυτά. Η αντίσταση αυτή οφείλεται στη συχνή χρήση των παραπάνω αντιβιοτικών σε συμπληρώματα διατροφής ζώων και ζωοτροφών και γενικότερα στην κτηνιατρική, καθώς και στη συχνή χρήση τους ως φάρμακα σε ανθρώπινες ασθένειες. Αντίθετα, η γενταμικίνη και η τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη εμφανίζουν καλύτερα αποτελέσματα έναντι του βακτηρίου (Harakeh, et al., 2009).

Η αναφορά αυτή στην θεραπεία κατά της λιστερίωσης γίνεται διότι η χρήση των αντιβιοτικών έχει αναφερθεί και ως προληπτικός τρόπος αποφυγής. Για παράδειγμα, σε ανθρώπους που βρίσκονται σε ευπαθείς κοινωνικές ομάδες, όπως οι έγκυες, προτείνεται

η προληπτική χορήγηση αντιβιοτικών σε περίπτωση εμπύρετης ασθένειας, ακόμα και αν δεν είναι σίγουρο πως πρόκειται για λιστερίωση (Schlech, 2000).

2.6.6. Εμβόλιο

Μία ενδιαφέρουσα πρόταση σε προσπάθεια αποφυγής των λιστεριώσεων, είναι η ανάπτυξη εμβολίου έναντι της *Listeria monocytogenes*, το οποίο θα χορηγείται κυρίως σε άτομα που ανήκουν στις ευπαθείς ομάδες. Σύμφωνα με τους Stout, et al. (2019) για λοιμώξεις με προσωρινή ανοσία, όπως οι τροφογενείς λοιμώξεις, η εκ νέου έκθεση σε λοίμωξη μπορεί να παρατείνει τη διάρκεια της προστατευτικής ανοσίας, συντομεύοντας τη διάρκεια και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα και βάσει έρευνας, το επίπεδο της ανοσίας που παρέχεται με τον εμβολιασμό με μεταλλαγμένο στέλεχος της *Listeria monocytogenes* μειωμένης μολυσματικότητας, εμφανίστηκε πολύ νωρίς μετά τον εμβολιασμό, παρέμεινε σταθερό για τουλάχιστον τέσσερις μήνες, αλλά μετά εξαφανίστηκε. Ωστόσο, με εκ νέου έκθεση στο βακτήριο κατά την περίοδο της ανοσίας, η ανοσία βελτιώθηκε και επέφερε ήπια ή καθόλου κλινικά συμπτώματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Ανίχνευση της *Listeria monocytogenes*

Η ελάχιστη ή και μηδενική ανοχή στη *Listeria monocytogenes* που έχει επιβληθεί ανά τις διάφορες χώρες παγκοσμίως, σημαίνει πως απαιτούνται τεχνικές ανίχνευσης του παθογόνου, οι οποίες να είναι ισχυρές, ευαίσθητες, γρήγορες και αναπαραγώγιμες, προκειμένου το παθογόνο να εντοπιστεί προτού το τρόφιμο φθάσει στον καταναλωτή (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Επίσης, μία τεχνική που συμφωνεί με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, προλαμβάνει τον κίνδυνο ανάκλησης προϊόντων από την αγορά, γεγονός που θα επέφερε μεγάλες οικονομικές συνέπειες για τις βιομηχανίες τροφίμων. Μέσω της ποιοτικής και ποσοτικής ανίχνευσης του τροφικού παθογόνου, παρέχονται μάλιστα χρήσιμα δεδομένα για ερευνητικές μελέτες στην προγνωστική μικροβιολογία, την επιδημιολογία, την ποσοτική αξιολόγηση του κινδύνου, όπως και για αναλύσεις ρουτίνας ή προγράμματα παρακολούθησης σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων. Ωστόσο, τα προϊόντα διατροφής και στην περίπτωση μας τα τυριά, μολύνονται συνήθως σε χαμηλά επίπεδα (μικρότερα των 100 cfu/g), με αποτέλεσμα να μην υπάρχει επαρκής μέθοδος για την ανίχνευση και απαρίθμηση της *Listeria* στα τρόφιμα (Auvolat & Besse, 2016).

Η ιδανική μέθοδος ανίχνευσης πρέπει να είναι ευαίσθητη, εκλεκτική, γρήγορη, απλή, αναπαραγώγιμη, ικανή να ανιχνεύσει βακτήρια από πολύπλοκα περιβάλλοντα τροφίμων, να έχει τη δυνατότητα να διακρίνει ζωντανά και νεκρά κύτταρα, να είναι οικονομική και αποδοτική και τελευταίο και σημαντικότερο, να μπορεί να επικυρωθεί (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Επίσης, βασικό παράγοντα παίζει και η δυνατότητα αυτοματοποίησης αυτής (Auvolat & Besse, 2016). Παρόλο που καμία μέθοδος δεν μπορεί να συνδυάσει όλα αυτά τα χαρακτηριστικά μαζί, η επιδιωκόμενη εφαρμογή της θα καθορίσει την καταλληλότερη μέθοδο ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes*.

Οι μέθοδοι ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes* χωρίζονται σε φαινοτυπικές μεθόδους, όπως οι τεχνικές κυτταρικής καλλιέργειας και οι ανοσολογικές τεχνικές, και σε γενετικές μεθόδους, όπως οι μοριακές τεχνικές, και θα αναλυθούν παρακάτω.

3.1 Τεχνικές κυτταρικής καλλιέργειας

Παλαιότερα, για την ανίχνευση του παθογόνου χρησιμοποιούνταν τεχνικές ψυχρού εμπλουτισμού, όπου τα στελέχη της *Listeria* αφήνονταν να πολλαπλασιαστούν σε θερμοκρασίες ψύξης, καθώς δεν ήταν πολλά άλλα βακτήρια σε θέση να αναπτυχθούν σε

αυτές τις θερμοκρασίες (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Την τεχνική αυτή χρησιμοποίησαν μάλιστα οι Pini & Gilbert (1988) ως πρώτο στάδιο της διαδικασίας ανίχνευσης *Listeria monocytogenes* σε μαλακά τυριά. Η τεχνική αυτή όμως διαρκούσε από μία έως αρκετές εβδομάδες, κάνοντας τη διαδικασία αρκετά χρονοβόρα, ενώ τη διαδικασία απομόνωσης δυσχέραιναν και άλλα ψυχρότροφα βακτήρια που μπορεί να υπήρχαν στο τρόφιμο (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991).

Σήμερα, τα εργαστήρια τροφίμων βασίζονται σε συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους για την ανίχνευση της *Listeria*. Οι μέθοδοι αυτές ακολουθούν την εξής διαδικασία. Γίνεται αρχικά δειγματοληψία, είτε από τα τρόφιμα, είτε από το περιβάλλον παραγωγής τροφίμων σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα. Στη συνέχεια, τα δείγματα προεπωάζονται σε βασικό μέσο για την ανάκτηση των τραυματισμένων κυττάρων που είναι βιώσιμα αλλά όχι καλλιεργήσιμα. Ακολουθεί εμπλουτισμός σε εκλεκτικό μέσο, όπως το Oxford agar, το PALCAM agar και το MOX agar, χημικά μέσα που χρησιμοποιούνται και από το BAM (Bacteriological Analytical Manual) του FDA της Αμερικής, σύμφωνα με έκδοση του 1995 (Τυμπής, Πετράκης, & Κοντελής, 2016). Ωστόσο, όπως ήταν γενικά παραδεκτό, το PALCAM agar δεν μπορούσε να διακρίνει τις αποικίες της *Listeria monocytogenes* από άλλα είδη της *Listeria*. Το πρόβλημα βελτιώθηκε το 2004 με την εισαγωγή του ALOA Agar (Agar *Listeria* Ottaviani Agosti), το οποίο και διακρίνει την *Listeria monocytogenes* (Auvolat & Besse, 2016). Άγαρ όπως το ALOA και το RAPID'L.mono είναι χρωμογόνα μέσα, που επιτρέπουν την εύκολη ανίχνευση και απαρίθμηση του βακτηρίου. Η χρήση του χρωμογόνου μέσου ALOA εξαρτάται από την δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης που περιέχει η *Listeria*, με αποτέλεσμα να παράγονται μπλε/πράσινες αποικίες, εφόσον το βακτήριο υπάρχει στο δείγμα. Έπειτα, η λεκιθίνη που περιέχει το ALOA υδρολύεται από το ένζυμο της φωσφολιπάσης, το οποίο συντίθεται μόνο από την *Listeria monocytogenes* και την *Listeria ivanovii*, σχηματίζοντας χαρακτηριστικούς αδιαφανείς δακτυλίους γύρω από τις αποικίες τους. Εάν όμως το εμπλουτισμένο δείγμα έχει εμβολιαστεί σε μη εκλεκτικό άγαρ, τότε οι ύποπτες αποικίες υποκαλλιεργούνται σε μη εκλεκτικό μέσο όπως το Tryptone Soy Agar και ακολουθεί βιοχημική ανάλυση της απομονωμένης καλλιέργειας (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Η *Listeria monocytogenes* στις βιοχημικές δοκιμές δίνει θετικό αποτέλεσμα για δοκιμή καταλάσης, Methyl Red, Voges-Proskauer και για δοκιμή αποικοδόμησης δεξτρόζης, εσκουλίνης, μαλτόζης και ραμνόζης. Αρνητικό αποτέλεσμα δίνει για δοκιμή αναγωγής νιτρικών, για δοκιμή παραγωγής υδρόθειου, για

δοκιμή διάσπασης ουρίας και για δοκιμή αποικοδόμησης μαννιτόλης και ξυλόζης (Τυμπής, Πετράκης, & Κοντελής, 2016).

