



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

In situ μελέτη υποθανάτιου τραυματισμού μεμονωμένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* σε λουκάνικα τ. Φρανκφούρτης ένεκα θερμικής ή όξινης καταπόνησης

Μαρία Π. Κουρτέλη

Επιβλέπων καθηγητής:

Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

In situ μελέτη υποθανάτιου τραυματισμού μεμονωμένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* σε λουκάνικα τ. Φρανκφούρτης ένεκα θερμικής καταπόνησης

In situ study of sublethal injury of *Listeria monocytogenes* single cells on frankfurters after heat or acid treatment

Μαρία Π. Κουρτέλη

Εξεταστική επιτροπή:

Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Γεώργιος – Ιωάννης Ε. Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Ελευθέριος Χ. Δροσινός, Καθηγητής ΓΠΑ

***In situ* μελέτη υποθανάτιου τραυματισμού μεμονωμένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* σε λουκάνικα τ. Φρανκφούρτης ένεκα θερμικής ή όξινης καταπόνησης**

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης αναγνωρίζονται από τον FDA και το USDA ως προϊόν πολύ υψηλού κινδύνου για την πρόκληση λιστερίωσης, όταν καταναλώνονται χωρίς να προηγηθεί αναθέρμανσή τους. Η ικανότητα του παθογόνου *Listeria monocytogenes* να επιβιώνει μετά από θερμική καταπόνηση έχει ήδη διαπιστωθεί σε προηγούμενες μελέτες. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η χωρική κατανομή των κυττάρων του παθογόνου στη μεμβράνη του τροφίμου μετά από θέρμανση στους 64°C με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού και βρέθηκε υψηλότερη συγκέντρωση ζωντανών κυττάρων σε βαθύτερα στρώματα της μεμβράνης, υποδεικνύοντας ότι η μικροδομή του τροφίμου επιτρέπει στο παθογόνο να προστατεύεται κατά τη θερμική επεξεργασία. Επιπλέον, μελετήθηκε η απόκριση του παθογόνου σε συνθήκες προσομοίωσης πέψης. Αρχικά, έγινε συγκριτική μελέτη της όξινης καταπόνησης *in situ* σε δύο επίπεδα pH (1,5 και 2,5), για τρία διαφορετικά διαλύματα καταπόνησης (Simulated Gastric Fluid, SGF 1/3 strength και Ringer/HCl) σε δυναμικές (μεταβολή του pH) και σε στατικές (επαναφορά του pH στην αρχική τιμή) συνθήκες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μεταβολή του pH λόγω της προσθήκης του τροφίμου και η παρουσία αδιάλυτων στερεών συστατικών στο διάλυμα καταπόνησης καθορίζουν το ρυθμό θανάτωσης του παθογόνου. Σε pH 1,5 παρατηρήθηκε δραματική μείωση του βακτηριακού πληθυσμού, ενώ το χειρότερο σενάριο, που προσομοιάζει τις συνθήκες του στομάχου μετά από κατανάλωση γεύματος, αφορούσε στην έκθεση σε διάλυμα SGF με αρχικό pH 2,5 που έφτασε την τιμή 3,5 μετά από 60 λεπτά. Στην περίπτωση αυτή δεν καταγράφηκε στατιστικά σημαντική μείωση του πληθυσμού. Ο υποθανάτιος τραυματισμός μελετήθηκε *in situ* σε διάλυμα HCl σε Ringer με pH 2,5 σε στατικές συνθήκες, με μικροβιολογικές μεθόδους επίστρωσης σε γενικά και ειδικά υποστρώματα και με διαφορική χρώση των κυττάρων και μικροσκοπία φθορισμού. Και με τις δύο μεθόδους δεν παρατηρήθηκε υποθανάτιος τραυματισμός των κυττάρων. Εντούτοις, από την ανάλυση των εικόνων μικροσκοπίας φθορισμού υπολογίστηκε υψηλότερο επίπεδο ζωντανών κυττάρων από αυτό που καταγράφηκε μέσω της επίστρωσης σε γενικό θρεπτικό υπόστρωμα. Τέλος, εύρημα της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η συσσωμάτωση των κυττάρων της *L.monocytogenes* σε χαμηλό pH, πιθανώς λόγω ελάττωσης του επιφανειακού τους φορτίου, και η αποσυσσωμάτωσή τους σε υψηλότερο pH (π.χ. pH 6,5).

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία τροφίμων

Λέξεις – κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, λουκάνικα Φρανκφούρτης, θερμική καταπόνηση, δοκιμασία προσομοίωσης πέψης, μικροσκοπία φθορισμού

***In situ* study of sublethal injury of *Listeria monocytogenes* single cells on frankfurters after heat or acid treatment**

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

ABSTRACT

Non reheated frankfurters are ranked as a product of very high relative risk for foodborne listeriosis by the FDA and USDA. Previous research has shown that the pathogen *Listeria monocytogenes* can survive thermal treatment. The present study focused on the spatial distribution of the cells on frankfurters' casings after heat treatment at 64°C using confocal fluorescence microscopy. Higher concentration of live cells was observed in deeper layers of the casings, showing that the food microstructure plays a significant role in heat protection of the cells. Moreover, the survival of the pathogen during simulation of digestion was assessed. First, a comparative study of *in situ* acid stress tests was conducted, including microbial response in two pH levels (1.5 and 2.5), using three different simulated gastric solutions (Simulated Gastric Fluid, SGF 1/3 strength and Ringer/HCl) under dynamic (increase in pH) or static (re-acidification of the solution to reach the initial pH value) conditions. The data obtained reveals that the increase in pH due to the addition of the frankfurters in the acid solution and undissolved solid particles of the solution determine the microbial rate of death. After exposure of the cells in solution adjusted to pH 1.5, the population drastically diminished, while the worst-case scenario, simulating stomach conditions after meal intake, referred to exposure to SGF solution with initial pH 2.5, reaching the pH value 3.5 after 1 hour. In this case, there was no statistically significant decrease in population levels reported. Sublethal injury was studied *in situ* in Ringer/HCl solution adjusted to pH 2.5 under static conditions using standard plate counting methods on general-purpose and selective media or staining of the cells and fluorescence microscopy. Both methods showed no cell injury. However, higher levels of live cells were reported by fluorescence microscopy image analysis compared to colonies counted on agar media. Lastly, another find of the present study was the aggregation of *L. monocytogenes* cells when exposed to highly acidic environment, probably due to a decrease in net surface potential, which was reversed in higher pH conditions (e.g., pH 6.5).

Scientific area: Food microbiology

Keywords: *Listeria monocytogenes*, frankfurters, thermal stress, simulation of digestion, fluorescence microscopy

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Παναγιώτη Ν. Σκανδάμη.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Παναγιώτη Ν. Σκανδάμη για την καθοδήγησή του και το χρόνο που αφιέρωσε για την επίβλεψη της πορείας της παρούσας μελέτης. Εξίσου σημαντική ήταν η συμβολή της Μεταδιδάκτορος Ερευνήτριας Αναστασίας Καπετανάκου και της υποψηφίου Διδάκτορος Μαριάννας Αρβανίτη, τις οποίες θα ήθελα να ευχαριστήσω για τις καθοριστικής σημασίας συμβουλές τους και για το χρόνο που αφιέρωσαν για την εργαστηριακή μου εκπαίδευση και την επίβλεψη των πειραμάτων της μεταπτυχιακής μελέτης.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ελένη Βλάχου για την άψογη συνεργασία και την παροχή των επιστημονικών αποτελεσμάτων της μελέτης της, στα οποία βασίστηκε η παρούσα εργασία. Ιδιαίτερη μνεία οφείλω στην προπτυχιακή φοιτήτρια Όλγα Απολλωνίου για την ευχάριστη συνεργασία, την καθοριστική συμβολή της στην οργάνωση και διεξαγωγή των πειραμάτων και την υποστήριξη της. Επιπρόσθετα, ευχαριστώ θερμά τη Διδάκτορα Δέσποινα Σαμακοβλή και το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συνεργασία και την ανάλυση μικροσκοπικών δειγμάτων μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόκληρη την επιστημονική ομάδα του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών για τη συνεργασία, το ευχάριστο κλίμα και την ουσιαστική βοήθειά 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

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	8
1.1	Ο ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ <i>Listeria monocytogenes</i>	8
1.1.1	ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	8
1.1.2	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ	9
1.1.3	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	10
1.1.4	ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	10
1.1.5	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	12
1.1.6	ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ	13
1.1.7	ΥΠΟΘΑΝΑΤΙΟΣ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ	18
1.2	ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ	20
1.2.1	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	20
1.2.2	ΕΙΣΟΔΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ	21
1.2.3	ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ	23
1.3	ΕΤΟΙΜΑ ΠΡΟΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΡΟΦΙΜΑ	24
1.3.1	ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΣΕ ΕΤΟΙΜΑ ΠΡΟΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΡΟΦΙΜΑ	24
1.3.2	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΛΟΥΚΑΝΙΚΩΝ ΤΥΠΟΥ ΦΡΑΝΚΦΟΥΡΤΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ	25
1.4	ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ	26
	ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	28
2.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	29
2.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	29
2.2	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΟΛΙΟΥ	30
2.3	ΤΡΟΦΙΜΟ	31
2.4	ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ	31
2.5	ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΕ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΙΣ	32
2.5.1	ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ	32
2.5.1.1	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΗΠΙΑΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ	32
2.5.1.2	ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	34
2.5.2	ΟΞΙΝΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ	35
2.5.2.1	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΠΕΨΗΣ (ΟΞΙΝΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ)	35
2.5.2.2	ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ pH	38
2.5.2.3	ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	39
2.5.2.4	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΟΣΟΣΤΟΥ (%) ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ	40

2.5.2.5 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	40
2.5.2.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	42
2.5.2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	42
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
3.1 ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ	43
3.2 ΟΞΙΝΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ	45
3.2.1 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ pH	45
3.2.2 ΣΤΑΤΙΚΕΣ VS ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ pH	46
3.2.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΠΕΨΗΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ.....	51
3.2.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΠΕΨΗΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	54
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	71

1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1.1 Ο ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ *Listeria monocytogenes*

1.1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* αποτελεί αντικείμενο έντονης μελέτης από τους ερευνητές παγκοσμίως τις τελευταίες δεκαετίες. Αν και είναι ευρέως διαδεδομένο στο φυσικό περιβάλλον, η τροφιμογενής διάδοσή του και η ικανότητα πρόκλησης σοβαρής νόσου στον άνθρωπο με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας καθιστούν την εντατική του μελέτη κρίσιμη για τη διασφάλιση της υγείας των καταναλωτών. Ανακαλύφθηκε το 1924 και περιγράφηκε το 1926 από τους Murray, Webb και Swann μετά από τον ξαφνικό θάνατο κουνελιών και ινδικών χοιριδίων στο εργαστήριο τους στο Cambridge της Αγγλίας. Αρχικά, ονομάστηκε *Bacterium monocytogenes* λόγω της μόλυνσης μονοπύρηνων λευκοκυττάρων (mononuclear leukocytosis) στα μολυσμένα ζώα, που θεωρήθηκε από τους ερευνητές ως το χαρακτηριστικότερο σύμπτωμα της λοίμωξης από το παθογόνο (Murray et al., 1926). Αργότερα, ο Pirie απομόνωσε το βακτήριο από το ήπαρ τρωκτικών χάμστερ και ονόμασε το νέο είδος *Listerella hepatolytica*, προς τιμήν του διαπρεπούς επιστήμονα Joseph Lister, γνωστού για τις καινοτόμες για την εποχή μελέτες του στην αντισηψία (Magalhães et al., 2014). Καθώς το όνομα *Listerella* χρησιμοποιούνταν ήδη για ένα γένος αμοιβαδόζων και ο μικροοργανισμός δεν παρουσίαζε τα χαρακτηριστικά των ειδών του γένους *Bacterium*, ο Pirie το 1940 πρότεινε το όνομα *Listeria monocytogenes* ως το οριστικό όνομα του είδους (Pirie, 1940).

Υπάρχουν αξιόπιστα δεδομένα ότι το είδος είχε απομονωθεί νωρίτερα, πριν από τον Α΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, από άλλους ερευνητές. Μάλιστα, το παλαιότερο διαθέσιμο στέλεχος *L. monocytogenes* απομονώθηκε το 1921, πριν από την περιγραφή του είδους, από τους Dumont και Cotonι από ασθενή που έπασχε από μηνιγγίτιδα (Seeliger, 1988). Το 1929 καταγράφηκαν τα πρώτα περιστατικά λιστερίωσης, αλλά για πολλά χρόνια δεν υπήρχαν συχνές καταγραφές της νόσου. Στα τέλη της δεκαετίας του 1970, παρατηρείται αύξηση των περιστατικών λιστερίωσης και το 1983 αναφέρεται η πρώτη έξαρση λιστερίωσης από κατανάλωση επιμολυσμένου λάχανου (Schlech et al., 1983). Από τότε, οι έρευνες για το συγκεκριμένο παθογόνο είναι εντατικές. Μόνο την δεκαετία 2010-2020, το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) των ΗΠΑ κατέγραψε 78 μαζικές εξάρσεις τροφιμογενούς λιστερίωσης στις ΗΠΑ.

1.1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ

Το γένος *Listeria* ανήκει στην οικογένεια Listeriaceae της ομοταξίας Bacilli και σχετίζεται φυλογενετικά με τα γένη *Brochothrix*, *Bacillus*, *Lactobacillus* και *Streptococcus* (Jay, 2000). Σύμφωνα με πρόσφατη ταξινομική μελέτη, περιλαμβάνει 20 είδη, τα οποία διακρίνονται σε δύο ομάδες, τα είδη *Listeria sensu stricto* και τα είδη *Listeria sensu lato* (Leclercq et al., 2019). Ο διαχωρισμός όπως βασίζεται στη συγγένεια των ειδών, που εξάγεται από την ομοιότητα γονιδιωματικών ή αμινοξικών αλληλουχιών και περιγράφεται στα αντίστοιχα φυλογενετικά δένδρα. Συγκεκριμένα, τα είδη της ομάδας *Listeria sensu stricto* σχηματίζουν έναν καλά υποστηριζόμενο φυλογενετικό κλάδο και μοιράζονται κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως η κινητικότητα του μαστιγίου και η ικανότητα αύξησης σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στον κλάδο περιλαμβάνεται το είδος *Listeria monocytogenes*, το πρώτο είδος του γένους *Listeria* που περιγράφηκε, και 5 στενά συγγενικά είδη (*L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* και *L. marthii*). Τα υπόλοιπα 14 είδη ανήκουν στην ομάδα *Listeria sensu lato* και ομαδοποιούνται σε 3 ξεχωριστούς μονοφυλετικούς κλάδους, που πιθανώς απεικονίζουν 3 διαφορετικά γένη (Orsi and Wiedmann, 2016).

Πίνακας 1. Ταξινόμηση του είδους *Listeria monocytogenes*.

Βασίλειο	Bacteria
Φύλο	Firmicutes
Ομοταξία	Bacilli
Τάξη	Bacillales
Οικογένεια	Listeriaceae
Γένος	<i>Listeria</i>
Είδος	<i>Listeria monocytogenes</i>

Στα είδη του γένους *Listeria* έχουν αναφερθεί 15 τύποι σωματικών αντιγόνων (O-) και 4 τύποι αντιγόνων του μαστιγίου (H-), ο συνδυασμός των οποίων οδηγεί στην περαιτέρω κατηγοριοποίηση των διαφορετικών στελεχών σε ορότυπους. Για τη *L. monocytogenes* έχουν αναγνωρισθεί 15 ορότυποι (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 6a, 6b, 7), εκ των οποίων οι 1/2a, 1/2b και 4b ευθύνονται για περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων λοίμωξης από το παθογόνο στον άνθρωπο. Οι ορότυποι 1/2a και 1/2b απομονώνονται συνήθως από τρόφιμα και σχετίζονται με σποραδικά περιστατικά λοίμωξης, ενώ τα στελέχη του ορότυπου 4b είναι συχνά υπεύθυνα για τις μαζικές επιδημίες λιστερίωσης (Chen et al., 2017; Holley and Cordeiro, 2014). Αξίζει να αναφερθεί ότι το στέλεχος *L. monocytogenes* EGD-e που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ανήκει στον ορότυπο 1/2a.

1.1.3 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει θετικά κατά Gram, μη σπορογόνα βακτήρια με ραβδόμορφο σχήμα κυττάρων, μήκους 0.5 – 2μm και διαμέτρου 0.5 μm (Holley and Cordeiro, 2014). Είναι ψυχρότροφα και ανήκουν στους προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα να μπορούν να αναπτυχθούν σε αερόβιες, μικροαερόφιλες ή ανοξικές συνθήκες συσκευασίας και σε χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης, καθιστώντας τα σημαντικό βιολογικό κίνδυνο για τα τρόφιμα (Gill et al., 2014). Στους 20-25°C, σχηματίζουν μαστίγια που τους επιτρέπουν να κινούνται περιστροφικά, ενώ στους 37°C έχουν περιορισμένη ή καθόλου κινητικότητα. Εκτός από την ικανότητα κίνησης, η θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται μπορεί να μεταβάλλει και το σχήμα τους, το οποίο από ραβδόμορφο γίνεται κοκκοειδές (Batt, 2014; Holley and Cordeiro, 2014). Τέλος, οι αποικίες των ειδών *Listeria spp* σε γενικά θρεπτικά μέσα είναι διαφανείς, γκρι-μπλε χρώματος, συνήθως λείες και μπορούν να διακριθούν από τις αποικίες άλλων μικροοργανισμών από το έντονο μπλε-πράσινο χρώμα που έχουν όταν φωτίζονται πλευρικά (Holley and Cordeiro, 2014).

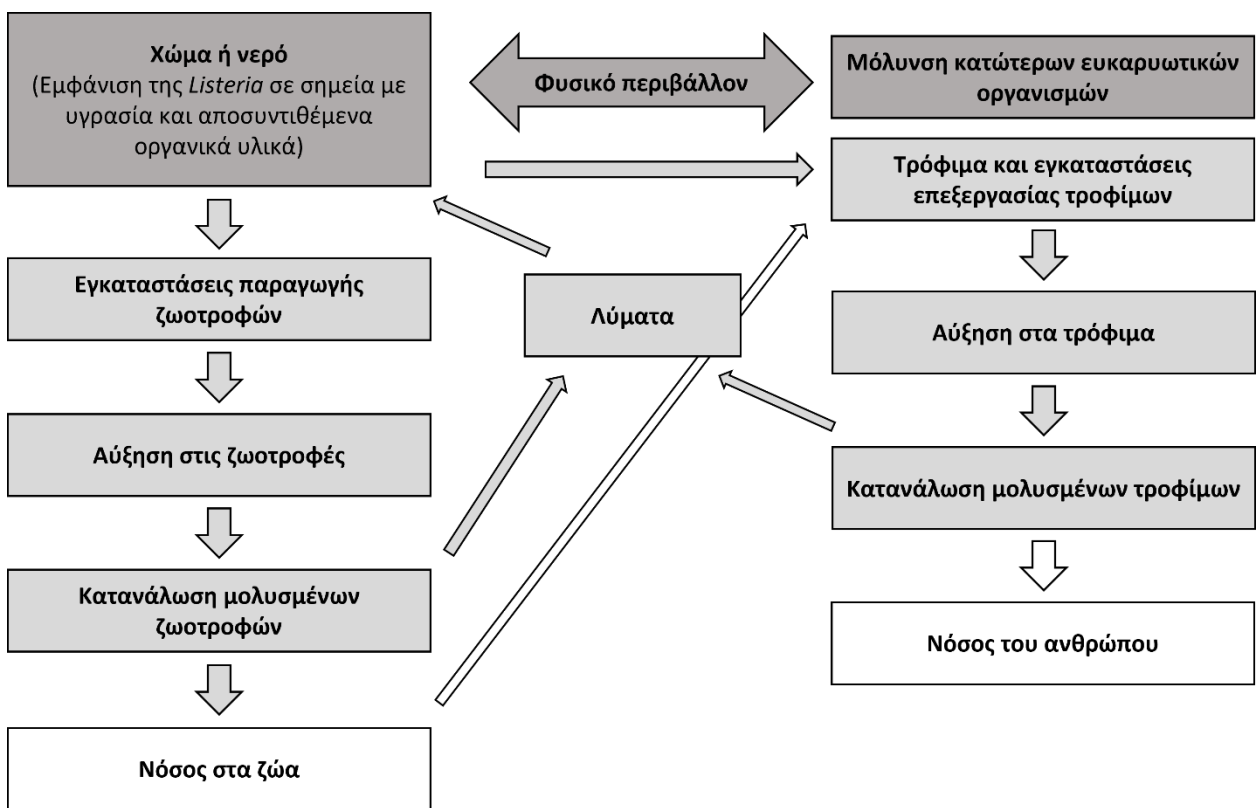
Ως προς τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, το γένος *Listeria* χαρακτηρίζεται από θετική αντίδραση καταλάσης (διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου), παραγωγή οξέων από γλυκόζη, έλλειψη του ενζύμου της ουρεάσης (καταβολισμός ουρίας) και αδυναμία παραγωγής υδρόθειου (Batt, 2014). Υπό αερόβιες συνθήκες, η γλυκόζη αξιοποιείται για την παραγωγή γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος και ακετοΐνης, η οποία όμως δεν παράγεται σε αναερόβιες συνθήκες (Holley and Cordeiro, 2014). Επιπλέον, ο διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών ειδών του γένους μπορεί να γίνει μέσω βιοχημικών δοκιμασιών. Συγκεκριμένα, η *L. monocytogenes* διακρίνεται από την β-αιμολυτική της δράση, η οποία ενισχύεται σε συγκαλλιέργειά της με το είδος *Staphylococcus aureus* κατά την αντίδραση CAMP και από την ικανότητα παραγωγής οξέος από L-ραμνόζη, αλλά όχι από D-ξυλόζη και D-μανιτόλη (McLauchlin, 2006).

1.1.4 ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Το γένος *Listeria* είναι ευρέως διαδεδομένο στο φυσικό περιβάλλον και η παρουσία του έχει αναφερθεί σε ένα εύρος υποστρωμάτων, όπως χώμα, νερό, ζωικές εκκρίσεις και κόπρανα, λύματα, ποικιλία τροφίμων και σε αγροτικές ή βιομηχανικές εγκαταστάσεις (Ryser and Marth, 2007). Έχει απομονωθεί από θηλαστικά, πτηνά, ψάρια και ασπόνδυλα, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται πάντα νόσος (McLauchlin, 2006). Το παθογόνο *L. monocytogenes* απαντάται με υψηλότερη συχνότητα σε αστικά και όχι σε φυσικά περιβάλλοντα και παρά την παρουσία του στο φυσικό περιβάλλον, συνήθως μεταδίδεται στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων. Κρούσματα λιστερίωσης έχουν συσχετιστεί με κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων, λαχανικών, θαλασσινών και προϊόντων κρέατος (Magalhães et al., 2014). Η ανθεκτικότητα και η

προσαρμοστικότητα του παθογόνου σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, σε όξινες συνθήκες και σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου διευκολύνουν την επιβίωση και την αύξησή του στα τρόφιμα κατά τη συντήρησή τους (Lopes-Luz et al., 2021).

Η επιμόλυνση των τροφίμων μπορεί να γίνει μέσω διαφόρων οδών στο φυσικό περιβάλλον κατά την καλλιέργεια φυτικών προϊόντων ή την εκτροφή ζώων, αλλά εξίσου συχνή είναι η διασταυρούμενη επιμόλυνση κατά την επεξεργασία των τροφίμων στις βιομηχανικές εγκαταστάσεις (Εικόνα 1). Μάλιστα, οι Carpentier και Cerf (2011) σε μελέτη τους αποδίδουν την επανεμφάνιση της *L. monocytogenes* σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις κυρίως στη συσσώρευση οργανικού υλικού σε δυσπρόσιτα σημεία των δαπέδων, των επιφανειών και των μηχανημάτων, καθώς το παθογόνο δεν φαίνεται να έχει ιδιαίτερη ανθεκτικότητα σε απολυμαντικούς παράγοντες ή αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης σε επιφάνειες σε σύγκριση με άλλα βακτηριακά είδη. Ως αποτέλεσμα, είναι εφικτή η επιμόλυνση των τροφίμων στα μεταγενέστερα στάδια της κοπής ή της συσκευασίας τους.



Εικόνα 1. Οικολογία και διασπορά του γένους *Listeria*. Με σκούρο χρώμα πλαισίου παρουσιάζονται τα ενδεχόμενα με υψηλή συχνότητα εμφάνισης, ενώ με ανοιχτότερο χρώμα τα σπανιότερα ενδεχόμενα. (Προσαρμογή από McLauchlin, 2006)

1.1.5 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Θερμοκρασία

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η *L. monocytogenes* χαρακτηρίζεται ως ψυχρότροφο βακτήριο, καθώς μπορεί να αυξάνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί αύξηση του παθογόνου σε εύρος θερμοκρασιών από -1,5 έως 45 °C, ενώ οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας για την αύξηση είναι μεταξύ 30 – 37 °C. Η ικανότητα επιβίωσης και αύξησης σε χαμηλές θερμοκρασίες οφείλεται στην παρουσία λιπαρών οξέων με διακλαδισμένη ανθρακική αλυσίδα στην κυτταρική μεμβράνη του παθογόνου. Οι διακλαδώσεις αποτρέπουν το σφιχτό πακετάρισμα των φωσφολιπιδίων, με αποτέλεσμα να διατηρείται η ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης και η λειτουργικότητά της (Lado and Yousef, 2007). Σε θερμοκρασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη συντήρηση των τροφίμων, ο ρυθμός αύξησης είναι σχετικά χαμηλός. Στους 4°C, ο μέγιστος χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι 1-2 ημέρες (McLaughlin, 2006). Επιπλέον, ο μικροοργανισμός μπορεί να επιβιώνει σε θερμοκρασία χαμηλότερη από τους -1,5 °C, αν και δεν παρατηρείται αύξηση. Τέλος, θερμοκρασίες μεγαλύτερες από τους 50 °C θεωρούνται θανατηφόρες, λόγω της αδρανοποίησης των κυτταρικών ενζύμων και της πρόκλησης πολλαπλών βλαβών στα ριβοσώματα (Lado and Yousef, 2007).

pH

Πληθώρα μελετών έχει καταγράψει την αύξηση του παθογόνου σε εύρος pH 4 – 9,6 με τη μέγιστη μικροβιακή συγκέντρωση να παρατηρείται κατά την αύξηση σε μέσο με pH 6 – 8. Σε τιμές pH < 4, παρατηρείται επιβίωση αλλά όχι αύξηση του μικροοργανισμού. Σε όξινες συνθήκες, τα κύτταρα αποβάλλουν την περίσσεια πρωτονίων προκειμένου να διατηρήσουν το ενδοκυτταρικό pH σε ουδέτερες τιμές. Όταν το pH του μέσου μειωθεί κάτω από κάποια τιμή, τα κύτταρα δεν μπορούν να αποβάλλουν αρκετά γρήγορα την περίσσεια H⁺, με αποτέλεσμα να οξινίζεται το κυτταρόπλασμα, προκαλώντας βλάβες στις λειτουργικές πρωτεΐνες και τα ένζυμα του κυττάρου και παρεμποδίζοντας την παραγωγή ενέργειας, λόγω μεταβολής του ηλεκτροχημικού δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης. Εντούτοις, η επίδραση του pH στην επιβίωση και την αύξηση εξαρτάται από τη θερμοκρασία επώασης, την ενεργότητα νερού, την επάρκεια θρεπτικών συστατικών, την παρουσία αλάτων στο μέσο αύξησης και τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων (Jay, 2000; Lado and Yousef, 2007). Έτσι, είναι πιθανό να μην υπάρχει αύξηση της *L. monocytogenes* ή να παρατηρείται μειωμένη επιβίωση σε τιμές pH που θεωρητικά επιτρέπουν την αύξηση της (Lado and Yousef, 2007).

Ενεργότητα νερού

Η ενεργότητα νερού (a_w) εκφράζει την ποσότητα νερού που είναι διαθέσιμη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το κύτταρο για να επιτελέσει τις διάφορες λειτουργίες του. Σε συνθήκες μειωμένης a_w , το κύτταρο αποβάλλει

νερό προκειμένου να διατηρηθεί η ωσμωτική ισορροπία μεταξύ εξωτερικού περιβάλλοντος και κυτταροπλάσματος. Ως αποτέλεσμα, μειώνεται η σπαργή του κυττάρου και αναστέλλεται η ανάπτυξη και ο διπλασιασμός του (Lado and Yousef, 2007). Η *L. monocytogenes* ευδοκίμει σε περιβάλλοντα με $a_w > 0,97$, αλλά ορισμένα στελέχη μπορούν να αυξάνονται σε συνθήκες χαμηλής ενεργότητας νερού (έως και 0,90) (Ryser and Buchanan, 2012). Για τιμές $a_w < 0,90$ η αύξηση του παθογόνου αναστέλλεται, αλλά μπορεί να συνεχιστεί με αύξηση της a_w , όταν οι συνθήκες είναι πάλι ευνοϊκές. Τέλος, η επιβίωση της *L. monocytogenes* σε συνθήκες μειωμένης ενεργότητας νερού εξαρτάται από τη διαλυμένη ουσία στο μέσο ανάπτυξης. Η επιβίωση είναι αυξημένη σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκερόλη σε σχέση με θρεπτικά μέσα ίδιας a_w που περιέχουν σουκρόζη ή χλωριούχο νάτριο (Miller, 1992).

