



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΠΟΤΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μοντελοποίηση της παραλλακτικότητας των οριακών συνθηκών θερμοκρασίας
(T°C) για την ανάπτυξη στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού
Listeria monocytogenes

Ελένη Γ. Φιλίππου

Επιβλέπων Καθηγητής:

Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2022

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΠΟΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μοντελοποίηση της παραλλακτικότητας των οριακών συνθηκών θερμοκρασίας (ToC) για την ανάπτυξη στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

Modelling the variability of the cardinal parameters of temperature (ToC) that allow growth for *Listeria monocytogenes* strains

Ελένη Γ. Φιλίππου

Εξεταστική Επιτροπή:

Σκανδάμης Ν. Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Δροσινός Χ. Ελευθέριος, Καθηγητής ΓΠΑ

Πανάγου Ζ. Ευστάθιος, Καθηγητής ΓΠΑ

Μοντελοποίηση της παραλλακτικότητας των οριακών συνθηκών θερμοκρασίας (T°C) για την ανάπτυξη στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων & Ποτών

Περίληψη

Τις τελευταίες δεκαετίες ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* έχει απασχολήσει επανειλημμένα τον κλάδο των Τροφίμων και την επιστημονική κοινότητα. Η ικανότητά του να αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών, τα μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας στις ευάλωτες πληθυσμιακές ομάδες και το υψηλό οικονομικό κόστος που απαιτεί η αντιμετώπισή του, τον καθιστούν μία από τις μεγαλύτερες απειλές για την υγεία των καταναλωτών.

Ο έλεγχος της απειλής αυτής αποδεικνύεται πως είναι ιδιαίτερα σύνθετος καθώς ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός παρουσιάζει μεγάλη γενετική και φαινοτυπική παραλλακτικότητα μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του. Η Μικροβιολογία Πρόρρησης και ειδικότερα τα μαθηματικά μοντέλα, όντας σημαντικά εργαλεία διαφύλαξης της δημόσιας υγείας, είναι σημαντικό να μπορούν ενσωματώσουν αυτή την διαστελεχική παραλλακτικότητα κατά την εξαγωγή των αποτελεσμάτων τους έτσι ώστε αυτά να είναι όσο πιο αντιπροσωπευτικά και ρεαλιστικά γίνεται.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε και μοντελοποιήθηκε η παραλλακτικότητα των οριακών συνθηκών θερμοκρασίας που επιτρέπουν την ανάπτυξη για 30 απομονώσεις *L. monocytogenes* που προήλθαν από τρόφιμα και επιφάνειες ελληνικών βιομηχανιών επεξεργασίας κρέατος. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι πειραματικά δεδομένα κινητικής συμπεριφοράς που προέρχονται από την καταγραφή της μεταβολής της οπτικής πυκνότητας των καλλιιεργειών των απομονώσεων μπορούν να αντικαταστήσουν εκείνα που προέρχονται από μεθόδους κλασσικής μικροβιολογίας όπως η καταμέτρηση αποικιών σε τρυβλία, μειώνοντας έτσι σημαντικά τον χρόνο που απαιτείται για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μοντέλου. Τέλος, η παραλλακτικότητα των οριακών τιμών θερμοκρασίας ποσοτικοποιήθηκε κατά τον υπολογισμό του μέγιστου ρυθμού αύξησης για τις απομονώσεις αυτές για την θερμοκρασία των 8°C και τελικά μεταφράστηκε σε μεγάλες λογαριθμικές διαφορές κατά την πρόβλεψη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού στο κρέας.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, Διαστελεχική παραλλακτικότητα, Οριακές συνθήκες, Θερμοκρασία

Modelling the variability of the cardinal parameters of temperature (T°C) that allow growth for *Listeria monocytogenes* strains

MSc Food Science & Technology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Quality Control & Hygiene

Abstract

In the past decades the pathogen *Listeria monocytogenes* has repeatedly challenged the Food Sector and the Scientific Community alike. Its ability to grow in a wide range of environmental conditions, the high mortality rates in vulnerable population groups and the big economical funds required for its control make it one of the biggest threats for consumers' health.

Due to the considerable genetic and phenotypic variation among the strains of this particular microorganism, the containment of this threat has proven to be very complicated. It is important that Predictive Microbiology and more specifically predictive mathematical models, which are invaluable tools for the protection of Public Health, take into account this interstrain variability in order for their results to be as representative and realistic as possible.

In this study the inter strain variability pertaining the cardinal parameters of temperature for 30 *L. monocytogenes* isolates was studied and modelled. These strains were isolated from food and surfaces of Greek meat processing plants. In addition, it was shown that Optical Density (O.D.) data describing the kinetics of the bacteria can be used to replace data obtained from Classic Microbiological methods such as plate counts for the estimation of the cardinal values, which makes the process of developing the model considerably less time consuming. Finally, the inter strain variability of the cardinal parameters of temperature resulted in substantial logarithmic differences in the concentration of the microorganism when its growth was modelled at 8°C in meat products.

Scientific area: Food Microbiology

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Inter- strain variability*, *Cardinal values*, *Temperature*

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών και επιβλέποντα της παρούσης εργασίας για την καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα ερευνήτρια του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών κ. Αντωνία Γουναδάκη για την πολύτιμη βοήθειά της τόσο κατά τον σχεδιασμό και την εκτέλεση του πειραματικού μέρους της εργασίας μου όσο και κατά τη συγγραφή της.

Τέλος, ευγνώμων νιώθω απέναντι σε όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου και ιδιαίτερα στις επιστημονικές συνεργάτιδες Δήμητρα Μποζινάκη και Ειρήνη Μεσημέρη που ήταν πάντα πρόθυμες να προσφέρουν τη βοήθεια και τις συμβουλές τους.

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract	4
Ευχαριστίες.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
<i>Listeria monocytogenes</i>	8
Γενικά στοιχεία	8
Ταξινόμηση και Ορολογική τυποποίηση	9
Συνθήκες ανάπτυξης.....	10
<i>L. monocytogenes</i> στο περιβάλλον και τον πρωτογενή τομέα	12
<i>L. monocytogenes</i> στη βιομηχανία τροφίμων	13
<i>L. monocytogenes</i> στα τρόφιμα	14
Απόκριση στην θερμοκρασιακή καταπόνηση	16
Ανθρώπινη Λιστερίωση.....	18
Στοιχεία επιδημιολογίας.....	18
Ευάλωτοι πληθυσμοί.....	21
Μολυσματική Δόση	22
Μηχανισμοί Παθογένειας.....	22
Μολυσματικοί παράγοντες	24
Κλινικά χαρακτηριστικά της λιστερίωσης στον άνθρωπο	26
Ισχύουσα νομοθεσία	27
Διαστελεχική παραλλακτικότητα	28
Ορισμός	28
Διαστελεχική παραλλακτικότητα κατά την αύξηση της <i>L. monocytogenes</i>	28
Διαστελεχική παραλλακτικότητα και QMRA	29
Διαστελεχική παραλλακτικότητα και Challenge tests.....	31
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	33
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
Χαρακτηριστικά βακτηριακών απομονώσεων	34
Συλλογή δεδομένων κινητικής	34
Υπολογισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης (μ_{max}).....	38
Εκτίμηση οριακών τιμών θερμοκρασίας	39
Εξωτερική επαλήθευση (External Validation).....	40

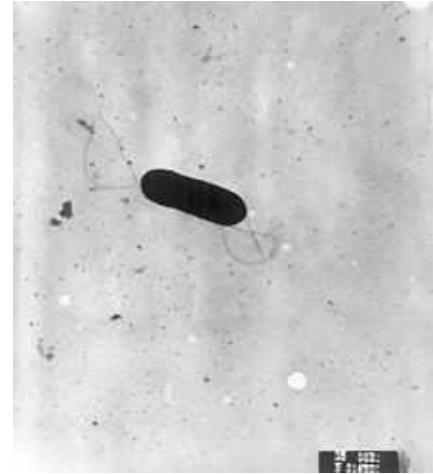
Συσχέτιση της μεθόδου της οπτικής πυκνότητας (O.D.) με τη μέθοδο μέτρησης αποικιών σε τρυβλία για τον υπολογισμό του μέγιστου ρυθμού αύξησης (μ_{max})	40
Προσδιορισμός του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης μέσω καταμέτρησης της αύξησης του μικροβιακού πληθυσμού σε τρυβλία	41
Προσδιορισμός του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης μέσω καταγραφής της οπτικής πυκνότητας με το Bioscreen C.	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
Οριακές τιμές θερμοκρασίας για την ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i>	44
Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών	50
Συσχέτιση δεδομένων O.D – plate counts/Bioscreen	52
Εξωτερική επαλήθευση (External Validation).....	55
Διαστελεχική παραλλακτικότητα στην πρόβλεψη της ανάπτυξης της <i>L. monocytogenes</i> σε εργαστηριακό υπόστρωμα και σε κρέας.	56
Συμπεράσματα	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	61
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I	66
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II	67
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III	68
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV	69

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Listeria monocytogenes

Γενικά στοιχεία

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα προαιρετικά ενδοκυτταρικό βακτήριο που ευθύνεται για την ασθένεια της λιστερίωσης στα ζώα και στους ανθρώπους. Πρόκειται για ένα μη σποριογόνο, θετικό κατά Gram βάκιλο, με μέγεθος 0,5 μm × 0,5-2,0 μm (Magalhães *et al.*, 2014). Απαντάται με τη μορφή μεμονωμένων κυττάρων ή μικρών αλυσίδων και 1-5 περίτριχα μαστίγια του προσδίδουν τη δυνατότητα κίνησης σε χαμηλές θερμοκρασίες (20-25°C). Δίνει θετική αντίδραση στη δοκιμή καταλάσης και αρνητική αντίδραση στη δοκιμή οξειδάσης.



Εικόνα 1: Scanning electron micrograph of *Listeria monocytogenes*.
https://en.wikipedia.org/wiki/Listeria_monocytogenes

Το πρώτο στέλεχος απομονώθηκε το 1924 από τον E.G.D. Murray σε ζώα που παρουσίαζαν σοβαρή μονοκυττάρωση (Dortet *et al.*, 2019). Ο ίδιος αρχικά έδωσε στο βακτήριο το όνομα *Bacterium monocytogenes*. Αργότερα μετονομάστηκε σε *Listerella hepatolytica* και τελικά το 1940 ο Pirie πρότεινε το όνομα *Listeria monocytogenes*, που τελικά εντάχθηκε στη λίστα των εγκεκριμένων βακτηριακών ονομάτων (Approved Lists of Bacterial Names) (Dortet *et al.*, 2019).

Η πρώτη επίσημη αναφορά για κρούσμα λιστερίωσης στον άνθρωπο χρονολογείται στο 1929 (Jay *et al.*, 2005). Ενώ στη βιβλιογραφία της εποχής υπήρχαν αναφορές για τη διάδοσή της μέσω των τροφίμων, μόλις το 1981 επιβεβαιώθηκε πως η *L. monocytogenes* αποτελεί παθογόνο μικροοργανισμό των τροφίμων. Αιτία στάθηκε μία έξαρση κρουσμάτων στον Καναδά, η οποία έπειτα από μελέτη πασχόντων-μαρτύρων (case control study), που συνοδεύτηκε από την αναγνώριση του εμπλεκόμενου στελέχους, αποκάλυψε ότι μία σαλάτα coleslaw τοπικής παραγωγής ήταν το πιθανότερο μέσο μετάδοσης της ασθένειας.

Αν και η συχνότητα εμφάνισης της ανθρώπινης λιστερίωσης είναι σχετικά χαμηλή, το μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας (20-30%) (Lomonaco *et al.*, 2015) καθώς και το υψηλό οικονομικό κόστος, που επιφέρει η αντιμετώπισή της, την καθιστούν μία σοβαρή απειλή για την δημόσια υγεία. Γι' αυτό το λόγο τα τελευταία χρόνια έχει συγκεντρώσει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον.

Ταξινόμηση και Ορολογική τυποποίηση

Το γένος *Listeria* ανήκει στο φύλο των Firmicutes. Βάσει δεδομένων που έχουν προκύψει από την αλληλούχηση του 16S RNA, τοποθετείται πιο κοντά στο γένος *Brochothrix* (Jay *et al.*, 2005), σε μία ευρύτερη ομάδα που περιλαμβάνει επιπλέον τα γένη *Carnobacterium*, *Caryophanon*, *Erysipelothrix*, *Kurthia*, *Lactobacillus* και *Renibacterium*. Χαρακτηριστικό αυτής την ομάδας είναι ότι το ποσοστό αζωτούχων βάσεων G+C στο DNA των μικροοργανισμών είναι λιγότερο από το 50%.

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει 20 είδη, μερικά εκ των οποίων είναι: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *L. ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis* και *L. fleischmannii* (Nwaiwu, 2020). Από αυτά, μόνο τα *L. monocytogenes* και *Listeria ivanovii* είναι παθογόνα με το πρώτο να αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία και το δεύτερο να πλήττει κατά κύριο λόγο οικόσιτα ζώα.

Συχνά, κατά την παρακολούθηση της δημόσιας υγείας ή κατά την διερεύνηση εξάρσεων κρουσμάτων, έχει παρουσιαστεί η ανάγκη τα βακτήρια του είδους *L. monocytogenes* να διαφοροποιηθούν περαιτέρω. Τα προηγούμενα χρόνια χρησιμοποιούνταν κατά κύριο λόγο ανοσολογικές μέθοδοι που βασιζόνταν στην συγκόλληση αντισωμάτων σε ορισμένα σωματικά αντιγόνα (O) και αντιγόνα μαστιγίου (H). Μ' αυτόν τον τρόπο διακρίθηκαν 13 διαφορετικοί ορότυποι, οι οποίοι ανήκουν σε 4 εξελικτικές καταγωγές (lineages). Ωστόσο, επιδημιολογικά στοιχεία φανερώνουν ότι για το 90 % περίπου των ανθρώπινων λιστεριώσεων ευθύνονται μόνο τρεις ορότυποι (1/2a, 1/2b και 4b). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι οι παραπάνω μέθοδοι έχουν μεγάλο κόστος, απαιτούν ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό, έχουν χαμηλή διακριτική ικανότητα και σε κάποιες περιπτώσεις μη επαρκή επαναληψιμότητα, οδήγησε στην αναζήτηση νέων μεθόδων.

Έτσι, από το 1989 και μετά έχουν εφαρμοστεί ποικίλοι τρόποι μοριακής τυποποίησης όπως η Ισοενζυμική Πολυεστιακή Ηλεκτροφόρηση (Multilocus Enzyme Electrophoresis, MLEE), η PCR-Ριβοτυπία (Ribotyping) και Ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulse-Field Gel Electrophoresis, PFGE). Μάλιστα, η τεχνική PFGE μέχρι πρόσφατα αποτελούσε τη βασική μέθοδο τυποποίησης κατά τη διερεύνηση εξάρσεων αλλά και κατά την αντιστοίχιση δεδομένων με διεθνείς πλατφόρμες, όπως την PulseNet του CDC (Disease Control and Prevention Center). Και ενώ αυτή η μέθοδος έχει πράγματι βελτιωμένη διακριτική ικανότητα, εξακολουθεί να είναι αρκετά απαιτητική και χρονοβόρα (Doumith *et al.*, 2004).

Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί μία πληθώρα νέων μοριακών τεχνικών τυποποίησης της *L. monocytogenes*, όπως Τυποποίηση Πολυτοπικής Αλληλούχησης (Multilocus sequence typing, MLST), η Multivirulence-locus Sequence Typing, η Ανάλυση Μακροσυστοιχιών (macroarray analyses) και η Αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS). Πιο συγκεκριμένα, η MLST διακρίνει τις απομονώσεις του είδους *L. Monocytogenes* σε τέσσερις κατηγορίες (Κλωνικά σύμπλοκα, Clonal Complexes) ανάλογα με τη μολυσματικότητά τους ενώ το WGS (αν και είναι ακόμα υπό ανάπτυξη) έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρότατο εργαλείο κατά τη διεξαγωγή επιδημιολογικών ερευνών (βλ. Στοιχεία Επιδημιολογίας).

Τέλος, οι Doumith *et al.* (2004) ανέπτυξαν μία εξαιρετικά χρήσιμη τεχνική, η οποία βασίζεται στην ενίσχυση τεσσάρων γονιδίων-στόχων ταυτόχρονα (Multiplex PCR), με σκοπό το διαχωρισμό των 4 βασικών οροτύπων της *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b) στις εξής 4 διακριτές ομάδες:

- **Οροομάδα I** (ορότυποι 1/2a και 3a)
- **Οροομάδα II** (ορότυποι 1/2c και 3c)
- **Οροομάδα III** (ορότυποι 1/2b, 3b και 7)
- **Οροομάδα IV** (ορότυποι 4b, 4d και 4e)

Με τη συγκεκριμένη τεχνική δεν είναι δυνατός ο διαχωρισμός των οροτύπων μέσα στην ίδια οροομάδα αλλά ούτε και ο διαχωρισμός των οροτύπων 4a και 4c από άλλα είδη του γένους *Listeria* (Doumith *et al.*, 2004). Ωστόσο, οι ορότυποι 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d, και 7 απομονώνονται σπάνια από τρόφιμα και δύσκολα συσχετίζονται με κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης.

Συνθήκες ανάπτυξης

Η *L. monocytogenes* φημίζεται για την ικανότητά της να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών:

Ατμόσφαιρα

Η *L. monocytogenes* είναι ένας προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός που μπορεί να αντέξει έως και 20% συγκέντρωση CO₂. Ωστόσο όταν η συγκέντρωση αυτή υπερβεί το 50% θεωρείται ανασταλτική (Magalhães *et al.*, 2014).

Θερμοκρασία

Η *L. monocytogenes* είναι ένας ψυχρότροφος μικροοργανισμός. Το εύρος θερμοκρασίας που επιτρέπει την αύξησή της είναι 1-45 °C με τη βέλτιστη αύξηση να παρατηρείται μεταξύ 30-37 °C. Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες του 0 °C τα βακτήρια αυτά είναι δυνατόν να επιβιώσουν ή να απενεργοποιηθούν. Γενικά, θεωρείται από τους πιο ανθεκτικούς στην κατάψυξη παθογόνους μικροοργανισμούς των τροφίμων και η επιβίωση ή ο τραυματισμός υπό αυτές τις συνθήκες εξαρτάται από το θρεπτικό υπόστρωμα και το ρυθμό κατάψυξης (Doyle and Buchanan (Eds), 2013). Είναι χαρακτηριστικό ότι ο αριθμός των κυττάρων του στελέχους Scott A που εμβολιάστηκε σε παγωτό δεν μεταβλήθηκε κατά την αποθήκευσή του στους -18 °C για 5 μήνες (Magalhães *et al.*, 2014). Στις χαμηλότερες θερμοκρασίες του εύρους ανάπτυξης, ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού είναι σημαντικά μειωμένος, ενώ αυξάνεται δραματικά με την αύξηση της θερμοκρασίας. Τέλος, οι 60 °C θανατώνουν την *L. monocytogenes*, γεγονός που καθιστά την παστερίωση μία αποτελεσματική μέθοδο εξάλειψης των συγκεκριμένων βακτηρίων σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Dortet *et al.*, 2019).

pH

Το εύρος του pH στο οποίο παρατηρείται αύξηση της *L. monocytogenes* είναι 5,6 - 9, ωστόσο τα βακτήρια αυτά μπορούν να ξεκινήσουν να αναπτύσσονται σε εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα, ακόμα και σε pH 4,4 (Doyle and Buchanan (Eds), 2013). Σε pH 4,3 ο μικροοργανισμός επιβιώνει αλλά δεν αναπτύσσεται (Doyle and Buchanan (Eds), 2013). Γενικά, οι ελάχιστες τιμές pH που επιτρέπουν την αύξηση εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία και ο χρόνος επώασης, η συγκέντρωση NaCl, η ενεργότητα ύδατος, η παρουσία οξέων ή άλλων αναστολέων. Η βέλτιστη αύξηση παρατηρείται σε pH 7 σε συγκέντρωση NaCl 0,5% (Jay *et al.*, 2005).

Ενεργότητα Ύδατος (a_w)

Για τα περισσότερα στελέχη της *L. monocytogenes* η βέλτιστη και η ελάχιστη τιμή ενεργότητας ύδατος που επιτρέπει την αύξηση είναι 0.97 και 0.93 αντίστοιχα. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη δύνανται να αναπτυχθούν και σε χαμηλότερες τιμές, μέχρι δηλαδή και 0.90. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι το βακτήριο μπορεί να επιβιώσει για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε πολύ χαμηλότερες τιμές ενεργότητας ύδατος (μέχρι και 0.83) (Jay *et al.*, 2005) αλλά και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (25.5%,) ειδικά όταν βρίσκεται υπό ψύξη (Skandamis, 2020), γι' αυτό αποτελεί σοβαρή απειλή σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις που διαχειρίζονται γαλακτοκομικά προϊόντα.

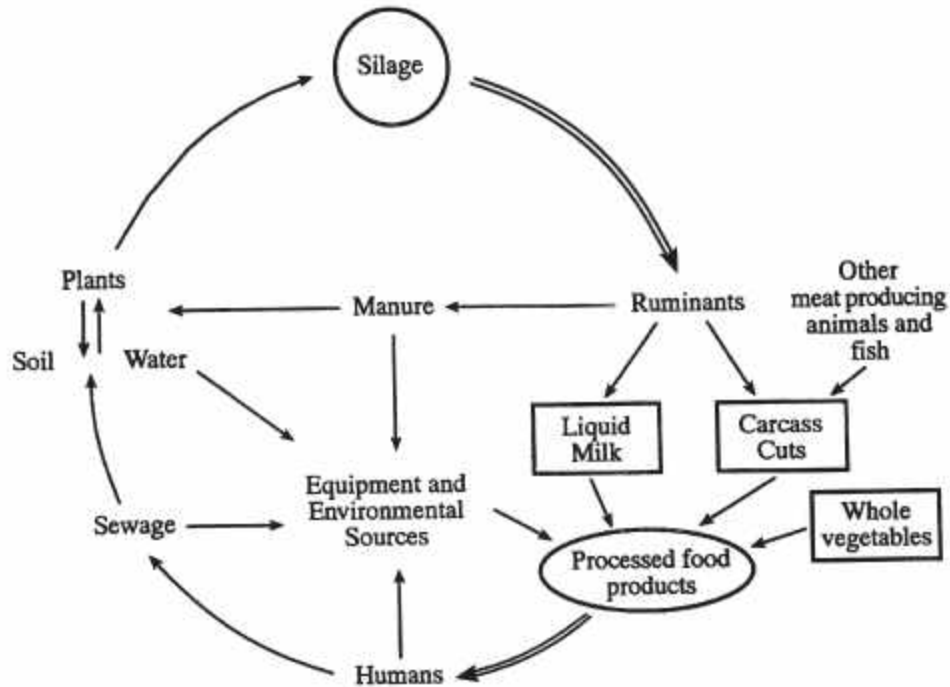
Θρεπτικά συστατικά

Οι ανάγκες της *L. monocytogenes* σε θρεπτικά συστατικά προσομοιάζουν στις ανάγκες όλων των υπολοίπων θετικών κατά Gram βακτηρίων (Jay *et al.*, 2005). Σε εργαστηριακές συνθήκες αναπτύσσονται σε κλασικά υγρά θρεπτικά υλικά όπως BHI (Brain Heart Infusion), Blood added gelosis ή αλλιώς Luria broth (LB) και Trypticase Soy Broth (TSB). Τουλάχιστον 4 βιταμίνες του συμπλέγματος Β είναι απαραίτητες (Βιοτίνη, ριβοφλαβίνη, θειαμίνη και λιποϊκό οξύ), καθώς και τα αμινοξέα κυστεΐνη, γλουταμίνη, ισολευκίνη, λευκίνη και βαλίνη (Jay *et al.*, 2005). Πέρα από αυτά, τα βακτήρια του είδους *L. monocytogenes* είναι ομοζυμωτικά και καταβολίζουν τη γλυκόζη μέσω της οδού Embden-Meyerhof-Parnas.

L. monocytogenes στο περιβάλλον και τον πρωτογενή τομέα

Η *L. monocytogenes* είναι ένας ευρύτατα διαδεδομένος μικροοργανισμός, τόσο σε αγροτικές όσο και αστικές περιοχές. Έχει απομονωθεί από το φυσικό περιβάλλον, το χώμα, το νερό, από οργανική ύλη σε αποσύνθεση, κόπρανα και ιστούς ανθρώπων και ζώων, εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων (Quereda *et al.*, 2021). Ενδεικτικά, σε παράκτιες περιοχές της Καλιφόρνιας το 62% 37 δειγμάτων γλυκού ή χαμηλής αλατότητας νερού και το 17,4% 46 δειγμάτων ιζήματος ήταν θετικά στην παρουσία του βακτηρίου (Jay *et al.*, 2005).

Στον πρωτογενή τομέα, εντοπίζεται κυρίως στο χώμα αν και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (Matle *et al.*, 2020). Μάλιστα, έχει δειχθεί ότι μπορεί να επιβιώσει εκεί για περισσότερες από 295 ημέρες (Jay *et al.*, 2005) και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ακόμα και ανάπτυξη (Matle *et al.*, 2020). Σε επόμενο στάδιο, η επαφή του χώματος, που λειτουργεί ως απόθεμα του μικροβιακού πληθυσμού, με τα ζώα αλλά και τα αγροτικά προϊόντα εισάγει το βακτήριο στην αλυσίδα παραγωγής. Πέρα απ' αυτό όμως, η διασπορά του μικροοργανισμού σε μηρυκαστικά ζώα μέσω μολυσμένης τροφής είναι γνωστή εδώ και αρκετά χρόνια με την ονομασία «κυκλική ασθένεια» (circling disease). Ακατάλληλα ζυμωμένες ζωοτροφές (silage) αποτελούν πηγή θρεπτικών συστατικών για το βακτήριο το οποίο καταναλώνεται από τα ζώα και στη συνέχεια μέσω της κοπριάς εισέρχεται εκ νέου στο περιβάλλον (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Πιθανές οδοί διάδοσης του βακτηρίου *L. monocytogenes* (Doyle and Buchanan (Eds), 2013).