Ωστόσο, η μέθοδος αυτή είναι αρκετά χρονοβόρα. Τα δείγματα υποβάλλονται σε 24 έως 48 ώρες εκλεκτικού εμπλουτισμού, με περαιτέρω απομόνωση 48 ωρών σε εκλεκτικά μέσα, που ακολουθείται από βιοχημικές αναλύσεις για ταυτοποίηση. Έτσι, η διαδικασία για να επιβεβαιωθεί ένα θετικό δείγμα, μπορεί να χρειαστεί έως και 10 ημέρες. Άλλα μειονεκτήματα των συμβατικών μεθόδων είναι η τυχαία επιλογή αποικιών από ένα δείγμα που μπορούν να οδηγήσουν σε ψευδή αποτελέσματα, η απαίτηση για διαφορετικά χημικά αντιδραστήρια, η εξάρτηση από τον φαινότυπο ο οποίος αλλάζει κάτω από διαφορετικό περιβάλλον και οι παρεμβολές από άλλα μολυσματικά βακτήρια (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

3.1.1 Πρότυπη μέθοδος αναφοράς (ISO 11290-1)

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης έχει τυποποιήσει την μέθοδο EN ISO 11290 ως μέθοδο αναφοράς για την ανίχνευση και καταμέτρηση της *Listeria monocytogenes*, στην οποία περιγράφονται οριζόντιες μέθοδοι που εφαρμόζονται σε όλα τα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων και των τυριών. Το πρότυπο ISO 11290 εκδόθηκε αρχικά το 1996, με μελλοντική τροποποίηση το 2004 προς βελτίωσή του. Το ISO 11290-1, αφορά το πρώτο μέρος του προτύπου και αναφέρεται στην ποιοτική ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* (Scotter, et al., 2001; Besse, et al., 2019)

Οι Besse, et al. (2019) αναφέρουν τα αποτελέσματα των εργαστηριακών μελετών που έγιναν για επικύρωση του προτύπου ISO 11290-1. Τα πειράματα έγιναν σε 5 είδη τροφίμων, εκ των οποίων το ένα ήταν το τυρί, για το οποίο και θα αναλυθούν παρακάτω τα στάδια της μεθόδου. Το δείγμα τυριού εμβολιάστηκε με σταθερό εμβόλιο με καθαρά στελέχη *Listeria monocytogenes*, που ανήκουν σε διαφορετικούς ορότυπους. Πάρθηκαν τρία δείγματα, όπου το ένα ήταν κενό (0 cfu/g) και τα άλλα δύο είχαν διαφορετικά επίπεδα μόλυνσης (5-10 και 50-100 cfu/25g), με οκτώ τυφλά αντίγραφα σε κάθε περίπτωση. Προστέθηκε μάλιστα και ανταγωνιστική μικροχλωρίδα του είδους *Lactococcus lactis*. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν σύμφωνα με το πρότυπο ήταν τα εξής:

α) Προεπεξεργασία του δείγματος τυριού, σύμφωνα με την τυποποιημένη διαδικασία για την απόκτηση ενός αρχικού δείγματος για πρωτογενή εμπλουτισμό, όπως αναφέρεται από τους Besse, et al. (2019).

- β) Πρωτογενής εμπλουτισμός σε εκλεκτικό υγρό μέσο εμπλουτισμού με μειωμένη συγκέντρωση υγρών παραγόντων (half-Fraser broth) με επώαση στους 30°C για 24 ώρες.
- γ) Δευτερογενής εμπλουτισμός μιας καλλιέργειας που λαμβάνεται από το (β) σε εκλεκτικό μέσο εμπλουτισμού με πλήρη συγκέντρωση εκλεκτικών παραγόντων (Fraser broth) με αερόβια επώαση στους 37°C για 24 ώρες.
- δ) Παραλαβή καλλιεργείων που προκύπτουν από στα στάδια (β) και (γ) και ταυτοποίηση σε ALOA agar με επώαση στους 37°C για 24-48 ώρες για τον έλεγχο της παρουσίας χαρακτηριστικών αποικιών *Listeria monocytogenes*.
- δ) Απομόνωση των τυπικών αποικιών σε μη εκλεκτικό άγαρ.
- ε) Επιβεβαίωση της παρουσίας γονιδίων του παθογόνου μέσω μορφολογικών, φυσιολογικών και βιοχημικών δοκιμών που πραγματοποιούνται σε πέντε υποθετικές αποικίες. Αυτές είναι η χρώση κατά Gram (ως υποχρεωτική δοκιμή), καθώς και η δοκιμή καταλάσης, η κινητικότητα και οι δοκιμές φωτισμού Henry (ως προαιρετικές δοκιμές). Πρόσθετη επιβεβαίωση ως προς το είδος *Listeria monocytogenes* επιτυγχάνεται μέσω της δοκιμής αιμόλυσης και του CAMP test.

3.1.2 Πρότυπη μέθοδος αναφοράς (ISO 11290-2)

Το δεύτερο μέρος του προτύπου ISO 11290 αφορά την ποσοτική ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα, δηλαδή την καταμέτρηση των κυττάρων του παθογόνου. Οι Rollier, et al. (2019) αναφέρουν τα αποτελέσματα των εργαστηριακών μελετών που έγιναν για επικύρωση του προτύπου ISO 11290-2. Τα πειράματα έγιναν σε τρία είδη τροφίμων, εκ των οποίων το ένα ήταν τυρί, για το οποίο και θα αναλυθούν παρακάτω τα στάδια της μεθόδου. Το δείγμα τυριού εμβολιάστηκε με διαφορετικά επίπεδα μόλυνσης από *Listeria monocytogenes* (0cfu/g, 100-150cfu/g, 500-1500cfu/g και 5000-15000cfu/g), από δύο επαναλήψεις το καθένα. Προστέθηκε μάλιστα και ανταγωνιστική μικροχλωρίδα του είδους *Lactococcus lactis*. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν σύμφωνα με το πρότυπο ήταν τα εξής:

- α) Παρασκευή του αρχικού εναιωρήματος σε Buffered Peptone Water (BPW), ένα από τα δύο αραιωτικά μέσα που επιτρέπονται στο πρότυπο, όταν η απαρίθμηση δεν πραγματοποιείται παράλληλα με την ανίχνευση.
- β) Ανάνηψη των κυττάρων για 1 ώρα στους 20°C.
- γ) Επιφανειακή εξάπλωση του αρχικού εναιωρήματος και περαιτέρω δεκαδικές αραιώσεις εις διπλούν, σε ALOA Agar.
- δ) Επώαση των πλακών στους 37°C και εξέταση μετά από 24 και 48 ώρες.

δ) Απομόνωση των τυπικών αποικιών σε μη εκλεκτικό άγαρ και επιβεβαίωση των πιθανών αποικιών *Listeria monocytogenes*, μέσω των δοκιμών που περιγράφηκαν και στο ISO 11290-1.

ε) Υπολογισμός του τελικού αριθμού *Listeria monocytogenes*/g.

3.1.3 Μέθοδος πολλαπλών σωλήνων (MPN)

Η τεχνική MPN (Most Probable Number Technique) βασίζεται σε στατιστικά στοιχεία πιθανότητας. Τα αποτελέσματα σχετίζονται με τη συχνότητα εμφάνισης του βακτηρίου σε μια σειρά αραιώσεων ενός δείγματος, το οποίο χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της πιθανότητας παρουσίας δεδομένου αριθμού κυττάρων βακτηρίου στο δείγμα. Τα στατιστικά αυτά αποτελέσματα υπολογίζονται από τον αριθμό των θετικών σωλήνων μέσω ενός συνολικού αριθμού δοκιμασμένων σωλήνων, για μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων. Η τεχνική αυτή έχει δύο βασικές υποθέσεις. Πρώτον, θεωρείται ότι οι μικροοργανισμοί κατανέμονται τυχαία σε όλο το δείγμα και δεν συμβαίνει συσσώρευση κυττάρων και δεύτερον, θεωρείται ότι κάθε αραιώση, όταν είναι σωστά επωασμένη, θα εμφανίσει ανάπτυξη όταν ένας ή περισσότεροι οργανισμοί είναι παρόντες. Ένα από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου, είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ευρύ φάσμα επιπέδων βακτηριακής μόλυνσης, όταν το επίπεδο μόλυνσης είναι άγνωστο. Ωστόσο, βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι πως η *Listeria monocytogenes* πρέπει ανακτηθεί και να επιβεβαιωθεί από τον κάθε υποθετικό θετικό σωλήνα, ενώ ως τεχνική είναι χρονοβόρα, κοστοβόρα και δεν έχει μεγάλη ακρίβεια και εκλεκτικότητα. Επίσης, η παρουσία ανταγωνιστικής χλωρίδας επηρεάζει το αποτέλεσμα της MPN (Auvolat & Besse, 2016).

Ωστόσο, καλύτερα αποτελέσματα παρουσιάζονται όταν η μέθοδος MPN συνδυαστεί με την μέθοδο PCR ή την real time-PCR. Η ανάλυση PCR χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της μεθόδου πολλαπλών σωλήνων και στοχεύει στην ανίχνευση του γονιδίου *prfA* της *Listeria monocytogenes*, ενώ η real time-PCR στην ανίχνευση του γονιδίου 16S-rRNA. Η δεύτερη συνδυασμένη μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί μάλιστα για την ανίχνευση του παθογόνου σε τυρί Brie και μειώνει τις μέρες παραλαβής των αποτελεσμάτων από τέσσερις σε δύο (Auvolat & Besse, 2016).