Συγκέντρωση οξυγόνου

Η *L. monocytogenes* κατατάσσεται στους δυνητικά αναερόβιους μικροοργανισμούς και συχνά αναφέρεται ως μικροαερόφιλο βακτήριο, δηλαδή ευδοκίμει σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Έτσι, συχνά παρατηρείται καλύτερη ανάπτυξη του παθογόνου σε αναερόβιες από ότι σε αερόβιες συνθήκες. Μπορεί να αυξάνεται σε συσκευασίες κενού ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας και σε αυξημένες συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα, αν και συγκέντρωση CO₂ μεγαλύτερη από 50% αναστέλλει την αύξηση (Hudson et al., 1994; Magalhães et al., 2014). Μάλιστα, σε πολλές περιπτώσεις καταγράφεται αυξημένη αντοχή σε παράγοντες καταπόνησης όπως η θερμοκρασία ή το pH, όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες (Roberts et al., 2020). Για παράδειγμα, κύτταρα του παθογόνου που αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (GAD), η οποία εμπλέκεται στο μηχανισμό απόκρισης σε όξινη καταπόνηση, με αποτέλεσμα η απουσία οξυγόνου να οδηγεί σε αυξημένη ανθεκτικότητα σε χαμηλό pH (Sewell et al., 2015).

1.1.6 ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ

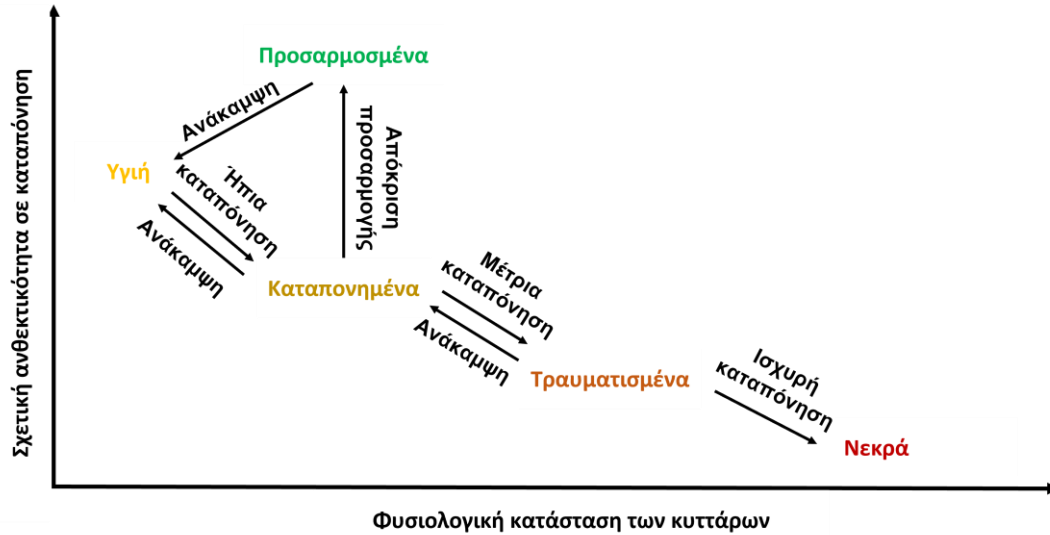
Με τον όρο καταπόνηση (stress) περιγράφεται κάθε παράγοντας ή συνθήκη που δρα ανασταλτικά στη μικροβιακή αύξηση ή επιβίωση (Yousef and Courtney, 2002). Οι παράγοντες καταπόνησης επιδρούν σε διάφορες δομές και λειτουργίες του κυττάρου και διακρίνονται σε 3 αδρές κατηγορίες: τους φυσικούς, τους χημικούς και τους παράγοντες που σχετίζονται με τη θρέψη των μικροβιακών κυττάρων (Wesche et al., 2009). Η καταπόνηση των τροφιμογενών μικροοργανισμών μπορεί να λάβει χώρα από το φυσικό περιβάλλον (π.χ. συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας που επικρατούν) μέχρι και την τελική κατανάλωσή τους (π.χ. επίδραση πεπτικού υγρού) και σε οποιοδήποτε ενδιάμεσο στάδιο επεξεργασίας ή συντήρησης. Σύμφωνα με τους Yousef and Courtney (2002), υπάρχουν 5 τρόποι απόκρισης των μικροβιακών κυττάρων σε συνθήκες καταπόνησης:

- α. Σύνθεση πρωτεϊνών για επιδιόρθωση κυτταρικών βλαβών ή απομάκρυνση του παράγοντα καταπόνησης
- β. Προσωρινή ενίσχυση της ανθεκτικότητας των κυττάρων σε συνθήκες καταπόνησης
- γ. Κυτταρική αδρανοποίηση μέσω σχηματισμού ενδοσπορίων ή μετάβασης στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» (Viable But Non Culturable – VBNC)
- δ. Διαφυγή από τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή
- ε. Προσαρμοστικές μεταλλάξεις

Η έκταση και η σοβαρότητα του τραυματισμού των μικροβιακών κυττάρων καθορίζεται από τον παράγοντα καταπόνησης, την ένταση και τη διάρκεια της καταπόνησης και δεν είναι η ίδια για όλα τα κύτταρα ενός μικροβιακού πληθυσμού. Η γονιδιακή ή φαινοτυπική ετερογένεια εντός του μικροβιακού πληθυσμού έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία υποπληθυσμών κυττάρων με αυξημένη ανθεκτικότητα ή προσαρμοστικότητα σε μεταβολές του περιβάλλοντος συγκριτικά με το συνολικό πληθυσμό και μπορεί να οδηγήσει στην επιβίωση μεμονωμένων κυττάρων ένεκα ισχυρής καταπόνησης (Arvaniti and Skandamis, 2022). Η ικανότητα επιβίωσης ορισμένων κυττάρων του πληθυσμού λόγω προσαρμοστικών μεταλλαγών και της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων ως απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης, εξασφαλίζει τελικά την επιβίωση του συνολικού πληθυσμού (Wesche et al., 2009). Σε συνθήκες ήπιας καταπόνησης, το μεγαλύτερο κλάσμα του πληθυσμού επιβιώνει εκδηλώνοντας μειωμένο ρυθμό αύξησης ή αυξημένη ευαισθησία σε χημικούς παράγοντες, ενώ σε ακραίες συνθήκες έντονου stress προκαλείται θανάτωση του συνόλου ή της πλειοψηφίας του πληθυσμού (Yousef and Courtney, 2002). Επομένως, ο κυτταρικός θάνατος είναι μια σταδιακή διαδικασία και υπάρχουν πολλά ενδιάμεσα επίπεδα τραυματισμού μεταξύ υγιών και νεκρών κυττάρων (Εικόνα 2). Ανάλογα με την ένταση της καταπόνησης και την έκταση της κυτταρικής βλάβης, ο τραυματισμός μπορεί να αναστραφεί ή να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (Ray, 1979).

Η μελέτη της απόκρισης των κυττάρων των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών είναι κρίσιμη, καθώς κατά την παραγωγή και συντήρηση των τροφίμων επιδρούν πολλοί και διαφορετικοί παράγοντες καταπόνησης. Η ενεργότητα νερού και το pH του τροφίμου, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, η παρουσία μικροβιακών καλλιεργειών, η θέρμανση ή η ψύξη του και η συγκέντρωση βιοενεργών αντιμικροβιακών μορίων μπορούν να δράσουν ως παράγοντες καταπόνησης στην αλυσίδα παραγωγής του (Wesche et al., 2009). Συχνά, οι διαδικασίες που ακολουθούνται για την εξάλειψη των αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών κατά την παραγωγή και συντήρηση των τροφίμων δεν είναι απόλυτα αποτελεσματικές, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας ετερογενής μικροβιακός πληθυσμός, που αποτελείται από ζώντα, τραυματισμένα και νεκρά κύτταρα (Ray, 1979; Wu, 2008). Η απώλεια καλλιεργησιμότητας των κυττάρων λόγω υποθανάτιου τραυματισμού και η πιθανή ανάκαμψή τους υπό ευνοϊκές συνθήκες, όπως περιγράφεται στην παράγραφο §1.1.7, μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της επικινδυνότητας και σε διακύβευση της ασφάλειας των τροφίμων και της υγείας

των καταναλωτών. Για το λόγο αυτό, η παρούσα εργασία εστιάζει στον εντοπισμό υποθανάτια τραυματισμένων κυττάρων της *L. monocytogenes* μετά από ήπια θερμική ή όξινη καταπόνηση.

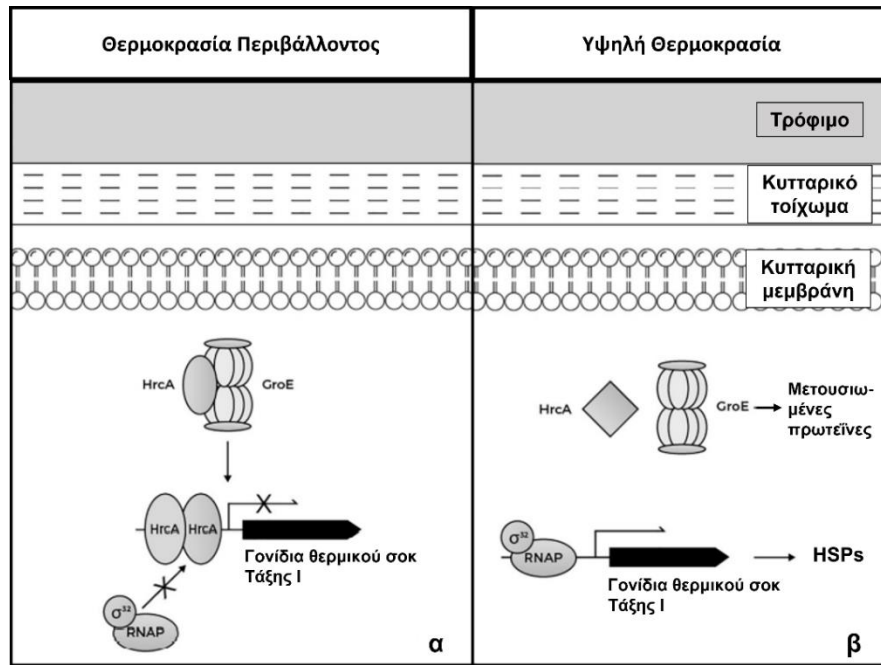


Εικόνα 2. Συσχέτιση φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων με την επίδραση καταπόνησης διαφορετικής έντασης. Τα καταπονημένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από μειωμένο ρυθμό αύξησης ή αναστολή της αύξησης, χωρίς μεταβολή της βιωσιμότητας, σε αντίθεση με τα τραυματισμένα, όπου παρατηρείται μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων. Ισχυρή καταπόνηση οδηγεί σε θανάτωση της πλειοψηφίας των κυττάρων ενός μικροβιακού πληθυσμού. Τέλος, η απόκριση προσρμογής στο stress οδηγεί σε αύξηση της ανθεκτικότητας των κυττάρων σε καταπόνηση από τον ίδιο ή διαφορετικό παράγοντα. (Προσαρμογή από Yousef and Courtney, 2002)

Απόκριση στη θερμική καταπόνηση

Η ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης εξαρτάται από το βακτηριακό στέλεχος και τον ορότυπο, την ηλικία των κυττάρων, τις συνθήκες αύξησης, την επίδραση προηγούμενων καταπονήσεων και τη σύσταση των τροφίμων. Σε υψηλές θερμοκρασίες, ενεργοποιείται η απόκριση θερμικού στρες (heat-shock response) των κυττάρων του παθογόνου, η οποία περιλαμβάνει την αυξημένη έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες και πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat-shock proteins – HSPs). Κατά τη μεταγραφή, μια πρωτεϊνική υπομονάδα του ολοενζύμου της RNA πολυμεράσης, ο μεταγραφικός παράγοντας σίγμα (σ), προσδένεται στον πυρήνα του ενζύμου και μπορεί να αναγνωρίζει εξειδικευμένες αλληλουχίες υποκινητών, επιτρέποντας την εξειδικευμένη και ισχυρή πρόσδεση της πολυμεράσης στο μόριο DNA και την έναρξη της μεταγραφής. Ο μεταγραφικός παράγοντας σ^{32} αναγνωρίζει αλληλουχίες υποκινητών γονιδίων που επάγονται κατά την απόκριση θερμικού στρες. Τέτοια γονίδια είναι τα γονίδια θερμικού σοκ της Τάξης I (*grpE*, *dnaK*, *dnaJ*, *groEL* και *groES*), τα οποία κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες

HSPs, που έχουν ρόλο μοριακών συνοδών. Οι πρωτεΐνες «μοριακοί συνοδοί» ή αλλιώς σαπερόνες (chaperones) είναι υπεύθυνες για τη σταθεροποίηση και το δίπλωμα μερικών αποδιαταγμένων πρωτεϊνών που συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα σε συνθήκες καταπόνησης. Η έκφραση των γονιδίων της Τάξης I ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη καταστολέα HrcA.



Εικόνα 3. Ρύθμιση των γονιδίων θερμικού σοκ Τάξης I: **(α)** Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η σαπερόνη GroE αναδιπλώνει τον καταστολέα HrcA, ο οποίος προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων, παρεμποδίζοντας τη μεταγραφή από την RNA πολυμεράση. **(β)** Σε υψηλή θερμοκρασία, η σαπερόνη GroE προσδένεται στις μετουσιωμένες πρωτεΐνες που έχουν συσσωρευτεί στο κυτταρόπλασμα και δεν αλληλεπιδρά με τον καταστολέα HrcA. Ο HrcA δεν μπορεί να προσδεθεί στον υποκινητή και ξεκινά η μεταγραφή των γονιδίων θερμικού σοκ Τάξης I από το σύμπλοκο RNA πολυμεράση – σ^{32} . (Προσαρμογή από Bucur et al., 2018)

Όσον αφορά την έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία, ο μηχανισμός ανθεκτικότητας της *L. monocytogenes* περιλαμβάνει την μεταβολή της σύστασης της πλασματικής μεμβράνης, με αυξημένη περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα με μικρότερο μήκος αλυσίδας και την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες ψυχρού σοκ (Csps). Οι Csps συμμετέχουν στη σταθεροποίηση μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων και δρουν ως μοριακοί συνοδοί για να διευκολύνουν την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τη σύνθεση πρωτεϊνών σε χαμηλές θερμοκρασίες. Τέλος, σε χαμηλή θερμοκρασία παρατηρείται αυξημένη πρόσληψη κρυσταλλοπροστατευτικών ενώσεων, όπως η βεταΐνη της γλυκίνης, η βεταΐνη της προλίνης, η γ -βουτυροβεταΐνη και η καρνιτίνη (Bucur et al., 2018).

Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η σαπερόνη GroE είναι υπεύθυνη για το σωστό δίπλωμα του καταστολέα HrcA, ο οποίος προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων θερμικού σοκ της Τάξης I, παρεμποδίζοντας την αναγνώρισή του από τον παράγοντα σ της RNA πολυμεράσης (Εικόνα 3). Έτσι, η πολυμεράση δεν προσδένεται στον υποκινητή και δεν εκφράζονται τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις HSPs. Σε υψηλή θερμοκρασία, η αποδιάταξη των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών οδηγεί σε συσσώρευσή τους στο κυτταρόπλασμα. Ως αποτέλεσμα, οι σαπερόνες του κυττάρου δεν επαρκούν για το δίπλωμα των πρωτεϊνών και ο καταστολέας HrcA καθίσταται μη λειτουργικός και δεν προσδένεται στον υποκινητή των γονιδίων θερμικού σοκ. Ταυτόχρονα, αυξάνεται η έκφραση του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα σ, ο οποίος προσδένεται ειδικά στην RNA πολυμεράση και στον υποκινητή και ξεκινά η μεταγραφή των γονιδίων και η σύνθεση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPs) (Bucur et al., 2018). Οι HSPs συμβάλλουν στην επιβίωση των κυττάρων διπλώνοντας πρωτεΐνες ή σημαίνοντας τις πλήρως μετουσιωμένες με μοριακά σήματα για να καταστραφούν από τις ενδοκυτταρικές πρωτεάσες (Wesche et al., 2009). Επιπλέον, παρατηρείται αυξημένη έκφραση πληθώρας άλλων γονιδίων, όπως τα γονίδια θερμικού σοκ Τάξης III που κωδικοποιούν για ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες (ClpC, ClpE, ClpP) και το *recA*, υπεύθυνου για την ενεργοποίηση του μηχανισμού SOS των κυττάρων που συμμετέχει στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA (van der Veen et al., 2007).

Απόκριση στην όξινη καταπόνηση

Όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, διατηρούν το ενδοκυτταρικό τους pH σχεδόν ουδέτερο αποβάλλοντας την περίσσεια πρωτονίων. Σε ισχυρά όξινες συνθήκες, η αποβολή των πρωτονίων από το κυτταρόπλασμα δεν μπορεί να γίνει αρκετά γρήγορα, με αποτέλεσμα τα πρωτόνια να συσσωρεύονται και να οξινίζεται το ενδοκυτταρικό περιβάλλον (Ryser and Marth, 2007). Η *L. monocytogenes* διαθέτει πληθώρα μηχανισμών για τη διατήρηση του ενδοκυτταρικού pH, όπως την F_0-F_1 ATPάση, την αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού (GAD) και τις απαμινάσες της αργινίνης και της αμινογουανιδίνης (ADI και AgDI αντίστοιχα). Κατά την έναρξη ήπιας όξινης καταπόνησης, αυξάνεται η έκφραση της F_0-F_1 ATPάσης, συμβάλλοντας στην αποβολή πρωτονίων από το κύτταρο. Σε ισχυρά όξινες συνθήκες καταπόνησης, ενεργοποιείται η δράση της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού, η οποία καταλύει την ενζυματική αντίδραση της μετατροπής εξωκυτταρικού γλουταμινικού σε γ-αμινοβουτυρικό (GABA). Οι αποκαρβοξυλάσες χαρακτηρίζονται από μέγιστη ενζυματική δραστηριότητα σε όξινες συνθήκες (π.χ. σε pH 3,8) (Arcari et al., 2020). Κατά την αντίδραση, καταναλώνεται ένα πρωτόνιο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγκέντρωση πρωτονίων και να αυξάνεται το ενδοκυτταρικό pH. Σε ακραίες συνθήκες, επάγεται καταβολισμός των αμινοξέων μέσω των συστημάτων ADI και AgDI. Η απαμινάση της αργινίνης διασπά την εξωκυτταρική αργινίνη σε ορνιθίνη, CO_2 , αμμωνία (NH_3) και ATP,

ενώ η αμινογουανιδίνη διασπάται σε πουτρεσκίνη και αμμωνία από την απαμινάση της αμινογουανιδίνης. Η πρωτονίωση της παραγόμενης αμμωνίας και η παραγωγή αμμωνίου NH_4 οδηγεί σε αύξηση του ενδοκυτταρικού pH (Yousef and Courtney, 2002; Bucur et al., 2018).

Η ένταση και η αποτελεσματικότητα της απόκρισης σε όξινο στρες επηρεάζεται από το υπόστρωμα ανάπτυξης των κυττάρων και τη δομή των τροφίμων. Μελέτες σε προϊόντα κρέατος και σε λαχανικά αναφέρουν ότι τα κύτταρα της *L. monocytogenes* είναι πιο ανθεκτικά στην επίδραση ασθενών οξέων όταν βρίσκονται στην επιφάνεια του τροφίμου, σε σύγκριση με την ανάπτυξη σε κάποιο υγρό θρεπτικό υλικό ή σε ομογενοποιημένο τρόφιμο (Skandamis et al., 2012; Poimenidou et al., 2016). Επίσης, το στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων και η φυσιολογική τους κατάσταση επηρεάζουν την ανθεκτικότητά τους σε όξινη καταπόνηση, με τα κύτταρα στατικής φάσης να είναι γενικά πιο ανθεκτικά σε σύγκριση με τα κύτταρα εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Τέλος, η παραμονή του παθογόνου σε τρόφιμο με ήπια όξινο pH μπορεί να αυξήσει την ανθεκτικότητά του σε εντονότερες συνθήκες καταπόνησης. Κύτταρα *L. monocytogenes* που έχουν προσαρμοστεί σε ήπια όξινες συνθήκες μπορούν να ανταποκρίνονται καλύτερα στην έκθεση στα οξέα του γαστρεντερικού σωλήνα, αυξάνοντας τον κίνδυνο πρόκλησης νόσου στον καταναλωτή (Ryser and Marth, 2007).

1.1.7 ΥΠΟΘΑΝΑΤΙΟΣ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ

Ο υποθανάτιος τραυματισμός είναι το αποτέλεσμα της έκθεσης σε κάποιον φυσικό ή χημικό παράγοντα που βλάπτει το κύτταρο, χωρίς να προκαλεί τη θανάτωση του (Wesche et al., 2009). Πληθώρα μελετών αποκαλύπτει ότι μετά την επίδραση ήπιας καταπόνησης, αναστέλλεται η αύξηση των τραυματισμένων κυττάρων και ο σχηματισμός αποικιών σε επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα. Αντιθέτως, τα τραυματισμένα κύτταρα διατηρούν την καλλιεργησιμότητά τους σε γενικά θρεπτικά υποστρώματα, πλούσια σε θρεπτικά συστατικά (Hartsell, 1951; Straka and Stokes, 1959; Ray, 1979; Siderakou et al., 2021; Arvaniti et al., 2021). Η αυξημένη ευαισθησία των τραυματισμένων κυττάρων οφείλεται στις δομικές και μεταβολικές βλάβες που προκαλούνται από κάποιον παράγοντα καταπόνησης. Συγκεκριμένα, η διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηριακών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τη μη ελεγχόμενη ανταλλαγή μορίων μεταξύ του κυττάρου και του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος. Με αυτόν τον τρόπο, τα κύτταρα καθίστανται πιο ευαίσθητα σε χημικά μόρια του περιβάλλοντος (π.χ. άλατα, αντιβιοτικά κ.λπ) και αναστέλλεται η αύξηση και ο πολλαπλασιασμός τους. Επιπλέον, παρατηρούνται βλάβες στα ριβοσώματα, στο γενετικό υλικό και σε ενδοκυτταρικά ένζυμα που καταλύουν κρίσιμες μεταβολικές αντιδράσεις (Ray, 1979).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο τραυματισμός των κυττάρων είναι αναστρέψιμος, χάρη στους επιδιορθωτικούς κυτταρικούς μηχανισμούς. Τα τραυματισμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένη διάρκεια της φάσης προσαρμογής, καθώς χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να επιδιορθώσουν τις βλάβες και να συνθέσουν εκ νέου τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα που είναι απαραίτητα για την αύξηση. Ανεξάρτητα από τον τύπο της καταπόνησης, η επώαση σε ευνοϊκές συνθήκες, δηλαδή σε πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, μη επιλεκτικό υπόστρωμα και σε κατάλληλη θερμοκρασία, αναστρέφει τον τραυματισμό και οδηγεί στην επιδιόρθωση των κυτταρικών βλαβών σε 2-4 ώρες. Η βέλτιστη θερμοκρασία επώασης και ο χρόνος που απαιτείται για επιδιόρθωση εξαρτάται από τον παράγοντα καταπόνησης. Μετά την επιδιόρθωση, τα κύτταρα ανακτούν πλήρως την λειτουργικότητά τους, την ανθεκτικότητα στις διαφορετικού τύπου καταπονήσεις, τη μολυσματικότητά τους και την ικανότητα διπλασιασμού τους τόσο σε γενικά όσο και σε επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (Wu, 2008).

Ο εντοπισμός του υποθανάτιου τραυματισμού συνήθως βασίζεται στην ικανότητα αύξησης των τραυματισμένων κυττάρων σε μη επιλεκτικά θρεπτικά μέσα και στην ταυτόχρονη απώλεια της καλλιεργησιμότητάς τους σε επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε Tryptic Soy Agar ενισχυμένο με 0,6% Yeast Extract (TSA-YE) ως γενικό θρεπτικό υπόστρωμα που επιτρέπει την αύξηση των τραυματισμένων κυττάρων και το σχηματισμό αποικιών. Ως επιλεκτικό υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε TSA-YE με προσθήκη 5% NaCl, καθώς λόγω της προσθήκης άλατος σε υψηλή συγκέντρωση, δεν είναι δυνατή η ανάκαμψη των τραυματισμένων κυττάρων και μόνο τα υγιή κύτταρα μπορούν να σχηματίσουν αποικίες (Siderakou et al., 2021).

Άλλες μέθοδοι ανάκαμψης και ανάκτησης της καλλιεργησιμότητας των τραυματισμένων μικροβιακών κυττάρων περιλαμβάνουν επίστρωση των κυττάρων σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα και επικάλυψη με μη επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα, ή αντίστροφα. Η παρουσία του μη επιλεκτικού υποστρώματος θα ευνοήσει την επιδιόρθωση και ανάκαμψη των τραυματισμένων κυττάρων, τα οποία θα σχηματίσουν αποικίες (solid-repair methods). Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει επώαση σε υγρό θρεπτικό υλικό, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά σε βέλτιστες για την ανάκαμψη συνθήκες και επίστρωση σε επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (liquid-repair methods) (Ray, 1979; Wu, 2008). Σε κάθε περίπτωση, η διαφορά στον αριθμό των αποικιών σε επιλεκτικά και μη επιλεκτικά μέσα είναι ενδεικτική του επιπέδου του τραυματισμού στον πληθυσμό.

Τέλος, η παρατήρηση του τραυματισμού είναι εφικτή σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, μέσω διαφορικής χρώσης και μικροσκοπικής παρατήρησης (Schottroff et al., 2018). Οι χρησιμοποιούμενες χρωστικές εισέρχονται στα κύτταρα και είτε προσδένονται εντός των κυττάρων είτε μεταβολίζονται, αποδίδοντας φθορισμό. Ορισμένες χρωστικές, όπως το SYTO9, μπορούν να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, να προσδένονται στο εσωτερικό των κυττάρων και να αποδίδουν φθορισμό. Αντίθετα, χρωστικές όπως το ιωδιούχο

προπίδιο (propidium iodide - PI), δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και επομένως, εισέρχονται και προσδένονται μόνο σε κύτταρα με διαρρηγμένη μεμβράνη. Με αυτό τον τρόπο, ανάλογα με τον φθορισμό που εκπέμπουν τα κύτταρα κατά την παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού, εξάγονται συμπεράσματα για τη φυσιολογική κατάστασή τους. Οι χρωστικές που προαναφέρθηκαν μπορούν να διαχωρίσουν ζωντανά και νεκρά κύτταρα. Η προσθήκη χρωστικών που υποδεικνύουν τη μεταβολική ενεργότητα των κυττάρων, όπως το CTC ή το CFDA για δράση αναπνευστικών ενζύμων και εστερασών αντίστοιχα, αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για τη διερεύνηση των ενδιάμεσων σταδίων τραυματισμού μεταξύ υγίων και νεκρών κυττάρων (Schottroff et al., 2018). Μάλιστα, οι Wideman et al. (2021) σε πρόσφατη μελέτη τους αναφέρουν ότι η χρώση με CFDA συμβάλλει στην καλύτερη ανίχνευση ζώντων κυττάρων έναντι άλλων χρωστικών, όπως το SYTO9, και η συνδυαστική χρήση της με το PI αποτελεί μια έγκυρη μέθοδο προσδιορισμού του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων.

1.2 ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ

1.2.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Έπειτα από την πρώτη καταγεγραμμένη έξαρση λιστερίωσης, το 1983, αυξήθηκε το επιστημονικό ενδιαφέρον για τη συγκεκριμένη νόσο, και ως αποτέλεσμα, οι καταγραφές κρουσμάτων τα τελευταία χρόνια είναι όλο και περισσότερες και πιο λεπτομερείς. Κατά την περίοδο 1983-2020, έχουν καταγραφεί 108 εξάρσεις τροφιμογενούς λιστερίωσης στις ΗΠΑ που αντιστοιχούν σε 1.232 κρούσματα και 176 θανάτους (NORS, CDC). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, τη δεκαετία 2011-2020 καταγράφηκαν 21.310 κρούσματα και 2.171 επιβεβαιωμένοι θάνατοι από λιστερίωση, ενώ το ποσοστό θνησιμότητας κυμάνθηκε μεταξύ 12,7 %- 17,8 % (Πίνακας 2).

Σύμφωνα με την Έκθεση για τις Ζωνοδόσους της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), το 2020 καταγράφηκαν 1.876 κρούσματα λιστερίωσης εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, εκ των οποίων, τα 780 χρειάστηκαν νοσηλεία. Αν και χαμηλότερη από το 2019, καταγράφηκε υψηλή θνησιμότητα εξαιτίας της νόσου (13%), γεγονός που την καθιστά μια από τις σοβαρότερες τροφιμογενείς νόσους. Η ανάλυση των δεδομένων των τελευταίων 5 χρόνων φανερώνει μια αυξητική τάση στο ποσοστό θνησιμότητας και τον αριθμό νοσηλειών που σχετίζονται με λοίμωξη από *L. monocytogenes*. Αξίζει να σημειωθεί πως από το 2005, η συχνότερα αναφερόμενη ζωνοδότη είναι η λοίμωξη από βακτήρια του γένους *Campylobacter*, για την οποία το 2020 καταγράφηκαν 120.946 κρούσματα και από αυτά κατέληξε μόνο το 0,05%. Τέλος, στην Ελλάδα αναφέρθηκαν 183 κρούσματα και 4 εξάρσεις λιστερίωσης για το ίδιο χρονικό διάστημα (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2021).