L. monocytogenes στη βιομηχανία τροφίμων

Η είσοδος του μικροοργανισμού στις βιομηχανίες τροφίμων συνήθως πραγματοποιείται μέσω διασταυρούμενης μόλυνσης από τους ίδιους τους εργάτες (υποδήματα και ενδυμασία), από την μεταφορά πρώτων υλών φυτικής και ζωικής προέλευσης, αλλά και από υγιείς ασυμπτωματικούς φορείς. Η υψηλή υγρασία και η παρουσία θρεπτικών συστατικών σε αυτούς τους χώρους ευνοεί την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Doyle and Buchanan (Eds), 2013). Επιπλέον, το συγκεκριμένο βακτήριο διαθέτει την ικανότητα να προσκολλάται σε επιφάνειες, όπως ανοξείδωτο ατσάλι, γυαλί, πλαστικό και να δημιουργεί βιοϋμένια. Αυτά είναι εξαιρετικά δύσκολο να απομακρυνθούν και μπορεί να παραμείνουν στις εγκαταστάσεις για μεγάλα χρονικά διαστήματα (ακόμα και χρόνια), αποτελώντας μια συνεχή απειλή για την ασφάλεια των παραγόμενων προϊόντων. Έχει, τέλος, αποδειχθεί ότι τα βακτήρια του γένους *Listeria* μπορούν να επιβιώσουν μετά το πλύσιμο των χεριών αλλά και στα σωματίδια του αέρα (Doyle and Buchanan (Eds), 2013).

Διάφορες θεωρίες έχουν διατυπωθεί με σκοπό να εξηγήσουν την επίμονη παρουσία της *L. monocytogenes* ακόμα και σε εγκαταστάσεις που διατηρούν τα προβλεπόμενα προγράμματα καθαρισμού και απολύμανσης. Ορισμένοι αποδίδουν την «ανθεκτικότητα» αυτή στην ανικανότητα των

συμβατικών απολυμαντικών να εισχωρήσουν στα δύσκολα σημεία που μπορεί να βρίσκεται το βακτήριο και άρα να το εξουδετερώσουν εκεί, υποστηρίζοντας ότι η *L. monocytogenes* δε διαθέτει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά συγκριτικά με άλλα είδη και άρα δε διαφέρει ως προς την αντίσταση που παρουσιάζει στα απολυμαντικά (Carpentier and Cerf, 2011). Από την άλλη, οι Mereghetti *et al.* (2000) αφού εξέτασαν 97 διαφορετικά στελέχη ως προς την αντοχή τους στα συμβατικά απολυμαντικά τύπου QAC (Quaternary Ammonium Compounds), διαπίστωσαν ότι τα 7 απ' αυτά είχαν υψηλή ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC), καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι αυτή η ανθεκτικότητα θα μπορούσε να εξηγήσει την επίμονη παρουσία του μικροοργανισμού σε ορισμένες εγκαταστάσεις. Σε γενικές γραμμές, οι περισσότεροι καταλήγουν στο ότι η εναλλαγή μεταξύ διάφορων απολυμαντικών και η χρήση των κατάλληλων συγκεντρώσεων αυτών, σε συνδυασμό με την ευλαβική τήρηση των προγραμμάτων απολύμανσης, είναι η ορθότερη γραμμή δράσης για τον έλεγχο του βακτηρίου.

L. monocytogenes στα τρόφιμα

Τα τρόφιμα που έχουν συσχετιστεί με τις μεγαλύτερες εξάρσεις κρουσμάτων ανθρώπινης λιστερίωσης είναι τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Ready to Eat, RTE) που:

- επιτρέπουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.
- καταναλώνονται χωρίς να προηγηθεί κάποια θερμική επεξεργασία
- διατηρούνται υπό ψύξη για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Σ' αυτή τη κατηγορία τροφίμων ανήκουν γαλακτοκομικά προϊόντα που παρασκευάζονται από μη παστεριωμένο γάλα, όπως μαλακά τυριά, παρασκευάσματα κρέατος, καπνιστά ψάρια και ορισμένα θαλασσινά. Εξάρσεις κρουσμάτων έχουν συνδεθεί και με φρέσκα φρούτα και λαχανικά και αποδίδονται συνήθως σε μολυσμένο εργοστασιακό εξοπλισμό όπως μηχανές κοπής ή ξεφλουδίσματος.

Κατά την περίοδο 2010-2011, υπό την επίβλεψη της EFSA (European Food Safety Authority), έλαβε χώρα μία εκτεταμένη έρευνα που αποσκοπούσε στη μελέτη της παρουσίας της *L. monocytogenes* σε ορισμένα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα στο επίπεδο του λιανικού εμπορίου (European Food Safety Authority, 2013). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 10,3% των δειγμάτων που προήλθαν από ιχθυρά, το 2,07% των δειγμάτων που προήλθαν από προϊόντα κρέατος και το 0,47% των δειγμάτων που προήλθαν από μαλακά και ημι-μαλακά τυριά ήταν μολυσμένα στο τέλος της διάρκειας ζωής τους στο ράφι. Σε μία αντίστοιχη έρευνα στις Ηνωμένες Πολιτείες που πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο 2010-2013 από φορείς όπως USDA ARS, FDA και USDA FSIS σε συνεργασία με διάφορα Πανεπιστήμια,

το ποσοστό των θετικών δειγμάτων ήταν 0,30% για τα ιχθυρά, 0,19% για τα συσκευασμένα προϊόντα αλλαντικών και 1,07% για τα μαλακά και ημι-μαλακά τυριά (Luchansky *et al.*, 2017).

Είναι δε χαρακτηριστικό ότι πολλές μελέτες που διερευνούν την παρουσία του βακτηρίου σε διάφορα RTE προϊόντα δείχνουν την επικράτηση των οροτύπων 1/2a και 1/2b στα δείγματα τροφίμων. Ακολουθούν σε συχνότητα οι ορότυποι 1/2c και 4b, ενώ λιγότερο συχνά απομονώνεται και ο ορότυπος 3b (Lianou and Sofos, 2007).

Η *L. monocytogenes* στο κρέας

Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π., άρθρο 88) ορίζει ως:

- «Κρέας»: τα αυτοτελή σώματα ή τμήματα σωμάτων των θερμόαιμων ζώων ή πτηνών κατάλληλα προς διατροφή του ανθρώπου και διατιθέμενα στην κατανάλωση ως έχουν χωρίς καμία επεξεργασία εκτός της ψύξης.
- «Παρασκευάσματα κρέατος»: το νωπό κρέας, συμπεριλαμβανομένου του κρέατος που έχει μετατραπεί σε τεμάχια, στο οποίο έχουν προστεθεί τρόφιμα, καρυκεύματα ή πρόσθετα ή το οποίο έχει υποβληθεί σε μεταποίηση που δεν μεταβάλλει την εσωτερική δομή των μυϊκών ινών του κρέατος και, κατά συνέπεια, δεν εξαφανίζει τα χαρακτηριστικά του νωπού κρέατος.

Και οι δύο παραπάνω κατηγορίες περιλαμβάνουν τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε νερό, πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες, γεγονός που τα καθιστά μεγάλης θρεπτικής αξίας και ταυτόχρονα ιδιαίτερα ευπαθή και ευαίσθητα ως προς την ανάπτυξη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών.

Τη στιγμή της θανάτωσης οι εσωτερικοί ιστοί των υγιών ζώων θεωρείται ότι είναι στείροι ή σχεδόν στείροι. Η μόλυνση συνήθως συμβαίνει στην επιφάνειά τους κατά τη διάρκεια της σφαγής ή των μετέπειτα χειρισμών και στη συνέχεια μπορεί να επεκταθεί κατά την επεξεργασία τους. Και ενώ τα ωμά κρέατα και ειδικά τα πουλερικά είναι σημαντικές πηγές του βακτηρίου, δε θεωρούνται μεγάλης επικινδυνότητας όσον αφορά την πρόκληση ανθρώπινης λιστερίωσης, δεδομένου ότι της κατανάλωσής τους προηγείται επαρκής θερμική επεξεργασία και ότι αποφεύγεται η διασταυρούμενη επιμόλυνση (Lianou and Sofos, 2007).

Όσον αφορά τα RTE προϊόντα με βάση το κρέας (πχ αλλαντικά, λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης), η μόλυνση λαμβάνει χώρα κυρίως μετά τις επεξεργασίες που στοχεύουν στη θανάτωση των μικροοργανισμών (όπως θερμική επεξεργασία, ζύμωση, αποξήρανση) διότι όταν αυτές

πραγματοποιούνται σωστά, μπορούν να εξουδετερώσουν το παθογόνο σε αποδεκτά επίπεδα (Sofos and Georghiou, 2010). Σε αυτές τις περιπτώσεις η μόλυνση συμβαίνει σε μετέπειτα στάδια κατόπιν επαφής του προϊόντος με μολυσμένες επιφάνειες και εξοπλισμό. Ένας επιπλέον τρόπος με τον οποίο μπορεί να πραγματοποιηθεί η μόλυνση είναι κατά τον τεμαχισμό, τη μεριδοποίηση και τη συσκευασία στα καταστήματα λιανικής πώλησης. Μάλιστα, αυτά τα καταστήματα επιθεωρούνται λιγότερο συχνά σε σχέση με τις βιομηχανίες τροφίμων (Lianou and Sofos, 2007), ενώ κάποια μοναδικά για αυτό το είδος των επιχειρήσεων χαρακτηριστικά όπως η ανάγκη επίδειξης των προϊόντων, το γεγονός ότι είναι ανοιχτά στο ευρύ κοινό και ο υψηλός ρυθμός αντικατάστασης των υπαλλήλων μπορεί να αποτελέσουν σοβαρά εμπόδια για την ανάπτυξη και τήρηση επαρκών μέτρων ελέγχου του κινδύνου (Lianou and Sofos, 2007).

Από τη στιγμή που θα πραγματοποιηθεί η μόλυνση, η δυνατότητα ανάπτυξης της *L. monocytogenes* στα προϊόντα που προέρχονται από το κρέας ή τα πουλερικά εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος του κρέατος, την επεξεργασία, το είδος και τον αριθμό της ανταγωνιστικής χλωρίδας, τον τύπο συσκευασίας και τους ενδογενείς παράγοντες (pH, a_w , θρεπτικά συστατικά) του τροφίμου. Για παράδειγμα, έρευνες έδειξαν ότι το βακτήριο αναπτύχθηκε σε προϊόντα κρέατος με pH κοντά στο 6 αλλά σε pH κοντά ή πιο κάτω του 5 η ανάπτυξη ήταν μικρή ή απουσίαζε εντελώς (Farber and Peterkin, 1991). Επιπλέον, επειδή το βακτήριο εντοπίζεται στα ζώα κυρίως σε όργανα όπως το συκώτι, τον σπλήνα αλλά και το έντερο, η κατανάλωση προϊόντων που προέρχονται από αυτά είναι δυνητικά πιο επικίνδυνη σε σχέση με αυτά που κατασκευάζονται από το μυϊκό ιστό (Doyle and Buchanan (Eds), 2013).

Απόκριση στην θερμοκρασιακή καταπόνηση

Όπως έχει προαναφερθεί, η *L. monocytogenes* είναι ένας ψυχρότροφος μικροοργανισμός που σημαίνει ότι αποτελεί μεγάλη απειλή για τα τρόφιμα που διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα υπό ψύξη και ιδιαίτερα εκείνα που είναι έτοιμα προς κατανάλωση.

Όταν το συγκεκριμένο βακτήριο εκτεθεί σε χαμηλή θερμοκρασία, αρχικά διακόπτεται η ανάπτυξή του, ακολουθεί μία περίοδος προσαρμογής και στη συνέχεια η ανάπτυξη συμβαίνει με χαμηλότερο ρυθμό (Saldivar *et al.*, 2018). Η ανάπτυξη αυτή υποβοηθείται από ορισμένους μηχανισμούς, οι οποίοι στην πλειονότητα τους είναι κοινοί με τους μηχανισμούς άλλων ψυχρότροφων μικροοργανισμών, ωστόσο υπάρχουν και εκείνοι που φαίνεται να είναι χαρακτηριστικοί μόνο για το είδος της *L. monocytogenes*.

Μερικοί από τους πιο εκτενώς μελετημένους μηχανισμούς απόκρισης στην έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία είναι:

- **Διατήρηση της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης**

Ο κύριος τρόπος με τον οποίο τα βακτήρια διατηρούν τη φυσική κατάσταση την κυτταρικής τους μεμβράνης είναι η ρύθμιση της σύστασης των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα, όταν η *L. monocytogenes* αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, τροποποιείται η διακλάδωση του μεθυλίου στο τέλος της αλειφατικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων, πράγμα που οδηγεί στην αύξηση του ποσοστού των anteiso (anteiso-C_{15:0}) λιπαρών οξέων. Παράλληλα, μειώνεται το μήκος των αλειφατικών αλυσίδων και αυξάνεται ο βαθμός ακορεστότητάς τους. Η εισαγωγή διπλών δεσμών μειώνει το σημείο πήξης των λιπαρών οξέων και εισάγει μία καμπυλότητα στη αλειφατική αλυσίδα διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο την ρευστότητά της. Η σημασία της μείωσης των κορεσμένων λιπαρών οξέων με μακριές, ευθύγραμμες αλειφατικές αλυσίδες στη διατήρηση της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης της *L. monocytogenes* τονίζεται και κατά τη σύγκρισή της με συγγενικά βακτηριακά είδη, όπως *Bacillus subtilis* και *Staphylococcus aureus*. Αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ευθύγραμμων αλειφατικών αλυσίδων και είναι και οι δύο πιο ευαίσθητοι στις χαμηλές θερμοκρασίες (Saldívar *et al.*, 2018).

- **Σταθεροποίηση μακρομορίων**

Η σταθεροποίηση απαραίτητων για τη λειτουργία των βακτηριακών κυττάρων μακρομορίων, όπως το DNA και το RNA έχει καθοριστική σημασία για την επιβίωση και την ανάπτυξη σε ακραίες θερμοκρασίες. Πρωτεΐνες όπως οι Csps (Cold-shock proteins), οι Caps (Cold-acclimation proteins), οι Hsps (Heat-shock proteins) και οι καζεϊνολυτικές πρωτεΐνες δρουν ως πρωτεΐνες-συνδοί σε διάφορες συνθήκες καταπόνησης, συμπεριλαμβανομένης και της χαμηλής θερμοκρασίας (Saldívar *et al.*, 2018). Οι Csps είναι μία ομάδα μικρών, πολύ καλά διατηρημένων συνοδών, οι οποίες θεωρείται ότι προσδένονται στο DNA και το RNA και βοηθούν στη ρύθμιση της αντιγραφής, της μεταγραφής και της μετάφρασης (Melo *et al.*, 2015). Οι καζεϊνολυτικές πρωτεΐνες ClpP και ClpB δρουν ως πρωτεάσες αποικοδομώντας πρωτεΐνες που καταστράφηκαν από τη θερμοκρασιακή καταπόνηση, προσφέροντας μ' αυτόν τον τρόπο επιπλέον πηγές αμινοξέων κατά τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης (Saldívar *et al.*, 2018).

- **Ρύθμιση του μεταβολισμού**

Τα βακτηριακά κύτταρα σε μία ακόμη προσπάθεια να ρυθμίσουν το εσωτερικό τους περιβάλλον, προσλαμβάνουν συμβατικούς ωσμωλύτες όπως τη βεταΐνη της γλυκίνης (glycine betaine) και την καρνιτίνη (carnitine) η οποία βρίσκεται σε αφθονία στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Τα μόρια αυτά προσλαμβάνονται με τη βοήθεια τριών πρωτεϊνών- μεταφορέων (BetL, Gbu και OpuC) (Saldivar *et al.*, 2018) και φαίνεται ότι συμβάλλουν στην επιβίωση και την ανάπτυξη σε χαμηλές θερμοκρασίες. Εκτός αυτών, η ανάλυση της πρωτεομικής απόκρισης του στελέχους ATCC 15313 της *L. monocytogenes* κατά την ανάπτυξή του σε χαμηλή θερμοκρασία έδειξε αυξημένη έκφραση ενζύμων της γλυκόλυσης και άλλων μεταβολικών μονοπατιών. Τα δεδομένα αυτά φανερώνουν την αυξημένη απαίτηση του κυττάρου σε ενδιάμεσα προϊόντα μεγάλου ενεργειακού δυναμικού που θα χρησιμοποιηθούν σε επόμενο στάδιο για τη σύνθεση των απαραίτητων για την διατήρηση του κυττάρου πρωτεϊνών (Melo *et al.*, 2015).

Ανθρώπινη Λιστερίωση

Στοιχεία επιδημιολογίας

Στις μέρες μας, η συχνότητα εμφάνισης της λιστερίωσης στους ανθρώπους υπολογίζεται μεταξύ 0,1 και 11,3 κρούσματα ανά 1.000.000 άτομα ετησίως (Lomonaco *et al.*, 2015), γεγονός που καθιστά την εμφάνισή της σχετικά σπάνια παρόλο που η έκθεση του γενικού πληθυσμού στο παθογόνο είναι συχνή. Ας σημειωθεί εδώ ότι 2-6 % των υγιών ενηλίκων είναι ασυμπτωματικοί φορείς (Doyle and Buchanan (Eds), 2013). Σύμφωνα με την EFSA, το 2020 τα καταγεγραμμένα κρούσματα λιστερίωσης στην Ευρωπαϊκή Ένωση ανήλθαν στα 1.876 (EFSA, 2020), ενώ σύμφωνα με το CDC στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2011 καταγράφηκαν 1.591 κρούσματα (Scallan *et al.*, 2011). Στον Πίνακα 1 φαίνονται μερικά παραδείγματα σοβαρών εξάρσεων ανθρώπινης λιστερίωσης που παρατηρήθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες.

Πίνακας 1: Παραδείγματα εξάρσεων ανθρώπινης λιστερίωσης

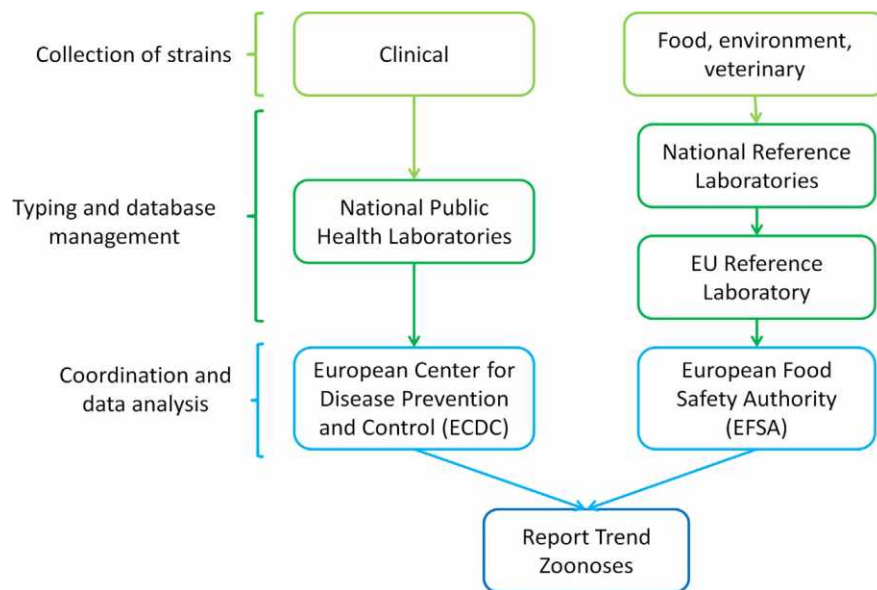
Έτος	Τοποθεσία	Αριθμός Κρουσμάτων	Αριθμός θανάτων /αποβολών	Ορότυπος	Τρόφιμο	Πηγή
1985	(Λος Άντζελες, Καλιφόρνια	142	28/20	4b	Μαλακό τυρί Μεξικάνικου τύπου	FDA, 2012
1992	Γαλλία	279	63/22	4b	Μολυσμένο χοιρινό (πηχτής)	Zhang <i>et al.</i> , 2021
1993	Γαλλία	38	11	4b	Χοιρινές ριλέτες	Doyle and

						Buchanan (Eds), 2013
1999	Ηνωμένες Πολιτείες	108	14/4	4b	Λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης	Doyle and Buchanan (Eds), 2013
2005	Ελβετία	10	3	1/2a	Μαλακό τυρί	Doyle and Buchanan (Eds), 2013
2008	Καναδάς	57	22	1/2a	Αλλαντικό	FDA, 2012
2010	Τέξας, Ην. Πολιτείες	10	3	-	Προτεμαχισμένο σέλερι	Buchanan <i>et al.</i> , 2017
2011	Ηνωμένες Πολιτείες	147	33/1	1/2a και 1/2b	Πεπόνι κανταλούπα	Buchanan <i>et al.</i> , 2017
2014	Ηνωμένες Πολιτείες	5	2	-	Φύτρες φασολιών	Buchanan <i>et al.</i> , 2017
2018	N. Αφρική	937	216	-	Αλλαντικό τύπου Bologna	Quereda <i>et al.</i> , 2021
2019	Ευρωπαϊκή Ένωση	21	3	-	RTE κρεατικά παρασκευάσματα	Zhang <i>et al.</i> , 2021

Συγκριτικά με αναφορές προηγούμενων δεκαετιών, ο αριθμός των εξάρσεων που καταγράφονται δείχνει αυξημένος, ενώ ο αριθμός των κρουσμάτων που αποδίδονται σε αυτές είναι μειωμένος, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες. Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε διάφορους τεχνολογικούς αλλά και κοινωνικούς παράγοντες όπως:

- Αυξημένο προσδόκιμο ζωής.
- Αυξημένος αριθμός ανοσοκατεσταλμένων ατόμων.
- Παγκοσμιοποίηση του εμπορίου τροφίμων.
- Αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες και άρα τις καταναλωτικές απαιτήσεις.
- Εκτεταμένη χρήση αντιόξινων και κατασταλτικών του γαστρικού οξέος παρασκευασμάτων.
- Βελτιωμένες διαγνωστικές μέθοδοι και εντατικότερη παρακολούθηση της δημόσιας υγείας.

Το σύστημα παρακολούθησης της ασθένειας που εφαρμόζεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος παρακολούθησης της λιστερίωσης στην Ε.Ε. (Lomonaco et al., 2015).

Τα στελέχη της *L. monocytogenes* που απομονώνονται από κλινικά περιστατικά αναλύονται αρχικά σε εθνικό επίπεδο από ένα Δίκτυο Εργαστηρίων Δημόσιας Υγείας υπό την επίβλεψη του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων (European Center for Disease Prevention and Control, ECDC). Παράλληλα, στελέχη που απομονώνονται από τρόφιμα, το περιβάλλον ή τα ζώα αναλύονται πάλι σε πρώτο επίπεδο στα Εθνικά Εργαστήρια Αναφοράς. Αυτά τροφοδοτούν στη συνέχεια την κεντρική βάση δεδομένων «EURL *Lm*» του εργαστηρίου ANSES Maisons-Alfort το οποίο εδρεύει στη Γαλλία και αποτελεί το Ευρωπαϊκό Εργαστήριο Αναφοράς (<https://eurl-listeria.anses.fr/en/minisite/listeria-monocytogenes/mandate>). Η βάση αυτή περιλαμβάνει δεδομένα ορολογικής τυποποίησης καθώς και άλλες επιδημιολογικές πληροφορίες. Τελικά, η EFSA σε συνεργασία με το ECDC αναλύουν και διερευνούν συγκεντρωτικά όλα τα παραπάνω δεδομένα εξάγοντας συμπεράσματα που αφορούν παρατηρούμενες τάσεις στην εμφάνιση κλινικών κρουσμάτων αλλά και τον τρόπο που αυτά συνδέονται με τα κρούσματα στα ζώα και στα τρόφιμα.

Σημαντικό εργαλείο κατά την παρακολούθηση της επιδημιολογίας της λιστερίωσης, έχει αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια η τεχνική της αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) των απομονώσεων. Βασικό πλεονέκτημά της είναι η μεγάλη διακριτική ικανότητα. Δίνει δηλαδή τη δυνατότητα αναγνώρισης γενετικών διαφορών μεταξύ στελεχών της *L. monocytogenes* που δεν μπορούν να εντοπιστούν από άλλες τεχνικές τυποποίησης, όπως η PFGE που μέχρι πρόσφατα αποτελούσε την πρότυπη μέθοδο τυποποίησης απομονώσεων. Το Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου

Νόσων των Ηνωμένων Πολιτειών (CDC) χρησιμοποιεί το WGS για τις επιδημιολογικές έρευνες ήδη από το 2013 και σταδιακά το υιοθετούν και άλλες αρχές, όπως ο FDA (Food and Drug Administration) και FSIS (Food Safety and Inspection Service).

Ευάλωτοι πληθυσμοί

Τα περισσότερα κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης εντοπίζονται στις εξής ομάδες ευάλωτων ατόμων:

Νεογνά και ηλικιωμένοι: Σύμφωνα με το ECDC, κατά το έτος 2016 το 65,4 % των περιπτώσεων ανθρώπινης λιστερίωσης ήταν ασθενείς με ηλικία μεγαλύτερη των 64 ετών (Lere, 2020) ενώ σύμφωνα με την αναφορά της EFSA για το έτος 2017 το ποσοστό αυτό αυξήθηκε σταδιακά από το 2008 (54.8%) στο 2017 (67,2%). Το 2011 στις Ηνωμένες Πολιτείες η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 71 χρόνια (Lomonaco *et al.*, 2015).