3.2 Ανοσολογικές τεχνικές

Η ειδικότητα της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος καθιστά κατάλληλες τις ανοσοτεχνικές για ανίχνευση παθογόνων. Τα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν

για ανίχνευση ολόκληρων κυττάρων ή και κυτταρικών συστατικών. Ωστόσο, μειονεκτήματα των ανοσολογικών μεθόδων είναι η μειωμένη ευαισθησία τους, η οποία φτάνει τα 10^5 κύτταρα/mL για ένα εμπλουτισμένο δείγμα, σε σύγκριση με τις καλλιεργητικές μεθόδους που έχουν ευαισθησία 10^4 κύτταρα/mL. Επίσης, μπορεί να συμβεί διασταυρούμενη αντίδραση με άλλα συγγενή είδη και διαφορική αντιγονική έκφραση σε διαφορετικά κυτταρικά περιβάλλοντα οδηγεί σε μεταβλητότητα των αντιδράσεων. Επιπλέον, η προετοιμασία των αντισωμάτων είναι χρονοβόρα, ενώ μπορεί να υπάρξει και απώλεια του μορίου-στόχου κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

3.2.1 Μέθοδος ELISA

Στην μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays), τα αντισώματα κατά της *Listeria* ακινητοποιούνται σε μέσο μικροτιτλοδότησης για τη σύλληψη των αντιγόνων *Listeria*, μαζί με δευτερογενή αντισώματα συνδεδεμένα με ένα ένζυμο. Είναι δοκιμές που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα και είναι απλές, εύκολες στην ερμηνεία και απαιτούν ελάχιστη επεξεργασία του δείγματος. Η ELISA δίνει αποτελέσματα σε 30-50 ώρες, έχει όμως μικρή ευαισθησία (10^5 - 10^6 cfu/mL). Τα πιθανά κύτταρα του παθογόνου που ανιχνεύονται με την μέθοδο αυτή, υπόκεινται και σε περαιτέρω τεχνικές για επιβεβαίωση, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

3.2.2 Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (IMS)

Ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός χρησιμοποιεί παραμαγνητικά σφαιρίδια πολυστυρενίου που διαθέτουν ειδικά παθογόνα αντισώματα, τα οποία συνδέονται ομοιοπολικά με την επιφάνεια των σφαιριδίων. Έτσι, τα παθογόνα αντιγόνα συνδέονται με το αντίσωμα παρουσία μαγνητικού πεδίου. Τα κύτταρα συμπυκνώνονται από ζωμούς εμπλουτισμού ή απευθείας από σύνθετα τρόφιμα, όπως τα γαλακτοκομικά. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για ενίσχυση λιγότερο ευαίσθητων μεθόδων. Έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης ανοσομαγνητικά νανοσωματίδια (IMNP) στην τεχνική αυτή για την συμπύκνωση των κυττάρων *Listeria* μέσω μαγνητικής υβριδοποίησης. Για γρήγορη ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος χρησιμοποιήθηκαν IMNPs επικαλυμμένα με αντισώματα της *Listeria monocytogenes* σε συνδυασμό με real-time PCR (με στόχο το γονίδιο hlyA) (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

3.3 Μοριακές μέθοδοι

Οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes* και γενικά των παθογόνων, βασίζονται στην γενετική, με αποτέλεσμα να είναι περισσότερο ευαίσθητες και αξιόπιστες από τις φαινοτυπικές μεθόδους (καλλιεργητικές και ανοσολογικές τεχνικές) που είναι χρονοβόρες και έχουν πιθανότητα ανίχνευσης ψευδών θετικών αποτελεσμάτων (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Οι μοριακές μέθοδοι αναλύονται παρακάτω.

3.3.1 Μικροσυστοιχίες DNA

Οι μικροσυστοιχίες DNA περιλαμβάνουν τη χρήση παθογόνων ή ειδικών ανιχνευτών για ταυτόχρονη αναγνώριση διαφορετικών βακτηρίων ή για την ανίχνευση συγκεκριμένων ειδικών γονδιακών πολυμορφισμών. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται και ως επιβεβαίωση της PCR, ενώ προσδιορίζει και τα είδη της *Listeria*. Είχε χρησιμοποιηθεί μάλιστα για τον προσδιορισμό έξι γονιδίων μολυσματικότητας του παθογόνου, σε συνδυασμό με multiplex PCR. Η μικροσυστοιχία περιείχε ακινητοποιημένους ειδικούς ανιχνευτές για ένα σετ γονιδίων μολυσματικότητας από κάθε είδος *Listeria* και το μονόκλωνο, λαμβανόμενο με φθορισμό DNA, υβριδοποιήθηκε με τη μικροσυστοιχία. Όσοι ανιχνευτές υβριδοποιήθηκαν με στελέχη της *Listeria monocytogenes* φάνηκαν χρήσιμοι για τη διαφοροποίηση και τον προσδιορισμό συγκεκριμένου ορότυπου. Ωστόσο, οι μικροσυστοιχίες DNA είναι πολύπλοκες και εμφανίζουν ορισμένες φορές διασταυρούμενη υβριδοποίηση με στενά συνδεδεμένο DNA (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

3.3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι PCR. Η πιο γνωστή είναι η συμβατική PCR (Polymerase Chain Reaction), η οποία ανιχνεύει την *Listeria monocytogenes* στοχεύοντας διάφορα γονίδια, όπως το *hly*, *inlA*, *inlB*, *iap*, διαγονιδιακές διαχωριστικές περιοχές, τα γονίδια 16S και 23S rRNA, γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη p60, την αμινοπεπτιδάση C, την πρωτεΐνη φωσφολιπάσης C, την πρωτεΐνη δέσμησης ινωδονεκτίνης και την πρωτεΐνη υπερευαισθησίας καθυστερημένου τύπου (dth-18) (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Η PCR είναι μια μέθοδος που βασίζεται στον πολυμερισμό ενός συγκεκριμένου τμήματος κυτταρικού DNA. Αποτελείται από τρία βήματα. Αρχικά, το δίκλωνο DNA (μήτρα DNA) χωρίζεται σε μονόκλωνες αλυσίδες, ακολουθούμενο από συνένωση και υβριδισμό των εκκινητών με τη μήτρα DNA. Σημαντική είναι η θερμοκρασία υβριδισμού για την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης. Τέλος, γίνεται επέκταση των εκκινητών μέσω μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης. Εντός δύο ωρών, η PCR μπορεί να

μεγεθύνει ένα αντίγραφο DNA κατά ένα εκατομμύριο φορές. Τα προϊόντα της PCR μπορούν να οπτικοποιηθούν σε πηκτή αγαρόζης, μέσω χρώσης με βρωμιούχο αιθίδιο (Montville & Matthews, 2010). Ωστόσο, η τεχνική δεν μπορεί να διακρίνει το DNA μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Επιπλέον, η ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα μέσω PCR είναι δύσκολη, λόγω του μικρού αριθμού των κυττάρων που επιμολύνουν το δείγμα και την επικάλυψη της *Listeria monocytogenes* από την *Listeria innocua*. Επίσης, σε λανθασμένο αποτέλεσμα μπορεί να οδηγήσει η PCR όταν δεν υπάρχει το DNA-στόχος ή όταν υπάρχουν αναστολές, όπως φαινολικά μόρια, νουκλεάσες ή εκλεκτικοί παράγοντες. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί και δοκιμές PCR που συμμορφώνονται με τις πρότυπες μεθόδους απομόνωσης, όπως η PCR τριών ημερών, που δίνει ανίχνευση ισοδύναμη με το πρότυπο ISO 11290-1. Έχει χρησιμοποιηθεί μάλιστα και σε τυριά, έχοντας ως γονίδιο-στόχο το *inlB* και δίνει αποτελέσματα εντός τριών ημερών (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

Μία καλή διαδικασία για PCR που έχει εφαρμοστεί σε φυσικά μολυσμένα δείγματα γάλακτος είναι η εξής: συμβατικός εμπλουτισμός σε half-Fraser broth (24 ώρες), με δευτερεύων εμπλουτισμό σε Fraser broth (48 ώρες), ακολουθούμενος από απομόνωση αποικίας του δευτερογενούς εμπλουτισμού, από βιοχημική ανάλυση χρησιμοποιώντας API και επιβεβαίωση μέσω PCR. Μετά από τέτοια μελέτη, τα θετικά δείγματα στο παθογόνο ήταν περισσότερα με ανάλυση PRC από ότι με τη μέθοδο καλλιέργειας. Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι οι καλλιεργητικές μέθοδοι δεν προσμετρούν νεκρά κύτταρα, βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα, μεταβολικά τραυματισμένα κύτταρα και κύτταρα σε κατάσταση stress, σε αντίθεση με την PCR που τα προσμετρά και μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση του αποτελέσματος (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Ωστόσο, σύμφωνα με αναφορές των Niederhauser, et al. (1993) ο PCR υβριδισμός DNA συνδυασμένος με εμπλουτισμό δύο σταδίων μπορεί να αντικαταστήσει την παραδοσιακή καλλιέργεια σε εκλεκτικό άγαρ, ακολουθούμενη από βιοχημικές δοκιμές και οροαποτύπωση. Αναφέρουν, μάλιστα, πως αποτελεί την πιο ισχυρή μέθοδο ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes* σε μαλακά και ημιμαλακά τυριά, σε επίπεδο ευαισθησίας, ειδικότητας και χρόνου ανάλυσης.