Πίνακας 2. Δεδομένα νοσηλειών και θνησιμότητας σε επιβεβαιωμένα κρούσματα λιστερίωσης για το χρονικό διάστημα 2011-2020 στην Ευρωπαϊκή Ένωση. (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2013-2021)

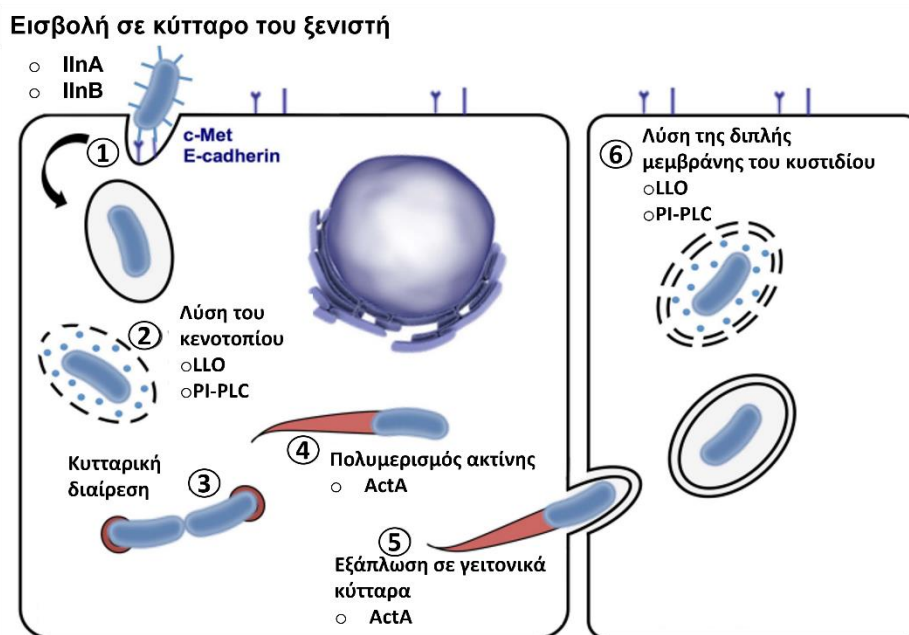
ΕΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ	ΝΟΣΗΛΕΙΕΣ			ΘΑΝΑΤΟΙ		
		ΔΙΑΘΕΣΙΜΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ (%)	ΑΡΙΘΜΟΣ ΝΟΣΗΛΕΙΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΝΟΣΗΛΕΥΜΕΝΩΝ (%)	ΔΙΑΘΕΣΙΜΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ (%)	ΑΡΙΘΜΟΣ ΘΑΝΑΤΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (%)
2011	1.476	43,7	604	93,6	71,4	134	12,7
2012	1.642	41,5	624	91,6	67,7	198	17,8
2013	1.763	42,1	735	99,1	69,7	191	15,6
2014	2.161	38,1	812	98,9	64,8	210	15,0
2015	2.206	44,9	964	97,4	69,1	270	17,7
2016	2.536	38,8	962	97,7	60,1	247	16,2
2017	2.480	40,4	988	98,6	65,8	225	13,8
2018	2.549	42,4	1.049	97,0	57,6	229	15,6
2019	2.621	51,1	1.234	92,1	65,1	300	17,6
2020	1.876	42,8	780	97,1	68,4	167	13,0

Από τα είδη του γένους *Listeria*, μόνο δύο είδη είναι παθογόνα. Το είδος *L. ivanovii* θεωρείται υπεύθυνο για την προσβολή ζώων, ενώ το είδος *L. monocytogenes* προκαλεί νόσο στον άνθρωπο. Μάλιστα, τα στελέχη *L. monocytogenes* με ορότυπο 1/2a, 1/2b και 4b είναι αυτά που αναφέρονται συχνότερα σε περιστατικά λιστερίωσης. Τα περισσότερα στελέχη που απομονώνονται από τρόφιμα ανήκουν στον ορότυπο 1/2a, ενώ περισσότερα από το 50% των περιστατικών λιστερίωσης οφείλονται σε στελέχη του ορότυπου 4b (Holley and Cordeiro, 2014). Η μολυσματική δόση που μπορεί να προκαλέσει νόσο κυμαίνεται από λιγότερα από 100 κύτταρα έως και 10^{11} κύτταρα του παθογόνου, καθώς εξαρτάται από την ποσότητα του μολυσμένου τροφίμου που θα καταναλωθεί, το βακτηριακό στέλεχος και την ανοσολογική κατάσταση του καταναλωτή (Lopes-Luz et al., 2021). Σε υγιή άτομα, η λιστερίωση εκδηλώνεται με συμπτώματα παρόμοια με της γρίπης και διάρροια, ενώ σε ευπαθείς ομάδες, όπως οι ηλικιωμένοι, οι εγκυμονούσες, τα νεογνά και οι ανοσοκατασταλμένοι, μπορεί να προκαλέσει σοβαρότατη νόσο και θάνατο σε ποσοστό 20-40% των κρουσμάτων. Σε περίπτωση σοβαρής νόσου, μπορεί να προκληθεί εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία ή αποβολή του εμβρύου στις εγκυμονούσες (Wang and Orsi, 2013).

1.2.2 ΕΙΣΟΔΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Όπως αναφέρθηκε, ο κυριότερος τρόπος μετάδοσης της λιστερίωσης στον άνθρωπο είναι μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων με το παθογόνο τροφίμων. Μετά την κατανάλωση, τα κύτταρα της *L. monocytogenes*

εκτίθενται στα υγρά του γαστρεντερικού σωλήνα. Αρχικά, βρίσκονται στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, όπου επιβιώνουν μέσω του μηχανισμού απόκρισης στο όξινο στρες (§ 1.1.6). Επίσης, με τη βοήθεια της υδρολάσης χολικών αλάτων (BSH) και ειδικές πρωτεΐνες απομάκρυνσης χολικών αλάτων (BSE) εξασφαλίζεται η επιβίωση των κυττάρων έναντι των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων της χολής (Lopes-Luz et al., 2021).



Εικόνα 4. Ενδοκυτταρικός κύκλος της *L.monocytogenes*. **(1)** Εισβολή στο κύτταρο-ξενιστή μέσω αλληλεπίδρασης των ιντερναλινών IInA και IInB του παθογόνου με τους υποδοχείς E-καδερίνη και Met, αντίστοιχα. **(2)** Λύση του πεπτικού κενοτοπίου πριν τη σύντηξη με λυσόσωμα και διαφυγή του παθογόνου στο κυτταρόπλασμα μέσω της δράσης της λιστεριολυσίνης O (LLO) και της φωσφολιπάσης C της φωσφατιδυλο-ινσοσιτόλης (PI-PLC). **(3)** Κυτταρική διαίρεση του παθογόνου στο κυτταρόπλασμα. **(4)** Κινητικότητα του παθογόνου μέσω πολυμερισμού ακτίνης. **(5)** Εξάπλωση σε γειτονικά κύτταρα μέσω «ουράς» ακτίνης εντός κυστιδίου με διπλή μεμβράνη. **(6)** Λύση της διπλής μεμβράνης με δράση της LLO και της φωσφολιπάσης C της φωσφατιδυλοχολίνης (PC-PLC) και εξάπλωση στον οργανισμό. (Προσαρμογή από Luque-Sastre et al., 2018)

Στη συνέχεια, με ειδικές πρωτεΐνες προσκόλλησης μπορούν να διαπερνούν τον επιθηλιακό φραγμό του λεπτού και του παχέος εντέρου και τελικά, να εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και τη λέμφο. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη προσκόλλησης της *Listeria* (LAP) αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα Hsp60 των κυττάρων του ξενιστή και το κύτταρο του παθογόνου μπορεί να περάσει διαμέσου των στενοσυνδέσμων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων. Επίσης, η ιντερναλίνη A (InIA) αλληλεπιδρά με την E-καδερίνη των κυττάρων του ξενιστή και το παθογόνο εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω εγκολπώσεων της μεμβράνης τους και σχηματισμού κυστιδίων (πεπτικά κενοτόπια). Η αλληλεπίδραση InIA/E-καδερίνης σχετίζεται και με τη διάσχιση

του πλακουντιακού και του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Magalhães et al., 2014). Μέσω της δράσης της λιστεριολυσίνης O (LLO), και των φωσφολιπασών της φωσφατιδυλοχολίνης και της φωσφατιδυλοϊννοσιτόλης (PC-PLC και PI-PLC αντίστοιχα) του παθογόνου διαρρηγνύεται το περίβλημα των κυστιδίων και το παθογόνο ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή. Εκεί πολλαπλασιάζεται και επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης, αποκτώντας κινητικότητα εντός του κυτταροπλάσματος. Τέλος, οι ουρές ακτίνης που διαθέτει του επιτρέπουν να προσκολλάται στη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου του ξενιστή και να μεταφέρεται με τη μορφή κυστιδίου με διπλό περίβλημα στα γειτονικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την εξάπλωσή του στον οργανισμό του ξενιστή (Holley and Cordeiro, 2014; Lopes-Luz et al., 2021).

Όταν τα κύτταρα του παθογόνου βρεθούν στο αίμα και τη λέμφο, μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας στο ήπαρ και το σπλήνα, όπου καταστρέφονται άμεσα από μακροφάγα. Παρόλα αυτά, εάν κάποια κύτταρα επιβιώσουν, εισέρχονται στα ηπατικά κύτταρα και ακολουθούν τον ενδοκυτταρικό κύκλο που περιγράφηκε παραπάνω. Τα προσβεβλημένα ηπατικά κύτταρα απελευθερώνουν χημικά μόρια και ενεργοποιούν το μηχανισμό ανοσολογικής απόκρισης που περιλαμβάνει τη δράση μακροφάγων και κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων. Σε υγιείς οργανισμούς, με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται άμεση εξάλειψη του παθογόνου από το ήπαρ. Εντούτοις, σε ασθενείς που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή, η ανοσολογική απόκριση στο ήπαρ είναι ανεπαρκής, με αποτέλεσμα το παθογόνο να απελευθερώνεται εκ νέου στην κυκλοφορία του αίματος και να μολύνει άλλους ιστούς, προκαλώντας βαριά νόσο (Holley and Cordeiro, 2014).

1.2.3 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ

Η *L. monocytogenes* διαθέτει πληθώρα παραγόντων παθογένειας προκειμένου να προσκολληθεί και να διαπεράσει τον επιθηλιακό φραγμό του εντέρου, να προσβάλλει τα επιθηλιακά κύτταρα και να εξαπλωθεί από κύτταρο σε κύτταρο και τελικά, σε ολόκληρο τον οργανισμό. Αυτές οι διαδικασίες καθορίζονται κυρίως από την έκφραση 8 γονιδίων παθογένειας, 6 από τα οποία ομαδοποιούνται σε μια νησίδα παθογένεσης του βακτηριακού χρωμοσώματος, η έκφραση της οποίας ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα PrfA (Renzoni et al., 1999; Magalhães et al., 2014). Το γονίδιο *prfA* που κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό παράγοντα είναι ένα από τα γονίδια που εντοπίζονται σε αυτή την ομάδα γονιδίων, μαζί με τα *hly* (λιστεριολυσίνη O/LLO), *plcA* (φωσφολιπάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης/PI-PLC), *actA* (ακτίνη/ActA), *plcB* (φωσφολιπάση C/PLCB) και *mpl* (μεταλλοπρωτεάση που συμμετέχει στην ωρίμανση της PLCB) (Magalhães et al., 2014).

Αυξημένη σύνθεση του PrfA παρατηρείται κατά την προσκόλληση κυττάρων του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή, οπότε επάγεται η έκφραση των παραγόντων παθογένειας (Renzoni et al., 1999). Επιπρόσθετα, η

έκφραση των γονιδίων της νησίδας παθογένεσης είναι αυξημένη όταν το παθογόνο αναπτύσσεται στα μακροφάγα κύτταρα του ξενιστή σε σχέση με τα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ ορισμένα γονίδια έχουν υψηλότερο επίπεδο έκφρασης σε συγκεκριμένα τμήματα του κυττάρου. Για παράδειγμα, τα γονίδια *hly* και *plcA* εκφράζονται κυρίως στο φαγοσωματικό κυστίδιο και συμμετέχουν στη διάτρηση και τη λύση της μεμβράνης του, ενώ το *actA* εκφράζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή (Bubert et al., 1999). Τέλος, τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις ιντερναλίνες (*inlA*, *inlB*) ομαδοποιούνται σε διαφορετικό οπερόνιο (Renzoni et al., 1999).

1.3 ΕΤΟΙΜΑ ΠΡΟΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΡΟΦΙΜΑ

1.3.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΣΕ ΕΤΟΙΜΑ ΠΡΟΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΡΟΦΙΜΑ

Ιδιαίτερα αυξημένος είναι ο κίνδυνος λιστερίωσης από κατανάλωση τροφίμων με μεγάλη διάρκεια συντήρησης που δεν απαιτούν μαγείρεμα πριν καταναλωθούν, τα λεγόμενα «έτοιμα προς κατανάλωση» προϊόντα (ready-to-eat, RTE) (Lianou and Sofos, 2007). Τα RTE τρόφιμα είναι προπλυμένα, προμαγειρεμένα και δε χρειάζονται καμία επεξεργασία πριν καταναλωθούν για να εξαλείψει ή να μειώσει σε αποδεκτό επίπεδο τους ανησυχητικούς μικροοργανισμούς και να είναι ασφαλή προς κατανάλωση. Η ικανότητα της *L. monocytogenes* να αναπτύσσεται σε συνθήκες συντήρησης την καθιστά το σημαντικότερο παθογόνο για τα RTE προϊόντα (Huang and Hwang, 2012). Μερικές από τις μεγαλύτερες εξάρσεις λιστερίωσης συνδέονται με την κατανάλωση αλλαντικών, γαλακτοκομικών προϊόντων και κυρίως μαλακών τυριών, συσκευασμένων λαχανικών και φρούτων, μαγειρεμένου κοτόπουλου, βρασμένων αυγών και παγωτού. Μάλιστα, η πιο πρόσφατη έξαρση λιστερίωσης στις ΗΠΑ καταγράφηκε τον Αύγουστο του 2022, εξαπλώθηκε σε 11 πολιτείες και αφορούσε προϊόν παγωτού λιανικής πώλησης (CDC).

Η μόλυνση των τροφίμων με το παθογόνο μπορεί να συμβεί είτε στο φυσικό περιβάλλον (π.χ. λαχανικά και φρούτα που έρχονται σε επαφή με μολυσμένο χώμα ή νερό, τυριά από μη παστεριωμένο γάλα, μολυσμένα θαλασσινά και ψάρια) είτε να είναι αποτέλεσμα διασταυρούμενης επιμόλυνσης κατά το χειρισμό και την επεξεργασία στις βιομηχανικές εγκαταστάσεις ή στο λιανικό εμπόριο, μετά την παραγωγή τους. Για τα μαγειρεμένα προϊόντα, όπως το κρέας ή τα αλλαντικά, η επεξεργασία ωμών και επεξεργασμένων τροφίμων στον ίδιο χώρο ή ο ανεπαρκής καθαρισμός των επιφανειών και των μηχανημάτων κοπής ή συσκευασίας συχνά ευθύνονται για την παρουσία του παθογόνου. Δεδομένων των παραπάνω και της αυξημένης ζήτησης για προϊόντα έτοιμα προς κατανάλωση, με όσο το δυνατόν λιγότερα πρόσθετα και συντηρητικά από τους σύγχρονους καταναλωτές, καθίσταται κρίσιμη η λήψη μέτρων ελέγχου της εξάπλωσης της *L. monocytogenes* στα συγκεκριμένα προϊόντα για τη διασφάλιση της υγείας του ανθρώπου (Lianou and Sofos, 2007).

1.3.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΛΟΥΚΑΝΙΚΩΝ ΤΥΠΟΥ ΦΡΑΝΚΦΟΥΡΤΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ

Τα λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης (frankfurters) είναι ένα προϊόν επεξεργασμένου και μαγειρεμένου κρέατος και εντάσσεται στην κατηγορία των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων (ready-to-eat, RTE). Για την παρασκευή τους, χρησιμοποιείται βόειο ή χοιρινό κρέας ή κρέας πουλερικών ή συνδυασμός τους. Ένα τυπικό μείγμα παρασκευής λουκάνικων τ. Φρανκφούρτης περιέχει 60% βόειου και 40% χοιρινού κρέατος, ενώ η περιεκτικότητα των λουκάνικων σε λίπος μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 15%-30%. Τα κομμάτια κρέατος τεμαχίζονται και προστίθενται καρυκεύματα, αλάτι, ζάχαρη, συντηρητικά και άλλα πρόσθετα, όπως τα νιτρικά. Το μείγμα ομογενοποιείται μέχρι να αποκτήσει την κατάλληλη υφή και στη συνέχεια χρησιμοποιείται για το γέμισμα μεμβρανών. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι φυσικής ζωικής προέλευσης (από το λεπτό έντερο προβάτων, χοίρων ή βοοειδών) ή μεμβράνες κυτταρίνης ή εδώδιμου κολλαγόνου και συμβάλλουν στη διατήρηση του σχήματος και της υγρασίας του τροφίμου (Feiner, 2006). Τέλος, ακολουθεί θερμική επεξεργασία ή κάπνισμα του τροφίμου, ώστε να είναι έτοιμο και ασφαλές για κατανάλωση (Lonergan et al., 2019).

Τα λουκάνικα τ. Φρανκφούρτης είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στις προτιμήσεις των Αμερικανών καταναλωτών, καθώς αποτελούν το 25% των πωλήσεων λουκάνικων όλων των τύπων (Lonergan et al., 2019). Σύμφωνα με τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών των ΗΠΑ, την περίοδο 1998-2008 καταγράφηκαν 24 εξάρσεις λιστερίωσης στις ΗΠΑ, εκ των οποίων 3 συνδέθηκαν με την κατανάλωση μολυσμένων λουκάνικων τύπου Φρανκφούρτης (Cartwright et al., 2013). Οι επιμολύνσεις του τροφίμου προκλήθηκαν από μόλυνση της γραμμής παραγωγής, λόγω ανακαίνισων στην βιομηχανική μονάδα. Συνολικά, καταγράφηκαν 116 κρούσματα, εκ των οποίων τα 101 (87%) νοσηλεύτηκαν και τα 14 (12%) κατέληξαν. Σε αξιολόγηση της σχετικής επικινδυνότητας της παρουσίας της *L. monocytogenes* σε προϊόντα έτοιμα προς κατανάλωση που διενεργήθηκε από τον FDA (Food and Drug Administration) και τον USDA (U.S. Department of Agriculture), αναφέρεται υψηλή συχνότητα επιμόλυνσης λουκάνικων Φρανκφούρτης στο στάδιο του λιανικού εμπορίου, ενώ το παθογόνο μπορεί να αυξάνεται κατά 0,1-0,2 log CFU ημερησίως κατά τη συντήρηση σε οικιακό περιβάλλον. Με τη χρήση μοντέλων πρόβλεψης, τα λουκάνικα Φρανκφούρτης που καταναλώνονται χωρίς να προηγηθεί αναθέρμανσή τους, αναδείχθηκαν ως τρόφιμο πολύ υψηλού κινδύνου για την υγεία των καταναλωτών, καθώς παρουσιάζουν υψηλή συχνότητα επιμόλυνσης, επιτρέπουν την αύξηση του παθογόνου σε συνθήκες ψύξης, διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα και καταναλώνονται συχνά και από όλες τις ομάδες καταναλωτών. Ακόμα και μετά την αναθέρμανσή τους, τα λουκάνικα Φρανκφούρτης ταξινομούνται στην κατηγορία μεσαίου κινδύνου, λόγω της πιθανότητας επαναμόλυνσής τους, εξαιτίας της απουσίας μέτρων ελέγχου (USDHHS-FDA-CFSAN και USDA-FSIS, 2003).

1.4 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο παθογόνο που μεταφέρεται στον άνθρωπο διαμέσου της κατανάλωσης επιμολυσμένων τροφίμων και δυνητικά, μπορεί να προκαλέσει σοβαρή νόσο, απειλητική για την ανθρώπινη ζωή. Λόγω του αυξημένου κινδύνου για την υγεία των καταναλωτών από την παρουσία του παθογόνου σε προϊόντα έτοιμα προς κατανάλωση (RTE), στις ΗΠΑ εφαρμόζεται πολιτική μηδενικής ανοχής από το 1989 με απόφαση του FDA και του FSIS του Τμήματος Γεωργίας (USDA) των ΗΠΑ. Συγκεκριμένα, απαιτείται απουσία του παθογόνου από δύο δείγματα 25 γραμμαρίων RTE τροφίμου, ώστε να θεωρηθεί ασφαλές για κατανάλωση (Huang and Hwang, 2012). Εντούτοις, η απαίτηση για παντελή απουσία του παθογόνου τίθεται υπό αμφισβήτηση, καθώς τα επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι συγκεντρώσεις μικρότερες από 100 κύτταρα ανά γραμμάριο τροφίμου είναι χαμηλού κινδύνου για τους καταναλωτές, ενώ τα περισσότερα κρούσματα λιστερίωσης προκλήθηκαν από κατανάλωση τροφίμων με περισσότερα από 1000 κύτταρα του παθογόνου ανά γραμμάριο τροφίμου. Έτσι, σε αρκετές χώρες εφαρμόζονται διαφορετικές απαιτήσεις ανάλογα το τρόφιμο και την προβλεπόμενη χρήση του (Lianou and Sofos, 2007).

Στην Ευρώπη, εφαρμόζεται ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός 2073/2005 που ορίζει τα μικροβιολογικά κριτήρια ασφάλειας για τα τρόφιμα. Με βάση τον κανονισμό, ισχύουν τα εξής κριτήρια για την παρουσία της *L.monocytogenes* :

- Σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς απαιτείται απουσία του παθογόνου σε 25 γραμμάρια τροφίμου σε 10 δείγματα κατά τη διάρκεια διατήρησής τους, όταν διατίθενται στην αγορά.
- Σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του παθογόνου, αλλά δεν προορίζονται για βρέφη ή για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς επιτρέπεται μέγιστη συγκέντρωση 100 cfu/g σε 5 δείγματα κατά τη διάρκεια διατήρησής τους, όταν διατίθενται στην αγορά. Σε αυτήν την περίπτωση, ο παρασκευαστής θα πρέπει να αποδείξει στην αρμόδια αρχή ότι το προϊόν δε θα υπερβεί το όριο των 100 cfu/g καθ'όλη τη διάρκεια διατήρησης. Εναλλακτικά, απαιτείται απουσία του παθογόνου σε 25 γραμμάρια τροφίμου σε 5 δείγματα πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης τροφίμων που το παρήγαγε.
- Σε τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του παθογόνου διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς επιτρέπεται μέγιστη συγκέντρωση 100 cfu/g σε 5 δείγματα κατά τη διάρκεια διατήρησής τους, όταν διατίθενται στην αγορά. Τα προϊόντα με $pH \leq 4,4$ ή $a_w \leq 0,92$, τα προϊόντα με $pH \leq 5,0$ και $a_w \leq 0,94$ και τα προϊόντα με διάρκεια διατήρησης μικρότερη από 5 ημέρες θεωρούνται αυτομάτως ότι ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Άλλες

κατηγορίες προϊόντων μπορούν επίσης να ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία, εφόσον αποδεικνύεται επιστημονικά.

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί/οι τοξίνες και οι μεταβολίτες τους	Πλάνο δειγματοληψίας ⁽¹⁾		Όρια ⁽²⁾		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς ⁽³⁾	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
		n	c	m	M		
1.1. Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς ⁽⁴⁾	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Απουσία σε 25 g		EN/ISO 11290-1	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.2. Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g ⁽⁵⁾		EN/ISO 11290-2 ⁽⁶⁾	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους Πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπευθύνου της επιχείρησης τροφίμων που το παράγει
		5	0	Απουσία σε 25 g ⁽⁷⁾		EN/ISO 11290-1	
1.3. Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς ⁽⁴⁾ ⁽⁸⁾	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g		EN/ISO 11290-2 ⁽⁶⁾	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

Εικόνα 5. Κριτήρια ασφάλειας για τα τρόφιμα και τη *Listeria monocytogenes*, όπως ορίζονται από τον ΕΚ 2073/2005.

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν:

- ❖ Η διερεύνηση της ανθεκτικότητας και της χωρικής κατανομής μεμονωμένων κυττάρων του παθογόνου *Listeria monocytogenes* στη μεμβράνη λουκάνικων τ. Φρανκφούρτης μετά από την ήπια αναθέρμανσή τους στους 64 °C με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού.
- ❖ Η *in situ* αξιολόγηση της επίδρασης όξινων διαλυμάτων προσομοίωσης πέψης στην επιβίωση του παθογόνου που είχε εμβολιαστεί στην επιφάνεια λουκάνικων τ. Φρανκφούρτης σε επίπεδο πληθυσμού και της πιθανότητας υποθανάτιου τραυματισμού των κυττάρων μετά την καταπόνηση.
- ❖ Η συγκριτική μελέτη της κατανομής ζώντων, τραυματισμένων και νεκρών κυττάρων με κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους καλλιέργειας σε τρυβλία και μικροσκοπία φθορισμού.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκε η ικανότητα επιβίωσης και ο τραυματισμός κυττάρων του στελέχους *Listeria monocytogenes* EGD-e που προσκολλήθηκαν στην επιφάνεια λουκάνικων τύπου Φρανκφούρτης. Κατά την παραγωγική διαδικασία και υπό συνθήκες ελλιπούς υγιεινής, καθίσταται πιθανή η διασταυρούμενη επιμόλυνση του τροφίμου (επιφανειακή επιμόλυνση), με αποτέλεσμα να διακυβεύεται η υγεία των καταναλωτών εάν ο κίνδυνος δεν τεθεί υπό έλεγχο. Λαμβάνοντας υπόψιν την παραπάνω υπόθεση, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός κυττάρων *L. monocytogenes* στην εξωτερική επιφάνεια λουκάνικων τύπου Φρανκφούρτης, προσομοιάζοντας μια υποθετική επιμόλυνση του τροφίμου σε κάποιο στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας ή/και της συσκευασίας. Στη συνέχεια, ακολούθησε ήπια αναθέρμανση του τροφίμου, όπως συστήνεται στην ετικέτα του προϊόντος. Προηγούμενα πειράματα θερμικής καταπόνησης εμβολιασμένων λουκάνικων Φρανκφούρτης έδειξαν ότι μετά από αναθέρμανση σε υδατόλουτρο στους 64 °C τα κύτταρα του παθογόνου διατήρησαν την καλλιεργησιμότητά τους και ο πληθυσμός τους παρέμεινε σταθερός μετά από 4 λεπτά θέρμανσης, ενδεχομένως λόγω της διείδυσης των κυττάρων σε βαθύτερα στρώματα της μεμβράνης του τροφίμου, με αποτέλεσμα την προστασία τους έναντι της υψηλής θερμοκρασίας (Βλάχου Ε., Μεταπτυχιακή μελέτη, 2022). Στην παρούσα μελέτη, η υπόθεση αυτή διερευνήθηκε με παρατήρηση χρωσμένων κυττάρων του παθογόνου επάνω στη μεμβράνη του λουκάνικου σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, που επέτρεψε τη μικροσκοπική παρατήρηση της κατανομής του μικροβιακού πληθυσμού σε διαφορετικά εστιακά βάθη.

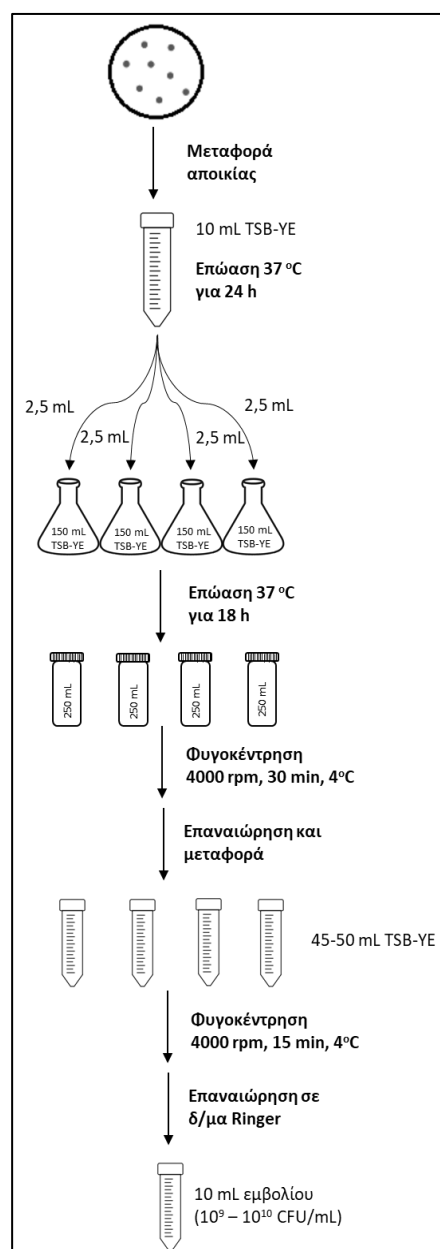
Τα λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης ανήκουν στα έτοιμα προς κατανάλωση (ready-to-eat) τρόφιμα, επομένως μπορούν να καταναλωθούν χωρίς να προηγηθεί αναθέρμανσή τους. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η επίδραση όξινης καταπόνησης στα κύτταρα του παθογόνου, προσομοιάζοντας την απευθείας κατανάλωση επιμολυσμένου τροφίμου και την επίδραση του γαστρικού υγρού στο μικροβιακό πληθυσμό. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 3 συνταγές γαστρικού υγρού (προσομοίωση γαστρικού υγρού - Simulated Gastric Fluid, αραιωμένο SGF και διάλυμα HCl σε Ringer) και μελετήθηκαν δύο επίπεδα χαμηλού pH 1,5 και 2,5 που προσομοιάζουν τις όξινες συνθήκες του στομάχου. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με την βιβλιογραφία η μελέτη της όξινης καταπόνησης γίνεται: (i) είτε σε συνθήκες σταθερού pH, μέσω της προσθήκης οξέος και επαναφοράς του pH στις αρχικές συνθήκες (ii) είτε σε συνθήκες μεταβαλλόμενου pH, όπου το pH σταδιακά αυξάνεται λόγω της προσθήκης του τροφίμου (η μεταβολή εξαρτάται από την σχετική αναλογία τροφίμου/όγκου γαστρικού υγρού). Στην παρούσα μελέτη, έγινε σύγκριση της δράσης των διαφορετικών διαλυμάτων γαστρικού υγρού (SGF και διάλυμα HCl σε Ringer) σε στατικές και δυναμικές συνθήκες, με σκοπό να διερευνηθεί εάν διαφέρει η επιβίωση του παθογόνου ανάλογα με την εργαστηριακή τεχνική που εφαρμόζεται.