Έγκυες γυναίκες: Μεταξύ των γυναικών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία έχει δειχθεί ότι η έγκυες γυναίκες έχουν περισσότερο από 100 φορές μεγαλύτερο ρίσκο λιστερίωσης (Lomonaco *et al.*, 2015). Η μητροεμβρυϊκή λιστερίωση συνήθως καταλήγει σε αποβολή του εμβρύου με συχνότητα αντιστρόφως ανάλογη του μήνα κύησης (Lomonaco *et al.*, 2015). Έγκυες γυναίκες που μολύνονται συνήθως δεν παρουσιάζουν συμπτώματα και, όταν αυτό συμβαίνει, εκείνα είναι ήπια και προσομοιάζουν τα συμπτώματα γρίπης. Επομένως είναι πιθανό σε πολλές από αυτές τις περιπτώσεις να μη γίνεται καν διάγνωση.

Ανοσοκατεσταλμένοι ενήλικες: Στην τελευταία κατηγορία συγκαταλέγονται τα άτομα που ακολουθούν κάποια θεραπευτική αγωγή που περιλαμβάνει ανοσοκατασταλτικά φάρμακα όπως κορτικοστεροειδή, άτομα με υποκείμενα νοσήματα, όπως καρκίνο (ειδικά του παγκρέατος και των πνευμόνων) και άτομα που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνου. Είναι χαρακτηριστικό ότι η ανθρώπινη λιστερίωση είναι 300 φορές πιο συχνή σε άτομα που πάσχουν από AIDS σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Doyle and Buchanan (Eds), 2013).

Η λιστερίωση πλέον θεωρείται ότι επηρεάζει κατά κύριο λόγο τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα των μεγαλύτερων ηλικιών (Lomonaco *et al.*, 2015). Τα ποσοστά θνησιμότητας σε αυτές τις περιπτώσεις αγγίζουν το 20-30%. Οι ασθενείς δε που υποβλήθηκαν πρόσφατα σε μεταμόσχευση φαίνεται πως είναι ο υποπληθυσμός με τη μεγαλύτερη επικινδυνότητα, αφού είναι 2.500 φορές πιο ευάλωτοι σε σχέση με τους υγιείς ενήλικες κάτω των 65 ετών (Doyle and Buchanan (Eds), 2013).

Μολυσματική Δόση

Η μολυσματική δόση της *L. monocytogenes* είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με ακρίβεια διότι εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, το είδος του μολυσμένου τροφίμου, τη μολυσματική ικανότητα του εμπλεκόμενου στελέχους και τον αριθμό των κυττάρων που εισήλθαν στον οργανισμό. Εξάλλου, είναι τόσο σοβαρές οι επιπτώσεις της ασθένειας ώστε είναι αδύνατον να γίνουν δοκιμές με εθελοντές για να διερευνηθεί η ακριβής σχέση δόσης-απόκρισης.

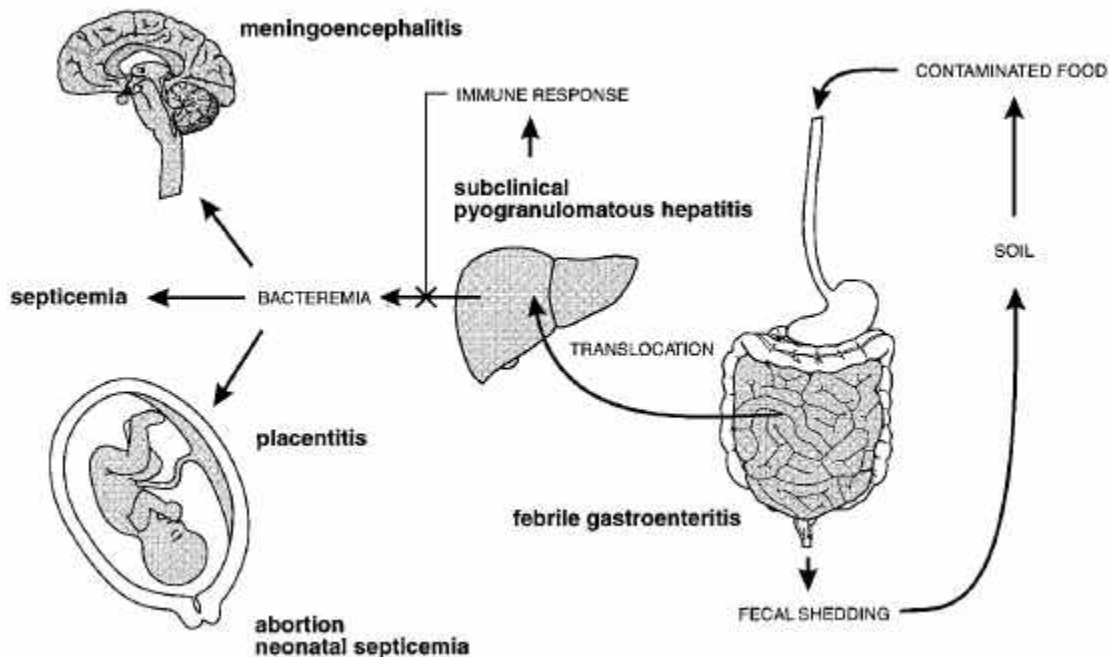
Επομένως, όσα στοιχεία είναι διαθέσιμα έχουν προκύψει από μελέτες σε πειραματόζωα και από ανάλυση των εξάρσεων των τελευταίων ετών. Από τις πρώτες προκύπτει ότι μειωμένα επίπεδα έκθεσης μειώνουν και την εμφάνιση της κλινικής ασθένειας (Doyle and Buchanan (Eds), 2013). Επιπλέον, όταν θηλυκοί πίθηκοι του είδους *Macacca mulatta* που διανύουν το τρίτο τρίμηνο εγκυμοσύνης εκτεθούν στη *L. monocytogenes*, παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα θνησιγένειας με τα νεκρά νεογνά να εμφανίζουν παρόμοια παθογένεια με αυτή των ανθρώπινων νεογνών συμπεριλαμβανομένης της οξείας φλεγμονής και της νέκρωσης του ήπατος (Doyle and Buchanan (Eds), 2013). Ωστόσο τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών είναι ενδεικτικά και ενώ επιβεβαιώνουν την συμπεριφορά του παθογόνου στις ευάλωτες πληθυσμιακές ομάδες, δεν μπορούν να αξιοποιηθούν με σκοπό τον υπολογισμό της ελάχιστης μολυσματικής δόσης στον άνθρωπο. Από την άλλη, δημοσιευμένα στοιχεία που αφορούν εξάρσεις αλλά και σποραδικά κρούσματα δείχνουν ότι τα μολυσμένα τρόφιμα συνήθως περιέχουν συγκεντρώσεις βακτηρίων μεγαλύτερες των 100 CFU/g (Doyle and Buchanan (Eds), 2013). Και πάλι όμως τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να γενικευτούν, καθώς ο αριθμός των βακτηρίων που πραγματικά προσλήφθηκαν με την κατανάλωση του τροφίμου και ο αριθμός βακτηρίων που προέκυψε από την μεταγενέστερη ανάλυση αυτού, μπορεί να διαφέρουν σημαντικά, ειδικά σε τρόφιμα που επιτρέπουν την αύξηση.

Γίνεται σαφές ότι απαιτείται επιπλέον μελέτη επιδημιολογικών στοιχείων ούτως ώστε να διερευνηθεί η μολυσματική δόση της *L. monocytogenes* με μεγαλύτερη ακρίβεια.

Μηχανισμοί Παθογένειας

Μετά την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου, το πρώτο σημαντικό εμπόδιο που θα αντιμετωπίσει η *L. monocytogenes* στον ανθρώπινο οργανισμό είναι το ισχυρά όξινο περιβάλλον του στομάχου (pH= 1-2). Πράγματι, ο μεγαλύτερος ρυθμός απομόνωσης του βακτηρίου σε κόπρανα ασθενών που

ακολουθούν θεραπευτικές αγωγές που περιλαμβάνουν καταστολείς του γαστρικού οξέος με H2 ανταγωνιστές (Queireda *et al.*, 2021), φανερώνει ότι το γαστρικό υγρό μπορεί να θανατώσει ένα μεγάλο αριθμό βακτηρίων που εισήλθαν στον οργανισμό. Παρόλα αυτά, ένα μέρος των μικροοργανισμών καταφέρνει να επιβιώσει εξαιτίας διαφόρων συστημάτων που ρυθμίζουν το ενδοκυτταρικό pH του βακτηρίου όπως το glutamate decarboxylase (GAD) system και το arginine deiminase system (ADI). Αυτά στη συνέχεια εισέρχονται στο έντερο, όπου καλούνται να αντιμετωπίσουν νέα εμπόδια, όπως η ενδογενής συμβιωτική μικροχλωρίδα, η ωσμωτική καταπόνηση και τα χολικά άλατα. Η αξιοποίηση εναλλακτικών μεταβολικών οδών, η έκκριση βακτηριοσινών και η παραγωγή της υδρολάσης του χολικού άλατος (Bile salt Hydrolase, Bsh) αποτελούν μερικούς από τους τρόπους που καθιστούν την *L. monocytogenes* ικανή να επιβιώσει στο περιβάλλον του εντέρου και τελικά να διαπεράσει το επιθήλιο του. Σε επόμενο στάδιο, τα βακτήρια εισβάλλουν και πολλαπλασιάζονται μέσα σε φαγωτικά και μη φαγωτικά επιθηλιακά κύτταρα. Η ενδοκύτωση υποβοηθείται από επιφανειακές βακτηριακές πρωτεΐνες, όπως η ActA και η LLO (βλ. παρακάτω).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της παθοφυσιολογίας της μόλυνσης από *Listeria* (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Μέσω του κυκλοφορικού αλλά και του λεμφικού συστήματος τα βακτήρια μεταφέρονται στο συκώτι και το σπλήνα. Η παρουσία της *L. monocytogenes* στα όργανα αυτά προκαλεί οξεία φλεγμονώδη αντίδραση και άρα τη συγκέντρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως μακροφάγα,

δενδριτικά και CD8 T λευκοκύτταρα, τα οποία εξουδετερώνουν τα μολυσμένα κύτταρα και περιορίζουν τη διασπορά των βακτηρίων.

Σε περίπτωση που η μόλυνση δεν περιοριστεί από την ανοσολογική απόκριση, πράγμα που μπορεί να συμβεί σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, το βακτήριο πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα στο συκώτι και τελικά εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος. Από εκεί και πέρα μπορεί να πλήξει διάφορα όργανα αν και η κλινική εικόνα της ασθένειας δείχνει τροπισμό του παθογόνου προς το κεντρικό νευρικό σύστημα και τη μήτρα εγκύων γυναικών.

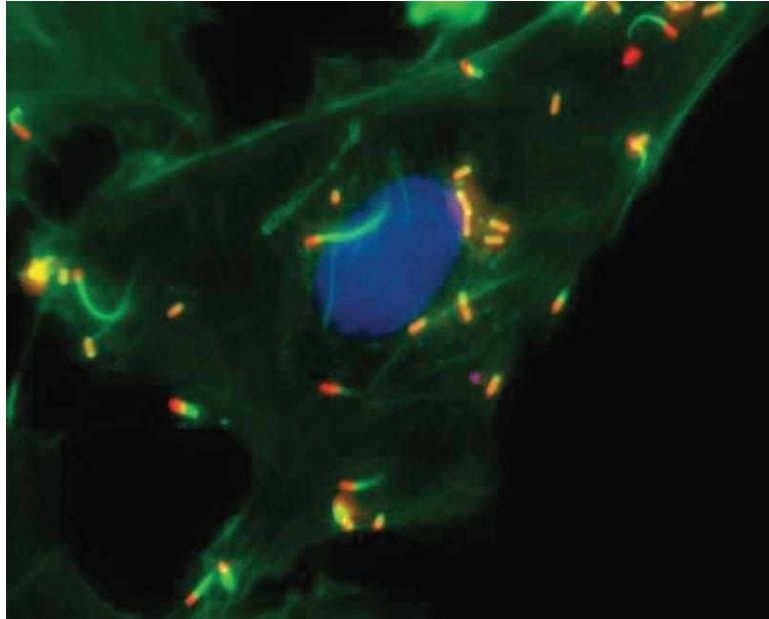
Μολυσματικοί παράγοντες

Η ανάλυση του γονιδιώματος ενός μεγάλου αριθμού παθογόνων στελεχών και η σύγκρισή του με γονιδιώματα μη παθογόνων απομονώσεων έχει βοηθήσει σημαντικά στην αναγνώριση μιας πληθώρας γονιδίων που έχουν συσχετιστεί άμεσα με την ικανότητα της *L. monocytogenes* να εισβάλλει στα κύτταρα των ξενιστών και να προκαλεί ασθένεια.

Όπως προαναφέρθηκε, ένα σημαντικό στάδιο στην πορεία της νόσου της λιστερίωσης είναι αρχικά η προσκόλληση και έπειτα η διαπέραση του επιθηλίου του εντέρου. Τα βακτήρια εκφράζουν μία πληθώρα γονιδίων (>70), που τους δίνουν την δυνατότητα να εισχωρούν στα κύτταρα του ξενιστή ακόμα και αν αυτά δεν είναι φαγωτικά. Η InlA και η InlB ήταν οι πρώτες που αναγνωρίστηκαν ως μεσολαβητές αυτής της εισβολής και έχουν μελετηθεί εκτενώς. Ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των ιντερναλινών και κωδικοποιούνται από το inlAB οπερόνιο. Χαρακτηρίζονται από μία περιοχή (domain) πλούσια σε λευκίνη (leucine-rich repeat, LRR) η οποία θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Μεταλλάξεις που οδηγούν στην απώλεια του οπερονίου inlAB έχουν ως αποτέλεσμα τη σοβαρή αδυναμία εισβολής στα κύτταρα του ξενιστή (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Η *L. monocytogenes* εισέρχεται μέσα στο κύτταρο-ξενιστή μέσω του σχηματισμού φαγωσωμάτων, από τα οποία είναι απαραίτητο να διαφύγει για να ξεκινήσει ο πολλαπλασιασμός. Σε αυτή τη διαδικασία συμμετέχουν κυρίως δύο φωσφολιπάσες (PI-PLC και PC-PLC) και η πρωτεΐνη LLO. Η σημασία αυτών των πρωτεϊνών για την μολυσματικότητα του βακτηρίου γίνεται σαφής όταν μεταλλάξεις τις καθιστούν μη λειτουργικές. Σ' αυτές τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αδυναμία ενδοκυτταρικού πολλαπλασιασμού σε κύτταρα θηλαστικών, καθώς τα βακτήρια δεν μπορούσαν να διαφύγουν από το φαγώσωμα.

Η εμφάνιση της ασθένειας, βέβαια, προϋποθέτει εκτός από την εισβολή και τον πολλαπλασιασμό, την μεταφορά των βακτηρίων από κύτταρο σε κύτταρο και άρα από ιστό σε ιστό. Αυτή είναι δυνατή χάρη στην πρωτεΐνη ActA η οποία προωθεί τον πολυμερισμό της ακτίνης μέσα στο κύτταρο- ξενιστή. Αυτή χρησιμοποιεί στη συνέχεια το βακτήριο για να μετακινηθεί και να μολύνει τελικά τα γειτονικά κύτταρα. Η ActA κωδικοποιείται από το γονίδιο *actA*, αποτελείται από 639 αμινοξέα και είναι μία κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνη η οποία ωθεί την κίνηση της *L. monocytogenes* μέσω της ακτίνης.



Εικόνα 5: Ο πολυμερισμός της ακτίνης από τη *L. monocytogenes* (Doyle and Buchanan (Eds), 2013).

Είναι τέλος σημαντικό να σημειωθεί ότι τα περισσότερα γονίδια που σχετίζονται με τη μολυσματικότητα της *L. monocytogenes* ρυθμίζονται από το μεταγραφικό ενεργοποιητή PrfA. Πιο συγκεκριμένα, ο PrfA προωθεί τη μεταγραφή του ρεγουλονίου LIPI-1. Αυτό περιλαμβάνει το ίδιο το *prfA* καθώς και τα γονίδια *hly*, *plcA*, *plcB*, *actA*, *mpl*, *orfX* (Quereda *et al.*, 2021). Ο PrfA ρυθμίζει επίσης την έκφραση των Bsh αλλά και των ιντερναλινών A, B και C. Η έκφραση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα είναι θερμορυθμιζόμενη από έναν RNA θερμοαισθητήρα και εμφανίζεται αυξημένη στους 37°C (Saldivar *et al.*, 2018). Πέρα από τη θερμοκρασία όμως, την έκφρασή του επηρεάζουν κι άλλοι παράγοντες όπως η παρουσία γλυκόζης ή σιδήρου και οι συνθήκες καταπόνησης.

Κλινικά χαρακτηριστικά της λιστερίωσης στον άνθρωπο

Η λιστερίωση στον άνθρωπο δεν παρουσιάζει κάποια συγκεκριμένη ομάδα συμπτωμάτων καθώς ο τρόπος εκδήλωσής της εξαρτάται άμεσα από τη φυσιολογική κατάσταση του ξενιστή. Δύο είναι τα βασικά κλινικά σύνδρομα που δύνανται να ακολουθήσουν την μόλυνση (Vazquez-Boland *et al.*, 2001):

1. **Λιστερίωση των ενηλίκων:** Στα υγιή άτομα έχει τη μορφή της εμπύρετης γαστρεντερίτιδας, δεν προκαλεί σοβαρές επιπλοκές, ενώ καταπολεμάται από τον ίδιο τον οργανισμό. Μεγάλες εξάρσεις συνδέθηκαν με σοβαρά μολυσμένα τρόφιμα ($>10^9$ CFU/ml), με περίοδο επώασης μέσης διάρκειας 24 ωρών (με απόκλιση από 6 μέχρι 240 ώρες)(Quereda *et al.*, 2021). Τα βασικά συμπτώματα είναι πυρετός, μυϊκοί πόνοι, εμετός και κάποιες φορές διάρροια (Food and Drug Administration, 2012). Στην πιο σοβαρή της μορφή, που εκδηλώνεται στους ανοσοκατασταλαμένους ενηλίκους πλην των εγκύων γυναικών ή στους ενηλίκους που πάσχουν από κάποιο υποκείμενο νόσημα, η λιστερίωση επηρεάζει κατά κύριο λόγο το κεντρικό νευρικό σύστημα (55-70% των κρουσμάτων) και οδηγεί σε μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα ή σηψαιμία. Τα συμπτώματα, που εμφανίζονται ξαφνικά έπειτα από μια περίοδο επώασης περίπου 2-10 ημερών, περιλαμβάνουν ισχυρή κεφαλαλγία, ζάλη, διαταραχές στην κίνηση και σε κάποιες περιπτώσεις παράλυση κρανιακών νεύρων. Χωρίς τη χορήγηση των κατάλληλων αντιβιοτικών, περίπου το 20% αυτών των ασθενών θα καταλήξουν, ενώ ορισμένοι από τους επιζήσαντες θα παρουσιάσουν μόνιμες νευρολογικές επιπλοκές (Skandamis, 2020).
2. **Εμβρυομητρική και νεογνική λιστερίωση:** Εκδηλώνεται εξαιτίας της ικανότητας της *L. monocytogenes* να περνά από τη μητέρα στο έμβρυο μέσω του πλακούντα. Καταλήγει είτε σε αποβολή του εμβρύου -συνήθως από τον 5^ο μήνα της κύησης και μετά- είτε σε θνησιγένεια, είτε στην γέννηση ενός σοβαρά άρρωστου νεογνού με υψηλή θνησιμότητας (Quereda *et al.*, 2021). Όπως προαναφέρθηκε, τα συμπτώματα της μητέρας είναι συνήθως ήπια (αν υπάρξουν) και περιλαμβάνουν ρίγος, κόπωση, κεφαλαλγία και μυϊκούς πόνους περίπου 2 με 15 ημέρες πριν την αποβολή του εμβρύου.

Ισχύουσα νομοθεσία

Δεδομένης της ευρείας διάδοσης της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα και τη συχνή (και πολλές φορές μακροχρόνια) παρουσία της στις βιομηχανίες τροφίμων, οι νομοθετικές Αρχές σε διάφορες χώρες έχουν θεσπίσει διαφορετικά του μηδενικού όρια ανοχής για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό.

Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ο Κανονισμός 2073/2005 που καθιερώνει τα μικροβιολογικά κριτήρια στα τρόφιμα προβλέπει τις εξής περιπτώσεις:

- **Έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς:** Απουσία στα 25 g τροφίμου καθόλη τη διάρκεια διατήρησής τους στην αγορά.
- **Έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη *L. monocytogenes*** διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς:
 - A) 100 CFU/g τροφίμου καθόλη τη διάρκεια διατήρησής τους στην αγορά.
 - B) Απουσία σε 25 g πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από την επιχείρηση που το παρήγαγε.
- **Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη *L. monocytogenes*,** διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς: 100 CFU/g τροφίμου καθόλη τη διάρκεια διατήρησής τους στην αγορά.

Από την άλλη, οι Ηνωμένες Πολιτείες, ενώ αναγνωρίζουν την ευρεία διάδοση του μικροβίου όπως και τις δυσκολίες κατά την παραγωγή τροφίμων εντελώς απαλλαγμένων από αυτό, έχουν υιοθετήσει μηδενική ανοχή. Εξάλλου, υποστηρίζουν ότι η θέσπιση ενός ορίου προϋποθέτει την ύπαρξη γνώσης ως προς το μέγεθος της μολυσματικής δόσης (Doyle and Buchanan (Eds), 2013). Και ενώ η έρευνα πάνω στο συγκεκριμένο ζήτημα έχει προχωρήσει τα τελευταία χρόνια, τα αποτελέσματα προς το παρόν δεν είναι αρκετά σαφή. Στον Καναδά, τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: αυτά που επιτρέπουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* και για τα οποία προβλέπεται μηδενική ανοχή και αυτά που μπορούν να περιορίσουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού ώστε να μην ξεπεράσει τα 100 CFU/g ή που δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη καθόλου (Zhang *et al.*, 2021). Τέλος, η Κίνα ακολουθεί και εκείνη μηδενική ανοχή στα 25 g τροφίμου όσον αφορά τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα κρέατος.

Διαστελεχική παραλλακτικότητα

Ορισμός

Ο όρος «διαστελεχική παραλλακτικότητα» χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις εγγενείς διαφορές μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους που υφίστανται ακριβώς τον ίδιο χειρισμό. Όταν πρόκειται για τροφιμογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς η παραλλακτικότητα αυτή μπορεί να αντικατοπτρίζει διαφορές σε μία μεγάλη γκάμα φαινοτυπικών αποκρίσεων, όπως η ανάπτυξη, η μολυσματικότητα, η ανταπόκριση σε συνθήκες καταπόνησης κ.α. Σε κάθε περίπτωση, η παραλλακτικότητα ως προς ένα χαρακτηριστικό μεταξύ διαφορετικών μονάδων ενός πληθυσμού (στην προκειμένη περίπτωση των στελεχών ενός είδους) είναι ένα μέγεθος που δεν μπορεί να μειωθεί με επιπλέον ή πιο ακριβείς μετρήσεις. Είναι σημαντικό επομένως να διαχωρίζεται από τον όρο «αβεβαιότητα» καθώς αυτός προκύπτει ως αποτέλεσμα της έλλειψης δεδομένων ή της χρήσης ανακριβών μετρήσεων και μπορεί να περιοριστεί με τη συλλογή επιπρόσθετων ή πιο έγκυρων στοιχείων.

Στις μικροβιολογικές μελέτες τόσο η παραλλακτικότητα όσο και η αβεβαιότητα αποτελούν πηγές μεταβλητότητας, γι' αυτό είναι επιθυμητό να ενσωματώνονται ως ξεχωριστές έννοιες στην εξαγωγή συμπερασμάτων στον μέγιστο δυνατό βαθμό. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση των λεγόμενων πιθανολογικών μοντέλων (probabilistic) δεύτερης τάξης (second-order models), οι μεταβλητές των οποίων παρουσιάζονται ως κατανομές. Και ενώ η αξία της χρήσης αυτών των μοντέλων και γενικότερα του διαχωρισμού αυτών των δύο βασικών εννοιών έχει καταδειχθεί στη βιβλιογραφία (Anderson and Hattis, 1999; Delignette-Muller *et al.*, 2006; Lammerding, 1997; Nauta, 2000; Poschet *et al.*, 2003), η εφαρμογή τους περιορίζεται από τον πολύ μεγάλο όγκο δεδομένων αλλά και από την αυξημένη πολυπλοκότητα των τεχνικών προσομοίωσης που απαιτούν.

Διαστελεχική παραλλακτικότητα κατά την αύξηση της *L. monocytogenes*

Οι πρώτες μελέτες που έκαναν λόγο για διαστελεχική παραλλακτικότητα όσον αφορά την αύξηση της *L. monocytogenes* δημοσιεύτηκαν κατά τη δεκαετία του 1980. Οι Barbosa *et al.* (1994) συνέκριναν την αύξηση 39 στελεχών της *L. monocytogenes* στις θερμοκρασίες 4, 10 και 37°C και παρατήρησαν αρκετές διαφορές στις κινητικές παραμέτρους, ώστε να συμπεράνουν ότι η επιλογή των στελεχών που προορίζονται για μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή ειδικά αν πρόκειται για δοκιμές σε χαμηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον, οι Begot *et al.* (1997) αφού μελέτησαν την ανάπτυξη 58 στελεχών *L. monocytogenes* σε διάφορους συνδυασμούς θερμοκρασίας, pH και aw κατέληξαν στο ότι οι εκτενείς διαφορές ως προς τις περιόδους προσαρμογής (lag time) που υπολόγισαν χρίζουν

ιδιαίτερης προσοχής ειδικά κατά τη δημιουργία μοντέλων πρόρρησης, που όπως τόνισαν είναι μία διαδικασία που είναι σημαντικό να λαμβάνει υπόψη έναν μεγάλο αριθμό στελεχών.