Στην περίπτωση χαμηλού αριθμού κυττάρων *Listeria monocytogenes* είναι απαραίτητη η διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Τη λύση δίνει το mRNA το οποίο μπορεί να τεθεί ως στόχος αντί του DNA, χρησιμοποιώντας την PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Η μέθοδος αυτή

χρησιμοποιεί το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση για να μετατρέψει το RNA σε DNA, το οποίο χρησιμοποιείται ως μήτρα στην PCR (Montville & Matthews, 2010).

Μία άλλη μορφή της PCR είναι η ποσοτική PCR ή πραγματικού χρόνου (real-time PCR ή qPCR). Αφορά την ποσοτική ανίχνευση του παθογόνου με τα προϊόντα της PCR να εντοπίζονται κατά την συσσώρευση τους, ενώ η ποσότητα τους είναι ανάλογη με την αύξηση ενός φθορίζοντος σήματος, το οποίο παρακολουθείται κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης. Το φθορίζον μόριο είναι συγκεκριμένος ανιχνευτής, επισημασμένος με φθορίζουσα βαφή. Οι επισημασμένοι ανιχνευτές υβριδοποιούνται στο μόριο-στόχο και δεν είναι διαθέσιμοι κατά την απόσβεση, κάτι που οδηγεί σε αύξηση του φθορισμού. Η αύξηση του φθορισμού μπορεί να γίνει, καθώς το DNA πολυμερίζεται. Οι ανιχνευτές υδρόλυσης (ανιχνευτές TaqMan) περιέχουν τον μάρτυρα και τη βαφή σβέσης στο ίδιο ολιγονουκλεοτίδιο, με αποτέλεσμα την απόσβεση. Κατά τη διάρκεια της ανόπτησης και το βήμα επέκτασης εκκινήτη της PCR, ο ανιχνευτής υβριδοποιείται με το γονίδιο ενδιαφέροντος, και στη συνέχεια υδρολύεται από τη δραστικότητα 5' / 3' εξονουκλεάσης της Taq πολυμεράσης κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης. Μόλις απελευθερωθεί, η βαφή του μάρτυρα, δεν αποσβένεται πλέον και μπορεί να μετρηθεί η αύξηση του φθορισμού (Auvolat & Besse, 2016). Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η αυξημένη ευαισθησία, η ικανότητα ανίχνευσης DNA-στόχου ακόμα σε μικρές ποσότητες, πιθανός αυτοματισμός και ικανότητα ποσοτικοποίησης βακτηριακού φορτίου χωρίς χειρισμό μετά την PCR. Αναφέρεται, μάλιστα, πως ο συνδυασμός της qPCR με το πρότυπο ISO 11290-1 αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου και δίνει γρήγορα και συγκεκριμένα αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

3.3.3 Υβριδισμός φθορισμού *in situ* (FISH)

Η τεχνική FISH είναι κυτταρογενετική και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της παρουσίας ή απουσίας συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Χρησιμοποιεί ανιχνευτές φθορισμού που συνδέονται με συμπληρωματικές αλληλουχίες και οι δεσμευμένοι ανιχνευτές εν συνεχεία οπτικοποιούνται με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού. Η τεχνική FISH σε συνδυασμό με καλλιέργεια φίλτρου (FISHFC) έχει χρησιμοποιηθεί για ταχεία απαρίθμηση της βιώσιμης *Listeria monocytogenes*. Έχει εφαρμοστεί μάλιστα και σε τυρί, ενώ δίνει ποσοτικό προσδιορισμό του παθογόνου εντός 16 ωρών, χωρίς σημαντικές διαφορές από τις κλασικές καλλιεργητικές μεθόδους σε επίπεδο 100 cfu/g (Auvolat & Besse, 2016).

3.4 Άλλες μέθοδοι

3.4.1 Τεχνικές με βιοαισθητήρα

Ένας βιοαισθητήρας περιέχει ένα βιομόριο που αλληλεπιδρά με τον οργανισμό-στόχο και δίνει ένα σήμα, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την ανάλυση της παρουσίας του μικροοργανισμού στα δείγματα. Έχουν αναπτυχθεί ειδικοί βιοαισθητήρες για την *Listeria monocytogenes* που ανιχνεύουν τα κύτταρα της σε διάλυμα. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων για 30 λεπτά σε αντισώματα της *Listeria monocytogenes*, που ακολουθείται από αφαίρεση των νεκρών κυττάρων και των δεσμευμένων αντισωμάτων μέσω φυγοκέντρησης (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

3.4.2 Ανίχνευση μονόκλωνων πολυμορφισμών σε προϊόντα PCR

Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην αρχή ότι η διαφορά ενός νουκλεοτιδίου σε ένα προϊόν PCR θα προκαλέσει αλλαγή στη διαμόρφωση ενός κλώνου του προϊόντος, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση πηκτής μετουσιωτικής βαθμίδας (DGGE), με χρήση ουρίας ως παράγοντα μετουσίωσης ή ηλεκτροφόρηση πηκτής θερμοκρασιακής βαθμίδας (TGGE). Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό θραυσμάτων DNA με το ίδιο μήκος, αλλά διαφορετικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Η βαθμίδωση στην σύνθεση της μετουσιωτικής ουσίας (ουρία) ή στην θερμοκρασία του πήγματος είναι υπεύθυνη για την διαφορετική κινητικότητα των θραυσμάτων DNA. Αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση διαφορετικών ειδών *Listeria* σε τρόφιμα, μετά από επιβεβαίωση μέσω PCR. Ωστόσο, οι τεχνικές αυτές είναι αρκετά χρονοβόρες (μέχρι και 14 ώρες για παραλαβή αποτελεσμάτων από την DGGE) (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Ωστόσο, πρόσφατες αναφορές των Paduro, et al. (2020) υποστηρίζουν πως η μέθοδος του μονο-νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού, λεγόμενη και ως SNP, αφότου υποστεί βελτιώσεις, θα αποτελέσει μελλοντικά σημαντικό εργαλείο στην υποτύπωση και τον προσδιορισμό της γονιδιακής ποικιλομορφίας της *Listeria monocytogenes*, καθώς βασίζεται σε φυλογενετικές αναλύσεις.

3.4.3 Ανιχνευτές DNA (DNA Probes)

Οι ανιχνευτές DNA αποτελούν μία ταχεία μέθοδο επιβεβαίωσης της *Listeria monocytogenes*, που δίνει αποτελέσματα ακόμα και εντός δύο ωρών. Οι ανιχνευτές αυτοί εντοπίζουν τη γονιδιακή αλληλουχία της λιστεριολυσίνης O, το γονίδιο κωδικοποίησης πιθανής εισβολής της *Listeria monocytogenes* και το γονίδιο του παράγοντα υπερευαισθησίας καθυστερημένου τύπου (dth-18), τα οποία είναι ειδικά για την *Listeria monocytogenes* και δεν εμφανίζονται σε άλλα είδη *Listeria* (Schuchat, Swaminathan, &

Broome, 1991). Οι ανιχνευτές αυτοί είναι μονόκλωνοι, επισημαίνονται με χημειοφωτάγεια (Niederhauser, et al., 1993) και υβριδίζονται στο ριβοσωμικό RNA των στελεχών της *Listeria*, η οποία με αυτόν τον τρόπο ταυτοποιείται (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991). Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά στο παρελθόν για την ανίχνευση του βακτηρίου σε φυσικά μολυσμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (Farber & Peterkin, 1991). Ωστόσο, ενώ οι Schuchat, Swaminathan, & Broome (1991) αναφέρουν πως είναι μία ταχεία μέθοδος, χρήσιμη για την επιβεβαίωση της *Listeria* σε δείγματα φαγητού, οι Niederhauser, et al. (1993) αποδεικνύουν μετά από πειράματα σε μαλακό και ημιμαλακό τυρί, πως το kit των DNA Probes στερείται ευαισθησίας και εξειδίκευσης στην ανάλυση ζωμών εμπλουτισμού. Αποτελεί όμως συμπληρωματική μέθοδο για γρήγορη επιβεβαίωση ύποπτων δειγμάτων *Listeria monocytogenes*.