Επιπλέον, στόχος της μελέτης ήταν η εκτίμηση του υποθανάτιου τραυματισμού των κυττάρων του παθογόνου μετά την επίδραση όξινης καταπόνησης, καθώς τα τραυματισμένα κύτταρα μπορεί να χάνουν την καλλιεργησιμότητά τους, αλλά να παραμένουν μεταβολικώς ενεργά και να διατηρούν την παθογόνο δράση τους. Η εκτίμηση του μεγέθους του κλάσματος των τραυματισμένων κυττάρων του μικροβιακού πληθυσμού έγινε με επίστρωση των κυττάρων μετά την καταπόνηση σε γενικό θρεπτικό υλικό Tryptic Soy Agar περιεκτικότητας 0,6% σε Yeast Extract (TSA-YE) και σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TSA-YE με 5% w/v NaCl. Η διαφορά του μεγέθους του πληθυσμού που καταγράφηκε στα 2 υποστρώματα αποτέλεσε μια εκτίμηση του υποθανάτιου τραυματισμού. Τέλος, ο υποθανάτιος τραυματισμός διερευνήθηκε και σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων μέσω διαφορικής χρώσης των ζωντανών και νεκρών κυττάρων με τις χρωστικές CFDA και PI, αντίστοιχα και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΟΛΙΟΥ

Για το σύνολο των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στατικής φάσης του στελέχους *L. monocytogenes* EGD-e (πηγή απομόνωσης ιστός κουνελιού), το οποίο φυλάσσεται στους -20 °C σε διάλυμα Tryptic Soy Broth (Thermo Scientific™ Oxoid™, CM0129B) περιεκτικότητας 0,6% σε Yeast Extract (Thermo Scientific™ Oxoid™, LP0021B & Neogen®, NCM0218A) (TSB-YE) και 20% v/v γλυκερόλης. Αρχικά, όγκος 100 μL της αρχικής καλλιέργειας που φυλάσσονταν στην κατάψυξη, μεταφέρθηκαν σε 10 mL θρεπτικού υλικού TSB-YE και επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες. Ακολούθησε μεταφορά 100 μL της καλλιέργειας σε νέο σωλήνα με 10 mL TSB-YE και επώαση στους 37 °C για 18 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε επιφανειακή επίστρωση της καλλιέργειας σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Tryptic Soy Agar (Thermo Scientific™ Oxoid™, CM0131B & Neogen®, NCM0020A) περιεκτικότητας 0,6% Yeast Extract (TSA-YE) με την τεχνική της γραμμικής εξάπλωσης (streaking). Τα τρυβλία επώαστηκαν για 48 ώρες στους 37 °C (έλεγχος καθαρότητας καλλιέργειας) και κατόπιν, συντηρήθηκαν στους 4 °C έως και 2-3 εβδομάδες.

Δύο ημέρες πριν την έναρξη κάθε πειράματος, ξεκινούσε η προετοιμασία του εμβολίου του παθογόνου. Συγκεκριμένα, μία αποικία από τα τρυβλία που συντηρούνταν στους 4 °C μεταφερόταν με μικροβιολογικό κρίκο σε 10 mL TSB-YE και ακολουθούσε επώαση στους 37 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια,



Εικόνα 6. Διαδικασία προετοιμασίας εμβολίου *Listeria monocytogenes* EGD-e

τα 10 mL της ανανεωμένης καλλιέργειας διαμοιράζονταν σε 4 κωνικές φιάλες (2,5 mL καλλιέργειας ανά φιάλη) που περιείχαν 150 mL TSB-YE η καθεμία και ακολουθούσε επώαση στους 37 °C για 18 ώρες, μέχρι τα κύτταρα να φτάσουν την στατική φάση. Ακολούθως, την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος, το περιεχόμενο κάθε κωνικής φιάλης μεταφερόταν σε ξεχωριστό περιέκτη, γινόταν έκπλυση κάθε φιάλης με 100 mL TSB-YE (τελικός όγκος 250 mL ανά περιέκτη) και ακολουθούσε φυγοκέντρηση των 4 περιεκτών (4000 rpm για 30 λεπτά στους 4 °C) (φυγόκεντρος Heraeus® Megafuge® 1.0R). Μετά από απόρριψη περίπου 220 mL του υπερκείμενου υγρού, τα κύτταρα επαναιωρούνταν στα 30-40 mL TSB-YE που απέμειναν και γινόταν έκπλυση κάθε περιέκτη με περίπου 10 mL TSB-YE. Με την παραπάνω διαδικασία, το ίζημα των κυττάρων κάθε περιέκτη επαναιωρούνταν σε 45-50 mL TSB-YE που μεταφέρονταν σε σωλήνα falcon και ακολουθούσε δεύτερη φυγοκέντρηση στα 4000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C (φυγόκεντρος Thermo Scientific™ SL 16R). Κατόπιν, το υπερκείμενο υγρό απορριπτόταν και γινόταν επαναιώρηση των κυττάρων σε διάλυμα Ringer ¼ strength (Neogen®, NCM0191K). Συγκεκριμένα, το ίζημα κάθε σωλήνα επαναιωρούταν σε 1,5 mL Ringer και ακολουθούσε έκπλυση με 1 mL Ringer για να περιοριστούν οι απώλειες βιομάζας. Ο τελικός όγκος του εμβολίου ήταν 10 mL. Τα κύτταρα καταμετρούνταν σε TSA-YE (37 °C για 48 h), ενώ η συγκέντρωση προσδιορίστηκε $10^9 - 10^{10}$ CFU/mL.

2.3 ΤΡΟΦΙΜΟ

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης (διαστάσεις: 4 cm x 2 cm) συσκευασμένα υπό κενό. Τα λουκάνικα προμηθεύονταν την προηγούμενη ημέρα του πειράματος από γνωστή αλυσίδα super-market στην Αθήνα και παρέμεναν στην αρχική τους συσκευασία στους 4 °C μέχρι την έναρξη του πειράματος.

2.4 ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ

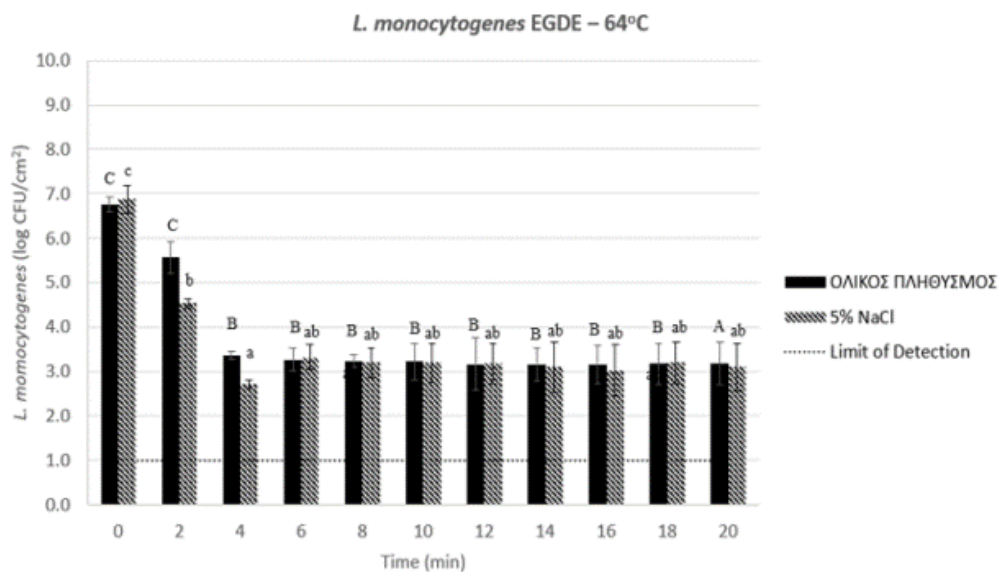
Την ημέρα του εμβολιασμού, τα λουκάνικα κόπηκαν στη μέση με επιμήκη τομή και στην συνέχεια εμβολιάστηκαν επιφανειακά με 40 μL του αρχικού εμβολίου ($10^9 - 10^{10}$ CFU/mL). Ο εμβολιασμός έγινε σημειακά και στη συνέχεια εξαπλώθηκε με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου σε ολόκληρη την εξωτερική επιφάνεια του τροφίμου (πλευρά που υπάρχει το έντερο, εμβαδόν: 15,7 cm²) προσομοιάζοντας επιφανειακή επιμόλυνση του εν λόγω τροφίμου από *L.monocytogenes*. Επομένως, η αρχική συγκέντρωση κυττάρων του παθογόνου ανά μονάδα επιφάνειας του τροφίμου υπολογίζεται σε 6,9 – 7,5 log CFU/cm². Μετά τον εμβολιασμό, έλαβε χώρα το στάδιο προσκόλλησης του εμβολίου (παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min).

2.5 ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΕ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΙΣ

2.5.1 ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ

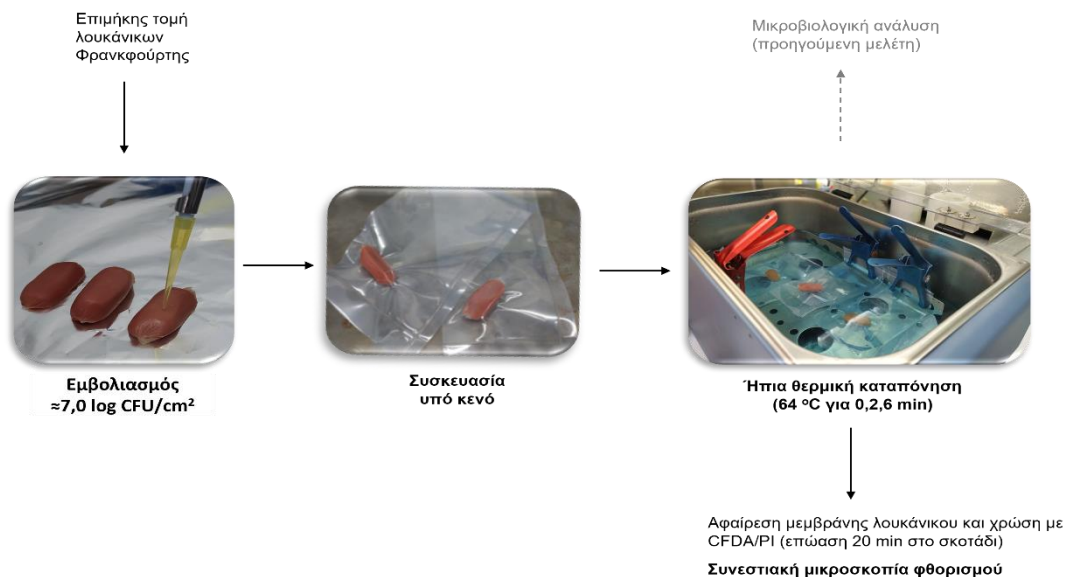
2.5.1.1 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΗΠΙΑΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο πειραματικός σχεδιασμός της δοκιμασίας ήπιας θερμικής καταπόνησης βασίστηκε σε προηγούμενη αντίστοιχη μελέτη, η οποία αναφέρει ότι στα πρώτα 4 min θερμικής καταπόνησης στους 64 °C παρατηρήθηκε μείωση του μικροβιακού πληθυσμού κατά 1,2 log CFU/cm², ενώ μετά από αυτό το χρονικό σημείο και για μέγιστο χρόνο έκθεσης τα 20 min, το επίπεδο του συνολικού πληθυσμού παρέμεινε σταθερό στους 3,0 log CFU/cm² (Εικόνα 7). Ως πιθανή εξήγηση του φαινομένου, οι συγγραφείς αναφέρουν την εισχώρηση των κυττάρων του παθογόνου σε βαθύτερα στρώματα και σχισμές της μεμβράνης του λουκάνικου και την εν δυνάμει προστασία τους από την επίδραση της θερμότητας. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η εγκυρότητα αυτού του ισχυρισμού μέσω παρατήρησης της χωρικής κατανομής του μικροβιακού πληθυσμού στην επιφάνεια της μεμβράνης του λουκάνικου με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Για το σκοπό αυτό, έγινε παρατήρηση δειγμάτων μετά από 2 min (μειούμενος πληθυσμός) και 6 min (σταθερό επίπεδο πληθυσμού) θερμικής καταπόνησης, ώστε να διαπιστωθεί εάν τα νεκρά κύτταρα εντοπίζονται στην επιφάνεια της μεμβράνης του λουκάνικου, ενώ τα ζώντα κύτταρα σε μεγαλύτερα εστιακά βάθη.



Εικόνα 7: Αποτύπωση του συνολικού (μαύρες μπάρες) και του ανθεκτικού υποπληθυσμού (γκρι μπάρες) της *Listeria monocytogenes* EGD-e σε λουκάνικα Φρανκφούρτης μετά από θέρμανση στους 64°C. Μετά από 2 min θερμικής επεξεργασίας ο πληθυσμός μειώνεται κατά 1,2 log CFU/cm², ενώ στα 6 min θερμικής καταπόνησης, ο πληθυσμός σταθεροποιείται στους 3,0 log CFU/cm² και παραμένει ανθεκτικός στην καταπόνηση. (Βλάχου Ε., Μεταπτυχιακή μελέτη, 2022)

Έτσι, μετά τον εμβολιασμό (§ 2.4), τα λουκάνικα συσκευάστηκαν μεμονωμένα σε σακούλες (διαστάσεις: 15 cm x 10 cm) υπό κενό (μηχάνημα κενού Lerica C312) και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία νερού 64 °C, προσομοιάζοντας τη θερμοκρασία που δύναται να λάβει χώρα κατά την αναθέρμανση του προϊόντος, σύμφωνα με τον USDA. Συγκεκριμένα, αναφέρεται πως σε τρόφιμα που περιέχουν χοιρινό κρέας, όπως τα λουκάνικα τ. Φρανκφούρτης, απαιτείται αναθέρμανση του προϊόντος για να υπάρξει η επιθυμητή μείωση ή εξάλειψη ενός παρασιτικού μικροοργανισμού, της τριχινέλλας, και το προϊόν να είναι ασφαλές για κατανάλωση. Θερμοκρασία αναθέρμανσης μεγαλύτερη από τους 62,2 °C μπορεί να προκαλέσει ακαριαία θανάτωση της τριχινέλλας (USDA-FSIS, 1994). Έτσι, επιλέχθηκαν οι 64 °C ως θερμοκρασία αναθέρμανσης που θα μπορούσε να καταστήσει ένα προϊόν κρέατος ασφαλές για κατανάλωση (Hinkens et al., 1996; Skandamis et al., 2008). Η θερμοκρασία του νερού και των λουκάνικων μετρήθηκε “on line” και καταγράφηκε με χρήση θερμοστοιχείων και ελεγκτή θερμοκρασίας (TC-08 Data Logger, Pico Technology Ltd). Για τη μέτρηση της επιφανειακής θερμοκρασίας των λουκάνικων χρησιμοποιήθηκε ένα μη εμβολιασμένο δείγμα, στο οποίο το άκρο του θερμοστοιχείου τοποθετήθηκε ακριβώς κάτω από τη μεμβράνη του λουκάνικου, ενώ ένα δεύτερο θερμοστοιχείο τοποθετήθηκε στο νερό. Αφού η επιφανειακή θερμοκρασία των λουκάνικων έφτανε τους 64 °C, θερμαίνονταν για 2 και 6 λεπτά υπό ανακίνηση. Αμέσως μετά την θερμική επεξεργασία, τα συσκευασμένα λουκάνικα τοποθετούνταν σε παγόλουτρο για 10 δευτερόλεπτα ώστε να διακοπεί η θερμική καταπόνηση.



Εικόνα 8. Δοκιμασία ήπιας θερμικής καταπόνησης λουκάνικων Φρανκφούρτης. Μετά από επιμήκη τομή, τα λουκάνικα εμβολιάζονταν επιφανειακά από την πλευρά της μεμβράνης με το στέλεχος *Listeria monocytogenes* EGD-e σε συγκέντρωση $\approx 7,0 \log \text{CFU/cm}^2$. Μετά την παραμονή για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (στάδιο προσκόλλησης), τα τεμάχια λουκάνικου συσκευάζονταν υπό κενό και ακολουθούσε εμβάπτισή τους σε υδατόλουτρο στους 64°C. Μετά από 2 και 6 λεπτά αναθέρμανσης, γινόταν αφαίρεση της μεμβράνης και χρώση με CFDA/PI και ακολουθούσε παρατήρηση των κυττάρων του παθογόνου σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

2.5.1.2 ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η επιβίωση ή η θανάτωση των κυττάρων μετά από τη θερμική τους επεξεργασία σχετίζεται με τη θέση και τη διεύθυνσή τους στη μεμβράνη που περιβάλλει τα λουκάνικα Φρανκφούρτης πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων πάνω στη μεμβράνη του λουκάνικου και παρατήρησή τους σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (Axio Observer.Z1/7, Zeiss). Το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού επιτρέπει την λήψη εικόνων τριών διαστάσεων υψηλής ευκρίνειας και αποτελεί πολύ σημαντικό εργαλείο για τη μικροσκοπική παρατήρηση παχύτερων βιολογικών δειγμάτων. Το φως ή ο φθορισμός που αντανακλάται από το δείγμα διέρχεται από έναν μικρό πόρο, με αποτέλεσμα να φιλτράρεται ο δευτερογενής φθορισμός και ο θόρυβος που προέρχεται από σημεία του δείγματος που βρίσκονται εκτός εστίασης. Έτσι, μπορούν να διακριθούν οι λεπτομέρειες της δομής του δείγματος που βρίσκεται στο εστιασμένο οπτικό πεδίο, χωρίς να αποκρύπτονται από το φθορισμό σε άλλα επίπεδα του δείγματος ή από το θόρυβο (Nwaneshiudu et al., 2012). Επίσης, με το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού μπορούν να ληφθούν ευκρινείς εικόνες σε διαφορετικά εστιακά βάθη του δείγματος. Αυτά τα δύο χαρακτηριστικά του συνεστιακού μικροσκοπίου επέτρεψαν τη διερεύνηση της τοπολογίας των κυττάρων της *L. monocytogenes* πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης των λουκάνικων τύπου Φρανκφούρτης.

Για τη μικροσκοπική παρατήρηση, η μεμβράνη αφαιρέθηκε με λαβίδα από το λουκάνικο μετά τη θερμική καταπόνηση και ένα τμήμα τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Στη συνέχεια, προστέθηκε σημειακά 4 μL διαλύματος που περιείχε 2 μL CFDA 500μM (ή 2,4 μL SYTO9 0,25mM) και 2μL PI 1,5mM σε 100 μL Ringer και απλώθηκε με μικροβιολογικό κρίκο σε όλη την επιφάνεια. Η χρωστική SYTO9 (LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability kit) διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη ζωντανών και νεκρών κυττάρων και προσδένεται στα νουκλεϊκά οξέα, εκπέμποντας πράσινο φθορισμό. Το μόριο διεγείρεται σε μήκος κύματος 485 nm για DNA ή 486 nm για RNA, εκπέμπει πράσινο φθορισμό στα 498 nm για DNA ή 501 nm για RNA και για την ανίχνευση του φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο EGFP του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού με εύρος διέγερσης στα 488 nm και εκπομπής στα 509 nm. Το ίδιο φίλτρο EGFP χρησιμοποιήθηκε και για τη χρωστική CFDA, που διεγείρεται και εκπέμπει πράσινο φθορισμό σε μήκος κύματος 492 nm και 517 nm, αντίστοιχα. Τέλος, για τη χρωστική PI, που διεγείρεται και εκπέμπει κόκκινο φθορισμό στα 535 nm και 617 nm, αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο AsRe2 του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού, με εύρος διέγερσης στα 586 nm και εκπομπής στα 600 nm. Η δράση των χρωστικών CFDA και PI αναφέρεται στην παράγραφο §2.5.2.5. Ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση, αφού το δείγμα παρέμεινε 20 λεπτά στο σκοτάδι για να λάβει χώρα η χρώση των κυττάρων.

2.5.2 ΟΞΙΝΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ

2.5.2.1 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΠΕΨΗΣ (ΟΞΙΝΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ)

Η μελέτη της προσομοίωσης της πέψης μπορεί να γίνει με χρήση διαφορετικών διαλυμάτων, σε στατικές ή δυναμικές συνθήκες. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται διαφορετικές συνταγές για την παρασκευή του γαστρικού υγρού (Simulated Gastric Fluid, SGF), ορισμένες από τις οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η παρασκευή του γαστρικού υγρού έγινε όπως αναφέρεται από τους Molly et al. (1994) και Naim et al. (2004) (Πίνακας 5). Πρόκειται για την πιο πλούσια συνταγή γαστρικού υγρού που αναφέρεται βιβλιογραφικά και περιέχει συστατικά που απαντώνται τόσο στο σιέλο (αντιμικροβιακές μυκίνες), όσο και στο στόμαχο (άλατα και το ένζυμο πεψίνη) και το λεπτό έντερο (φωσφορικά άλατα), παρέχοντας μια πιο ολοκληρωμένη προσομοίωση της πέψης και της διέλευσης της τροφής από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Μετά τη ζύγιση των συστατικών του SGF σε αναλυτικό ζυγό, γινόταν προσθήκη 1 L απιονισμένου νερού, 1 mL Tween 80 και μετά από καλή ανάδευση, ακολουθούσε αποστείρωση του υλικού (121 °C για 15 min). Σημειώνεται ότι η προσθήκη της πεψίνης γινόταν μετά την αποστείρωση του διαλύματος.

Πίνακας 3. Διαφορετικές συνταγές μελέτης προσομοίωσης πέψης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Σε ορισμένες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά διαλύματα για προσομοίωση του σιέλου (Simulated Salivary Fluid), των υγρών του στομάχου (Simulated Gastric Fluid) και των υγρών του εντέρου (Simulated Intestinal Fluid).

Song et al., 2022	Dong et al., 2021	Albadran et al., 2020
<i>Simulated Salivary Fluid</i>	<i>Simulated Gastric Fluid</i>	<i>Simulated Gastric Fluid</i>
1.594 g/L NaCl	9 g/L NaCl	0.2% w/v NaCl
0.202 g/L <u>KCl</u>	3 g/L Pepsin	3 g/L Pepsin
10 g/L Mucin (II)	<i>Simulated Intestinal Fluid</i>	<i>Simulated Intestinal Fluid</i>
0.638 g/L K ₃ PO ₄	9 g/L NaCl	0.05 mol/L KH ₂ PO ₄
0.328 g/L H ₄ N ₂ O ₃	3 mL/L Beef bile	0.125 g/L Pancreatic lipase
<i>Simulated Gastric Fluid</i>	Mazzantini et al., 2021	Bommasamudram et al., 2022
2 g/L CH ₄ N	0.03 mol/L NaCl	0.125 mol/L NaCl
3.2 g/L Pepsin	0.32% w/v Pepsin	0.007 mol/L <u>KCl</u>
<i>Simulated Intestinal Fluid</i>	Bai et al., 2019	0.045 mol/L NaHCO ₃
0.05 mol/L KH ₂ PO ₄	1% w/v Pepsin	3 g/L Pepsin
10 g/L Pancreatic enzyme		
Yang et al., 2014	Tsilia et al., 2016	
8.3 g/L Proteose peptone	1 g/L Arabinogalactan	
3.5 g/L D-glucose	2 g/L Pectin from apple	
2.05 g/L NaCl	1 g/L <u>Xylan</u>	
0.6 g/L KH ₂ PO ₄	3 g/L Starch	
0.11 g/L CaCl ₂	0.4 g/L D-glucose	
0.37 g/L <u>KCl</u>	3 g/L Yeast extract	
0.1 g/L Lysozyme	1 g/L Proteose peptone	
13.3 mg/L Pepsin	0.5 g/L L-cysteine	
	4 g/L Porcine mucin II	

Επίσης, η δράση του πλούσιου σε συστατικά SGF συγκρίθηκε τόσο με τη δράση ενός αραιωμένου διαλύματος SGF (1/3 strength), όσο και με ένα διάλυμα Ringer ¼ strength με HCl (Πίνακας 4). Το διάλυμα HCl σε Ringer είναι το απλούστερο διάλυμα προσομοίωσης πέψης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί μεμονωμένα η επίδραση του χαμηλού pH του στομάχου, σε αντίθεση με το SGF που προσομοιάζει καλύτερα την πολυπαραγοντική επίδραση των γαστρικών υγρών (όξινες συνθήκες, παρουσία στερεών συστατικών και αλάτων και δράση ενζύμων) στην επιβίωση του παθογόνου. Το αραιωμένο διάλυμα SGF χρησιμοποιήθηκε ως μεταβατικό στάδιο μεταξύ των δύο υλικών που αναφέρθηκαν, ώστε να διαπιστωθεί ποιος παράγοντας καθορίζει την ένταση της καταπόνησης και την ικανότητα επιβίωσης του παθογόνου, η υψηλή οξύτητα ή η επίδραση της παρουσίας ενζύμων και στερεών συστατικών. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την προσομοίωση της πέψης ρυθμίστηκαν σε δύο επίπεδα pH 1,5 και 2,5 με την προσθήκη 6 N HCl, προσομοιάζοντας τις όξινες συνθήκες του στομάχου.

Πίνακας 4. Συνδυασμός συνθηκών pH, γαστρικού υγρού προσομοίωσης πέψης και ρύθμισης pH που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

		SGF	SGF 1/3 strength	Δ/μα HCl σε Ringer
pH 1.5	Συνθήκες μη ρυθμιζόμενου pH	+		+
	Συνθήκες ρυθμιζόμενου pH	+	+	+
pH 2.5	Συνθήκες μη ρυθμιζόμενου pH	+		+
	Συνθήκες ρυθμιζόμενου pH	+	+	+

Τέλος, έγινε σύγκριση της δράσης των τριών παραπάνω διαλυμάτων σε συνθήκες σταθερού ή μη pH. Είναι γνωστό ότι μετά την κατανάλωση τροφής, το pH του στομάχου αυξάνεται και ανά τακτά χρονικά διαστήματα, γίνεται έκκριση γαστρικού οξέος, επαναφέροντας το pH του στομάχου σε χαμηλές τιμές. Επιπλέον, το pH του στομάχου μπορεί να κυμαίνεται από τιμές 1 έως και 5 μιας και δύναται να επηρεάζεται από συνθήκες, όπως η ηλικία, ο χρόνος από την κατανάλωση κάποιου γεύματος και το είδος του γεύματος (Koziolek et al., 2015). Έτσι, στη βιβλιογραφία, σε ορισμένες μελέτες προσομοίωσης πέψης δεν κρίνεται απαραίτητη η επαναφορά του pH στην αρχική τιμή με προσθήκη οξέος, καθώς υψηλότερες τιμές pH στομάχου δύνανται να λάβουν χώρα (Karpetanakou et al., 2017; Pienaar et al., 2020). Άλλες μελέτες στοχεύουν στην όσο το δυνατόν πιο ρεαλιστική προσομοίωση της πέψης και της έκκρισης γαστρικού οξέος και για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται αντλίες για την προσθήκη οξέος και τη διατήρηση του pH σε σταθερά επίπεδα (Koseki et al., 2011; Mulet-Cabero et al., 2020; Takeoka et al., 2022; Deng et al., 2022). Στην παρούσα μελέτη συγκρίθηκαν οι δύο μέθοδοι, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν διαφορές στην επιβίωση του παθογόνου ανάλογα με την εργαστηριακή τεχνική που εφαρμόζεται. Στα πειράματα που το pH διατηρήθηκε σταθερό, η επαναφορά του pH γινόταν χειροκίνητα και όχι με τη χρήση αντλίας, προς απλούστευση της πειραματικής διαδικασίας. Συγκεκριμένα, γινόταν μέτρηση του pH

σε τακτικά χρονικά διαστήματα και όποτε υπήρχε αύξηση του pH, γινόταν προσθήκη 1-2 σταγόνων διαλύματος HCl 3 N με πιπέτα Pasteur με στόχο την επαναφορά του pH στο αρχικό (pH 1,5 και 2,5).

Πίνακας 5. Σύσταση γαστρικού υγρού προσομοίωσης πέψης (SGF) που μελετήθηκε στην παρούσα μελέτη.