Τα επόμενα χρόνια δημοσιεύτηκαν όλο και περισσότερες σχετικές μελέτες. Τα αποτελέσματά τους δείχνουν ότι οι διαφορές μεταξύ των στελεχών κατά την αύξηση, είναι πιο εμφανείς όσο οι συνθήκες αύξησης (και ιδιαίτερα η θερμοκρασία) απέχουν από τις ιδανικές για τον μικροοργανισμό συνθήκες (Lianou and Koutsoumanis, 2013). Παρόλα αυτά, πολλές μελέτες σημειώνουν την απουσία συσχέτισης αυτών των διαφορών με κάποιο συγκεκριμένο ορότυπο (Lianou *et al.*, 2006; De Jesus and Whiting, 2003). Το γεγονός αυτό φανερώνει μία γενικότερη αδυναμία όσον αφορά την κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών που βρίσκονται πίσω από αυτή την παρατηρούμενη παραλλακτικότητα, γι'αυτό είναι σημαντικό δεδομένα που αφορούν διαφορές σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά να μελετώνται σε συνδυασμό με αυτά που προκύπτουν από τις μοριακές δοκιμές.

Διαστελεχική παραλλακτικότητα και QMRA

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius η ανάλυση επικινδυνότητας (Risk analysis) είναι μία διαδικασία που αποτελείται από τρία στοιχεία: Αξιολόγηση επικινδυνότητας (Risk Assessment), Διαχείριση Επικινδυνότητας (Risk Management) και Επικοινωνία επικινδυνότητας (Risk Communication). Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για ένα εργαλείο που βοηθά στη λήψη αποφάσεων που αφορούν τη δημόσια υγεία, στην ανάπτυξη ή βελτίωση των προτύπων ασφάλειας τροφίμων, καθώς και στην αντιμετώπιση νέων κινδύνων ή αδυναμιών που προκύπτουν κατά την εφαρμογή των συστημάτων διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων.

Το κομμάτι που αφορά τη μικροβιολογική αξιολόγηση επικινδυνότητας (Microbial Risk Assessment, MRA) έχει συγκεντρώσει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Σκοπός του δεν είναι κατ' ανάγκην η δημιουργία καινούριας γνώσης, αλλά η συνεχής τροφοδότηση των διαχειριστών επικινδυνότητας (risk managers) με μία λογική και αντικειμενική εικόνα των απειλών της δημόσιας υγείας, καθώς και των παραγόντων που ευθύνονται γι' αυτές σε κάποια συγκεκριμένη χρονική στιγμή (FAO and WHO, 2021). Η μικροβιολογική αξιολόγηση επικινδυνότητας είναι μία διαδικασία που βασίζεται σε επιστημονικά δεδομένα και αποτελείται από 4 στοιχεία:

- Αναγνώριση κινδύνων (Hazard Identification)
- Αξιολόγηση της έκθεσης (Exposure Assessment)
- Χαρακτηρισμός κινδύνων (Hazard Characterization)

- Χαρακτηρισμός επικινδυνότητας (Risk Characterization)

Μία τέτοιου είδους μικροβιολογική αξιολόγηση μπορεί να διεξαχθεί σε διάφορα επίπεδα λεπτομέρειας ανάλογα με το είδος του τροφίμου και του κινδύνου που εξετάζεται (Nauta, 2000). Έτσι, σε ορισμένες περιπτώσεις μία ποιοτική ανάλυση μπορεί να είναι αρκετή ώστε να προσφέρει στα ενδιαφερόμενα μέλη τη βέλτιστη εκτίμηση της επικινδυνότητας. Ωστόσο κατά την μικροβιολογική αξιολόγηση επικινδυνότητας συχνά προτιμάται η ποσοτική προσέγγιση (Quantitative Microbial Risk Assessment, QMRA) κατά την οποία αξιοποιούνται αριθμητικά δεδομένα και ποσοτικές πληροφορίες για την ολοκλήρωση των τεσσάρων βημάτων που την απαρτίζουν. Συνοπτικά, μία τέτοιου είδους αξιολόγηση διερευνά την πορεία ενός παθογόνου μικροοργανισμού κατά μήκος της της εφοδιαστικής αλυσίδας (farm to fork), όπως επίσης και τον κίνδυνο για τον καταναλωτή που τον συνοδεύει. Σημαντικό ρόλο σε αυτή την διαδικασία κατέχει η ανάπτυξη μοντέλων πρόρρησης, τα οποία έρχονται να καλύψουν τα κενά στα διαθέσιμα ποσοτικά δεδομένα που περιγράφουν τα διάφορα στάδια επεξεργασίας και διακίνησης των τροφίμων. Το πόσο αξιόπιστα είναι τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτά τα μοντέλα, εξαρτάται άμεσα από το βαθμό στον οποίο έχουν συμπεριληφθεί οι έννοιες της «παραλλακτικότητας» και της «αβεβαιότητας» κατά την εξαγωγή τους.

Η διαστελεχική παραλλακτικότητα εισάγει μία βιολογική μεταβλητότητα κατά την φαινοτυπική απόκριση των μικροοργανισμών η οποία μπορεί να επηρεάσει άμεσα το αποτέλεσμα της αξιολόγησης της επικινδυνότητας και άρα είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη κατά την διεξαγωγή της. Ο Nauta (2000) χρησιμοποιώντας ένα απλό παράδειγμα αξιολόγησης επικινδυνότητας έδειξε ότι όταν η φύση της κατανομής μιας παραμέτρου ενός μοντέλου δεν είναι ξεκάθαρη, είναι προτιμότερο να αποδοθεί σε λανθασμένο βαθμό σε παραλλακτικότητα ή/και αβεβαιότητα παρά να αγνοηθεί εντελώς.

Τα στάδια μιας ποσοτικής μικροβιολογικής αξιολόγησης επικινδυνότητας που επηρεάζονται άμεσα από τη διαστελεχική παραλλακτικότητα ενός μικροοργανισμού είναι η αξιολόγηση της έκθεσης και ο χαρακτηρισμός των κινδύνων.

Η αξιολόγηση της έκθεσης αποσκοπεί στην εκτίμηση της πιθανής δόσης του μικροβιολογικού κινδύνου που θα καταλήξει στον καταναλωτή ενός συγκεκριμένου τροφίμου. Σ' αυτό το στάδιο είναι απαραίτητο να περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα βήματα της επεξεργασίας αλλά και της εφοδιαστικής αλυσίδας, έτσι ώστε να μπορούν εκτιμηθούν οι αλλαγές στο μικροβιακό φορτίο που τις συνοδεύουν. Πολλές φορές για την επίτευξη αυτού του στόχου αναπτύσσονται μοντέλα πάνω σε επιλεγμένα στελέχη που δείχνουν να έχουν μεγάλο δυναμικό ανάπτυξης και ανοχή στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις με

σκοπό να εξεταστούν τα χειρότερα σενάρια (worst case scenarios). Γίνεται, λοιπόν, σαφές ότι η σωστή επιλογή στελεχών για αυτά τα μοντέλα εξαρτάται άμεσα από τα διαθέσιμα δεδομένα που αφορούν τη διαστελεχική παραλλακτικότητα του μικροοργανισμού. Σε αυτά τα δεδομένα θα πρέπει να βασίζεται και η επιλογή αντιπροσωπευτικών στελεχών που θα χρησιμοποιηθούν ως «κοκτέιλ» σε ανάλογες μελέτες. Σε αντίθετη περίπτωση εισάγεται ο κίνδυνος της συστηματικής υπερεκτίμησης ή υποεκτίμησης, που μπορεί τελικά να επηρεάσει άμεσα τα συμπεράσματα της αξιολόγησης επικινδυνότητας.

Όσον αφορά το κομμάτι του χαρακτηρισμού των κινδύνων, αυτό περιγράφει τις επιπτώσεις που μπορεί να έχει η πρόσληψη ενός κινδύνου, είτε αυτός είναι μικροοργανισμός είτε τοξίνη (FAO and WHO, 2021), και όπου είναι εφικτό συνοδεύεται από μελέτες δόσης-απόκρισης (dose-response). Σε αυτές τις μελέτες όταν δεν λαμβάνεται υπόψη η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των στελεχών παθογόνων βακτηρίων, αυξάνεται το στοιχείο της αβεβαιότητας. Πράγματι, ανθρώπινα κλινικά δεδομένα έχουν αναδείξει την ανάγκη για ανάπτυξη και εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων ικανών να προβλέπουν τη σχέση δόσης- απόκρισης ως συνάρτηση (μεταξύ άλλων) της μολυσματικότητας σε επίπεδο στελέχους (Lianou and Koutsoumanis, 2013).

Διαστελεχική παραλλακτικότητα και Challenge tests

Σύμφωνα με το Παράρτημα II του Ευρωπαϊκού Κανονισμού 2073/2005, που αφορά στα μικροβιολογικά κριτήρια σε τρόφιμα, όποτε κρίνεται απαραίτητο, ο υπεύθυνος επιχείρησης τροφίμων θα πρέπει να διενεργεί ειδικές μελέτες στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα για τη διερεύνηση της διάρκειας ζωής τους στο ράφι αναφορικά με τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*. Η σχετική Ευρωπαϊκή τεχνική οδηγία (European Commission (EC), 2021) διευκρινίζει ότι πρόκειται για τις λεγόμενες «δοκιμές πρόκλησης» (challenge test), τις οποίες ορίζει ως τις εργαστηριακές μελέτες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της μικροβιολογικής ασφάλειας ενός προϊόντος.

Οι μελέτες αυτές διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- 1. Δοκιμή για τον καθορισμό του δυναμικού ανάπτυξης (growth potential):** Με αυτή τη δοκιμή μετράται η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε ένα τεχνητά μολυσμένο τρόφιμο κατά τη διάρκεια αποθήκευσής του υπό τις συνθήκες που αναμένεται να επικρατούν στο περιβάλλον

του κατασκευαστή, του λιανικού εμπόρου και τελικά του καταναλωτή. Το δυναμικό ανάπτυξης (Δ) προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Growth potential } (\Delta) = (\text{highest observed } Lm \text{ concentration}) - (\text{initial } Lm \text{ concentration})$$

(Εξίσωση 1)

Το δυναμικό ανάπτυξης (Δ) μπορεί σε επόμενο στάδιο να αξιοποιηθεί για την εφαρμογή του Κανονισμού 2073/2005, διαχωρίζοντας τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα σε αυτά που επιτρέπουν ($\Delta > 0,5 \text{ Log CFU/g}$) και σε αυτά που δεν επιτρέπουν ($\Delta > 0,5 \text{ Log CFU/g}$) την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*.

- 2. Δοκιμή για τον καθορισμό του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης (maximum growth rate):** Με αυτή τη δοκιμή υπολογίζεται ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης ενός στελέχους σε ένα τεχνητά μολυσμένο τρόφιμο και σε μία σταθερή θερμοκρασία. Η διάρκεια αυτής της μελέτης δεν ταυτίζεται με τη διάρκεια ζωής του προϊόντος αλλά εξαρτάται από το χρόνο που απαιτείται για τη δημιουργία της καμπύλης ανάπτυξης του επιλεγμένου στελέχους.

Ιδανικά, και σύμφωνα με όσα έχουν προαναφερθεί, ο υπεύθυνος επιχείρησης τροφίμων, λαμβάνοντας υπόψη την παραλλακτικότητα των στελεχών του βακτηρίου ως προς τις φαινοτυπικές τους αποκρίσεις και στοχεύοντας στην ενσωμάτωσή της στα αποτελέσματά του με σκοπό την αύξηση της αξιοπιστίας τους, θα έπρεπε να εξετάσει ένα πλήθος στελεχών κάθε φορά. Είναι ωστόσο προφανές ότι κάτι τέτοιο είναι οικονομικά αλλά και πρακτικά ασύμφορο. Έτσι, για τη διεξαγωγή των δοκιμών πρόκλησης συνήθως επιλέγονται 3-5 αντιπροσωπευτικά στελέχη. Η επιλογή τους είναι καθοριστικής σημασίας για την έκβαση της δοκιμής γι' αυτό και πρέπει να γίνεται πάντα βάσει επιστημονικών δεδομένων και πληροφοριών, όπως η προέλευση, η φυσιολογική τους κατάσταση, οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις αλλά και οι οριακές τιμές των περιβαλλοντικών συνθηκών που επιτρέπουν την ανάπτυξή τους.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σύμφωνα με τον FAO/WHO (2004) η μείωση της παρουσίας του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στα τρόφιμα τη στιγμή της κατανάλωσής τους έχει μεγάλο αντίκτυπο στον προβλεπόμενο αριθμό κρουσμάτων της ασθένειας. Η Μικροβιολογία Πρόρρησης και ειδικότερα τα μαθηματικά μοντέλα αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο με το οποίο μπορεί να προσομοιωθεί η συμπεριφορά του μικροοργανισμού μέσα στο τρόφιμο, άρα να εκτιμηθεί και εν συνεχεία να μειωθεί ο κίνδυνος για την υγεία του καταναλωτή. Η πραγματικότητα ωστόσο είναι πολυδιάστατη, καθώς η σύνθετη βιολογία των μικροοργανισμών και ο μεγάλος αριθμός των παραμέτρων ενός μοντέλου δεν συνεπάγεται πάντα και επιτυχή βελτίωση των προβλέψεων.

Τα τελευταία χρόνια, τα στοχαστικά-πιθανολογικά μοντέλα συγκεντρώνουν όλο και μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς έχουν την ικανότητα να συμπεριλάβουν την έννοια της παραλλακτικότητας κατά την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων τους, τα οποία παύουν πλέον να έχουν τη μορφή μίας απόλυτης τιμής. Η εν λόγω παραλλακτικότητα μπορεί να αντικατοπτρίζει διαφορές που αφορούν τόσο το ίδιο το τρόφιμο και τη σύστασή του όσο και τους μικροοργανισμούς που το προσβάλλουν. Η εγγενής παραλλακτικότητα ως προς τις φαινοτυπικές αποκρίσεις μικροβιακών στελεχών του ίδιου είδους αποτελεί ίσως την βασικότερη πηγή εισαγωγής μεταβλητότητας κατά την διεξαγωγή μικροβιολογικών μελετών.

Η συγκεκριμένη μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να διερευνηθεί και να μοντελοποιηθεί η παραλλακτικότητα ενός αρκετά μεγάλου αριθμού στελεχών της *Listeria monocytogenes* όπως αυτή αποτυπώνεται στις οριακές τιμές θερμοκρασίας (cardinal values) που επιτρέπουν την ανάπτυξη. Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκε επίσης το αν η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας ως μέθοδος συλλογής δεδομένων κινητικής συμπεριφοράς μπορεί τελικά να αποδώσει συγκρίσιμα αποτελέσματα που αφορούν στις οριακές τιμές με αυτά που προέρχονται από μεθόδους κλασσικής μικροβιολογίας όπως μέσω της καταμέτρησης του πληθυσμού σε τρυβλία. Τέλος, η παραλλακτικότητα των οριακών τιμών θερμοκρασίας μεταφράστηκε σε λογαριθμικές διαφορές των προβλέψεων από στέλεχος σε στέλεχος κατά τη περιγραφή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα αλλά και στο κρέας, αντικατοπτρίζοντας πλέον τη σημασία της διαστελλεχικής μεταβλητότητας και σε πραγματικά τρόφιμα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Χαρακτηριστικά βακτηριακών απομονώσεων

Οι βακτηριακές απομονώσεις του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη προήλθαν από τη συλλογή του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Παράρτημα Ι). Πρόκειται για 30 διαφορετικά στελέχη του παθογόνου που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα και επιφάνειες ελληνικών βιομηχανιών επεξεργασίας κρέατος κατά τη χρονική περίοδο 2014-2017 μέσα στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος «e-platon».

Η ορολογική τυποποίηση των απομονώσεων πραγματοποιήθηκε τα προηγούμενα χρόνια στο εργαστήριο Ποιοτικού ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γιαννουλής, 2019) και είχε ως αποτέλεσμα την κατάταξή τους στις 4 ξεχωριστές οροομάδες κατά Doumith. (Παράρτημα Ι).

Οι βακτηριακές απομονώσεις συντηρούνταν στην κατάψυξη (-20°C) σε Tryptic Soy Broth (TSB, OXOID) παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 20% v/v του συνολικού όγκου.

Συλλογή δεδομένων κινητικής

Στο πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης δημιουργήθηκε μία βάση δεδομένων κινητικής συμπεριφοράς των 30 επιλεγμένων στελεχών του είδους *L. monocytogenes* σε 10 θερμοκρασίες (4, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 37, 40 και 42 °C). Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών έγινε αρχικά με την καταγραφή της αλλαγής την οπτικής πυκνότητας(O.D.) όταν αυτοί καλλιεργούνταν στο υγρό γενικό θρεπτικό υπόστρωμα TSB (pH 7,3 ± 0,2). Ανεξαρτήτως στελέχους και θερμοκρασίας ανάπτυξης η πειραματική πορεία περιλάμβανε τα στάδια που περιγράφονται παρακάτω.

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ SLANT

Προκειμένου τα μικροβιακά στελέχη να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους και να καταστούν άμεσα ικανά για ανάπτυξη πραγματοποιούνταν, υπό ασηπτικές συνθήκες, τα εξής:

- Μεταφορά 100 μL της κατεψυγμένης καλλιέργειας σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 μL θρεπτικού υποστρώματος TSB και επώαση στους 37 °C για 24 ώρες (Α' ανανέωση).

- Μετά την επώαση, μεταφορά 100 μL από την καλλιέργεια της Α' ανανέωσης σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 mL TSB και εκ νέου επώαση στους 37 °C για 18 ώρες (Β' ανανέωση).

Στη συνέχεια, για τη δημιουργία των slant (τροβλία stock), με σκοπό αρχικά τον έλεγχο της καθαρότητας και μετέπειτα τη συντήρηση της καλλιέργειας για μικρή χρονική διάρκεια (έως 3 εβδομάδες στους 4 °C), πραγματοποιούνταν γραμμική εξάπλωση (streaking) των κυττάρων της Β' Ανανέωσης σε τροβλία Tryptic Soy Agar (TSA, Acumedia) και μετέπειτα επώαση στους 37 °C για 48 ώρες. Έτσι, δινόταν η δυνατότητα λήψης μονής βακτηριακής αποικίας και μεταφοράς της σε 10mL αποστειρωμένο TSB με σκοπό την εκ νέου την ανανέωση της καλλιέργειας.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΙ

Πριν από κάθε πειραματική διαδικασία, ήταν απαραίτητο τα βακτήρια να ξεπεράσουν οποιαδήποτε πιθανή καταπόνηση και να πολλαπλασιαστούν έως ότου φτάσουν τη στατική φάση ανάπτυξης και τον επιθυμητό πληθυσμό κυττάρων (περίπου 10^8 CFU/mL). Για το σκοπό αυτό, κάθε στέλεχος που επρόκειτο να δοκιμασθεί, ανεξάρτητα από την θερμοκρασία επώασης που θα εξεταζόταν, υποβλήθηκε σε μία σειρά δύο ανανεώσεων. Αναλυτικότερα:

- Μία βακτηριακή αποικία από το αντίστοιχο slant (τροβλίο stock) μεταφερόταν υπό ασηπτικές συνθήκες και με τη χρήση μικροβιολογικού κρίκου (inoculation loop), σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 mL TSB και επωαζόταν στους 37°C για 24 ώρες (Α' Ανανέωση).
- Με το πέρας της επώασης, 100 μL από το δοκιμαστικό σωλήνα της Α' ανανέωσης μεταφέρονταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε καινούριο δοκιμαστικό σωλήνα με 10 mL TSB και επωάζονταν εκ νέου στους 37°C για 18 ώρες (Β' Ανανέωση)

Ακολουθούσε η διαδικασία των καθαρισμών που αποσκοπούσε στην απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και όλων των μεταβολικών παραπροϊόντων και περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- Φυγοκέντρηση της υγρής καλλιέργειας (3500 rpm για 10 λεπτά στους 4°C).
- Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση σε 10 mL αλατούχου διαλύματος (1/4 strength Ringer's solution, Neogen).
- Επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας εις τριπλούν.

Από την παραπάνω διαδικασία προέκυπτε το εμβόλιο με συγκέντρωση κυττάρων 10^8 - 10^9 CFU/mL. Τους καθαρισμούς ακολουθούσαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε αλατούχο διάλυμα οι οποίες λάμβαναν χώρα υπό ασηπτικές συνθήκες με σκοπό το τελικό εμβόλιο να έχει συγκέντρωση 10^6 CFU/mL.

ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των υπό εξέταση μικροβιακών απομονώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 96-βοθρίων αποστειρωμένων τρυβλίων μικροτιτλοδότησης (96-well microtiter plates, microplates, Biofil)

Ο εμβολιασμός των microplates γινόταν στον θάλαμο νηματικής ροής αμέσως μετά την παρασκευή των μικροβιολογικών ενοφθαλμισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, το σύνολο των βοθρίων του κάθε microplate (96 wells) πληρούνταν στην αρχή με 150 μL TSB και στην συνέχεια οι δέκα από τις δώδεκα κάθετες στήλες βοθρίων εμβολιάζονταν με 50 μl καθαρής μονοκαλλιέργειας με τέτοιο τρόπο ώστε σε κάθε στέλεχος να αντιστοιχούν 8 τεχνικές επαναλήψεις. Οι δύο εναπομείνουσες στήλες λειτούργησαν ως αρνητικοί μάρτυρες και συμπληρώνονταν με 50 μL ρυθμιστικού διαλύματος (1/4 strength Ringer's solution). Τελικά, τα microplates καλύπτονταν με το αποστειρωμένο κάλυμμά τους και μεταφέρονταν στον επωαστικό θάλαμο με την κατάλληλη θερμοκρασία.

Όταν κρινόταν απαραίτητο, δηλαδή στις θερμοκρασίες που αναμενόταν πολύ ταχεία ή αντίστοιχα πολύ αργή ανάπτυξη, τα υπό δοκιμή στελέχη εμβολιάζονταν σε περισσότερα του ενός microplate (3-4 επαναλήψεις) τα οποία μετρούνταν διαδοχικά. Αυτό διασφάλιζε αφενός ότι στις χαμηλές θερμοκρασίες όπου η επώαση διαρκούσε περισσότερο (έως και 15 ημέρες), θα προλαμβάνονταν όποια πιθανή επιμόλυνση των microplates. Αφετέρου, στις υψηλότερες θερμοκρασίες, που απαιτούσαν συχνότερη μέτρηση -και άρα συχνότερη απομάκρυνση του microplate από τον επωαστικό θάλαμο- η θερμοκρασιακή διαφορά αυτού και του περιβάλλοντος δε θα επηρέαζε σημαντικά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΠΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ

Ο προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας των μικροβιακών απομονώσεων σε κάθε βοθρίο του microplate γινόταν με τη χρήση του οργάνου Sunrise Absorbance Reader (Tecan's Magellan™), το οποίο συνοδεύεται από το κατάλληλο add-on λογισμικό ρυθμίσεων και ανάλυσης δεδομένων (Tecan's Magellan™ universal reader control and data analysis software add-on). Το συγκεκριμένο όργανο υποστηρίζει μετρήσεις σε ένα μεγάλο εύρος μηκών κύματος (340- 750 nm), μπορεί να μετρήσει ένα microplate 96 βοθρίων σε μόλις λίγα δευτερόλεπτα, ενώ δίνει και τη δυνατότητα ανάδευσης πριν ή κατά τη διάρκεια καταγραφής.

Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γινόταν κάθε φορά στα 620 nm αφού είχε προηγηθεί ανάδευση διάρκειας 5 δευτερολέπτων. Ήταν σημαντικό να διατηρούνται ασηπτικές συνθήκες (παρουσία λύχνου

Bunsen) καθόλη τη διάρκεια της μέτρησης καθώς το προστατευτικό κάλυμμα του microplate έπρεπε να απομακρυνθεί πριν αυτό εισέλθει στο όργανο.

Η συχνότητα με την οποία πραγματοποιούνταν οι μετρήσεις είχε άμεση σχέση με τη θερμοκρασία επώασης του microplate αλλά και με την ίδια την φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, οι μετρήσεις στις χαμηλότερες θερμοκρασίες (4 °C, 7 °C και 10 °C) λαμβάνονταν κάθε 24 ώρες. Αυξανόμενη της θερμοκρασίας επώασης το χρονικό διάστημα που παρεμβάλλονταν μεταξύ των μετρήσεων προοδευτικά μειωνόταν, και στις θερμοκρασίες που προσέγγιζαν θεωρητικά τη βέλτιστη για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (30°C και 37°C), το διάστημα αυτό περιορίστηκε στα 20 λεπτά. Πέρα απ' αυτό, όταν τα αποτελέσματα των μετρήσεων φάνέρωναν την έναρξη την εκθετικής φάσης ανάπτυξης των μικροοργανισμών, η μέτρηση την οπτικής πυκνότητας γινόταν με μεγαλύτερη συχνότητα έτσι ώστε αυτή να περιγραφεί με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Μέσο χρονικό διάστημα μεταξύ μετρήσεων κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης σε σχέση με τη θερμοκρασία επώασης

Θερμοκρασία Επώασης (°C)	Μέσο χρονικό διάστημα μεταξύ μετρήσεων κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης (min)
4	1440
7	1440
10	1440
15	480
20	120
25	60
30	30
37	20
40	30
42	30

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Αποσκοπώντας στην απαρίθμηση του ακριβούς αριθμού των κυττάρων του κάθε στελέχους που εμβολιαζόταν στο microplate, πριν την έναρξη της επώασης λαμβάνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες 100 μL από το περιεχόμενο του όγδοου βοθρίου της κάθε στήλης (πλην εκείνων των μαρτύρων) και αραιώνονταν κατάλληλα (1:1000 σε αλατούχο διάλυμα Ringers). Έπειτα, ακολουθούσε επιφανειακή επίστρωση (spreading) της κατάλληλης αραιώσεως σε τρυβλία TSA και επώαση στους 37 °C για 48 ώρες. Τελικά, γινόταν απαρίθμηση των βακτηριακών αποικιών στα τρυβλία που περιείχαν 30-300 αποικίες. Ο αριθμός των αποικιών εκφράστηκε σε Μονάδες Σχηματιζόμενων Αποικιών (Colony Forming Units – CFU) ανά mL δείγματος και υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{CFU/ mL} = \frac{C1 + C2}{n1 + (n2/10)} \times \frac{1}{V1} \times \frac{1}{d1}$$

(Εξίσωση 2)

Όπου:

C1 το συνολικό άθροισμα των αποικιών n1 στα τρυβλία της αραιώσης d1

C2 το συνολικό άθροισμα των αποικιών n2 στα τρυβλία της επόμενης αραιώσης

V ο όγκος του εμβολίου (mL)

Τέλος, ο αριθμός των αποικιών εκφράστηκε ως δεκαδικός λογάριθμος [Log (CFU/ mL)]

Υπολογισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης (μ_{\max})

Αφού ολοκληρώθηκε η συλλογή δεδομένων οπτικής πυκνότητας, αυτά αξιοποιήθηκαν ώστε να δημιουργηθούν οι καμπύλες ανάπτυξης για κάθε στέλεχος και για όλες τις θερμοκρασίες. Το πρωτογενές μοντέλο των Baranyi και Roberts (Baranyi and Roberts, 1994) (εξισώσεις 3, 4, 5) προσαρμόστηκε κατευθείαν στα δεδομένα οπτικής πυκνότητας. Σύμφωνα με τους Mytilinaios *et al.* (2014), κάτι τέτοιο μπορεί να δικαιολογηθεί όταν το προφίλ της οπτικής πυκνότητας-χρόνου έχει την απλή σιγμοειδή μορφή η οποία ταιριάζει στο μοντέλο που χρησιμοποιείται και όταν η μέγιστη οπτική πυκνότητα οφείλεται στον μέγιστο πληθυσμό και όχι στο φαινόμενο κορεσμού. Η προσαρμογή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού DMFit version 3.5 που είχε την μορφή πρόσθετου (add-in) για αρχεία Microsoft Excel (www.ifr.ac.uk/safety/DMfit).