3.4.4 Τεχνικές με βάση τη φασματοσκοπία

Υπέρυθροι μετασχηματισμοί Fourier (FT-IR), φασματοσκοπία Raman και φασματοσκοπία μάζας ιονισμού/εκρόφησης με laser υποβοηθούμενης από υλικό μήτρας (MALDI-TOF MS) αναπτύχθηκαν πρόσφατα για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων. Τα πλεονεκτήματα των μεθόδων αυτών είναι πως είναι γρήγορες, αξιόπιστες, απαιτούν μικρή προετοιμασία δείγματος, έχουν χαμηλό κόστος λειτουργίας και δίνουν ένα μοναδικό δακτυλικό αποτύπωμα του βακτηρίου, ανιχνεύοντας το γένος, το είδος ή ακόμα και το στέλεχος του. Στοχεύουν στην ανίχνευση του βακτηρίου μέσω λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων ή συνθέσεις νουκλεϊκών οξέων και οι περισσότερες είναι μη καταστροφικές τεχνικές, με εξαίρεση την MALDI-TOF MS. Το μόνο μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι η ανάγκη για καθαρές καλλιέργειες κατά την ανάλυση. Κατά την τεχνική MALDI-TOF MS για την ταυτοποίηση των ειδών *Listeria*, λαμβάνεται το δακτυλικό αποτύπωμα των ριβοσωμικών πρωτεϊνών στα βακτηριακά κύτταρα και εν συνεχεία γίνεται λήψη μιας καθαρής αποικίας *Listeria*. Το δείγμα δέχεται κατεργασία με αιθανόλη, μυρμηγκικό οξύ και ακετονιτρίλιο, και λαμβάνεται το κυτταρικό εκχύλισμα. Κατά την φασματοσκοπία, οι κορυφές που ανιχνεύονται στην περιοχή των κορυφών που δίνουν συνήθως οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες, αποτελούν τις κορυφές διάκρισης. Τα στελέχη της *Listeria monocytogenes* θα μπορούσαν να χωριστούν και σε επίπεδο γενεών, αν οι τεχνικές φασματοσκοπίας συνδυαστούν με την πρότυπη τεχνική ηλεκτροφόρηση πήγματος παλλόμενου πεδίου (PFGE) (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Υποτύπωση της *Listeria monocytogenes*

Δεδομένου ότι υπάρχουν πολλά στελέχη της *Listeria monocytogenes* χρειάζεται ένα σύστημα υποτύπωσης (subtyping), προκειμένου να ελέγχονται τα κρούσματα λιστερίωσης. Η υποτύπωση βοηθά στην δημιουργία προγραμμάτων και στρατηγικών ελέγχου έναντι της *Listeria*, καθώς και στην ανίχνευση της αρχικής πηγής και στην εξάλειψή της. Οι μέθοδοι υποτύπωσης χωρίζονται σε φαινοτυπικές και γονοτυπικές, με τις μεν φαινοτυπικές να είναι λιγότερο ευαίσθητες, με χαμηλή ικανότητα διαφοροποίησης και αναπαραγωγιμότητας, και τις δε γονοτυπικές να είναι πιο ευαίσθητες και αξιόπιστες (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Μερικές από τις μεθόδους αυτές αναλύονται παρακάτω.

4.1 Συμβατικές μέθοδοι υποτύπωσης

4.1.1 Οροαποτύπωση (Serotyping)

Η οροαποτύπωση ήταν η πρώτη μέθοδος που αναπτύχθηκε για την διάκριση του υπότυπου της *Listeria monocytogenes* (Orsi, Den Bakker, & Wiedmann, 2011). Εκ των 13 οροτύπων της *Listeria monocytogenes*, οι πιο κοινοί ορότυποι που εμφανίζονται σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων είναι οι 1/2a, 4b, 1/2b και 1/2c, με σειρά προτεραιότητας εμφάνισης. Η οροαποτύπωση βασίζεται στην συγκόλληση των σωματικών (O) και των βλεφαριδικών (H) αντιγόνων από διάφορους μονοσθενείς και πολυσθενείς αντιορούς. Η μέθοδος αυτή έχει το μειονέκτημα ότι βασίζεται στην υψηλή ποιότητα αντιορών που παρασκευάζονται με τυποποιημένα στελέχη, είναι πολύ ακριβή, χρονοβόρα, έχει χαμηλή αναπαραγωγιμότητα και απαιτεί εξειδικευμένη εργασία για την ανίχνευση των αντιδράσεων συγκόλλησης. Επίσης, τα αντιγόνα μοιράζονται μεταξύ των στελεχών της *L. monocytogenes*, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπουν σαφή εύρεση του υπότυπου τους (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Επίσης, το γεγονός ότι οι παθογόνοι ορότυποι είναι πολύ λίγοι, η μέθοδος της οροαποτύπωσης έχει μικρή αξία σε επιδημιολογικές έρευνες (Farber & Peterkin, 1991).

Η οροαποτύπωση έχει συνδυαστεί και με άλλες μεθόδους. Ωστόσο, συνδυασμός της μεθόδου αυτής με την ELISA φαίνεται να έχει τα ίδια μειονεκτήματα με την μεμονωμένη χρήση της μεθόδου (μεγάλη χρονική διάρκεια, ανάγκη για υψηλή ποιότητα αντιορών). Καλύτερα αποτελέσματα φαίνεται να έχει ο συνδυασμός της οροαποτύπωσης με την PCR. Και αυτός όμως ο συνδυασμός είναι ελλιπής, καθώς δεν μπορεί να διακρίνει όλους

τους ορότυπους μεταξύ τους. Για επιδημιολογικές μελέτες, οι δοκιμές αυτές πρέπει να υποστηρίζονται από PFGE, MLST και MLVA που θα αναλυθούν παρακάτω (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

4.1.2 Λυσιτυπία (Phage typing)

Οι βακτηριοφάγοι εμφανίζονται συχνά στα βακτήρια και έχουν την ικανότητα να λύουν τον ξενιστή τους και άλλα βακτήρια που σχετίζονται με αυτόν. Ανάλογα με την αντίσταση ή την ευαισθησία των ξενιστών σε φάγους, τα στελέχη της *Listeria monocytogenes* διαφοροποιούνται σε διαφορετικές ομάδες φαγότυπων, βοηθώντας στην παρακολούθηση της μόλυνσης από *Listeria* (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Παλαιότερα, η μέθοδος αυτή αποτελούσε χρήσιμο εργαλείο σε μελέτες κρουσμάτων λιστερίωσης, ενώ είχε δημιουργηθεί και διεθνές σύστημα λυσιτυπίας για την *Listeria monocytogenes* (Farber & Peterkin, 1991; Martin & Fisher, 1999). Έχει χρησιμοποιηθεί μάλιστα από τους Rudolf & Scherer (2001) ως συμπληρωματική μέθοδος επιβεβαίωσης της *Listeria monocytogenes* μετά από κλασσική κυτταρική καλλιέργεια. Τα δείγματα που είχαν επιβεβαιωθεί αφορούσαν τυριά κόκκινου επιχρίσματος, καθώς και δείγματα από το περιβάλλον επεξεργασίας τους. Ωστόσο, λόγω του ότι μεγάλος αριθμός στελεχών της *Listeria* δεν τυποποιείται, η τεχνική αυτή σήμερα έχει περιορισμένη εφαρμογή στην υποτύπωση του βακτηρίου (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

4.1.3 Ηλεκτροφόρηση ενζύμου πολλαπλής εστίασης (MLEE)

Η μέθοδος MLEE (Multi Locus Enzyme Electrophoresis) βασίζεται στην διαφορά της ηλεκτρομαγνητικής κινητικότητας διαφορετικών ενζύμων που υπάρχουν στο βακτήριο, λόγω διαφορών στις αλληλουχίες των αμινοξέων τους. Τα εκχυλίσματα ενζύμων παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας βακτήρια μετά από λύση και διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αμύλου, που ακολουθείται από PFGE ή φυσική ισοηλεκτροφορητική εστίαση. Κάθε παραλλαγή κινητικότητας του ενζύμου ονομάζεται ηλεκτρομορφή και μια ομάδα ηλεκτρομορφών ονομάζεται ηλεκτροφορητικός τύπος (ET). Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για την διαφοροποίηση των στελεχών της *Listeria monocytogenes* με βάση την διαφορά στους ορότυπους. Μειονεκτήματα της MLEE αποτελούν η μειωμένη αναπαραγωγικότητα και η δυσκολία στη διάκριση. Ωστόσο, είναι οικονομική μέθοδος, εύκολη στη χρήση και πολύ αξιόπιστη (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Έχει χρησιμοποιηθεί μάλιστα για αρκετές επιδημιολογικές έρευνες λιστερίωσης, καθώς επιτρέπει την τυποποίηση όλων των στελεχών της *Listeria* (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991).

4.2 Μέθοδοι που βασίζονται στην χρήση περιοριστικών ενζύμων

4.2.1 Ριβοσωμική αποτύπωση (Ribotyping)

Η ριβοσωμική αποτύπωση είναι μία τεχνική πολυμορφισμού στο μήκος θραυσμάτων περιορισμού βάσει του πολυμορφισμού που παρατηρείται στο mRNA. Το γονιδιακό DNA χωρίζεται αρχικά από περιοριστικά ένζυμα. Εν συνεχεία, δημιουργούνται μικρά θραύσματα DNA και πραγματοποιείται Southern blot για την ανίχνευση του ενωμένου DNA-ενζύμου που υβριδοποιείται με ανιχνευτές, ειδικούς για τα γονίδια που κωδικοποιούν ριβοσωμικό RNA. Η μέθοδος αυτή βοηθά στη διαφοροποίηση των στελεχών με βάση την προέλευσή τους. Η ριβοσωμική αποτύπωση έχει μάλιστα αυτοματοποιηθεί, καθώς το DNA συνδέεται με ένα ή δύο περιοριστικά ένζυμα, και αυτό που προκύπτει, συγκρίνεται με ήδη υπάρχουσα βιβλιοθήκη ριβοτύπων. Σαν μέθοδος, έχει παρόμοια ικανότητα διάκρισης με την MLEE για τον τύπο της *Listeria* και είναι μάλιστα αναπαραγωγίμη. Ωστόσο, δεν μπορεί να διακρίνει ορισμένα στελέχη που ανήκουν στους ορότυπους 1/2b και 4b. Έχει γίνει έρευνα σε εργοστάσια παραγωγής τυριού από παστεριωμένο γάλα με ριβοσωμική αποτύπωση, προκειμένου να βρεθεί η πηγή μόλυνσης. Μετά από δειγματοληψία και ανάλυση, βρέθηκε ότι ο ριβότυπος που απομονώθηκε από ορισμένα εργοστάσια, είχε συσχετιστεί με κρούσμα μεταξύ πολλών κρατών στις Η.Π.Α. το 1998 (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

4.2.2 Ηλεκτροφόρηση πήγματος παλλόμενου πεδίου (PFGE)