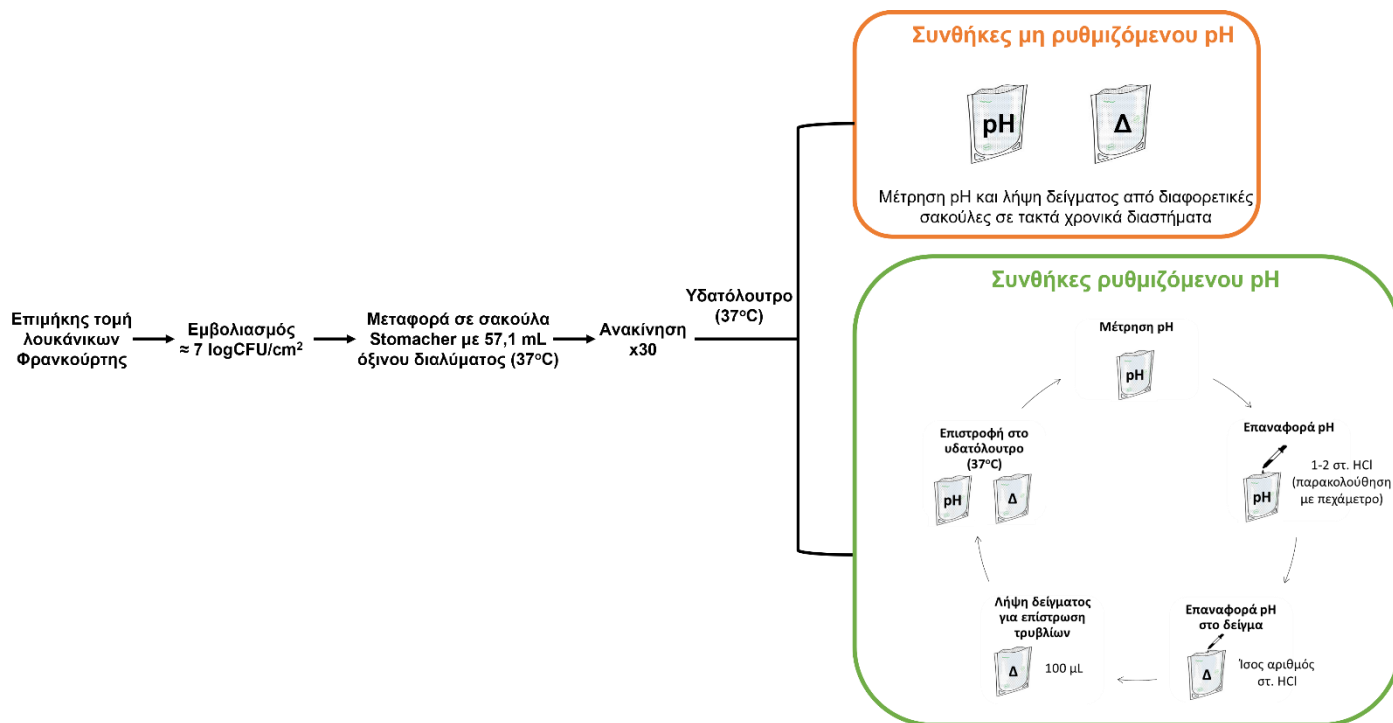
Συστατικά	SGF	SGF (1/3 strength)
	Ποσότητα (g L ⁻¹)	Ποσότητα (g L ⁻¹)
Yeast extract	3	1
Bacto peptone	1	0.333
Cysteine	0.5	0.167
Glucose	0.4	0.133
Porcine mucin	4	1.333
NaCl	0.08	0.027
NaHCO ₃	0.4	0.133
K ₂ HPO ₄	0.04	0.013
KH ₂ PO ₄	0.04	0.013
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.008	0.003
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.008	0.003
Xylan	1	0.333
Soluble starch	3	1
Pectin	2	0.667
Tween 80	1 mL L ⁻¹	0.333 mL L ⁻¹
Pepsine (from porcine stomach mucosa)	3	1

Για τη δοκιμασία προσομοίωσης πέψης, μετά τον εμβολιασμό (§ 2.4), κάθε φορά ένα τεμάχιο λουκάνικου (διαστάσεις: 4 cm x 1 cm, βάρος: περίπου 5,7 g) τοποθετήθηκε σε σακούλα Stomacher αφού προηγουμένως είχε προστεθεί προζυγισμένο (57 mL) και προθερμασμένο στους 37 °C, το μέσο της όξινης καταπόνησης (SGF ή αραιωμένο SGF ή διάλυμα Ringer με HCl), σε αναλογία 1:10 w/w και τοποθετούνταν στο υδατόλουτρο στους 37 °C. Η θερμοκρασία των 37 °C είναι κατά προσέγγιση η θερμοκρασία στην οποία εκτίθεται το παθογόνο κατά τη διέλευση από τον γαστρεντερικό σωλήνα στο ανθρώπινο σώμα. Μετά την προσθήκη του εκάστοτε όξινου διαλύματος, οι σακούλες ανακινήθηκαν 30 φορές ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από τα τεμάχια

λουκάνικου (USDA-FSIS, 1996). Σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, λήφθηκε δείγμα του υγρού (100 μL) από τη σακούλα για την καταμέτρηση του παθογόνου (§ 2.5.2.3). Για κάθε χρονικό σημείο χρησιμοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ πραγματοποιήθηκαν 1-3 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε συνθήκη.

2.5.2.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ pH

Η μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια της όξινης καταπόνησης καταγράφηκε με τη χρήση πεχαμέτρου (πεχάμετρο WTW pH 526) σε ξεχωριστή σακούλα Stomacher για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Για το λόγο αυτό, έγινε η παραδοχή ότι η μεταβολή του pH είναι παρόμοια στις διαφορετικές σακούλες και μετρώντας το pH σε ξεχωριστή σακούλα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι παρόμοια τιμή pH επικρατεί και στη σακούλα του δείγματος, αν και δεν πραγματοποιήθηκε η αντίστοιχη μέτρηση. Συγκεκριμένα, σε κάθε βιολογική επανάληψη του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν 2 επιπλέον σακούλες Stomacher με 57 mL υγρού μέσου όξινης καταπόνησης, προθερμασμένου στους 37 °C, και ένα τεμάχιο λουκάνικου (διαστάσεις: 4 cm x 1 cm, βάρος: περίπου 5,7 g), το οποίο δεν είχε εμβολιαστεί, ώστε να περιοριστεί η εξάπλωση του παθογόνου στον κοινόχρηστο εργαστηριακό εξοπλισμό. Στα πειράματα που δεν πραγματοποιήθηκε επαναφορά του pH στην αρχική τιμή, γίνονταν καταγραφή του pH κάθε 5 min στις δύο σακούλες (2 τεχνικές επαναλήψεις).



Εικόνα 9. Διαγραμματική απεικόνιση δοκιμασίας όξινης καταπόνησης.

Αντίθετα, στα πειράματα που το pH διατηρήθηκε σταθερό, για κάθε σακούλα δειγματοληψίας που περιείχε εμβολιασμένο λουκάνικο αντιστοιχήθηκε μία σακούλα για τη μέτρηση του pH, που περιείχε μη εμβολιασμένο τρόφιμο. Έτσι, κάθε 5 min γινόταν μέτρηση του pH στην ειδική σακούλα και αν το pH είχε αυξηθεί, γινόταν προσθήκη 1-2 σταγόνων HCl 3 N με πιπέτα *pasteur*, μέχρι να γίνει επαναφορά του περίπου στην αρχική τιμή. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη του ίδιου αριθμού σταγόνων HCl 3N στη σακούλα δειγματοληψίας, ώστε να επιτευχθεί επαναφορά του pH στην αρχική, χαμηλή τιμή και στο δείγμα με το εμβολιασμένο λουκάνικο. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τη δεύτερη τεχνική επανάληψη. Το pH θεωρήθηκε σταθερό για μεταβολές εντός του εύρους τιμών $1,5 \pm 0,2$ και $2,5 \pm 0,2$.

2.5.2.3 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.5.2.1, σε καθορισμένα χρονικά σημεία, έγινε λήψη δείγματος 100 μL βακτηριακού εναιωρήματος σε γαστρικό υγρό από τις σακούλες που περιείχαν εμβολιασμένο λουκάνικο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για διαδοχικές αραιώσεις και επιφανειακή επίστρωση των κυττάρων του παθογόνου σε διαφορετικά θρεπτικά υλικά. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους του βακτηριακού πληθυσμού χρησιμοποιήθηκε το γενικό θρεπτικό υπόστρωμα TSA-YE. Μετά από την επίστρωση των τρυβλίων TSA-YE, ακολουθούσε επώαση στους 37 °C για 48 ώρες και καταμέτρηση των αποικιών. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του μικροβιακού πληθυσμού έγινε με βάση τον τύπο:

$$\log \text{CFU/cm}^2 = \log \frac{\text{CFU} \times 10^{(\text{Παράγοντας αραιώσης}+1)} \times V_{\text{ολικό}}}{\text{Εμβαδόν επιφάνειας τροφίμου}}$$

ή

$$\log \text{CFU/cm}^2 = \log \frac{\text{CFU} \times 10^{(\text{Παράγοντας αραιώσης}+1)} \times 57 \text{ mL}}{15,7 \text{ cm}^2}$$

Εξίσωση 1. Εξίσωση υπολογισμού της συγκέντρωσης του μικροβιακού πληθυσμού από την καταμέτρηση αποικιών σε τρυβλία.

Επιπλέον, διερευνήθηκε η παρουσία τραυματισμένων κυττάρων με επίστρωση τρυβλίων TSA-YE με περιεκτικότητα 5% σε NaCl, τα οποία επωάζονταν στους 37 °C για 5 ημέρες. Το επιλεκτικό υπόστρωμα TSA-YE + 5% NaCl επιτρέπει την ανάπτυξη μόνο των μη τραυματισμένων, δηλαδή των υγιών κυττάρων, ενώ η συγκέντρωση 5% NaCl είναι η μέγιστη μη ανασταλτική συγκέντρωση άλατος στην οποία δεν παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης για το συγκεκριμένο στέλεχος της *L. monocytogenes* (Siderakou et al., 2021). Η διαφορά του πληθυσμού που προκύπτει από την καταμέτρηση των TSA-YE τρυβλίων και των TSA-YE + 5% NaCl τρυβλίων (Εξίσωση 2) αποτελεί μια εκτίμηση του υποθανάτιου τραυματισμού, καθώς δίνει τον αριθμό των

τραυματισμένων κυττάρων, δηλαδή αυτών που αναπτύσσονται μόνο σε γενικό και όχι σε επιλεκτικό υπόστρωμα, αλλά διατηρούν την ικανότητα ανάκαμψης και παθογόνου δράσης σε μεταγενέστερο χρονικό διάστημα.

$$\log \text{CFU/cm}^2 (\text{τραυματισμένων κυττάρων}) = \log \text{CFU/cm}^2 (\text{TSA-YE}) - \log \text{CFU/cm}^2 (\text{TSA-YE} + 5\% \text{ NaCl})$$

Εξίσωση 2. Εξίσωση υπολογισμού του αριθμού των τραυματισμένων κυττάρων ως η διαφορά του αριθμού των αποικιών που καταγράφονται σε TSA-YE και TSA-YE + 5% NaCl θρεπτικό υπόστρωμα.

Τέλος, επιστρώθηκαν τρυβλία με τη μέθοδο του λεπτού στρώματος άγαρ (thin agar layer method) (Kang and Fung, 1999) για να επιβεβαιωθεί η ορθότητα της καταμέτρησης, καθώς οι αποικίες της *Listeria monocytogenes* σε TSA-YE συχνά διακρίνονται με δυσκολία από τις αποικίες που σχηματίζουν άλλοι μικροοργανισμοί. Συγκεκριμένα, επιστρώθηκαν τρυβλία TSA-YE και μετά από 2 ώρες επώασης στους 37 °C, προστέθηκε όγκος 8 mL επιλεκτικού χρωμογόνου θρεπτικού υλικού ALOA (Thermo Scientific™ Oxoid™, CM1084B) για το σχηματισμό δεύτερου στρώματος άγαρ και καταμετρήθηκαν οι χαρακτηριστικές αποικίες μετά από 48 ώρες στους 37 °C.

2.5.2.4 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΟΣΟΣΤΟΥ (%) ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

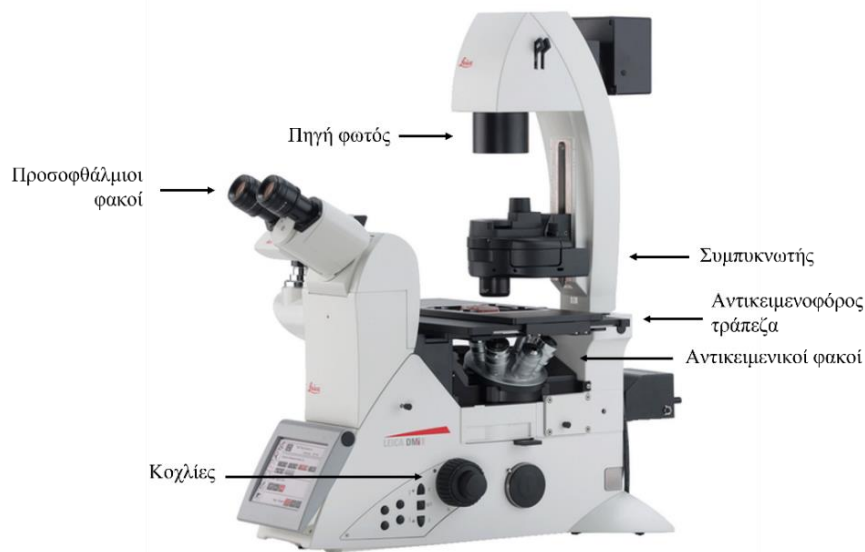
Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων επιβίωσης του παθογόνου που προέκυψαν με κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους και με τη μικροσκοπία φθορισμού, η συγκέντρωση κυττάρων που υπολογίστηκε σε $\log \text{CFU/cm}^2$ μετατράπηκε σε ποσοστό (%) ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Αφού έγινε απολογαρίθμηση όλων των συγκεντρώσεων, από το συνολικό πληθυσμό (10^7CFU/cm^2) αφαιρέθηκε ο αριθμός ζωντανών κυττάρων που καταγράφηκε σε κάθε χρονικό σημείο και προέκυψε ο αριθμός νεκρών κυττάρων (CFU/cm^2) για κάθε χρονική στιγμή. Τέλος, με εφαρμογή της εξίσωσης 3, έγινε μετατροπή της συγκέντρωσης των ζωντανών και νεκρών κυττάρων σε ποσοστά (%).

$$\% \text{ κυττάρων} = \frac{\left(\frac{\text{CFU}}{\text{cm}^2} \text{ ζωντανών ή νεκρών κυττάρων σε κάποια χρονική στιγμή}\right) \cdot 100}{10^7}$$

Εξίσωση 3. Σχέση μετατροπής της συγκέντρωσης (CFU/cm^2) νεκρών και ζωντανών κυττάρων σε ποσοστό % κυττάρων.

2.5.2.5 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Η διερεύνηση της θανάτωσης και του τραυματισμού μεμονωμένων κυττάρων της *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου φθορισμού (Leica DMi8). Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε με ελαιοκαταδυτικό φακό αντίθεσης φάσης 63x και λήφθηκαν φωτογραφίες για ανάλυση με χρήση του λογισμικού LAS X (Leica) και φωτογραφικής μηχανής DFC 7000T.



Εικόνα 10. Ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού Leica DMi8.

Η διαφορά ενός ανάστροφου μικροσκοπίου από ένα κοινό μικροσκόπιο εντοπίζεται στην θέση της πηγής φωτός και των αντικειμενικών φακών. Στο ανάστροφο μικροσκόπιο, η πηγή φωτός και ο συμπυκνωτής βρίσκονται πάνω από την αντικειμενοφόρο τράπεζα, ενώ οι αντικειμενικοί φακοί κάτω από αυτήν. Ο φακός που χρησιμοποιήθηκε είχε λειτουργία αντίθεσης φάσης. Η αρχή της μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης βασίζεται στη μειωμένη ταχύτητα διέλευσης μιας φωτεινής ακτίνας από υλικό που απορροφά μερικώς το φως, με αποτέλεσμα οι περιοχές αυτές να εμφανίζονται σκοτεινότερες παρά την απουσία χρώσης. Έτσι, τα κύτταρα εμφανίζονται με σκούρο γκρι χρώμα σε φωτεινό φόντο (Burch et al., 1942; Lovitt and Wright, 2014).

Για τη διάκριση των μεταβολικώς ενεργών και των νεκρών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν οι χρωστικές 5(6)-CFDA-SE (Sigma) και ιωδιούχο προπίδιο (PI) (LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability kit), αντίστοιχα. Το 5(6)-CFDA-SE είναι ένα μη φθορίζον μόριο που μπορεί να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες λόγω της υδρόφοβης φύσης του. Η δράση ενδοκυτταρικών εστερασών οδηγεί στην απομάκρυνση δύο ακετόξυ – ομάδων και τη δημιουργία φθορίζοντος μορίου CFSE με χαμηλότερη υδροφοβικότητα και άρα, μειωμένη ικανότητα διέλευσης από την κυτταρική μεμβράνη (Ren et al., 2019). Επομένως, τα φθορίζοντα κύτταρα είναι αυτά που διατηρούν τη λειτουργικότητα των εστερασών και είναι μεταβολικώς ενεργά, άρα και ζώντα. Το φθορίζον μόριο διεγείρεται και εκπέμπει πράσινο φθορισμό σε μήκος κύματος 492 nm και 517 nm, αντίστοιχα και για την ανίχνευση του φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο GFP του μικροσκοπίου φθορισμού με εύρος διέγερσης στα 450-490 nm και εκπομπής στα 500-550 nm. Αντίθετα, το PI είναι φθορίζον μόριο που μπορεί να διαπερνά μόνο τη διαρρηγμένη κυτταρική μεμβράνη και να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Η ακεραιότητα της

κυτταρικής μεμβράνης είναι ενδεικτική της φυσιολογικής κατάστασης του κυττάρου, καθώς τα ζώντα κύτταρα έχουν ως επί το πλείστον άθικτη την κυτταρική τους μεμβράνη, ενώ η διάρρηξή της και η παρουσία πόρων χαρακτηρίζουν τα νεκρά κύτταρα. Το PI εκπέμπει κόκκινο φθορισμό, με μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής 535 nm και 617 nm, αντίστοιχα. Για την ανίχνευση του κόκκινου φθορισμού, χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο Y3 του μικροσκοπίου φθορισμού με εύρος μήκους κύματος διέγερσης 532 – 558 nm και εκπομπής 570 – 640 nm.

Για την προετοιμασία των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων, μετά από τον προκαθορισμένο χρόνο έκθεσης, 50 mL διαλύματος από τη σακούλα δειγματοληψίας μεταφέρθηκαν σε σωλήνες falcon και φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 στροφές για 4 λεπτά. Ακολούθησε απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε μικρό όγκο του υπερκειμένου που δεν ήταν δυνατό να αφαιρεθεί. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση στα 12000 g για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 100 μ L Ringer. Ακολούθησε χρώση των κυττάρων με 2 μ L CFDA 500 μ M και 2 μ L PI 1,5mM. Μετά από επώαση για 20 λεπτά στο σκοτάδι, έγινε φυγοκέντρηση στα 12000 g για 2 λεπτά, επαναιώρηση των κυττάρων σε 20 μ L Ringer και μεταφορά 5 μ L σε αντικειμενοφόρο πλάκα για παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

2.5.2.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

Η ανάλυση των εικόνων μικροσκοπίας φθορισμού έγινε με χρήση του προγράμματος ImageJ (Schneider et al., 2012). Για κάθε χρονικό σημείο αναλύθηκαν 3-6 φωτογραφίες από διαφορετικά οπτικά πεδία. Αρχικά, έγινε περικοπή των εικόνων για να αφαιρεθούν στερεά συστατικά (υπολείμματα του τροφίμου) και ακαθαρσίες του παρασκευάσματος από την ανάλυση. Μετά από αφαίρεση του θορύβου στις φωτογραφίες των φίλτρων φθορισμού, καταμετρήθηκαν τα κύτταρα που έδωσαν πράσινο ή κόκκινο φθορισμό και ο αριθμός τους εκφράστηκε ως ποσοστό του συνολικού πληθυσμού κυττάρων, δηλαδή των ολικών κυττάρων που ανιχνεύτηκαν μέσω του φίλτρου αντίθεσης φάσης. Με τον τρόπο αυτό, έγινε εκτίμηση της ποσοστιαίας αναλογίας ζωντανών και νεκρών κυττάρων στον πληθυσμό μετά την επίδραση της όξινης καταπόνησης.

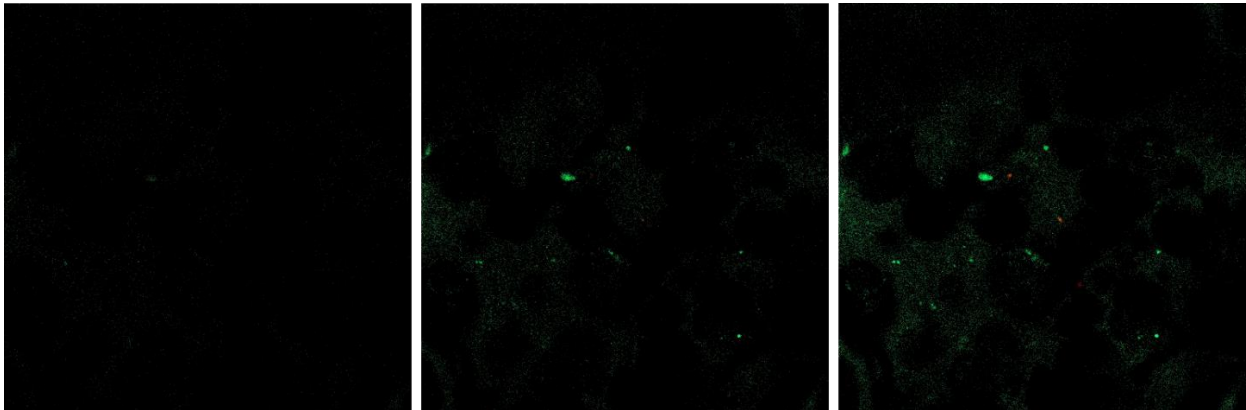
2.5.2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση των εργαλείων περιγραφικής στατιστικής του Microsoft Excel για υπολογισμό του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης της συγκέντρωσης του μικροβιακού πληθυσμού. Επιπλέον, διενεργήθηκε ανάλυση διακύμανσης ANOVA στο στατιστικό πακέτο IBM SPSS 26.0 για αξιολόγηση της επίδρασης του χρόνου έκθεσης σε όξινο διάλυμα καταπόνησης στον πληθυσμό του παθογόνου. Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Tukey για πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων βακτηριακής συγκέντρωσης σε κάθε χρονικό σημείο της καταπόνησης και ελέγχθηκε η στατιστική σημαντικότητα στο 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ

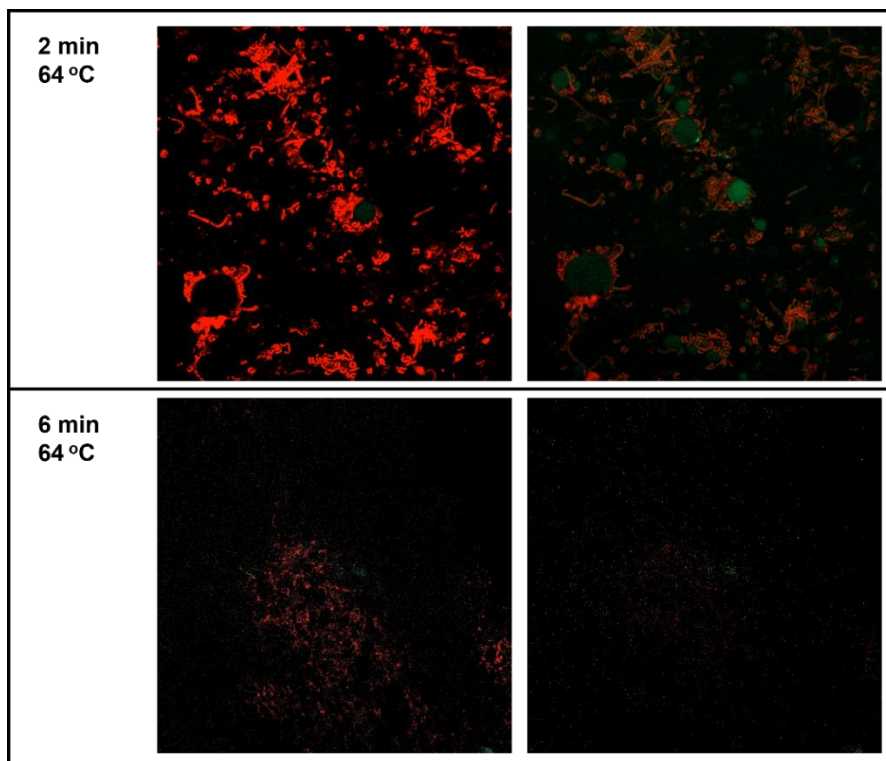
Η μελέτη της τοπολογίας και της κατανομής των κυττάρων της *L. monocytogenes* στην επιφάνεια της μεμβράνης λουκάνικων τ. Φρανκφούρτης πραγματοποιήθηκε με παρατήρηση της μεμβράνης σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Μετά από την αναθέρμανση εμβολιασμένων λουκάνικων Φρανκφούρτης στους 64 °C, αφαιρέθηκε η μεμβράνη από το τρόφιμο και ακολούθησε διαφορετική χρώση των κυττάρων επάνω σε αυτή. Κατά την παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, λήφθηκαν φωτογραφίες από διαφορετικά εστιακά βάθη προκειμένου να μελετηθεί η εισχώρηση των κυττάρων του παθογόνου σε βαθύτερα στρώματα της μεμβράνης του λουκάνικου και η φυσιολογική τους κατάσταση. Μετά από χρώση με SYTO9 και PI, παρατηρήθηκε αυξημένος φθορισμός πράσινου χρώματος μεταβαίνοντας σε μεγαλύτερο βάθος, σε σύγκριση με τα πιο επιφανειακά στρώματα της μεμβράνης του λουκάνικου (Εικόνα 11), υποδηλώνοντας την καλύτερη επιβίωση των κυττάρων του παθογόνου μετά από την εισχώρησή τους σε βαθύτερα στρώματα του τροφίμου.



Εικόνα 11. Απεικόνιση του πληθυσμού κυττάρων *Listeria monocytogenes* EGD-e επάνω στη μεμβράνη λουκάνικου τ. Φρανκφούρτης μετά από θερμική καταπόνηση στους 64°C σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Πραγματοποιήθηκε διαφορετική χρώση με SYTO9 (πράσινος φθορισμός) και PI (κόκκινος φθορισμός). Το εστιακό βάθος λήψης των φωτογραφιών αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά. Παρατηρείται αυξημένος αριθμός ζωντανών κυττάρων (πράσινο χρώμα) σε μεγαλύτερο βάθος της μεμβράνης του λουκάνικου (δεξιά εικόνα).

Ομοίως, παρατηρήθηκε εντονότερος πράσινος φθορισμός και μειωμένος κόκκινος φθορισμός σε βαθύτερα στρώματα της μεμβράνης του τροφίμου μετά από θερμική επεξεργασία για 2 και 6 λεπτά στους 64°C και χρώση με CFDA και PI (Εικόνα 12). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μειωμένη ένταση του πράσινου φθορισμού στα 6 λεπτά συγκριτικά με τα 2 λεπτά θερμικής καταπόνησης. Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με τα μικροβιολογικά δεδομένα (Εικόνα 7), όπου καταγράφηκε μείωση της συγκέντρωσης ζωντανών κυττάρων από 5 log CFU/cm² μετά από 2 λεπτά έκθεσης σε 3 log CFU/cm² μετά από 6 λεπτά αναθέρμανσης. Τέλος, σε αρκετά οπτικά πεδία, φάνηκε ότι τα πράσινα φθορίζοντα κύτταρα συσσωρεύονται σε συγκεκριμένες περιοχές της μεμβράνης, που πιθανώς

σχετίζονται με τη μικροδομή της (σχισμές και εγκοιλώσεις) ή με τη σύσταση του τροφίμου και την παρουσία υγρασίας που είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων, καθώς, όπως είναι γνωστό, τα μικροβιακά κύτταρα κατανέμονται και αναπτύσσονται στην υδατική φάση των τροφίμων.



Εικόνα 12. Απεικόνιση του πληθυσμού κυττάρων *Listeria monocytogenes* EGD-e επάνω στη μεμβράνη λουκάνικου τ. Φρανκφούρτης με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού μετά από θερμική καταπόνηση στους 64°C για 2 και 6 λεπτά. Πραγματοποιήθηκε διαφορική χρώση με CFDA (πράσινος φθορισμός) και PI (κόκκινος φθορισμός). Το εστιακό βάθος λήψης των φωτογραφιών αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά. Παρατηρείται αυξημένος αριθμός ζωντανών κυττάρων (CFDA+) σε μεγαλύτερο βάθος της μεμβράνης του λουκάνικου (δεξιά στήλη), ενώ ταυτόχρονα η ένταση του κόκκινου φθορισμού μειώνεται. Η ένταση του πράσινου φθορισμού είναι μικρότερη στα 6 λεπτά καταπόνησης, υποδηλώνοντας μεγαλύτερη μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.