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{\max}A(t) - \ln \left[1 + \frac{e^{\mu_{\max}A(t)} - 1}{e^{(N_{\max} - N_0)}} \right]$$

(Εξίσωση 3)

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(\frac{e^{(-\mu_{\max}t)} + q_0}{1 + q_0} \right)$$

(Εξίσωση 4)

$$\lambda = \frac{\ln\left(1 + \frac{1}{q_0}\right)}{\mu_{\max}}$$

(Εξίσωση 5)

Εκτίμηση οριακών τιμών θερμοκρασίας

Οι μέγιστοι ρυθμοί αύξησης (μ_{\max}) που υπολογίστηκαν για κάθε στέλεχος και για όλες τις θερμοκρασίες κατά την πρωτογενή μοντελοποίηση, αξιοποιήθηκαν σε επόμενο στάδιο για τον υπολογισμό των οριακών τιμών της θερμοκρασίας που επιτρέπουν την αύξηση. Το μοντέλο πάνω στο οποίο προσαρμόστηκαν τα μ_{\max} ανήκει στην ευρύτερη ομάδα των μοντέλων θεμελιωδών παραμέτρων (CardinalParameter Models, CPMs), τα οποία αναπτύχθηκαν από τους Rosso *et al.* (1995) σύμφωνα με τις αρχές του μοντέλου gamma concept. Τα εμπειρικά αυτά μοντέλα βασίζονται στην υπόθεση ότι η παρεμποδιστική δράση των περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης είναι πολλαπλασιαστική και καθεμιά από αυτές μπορεί να εκφραστεί ως ένας ξεχωριστός όρος ($CM_n(X)$) στην παρακάτω εξίσωση (Silva *et al.*, 2020):

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \cdot CM_2(T) \cdot CM_2(a_w) \cdot CM_1(pH)$$

(Εξίσωση 6)

Με τη σειρά τους αυτοί οι όροι εκφράζονται ως κλάσμα του μ_{\max} που επιτυγχάνεται όταν ο περιβαλλοντικός παράγοντας παίρνει τη βέλτιστη τιμή:

$$CM_n(X) = \begin{cases} 0, & X \leq X_{\min} \\ \frac{(X - X_{\max}) \cdot (X - X_{\min})^n}{(X_{\text{opt}} - X_{\min})^{n-1} \cdot [(X_{\text{opt}} - X_{\min}) \cdot (X - X_{\text{opt}}) - (X_{\text{opt}} - X_{\max}) \cdot ((n-1) \cdot X_{\text{opt}} + X_{\min} - n \cdot T)]}, & X_{\min} < X < X_{\max} \\ 0, & X \geq X_{\max} \end{cases}$$

(Εξίσωση 7)

Είναι φανερό ότι όταν οι παραπάνω όροι παίρνουν την τιμή 1, τότε το μ_{\max} είναι ίσο με το μ_{opt} , δηλαδή με τον βέλτιστο ρυθμό ανάπτυξης. Βασικό πλεονέκτημα των μοντέλων αυτών είναι ότι οι παράμετροί τους έχουν βιολογική ή γραφική σημασία.

Στην παρούσα μελέτη, η ανάπτυξη των στελεχών της *L. monocytogenes* διερευνήθηκε μόνο σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία επώασης, επομένως οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την δευτερογενή μοντελοποίηση είναι αυτές που περιγράφηκαν από τους Rosso *et al* (1993) (Εξισώσεις 8 & 9).

$$\mu_{\max}(T) = \mu_{\text{opt}} \tau(T)$$

(Εξίσωση 8)

$$\tau(T)$$

$$= \frac{(T - T_{\max})(T - T_{\min})^2}{(T_{\text{opt}} - T_{\min}) [(T_{\text{opt}} - T_{\min})(T - T_{\text{opt}}) - (T_{\text{opt}} - T_{\max})(T_{\text{opt}} + T_{\min} - 2T)]}$$

(Εξίσωση 9)

Η προσαρμογή των δεδομένων στο παραπάνω μοντέλο για κάθε στέλεχος ξεχωριστά πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της γλώσσας προγραμματισμού ανοιχτού κώδικα, R.

Εξωτερική επαλήθευση (External Validation)

Όλα τα πειράματα της παρούσης μελέτης, πάνω στα οποία βασίστηκε η ανάπτυξη του δευτερογενούς μοντέλου, εκτελέστηκαν σε υγρό εργαστηριακό υπόστρωμα. Επομένως, ήταν ανάγκη να αξιολογηθεί η ικανότητά του μοντέλου αυτού να προβλέπει το μ_{\max} σε πραγματικά τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Για τον σκοπό αυτό, προβλέψεις του μ_{\max} που αφορούσαν στο σύνολο των 30 απομονώσεων σε διάφορες θερμοκρασίες του θερμοκινητικού εύρους συγκρίθηκαν με πραγματικές τιμές μ_{\max} που προέκυψαν από πειράματα σε προϊόντα κρέατος. Οι τιμές αυτές αντλήθηκαν από τη διαδικτυακή βάση δεδομένων Combase (www.combase.cc/index.php/en/).

Συσχέτιση της μεθόδου της οπτικής πυκνότητας (O.D.) με τη μέθοδο μέτρησης αποικιών σε τρυβλία για τον υπολογισμό του μέγιστου ρυθμού αύξησης (μ_{\max})

Με σκοπό τη διερεύνηση της επίπτωσης που μπορεί να έχει η μέθοδος που επιλέχθηκε για τη συλλογή των δεδομένων κινητικής συμπεριφοράς κατά τον υπολογισμό των οριακών τιμών θερμοκρασίας, εκτελέστηκαν επιπλέον πειράματα (επιβεβαίωσης) με τη μέθοδο της καταμέτρησης αποικιών σε

τρυβλία. Σε αυτά τα επιβεβαιωτικά πειράματα συμμετείχαν 2 (FL_346 και EL_2) από τα 30 μικροβιακά στελέχη, για τα οποία (με βάση τα δεδομένα οπτικής πυκνότητας) υπολογίστηκε μία από τις υψηλότερες και μία από τις χαμηλότερες τιμές του ρυθμού αύξησης αντίστοιχα. Η αύξηση παρακολούθηθηκε στις θερμοκρασίες 4, 7, 37, 40 και 42 °C και για πρακτικούς λόγους στις μεν χαμηλές θερμοκρασίες περιγράφηκε με καταμέτρηση τρυβλίων ενώ στις υψηλές με το αυτοματοποιημένο σύστημα καταγραφής οπτικής πυκνότητας Bioscreen C.

Προσδιορισμός του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης μέσω καταμέτρησης της αύξησης του μικροβιακού πληθυσμού σε τρυβλία

Συλλογή δεδομένων κινητικής

Τα 2 στελέχη (FL_346 και EL_2) που μελετήθηκαν, ανανεώθηκαν και υποβλήθηκαν στη διαδικασία των καθαρισμών σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιεγράφηκε παραπάνω ώστε να προκύψουν εμβόλια κυττάρικης συγκέντρωσης 10^8 - 10^9 CFU/mL. Σε αμέσως επόμενο στάδιο και υπό ασηπτικές συνθήκες πραγματοποιήθηκαν 4 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε αλατούχο διάλυμα Ringers. Κάθε στέλεχος εμβολιάστηκε σε ξεχωριστό περιέκτη (φιάλη Durham), που περιείχε 200 mL γενικού θρεπτικού υποστρώματος TSB, με τέτοιο όγκο εμβολίου ώστε η αρχική συγκέντρωση και των δύο στελεχών να είναι 10^2 CFU/ml. Για κάθε στέλεχος και για κάθε θερμοκρασία επώασης (4 °C και 7 °C) δημιουργήθηκαν δύο φιάλες οι οποίες αποτέλεσαν τις δύο τεχνικές επαναλήψεις του πειράματος.

Για τις επόμενες 20 ημέρες πραγματοποιούταν μία δειγματοληψία από την κάθε φιάλη κάθε 24 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, υπό ασηπτικές συνθήκες, 1 mL από την κάθε καλλιέργεια μεταφερόταν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 mL ρυθμιστικού διαλύματος (1/4 strength Ringer's solution). Ακολουθούσαν κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Στη συνέχεια, ποσότητα 100 μL από τις κατάλληλες αραιώσεις μεταφέρονταν σε τρυβλία με TSA με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης (spread), και τελικά επωάζονταν στους 37°C για 48 ώρες. Μετά την επώαση, η καταμέτρηση των αποικιών γινόταν στα τρυβλία που περιείχαν 30-300 αποικίες και ο αριθμός των αποικιών εκφραζόταν σε CFU/ml σύμφωνα με την εξίσωση που έχει προαναφερθεί.

Υπολογισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης

Καμπύλες ανάπτυξης δημιουργήθηκαν για κάθε στέλεχος και για τις δύο θερμοκρασίες επώασης. Ο μέγιστος ρυθμός αύξησης (μ_{max}) προέκυψε από την προσαρμογή του μοντέλου Baranyi και Roberts με τη χρήση του λογισμικού DMFit.

Προσδιορισμός του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης μέσω καταγραφής της οπτικής πυκνότητας με το Bioscreen C.

Το Bioscreen C είναι ένα όργανο αυτόματης καταγραφής οπτικής πυκνότητας (O.D.). Επιτρέπει την καλλιέργεια μικροβιακών κυττάρων σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 1-60°C ανάλογα με την θερμοκρασία περιβάλλοντος και έτσι αναδεικνύεται ως ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για την δημιουργία καμπυλών ανάπτυξης. Έχει τη δυνατότητα μέτρησης 2 microplates τύπου honeycomb ταυτοχρόνως. Τα συγκεκριμένα microplates αποτελούνται από 100 βοθρία των 400 μL, η χαρακτηριστική διάταξη των οποίων βοηθά στην ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας. Τέλος, δίνει την επιλογή για ανάδευση κατά τη διάρκεια καταγραφής αλλά και τη δυνατότητα λειτουργίας για μεγάλα χρονικά διαστήματα (εβδομάδες).

Συλλογή δεδομένων κινητικής

Και σε αυτό το πείραμα τα στελέχη 346 και EL2 προετοιμάστηκαν με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Έπειτα, στον θάλαμο νηματικής ροής πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του εμβολίου (10^8 - 10^9 CFU/mL). Καθένα από τα δύο microplates που μπορούν να αναλυθούν κάθε φορά στο συγκεκριμένο όργανο, εμβολιάστηκε και με ένα στέλεχος.

Ο απαραίτητος αριθμός βοθρίων κάθε microplate πληρώθηκε αρχικά με 150 μL TSB. Ο εμβολιασμός (50 μL) έγινε με τέτοιον τρόπο έτσι ώστε κάθε στήλη του microplate να αντιστοιχεί και σε μία αραιώση του αρχικού εμβολίου. Συνολικά, το εύρος των βακτηριακών συγκεντρώσεων στα microplates για το κάθε στέλεχος ήταν περίπου 10^5 - 10^2 CFU/mL. Τα 9 βοθρία της κάθε στήλης αποτελούσαν και τις 9 τεχνικές επαναλήψεις. Τέλος, δύο στήλες σε κάθε microplate λειτούργησαν ως αρνητικοί μάρτυρες αφού προστέθηκαν σε αυτές 50 μL ρυθμιστικού διαλύματος (1/4 strength Ringer's solution).

Τα microplates επώαστηκαν πρώτα στους 40°C και στη συνέχεια η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για τους 42 °C. Η διάρκεια επώασης και στις δύο περιπτώσεις ορίστηκε στις 48 ώρες, έτσι ώστε να είναι σίγουρο ότι θα επιτευχθεί η στατική φάση, ει δυνατόν για όλες τις δεκαδικές αραιώσεις του εμβολίου. Το όργανο ρυθμίστηκε ώστε να πραγματοποιεί τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 620 nm ανά 15 λεπτά, αφού πρώτα ανάδευε τα microplates για 5 δευτερόλεπτα με μέση ένταση.

Για την απαρίθμηση του ακριβούς αριθμού των κυττάρων του κάθε στελέχους που εμβολιάστηκε, ελήφθησαν 100 μL από την 6^η και τελευταία αραιώση και μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με TSA με την μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 48 ώρες και απαρίθμηση

των αποικιών. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά και με αναγωγικό τρόπο υπολογίστηκε ο ακριβής αριθμός κυττάρων που αντιστοιχούσε σε κάθε αραιώση του microplate για τα 2 στελέχη.

Υπολογισμός μεγίστου ειδικού ρυθμού αύξησης

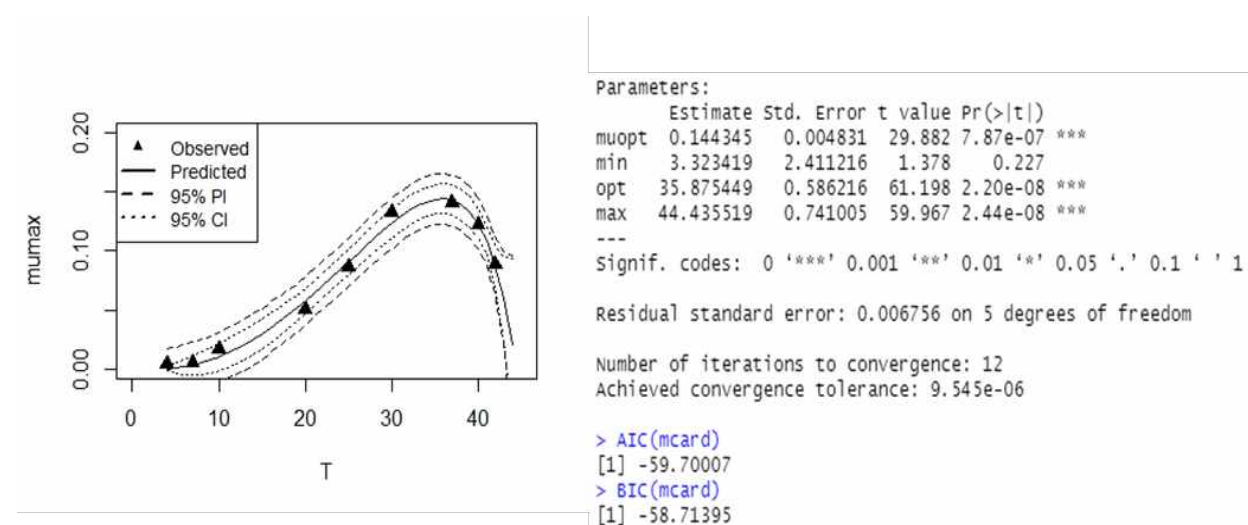
Ο υπολογισμός του μεγίστου ρυθμού αύξησης (μ_{max}) για τα δύο αυτά στελέχη στις υψηλές θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του χρόνου ανίχνευσης οπτικής πυκνότητας (Time To Detection, TTD) των δεκαδικών αραιώσεων όπως περιγράφεται από τους Dalgaard and Koutsoumanis (2001) και Mytilinaios *et al.* (2012).

Αρχικά, από τα δεδομένα O.D./χρόνου που προέκυψαν από το Bioscreen αφαιρέθηκαν οι τιμές O.D. που οφείλονταν στο θρεπτικό υλικό (μάρτυρα). Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν οι TTD για κάθε βακτηριακή συγκέντρωση των δύο καλλιεργειών των στελεχών και απεικονίστηκαν γραφικά σε σχέση με τον δεκαδικό λογάριθμο της αντίστοιχης αρχικής αραιώσης. Σύμφωνα με τους Currens and Smelt (1993), για ένα συγκεκριμένο σετ περιβαλλοντικών παραμέτρων η σχέση αυτή αποδίδεται γραφικά ως μία ευθεία γραμμή, η κλίση της οποίας είναι ίση με τον αντίστροφο αριθμό του μεγίστου ειδικού ρυθμού αύξησης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οριακές τιμές θερμοκρασίας για την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*.

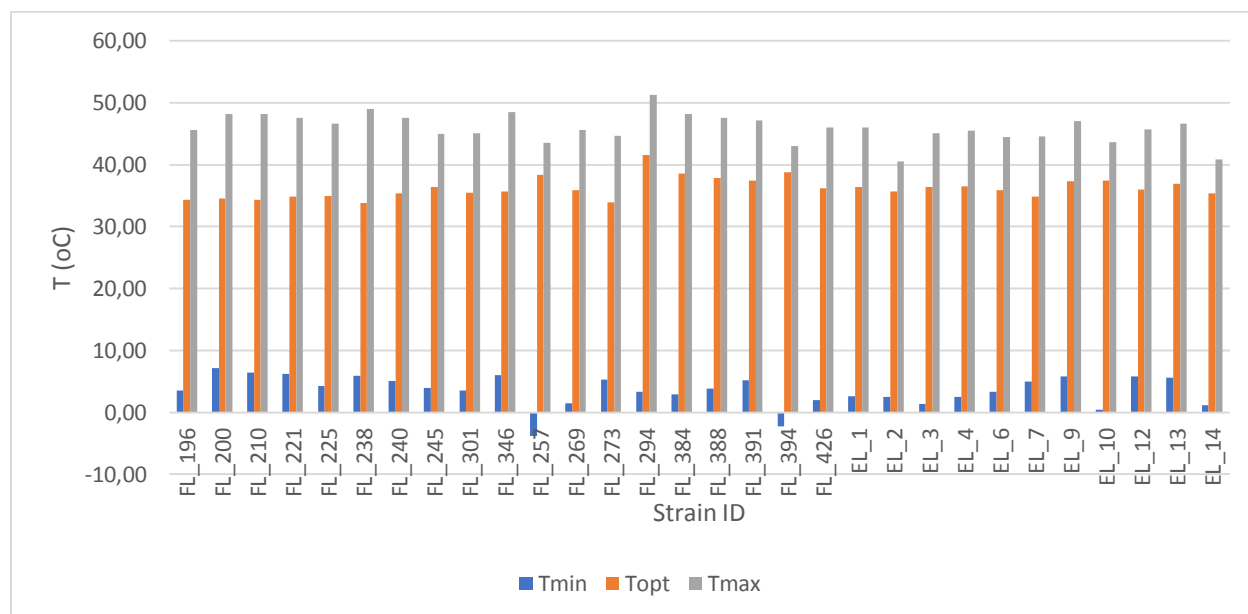
Οι εκτιμήσεις των οριακών τιμών θερμοκρασίας (T_{\min} , T_{opt} , T_{\max}) καθώς και η εκτίμηση της τιμής του μ_{opt} (βέλτιστος ρυθμός ανάπτυξης) για κάθε στέλεχος, προέκυψαν από τη προσαρμογή του μοντέλου των θεμελιωδών παραμέτρων του Rosso *et al.* (1995) στις τιμές μ_{\max} που υπολογίστηκαν κατά την πρωτογενή μοντελοποίηση (Παράρτημα II). Η προσαρμογή αυτή πραγματοποιήθηκε στο προγραμματιστικό περιβάλλον της γλώσσας R και ενδεικτικά στην Εικόνα 6 αποτυπώνεται η μορφή των αποτελεσμάτων αυτής της μοντελοποίησης όπως προέκυψαν για το στέλεχος EL_6.



Εικόνα 6: Τα αποτελέσματα της δευτερογενούς μοντελοποίησης για το στέλεχος EL_6 στο προγραμματιστικό περιβάλλον της γλώσσας R.

Στο Παράρτημα III παρατίθενται αναλυτικά οι εκτιμήσεις των παραμέτρων T_{\min} , T_{opt} , T_{\max} και μ_{opt} με το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα, το τυπικών σφάλμα καταλοίπων (Residual Standard Error) καθώς και τους δείκτες αξιολόγησης AIC (Akaike information criterion) και BIC (Bayesian information criterion) για το σύνολο των 30 εξεταζόμενων στελεχών. Στο ίδιο παράρτημα παρουσιάζονται και οι διορθωμένες τιμές των ακραίων (outliers) εκτιμήσεων των T_{\max} . Η διόρθωση αυτή έγινε για 9 στελέχη για τα οποία εκτιμήθηκαν T_{\max} που ξεπερνούσαν τους 49°C. Σε αυτές τις περιπτώσεις το T_{\max} προέκυψε από το άθροισμα των T_{opt} και της μέσης τιμής των διαφορών T_{\max} και T_{opt} των υπόλοιπων 21 στελεχών. Η οριακή θερμοκρασία των 49°C επιλέχθηκε με το σκεπτικό ότι δεν απέχει πολύ από την οριακή τιμή των

45°C που συναντάται στην βιβλιογραφία (Skandamis, 2020) ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει την ανάπτυξη της παραλλακτικότητας των εκτιμώμενων T_{max} .



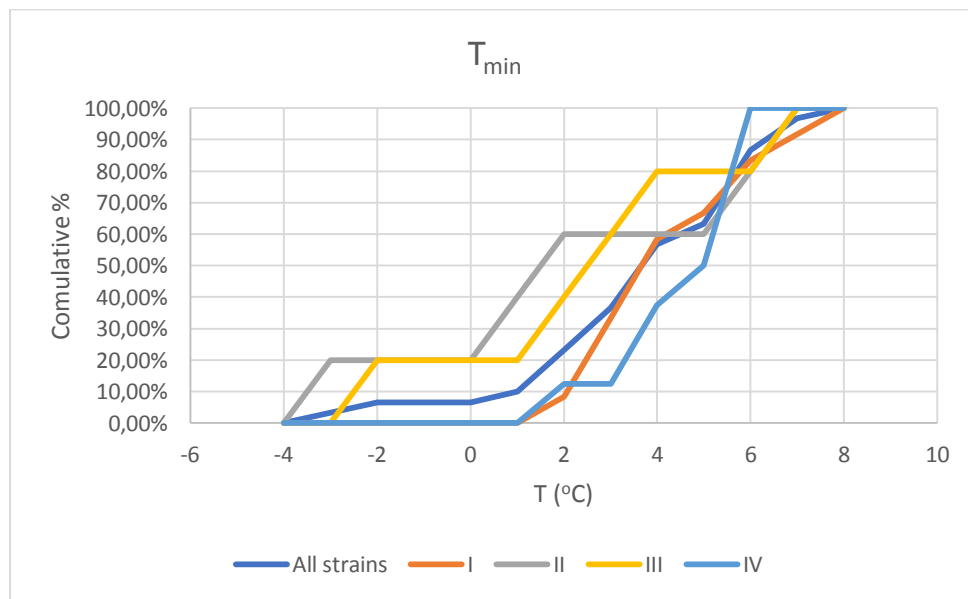
Διάγραμμα 1: Οι τιμές T_{min} , T_{opt} , T_{max} όπως εκτιμήθηκαν από το μοντέλο των θεμελιωδών παραμέτρων.

Στο Διάγραμμα 1 αναπαρίστανται οι κατανομές των οριακών τιμών της θερμοκρασίας για τα 30 στελέχη. Αρχικά γίνεται φανερό ότι το φάσμα των θερμοκρασιών που, σύμφωνα με το μοντέλο, επιτρέπουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, αν και δεν ταυτίζεται για όλα τα στελέχη, είναι ιδιαίτερα ευρύ. Ειδικότερα, η μέση τιμή των ελάχιστων θερμοκρασιών (T_{min}) είναι 3,53 °C και η μέση τιμή των μέγιστων θερμοκρασιών (T_{max}) είναι 45,96 °C (Διάγραμμα 1, Παράρτημα III). Η σχετική ομοιομορφία των τιμών T_{opt} που μπορεί κανείς να παρατηρήσει στο Διάγραμμα 1 επιβεβαιώνεται και από τον Συντελεστή Διακύμανσης (coefficient of variation) που υπολογίζεται στο 71,2%, 4,63% και 5,03% για το σύνολο των εκτιμώμενων T_{min} , T_{opt} και T_{max} αντίστοιχα (Παράρτημα III). Η μεγάλη τιμή του συντελεστή αυτού που αφορά τις ελάχιστες θερμοκρασίες αύξησης (T_{min}) είναι αναμενόμενη καθώς η παραλλακτικότητα μεταξύ των στελεχών της *L. monocytogenes* τείνει να αυξάνεται όσο οι συνθήκες ανάπτυξης -και ιδιαίτερα η θερμοκρασία- αποκλίνουν από τις βέλτιστες (Lianou and Koutsoumanis, 2013).