Η μέθοδος PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) χρησιμοποιεί περιοριστικά ένζυμα που κόβουν το DNA σε μεγαλύτερα θραύσματα από ότι η ριβοσωμική αποτύπωση. Το πρότυπο δέσμευσης DNA που λαμβάνεται μετά από κάθε συνένωση, συγκρίνεται για κάθε προϊόν απομόνωσης για την ταξινόμηση αυτών σε διαφορετικούς τύπους παλμού. Η PFGE αποτελεί την καθιερωμένη πρότυπη μέθοδο (gold standard method) για επιδημιολογικές μελέτες. Το PulseNet είναι μάλιστα ένα δίκτυο που αναπτύχθηκε στην Αμερική και αφορά τα εργαστήρια τροφίμων, μέσω του οποίου βρίσκουν τον υπότυπο των βακτηρίων που έχουν κοινή PFGE και προκαλούν τροφικές λιστεριώσεις (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Τα προφίλ διαφορετικών στελεχών της *Listeria monocytogenes* συλλέγονται σε μία βάση δεδομένων, η οποία επιτρέπει την ταχεία ανίχνευση κοινών περιπτώσεων κρουσμάτων. Έχει χρησιμοποιηθεί μάλιστα ευρέως στην περίπτωση των κρουσμάτων από τυριά και γαλακτοκομικά προϊόντα γενικότερα (Lunden, Tolvanen, & Korkeala, 2004). Το 2001, που σημειώθηκε κρούσμα από τυρί επιχρίσματος στην Ιαπωνία, *Listeria monocytogenes* απομονώθηκε από το 60% των

δειγμάτων κοπράνων των ασθενών, τα προϊόντα απομόνωσης ήταν του ίδιου ορότυπου και έδωσαν σχεδόν πανομοιότυπα μοτίβα PFGE. Το βακτήριο αποκτήθηκε από τους ασθενείς, ως αποτέλεσμα κατανάλωσης μολυσμένων τυριών, τα οποία είχαν βρεθεί σε εργοστάσιο επεξεργασίας, προσβεβλημένα από τον ίδιο ορότυπο της *Listeria monocytogenes* με τους ασθενείς (Makino, et al., 2005). Η τεχνική είναι επίσης βοηθητική στον έλεγχο του βαθμού επιμόλυνσης εντός των εργοστασίων τυριών, τόσο στα ίδια τα προϊόντα, όσο και στο περιβάλλον επεξεργασίας τους, καθώς βρίσκει τον κοινό τύπο PFGE από τα διάφορα τροφικά και περιβαλλοντικά δείγματα, που έχουν επιμολυνθεί από τα ίδια παθογόνα στελέχη του βακτηρίου (Almeida, et al., 2013).

Η μέθοδος αυτή τυποποιείται εύκολα, είναι ευαίσθητη, εντοπίζει γενετικές αλλαγές και ανιχνεύει με επιτυχία στελέχη των ορότυπων 4b της *Listeria monocytogenes*. Ωστόσο, τα μειονεκτήματα της τεχνικής είναι πως απαιτεί εξειδικευμένη εργασία και εξοπλισμό, ακριβά χημικά μέσα, είναι χρονοβόρα και τα αποτελέσματα της είναι δύσκολο να συγκριθούν μεταξύ εργαστηρίων (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

4.2.3 Πολυμορφισμός μήκους θραύσματος DNA με Πολυμερισμό (AFLP)

Η μέθοδος AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) χωρίζει το DNA με δύο περιοριστικά ένζυμα και δίκλωνοι προσαρμογείς με αλληλουχίες συμπληρωματικές στην θέση του περιοριστικού ενζύμου, συνδέονται με τα θραύσματα που παράγονται σε μετουσιωτικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου. Τα θραύσματα αυτά πολυμερίζονται χρησιμοποιώντας PCR και υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς gel. Ωστόσο, η AFLP εμφανίζει ένα πρόβλημα τυποποίησης των στελεχών σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Ο συνδυασμός όμως της AFLP με την PFGE λύνει το παραπάνω πρόβλημα. Η μέθοδος είναι εν γένει ευαίσθητη και αναπαραγωγίμη, αυτοματοποιείται και παρέχει διάκριση επιπέδου στελέχους για την *Listeria monocytogenes* (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Τα ίδια μάλιστα πλεονεκτήματα αναφέρουν και οι Bernini, et al. (2013), οι οποίοι χρησιμοποίησαν αυτοματοποιημένο kit της AFLP για την ανίχνευση *Listeria monocytogenes* σε μπλε τυρί μούχλας, αναφέροντας μάλιστα πως μπορεί κάλλιστα να χρησιμοποιηθεί έναντι της PFGE. Μειονεκτήματα της τεχνικής είναι πως είναι χρονοβόρα και δαπανηρή (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

4.2.4 Πολυμορφισμός μήκους θραύσματος DNA Περιορισμού (RFLP)

Κατά την RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), το DNA χωρίζεται επίσης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). Όπως αναφέρουν

οι Schuchat, Swaminathan, & Broome (1991) χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση HhaI για εξέταση στελεχών *Listeria monocytogenes* ορότυπου 4b από διάφορα κρούσματα της Αμερικής. Η RFLP είχε χρησιμοποιηθεί μάλιστα και για να χαρακτηρίσει τα στελέχη της *Listeria monocytogenes* που είχαν προκαλέσει τα πρώτα κρούσματα λιστερίωσης στην Καλιφόρνια από το τυρί μεξικάνικου τύπου και στην Ελβετία από μαλακό τυρί (Farber & Peterkin, 1991). Ωστόσο, όπως υποστηρίζουν οι Schuchat, Swaminathan, & Broome (1991), η μέθοδος δεν είναι ιδιαίτερα βοηθητική σε επιδημιολογικές έρευνες, παρά τη μεγάλη διακριτική της ικανότητα.

4.3 Μέθοδοι που βασίζονται στην PCR

4.3.1 Τυχαία Πολυμερισμένο Πολυμορφικό DNA (RAPD)

Στην RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) χρησιμοποιούνται αυθαίρετες αλληλουχίες ως απλοί εκκινητές και στοχεύουν σε μία μη καθορισμένη γονιδιακή αλληλουχία, με σκοπό τη δημιουργία γενετικού προφίλ. Η ενίσχυση πραγματοποιείται σε χαμηλή θερμοκρασία ανόπτησης επιτρέποντας τις αναντιστοιχίες, καθώς ο εκκινητής δεσμεύεται ειδικά και μη-ειδικά στο πρότυπο DNA. Παρατηρούνται ορισμένοι πολυμορφισμοί μεταξύ των προφίλ πηκτώματος σχετικών στελεχών. Σαν μέθοδος έχει μικρότερη διακριτική ικανότητα από άλλες, είναι όμως οικονομική, απλή, γρήγορη και χρήσιμη για τυποποίηση ορισμένου αριθμού στελεχών της *Listeria monocytogenes*. Έχει χρησιμοποιηθεί μάλιστα αρκετές φορές για αναλύσεις σε γαλακτοκομικά προϊόντα, διακρίνοντας το παθογόνο σε επίπεδο ορότυπου. Ωστόσο, η αναπαραγωγιμότητα της τεχνικής είναι χαμηλή (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

4.3.2 Επαναλαμβανόμενη Εξωγονιδιακή Παλινδρομική PCR (REP-PCR)

Οι REP παλινδρομικές αλληλουχίες (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR) βρίσκονται στις εξωγενείς περιοχές του γονιδιώματος σε ευθύ ή αντίστροφο προσανατολισμό. Τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία χρησιμοποιούνται ως θέσεις δέσμευσης των εκκινητών REP στο γονιδίωμα. Καθώς υπάρχουν πολλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες σε διαφορετικές τοποθεσίες στο γονιδίωμα, το μέγεθος των θραυσμάτων που δημιουργούνται ποικίλει μεταξύ των στελεχών. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι πως είναι οικονομική, σχετικά γρήγορη και λιγότερο επίπονη σχετικά με άλλες μεθόδους. Ωστόσο, όταν η τεχνική εφαρμόστηκε σε δείγματα ακατέργαστου γάλακτος χύδην σε δεξαμενή, παρατηρήθηκε πως δεν διαφοροποιεί αποτελεσματικά τους ορότυπους 1/2b και 4b, ενώ ως τεχνική γενικότερα χρήζει αυτοματοποίησης (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

4.3.3 Πολυτοπική Ανάλυση Αλληλουχίας DNA (MLST)

Στην MLST (Multi Locus Sequence Typing), επιλέγονται επτά διαφορετικοί τόποι από καθαρά γονίδια του βακτηριακού γονιδιώματος και αναλύονται για διαφορές νουκλεοτιδίων, χρησιμοποιώντας PCR και αυτοματοποιημένη αλληλούχιση. Οι θέσεις των λοιμογόνων τύπων αλληλουχίας απομονώνονται με βάση τις διαφορές στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων μολυσματικότητας. Δεδομένα αλληλουχίας από τα γονίδια παθογένεσης *actA* και *inlA* της *Listeria monocytogenes* αποδείχθηκαν χρήσιμα για τη διάκριση μεταξύ στελεχών του βακτηρίου. Σαν μέθοδος είναι μεν κοστοβόρα και δεν δίνει καλή διάκριση μεταξύ οροτύπων 4b, αλλά επιτρέπει τη φυλογενετική ανάλυση και την αξιόπιστη αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ εργαστηρίων (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

4.3.4 Ανάλυση Μεγέθους Μεταβλητού Αριθμού Πολλαπλών Περιοχών (MLVA)