3.2 ΟΞΙΝΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ

3.2.1 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ pH

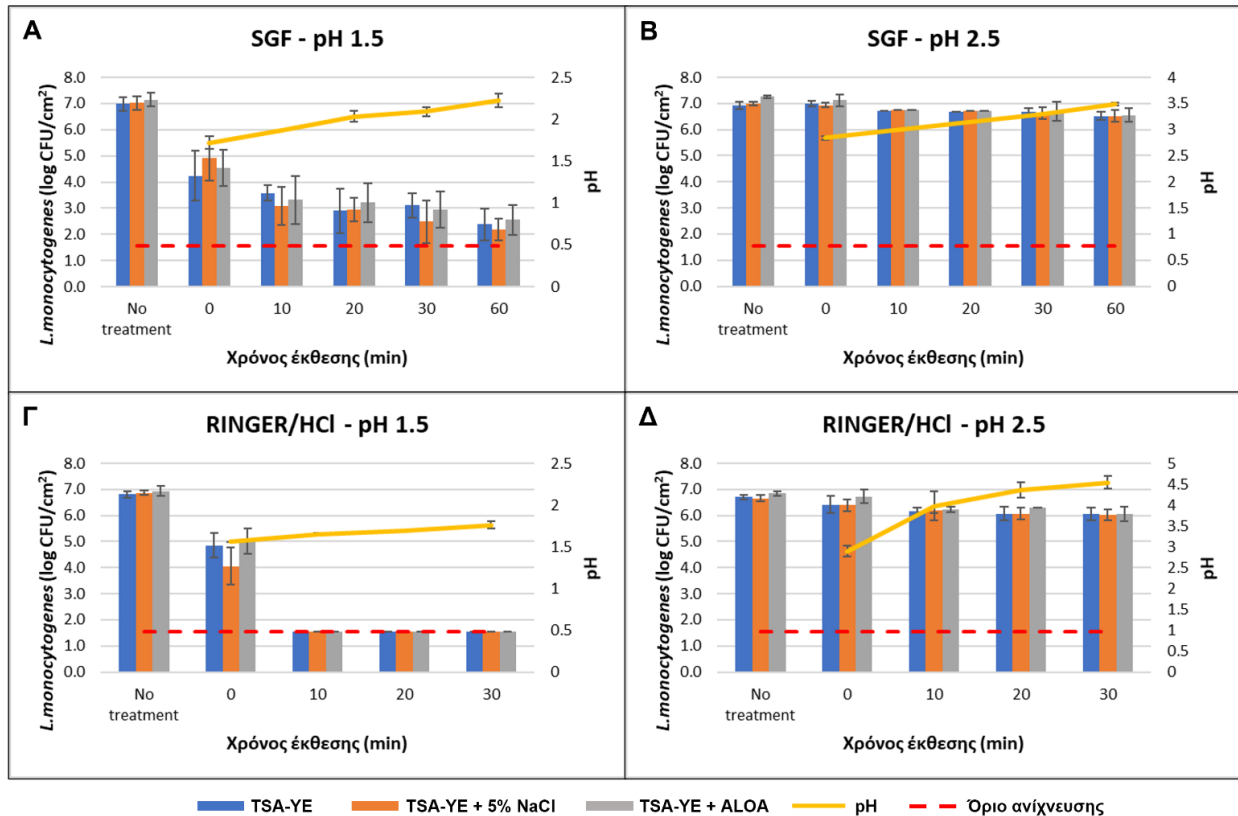
Η επίδραση των διαλυμάτων προσομοίωσης πέψης στον πληθυσμό κυττάρων *L. monocytogenes* EGD-e που είχε εμβολιαστεί στην επιφάνεια λουκάνικων Φρανκφούρτης μελετήθηκε σε δύο επίπεδα pH 1,5 και 2,5. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στα δύο διαφορετικά διαλύματα προσομοίωσης πέψης (SGF και διάλυμα Ringer / HCl) στα δύο επίπεδα pH, χωρίς την επαναφορά του pH στις αρχικές συνθήκες.

Κατά την έκθεση στο διάλυμα SGF με pH 1.5, παρατηρήθηκε άμεση μείωση του ολικού πληθυσμού αμέσως μετά την έναρξη της καταπόνησης (χρονική στιγμή 0 min). Ο ολικός πληθυσμός, που προκύπτει από την καταμέτρηση των TSA-YE τρυβλίων, μειώθηκε κατά 2,8 log CFU/cm² τη μηδενική χρονική στιγμή, ενώ παρατηρήθηκε συνολική μείωση 4,6 log CFU/cm² μετά από 60 λεπτά έκθεσης (Εικόνα 13). Αντίστοιχη μείωση παρατηρήθηκε και στον ανθεκτικό υποπληθυσμό (TSA-YE + 5% NaCl τρυβλία). Η διαφορά στο επίπεδο του βακτηριακού πληθυσμού πριν και μετά την καταπόνηση αξιολογήθηκε ως στατιστικά σημαντική στο διάστημα εμπιστοσύνης 95% ($p < 0,05$). Η προσθήκη του λουκάνικου στο γαστρικό υγρό προσομοίωσης πέψης οδήγησε σε αύξηση του pH του διαλύματος από 1,5 σε $1,7 \pm 0,07$, ενώ στο τέλος της δοκιμασίας καταπόνησης, καταγράφηκε τιμή pH $2,2 \pm 0,08$. Τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψαν από την ανάλυση τριών ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων, με 2 τεχνικές επαναλήψεις η καθεμία για τη μέθοδο της επίστρωσης σε τρυβλία.

Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ολικού πληθυσμού κατά την έκθεση σε SGF με pH 2.5. Ο ολικός πληθυσμός καταγράφηκε μικρότερος κατά 0,4 log CFU/cm² κατά μέσο όρο μετά από 60 λεπτά έκθεσης, αλλά η μείωση δεν κρίθηκε στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$). Ίδια μείωση σημειώθηκε και για τον ανθεκτικό υποπληθυσμό. Εντούτοις, αυξημένη ήταν η μεταβολή του pH του διαλύματος λόγω προσθήκης του τροφίμου, καθώς αυξήθηκε κατά 0,3 μονάδες τη μηδενική χρονική στιγμή ($2,8 \pm 0,04$), ενώ μετά από 60 λεπτά ανέβηκε συνολικά κατά μία μονάδα ($3,5 \pm 0,02$). Για τη δοκιμασία αυτή αξιολογήθηκαν 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις με 2 τεχνικές επαναλήψεις η καθεμία.

Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά διαφορετικά όταν αξιολογήθηκε η επίδραση του διαλύματος Ringer / HCl στα δύο επίπεδα pH. Συγκεκριμένα, σε pH 1,5 ο ολικός πληθυσμός μειώθηκε κατά 1,9 log CFU/cm² τη μηδενική χρονική στιγμή, ενώ στα επόμενα χρονικά σημεία, δεν παρατηρήθηκε αύξηση στα τρυβλία, καθώς ο πληθυσμός μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ($1,6 \log \text{CFU/cm}^2$). Σε αντίθεση με τη μεταβολή pH που παρατηρήθηκε στο διάλυμα SGF με αρχικό pH 1,5, στο διάλυμα Ringer / HCl το pH παρέμεινε σχεδόν σταθερό, καθώς δεν καταγράφηκε ουσιαστική αύξηση μετά την προσθήκη του τροφίμου (pH 1,56) και συνολικά αυξήθηκε κατά 0,2 μονάδες μετά από 30 λεπτά έκθεσης. Αντίθετα, σε pH 2,5 παρατηρήθηκε μείωση του συνολικού πληθυσμού μόλις 0,6 log CFU/cm² μετά από 30 λεπτά έκθεσης ($p < 0,05$), ενώ καταγράφηκε μεγάλη μεταβολή του

pH κατά 2 μονάδες (pH 4,5 μετά από 30 min). Το επίπεδο του ανθεκτικού πληθυσμού και στις δύο δοκιμασίες μεταβλήθηκε παρόμοια με αυτό του συνολικού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από 2 τεχνικές επαναλήψεις μίας βιολογικής επανάληψης για κάθε επίπεδο pH.



Εικόνα 13. Επίδραση διαφορετικών διαλυμάτων προσομοίωσης γαστρικού υγρού (SGF και Ringer / HCl) σε δύο επίπεδα pH (1,5 και 2,5) στην επιβίωση βακτηριακού πληθυσμού *Listeria monocytogenes* EGD-e στην επιφάνεια λουκάνικων Φρανκφούρτης. Τα διαγράμματα αναφέρονται στην περίπτωση μη ρύθμισης και επαναφοράς του pH στην αρχική τιμή. “No treatment”: δείγματα που έγινε προσθήκη Ringer για την προσδιορισμό της αρχικής συγκέντρωσης του πληθυσμού. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου υπολογίζεται στους 1,6 log CFU/cm². **(Α)** Όξινη καταπόνηση σε SGF με αρχικό pH 1,5 για 60 λεπτά. **(Β)** Όξινη καταπόνηση σε SGF με αρχικό pH 2,5 για 60 λεπτά. **(Γ)** Όξινη καταπόνηση σε διάλυμα Ringer / HCl με αρχικό pH 1,5 για 30 λεπτά. **(Δ)** Όξινη καταπόνηση σε διάλυμα Ringer / HCl με αρχικό pH 2,5 για 30 λεπτά.

3.2.2 ΣΤΑΤΙΚΕΣ VS ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ pH

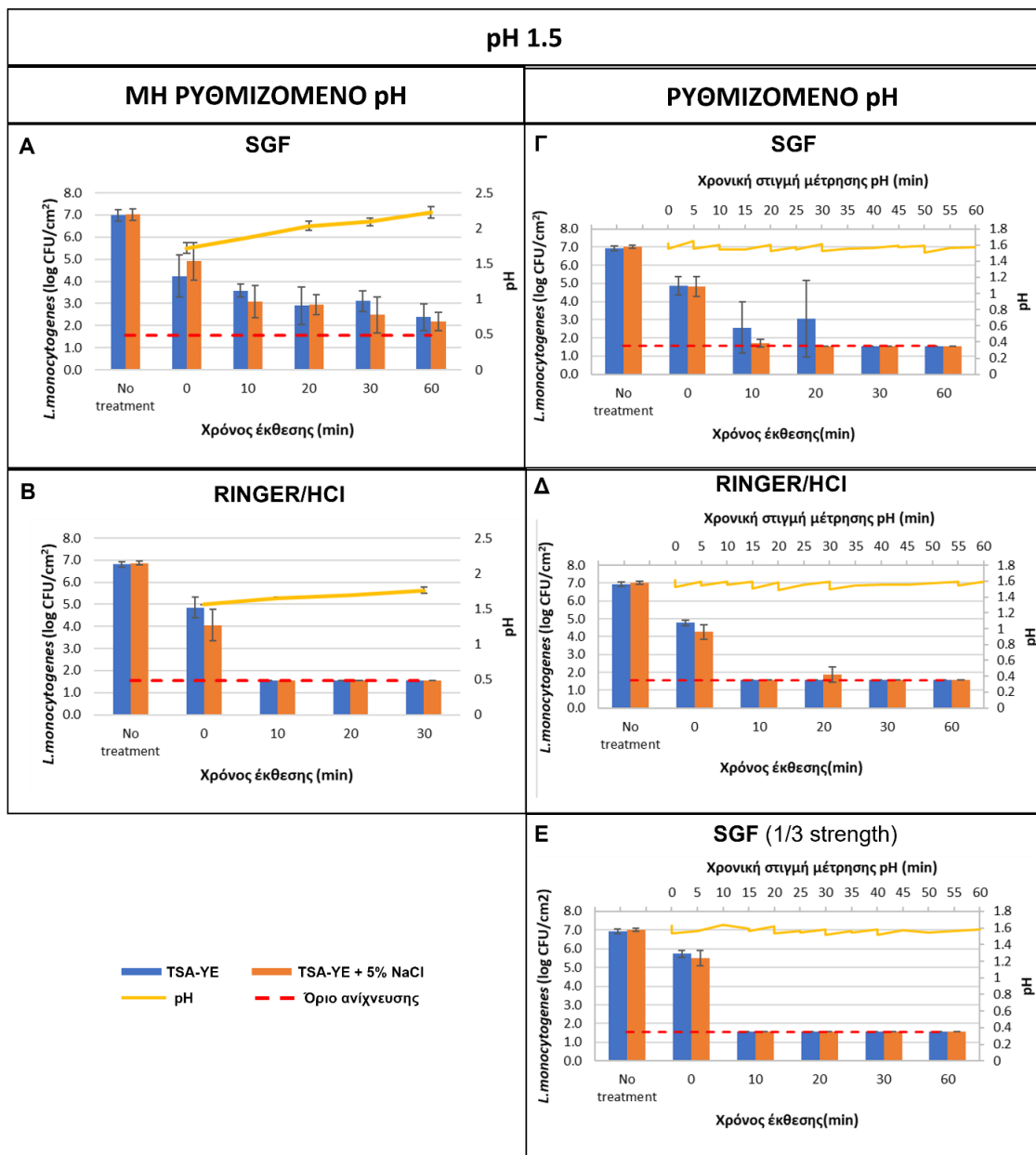
Η διαφορετική απόκριση του βακτηριακού πληθυσμού στην έκθεση σε διαφορετικά διαλύματα προσομοίωσης πέψης, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο §3.2.1, εγείρει ερωτήματα που απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση. Οι παρατηρούμενες διαφορές θα μπορούσαν να οφείλονται στη διαφορετική σύσταση των διαλυμάτων. Το διάλυμα SGF περιείχε μεγάλη ποσότητα αδιάλυτων στερεών συστατικών που θα μπορούσαν να επηρεάζουν την ομοιόμορφη κατανομή του διαλύματος υδροχλωρίου που χρησιμοποιήθηκε για τη ρύθμιση του pH ή να δρουν προστατευτικά για τα κύτταρα του παθογόνου, λόγω εγκλεισμού τους στο ίζημα του διαλύματος,

με αποτέλεσμα την έκθεσή τους στο όξινο διάλυμα σε μικρότερο βαθμό. Επιπλέον, οι παρατηρούμενες διαφορές στη μεταβολή του pH στα δύο διαλύματα για τα δύο επίπεδα pH μπορεί να ευθύνονται για τη διαφορετική απόκριση των κυττάρων του πληθυσμού. Για να ελεγχθεί η συσχέτιση αυτών των παραγόντων (παρουσία στερεών συστατικών και μεταβολή pH) με την επιβίωση του μικροβιακού πληθυσμού, η δοκιμασία όξινης καταπόνησης πραγματοποιήθηκε σε 3 διαφορετικά διαλύματα σε συνθήκες ρυθμιζόμενου pH. Το αραιότερο διάλυμα SGF (1/3 strength) περιέχει λιγότερα αδιάλυτα στερεά συστατικά και αποτελεί ένα ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ των διαλυμάτων SGF και Ringer / HCl για τον έλεγχο της επίδρασης των στερεών συστατικών στην επιβίωση του παθογόνου. Τέλος, η ρύθμιση και η επαναφορά του pH στην αρχική τιμή εξαλείφει τον παράγοντα της μεταβλητότητας στην αύξηση του pH, οδηγώντας σε συμπεράσματα για τη σημασία αυτής της μεταβλητότητας στον καθορισμό της βιωσιμότητας των μικροβιακών κυττάρων.

Σε συνθήκες σταθερού pH 1,5, η όξινη καταπόνηση αποδείχθηκε ιδιαίτερα ισχυρή, καθώς οδήγησε σε μείωση του μικροβιακού πληθυσμού σε επίπεδο κάτω από το όριο ανίχνευσης (Εικόνα 14). Αναλυτικότερα, στο διάλυμα SGF, το επίπεδο του συνολικού πληθυσμού καταγράφηκε στους $4,9 \pm 0,5 \log \text{CFU/cm}^2$ και $3,0 \pm 2,1 \log \text{CFU/cm}^2$ τη μηδενική χρονική στιγμή και μετά από 20 λεπτά έκθεσης, αντίστοιχα. Για τα 10 και τα 20 λεπτά έκθεσης, καταγράφηκαν μεγάλες τυπικές αποκλίσεις μεταξύ των τεχνικών επαναλήψεων, οδηγώντας σε μη αξιόπιστο προσδιορισμό του μεγέθους του μικροβιακού πληθυσμού για αυτά τα χρονικά σημεία. Μετά από 30 λεπτά έκθεσης δεν ανιχνεύθηκαν ζώντα κύτταρα. Σε παρόμοια επίπεδα κυμάνθηκε και ο ανθεκτικός υποπληθυσμός, υποδεικνύοντας απουσία τραυματισμένων κυττάρων. Το pH διατηρήθηκε εντός του εύρους τιμών 1,51-1,65. Η επαναφορά του pH σε τιμές κοντά στην αρχική είχε σημαντική επίδραση στην ικανότητα επιβίωσης των κυττάρων του παθογόνου, καθώς σε SGF σε pH 1,5 που δεν ρυθμίστηκε κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, καταγράφηκε κατά μέσο όρο υψηλότερος πληθυσμός κυττάρων σε όλα τα χρονικά σημεία και δεν υπήρξε μείωση κάτω από το όριο ανίχνευσης μετά από 60 λεπτά έκθεσης.

Αντίθετα, στο αραιωμένο διάλυμα SGF (1/3 strength) και στο διάλυμα Ringer / HCl, το επίπεδο του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης από τα πρώτα 10 λεπτά έκθεσης. Στη μηδενική χρονική στιγμή καταγράφηκε μικρότερη μείωση στο αραιωμένο διάλυμα SGF (1/3 strength) (μείωση $1,2 \log \text{CFU/cm}^2$) από ότι στο διάλυμα Ringer / HCl (μείωση $2,2 \log \text{CFU/cm}^2$). Επιπλέον, το pH κυμάνθηκε μεταξύ 1,52-1,64 και 1,49-1,62 στη δοκιμασία του αραιωμένου διαλύματος SGF (1/3 strength) και του διαλύματος Ringer / HCl, αντίστοιχα. Τέλος, η απόκριση του παθογόνου σε συνθήκες σταθερού pH 1,5 στα διαλύματα SGF (1/3 strength) και Ringer / HCl ήταν παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε σε διάλυμα Ringer / HCl ίδιας οξύτητας χωρίς επαναφορά του pH.

Για τη δοκιμασία όξινης καταπόνησης σε σταθερό pH 1,5, για κάθε διάλυμα καταπόνησης πραγματοποιήθηκε μία βιολογική επανάληψη με δύο τεχνικές επαναλήψεις η καθεμία.

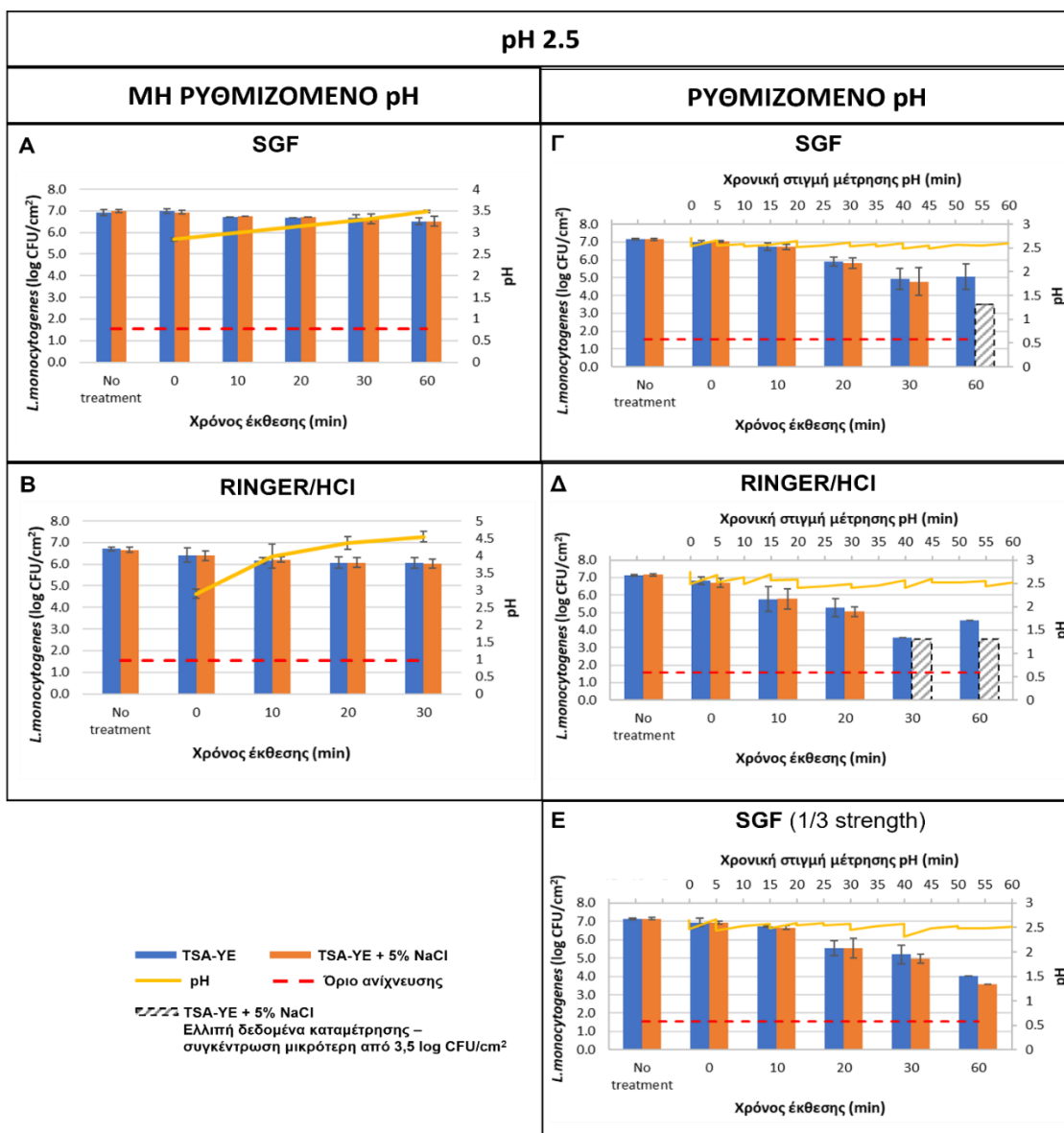


Εικόνα 14. Σύγκριση της επίδρασης διαφορετικών διαλυμάτων προσομοίωσης γαστρικού υγρού (SGF, αραιωμένο SGF 1/3 strength και Ringer / HCl) σε σταθερές και δυναμικές συνθήκες pH 1,5 στην επιβίωση βακτηριακού πληθυσμού *Listeria monocytogenes* EGD-e στην επιφάνεια λουκάνικων Φρανκφούρτης. Τα διαγράμματα της αριστερής στήλης (Μη ρυθμιζόμενο pH) αναφέρονται στην περίπτωση που δεν έγινε επαναφορά του pH, ενώ στη δεξιά στήλη (Ρυθμιζόμενο pH) σε συνθήκες ρύθμισης και επαναφοράς του pH στην αρχική τιμή. “No treatment”: δείγματα που έγινε προσθήκη Ringer για την προσδιορισμό της αρχικής συγκέντρωσης του πληθυσμού. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου υπολογίζεται στους 1,6 log CFU/cm². **(Α)** Όξινη καταπόνηση σε SGF με αρχικό pH 1,5 χωρίς ρύθμιση για 60 λεπτά. **(Β)** Όξινη καταπόνηση σε διάλυμα Ringer / HCl με αρχικό pH 1,5 χωρίς ρύθμιση για 30 λεπτά. **(Γ)** Όξινη καταπόνηση σε διάλυμα SGF σε σταθερό pH 1,5 για 60 λεπτά. **(Δ)** Όξινη καταπόνηση σε διάλυμα Ringer / HCl σε σταθερό pH 1,5 για 60 λεπτά. **(Ε)** Όξινη καταπόνηση σε αραιωμένο διάλυμα SGF (1/3 strength) σε σταθερό pH 1,5 για 60 λεπτά.

Η δοκιμασία όξινης καταπόνησης πραγματοποιήθηκε και για σταθερό pH 2,5 (Εικόνα 15). Σε αντίθεση με τις συνθήκες μη ρυθμιζόμενου pH, όπου ο πληθυσμός παρέμεινε σχεδόν σταθερός, η συνεχής επαναφορά του pH κοντά στην αρχική τιμή οδήγησε σε μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού και για τα τρία διαλύματα, η οποία κρίθηκε στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) μετά τα πρώτα 10 λεπτά έκθεσης (βλ. Παράρτημα). Αναλυτικότερα, για το διάλυμα SGF, καταγράφηκε στατιστικά σημαντική μείωση κατά $1,3 \log \text{CFU/cm}^2$ στα 20 λεπτά της δοκιμασίας, ενώ μετά από 60 λεπτά καταπόνησης, η συγκέντρωση του συνολικού πληθυσμού ήταν $5,1 \pm 0,7 \log \text{CFU/cm}^2$. Οι μετρήσεις των TSA-YE + 5% NaCl τρυβλίων έδωσαν παρόμοια επίπεδα του ανθεκτικού πληθυσμού με τον συνολικό πληθυσμό και δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο του υποθανάτιου τραυματισμού. Το pH διατηρήθηκε σταθερό εντός του εύρους τιμών 2,49 – 2,71.

Για το διάλυμα Ringer /HCl, ο ρυθμός μείωσης ήταν λίγο μεγαλύτερος. Ο πληθυσμός μειώθηκε κατά $1,4 \log \text{CFU/cm}^2$ μετά από 10 λεπτά έκθεσης, ενώ αντίστοιχη μείωση στο διάλυμα SGF παρατηρήθηκε μετά από 20 λεπτά έκθεσης. Συνολικά, καταγράφηκε μείωση της τάξης των $2,6 \log \text{CFU/cm}^2$ μετά από 60 λεπτά καταπόνησης. Και σε αυτή την περίπτωση, δεν παρατηρήθηκε υποθανάτιος τραυματισμός, καθώς δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των TSA-YE και των TSA-YE + 5% NaCl τρυβλίων. Το pH κυμάνθηκε εντός του εύρους 2,4 – 2,75.

Ο ρυθμός μείωσης του μικροβιακού πληθυσμού μετά από έκθεση σε αραιωμένο διάλυμα SGF (1/3 strength) ήταν ενδιάμεσος των δύο άλλων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Καταγράφηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα 20 λεπτά καταπόνησης, όταν ο πληθυσμός έφτασε τους $5,5 \pm 0,4 \log \text{CFU/cm}^2$, ενώ καταγράφηκε συνολική μείωση της τάξης των $3,1 \log \text{CFU/cm}^2$ μετά από 60 λεπτά. Για ακόμα μία φορά, δεν παρατηρήθηκε τραυματισμός των κυττάρων, ενώ το pH διατηρήθηκε εντός του εύρους 2,31 – 2,67. Τέλος, τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψαν από μία βιολογική επανάληψη με δύο τεχνικές επαναλήψεις για κάθε διάλυμα προσομοίωσης πέψης.

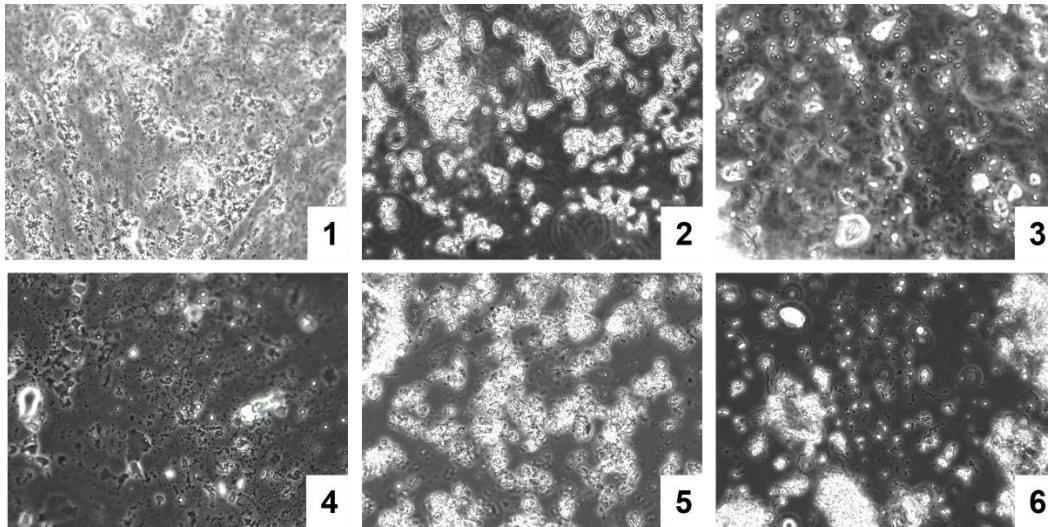


Εικόνα 15. Σύγκριση της επίδρασης διαφορετικών διαλυμάτων προσομοίωσης γαστρικού υγρού (SGF, αραιωμένο SGF 1/3 strength και Ringer / HCl) σε σταθερές και δυναμικές συνθήκες pH 2,5 στην επιβίωση βακτηριακού πληθυσμού *Listeria monocytogenes* EGD-e στην επιφάνεια λουκάνικων Φρανκφούρτης. Τα διαγράμματα της αριστερής στήλης (Μη ρυθμιζόμενο pH) αναφέρονται στην περίπτωση που δεν έγινε επαναφορά του pH, ενώ στη δεξιά στήλη (Ρυθμιζόμενο pH) σε συνθήκες ρύθμισης και επαναφοράς του pH στην αρχική τιμή. “No treatment”: δείγματα που έγινε προσθήκη Ringer για την προσδιορισμό της αρχικής συγκέντρωσης του πληθυσμού. Οι σκιαγραφημένες στήλες δεν αφορούν πραγματικές μετρήσεις, αλλά το εύρος (<3,5 log CFU/cm²) εντός του οποίου κυμαίνεται η πραγματική συγκέντρωση (ανεπαρκής αρραίωση του δείγματος για ακριβή καταμέτρηση). Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου υπολογίζεται στους 1,6 log CFU/cm². **(Α)** Όξινη καταπόνηση σε SGF με αρχικό pH 2,5 χωρίς ρύθμιση για 60 λεπτά. **(Β)** Όξινη καταπόνηση σε διάλυμα Ringer / HCl με αρχικό pH 2,5 χωρίς ρύθμιση για 30 λεπτά. **(Γ)** Όξινη καταπόνηση σε διάλυμα SGF σε σταθερό pH 2,5 για 60 λεπτά. **(Δ)** Όξινη καταπόνηση σε διάλυμα Ringer / HCl σε σταθερό pH 2,5 για 60 λεπτά. **(Ε)** Όξινη καταπόνηση σε αραιωμένο διάλυμα SGF (1/3 strength) σε σταθερό pH 2,5 για 60 λεπτά.