Τη μελέτη της κατανομής των οριακών τιμών θερμοκρασίας ακολούθησε μία λεπτομερέστερη ανάλυση των 30 εκτιμήσεων για την κάθε παράμετρο του μοντέλου ξεχωριστά.

Οι εκτιμήσεις της παραμέτρου T_{min}

Οι τιμές της παραμέτρου T_{min} (Παράρτημα III), που υπολογίστηκαν σε αυτή τη μελέτη κυμαίνονται από -3,77 έως 7,17°C. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2, το 63% των εκτιμήσεων εντοπίζεται μεταξύ 2 και 6°C. Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με εκείνα της βιβλιογραφίας αν και το εύρος των τιμών των T_{min} για την *L. monocytogenes* δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια και πολλές φορές διαφοροποιείται από έρευνα σε έρευνα. Αναλυτικότερα, μελέτες μετα-αναλύσεων, όπως εκείνη των Augustin και Carlier (2000) ή των Coroller *et al.* (2012), αναφέρουν ότι οι τιμές των T_{min} που εκτιμήθηκαν για ένα μεγάλο όγκο δεδομένων κινητικής συμπεριφοράς του βακτηρίου ήταν από -6,6°C έως 9,1°C και από -6,02°C – 1,47°C αντίστοιχα. Από την άλλη, οι Arvani *et al.* (2015) αφού μελέτησαν 20 στελέχη από διάφορες πηγές απομόνωσης, συμπεριλαμβανομένων και προϊόντων κρέατος, κατέληξαν σε ένα αρκετά στενότερο και χαμηλότερο εύρος εκτιμήσεων (-2,2°C έως 0,031°C). Τέτοιες διαφορές μπορούν να δικαιολογηθούν αν σκεφτεί κανείς ότι σπάνια παράμετροι όπως το είδος, ο αριθμός, η πηγή απομόνωσης και η φυσιολογική κατάσταση των στελεχών που μελετώνται είναι κοινές για όλες τις μελέτες. Το γεγονός αυτό δυσχεραίνει την διαδικασία σύγκρισης μεταξύ τους, τονίζοντας παράλληλα την ανάγκη για όσο το δυνατόν πιο αυτοτελείς έρευνες.



Διάγραμμα 2: Το σωρευτικό ποσοστό του συνόλου των στελεχών ή των στελεχών που ανήκουν στις οροομάδες I, II, III και IV και που παρουσίασαν T_{min} στις αντίστοιχες θερμοκρασίες.

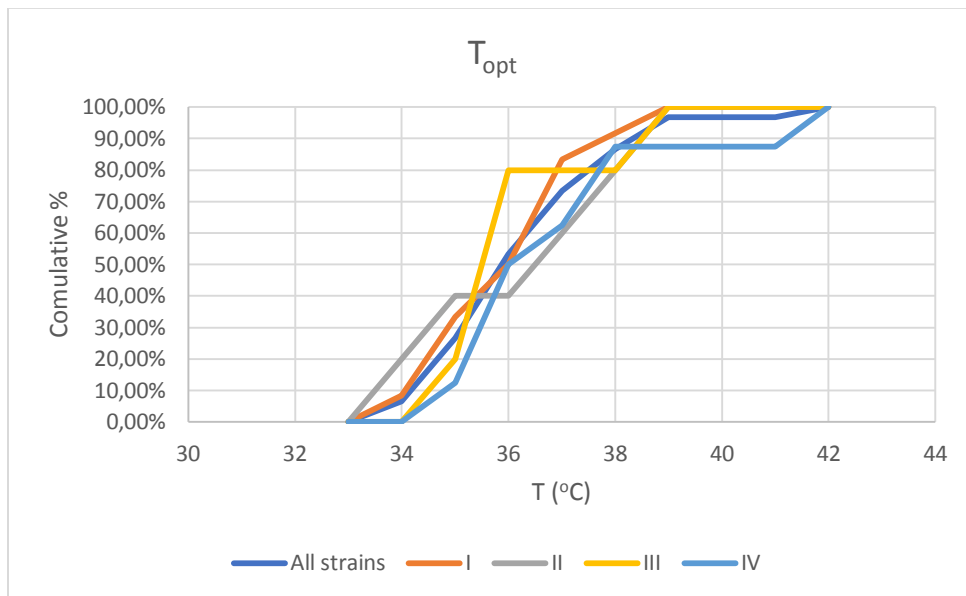
Όταν οι εκτιμώμενες τιμές εξεταστούν για κάθε οροομάδα ξεχωριστά (Διάγραμμα 2), παρατηρεί κανείς ότι το εύρος των T_{min} για τις οροομάδες II και III είναι μεγαλύτερο σε σχέση με τις άλλες δύο οροομάδες συμπεριλαμβάνοντας και ακραία χαμηλές ($-3,77^{\circ}\text{C}$) αλλά και ακραία υψηλές θερμοκρασίες ($6,41^{\circ}\text{C}$). Ας σημειωθεί εδώ ότι στην οροομάδα II ανήκει και ο ορότυπος 1/2c που συχνά απομονώνεται από τρόφιμα και επιφάνειες κάτι που εξελικτικά μπορεί να του έχει δώσει μεγαλύτερη αντοχή στην θερμοκρασιακή καταπόνηση. Αντίθετα, η πλειονότητα των αντίστοιχων τιμών για τις οροομάδες I και IV βρίσκονται συγκεντρωμένες πάνω από τους 2°C . Στη μεν οροομάδα I ανήκει ο ορότυπος 1/2a που, όπως και ο 1/2c, απομονώνεται συχνότερα από τρόφιμα (Farber and Peterkin, 1991) ενώ η οροομάδα IV περιλαμβάνει τον ορότυπο 4b που έχει συσχετιστεί με τις μεγαλύτερες εξάρσεις κρουσμάτων ανθρώπινης λιστερίωσης (van der Veen *et al.*, 2008). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο ορότυπος 4b παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην θερμική καταπόνηση (Buncic *et al.*, 2001), άρα είναι λογικό οι T_{min} των εν λόγω στελεχών να εντοπίζεται ανάμεσα στις υψηλότερες εκτιμώμενες τιμές.

Σε κάθε περίπτωση, το φάσμα των ελάχιστων θερμοκρασιών που επιτρέπουν την ανάπτυξη των 30 απομονώσεων που εξετάστηκαν, (αν και θεωρητικό) περιλαμβάνει θερμοκρασίες που λογικά ή καταχρηστικά αναμένονται να επικρατούν στη ψυκτική αλυσίδα καθόλο το μήκος της εφοδιαστικής αλυσίδας του κρέατος. Επομένως, για ακόμη μία φορά επιβεβαιώνεται η ανάγκη λήψης μέτρων που αποσκοπούν στον συστηματικό έλεγχο του βακτηρίου υπό συνθήκες ψύξης.

Οι εκτιμήσεις της παραμέτρου T_{opt}

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3, οι τιμές των T_{opt} εντοπίζονται στην συντριπτική πλειοψηφία τους (90%) από τους 34°C έως 39°C . Αυτό σημαίνει ότι ανεξάρτητα από την προέλευση ή την οροομάδα στην οποία ανήκουν, η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης δεν διαφέρει πολύ από στέλεχος σε στέλεχος. Πράγματι, στο ίδιο διάγραμμα φαίνεται ότι οι κατανομές των οριακών τιμών, που αφορούν κάθε οροομάδα ξεχωριστά, είναι παρόμοιες μεταξύ τους. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι για το 26% του συνόλου των στελεχών που εξετάστηκαν, η τιμή της T_{opt} είναι μεγαλύτερη των 37°C που, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, αποτελεί τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (Skandamis, 2020). Η παρατήρηση αυτή αφορά σε στελέχη που ανήκουν και στις 4 διαφορετικές οροομάδες και μπορεί να ερμηνευτεί υπό το πρίσμα της εξέλιξης. Πιο συγκεκριμένα, η θερμοκρασία σώματος των υγείων χοίρων βρίσκεται μεταξύ 38°C και 40°C (Zhang *et al.*, 2019), των υγείων πουλερικών μεταξύ 41°C και 42°C (Cândido *et al.*, 2020) και των βοοειδών μεταξύ $38,1^{\circ}\text{C}$ και $39,1^{\circ}\text{C}$ (Wenz *et al.*, 2011). Είναι πολύ πιθανό κατάλληλες γενετικές μεταλλάξεις να δίνουν σε ορισμένα στελέχη το πλεονέκτημα που χρειάζονται ούτως ώστε να

μπορούν να εκμεταλλευτούν πλήρως το περιβάλλον των ξενιστών τους και να πολλαπλασιαστούν με τον μεγαλύτερο δυνατό ρυθμό μέσα σε αυτό. Τέλος, παρόμοιες παρεκκλίσεις που αφορούν την εκτίμηση της παραμέτρου T_{opt} έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Augustin and Carlier, 2000; Silva *et al.*, 2020) με τους ερευνητές να υποστηρίζουν ότι συχνά κατά την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* οι T_{opt} που παρατηρούνται περιλαμβάνουν τιμές μεγαλύτερες των 30-37°C.

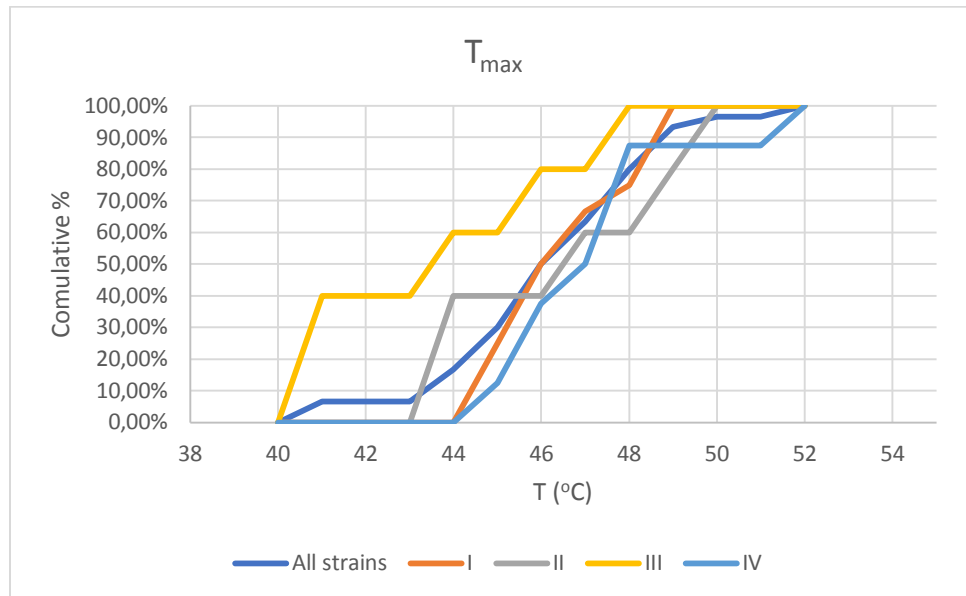


Διάγραμμα 3: Το σωρευτικό ποσοστό του συνόλου των στελεχών ή των στελεχών που ανήκουν στις οροομάδες I, II, III και IV και που παρουσίασαν T_{opt} στις αντίστοιχες θερμοκρασίες.

Οι εκτιμήσεις της παραμέτρου T_{max}

Η ανάλυση των T_{max} πραγματοποιήθηκε αφού προηγήθηκε η κατάλληλη διόρθωση των ακραίων τιμών (βλ. παράγραφο «Οριακές τιμές θερμοκρασίας για την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*»). Στο Διάγραμμα 4 αλλά και στο Παράρτημα III, φαίνεται ότι ακόμα και οι διορθωμένες εκτιμήσεις του T_{max} καταλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (από 40,56 έως 51,27 °C). Οι τιμές των εκτιμήσεων που αφορούν στις οροομάδες I και IV καταλαμβάνουν το υψηλότερο τμήμα του φάσματος αυτού ξεκινώντας από τους 45 °C, ενώ εκείνες των οροομάδων II και III λαμβάνουν και χαμηλότερες. Οι van der Veen *et al.* (2008) σε μία μελέτη που στόχευε στον καθορισμό των οριακών συνθηκών ανάπτυξης για 138 στελέχη *L. monocytogenes* αναφέρουν ότι το ανώτερο θερμοκρασιακό όριο ήταν μεταξύ 44-47°C. Οι ίδιοι αναφέρουν επίσης ότι τα στελέχη που ανήκαν στον ορότυπο 4b (Οροομάδα IV) ήταν σε

θέση να αναπτυχθούν σε υψηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με εκείνα που ανήκαν στον ορότυπο 1/2b (Οροομάδα III), κάτι που επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη.



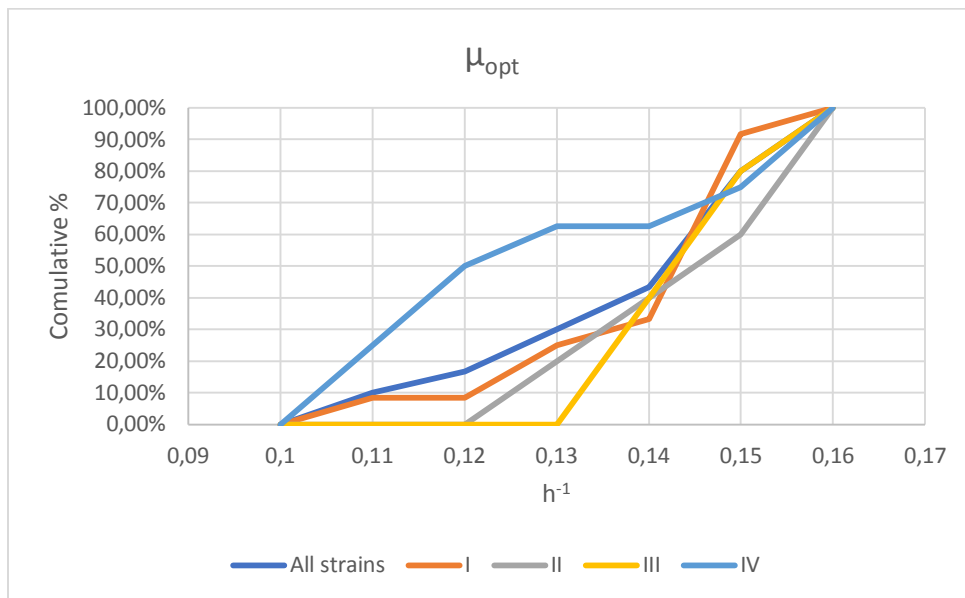
Διάγραμμα 4: Το σωρευτικό ποσοστό του συνόλου των στελεχών ή των στελεχών που ανήκουν στις οροομάδες I, II, III και IV και που παρουσίασαν T_{max} στις αντίστοιχες θερμοκρασίες.

Οι εκτιμήσεις της παραμέτρου μ_{opt}

Αναφορικά με τις τιμές μ_{opt} που εκτιμήθηκαν στην παρούσα μελέτη (Παράρτημα III), αυτές καλύπτουν ένα σχετικά στενό εύρος (από 0,10 έως 0,16 h^{-1}), με ένα μεγάλο ποσοστό των εκτιμήσεων (63,3%) να συγκεντρώνεται μεταξύ των τιμών 0,13 και 1,15 h^{-1} . Οι μ_{opt} των στελεχών που ανήκουν στις οροομάδες II και III φαίνεται να κατέχουν υψηλότερες τιμές ενώ τα στελέχη των οροομάδων I και IV αντιπροσωπεύονται σε ολόκληρο το εύρος των εκτιμήσεων (Διάγραμμα 5).

Ο Συντελεστής Διακύμανσης για τις τιμές των μ_{opt} υπολογίζεται στο 10,94% (Παράρτημα III). Μικρή μεταβλητότητα ως προς τις εκτιμώμενες τιμές των μ_{opt} (αν και σχετικά μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή που υπολογίστηκε στην παρούσα μελέτη) αναφέρουν και οι Augustin *et al.* (2005). Πιο συγκεκριμένα υποστήριξαν ότι η μεταβλητότητα αυτή εξαρτάται άμεσα από το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσεται το βακτήριο μιας και οι συντελεστές διακύμανσης που υπολόγισαν για αυτό το μέγεθος ήταν μεταξύ 15

και 25% για υγρά μικροβιολογικά υποστρώματα, γαλακτοκομικά προϊόντα και ιχθυρά, 30-50% για προϊόντα κρέατος και περίπου 90% για τυριά.



Διάγραμμα 5: Το σωρευτικό ποσοστό του συνόλου των στελεχών ή των στελεχών που ανήκουν στις οροομάδες I,II,III και IV και που παρουσίασαν μ_{opt} στις αντίστοιχες τιμές.

Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών

Στοχεύοντας στην ταυτόχρονη εξέταση των εκτιμήσεων του μοντέλου που αφορούν και στις τρεις οριακές συνθήκες θερμοκρασίας (T_{min} , T_{opt} και T_{max}), πραγματοποιήθηκε ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) με τη χρήση του λογισμικού Statgraphics centurion. Η ανάλυση αυτή περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τον Karl Pearson το 1901 και πλέον αποτελεί μία από τις βασικότερες τεχνικές της λεγόμενης πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης (Multivariate Statistical Analysis, MSA).

Principal Components Analysis

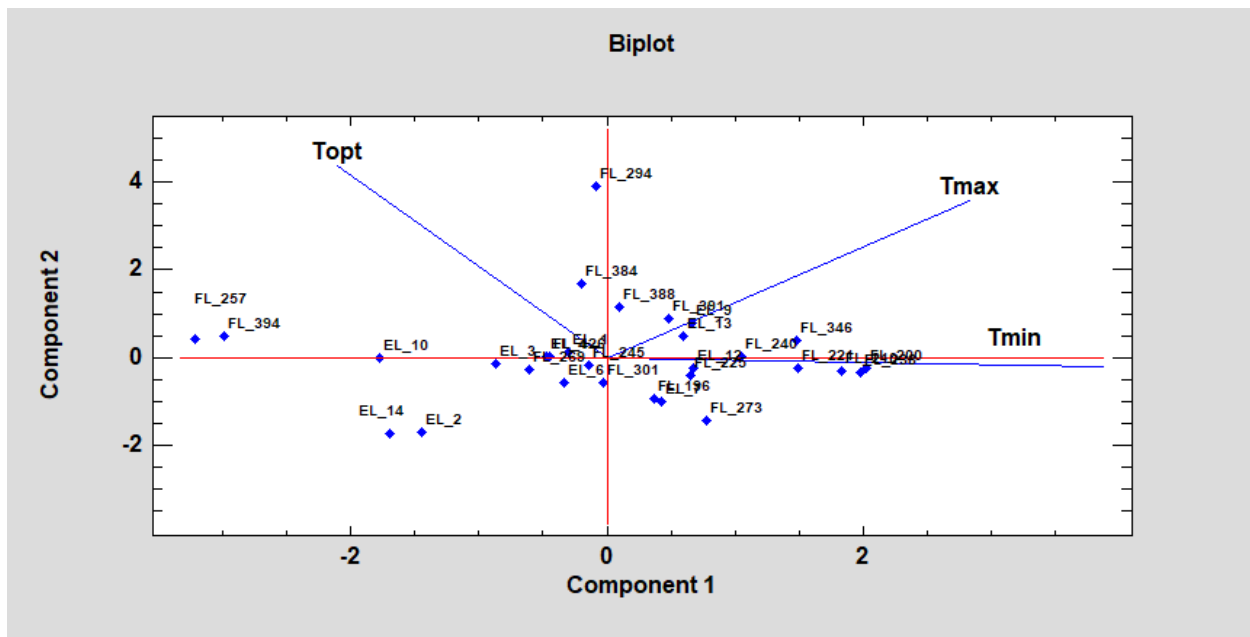
Component Number	Eigenvalue	Percent of Variance	Cumulative Percentage
1	1.68283	56.094	56.094
2	1.14011	38.004	94.098
3	0.177058	5.902	100.000

Table of Component Weights

	Component 1	Component 2
Tmin	0.73862	-0.0388622
Topt	-0.402648	0.775258
Tmax	0.540663	0.630449

Εικόνα 7: Ιδιοτιμές των κύριων συνιστωσών, τα ποσοστά κάλυψης της συνολικής αρχικής διακύμανσης καθώς και οι τιμές των ιδιοδιανυσμάτων των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών.

Στην Εικόνα 7 φαίνεται ότι δύο κύριες συνιστώσες είναι επαρκείς για το συγκεκριμένο σετ δεδομένων αφού σωρευτικά καλύπτουν το 94% της αρχικής διακύμανσης. Επιπλέον, κρίνοντας από τις τιμές των ιδιοδιανυσμάτων, φαίνεται ότι η συνιστώσα 1 χαρακτηρίζεται από ισχυρή θετική συσχέτιση με υψηλές τιμές T_{min} και αρνητική συσχέτιση με τις τιμές T_{opt} . Αντίθετα, η συνιστώσα 2 χαρακτηρίζεται από ισχυρή θετική συσχέτιση με υψηλές τιμές T_{opt} και αρνητική συσχέτιση με τις τιμές T_{min} . Γραφικά (Εικόνα 8), αυτές οι παρατηρήσεις μεταφράζονται ως εξής: Απομονώσεις που βρίσκονται στο πάνω δεξιό τεταρτημόριο (FL_346, FL_388, FL_391, EL_9, EL_1) χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές T_{min} και υψηλές τιμές T_{opt} , ενώ οι απομονώσεις που εντοπίζονται στο κάτω αριστερά τεταρτημόριο (EL_14, EL_2, EL_6, FL_269) χαρακτηρίζονται από χαμηλές τιμές T_{min} και χαμηλές τιμές T_{opt} .



Εικόνα 8: Γραφική αναπαράσταση του συνόλου των εξεταζόμενων στελεχών όπως προέκυψε από την ανάλυση κύριων συνιστωσών.

Σε επόμενο στάδιο, επιχειρήθηκε η πιθανή συσχέτιση των παραπάνω αποτελεσμάτων (PCA) με τα μετα δεδομένα του Παραρτήματος Ι. Αρχικά, δεν μπορεί να γίνει κάποια ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ των εξεταζόμενων παραμέτρων και του οροτύπου ή της προέλευσης των απομονώσεων, ωστόσο φαίνεται ότι τα στελέχη που ανήκουν στην οροομάδα IV (ορότυποι 4b, 4d, 4e) εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στην δεξιά πλευρά της συνιστώσας 2 και χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές T_{opt} και χαμηλές τιμές T_{min} , ενώ τα στελέχη που ανήκουν στην οροομάδα III (ορότυποι 1/2b, 3b, 7) εντοπίζονται στην κάτω πλευρά της συνιστώσας 1 και χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές T_{min} και χαμηλές τιμές T_{opt} .

Συσχέτιση δεδομένων O.D – plate counts/Bioscreen

Όπως έχει προαναφερθεί ένας από τους στόχους αυτής της μελέτης ήταν να διαπιστωθεί εάν η μέθοδος της καταμέτρησης της οπτικής πυκνότητας μπορεί να συγκριθεί και άρα τελικά να αντικαταστήσει εκείνη της κλασσικής καταμέτρησης αποικιών σε τρυβλία κατά την εκτίμηση των οριακών τιμών θερμοκρασίας. Για τον σκοπό αυτό, ήταν απαραίτητο να διερευνηθεί η σχέση των μέγιστων ειδικών ρυθμών αύξησης που υπολογίζονται με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν και από τις δύο αυτές μεθόδους.

Ειδικότερα, αφού υπολογίστηκαν τα μ_{max} για τα δύο εξεταζόμενα στελέχη και με τις δύο μεθόδους, αξιοποιήθηκαν σε επόμενο στάδιο για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης (calibration curve). Για κάθε στέλεχος δημιουργήθηκε ένα γράφημα στον οριζόντιο άξονα του οποίου τοποθετήθηκαν τα μ_{max} όπως υπολογίστηκαν από τα δεδομένα οπτικής πυκνότητας και στον κάθετο άξονα τοποθετήθηκαν τα μ_{max} όπως υπολογίστηκαν με την μέθοδο της καταμέτρησης τρυβλίων και του Bioscreen (Διαγράμματα 6 & 7). Στην συνέχεια, εφαρμόστηκε απλή γραμμική παλινδρόμηση και για τα δύο στελέχη και τελικά προέκυψαν οι εξής εξισώσεις συσχέτισης:

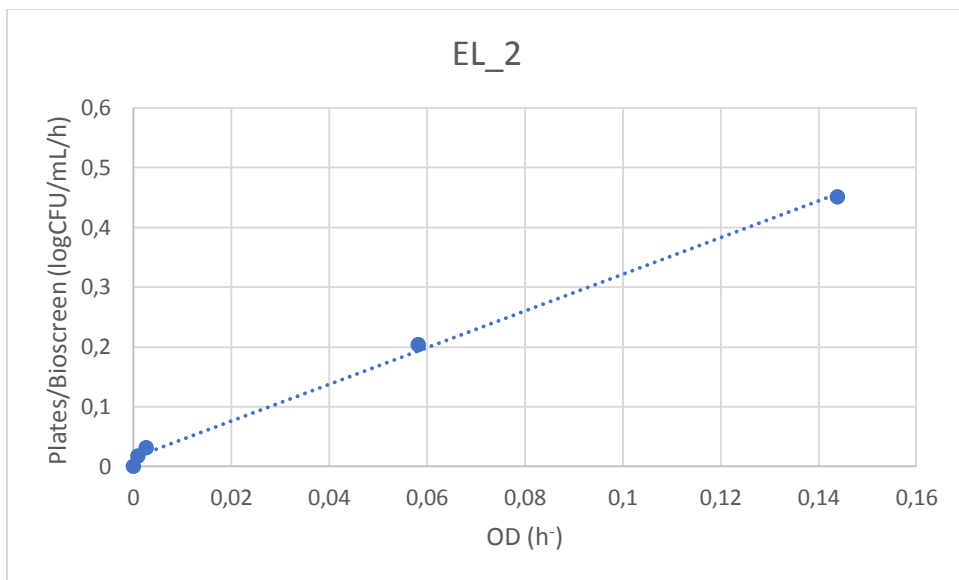
$$\text{FL_346} \quad \mu_{max}(N)=3.391 \mu_{max}(O.D.) + 0.0018, R^2 = 0.8707$$

(Εξίσωση 10)

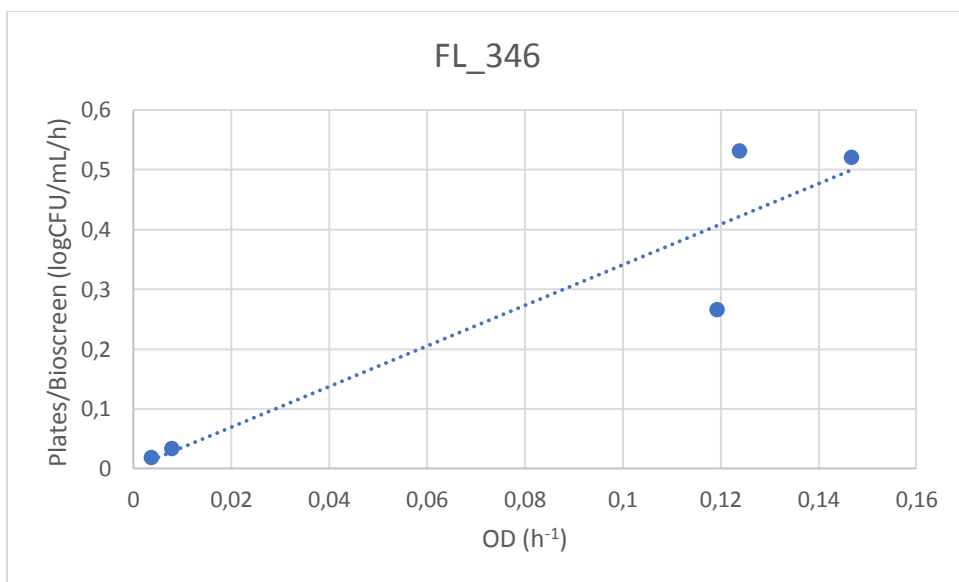
$$\text{EL_2} \quad \mu_{max}(N)=3.0648 \mu_{max}(O.D.) + 0.0151, R^2 = 0.997$$

(Εξίσωση 11)

όπου $\mu_{max}(N)$ είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης με τις μεθόδους καταμέτρησης τρυβλίων-Bioscreen (LogCFU/mL/h) και $\mu_{max}(O.D.)$ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης με τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας (h^{-1}).