Η μέθοδος MLVA (Multi Locus Variable number of tandem repeat Analysis) λειτουργεί βάσει της ανίχνευσης διακύμανσης στον αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων σε μια συγκεκριμένη θέση στο γονιδιακό DNA του οργανισμού. Οι εκκινητές PCR είναι σχεδιασμένοι από πλευρικές περιοχές των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Τα προϊόντα PCR για κάθε θέση μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτώματα αγαρόζης, με ακόλουθη μέτρηση μεγέθους των μεμονωμένων θραυσμάτων για την ανίχνευση διαφορών στον αριθμό των αντίγραφων, η οποία θα γίνει είτε με αλληλούχιση, είτε με ηλεκτροφόρηση. Η MLVA είναι μία απλή, γρήγορη, αξιόπιστη και βολική μέθοδος τυποποίησης. Σε συνδυασμό μάλιστα με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς gel και χρήση επισημασμένων εκκινητών, δίνει αποτελέσματα ακόμη και για μέγεθος εμβολίου με *Listeria monocytogenes* 1-5 cfu/ 25g τροφίμου. Αν και αποτελεί πρόσφατη σχετικά μέθοδο, φαίνεται τα αποτελέσματά της να είναι εξίσου αποτελεσματικά με της PFGE (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παγκόσμια ζήτηση για γαλακτοκομικά προϊόντα αναπτύσσεται ραγδαία, λόγω της αύξησης του πληθυσμού και της αγοραστικής ικανότητας αυτού, ενώ νέες τάσεις εμφανίζονται στην αγορά. Όσον αφορά τα τυριά, υπάρχει αυξανόμενη ζήτηση για προϊόντα μεγαλύτερης ευκολίας, όπως έτοιμες κομμένες φέτες τυριού και τριμμένα τυριά, ή προϊόντα φρέσκα και βιολογικά, με ηπιότερη επεξεργασία και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Τέτοια προϊόντα όμως είναι ευάλωτα σε μολύνσεις από την *Listeria monocytogenes*. Άλλες τάσεις της αγοράς αποτελούν και οι πωλήσεις γαλακτοκομικών μέσω διαδικτύου. Ωστόσο, η υγιεινή και η ασφάλεια των προϊόντων αυτών εγείρουν ανησυχία στις μικροβιολογικές έρευνες (Van Bokhorst-Van de Veen, Minor, Zwietering, & Groot, 2015).

Παρόλο που τα τελευταία χρόνια έχει εντατικοποιηθεί η καθαριότητα, η υγιεινή και η διαδικασίες HACCP στις βιομηχανίες τυριών και φαίνεται να έχουν μειωθεί οι πιθανότητες μόλυνσης, η εξάλειψη της *Listeria monocytogenes* παραμένει μία δύσκολη, αν όχι αδύνατη, διαδικασία για τα προϊόντα (Todd & Notermans, 2011). Πολύ σημαντικός είναι ο έλεγχος και τα προληπτικά μέτρα σε όλα τα στάδια της τροφικής αλυσίδας, ξεκινώντας από την πρωτογενή παραγωγή και την επεξεργασία των τυριών, καταλήγοντας στο λιανικό εμπόριο και τους τελικούς καταναλωτές (Farber & Peterkin, 1991).

Πέραν των προληπτικών τακτικών, μεγάλη σημασία έχουν και τα μέτρα περιορισμού και αντιμετώπισης, εφόσον εντοπιστεί η παρουσία του μικροοργανισμού στα τυριά. Κρίσιμο ρόλο στην πρόωμη αναγνώριση επιδημιών λιστερίωσης, παίζει η μοριακή ανίχνευση του βακτηρίου, με την PCR να κατέχει εξέχουσα θέση (Niederhauser, et al., 1993), όντας αξιόπιστη και ιδιαίτερα χρήσιμη σε επιδημιολογικές μελέτες, με την χρήση τυποποιημένου πρωτοκόλλου. Εξίσου έμπιστα και γρήγορα αποτελέσματα φαίνεται να δίνει και η PFGE, η οποία είναι πιο πρόσφατη μέθοδος, με πολλές όμως προοπτικές για μελλοντική ευρεία χρήση (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Ωστόσο, οι τεχνικές είναι πολυάριθμες και την κατάλληλη στρατηγική ανίχνευσης και υποτύπωσης της *Listeria monocytogenes*, θα καθορίσει η επιδιωκόμενη εφαρμογή του υπότυπου του βακτηρίου (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012).

Δυστυχώς, τα μέτρα ελέγχου για την *Listeria monocytogenes* επηρεάζονται από τις παγκόσμια διαφορετικές κυβερνητικές πολιτικές σχετικά με την παρουσία του βακτηρίου

στα τυριά και γενικά στα τρόφιμα, πρόβλημα που θα συνεχίσει να υφίσταται, όσο η ελάχιστη μολυσματική δόση του μικροοργανισμού παραμένει άγνωστη (Farber & Peterkin, 1991). Ανησυχία επίσης προκαλεί και η σημασία των λιστεριώσεων στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου δεν έχουν καθοριστεί ακόμα μέτρα παρακολούθησης (Todd & Notermans, 2011).

Προς το παρόν, η λοίμωξη από την *Listeria monocytogenes* φαίνεται να είναι σε χαμηλότερη προτεραιότητα, σε σύγκριση με άλλα προβλήματα δημόσιας υγείας (Todd & Notermans, 2011). Ωστόσο, οι μελλοντικές τάσεις στην αγορά των τυριών και των τροφίμων που μπορούν να μολυνθούν από το βακτήριο, πιθανόν να κάνει την *Listeria monocytogenes* ένα πιο σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία

- Almeida, G., Magalhães, R., Carneiro, L., Santos, I., Silva, J., Ferreira, V., Hogg, T., & Teixeira, P. (2013). Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, *167*, pp. 303-309. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.006>
- Aurolat, A., & Besse, N. (2016). The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. *Food Microbiology*, *53*, pp. 135-149. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.003>
- Baba, H., Kanamori, H., Kakuta, R., Sakurai, H., Oshima, K., Aoyagi, T., & Kaku, M. (2020). Genomic characteristics of *Listeria monocytogenes* causing invasive. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115233>
- Bernini, V., Bottari, B., Dalzini, E., Sgarbi, E., Lazzi, C., Neviani, E., & Gatti, M. (2013). The presence, genetic diversity and behaviour of *Listeria monocytogenes* in blue-veined cheese rinds during the shelf life. *Food Control*, *34*, pp. 323-330. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.015>
- Bernini, V., Dalzini, E., Lazzi, C., Bottari, B., Gatti, M., & Neviani, E. (2016). Cutting procedures might be responsible for *Listeria monocytogenes* contamination of foods: The case of Gorgonzola cheese. *Food Control*, *61*, pp. 54-61. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.021>
- Besse, N., Lombard, B., Guillier, L., François, D., Romero, K., Pierru, S., Bouhier, L., & Rollier, P. (2019). Validation of standard method EN ISO 11290 - Part 1 - Detection of *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, *288*, pp. 13-21. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.024>
- Chon, J.-W., Kim, J.-W., Song, K.-Y., Lim, J.-S., Bae, D., Kim, H., & Seo, K.-H. (2020). Fate and survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 during ripening of cheddar cheeses manufactured from unpasteurized raw milk. *LWT - Food Science and Technology*, *133*, pp. 109-144. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109944>

- Cole, M. B., Jones, M. V., & Holyoak, C. (1990). The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, *69*, pp. 63-72. doi:3121/06/89
- Cui, H., Li, H., Li, C., Abdel-Samie, M. A., & Lin, L. (2020). Inhibition effect of moringa oil on the cheese preservation and its impact on the viability, virulence and genes expression of *Listeria monocytogenes*. *LWT - Food Science and Technology*, *134*, pp. 110-163. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110163
- Den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., Stasiewicz, M.J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L.K., Fortes, E., Nightingale, K.K., Kephart, D. & Wiedmann, M. (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*(6), pp. 1882–1889. doi:10.1099/ijs.0.052720-0
- Desai, A. N., Anyoha, A., Madoff, L. C., & Lassmann, B. (2019). Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of ProMED reports from 1996 to 2018. *International Journal of Infectious Diseases*, *84*, pp. 48-53. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.04.021
- EFSA & ECDC. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, *13*(1), pp. 1-162. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991
- EFSA. (2009). The Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *EFSA Journal*, *223*.
- EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernandez Escamez, P.S., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Norrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Ter Kuile, B., Threlfall, J., Wahlstrom, H., Takkinen, J., Wagner, M., Arcella, D., Da Silva Felicio, M.T., Georgiadis, M., Messens, W., & Lindqvist, R. (2018). Scientific Opinion on the *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for

- human health in the EU. *EFSA Journal* 2018, 16(1). doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5134>
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3), pp. 476-511. doi:0146-0749/91/030476-36\$02.00/0
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *Journal of Food Protection*, 77(1), pp. 150-170. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-150
- Filiosis, G., Johansson, A., Frey, J., & Perreten, V. (2009). Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. *Food Control*, 20, pp. 314-317. doi:10.1016/j.foodcont.2008.05.018
- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A. R., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., & Debevere, J. (2006). Effect of environmental parameters (temperature, pH, aw) on the individual cell lag phase and generation time of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 108, pp. 326-335. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.017
- Gianfranceschi, M. V., Rodriguez-Lazaro, D., Hernandez, M., González-García, P., Comin, D., Gattuso, A., Delibato, E., Sonnessa, M., Pasquali, F., Prencipe, V., Sreter-Lancz, Z., Saiz-Abajo, M.J., Pérez-De-Juan, J., Butrón, J., Olsen, J.E., De Santis, P., Lovari, S., Bertasi, B., Pavoni, E., Paiusco, A., De Cesare, A., Manfreda, G. & De Medici, D. (2014). European validation of a real-time PCR-based method for detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 184, pp. 128-133. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.021>
- Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E., & Alwan, N. (2009). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. *Science of the Total Environment*, 407, pp. 4022-4027. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.010>