3.2.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΠΕΨΗΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

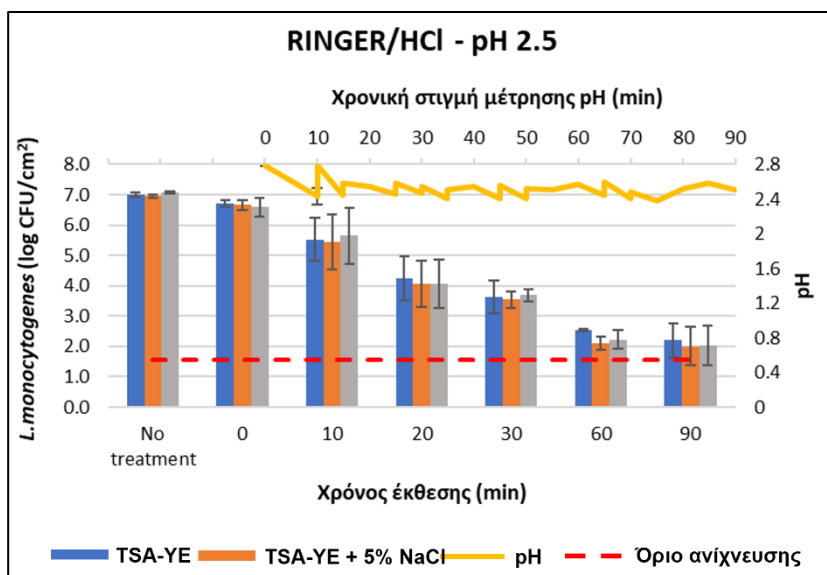
Από τη σύγκριση της απόκρισης του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε συνθήκες ρυθμιζόμενου ή μη ρυθμιζόμενου pH (§3.2.2), κατέστη σαφές ότι η αύξηση του pH, λόγω προσθήκης του τροφίμου στο διάλυμα όξινης καταπόνησης, οδηγεί σε αυξημένη επιβίωση των βακτηριακών κυττάρων. Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση διαλυμάτων συγκεκριμένης οξύτητας στην επιβίωση των κυττάρων, το pH πρέπει να παραμένει σταθερό ή να μεταβάλλεται εντός κάποιου εύρους που δεν αλλοιώνει τα πειραματικά αποτελέσματα. Σε αντίθετη περίπτωση, τα αποτελέσματα θα αφορούσαν την επίδραση διαλυμάτων μεταβαλλόμενης οξύτητας στην κυτταρική βιωσιμότητα και ενδεχομένως, η υψηλότερη επιβίωση θα αποδιδόταν σε πιθανή ανθεκτικότητα τους και όχι στην σημαντική μείωση της οξύτητας. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη η επιβίωση και ο υποθανάτιος τραυματισμός των κυττάρων του παθογόνου κατά τη δοκιμασία προσομοίωσης πέψης μελετήθηκαν σε συνθήκες ρύθμισης και επαναφοράς του pH κοντά στην αρχική τιμή. Για pH 1,5, δεν ανιχνεύθηκαν ζωντανά κύτταρα μετά από τα πρώτα λεπτά της καταπόνησης, ενώ σε pH 2,5 η καταπόνηση ήταν ηπιότερη και παρατηρήθηκε επιβίωση των κυττάρων. Επομένως, για τη μελέτη της επίδρασης της δοκιμασίας προσομοίωσης πέψης σε επίπεδο πληθυσμού και μεμονωμένων κυττάρων επιλέχθηκε το επίπεδο pH 2,5 και η μέθοδος επαναφοράς του pH και διατήρησής του εντός ενός μικρού εύρους τιμών.

Οι προκαταρκτικές δοκιμές παρατήρησης των κυττάρων σε μικροσκόπιο φθορισμού σε γαστρικό υγρό SGF δεν απέδωσαν καρπούς, λόγω της παρουσίας μεγάλης ποσότητας ιζήματος και στερεών συστατικών στο αρχικό διάλυμα (Εικόνα 16). Παρά τις δοκιμές με εναλλακτικές, απλούστερες συνταγές παρασκευής γαστρικού υγρού προσομοίωσης πέψης, η μεγάλη ποσότητα στερεών συστατικών απέτρεπε την παρατήρηση των κυττάρων. Επομένως, η μικροσκοπική παρατήρηση κατέστη εφικτή μόνο για την περίπτωση έκθεσης των κυττάρων σε όξινο διάλυμα HCl σε Ringer. Μάλιστα, συγκρίνοντας τα επίπεδα του μικροβιακού πληθυσμού μετά από καταπόνηση σε σταθερό pH 2,5, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο ρυθμό μείωσης του πληθυσμού στα 3 διαφορετικά διαλύματα καταπόνησης (Εικόνα 15). Επομένως, η χρήση διαλύματος SGF υπό αυτές τις συνθήκες θα είχε το ίδιο αποτέλεσμα με τη χρήση διαλύματος Ringer / HCl και η επιλογή διαλύματος για τη συνέχιση των πειραμάτων μπορεί να γίνει με γνώμονα την ποιότητα των εικόνων κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση. Τελικά, η επίδραση της προσομοίωσης της πέψης σε επίπεδο πληθυσμού και μεμονωμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα Ringer / HCl σε σταθερό pH 2,5.



Εικόνα 16. Παρουσία ιζήματος και στερεών συστατικών σε διαφορετικές συνταγές διαλυμάτων προσομοίωσης πέψης κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση. **(1)** Συνταγή SGF που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη [Molly et al. (1994) και Naim et al. (2004)]. **(2)** Συνταγή SGF από Bai et al., 2019. **(3)** Συνταγή SGF Dong et al., 2021. **(4)** Συνταγή SGF από Albadran et al., 2020. **(5)** Συνταγή SGF από Song et al., 2022. **(6)** Συνταγή SGF από Yang et al., 2014.

Η προσομοίωση της πέψης σε διάλυμα HCl σε Ringer και σταθερό pH 2,5 είχε ως αποτέλεσμα την επιβίωση των κυττάρων του παθογόνου ακόμα και μετά από 90 λεπτά έκθεσης στην όξινη καταπόνηση (Εικόνα 17). Μετά από 20 λεπτά έκθεσης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της τάξης των $2,8 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ στον συνολικό πληθυσμό, ενώ στο τέλος της καταπόνησης (90 min) ο πληθυσμός απαριθμήθηκε στους $2,2 \pm 0,6 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ (συνολική μείωση $4,8 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$). Δεν υπάρχουν ενδείξεις για την παρουσία υποπληθυσμού τραυματισμένων κυττάρων, καθώς ο αριθμός αποικιών που καταμετρήθηκε στα τρυβλία του επιλεκτικού υποστρώματος TSA-YE +5% NaCl κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα με τον συνολικό πληθυσμό. Το pH κυμάνθηκε μεταξύ 2,38 – 2,79. Τέλος, τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψαν από δύο ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις με δύο τεχνικές επαναλήψεις η καθεμία.



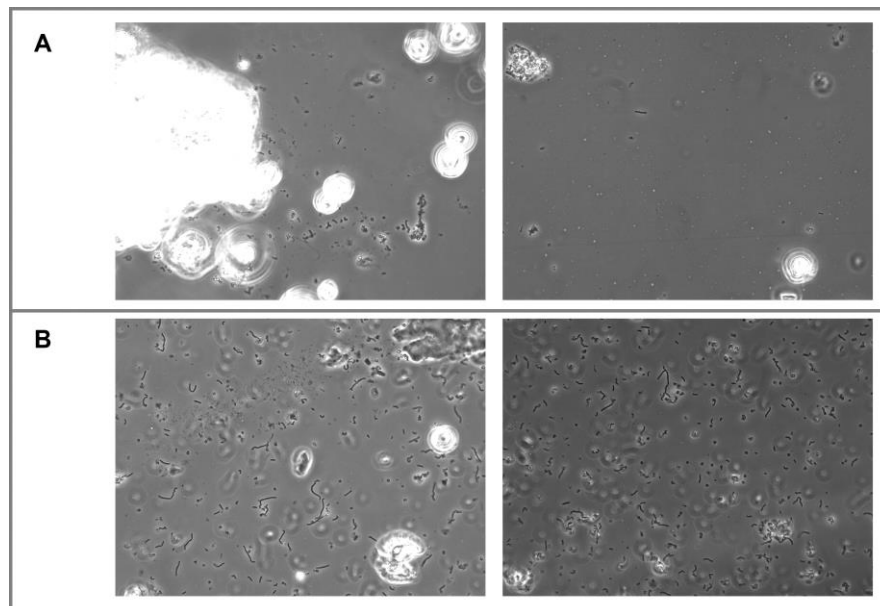
Εικόνα 17. Επίδραση της δοκιμασίας προσομοίωσης πέψης στον πληθυσμό κυττάρων *Listeria monocytogenes* EGD-e εμβολιασμένων στην επιφάνεια λουκάνικων Φρανκφούρτης. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα HCl σε Ringer ρυθμισμένο σε pH 2,5. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης, γινόταν επαναφορά του pH σε χαμηλότερες τιμές κοντά στην αρχική τιμή, ώστε το pH να διατηρηθεί εντός ενός στενού εύρους τιμών. “No treatment”: δείγματα που έγινε προσθήκη Ringer για την προσδιορισμό της αρχικής συγκέντρωσης του πληθυσμού. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου υπολογίζεται στους 1,6 log CFU/cm².

Πίνακας 6. Επίπεδο πληθυσμού κυττάρων *Listeria monocytogenes* EGD-e εμβολιασμένων στην επιφάνεια λουκάνικων Φρανκφούρτης μετά την έκθεση σε όξινο διάλυμα Ringer/HCl σε σταθερό pH 2,5. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης, γινόταν επαναφορά του pH σε χαμηλότερες τιμές κοντά στην αρχική τιμή, ώστε το pH να διατηρηθεί εντός ενός στενού εύρους τιμών. Παρουσιάζεται η συγκέντρωση κυττάρων όπως προσδιορίστηκε κατά την επίστρωση στα τρία θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις (TSA-YE, TSA-YE + 5% NaCl, TSA-YE + ALOA).

Ringer /HCl – Σταθερό pH 2,5			
Χρόνος έκθεσης (min)	TSA-YE (log CFU/cm ²)	TSA-YE + NaCl (log CFU/cm ²)	TSA-YE + ALOA (log CFU/cm ²)
No treatment	7,0 ± 0,1	7,0 ± 0,1	7,1 ± 0,04
0	6,7 ± 0,1	6,7 ± 0,2	6,6 ± 0,3
10	5,5 ± 0,7	5,4 ± 0,9	5,6 ± 0,9
20	4,3 ± 0,7	4,1 ± 0,8	4,1 ± 0,8
30	3,6 ± 0,6	3,5 ± 0,3	3,7 ± 0,2
60	2,5 ± 0,02	2,1 ± 0,2	2,2 ± 0,3
90	2,2 ± 0,6	2,0 ± 0,6	2,0 ± 0,7

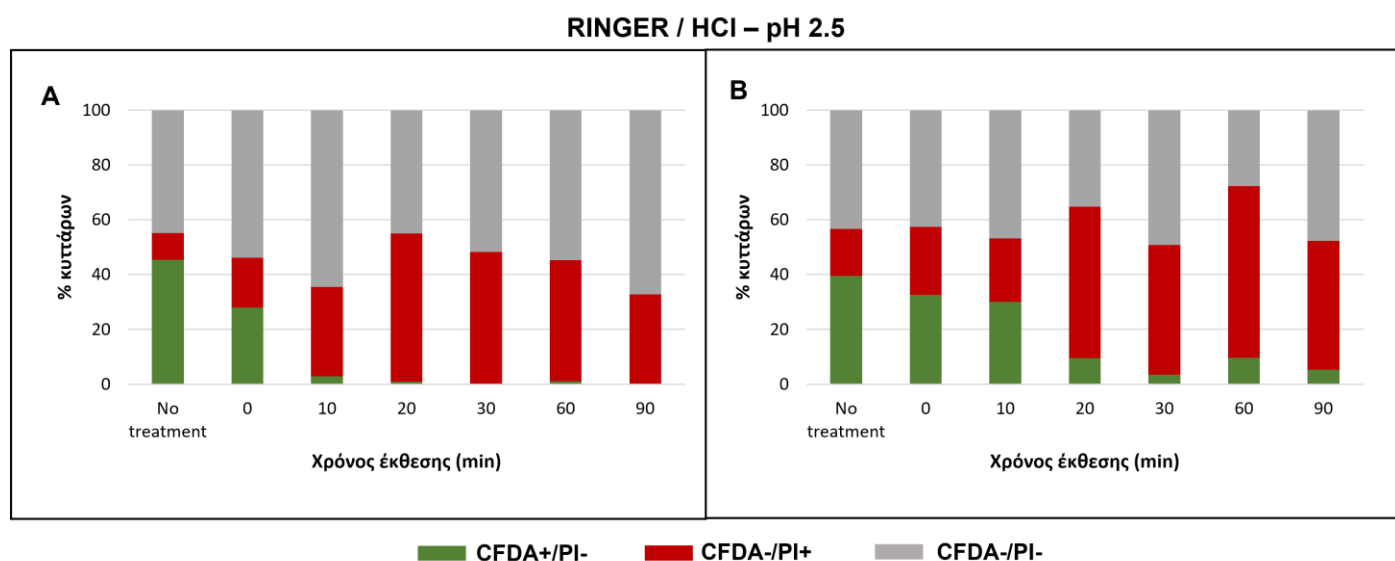
3.2.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΠΕΨΗΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για τη μελέτη της επίδρασης της δοκιμασίας της πέψης σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων *L.monocytogenes* EGD-e, πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Η προσομοίωση της πέψης έγινε σε διάλυμα HCl σε Ringer με pH 2,5 και κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, γινόταν ρύθμιση και επαναφορά του pH, όπως ακριβώς και για την περίπτωση της μικροβιολογικής ανάλυσης με επίστρωση τρυβλίων (παράγραφος §3.2.3). Οι πρώτες δοκιμές παρατήρησης στο μικροσκόπιο φθορισμού έδειξαν ότι σε ισχυρά όξινο pH τα κύτταρα της *L.monocytogenes* δημιουργούσαν συσσωματώματα που απέτρεπαν την παρατήρηση μεμονωμένων κυττάρων (Εικόνα 18). Η μικροσκοπική παρατήρηση ήταν εφικτή μόνο στα δείγματα του αρνητικού μάρτυρα, δηλαδή στην περίπτωση που τα κύτταρα δεν καταπονήθηκαν, αλλά συλλέχθηκαν σε διάλυμα Ringer χωρίς προσθήκη οξέος. Για τους λόγους αυτούς, για τη μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων μετά τη δοκιμασία της όξινης καταπόνησης, το όξινο διάλυμα εξουδετερώθηκε σε pH ίδιο με του αρνητικού μάρτυρα, που μετρήθηκε ίσο με 6,5. Τέλος, έγινε επίστρωση τρυβλίων TSA-YE, TSA-YE + 5% NaCl και TSA-YE + ALOA μετά την εξουδετέρωση του διαλύματος, για να ελεγχθεί εάν η αύξηση του pH σε ευνοϊκές για τη βακτηριακή ανάπτυξη συνθήκες οδήγησε σε υψηλότερη επιβίωση του πληθυσμού του παθογόνου (Παράρτημα, Εικόνα 1). Ο ρυθμός μείωσης ήταν παρόμοιος και για τις δύο περιπτώσεις (με ή χωρίς εξουδετέρωση) και επομένως, τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας φθορισμού μπορούν να συγκριθούν με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της προηγούμενης παραγράφου.



Εικόνα 18. Φωτογραφίες από τη μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων *L. monocytogenes* EGD-e μετά από όξινη καταπόνηση σε διάλυμα HCl σε Ringer σε pH 2,5. **(A)** Σύσσωμάτωση κυττάρων λόγω του χαμηλού pH του διαλύματος. Ο αριθμός των μεμονωμένων κυττάρων που μπορούν να παρατηρηθούν ανά οπτικό πεδίο είναι πολύ χαμηλός. **(B)** Απουσία σύσσωμάτωσης και υψηλός αριθμός βακτηριακών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο μετά από εξουδετέρωση του διαλύματος σε pH 6,5.

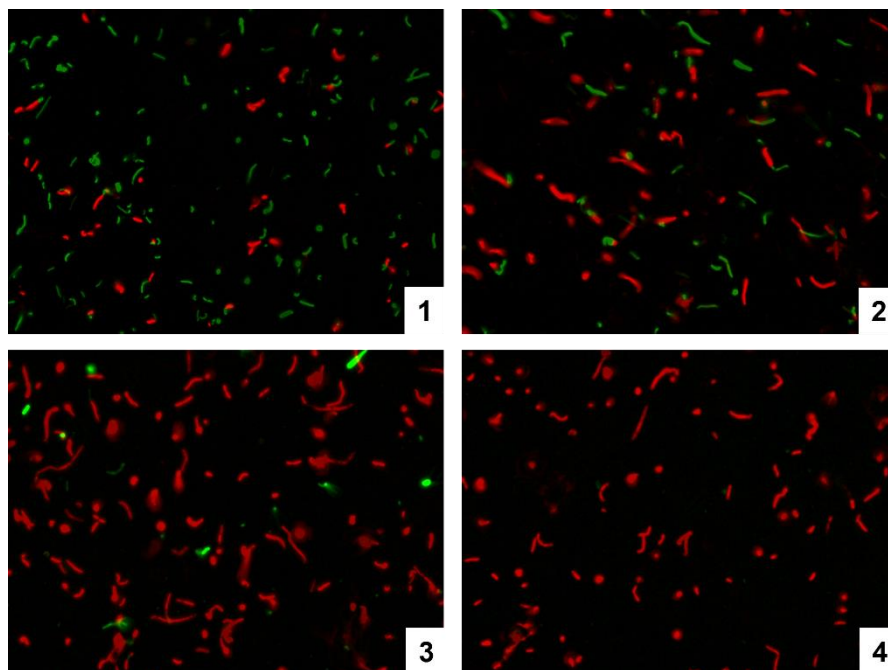
Τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας φθορισμού από δύο επαναλήψεις παρουσιάζονται στην Εικόνα 19. Με μια πρώτη ματιά, παρατηρούμε ότι ο αριθμός των μεταβολικά ενεργών κυττάρων (CFDA+/PI-) μειώνεται με την αύξηση του χρόνου έκθεσης, ενώ ο αριθμός των νεκρών κυττάρων αυξάνεται (CFDA-/PI+), όπως ήταν αναμενόμενο. Επιπρόσθετα, 45-65% των κυττάρων στην Α' επανάληψη και 30-50% των κυττάρων στη Β' επανάληψη παρέμειναν άβαφα και δεν εξέπεψαν φθορισμό (CFDA-/PI-). Παρά τις διαφορές μεταξύ των χρονικών σημείων, το ποσοστό των μη χρωσμένων κυττάρων θα μπορούσε να θεωρηθεί σταθερό για κάθε επανάληψη, καθώς οι παρατηρούμενες μεταβολές δεν δείχνουν κάποια συγκεκριμένη τάση (αύξηση ή μείωση με το χρόνο) και φαίνεται να οφείλονται στη φυσική μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων και οπτικών πεδίων παρατήρησης. Τέλος, το ίδιο ποσοστό άβαφων κυττάρων καταγράφηκε και στις δύο βιολογικές επαναλήψεις για το δείγμα ελέγχου (No treatment) (45% και 43% για την Α' και Β' επανάληψη, αντίστοιχα), υποδηλώνοντας ότι η παρουσία άβαφων κυττάρων οφείλεται σε κάποιο συστηματικό σφάλμα της μεθόδου.



Εικόνα 19. Επίδραση της δοκιμασίας προσομοίωσης πέψης σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* EGD-e εμβολιασμένων στην επιφάνεια λουκάνικων Φρανκφούρτης. Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η ποσοστιαία αναλογία μεταβολικά ενεργών (CFDA+/PI-), νεκρών (CFDA-/PI+) και μη χρωσμένων κυττάρων (CFDA-/PI-), όπως προέκυψαν από την ανάλυση φωτογραφιών μικροσκοπίας φθορισμού. **(Α)** Α' επανάληψη. **(Β)** Β' επανάληψη.

Αναλυτικότερα, στην Α' επανάληψη, το ποσοστό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων είναι χαμηλότερο από αυτό που παρατηρήθηκε κατά τη Β' επανάληψη για όλα τα χρονικά σημεία. Μάλιστα, στην πρώτη περίπτωση δεν ανιχνεύονται καθόλου ζωντανά κύτταρα μετά από 90 λεπτά έκθεσης, ενώ στη δεύτερη δοκιμή, 5% των κυττάρων έδωσαν πράσινο φθορισμό. Κατά την Α' δοκιμή, το ποσοστό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων μειώθηκε από το 45% στο 29% τη μηδενική χρονική στιγμή και στο 3% μετά από 10 λεπτά έκθεσης, ενώ στα

επόμενα χρονικά σημεία, μόλις το 1% των κυττάρων έδωσε πράσινο φθορισμό. Αντίστοιχα, το ποσοστό των CFDA-/PI+ κυττάρων αυξήθηκε από το 10% στο 18% τη μηδενική χρονική στιγμή και στο 33% μετά από 90 λεπτά καταπόνησης. Η ρυθμός θανάτωσης ήταν μικρότερος για τη Β' επανάληψη. Τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα αποτέλεσαν το 30% και το 5% του συνολικού πληθυσμού μετά από 10 και 90 λεπτά έκθεσης στο διάλυμα προσομοίωσης πέψης με pH 2,5, αντίστοιχα. Επιπλέον, μετά τα πρώτα 20 λεπτά καταπόνησης και μέχρι και τα 90 λεπτά, το 50% των κυττάρων, ή και παραπάνω, εμφάνισαν κόκκινο φθορισμό. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν διπλά χρωσμένα κύτταρα (CFDA+/PI+) σε καμία από τις δύο επαναλήψεις. Επομένως, η όξινη καταπόνηση σε pH 2,5 δεν οδήγησε στην εμφάνιση υποπληθυσμού υποθανάτια τραυματισμένων κυττάρων σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων.



Εικόνα 20. Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού, όπου διακρίνονται οι διαφορετικές χρώσεις των κυττάρων μετά την επίδραση όξινης καταπόνησης (pH 2,5). Με πράσινο φθορισμό εμφανίζονται τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα (CFDA+/PI-) και με κόκκινο φθορισμό τα νεκρά κύτταρα (CFDA-/PI+). **(1)** Μηδενική στιγμή όξινης καταπόνησης. **(2)** Μετά από 10 λεπτά καταπόνησης. **(3)** Μετά από 30 λεπτά καταπόνησης. **(4)** Μετά από 90 λεπτά καταπόνησης.

Για την ευκολότερη σύγκριση των αποτελεσμάτων της μικροσκοπίας φθορισμού και των κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων ανάλυσης, έγινε μετατροπή της συγκέντρωσης κυττάρων ανά μονάδα επιφανείας του τροφίμου ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$), όπως προέκυψε από την καταμέτρηση των τρυβλίων, σε ποσοστό ζωντανών και νεκρών κυττάρων στον πληθυσμό (Πίνακας 7). Όσον αφορά στον βιώσιμο μικροβιακό πληθυσμό, τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων φαίνεται να συμφωνούν για τα πρώτα λεπτά της όξινης καταπόνησης, καθώς τα συγκρινόμενα

ποσοστά, αν και διαφέρουν, είναι της ίδιας τάξης μεγέθους. Μετά τα 20 λεπτά καταπόνησης, η επιβίωση σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων και στις δύο βιολογικές επαναλήψεις προκύπτει μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρήθηκε με τη μέθοδο των τρυβλίων. Τελικά, μετά από 60 λεπτά καταπόνησης, τα ζώντα κύτταρα υπολογίζονται περισσότερα περίπου κατά 1.000 φορές μέσω της μικροσκοπίας φθορισμού, σε σύγκριση με την ανάπτυξη που καταγράφηκε στο γενικό θρεπτικό υπόστρωμα. Ταυτόχρονα, ο πληθυσμός των νεκρών κυττάρων στο μικροσκόπιο φθορισμού καταγράφηκε μικρότερος σε σχέση με τη μείωση που παρατηρήθηκε μετά από επίστρωση τρυβλίων. Με τη μέθοδο των τρυβλίων, παρατηρήθηκε θανάτωση σχεδόν ολόκληρου του πληθυσμού από τα πρώτα λεπτά καταπόνησης, ενώ η ανάλυση των φωτογραφιών του μικροσκοπίου υποδεικνύει θανάτωση μικρότερη από 50% των κυττάρων του πληθυσμού. Επομένως, η ανάλυση με κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους και επίστρωση τρυβλίων υποεκτιμά τη βιωσιμότητα των κυττάρων της *L. monocytogenes* μετά από τη δοκιμασία προσομοίωσης πέψης και πιθανώς, τον κίνδυνο πρόκλησης νόσου στον άνθρωπο.

Πίνακας 7. Σύγκριση των αποτελεσμάτων επιβίωσης της *Listeria monocytogenes* EGD-e σε λουκάνικα Φρανκφούρτης μετά τη δοκιμασία προσομοίωσης πέψης που λήφθηκαν με δύο διαφορετικές μεθόδους, τη μέθοδο της επίστρωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα και τη μικροσκοπία φθορισμού. Για τον υπολογισμό του ποσοστού των νεκρών κυττάρων για την περίπτωση της μικροσκοπίας φθορισμού, έγινε αφαίρεση του ποσοστού νεκρών κυττάρων που υπήρχαν στο δείγμα πριν από την έκθεση στο διάλυμα καταπόνησης (μάρτυρας). Σε παρένθεση καταγράφεται το ποσοστό που υπολογίστηκε από την ανάλυση διαφορετικών οπτικών πεδίων με μικροσκόπιο φθορισμού. Εκτός παρένθεσης καταγράφεται το ποσοστό νεκρών κυττάρων στον πληθυσμό μετά την όξινη καταπόνηση, μετά από αφαίρεση του μάρτυρα.

Χρόνος έκθεσης (min)	ΖΩΝΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (% κυττάρων)			ΝΕΚΡΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (% κυττάρων)		
	Μέθοδος τρυβλίων	Μικροσκοπία φθορισμού		Μέθοδος τρυβλίων	Μικροσκοπία φθορισμού	
		Α' επανάληψη	Β' επανάληψη		Α' επανάληψη	Β' επανάληψη
Χωρίς έκθεση	(100)	45.3	39.5	-	9.8	17.1
0	50.1	28.0	32.7	49.9	8.4 (18.2)	7.6 (24.7)
10	3.2	2.9	30.1	96.8	22.8 (32.6)	5.9 (23.0)
20	0.2	0.9	9.6	99.8	44.3 (54.1)	38.1 (55.2)
30	0.04	0.1	3.4	100.0	38.4 (48.1)	30.2 (47.3)
60	0.004	1.1	9.6	100.0	34.3 (44.1)	45.5 (62.7)
90	0.0016	0.0	5.3	100.0	23 (32.8)	29.8 (46.9)

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα (RTE) είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στην αγορά τροφίμων και προτιμώνται συχνά από τους σύγχρονους καταναλωτές λόγω της ευκολίας στη χρήση τους. Εντούτοις, αποτελούν προϊόντα υψηλού κινδύνου στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς θα πρέπει να διασφαλίζεται χαμηλή συγκέντρωση ή και απουσία παθογόνων μικροοργανισμών τη στιγμή της κατανάλωσής τους, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος πρόκλησης νόσου στους καταναλωτές. Τα λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης ανήκουν στην κατηγορία των RTE τροφίμων και κατέχουν υψηλή θέση στις προτιμήσεις των καταναλωτών. Επιπρόσθετα, δεν αποτελούν προϊόντα ζύμωσης, όπως άλλα αλλαντικά, και έχουν χαμηλό μικροβιακό φορτίο, λόγω της θερμικής τους επεξεργασίας πριν τη διάθεσή τους στην αγορά. Για όλους αυτούς τους λόγους, επιλέχθηκαν ως το τρόφιμο – μοντέλο για τη μελέτη της επιβίωσης του παθογόνου *L. monocytogenes* μετά από θερμική και όξινη καταπόνηση. Η *L. monocytogenes* βρίσκεται στο επίκεντρο των μελετών καθώς μπορεί να προκαλέσει σοβαρότατη νόσο στον άνθρωπο με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, καταγράφηκαν ποσοστά θνησιμότητας 12,7-17,7 % κατά τη δεκαετία 2011-2020 (Πίνακας 2). Λόγω της ικανότητας αύξησης σε συνθήκες συντήρησης, η *L. monocytogenes* θεωρείται από τα σημαντικότερα παθογόνα για τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντων. Μάλιστα, όπως αναφέρθηκε στα εισαγωγικά στοιχεία, τα λουκάνικα Φρανκφούρτης σημειώνονται ως προϊόν πολύ υψηλού κινδύνου από τον FDA και τον USDA για τη διάδοση του παθογόνου και την πρόκληση λιστερίωσης, ειδικά όταν καταναλώνονται χωρίς να προηγηθεί αναθέρμανσή τους.