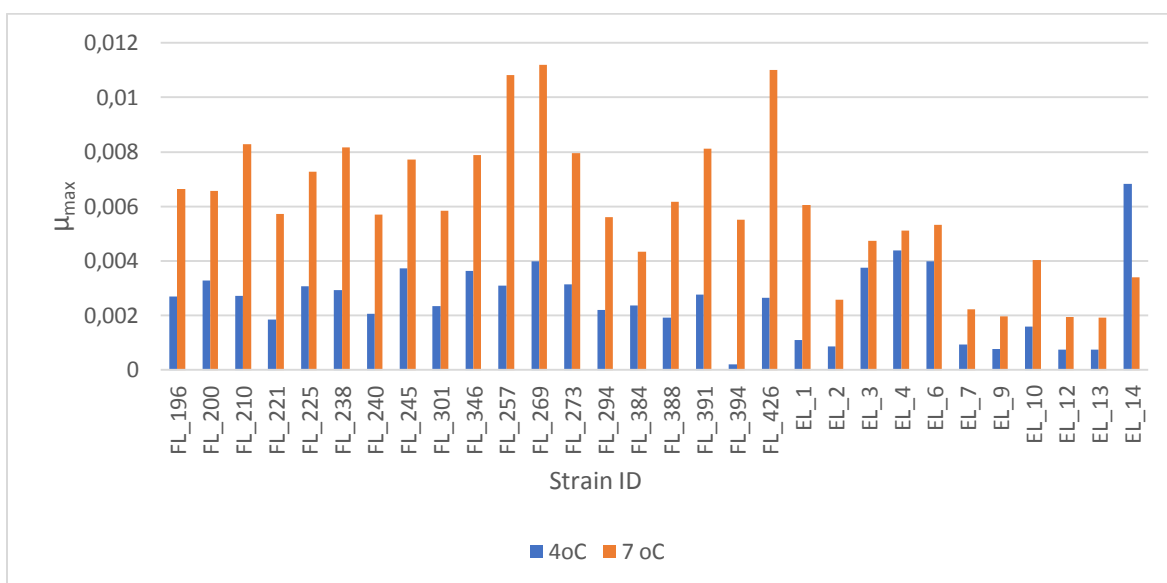
Διάγραμμα 6: Καμπύλη βαθμονόμησης για το στέλεχος EL_2.



Διάγραμμα 7: Καμπύλη βαθμονόμησης για το στέλεχος EL_346.

Εξετάζοντας τις δύο αυτές εξισώσεις καθώς και τα σχετικά διαγράμματα παρατηρεί κανείς ότι τα μεγέθη $\mu_{\max}(N)$ και $\mu_{\max}(O.D.)$ και για τα δύο στελέχη αν και δεν ταυτίζονται, είναι (σχεδόν) ανάλογα. Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι ο συντελεστής αναλογίας- κλίση των ευθειών είναι παρόμοιος παρόλο που το FL_346 είναι ένα στέλεχος που, όπως αποδείχθηκε από την πρωτογενή μοντελοποίηση,

στις χαμηλές θερμοκρασίες (4, 7°C) αναπτύσσεται γρήγορα (fast grower) ενώ το EL_2 στις ίδιες θερμοκρασίες αναπτύσσεται αργά (slow grower) (Διάγραμμα 8).



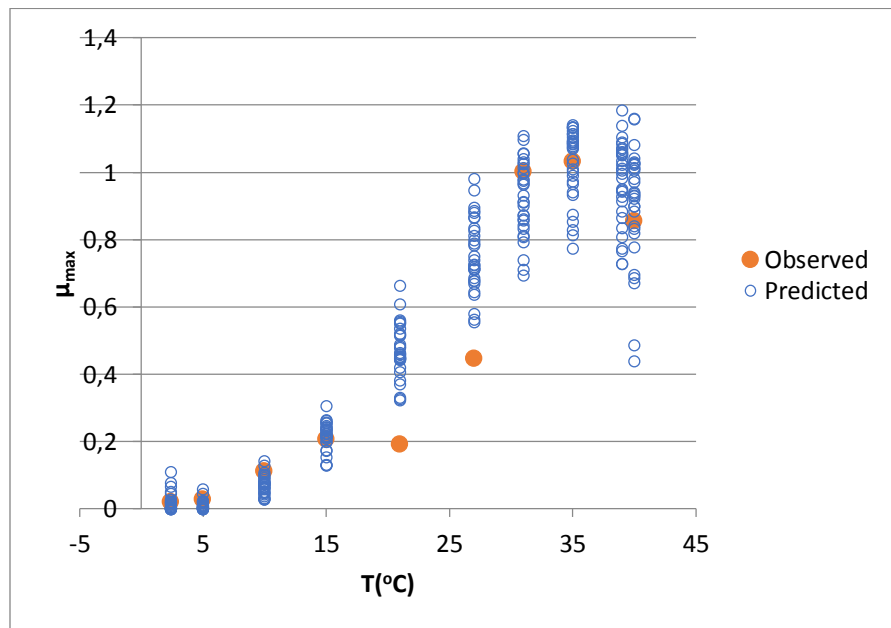
Διάγραμμα 8: Οι κατανομές των μ_{max} (h^{-1}) που υπολογίστηκαν για το σύνολο των στελεχών στις θερμοκρασίες των 4°C και 7°C.

Το γεγονός ότι οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί αύξησης μπορούν να συσχετιστούν επιτρέπει αρχικά τη διόρθωση - μετατροπή των $\mu_{max}(O.D.)$ σε $\mu_{max}(N)$ και αντίστροφα χωρίς να απαιτούνται επιπλέον πειράματα. Έμμεση συνέπεια αυτής της γραμμικής σχέσης των $\mu_{max}(O.D.)$ και $\mu_{max}(N)$ είναι ότι ανεξάρτητα από το είδος της μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό των μ_{max} , όταν αυτά χρησιμοποιηθούν για να τροφοδοτίσουν το δευτερογενές μοντέλο, οι τιμές των εκτιμώμενων παραμέτρων θα είναι οι ίδιες. Η σημασία αυτής της διαπίστωσης είναι μεγάλη δεδομένου του ότι η μέθοδος της καταμέτρησης οπτικής πυκνότητας είναι λιγότερο χρονοβόρα σε σχέση με τη μέθοδο της καταμέτρησης των τρυβλίων.

Τέλος, από τη στιγμή που τα δύο αυτά στελέχη επιλέχθηκαν με το σκεπτικό ότι αντιπροσωπεύουν τα γρήγορα και αργά αναπτυσσόμενα στελέχη όσον αφορά τις χαμηλές θερμοκρασίες, αναμένεται ότι τα $\mu_{max}(N)$ και των υπόλοιπων στελεχών θα βρίσκονται ανάμεσα στο εύρος που ορίζουν οι εξισώσεις 8 και 9. Οι διορθωμένες τιμές των εκτιμήσεων της παραμέτρου μορτ για κάθε απομόνωση ξεχωριστά φαίνονται στο Παράρτημα IV.

Εξωτερική επαλήθευση (External Validation)

Όταν οι προβλεπόμενες τιμές μ_{max} συγκριθούν με εκείνες που προκύπτουν από ανεξάρτητα πειράματα σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Διάγραμμα 9), φαίνεται ότι το μοντέλο δίνει έγκυρες προβλέψεις. Οι πραγματικές τιμές των μ_{max} εντοπίζονται κατά κύριο λόγο μέσα στην ζώνη πρόβλεψης του μοντέλου που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, ενώ εκείνες που αποκλίνουν έχουν μικρότερες τιμές από τις προβλεπόμενες, επομένως οι προβλέψεις αυτές θεωρούνται fail safe.



Διάγραμμα 9: Οι τιμές του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης μ_{max} (lnCFU/mL/h) που προβλέπονται από το μοντέλο για τις 30 εξεταζόμενες απομονώσεις (predicted) σε σχέση με εκείνες που έχουν υπολογιστεί από ανεξάρτητα πειράματα σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης (observed).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται και γραφικά πλέον ο τρόπος με τον οποίο η παραλλακτικότητα των οριακών τιμών της θερμοκρασίας επηρεάζει την προβλεπόμενη τιμή του μ_{max} . Ειδικότερα, το εύρος των εκτιμώμενων μ_{max} φαίνεται να αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας και σε θερμοκρασίες όπως εκείνη των 27 °C να περιλαμβάνει τιμές από 0,55 έως 0,98 lnCFU/mL/h. Η έννοια της παραλλακτικότητας επομένως είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψιν κατά την ανάπτυξη αντίστοιχων μοντέλων καθώς όπως αποδεικνύεται μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλες αποκλίσεις των προβλεπόμενων τιμών.

Διαστελλεχική παραλλακτικότητα στην πρόβλεψη της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε εργαστηριακό υπόστρωμα και σε κρέας.

Το μοντέλο που αναπτύχθηκε αξιοποιήθηκε για την πρόβλεψη της μικροβιακής ανάπτυξης στην ενδεικτική θερμοκρασία των 8°C. Η τιμή αυτή επιλέχθηκε καθώς πολλές έρευνες που αφορούν χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης έχουν δείξει ότι τα οικιακά ψυγεία διάφορων πληθυσμιακών ομάδων συχνά ξεπερνούν τους 7°C (Dumitrașcu *et al.*, 2020).

Η περιγραφή της κινητικής συμπεριφοράς της *L. monocytogenes* πρώτον στο εργαστηριακό θρεπτικό υλικό (TSB) και δεύτερον σε πραγματικό τρόφιμο (κρέας) έγινε με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου της εκθετικής ανάπτυξης (Εξισώσεις 12 & 13)

$$\frac{dN}{dt} = \mu_{\max} * N$$

(Εξίσωση 12)

Όταν η παραπάνω εξίσωση λογαριθμηθεί:

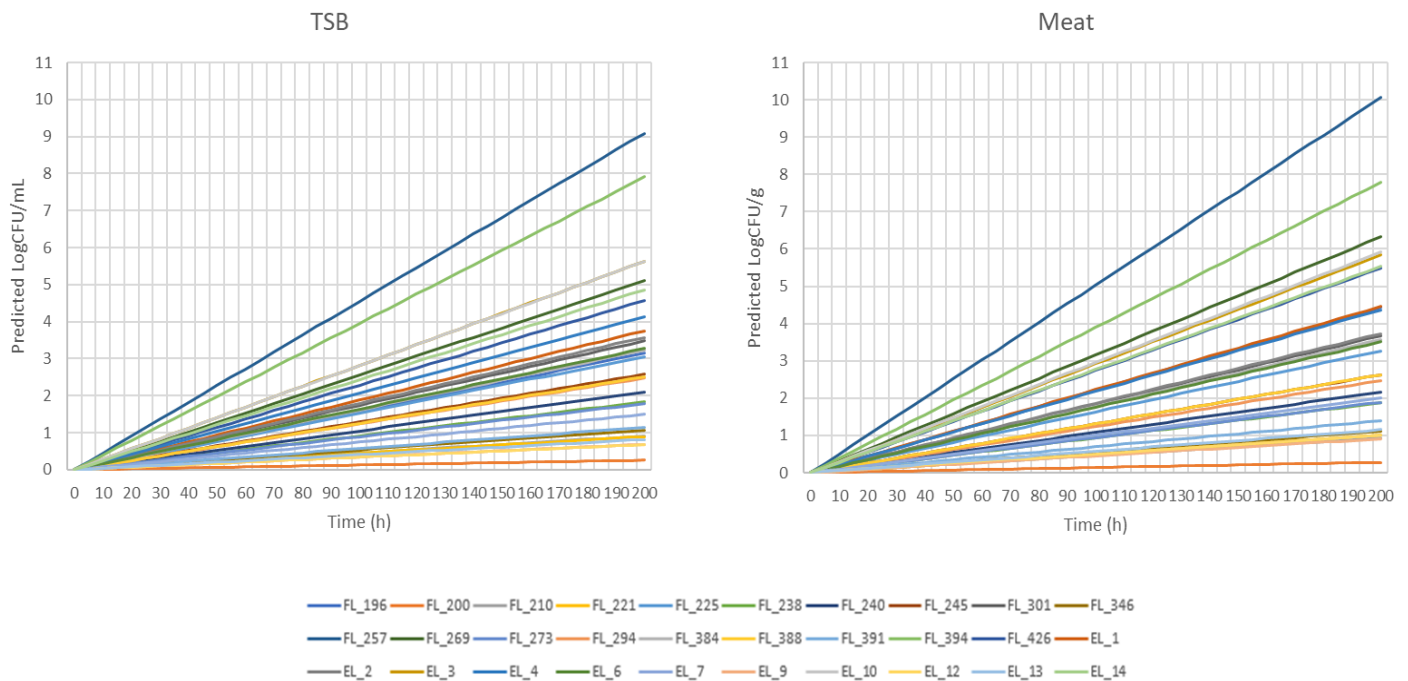
$$\text{Log}(N_t) = \text{Log}N_0 + \mu_{\max} * t$$

(Εξίσωση 13)

Όπου N_t ο αριθμός των κυττάρων τη χρονική στιγμή t , N_0 ο αρχικός αριθμός των κυττάρων και μ_{\max} ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης. Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε το χειρότερο σενάριο (worst-case scenario) που προβλέπει απουσία φάσης προσαρμογής, το οποίο είναι ρεαλιστικό και μπορεί να συμβεί όταν τα στελέχη του μικροοργανισμού έχουν προσαρμοστεί στο περιβάλλον του τροφίμου.

Η διαστελλεχική παραλλακτικότητα ενσωματώθηκε στην πρόβλεψη της ανάπτυξης κατά τον υπολογισμό του μ_{\max} , ο οποίος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μοντέλου των θεμελιωδών παραμέτρων του Rosso (Εξισώσεις 8 & 9). Πιο συγκεκριμένα, και όσον αφορά την πρόβλεψη της ανάπτυξης στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, το μ_{\max} υπολογίστηκε για κάθε στέλεχος ξεχωριστά, αντικαθιστώντας κάθε φορά τις τιμές των παραμέτρων του μοντέλου (T_{\min} , T_{opt} και T_{\max}) με αυτές που εκτιμήθηκαν στη παρούσα μελέτη. Όπως αποδείχθηκε, προηγουμένως, οι τιμές αυτές είναι σταθερές ανεξαρτήτως μεθόδου, επομένως η παράμετρος μ_{opt} της εξίσωσης αυτής ήταν δυνατόν να αντικατασταθεί από την διορθωμένη τιμή (average) της εκτίμησης του μ_{opt} για κάθε στέλεχος, έτσι ώστε το υπολογιζόμενο μ_{\max} να αντιστοιχεί σε λογαριθμική αύξηση του πληθυσμού και όχι σε αύξηση της οπτικής πυκνότητας.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και κατά τον υπολογισμό των μέγιστων ειδικών ρυθμών αύξησης των στελεχών κατά την ανάπτυξη των στελεχών στο κρέας με τη διαφορά ότι σε αυτή τη περίπτωση η τιμή του μ_{opt} προήλθε από τη βιβλιογραφία (Augustin *et al.*, 2005) έτσι ώστε να αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Ειδικότερα, για όλα τα στελέχη ως μ_{opt} ελήφθηκε η τιμή 1,168, όπως υπολογίστηκε από τους Augustin *et al.* (2005) σε μία εκτεταμένη μέτα-ανάλυση που περιλάμβανε και δεδομένα που αφορούσαν σε προϊόντα κρέατος που προήλθαν από 17 διαφορετικές έρευνες.



Τελικά, αντικαθιστώντας στην Εξίσωση 13 όπου μ_{max} τις τιμές των μέγιστων ειδικών ρυθμών αύξησης που υπολογίστηκαν, και $N_0 = 1$ προέκυψαν οι παρακάτω καμπύλες ανάπτυξης (Διαγράμματα 10 & 11).

Διαγράμματα 10 & 11: Η προβλεπόμενη ανάπτυξη των 30 απομονώσεων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα και στο κρέας.

Ανεξαρτήτως του μέσου ανάπτυξης (υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ή κρέας), η ανάπτυξη των στελεχών δεν περιορίζεται σημαντικά από την χαμηλή θερμοκρασία, ενώ η απόκρισή τους παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία. Το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο στην περίπτωση των προβλέψεων που αφορούν στο κρέας καθώς στις 200 ώρες ο πληθυσμός των μικροοργανισμών καλύπτει ένα εύρος τιμών από 0,28 μέχρι 10 LogCFU/g. Στο εργαστηριακό θρεπτικό υλικό για την ίδια χρονική στιγμή ο πληθυσμός των περισσότερων στελεχών κυμαίνεται μεταξύ 0,26 και 5,62 LogCFU/ml. Οι απομονώσεις FL_257 και

FL_394 και στις δύο περιπτώσεις ήταν εκείνες με τις υψηλότερες τιμές προβλέψεων. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν βρεθεί από τους Arvani *et al.* (2015), οι οποίοι σε μία αντίστοιχη μελέτη που αφορούσε στην πρόβλεψη της ανάπτυξης 20 στελεχών στους 7°C αναφέρουν ότι οι πληθυσμοί του μικροοργανισμού στις 10 ημέρες παρουσίαζαν διαφορές της τάξης των 4 LogCFU/g με τις υψηλότερες να φτάνουν τους 6 LogCFU/g. Επιπροσθέτως, αξίζει να παρατηρηθεί το γεγονός ότι οι προβλέψεις του μοντέλου που αφορούν στην ανάπτυξη σε εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα προσεγγίζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό εκείνες που αφορούν στο πραγματικό τρόφιμο που εξετάστηκε σε αυτή τη μελέτη.

Συμπεράσματα

Ο αποτελεσματικός έλεγχος της παρουσίας του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* κατά μήκος της εφοδιαστικής αλυσίδας είναι απαραίτητος για την διαφύλαξη της υγείας των καταναλωτών. Η βαθύτερη κατανόηση της φυσιολογίας του βακτηρίου, της αλληλεπίδρασής του με το περιβάλλον αλλά και των γενετικών και φαινοτυπικών διαφοροποιήσεων μεταξύ των στελεχών του παίζει καθοριστικό ρόλο στην προσπάθεια αυτή.

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν συνολικά 30 απομονώσεις *L. monocytogenes* που προήλθαν από τρόφιμα και επιφάνειες ελληνικών βιομηχανιών επεξεργασίας κρέατος κατά τη χρονική περίοδο 2014-2017. Αφού μελετήθηκε η κινητική τους συμπεριφορά σε ολόκληρο το θερμοκινητικό εύρος μέσω της καταγραφής της Οπτικής Πυκνότητας, τα δεδομένα αυτά αξιοποιήθηκαν στη συνέχεια κατά τη μοντελοποίηση της παραλλακτικότητας των οριακών συνθηκών θερμοκρασίας που επιτρέπουν την ανάπτυξή τους. Επιπλέον, πειράματα συλλογής δεδομένων με την κλασική μέθοδο της απαρίθμησης αποικιών σε τρυβλία επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη μέθοδο της καταγραφής της Οπτικής Πυκνότητας αποδεικνύοντας πως ο χρόνος που απαιτείται για την ανάπτυξη του μοντέλου μπορεί να περιοριστεί σημαντικά χωρίς να μειωθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Τέλος, η παραλλακτικότητα των οριακών τιμών θερμοκρασίας ποσοτικοποιήθηκε και μεταφράστηκε σε μεγάλες λογαριθμικές διαφορές (της τάξης των 10 LogCFU/g) κατά την πρόβλεψη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού στο κρέας.

Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να επικεντρωθούν:

- Στην ολοκλήρωση του προφίλ των 30 επιλεγμένων στελεχών συνδυάζοντας δεδομένα που αφορούν την παραλλακτικότητα των φαινοτυπικών τους αποκρίσεων με δεδομένα γενετικών αναλύσεων (πχ Whole Genome Sequencing).
- Στην περαιτέρω μοριακή τυποποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο στελέχους η οποία θα βοηθούσε στη βαθύτερη κατανόηση της κατανομής τους στα τρόφιμα και τις επιφάνειες των ελληνικών βιομηχανιών.
- Στην ανάπτυξη του ίδιου μοντέλου βασιζόμενου σε περισσότερα των 30 στελεχών έτσι ώστε να διερευνηθεί εκτενέστερα η διαστελλεχική παραλλακτικότητα των οριακών τιμών της θερμοκρασίας.

- Σε επιπλέον πειράματα επιβεβαίωσης της μεθόδου καταγραφής της Οπτικής Πυκνότητας που θα περιλαμβάνουν περισσότερα των δύο στελεχών και θα αυξάνουν την αξιοπιστία της συσχέτισης των δύο τεχνικών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson E.L. & Hattis D. (1999). Uncertainty and variability. *Risk Analysis*, 19, 47–49.
- Aryani D.C., den Besten H.M.W., Hazeleger W.C. & Zwietering M.H. (2015). Quantifying strain variability in modeling growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 208, 19–29.
- Augustin J. -C. & Carlier V. (2000). Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 29–51.
- Augustin J. -C., Zuliani V., Cornu M. & Guillier L. (2005). Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1019–1042.
- Baranyi J., & Roberts T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- Barbosa W. B., Cabedo L., Wederquist H. J., Sofos J. N., & Schmidt G. R. (1994). Growth Variation Among Species and Strains of *Listeria* in Culture Broth. *Journal of Food Protection*, Vol. 57, No.9, 765-769, 775.
- Begot C., Lebert I., & Lebert A. (1997). Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiology*, 14, 403-412.
- Buchanan R. L., Gorris L. G. M., Hayman M. M., Jackson T. C., Whiting R. C. (2017), A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1-13.
- Buncic, S., Avery, S.M., Rocourt, J. and Dimitrijevic, M. (2001). Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1 / 2a, of *Listeria monocytogenes*?. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 201–212.
- Cândido M. G. L., Tinôco I. F. F., Albino L. F. T., Freitas L. C. S. R., Santos T. C., Cecon P. R. & Gates R. S. (2020). Effects of heat stress on pullet cloacal and body temperature. *Poultry Science*, 99, 2469–2477.
- Carpentier B., & Cerf O. (2011). Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 1-8.
- Coroller L., Kan-King-Yu D., Leguerinel I., Mafart P. & Membré J.M. (2012). Modelling of growth, growth/no-growth interface and nonthermal inactivation areas of *Listeria* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 152, 139–152.
- Cuppers H.G.A.M. & Smelt J.P.P.M. (1993). Time to turbidity measurement as a tool for modeling spoilage by *Lactobacillus*. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 168-171.
- Dalgaard P. & Koutsoumanis K. (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*, 43, 183–196.
- De Jesus A. J., & Whiting R. C. (2003). Thermal Inactivation, Growth, and Survival Studies of *Listeria monocytogenes* Strains Belonging to Three Distinct Genotypic Lineages. *Journal of Food Protection*, Vol. 66, No. 9, 1611–1617.