- Hof, H. (2003). History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, pp. 199-202. doi:10.1016/S0928-8244(02)00471-6
- Jackson, K. A., Gould, L. H., Hunter, J. C., Kucero, Z., & Jackson, B. (2018). Listeriosis outbreaks associated with soft cheeses, United States, 1998-2014. *Emerg. Infectious Diseases*, 24(6), pp. 1116–1118. doi:file://dx.doi.org/10.3201%2Fcid2406.171051
- Jadhav, S., Bhave, M., & Palombo, E. A. (2012). Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 88, pp. 327-341. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.01.002
- Lahou, E., & Uyttendaele, M. (2017). Growth potential of *Listeria monocytogenes* in soft, semi-soft and semihard artisanal cheeses after post-processing contamination in deli retail establishments. *Food Control*, 76, pp. 13-23. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.033
- Lepe, J. A. (2020). Current aspects of listeriosis. *Medicina Clinica*, 154(11), pp. 453-458. doi:2387-0206/
- Lunden, J., Tolvanen, R., & Korkeala, H. (2004). Human Listeriosis Outbreaks Linked to Dairy Products in Europe. *Journal of Dairy Science*, 87, pp. 6-11. Retrieved November 23, 2020
- Lungu, B., Ricke, S. C., & Johnson, M. G. (2009). Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe*, 15, pp. 7-17. doi:10.1016/j.anaerobe.2008.08.001
- Makino, S. I., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S., & Igimi, S. (2005). An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *International Journal of Food Microbiology*, 104, pp. 189 – 196. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.009
- Martin, S. E., & Fisher, C. W. (1999). *LISTERIA, Listeria monocytogenes*. In Anonymous, *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 1228-1238). Illinois, Urbana, USA: Academic Press. doi:https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0965

- Martinez-Rios, V., & Dalgaard, P. (2018). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. *Food Control*, *84*, pp. 205-214. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.020>
- Martinez-Rios, V., Gkogka, E., & Dalgaard, P. (2020). Predicting growth of *Listeria monocytogenes* at dynamic conditions during manufacturing, ripening and storage of cheeses – Evaluation and application of models. *Food Microbiology*, *92*, pp. 103-578. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103578>
- Martinez-Rios, V., Jorgensen, M. O., Koukou, I., & Gkogka, E. (2019). Growth and growth boundary model with terms for melting salts to predict growth responses of *Listeria monocytogenes* in spreadable processed cheese. *Food Microbiology*, *84*, pp. 103-255. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103255>
- Niederhauser, C., Hofelein, C., Luthy, J., Kaufmann, U., Buhler, H. P., & Candrian, U. (1993). Comparison of “Gen Probe” DNA probe and PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated soft cheese and semi-soft cheese. *Res. Microbiology*, *144*, pp. 47-54. Retrieved January 9, 2021
- Okpo, E., Leith, J., Smith-Palmer, A., Bell, J., Parks, D., Browning, F., Byers, L., Corrigan, H., Webster, D., Karcher, A.M., Murray, A. & Storey, T. (2015). An outbreak of an unusual strain of *Listeria monocytogenes* infection in North-East Scotland. *Journal of Infection and Public Health*, *8*, pp. 612-618. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2015.05.009>
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., & Almeida, R. A. (2005). Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, *2*(2). doi:83.212.64.123
- Orsi, R. H., Den Bakker, H. C., & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, *301*, pp. 79-96. doi:10.1016/j.ijmm.2010.05.002
- Paduro, C., Montero, D. A., Chamorro, N., Carreño, L. J., Vidal, M., & Vidal, R. (2020). Ten years of molecular epidemiology surveillance of *Listeria monocytogenes* in Chile 2008–2017. *Food Microbiology*, *85*, pp. 103-280. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103280>

- Pagotto, F. J., & Farber, J. M. (2003). *LISTERIA* - Listeriosis. In B. Caballero, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second ed., pp. 3582-3588). Baltimore: Academic Press. Retrieved November 12, 2020
- Panebianco, F., Giarratana, F., Caridi, A., Sidari, R., De Bruno, A., & Giuffrida, A. (2020). Lactic acid bacteria isolated from traditional Italian dairy products: activity against *Listeria monocytogenes* and modelling of microbial competition in soft cheese. *LWT - Food Science and Technology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110446>
- Pini, P. N., & Gilbert, R. J. (1988). The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 6, pp. 317-326. doi:0168-1605/88/\$03 50
- Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., & Griffiths, M. W. (1998). Survival of Bioluminescent *Listeria monocytogenes* and Escherichia coli 0157:H7 in Soft Cheeses. *Journal of Dairy Science*, 81(7), pp. 1810-1817. Retrieved November 26, 2020
- Robinson, T. P., Ocio, M. J., Kaloti, A., & Mackey, B. M. (1998). The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 44, pp. 83–92. doi:0168-1605/98
- Rollier, P., Lombard, B., Guillier, L., François, D., Romero, K., Pierru, S., . . . Besse, N. G. (2019). Validation of standard method EN ISO 11290 - Part 2 for the enumeration of *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 288, pp. 22-31. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.023>
- Rudolf, M., & Scherer, S. (2001). High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 63, pp. 91–98. Retrieved November 26, 2020, from <http://www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro>
- Ryser, E. T. (2002). *Listeria monocytogenes*. In Anonymous, *Encyclopedia of Dairy Science* (pp. 1650-1655). Michigan State University, East Lansing, USA: Elsevier Science Ltd. doi:<https://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00276-5>
- Ryser, E. T., & Marth, E. H. (2007). *Listeria, Listeriosis and Food Safety* (Third ed.). London: CRC Press. Retrieved November 26, 2020, from

<https://www.google.com/books?hl=el&lr=&id=NZsS6tbSAFYC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Listeria,+Listeriosis+and+Food+Safety&ots=3vGz9eRjU7&sig=S0Y0e9jRHe-8Uxu7xOMHTrzwyLA>

- Schlech, W. F. (2000). Foodborne Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases, Special Section: Food Safety*, 31, pp. 770-775. Retrieved November 18, 2020, from <https://academic.oup.com/cid/article/31/3/770/298078>
- Schuchat, A., Swaminathan, B., & Broome, C. V. (1991). Epidemiology of Human Listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(2), pp. 169-183. Retrieved November 18, 2020, from <http://cmr.asm.org/>
- Scotter, S. L., Langton, S., Lombard, B., Schulten, S., Nagelkerke, N., In't Veld, P. H., Rollier, P., & Lahellec, C. (2001). Validation of ISO method 11290 Part 1 - Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 64, pp. 295–306. doi:0168-1605/01
- Stout, A., Stelten-Carlson, A. V., Marquis, H., Ballou, M., Reilly, B., Loneragan, G. H., Nightingale, K. & Ivanek, R. (2019). Public health impact of foodborne exposure to naturally occurring virulence-attenuated *Listeria monocytogenes*: inference from mouse and mathematical models. *Interface Focus*, 10. doi:<http://dx.doi.org/10.1098/rsfs.2019.0046>
- Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9, pp. 1236-1243. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.011
- Tirloni, E., Bernardi, C., Rosshaug, P. S., & Stella, S. (2019). Potential growth of *Listeria monocytogenes* in Italian mozzarella cheese as affected by microbiological and chemical-physical environment. *Journal of Dairy Science*, 102, pp. 4913–4924. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2018-15991>
- Todd, E. D., & Notermans, S. (2011). Surveillance of listeriosis and its causative pathogen *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 22, pp. 1484-1490. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.021>
- Valero, A., Hernández, M., Esteban-Carbonero, Ó., & Rodríguez-Lázaro, D. (2018). Modelling the fate and serogroup variability of persistent *Listeria monocytogenes* strains on grated cheese at different storage temperatures. *International Journal*

of Food Microbiology, 286, pp. 48-54.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.021>

Van Bokhorst-Van de Veen, H., Minor, M., Zwietering, M., & Groot, M. N. (2015). *Microbial Hazards in Dairy Chain*. Wageningen: UR Food & Biobased Research. Retrieved November 26, 2020

Ελληνική Βιβλιογραφία

Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2010). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. (Β. Σπηλιώτης, & Ι. Γιαβάσης, Επιμ.). Σελ. 53-77, 191-209. Αθήνα: Ίων.

Γαΐτης, Φ. (2010). *Μικροβιολογικά Κριτήρια για τα Τρόφιμα*. (Σελ. 176-180). Αθήνα: Έμβρυο.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα (2005). *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*. Retrieved Νοεμβρίου 25, 2020

Κεχαγιάς, Χ., & Τσάκαλη, Ε. (2017). *Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων*. (Σελ. 116-125, 235-250). Αθήνα: Εκδόσεις Νέων Τεχνολογιών.

Τυμπής, Δ., Πετράκης, Ε., & Κοντελής, Σ. (2016). *Μικροβιολογία τροφίμων. Μεθοδολογία και τεχνικές αναλύσεων. Απομόνωση και Ταυτοποίηση *Listeria monocytogenes* σε τρόφιμα* (Σελ. 105-111). Αθήνα: Δίσιγμα.