- Delignette-Muller M.L., Cornu M., Pouillot R. & Denis J.-B. (2006). Use of Bayesian modelling in risk assessment: Application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 106, Issue 2, 195-208.
- Dortet L., Radoshevich L, Veiga E., & Cossart P. (2019). *Listeria monocytogenes*. *Encyclopedia of Microbiology* (4th ed.), 803-818.
- Doumith M., Buchrieser C, Glaser P., Jacquet C., & Martin P. (2004). Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3819–3822.
- Doyle M. P., & Buchanan R. L. (Eds) (2013). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (4th ed.), ASM Press.
- Dumitraşcu L., Nicolau A. I., Neagu C., Didier P., Maître I., Nguyen-The C., Skuland S. E., Møretrø T., Langsrud S., Truninger M., Teixeira P., Ferreira V., Martens L., Borda D. (2020). Time-temperature profiles and *Listeria monocytogenes* presence in refrigerators from households with vulnerable consumers. *Food Control*, 111, 107078.
- European Commission. (2005). Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, 50, 1-26.
- European Food Safety Authority; (2013). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat (RTE) foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA Journal* 2013;11(6):3241, 75 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3241.
- FAO & WHO (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Microbiological Risk Assessment Series No. 5. Rome, Italy, FAO and WHO.
- FAO and WHO (2019). *Codex Alimentarius Commission – Procedural Manual twenty-seventh edition*. Rome. 254 pp.
- FAO and WHO (2021). *Microbiological risk assessment - Guidance for food*. Microbiological Risk Assessment Series No. 36. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb5006en>
- Farber J. M., & Peterkin P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews*, Vol. 55, No. 3, 476-511.
- Food and Drug Administration (2012). *Bad Bug Book*, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, (2nd ed.).
- Gandhi M., & Chikindas M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1-15.
- Jay J. M., Loessner M. J., & Golden D. A. (2005). *Modern Food Microbiology* (7th ed.), Springer Science + Business Media, Inc.
- Lammerding A.M. (1997). An Overview of Microbial Food Safety Risk Assessment. *J Food Prot.*, Nov;60(11), 1420-1425.
- Lepe J. A. (2020). Current aspects of listeriosis. *Medicina Clinica*, 154(11), 453-458.

- Lianou A., & Koutsoumanis K. P. (2013). Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 310-321.
- Lianou A., & Sofos J. N. (2007). Review of the Incidence and Transmission of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Products in Retail and Food Service Environments. *Journal of Food Protection*, Vol. 70, No. 9, 2172–2198.
- Lianou A., Stopforth J. D., Yoon Y., Wiedmann M., & Sofos J. N. (2006). Growth and Stress Resistance Variation in Culture Broth among *Listeria monocytogenes* Strains of Various Serotypes and Origins. *Journal of Food Protection*, Vol. 69, No. 11, 2640–2647.
- Lomonaco S., Nucera D., & Filipello V. (2015). The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, 35, 172–183.
- Luchansky J. B., Chen Y., Porto-Fett A. C. S., Pouillot R., Shoyer B. A., Johnson-DeRycke R., Eblen D. R., Hoelzer K., Shaw W. K. JR., Van Doren J. M., Catlin M., Lee J., Tikekar R., Gallagher D., Lindsay J. A., The *Listeria* Market Basket Survey multi-institutional team, & Dennis S. (2017). Survey for *Listeria monocytogenes* in and on Ready-to-Eat Foods from Retail Establishments in the United States (2010 through 2013): Assessing Potential Changes of Pathogen Prevalence and Levels in a Decade. *Journal of Food Protection*, Vol. 80, No. 6, 903–921.
- Magalhães R., Mena C., Ferreira V., Silva J., Almeida G., Gibbs P., & Teixeira P. (2014). *Listeria monocytogenes*. Encyclopedia of Food Safety. 450-461.
- Matle I., Mbatha K.R. & Madoroba E. (2020). A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 87(1), a1869. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1869>.
- Melo J., Andrew P.W., & Faleiro M. L. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*, 67, 75–90.
- Mereghetti L., Quentin R., & Laure Van der Mee-Marquet N. (2000). Low Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to Quaternary Ammonium Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 11, 5083–5086.
- Mytilinaios I., Bernigaud I., Belot V., & Lambert R.J.W. (2014). Microbial growth parameters obtained from the analysis of time to detection data using a novel rearrangement of the Baranyi–Roberts model. *Journal of Applied Microbiology*, Vol 118, 161-174.
- Mytilinaios I., Salih M., Schofield H. K. & Lambert R. J. W. (2012). Growth curve prediction from optical density data. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 169–176.
- Nauta M. J. (2000). Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 9–18.
- Nwaiwu O. (2020). What are the recognized species of the genus *Listeria*? *Access Microbiol.* Jul 21;2(9):acmi000153.

- Poschet F., Geeraerd A.H., Scheerlinck N., B.M. Nicolai B.M. & Van Impe J. F. (2003). Monte Carlo analysis as a tool to incorporate variation on experimental data in predictive microbiology. *Food Microbiology*, Volume 20, Issue 3, 285-295.
- Quereda J. J., Morón-García A., Palacios-Gorba C., Dessaux C., García-del Portillo F., Pucciarelli M. G. & Ortega A. D. (2021). Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology. *Virulence*. 12:1, 2509-2545.
- Rosso L., Lobry J. R., Bajard S., & Flandrois J. P. (1995). Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, No. 2, 610–616.
- Rosso L., Lobry J.R., Flandrois J. P. (1993). An Unexpected Correlation between Cardinal Temperatures of Microbial Growth Highlighted by a New Model. *Journal of Theoretical Biology*, Issue 4, 447-463.
- Saldivar J. C., Davis M. L., Johnson M. G., & Ricke S. C. (2018). Chapter 13 - *Listeria monocytogenes* Adaptation and Growth at Low Temperatures: Mechanisms and Implications for Foodborne Disease. *Food and Feed Safety Systems and Analysis*. Academic Press, 227-248.
- Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L., Jones J.L., & Griffin P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 17(1):7-15.
- Silva B. N., Cadavez V., Teixeira J. A., Ellouze M. & Gonzales-Barron U. (2020). Cardinal parameter meta-regression models describing *Listeria monocytogenes* growth in broth. *Food Research International*, 136, 109476.
- Skandamis P. N. (2020). *Listeria monocytogenes*. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Third edition), 305-312.
- Sofos J. N., & Geornaras I. (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 86, 2–14.
- van der Veen S., Moezelaar R., Abee T., Wells-Bennik M.H.J. (2008). The growth limits of a large number of *Listeria monocytogenes* strains at combinations of stresses show serotype- and niche-specific traits. *Journal of Applied Microbiology* ISSN, 1364-5072.
- Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., & Kreft J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 14, No. 3, 584–640.
- Wenz J. R., Moore D. A. & Kasimanickam R. (2011). Factors associated with the rectal temperature of Holstein dairy cows during the first 10 days in milk. *J. Dairy Sci*, 94, 1864–1872.
- Zhang X., Wang S., Chen X., & Qu C. (2021). Review controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products: An overview of outbreaks, current legislations, challenges, and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 24-35.
- Zhang Z., Zhang H. & Liu T. (2019). Study on body temperature detection of pig based on infrared technology: A review. *Artificial Intelligence in Agriculture*, 1, 14–26.

Γιαννουλής Ν. (2019). «Φαινοτυπικός και μοριακός χαρακτηρισμός μικροβιακών στελεχών *Listeria monocytogenes* απομονωθέντων από βιομηχανίες τροφίμων»

Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Γενικό Χημείο του Κράτους - Άρθρο 88 (Γενικές Διατάξεις)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Στοιχεία των 30 απομονώσεων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία

Απομόνωση	Ημ/νία Απομόνωσης	Ορότυπος	Πηγή Απομόνωσης
FL_196	2/12/2014	I (1/2a, 3a)	Α' ύλη χοιρινό
FL_200	3/18/2014	I (1/2a, 3a)	Μπιφτέκι βόειο
FL_210	6/3/2014	II (1/2c, 3c)	Γύρος κοτόπουλο
FL_221	7/8/2014	III (1/2b, 3b, 7)	Γύρος κοτόπουλο
FL_225	7/22/2014	I (1/2a, 3a)	Γύρος κοτόπουλο
FL_238	10/29/2014	II (1/2c, 3c)	Ρολό κοτόπουλο γεμιστό
FL_240	10/29/2014	IV (4b, 4d, 4e)	Κεμπάπ
FL_245	11/18/2014	I (1/2a, 3a)	Γύρος χοιρινός
FL_301	7/15/2015	III (1/2b, 3b, 7)	Βόειο κρέας φυσικής ωρίμανσης
FL_346	3/1/2016	I (1/2a, 3a)	Σπάλα βόεια
FL_257	1/28/2015	II (1/2c, 3c)	Α' ύλη χοιρινό
FL_269	3/10/2015	IV (4b, 4d, 4e)	Φιλέτα χοιρινά
FL_273	4/15/2015	I (1/2a, 3a)	Λουκάνικο χοιρινό
FL_294	6/30/2015	IV (4b, 4d, 4e)	Μπιφτέκι βόειο
FL_384	10/19/2016	I (1/2a, 3a)	Γύρος κοτόπουλο
FL_388	11/1/2016	IV (4b, 4d, 4e)	Σπάλα χοιρινή
FL_391	11/1/2016	I (1/2a, 3a)	Γύρος χοιρινός
FL_394	11/2/2016	III (1/2b, 3b, 7)	Γύρος κοτόπουλο
FL_426	2/20/2017	II (1/2c, 3c)	Α' ύλη χοιρινό
EL_1	-	I (1/2a, 3a)	Μπιφτέκι βόειο
EL_2	-	III (1/2b, 3b, 7)	Σουβλάκι κοτόπουλο
EL_3	-	I (1/2a, 3a)	Φιλέτο στήθος κοτόπουλο
EL_4	-	I (1/2a, 3a)	Α' ύλη βόειο
EL_6	-	I (1/2a, 3a)	Μπιφτέκι
EL_7	-	IV (4b, 4d, 4e)	Γεμισμένο σαλάμι αέρος
EL_9	-	IV (4b, 4d, 4e)	Επιφάνεια ανοξείδωτου κουτέρ ανάμειξης
EL_10	-	II (1/2c, 3c)	Μπιφτέκι
EL_12	-	IV (4b, 4d, 4e)	Σπάλα χοιρινή
EL_13	-	IV (4b, 4d, 4e)	Επιφάνεια ανοξείδωτης χοάνης από το γεμιστικό
EL_14	-	III (1/2b, 3b, 7)	Γεμισμένο λουκάνικο φρανκφούρτης

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Οι τιμές μ_{\max} όπως υπολογίστηκαν κατά την πρωτογενή μοντελοποίηση για τα 30 εξεταζόμενα στελέχη στις 10 θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν

Strain ID	Θερμοκρασία (°C)																			
	4		7		10		15		20		25		30		37		40		42	
	μ_{\max}	R ²	μ_{\max}	R ²	μ_{\max}	R ²	μ_{\max}	R ²	μ_{\max}	R ²	μ_{\max}	R ²	μ_{\max}	R ²	μ_{\max}	R ²	μ_{\max}	R ²	μ_{\max}	R ²
FL_196	0.0027	0.9848	0.0067	0.9990	0.0178	0.9992	0.0206	0.9984	0.0491	0.9972	-	-	-	-	0.1004	0.9936	0.0885	0.9932	0.0684	0.9914
FL_200	0.0033	0.9850	0.0066	0.9976	0.0180	0.9993	0.0267	0.9991	0.0531	0.9932	0.0908	0.9920	0.1653	0.9849	0.1255	0.9922	0.1063	0.9749	0.1204	0.9940
FL_210	0.0027	0.9939	0.0083	0.9891	0.0187	0.9996	0.0318	0.9972	0.0626	0.9929	0.0999	0.9916	0.1716	0.9793	0.1320	0.9927	0.1199	0.9719	0.1215	0.9904
FL_221	0.0018	0.9962	0.0057	0.9982	0.0134	0.9999	0.0231	0.9984	0.0634	0.9707	0.0831	0.9880	0.1426	0.9753	0.1278	0.9917	0.1147	0.9742	0.1044	0.9886
FL_225	0.0031	0.9966	0.0073	0.9954	0.0197	0.9997	0.0297	0.9969	0.0618	0.9899	0.0904	0.9925	0.1514	0.9776	0.1302	0.9928	0.1255	0.9918	0.1031	0.9837
FL_238	0.0029	0.9954	0.0082	0.9924	0.0143	0.9953	0.0270	0.9990	0.0999	0.9785	0.0931	0.9891	0.1618	0.9853	0.1422	0.9925	0.1195	0.9744	0.1177	0.9891
FL_240	0.0021	0.9906	0.0057	0.9926	0.0176	0.9981	0.0272	0.9977	0.0680	0.9890	0.0880	0.9902	0.1549	0.9800	0.1407	0.9908	0.1306	0.9906	0.1181	0.9964
FL_245	0.0037	0.9835	0.0077	0.9957	0.0154	0.9998	0.0301	0.9992	0.0457	0.9818	0.0825	0.9876	0.1477	0.9883	0.1340	0.9917	0.1478	0.9946	0.1022	0.9867
FL_301	0.0023	0.9979	0.0058	0.9975	0.0170	0.9986	0.0350	0.9981	0.0550	0.9786	0.0827	0.9881	0.1507	0.9877	0.1321	0.9942	0.1295	0.9866	0.0936	0.9795
FL_346	0.0036	0.9923	0.0079	0.9977	0.0196	0.9997	0.0266	0.9981	0.0578	0.9704	0.0845	0.9857	0.1638	0.9718	0.1239	0.9948	0.1468	0.9947	0.1193	0.9940
FL_257	0.0031	0.9494	0.0108	0.9986	0.0195	0.99997	0.0312	0.9971	0.0538	0.9974	0.0839	0.9884	0.1147	0.9888	0.1212	0.9901	0.1453	0.9877	0.1024	0.9724
FL_269	0.0040	0.9935	0.0112	0.9940	0.0114	0.9996	0.0340	0.9980	0.0735	0.9887	0.0809	0.9835	0.1156	0.9923	0.1307	0.9961	0.1054	0.9964	0.1103	0.9950
FL_273	0.0031	0.9685	0.0080	0.9963	0.0120	0.9994	0.0328	0.9994	0.0667	0.9973	0.0857	0.9573	0.1588	0.9821	0.1243	0.9946	0.1137	0.9896	-	-
FL_294	0.0022	0.9836	0.0056	0.9651	0.0124	0.9965	0.0346	0.9973	0.0655	0.9970	0.0978	0.9819	0.1190	0.9909	0.1532	0.9938	0.1503	0.9927	0.1564	0.9833
FL_384	0.0024	0.9656	0.0043	0.9919	0.0140	0.9987	0.0309	0.9990	0.0634	0.9965	0.0892	0.9873	0.1171	0.9914	0.1395	0.9953	0.1364	0.9952	0.1352	0.9953
FL_388	0.0019	0.9566	0.0062	0.9411	0.0126	0.9938	0.0315	0.9994	0.0573	0.9713	0.0889	0.9585	0.1323	0.9908	0.1470	0.9950	0.1371	0.9960	0.1422	0.9884
FL_391	0.0028	0.9938	0.0081	0.9991	0.0148	0.9999	0.0272	0.9964	0.0946	0.9725	0.0833	0.9857	0.1131	0.9915	0.1396	0.9938	0.1127	0.9850	0.1265	0.9913
FL_394	0.0002	0.9867	0.0055	0.9903	0.0116	0.9999	0.0342	0.9975	0.0640	0.9914	0.0873	0.9641	0.1110	0.9902	0.1459	0.9946	0.1583	0.9928	0.1117	0.9708
FL_426	0.0026	0.9507	0.0110	0.9982	0.0131	1.0000	0.0300	0.9988	0.0488	0.9833	0.0818	0.9810	0.1177	0.9893	0.1271	0.9952	0.1137	0.9805	0.0981	0.9825
EL_1	0.0011	0.9651	0.0061	0.9914	0.0142	0.9978	0.0338	0.9964	0.0451	0.9989	0.0733	0.9884	0.1224	0.9892	0.1309	0.9948	0.1115	0.9906	0.1021	0.9950
EL_2	0.0009	0.9976	0.0026	0.9934	0.0112	0.9739	0.0333	0.9971	0.0481	0.9989	0.0814	0.9918	0.1252	0.9930	0.1438	0.9960	0.0581	0.9902	-	-
EL_3	0.0037	0.9770	0.0047	0.9991	0.0175	0.9999	0.0337	0.9948	-	-	0.0888	0.9942	0.1331	0.9909	0.1451	0.9914	0.1358	0.9832	0.1050	0.9938
EL_4	0.0044	0.0044	0.0051	0.9891	0.0154	0.9971	0.0285	0.9992	0.0551	0.9962	0.0884	0.9904	0.1312	0.9922	0.1365	0.9952	0.1402	0.9907	0.1060	0.9880
EL_6	0.0040	0.9737	0.0053	0.9996	0.0165	0.9999	-	-	0.0506	0.9985	0.0860	0.9901	0.1327	0.9922	0.1406	0.9870	0.1220	0.9965	0.0886	0.9830
EL_7	0.0009	0.9743	0.0022	0.9687	0.0144	0.9945	0.0335	0.9988	0.0406	0.9926	0.0826	0.9641	0.1282	0.9880	0.0899	0.9956	0.1153	0.9943	0.0895	0.9882
EL_9	0.0008	0.9706	0.0020	0.9576	0.0109	0.9978	0.0300	0.9978	0.0426	0.9939	0.0786	0.9617	0.1266	0.9900	0.0910	0.9956	0.1193	0.9872	0.1146	0.9911
EL_10	0.0016	0.9577	0.0040	0.9919	0.0180	0.9995	0.0352	0.9958	0.0465	0.9993	0.0805	0.9755	0.1230	0.9869	0.1414	0.9948	0.1393	0.9955	0.0961	0.9803
EL_12	0.0007	0.9924	0.0019	0.9643	0.0109	0.9975	0.0262	0.9995	0.0469	0.9902	0.0787	0.9612	0.1098	0.9853	0.0811	0.9875	0.1047	0.9892	0.0965	0.9941
EL_13	0.0008	0.9926	0.0019	0.9662	0.0109	0.9989	0.0285	0.9984	0.0580	0.9953	0.0688	0.9749	0.1231	0.9900	0.0878	0.9925	0.1108	0.9929	0.1082	0.9952
EL_14	0.0068	0.8914	0.0034	0.9897	0.0127	0.9977	0.0285	0.9972	0.0596	0.9967	0.0727	0.9678	0.1210	0.9928	0.1303	0.9956	0.0643	0.9816	-	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Οι παράμετροι T_{min} , T_{opt} , T_{max} ($^{\circ}C$) και μ_{opt} (h^{-1}) όπως αυτές εκτιμήθηκαν από το μοντέλο των Θεμελιωδών Παραμέτρων (Rosso et al., 1995) καθώς και στοιχεία περιγραφικής στατιστικής αυτών, το τυπικό σφάλμα καταλοίπων (Rsd. st. Error) της προσαρμογής και οι δείκτες αξιολόγησης AIC (Akaike information criterion) και BIC (Bayesian information criterion).

Strain ID	μ_{opt} (\pm St. error)	T_{min} (\pm St. error)	T_{opt} (\pm St. error)	T_{max} (\pm St. error)	Corrected T_{max}	Rsd. st. error	AIC	BIC
FL_196	0.109 (\pm 0.005)	3.50 (\pm 2.71)	34.37 (\pm 0.97)	45.65 (\pm 1.44)	45.65	0.007	-59.29	-58.31
FL_200	0.143 (\pm 0.015)	7.17 (\pm 3.06)	34.50 (\pm 1.37)	48.24 (\pm 4.47)	48.24	0.020	-45.29	-43.78
FL_210	0.151 (\pm 0.013)	6.42 (\pm 3.32)	34.32 (\pm 1.24)	48.19 (\pm 3.89)	48.19	0.017	-47.85	-46.34
FL_221	0.137 (\pm 0.008)	6.20 (\pm 2.64)	34.84 (\pm 0.88)	47.56 (\pm 2.58)	47.56	0.011	-57.71	-56.19
FL_225	0.144 (\pm 0.009)	4.21 (\pm 3.44)	34.98 (\pm 1.03)	46.60 (\pm 2.42)	46.60	0.012	-55.80	-54.29
FL_238	0.151 (\pm 0.013)	5.86 (\pm 3.49)	33.82 (\pm 1.27)	49.00 (\pm 4.24)	49.00	0.017	-48.31	-46.80
FL_240	0.150 (\pm 0.009)	5.06 (\pm 3.38)	35.36 (\pm 0.99)	47.62 (\pm 3.09)	47.62	0.012	-55.36	-53.84
FL_245	0.152 (\pm 0.010)	3.98 (\pm 4.24)	36.43 (\pm 1.18)	44.98 (\pm 2.00)	44.98	0.014	-51.83	-50.31
FL_301	0.146 (\pm 0.009)	3.47 (\pm 3.71)	35.46 (\pm 1.09)	45.13 (\pm 1.74)	45.13	0.013	-54.17	-52.65
FL_346	0.149 (\pm 0.015)	6.02 (\pm 4.89)	35.66 (\pm 1.51)	48.56 (\pm 5.83)	48.56	0.019	-45.87	-44.36
FL_257	0.140 (\pm 0.007)	-3.77 (\pm 3.43)	38.34 (\pm 0.92)	43.55 (\pm 1.05)	43.55	0.009	-60.60	-59.08
FL_269	0.125 (\pm 0.007)	1.46 (\pm 3.23)	35.84 (\pm 0.93)	49.76 (\pm 4.41)	45.56	0.009	-61.83	-60.32
FL_273	0.146 (\pm 0.014)	5.32 (\pm 4.27)	33.95 (\pm 1.32)	44.66 (\pm 3.66)	44.66	0.015	-45.10	-44.11
FL_294	0.155 (\pm 0.002)	3.36 (\pm 1.35)	41.55 (\pm 1.98)	61.81 (\pm 6.87)	51.27	0.003	-81.32	-79.81
FL_384	0.139 (\pm 0.001)	2.88 (\pm 0.86)	38.53 (\pm 0.47)	54.05 (\pm 2.26)	48.25	0.002	-89.59	-88.07
FL_388	0.147 (\pm 0.004)	3.88 (\pm 2.17)	37.83 (\pm 0.78)	51.42 (\pm 4.20)	47.55	0.006	-68.97	-67.46
FL_391	0.127 (\pm 0.008)	5.20 (\pm 3.81)	37.47 (\pm 4.41)	61.46 (\pm 15.64)	47.18	0.015	-50.94	-49.43
FL_394	0.157 (\pm 0.005)	-2.27 (\pm 2.04)	38.78 (\pm 0.56)	43.08 (\pm 0.48)	43.08	0.006	-68.10	-66.59
FL_426	0.129 (\pm 0.004)	1.95 (\pm 1.78)	36.23 (\pm 0.50)	46.01 (\pm 1.18)	46.01	0.005	-72.68	-71.16
EL_1	0.130 (\pm 0.006)	2.63 (\pm 2.95)	36.43 (\pm 0.81)	46.01 (\pm 1.98)	46.01	0.008	-62.65	-61.14
EL_2	0.148 (\pm 0.004)	2.48 (\pm 1.34)	35.70 (\pm 0.39)	40.56 (\pm 0.13)	40.56	0.004	-67.59	-66.60
EL_3	0.149 (\pm 0.003)	1.39 (\pm 1.48)	36.39 (\pm 0.42)	45.07 (\pm 0.73)	45.07	0.005	-65.92	-64.94
EL_4	0.146 (\pm 0.005)	2.54 (\pm 2.13)	36.54 (\pm 0.59)	45.51 (\pm 1.24)	45.51	0.007	-66.80	-65.28
EL_6	0.144 (\pm 0.005)	3.32 (\pm 2.41)	35.88 (\pm 0.59)	44.44 (\pm 0.74)	44.44	0.007	-59.70	-58.71
EL_7	0.115 (\pm 0.012)	4.96 (\pm 5.72)	34.89 (\pm 1.71)	49.11 (\pm 6.56)	44.61	0.016	-49.74	-48.23
EL_9	0.116 (\pm 0.010)	5.81 (\pm 4.81)	37.38 (\pm 3.63)	56.29 (\pm 15.33)	47.10	0.015	-50.12	-48.60
EL_10	0.147 (\pm 0.004)	0.37 (\pm 1.95)	37.48 (\pm 0.53)	43.64 (\pm 0.53)	43.64	0.006	-68.69	-67.18
EL_12	0.102 (\pm 0.008)	5.82 (\pm 3.31)	35.97 (\pm 2.25)	55.38 (\pm 9.60)	45.68	0.012	-55.92	-54.41
EL_13	0.109 (\pm 0.009)	5.55 (\pm 4.39)	36.96 (\pm 3.72)	57.84 (\pm 14.92)	46.68	0.014	-51.60	-50.08
EL_14	0.136 (\pm 0.005)	1.16 (\pm 2.19)	35.39 (\pm 0.64)	40.85 (\pm 0.31)	40.85	0.007	-59.90	-58.91
Mean	0.14	3.53	36.24		45.96			
Coefficient of Variation	10.94%	71.20%	4.63%		5.03%			

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Οι διορθωμένες τιμές των εκτιμήσεων της παραμέτρου μορτ ($\ln CFU/mL/h$) όπως προκύπτουν από την εξίσωση βαθμονόμησης 8 (γρήγορα αναπτυσσόμενα στελέχη) και 9 (αργά αναπτυσσόμενα στελέχη).

Απομόνωση	Διορθωμένες τιμές μορτ (Εξίσωση 8)	Διορθωμένες τιμές μορτ (Εξίσωση 9)	Μέση διορθωμένη τιμή μ_{opt}
FL_196	0.86	0.81	0.83
FL_200	1.12	1.04	1.08
FL_210	1.18	1.10	1.14
FL_221	1.07	1.00	1.04
FL_225	1.13	1.05	1.09
FL_238	1.18	1.10	1.14
FL_240	1.18	1.09	1.13
FL_245	1.19	1.11	1.15
FL_301	1.15	1.07	1.11
FL_346	1.17	1.09	1.13
FL_257	1.09	1.02	1.06
FL_269	0.98	0.91	0.94
FL_273	1.14	1.06	1.10
FL_294	1.21	1.13	1.17
FL_384	1.09	1.02	1.05
FL_388	1.15	1.07	1.11
FL_391	0.99	0.93	0.96
FL_394	1.23	1.14	1.19
FL_426	1.01	0.94	0.97
EL_1	1.02	0.95	0.98
EL_2	1.16	1.08	1.12
EL_3	1.17	1.09	1.13
EL_4	1.14	1.06	1.10
EL_6	1.13	1.05	1.09
EL_7	0.90	0.85	0.87
EL_9	0.91	0.85	0.88
EL_10	1.15	1.07	1.11
EL_12	0.80	0.75	0.78
EL_13	0.85	0.80	0.83
EL_14	1.06	0.99	1.03