Τα RTE τρόφιμα συνήθως επιμολύνονται από το παθογόνο σε στάδια μεταγενέστερα της παραγωγής τους, όπως το στάδιο του τεμαχισμού ή της συσκευασίας. Στην παρούσα εργασία, τα λουκάνικα Φρανκφούρτης εμβολιάστηκαν με $6,9 - 7,5 \log \text{CFU/cm}^2$ του παθογόνου, συγκέντρωση πολύ υψηλότερη από αυτή που θα μπορούσε να υπάρξει κατά την τυχαία επιμόλυνση του τροφίμου. Εντούτοις, η χρήση εμβολίου υψηλής αρχικής συγκέντρωσης ήταν απαραίτητη προκειμένου να διερευνηθεί το φαινόμενο του υποθανάτιου τραυματισμού, καθώς αφορά μόνο σε ένα κλάσμα του ολικού μικροβιακού πληθυσμού και σε χαμηλές πληθυσμιακές συγκεντρώσεις, ο ενδεχόμενος τραυματισμός λιγοστών κυττάρων δεν θα ήταν εύκολα ανιχνεύσιμος με τις κλασικές μεθόδους καλλιέργειας. Επιπρόσθετα, σε χαμηλότερη συγκέντρωση κυττάρων δε θα ήταν εφικτή η μικροσκοπική παρατήρηση και η αξιολόγηση της φυσιολογικής κατάστασης του παθογόνου σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της αναθέρμανσης εμβολιασμένων λουκάνικων Φρανκφούρτης στους 64°C στην χωρική κατανομή των κυττάρων του παθογόνου στην επιφάνεια του τροφίμου μέσω παρατήρησης της μεμβράνης του λουκάνικου σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Αφορμή για τη συγκεκριμένη δοκιμασία αποτέλεσαν τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης, όπου παρατηρήθηκε σταθερό επίπεδο πληθυσμού *L.*

monocytogenes μετά από 4 λεπτά αναθέρμανσης εμβολιασμένων λουκάνικων Φρανκφούρτης στους 64°C (Βλάχου Ε., Μεταπτυχιακή μελέτη, 2022). Μία πιθανή εξήγηση της ανθεκτικότητας των κυττάρων του παθογόνου ήταν η μετακίνηση τους σε βαθύτερα στρώματα της μεμβράνης του τροφίμου, με αποτέλεσμα την προστασία τους από την επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας. Οι Murthy et al. (2000) αναφέρουν αυξημένη επιβίωση του παθογόνου μετά από θερμική επεξεργασία σε περιβάλλον τροφίμου σε σύγκριση με υγρά μέσα καλλιέργειας, η οποία αποδίδεται στη σύσταση του τροφίμου. Στην παρούσα μελέτη, από την παρατήρηση των κυττάρων του παθογόνου επάνω στη μεμβράνη του λουκάνικου σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού προκύπτει ότι ο αριθμός ζωντανών κυττάρων αυξάνεται στα βαθύτερα στρώματα της μεμβράνης, ενώ τα κύτταρα που βρίσκονται στα επιφανειακά στρώματα είναι στην πλειοψηφία τους νεκρά. Συμπεραίνεται πως η ενσωμάτωση των κυττάρων στο τρόφιμο δρα προστατευτικά και μειώνει την αποτελεσματικότητα της θερμικής επεξεργασίας, καθώς δεν θανατώνεται ένα σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού του παθογόνου. Επιπρόσθετα, παρατηρείται συσσώρευση ζώντων βακτηριακών κυττάρων σε ορισμένες περιοχές της μεμβράνης, η οποία μπορεί να οφείλεται στην παρουσία μικροσκοπικών σχισμών και εγκολλώσεων ή στην κατανομή της υγρασίας επάνω στο τρόφιμο. Η κατανομή των βακτηριακών κυττάρων στα τρόφιμα περιγράφεται σε μελέτη των Wilson et al. (2002), οι οποίοι αναφέρουν την ικανότητα κίνησης και αύξησης των βακτηριακών κυττάρων στην υδατική φάση των τροφίμων και την ακινητοποίηση τους σε δομές στην επιφάνεια τους.

Το δεύτερο σκέλος της μελέτης αφορούσε στην επίδραση της δοκιμασίας προσομοίωσης πέψης στην επιβίωση του παθογόνου σε διαφορετικά διαλύματα όξινης καταπόνησης (SGF και Ringer/HCl) και σε δύο επίπεδα pH, 1,5 και 2,5, προσομοιάζοντας το φυσιολογικό pH του στομάχου. Για όλα τα διαλύματα καταπόνησης που εξετάστηκαν, τόσο σε στατικές όσο και σε δυναμικές συνθήκες, η έκθεση σε διάλυμα προσομοίωσης πέψης σε pH 1,5 επέφερε δραματική μείωση της βιωσιμότητας του παθογόνου, καθώς μετά από 60 λεπτά καταπόνησης ο πληθυσμός ήταν κοντά ή κάτω από το όριο ανίχνευσης. Μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις, ο πληθυσμός δεν ήταν ανιχνεύσιμος μετά από τα πρώτα 10 λεπτά έκθεσης στο όξινο διάλυμα. Αντίθετα, μεταβολή του pH κατά μία μονάδα (pH 2,5) οδήγησε είτε σε μείωση του πληθυσμού με μικρότερο ρυθμό, είτε σε μη στατιστικά σημαντική μεταβολή του πληθυσμού. Είναι γνωστό ότι το επίπεδο του pH του στομάχου διαφέρει από άνθρωπο σε άνθρωπο και αυξάνεται σε τιμές pH 2-4 κατά μέσο όρο μετά την πρόσληψη τροφής (Koziolek et al., 2015). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη διαφορετική *in vitro* απόκριση του παθογόνου σε pH 1,5 και 2,5, καθιστά σαφές ότι το παθογόνο μπορεί κατά περίπτωση να επιβιώνει ικανοποιητικά στις μεταβαλλόμενες συνθήκες του στομάχου. Έτσι, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή σε ό,τι αφορά την παρουσία του σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, καθώς ο ρυθμός θανάτωσής του εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που δεν είναι εύκολα προβλέψιμοι. Συνεπώς, η επιλογή του επιπέδου pH σε μία μελέτη προσομοίωσης πέψης είναι κρίσιμη για την

αξιολόγηση του κινδύνου, καθώς απόκλιση μόνο μιας μονάδας μεταβάλλει κατά πολύ την επιβίωση του μικροοργανισμού.

Εξίσου σημαντική είναι η επιλογή της πειραματικής διαδικασίας προσομοίωσης πέψης που ακολουθείται σε ότι αφορά τη μεταβολή του pH του διαλύματος καταπόνησης. Η προσθήκη του τροφίμου στο διάλυμα καταπόνησης έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της οξύτητας και της αποτελεσματικότητας του γαστρικού υγρού προσομοίωσης πέψης έναντι του παθογόνου. Από τη σύγκριση των δύο διαλυμάτων καταπόνησης σε δυναμικές συνθήκες προσομοίωσης πέψης (Εικόνα 13), προκύπτει ότι η μεταβολή του pH συναρτησει του χρόνου μετά την προσθήκη του τροφίμου είναι μεγαλύτερη για το διάλυμα Ringer/HCl από ότι για το SGF. Το διάλυμα SGF περιέχει ανθρακικά και φωσφορικά άλατα (0,4 g/L NaHCO₃, 0,04 g/L K₂HPO₄, 0,04 g/L KH₂PO₄) που όταν υδρολύονται σχηματίζουν αμφοτερικά ιόντα. Έτσι, το διάλυμα αποκτά ιδιότητες ρυθμιστικού διαλύματος και το pH του μεταβάλλεται δυσκολότερα. Αντιθέτως, το διάλυμα Ringer περιέχει ανθρακικά άλατα σε χαμηλότερη συγκέντρωση (0,05 g/L NaHCO₃) με αποτέλεσμα το pH του να είναι πιο ευμετάβλητο. Επιπρόσθετα, όταν το pH διατηρήθηκε σταθερό (στατικές συνθήκες) (Εικόνες 14, 15), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη βιωσιμότητα του μικροβιακού πληθυσμού μεταξύ των τριών διαφορετικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ καταγράφηκε υψηλότερος ρυθμός θανάτωσης σε σύγκριση με τις δυναμικές συνθήκες. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η αύξηση του pH ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την αυξημένη επιβίωση του παθογόνου και για τις παρατηρούμενες διαφορές στην απόκριση των κυττάρων στο όξινο στρες στα διαφορετικά διαλύματα καταπόνησης, όταν το pH δε διατηρείται σταθερό.

Επιπρόσθετα, η παρουσία αδιάλυτων στερεών συστατικών φαίνεται να επηρεάζει τη βιωσιμότητα του παθογόνου, αλλά σε μικρότερο βαθμό από τη μεταβολή του pH. Παρατηρώντας τα διαγράμματα όξινης καταπόνησης σε δυναμικές συνθήκες της Εικόνας 13 για το επίπεδο pH 2,5, φαίνεται ότι παρά την μεγαλύτερη αύξηση του pH συναρτησει του χρόνου στο διάλυμα Ringer/HCl συγκριτικά με το SGF, καταγράφηκε στατιστικά σημαντική μείωση του πληθυσμού μετά την όξινη καταπόνηση. Αντίθετα, η μεταβολή του μεγέθους του πληθυσμού δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$) για την περίπτωση έκθεσης σε SGF με pH 2,5 σε δυναμικές συνθήκες, αν και το διάλυμα παρέμεινε πιο όξινο από το Ringer/HCl σε όλα τα χρονικά σημεία (Παράρτημα-Πίνακας 1). Ακόμα, σε στατικές συνθήκες έκθεσης σε pH 2,5 (Εικόνα 15), αν και οι διαφορές είναι μικρές και θα μπορούσαν να οφείλονται στη μεταβλητότητα μεταξύ των δειγμάτων, φαίνεται ότι το αραιωμένο διάλυμα SGF (1/3 strength) επιδρά στο βακτηριακό πληθυσμό με τρόπο ενδιάμεσο μεταξύ του διαλύματος SGF και του Ringer/HCl. Η προστατευτική δράση του γαστρικού υγρού προσομοίωσης πέψης έναντι των κυττάρων της *L. monocytogenes* πιθανώς οφείλεται στην πλούσια σύσταση του διαλύματος σε θρεπτικά συστατικά και στην παρουσία αδιάλυτων στερεών συστατικών, που αυξάνουν το ιξώδες του. Ενδεχομένως, τα κύτταρα του

παθογόνου εγκλωβίζονται στα στερεά συσσωματώματα του διαλύματος και εκτίθενται σε μικρότερο βαθμό στις ισχυρά όξινες συνθήκες.

Η δοκιμασία όξινης καταπόνησης σε διάλυμα SGF σε δυναμικές συνθήκες προσομοίωσης πέψης, όπου το pH δε διατηρήθηκε σταθερό, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως το worst-case scenario για την επιβίωση του παθογόνου κατά την πέψη. Είναι γνωστό ότι μετά την κατανάλωση ενός γεύματος, αυξάνεται το pH του στομάχου και κατά περιπτώσεις, μπορεί να φτάσει μέχρι και την τιμή pH 5 (Koziolek et al., 2015). Έτσι, η αύξηση του pH και η παρουσία στερεών συστατικών στο διάλυμα προσομοιάζει τις συνθήκες που επικρατούν στο στόμαχο του ανθρώπου μετά από την κατανάλωση ενός μεγάλου γεύματος. Σε αυτές τις συνθήκες, παρατηρείται αυξημένη επιβίωση και μάλιστα για pH που κυμαίνεται μεταξύ 2,5 και 3,5 δεν καταγράφεται θανάτωση του παθογόνου. Η παρατήρηση αυτή είναι ιδιαίτερης σημασίας για την αξιολόγηση του κινδύνου και τον προσδιορισμό της πιθανότητας πρόκλησης λιστερίωσης από κατανάλωση επιμολυσμένων λουκάνικων Φρανκφούρτης που δεν έχουν υποστεί αναθέρμανση πριν καταναλωθούν.

Παρόλα αυτά, επιλέχθηκε ένα λιγότερο ακραίο σενάριο για τη μελέτη του υποθανάτιου τραυματισμού του παθογόνου, αυτό της διατήρησης του pH σε σταθερά επίπεδα, προσομοιάζοντας τη φυσική επαναφορά που λαμβάνει χώρα στο στόμαχο μέσω της έκκρισης γαστρικού οξέος. Λόγω της υψηλής θανάτωσης του πληθυσμού του παθογόνου σε γαστρικό διάλυμα με pH 1,5, επιλέχθηκε η τιμή pH 2,5 για την αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού. Επιπρόσθετα, σε στατικές συνθήκες pH 2,5, το όξινο διάλυμα SGF ασκεί καταπόνηση παρόμοιας έντασης με το διάλυμα Ringer/HCl, καθώς ο πληθυσμός του παθογόνου μειώνεται με παρόμοιο ρυθμό στα δύο διαλύματα (Εικόνα 15). Εξαιτίας προβλημάτων μικροσκοπικής παρατήρησης των κυττάρων σε διάλυμα SGF, λόγω της παρουσίας αδιάλυτων ιζημάτων, η προσομοίωση της διαδικασίας της πέψης έγινε σε διάλυμα HCl σε Ringer σε σταθερό pH 2,5 (Εικόνα 17). Σε αυτές τις συνθήκες, καταγράφηκε στατιστικά σημαντική μείωση του πληθυσμού του παθογόνου μετά από 20 λεπτά όξινης καταπόνησης, ενώ στο τέλος της δοκιμασίας (90 λεπτά) η μέση συγκέντρωση του πληθυσμού ήταν περίπου $2,0 \log \text{CFU/cm}^2$. Παρόμοιο επίπεδο πληθυσμού καταγράφηκε τόσο στα τρυβλία γενικού θρεπτικού υποστρώματος TSA-YE, όσο και στα τρυβλία επιλεκτικού υποστρώματος TSA-YE + 5% NaCl, υποδηλώνοντας την απουσία υποπληθυσμού τραυματισμένων κυττάρων. Υποθανάτιος τραυματισμός δεν παρατηρήθηκε ούτε σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων μέσω παρατήρησης σε μικροσκόπιο φθορισμού, καθώς δεν ανιχνεύτηκαν διπλά χρωσμένα κύτταρα (CFDA+/PI+).

Αν και δεν παρατηρήθηκε υποθανάτιος τραυματισμός, σημαντικά ήταν τα ευρήματα από την ανάλυση των εικόνων μικροσκοπίας φθορισμού. Στα πρώτα 10 λεπτά καταπόνησης, η τάξη μεγέθους του αριθμού των ζωντανών κυττάρων που προσδιορίστηκε μέσω της μικροσκοπίας φθορισμού ήταν σε συμφωνία με το επίπεδο του πληθυσμού που προσδιορίστηκε μέσω της επιστροφής σε τρυβλία (Πίνακας 7). Εντούτοις, στα επόμενα

χρονικά σημεία καταγράφηκε υψηλότερο επίπεδο ζωντανών κυττάρων μετά από μικροσκοπική παρατήρηση σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης. Αντίστοιχα, μετά την ανάλυση των φωτογραφιών, η θανάτωση των κυττάρων βρέθηκε μικρότερη από αυτή που υπολογίστηκε με την ανάπτυξη σε γενικό θρεπτικό υπόστρωμα. Επομένως, φαίνεται πως η μέθοδος της επίστρωσης τρυβλίων υποεκτιμά τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων του πληθυσμού του παθογόνου μετά από όξινη καταπόνηση. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στον ενδεχόμενο σχηματισμό αποικίας στο θρεπτικό υπόστρωμα από περισσότερα από ένα ζώντα κύτταρα ή στην παρουσία κυττάρων που είναι μεταβολικά ενεργά αλλά μη καλλιεργήσιμα, δηλαδή βρίσκονται σε κατάσταση ληθάργου. Ως αποτέλεσμα, ο αριθμός των αποικιών δεν αντανακλά τον πραγματικό αριθμό καλλιεργήσιμων κυττάρων.

Επιπρόσθετα, κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση καταγράφηκε υψηλό ποσοστό άβαφων κυττάρων (CFDA- / PI-). Η παρουσία άβαφων κυττάρων μπορεί να είναι αποτέλεσμα δύο παραγόντων, της απόδοσης της χρώσης των κυττάρων και της παρουσίας υπολειμμάτων του τροφίμου. Αναλυτικότερα, είναι γνωστό πως οι διάφορες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για τη χρώση των κυττάρων δεν έχουν 100% απόδοση και ένα κλάσμα κυττάρων παραμένει άβαφο (Fuller et al., 2000). Επιπρόσθετα, ένα ποσοστό κυττάρων μπορεί να παραμένει άβαφο λόγω ανικανότητας προσαρμογής στις μεταβαλλόμενες συνθήκες pH, από την όξινη καταπόνηση στην εξουδετέρωση σε pH 6,5 και στην επαναιώρηση σε ελαφρώς βασικό διάλυμα Ringer, καθώς ορισμένες χρωστικές, όπως το CFDA, είναι ευαίσθητες στις μεταβολές του pH (Arvaniti et al., 2021). Παρ'όλα αυτά, η παρουσία υπολειμμάτων του τροφίμου στο μικροσκοπικό παρασκεύασμα καθόρισε το υψηλό ποσοστό άβαφων κυττάρων. Στην πραγματικότητα, δεν πρόκειται για κύτταρα αλλά για μικροσκοπικά υπολείμματα του τροφίμου που εμφανίζονται με μαύρο χρώμα στον φακό αντίθεσης φάσης, όπως και τα κύτταρα του παθογόνου. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση βασίζεται στην αντίθεση χρώματος μεταξύ κυττάρων και υπόβαθρου και επομένως, δεν μπορεί να διαχωρίσει τα κύτταρα από τα υπολείμματα του λουκάνικου. Παρά τη ρύθμιση του αλγόριθμου ώστε να καταμετρά μόνο τα σωματίδια που έχουν μέγεθος όσο τα κύτταρα του παθογόνου, ορισμένες ακαθαρσίες δεν μπόρεσαν να εξαλειφθούν από την ανάλυση. Έτσι, προέκυψε υψηλό ποσοστό άβαφων κυττάρων, το οποίο μάλιστα παραμένει σχετικά σταθερό μεταξύ των χρονικών σημείων, κάτι που υποδηλώνει ότι πρόκειται για ένα συστηματικό σφάλμα της μεθόδου. Με αυτά τα δεδομένα, συμπεραίνεται ότι το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μπορεί να είναι ακόμα υψηλότερο από ότι καταγράφεται, καθώς ο υπολογισμός του βασίστηκε στον ολικό αριθμό κυττάρων που προσδιορίστηκε μέσα από την ανάλυση των φωτογραφιών αντίθεσης φάσης. Εάν αφαιρεθούν τα υπολείμματα του τροφίμου, ο συνολικός αριθμός κυττάρων είναι μικρότερος και άρα, το ποσοστό των φθορίζοντων με πράσινο χρώμα κυττάρων, δηλαδή των μεταβολικά ενεργών κυττάρων του παθογόνου, είναι ακόμα μεγαλύτερο.

Ένα τελευταίο εύρημα που προέκυψε από την προσπάθεια μικροσκοπικής παρατήρησης των κυττάρων ήταν η συσσωμάτωση τους σε συνθήκες χαμηλού pH. Μελέτη των Burel et al. (2021) στο βακτήριο *Staphylococcus aureus* έδειξε ότι σε χαμηλό pH τα μικροβιακά κύτταρα συσσωματώνονται λόγω ελάττωσης του επιφανειακού φορτίου και των απωστικών δυνάμεων μεταξύ των κυττάρων. Η συσσωμάτωση ήταν αντιστρεπτή και τα κύτταρα ήταν και πάλι διάχυτα μετά από αύξηση του pH. Το ίδιο συμπέρασμα εξάγεται και από την παρούσα μελέτη για τα κύτταρα της *L. monocytogenes*. Σε ισχυρά όξινο pH 2,5 τα κύτταρα δημιουργούσαν συσσωματώματα και ήταν αδύνατη η παρατήρηση μεμονωμένων κυττάρων. Μετά την εξουδετέρωση του διαλύματος σε pH 6,5, υπήρχε ικανοποιητική αποσυσσωμάτωση των κυττάρων, ώστε να είναι εφικτή η μικροσκοπική παρατήρησή τους. Παρ'όλα αυτά, η αύξηση του pH σε ευνοϊκότερες τιμές για την ανάπτυξη του παθογόνου για σύντομο χρονικό διάστημα δεν επηρέασε την ικανότητα επιβίωσής του και επέτρεψε τη σύγκριση των μικροβιολογικών μεθόδων με τη μικροσκοπία φθορισμού.

Εν κατακλείδι, η κατανάλωση λουκάνικων Φρανκφούρτης, ή άλλων RTE προϊόντων, επιμολυσμένων με το παθογόνο *L. monocytogenes* ενέχει υψηλό κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών, καθώς τα κύτταρα του παθογόνου μπορούν να επιβιώνουν ικανοποιητικά μετά την αναθέρμανσή τους ή στο όξινο περιβάλλον του στομάχου. Η μελέτη της χωρικής κατανομής του παθογόνου στην επιφάνεια του τροφίμου μετά από θερμική καταπόνηση και της απόκρισής του σε συνθήκες προσομοίωσης πέψης μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την ορθότερη αξιολόγηση του κινδύνου και να αναθεωρηθεί η διαδικασία παραγωγής και διάθεσης του τροφίμου ή οι οδηγίες κατανάλωσής του. Τέλος, η συνδυαστική χρήση κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων ανάπτυξης σε τρυβλία και μικροσκοπίας φθορισμού συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση του υποθανάτιου τραυματισμού των κυττάρων, αλλά και στην αποφυγή υποεκτίμησης του μεγέθους του βακτηριακού πληθυσμού.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία εμβάθυνε στις συνθήκες που επιτρέπουν την επιβίωση του παθογόνου *L.monocytogenes* κατά τη θερμική επεξεργασία και την πέψη επιμολυσμένων λουκάνικων Φρανκφούρτης.

- Με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού διαπιστώθηκε η αυξημένη επιβίωση των κυττάρων του παθογόνου που είχαν διεισδύσει σε βαθύτερα στρώματα της επιφάνειας του τροφίμου μετά από αναθέρμανση στους 64°C, υποδεικνύοντας την προστατευτική δράση της μικροδομής του τροφίμου έναντι των μικροβιακών κυττάρων.
- Επιπρόσθετα, η επιβίωση του παθογόνου σε συνθήκες προσομοίωσης πέψης καθορίζεται κυρίως από τη μεταβολή του pH του διαλύματος όξινης καταπόνησης και δευτερευόντως από την παρουσία αδιάλυτων στερεών συστατικών.
 - Για μεταβολή του pH από 2,5 σε 3,5 και υψηλή συγκέντρωση στερεών συστατικών, δηλαδή σε συνθήκες που μπορεί να επικρατούν στο στόμαχο του ανθρώπου μετά από την κατανάλωση μεγάλου γεύματος, δεν παρατηρήθηκε θανάτωση των κυττάρων του παθογόνου μετά από 60 λεπτά.
 - Σε σταθερό pH 2,5 παρατηρήθηκε μεγαλύτερος ρυθμός θανάτωσης.
 - Σε καμία συνθήκη όξινης καταπόνησης δεν παρατηρήθηκε υποθανάτιος τραυματισμός των κυττάρων, αλλά η συγκέντρωση των ζωντανών κυττάρων προσδιορίστηκε μεγαλύτερη μέσω της μικροσκοπίας φθορισμού σε σχέση με τις κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους, υποδεικνύοντας ότι η συνδυαστική χρήση των δύο μεθόδων θα συμβάλλει στον ακριβέστερο προσδιορισμό του επιπέδου του πληθυσμού του παθογόνου στο τρόφιμο.
 - Τέλος, διαπιστώθηκε η αντιστρεπτή συσσωμάτωση των κυττάρων της *L.monocytogenes* σε χαμηλό pH, πιθανώς ως αποτέλεσμα της ελάττωσης του επιφανειακού φορτίου και των απωστικών δυνάμεων μεταξύ των κυττάρων.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα επιβίωσης του παθογόνου σε συνθήκες καταπόνησης, θα παρουσίαζε ενδιαφέρον η εφαρμογή των καταπονήσεων σε διαδοχή, ώστε να γίνει προσομοίωση της πορείας του επιμολυσμένου τροφίμου από το στάδιο της συντήρησης μέχρι και την κατανάλωσή του. Η διαδοχική έκθεση του παθογόνου στις χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης επάνω στο τρόφιμο, σε υψηλή θερμοκρασία κατά την αναθέρμανσή του τροφίμου και στα υγρά του γαστρεντερικού σωλήνα θα δώσει μια πληρέστερη εικόνα της απόκρισης του παθογόνου και πιθανώς θα αναδείξει φαινόμενα αυξημένης ανθεκτικότητας λόγω προηγούμενης έκθεσης σε κάποιον παράγοντα καταπόνησης (cross-protection).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albadran, H.A., Monteagudo-Mera, A., Khutoryanskiy, V.V., Charalampopoulos, D., 2020. Development of chitosan-coated agar-gelatin particles for probiotic delivery and targeted release in the gastrointestinal tract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 5749–5757. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10632-w>
- Arcari, T., Feger, M.-L., Guerreiro, D.N., Wu, J., O’Byrne, C.P., 2020. Comparative Review of the Responses of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* to Low pH Stress. *Genes* 11, 1330. <https://doi.org/10.3390/genes11111330>
- Arvaniti, M., Skandamis, P.N., 2022. Defining bacterial heterogeneity and dormancy with the parallel use of single-cell and population level approaches. *Current Opinion in Food Science* 44, 100808. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100808>
- Arvaniti, M., Tsakanikas, P., Papadopoulou, V., Giannakopoulou, A., Skandamis, P., 2021. *Listeria monocytogenes* Sublethal Injury and Viable-but-Nonculturable State Induced by Acidic Conditions and Disinfectants. *Microbiol. Spectr.* 9, e01377-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01377-21>
- Bai, H., Zhao, F., Li, M., Qin, L., Yu, H., Lu, L., Zhang, T., 2019. Citric acid can force *Staphylococcus aureus* into viable but nonculturable state and its characteristics. *Int. J. Food Microbiol.* 305, 108254. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108254>
- Batt, C.A., 2014. LISTERIA | Introduction, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 466–469. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00186-5>
- Bommasamudram, J., Muthu, A., Devappa, S., 2022. Effect of sub-lethal heat stress on viability of *Lactocaseibacillus casei* N in spray-dried powders. *LWT* 155, 112904. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112904>
- Bubert, A., Sokolovic, Z., Chun, S.-K., Papatheodorou, L., Simm, A., Goebel, W., 1999. Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. *Mol. Gen. Genet.* MGG 261, 323–336. <https://doi.org/10.1007/PL00008633>
- Bucur, F.I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C.U., Nicolau, A.I., 2018. Resistance of *Listeria monocytogenes* to Stress Conditions Encountered in Food and Food Processing Environments. *Front. Microbiol.* 9, 2700. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02700>
- Burch, C. R., Stock, J. P. P., 1942. Phase-Contrast Microscopy. *Journal of Scientific Instruments*, 19(5), 71–75. [doi:10.1088/0950-7671/19/5/302](https://doi.org/10.1088/0950-7671/19/5/302)
- Burel, C., Dreyfus, R., Purevdorj-Gage, L., 2021. Physical mechanisms driving the reversible aggregation of *Staphylococcus aureus* and response to antimicrobials. *Sci. Rep.* 11, 15048. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94457-1>
- Carpentier, B., Cerf, O., 2011. Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>
- Cartwright, E., Jackson, K., Johnson, S., Graves, L., Silk, B., Mahon, B., 2013. Listeriosis Outbreaks and Associated Food Vehicles, United States, 1998–2008. *Emerg. Infect. Dis. J.* 19, 1. <https://doi.org/10.3201/eid1901.120393>
- Chen, J.-Q., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S., Hu, Z., 2017. Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Sci. Hum. Wellness* 6, 97–120. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.06.002>
- Deng, R., Seimys, A., Mars, M., Janssen, A.E.M., Smeets, P.A.M., 2022. Monitoring pH and whey protein digestion by TD-NMR and MRI in a novel semi-dynamic in vitro gastric simulator (MR-GAS). *Food Hydrocoll.* 125, 107393. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107393>

- Dong, L.M., Nam, D.T., Phuong, T.T., Thuy, D.K., 2021. Effect of Stevia rebaudiana on the Bioactive Compounds from Agarwood Leaf (*Aquilaria* spp.) by Lactic Fermentation and Spray Drying. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 49, 201–209. <https://doi.org/10.48022/mbl.2101.01003>
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J.* 17. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2021a. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA J.* 19. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2021b. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* 19. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.* 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* 14. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA J.* 12. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3547>
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA J.* 11. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3129>
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, n.d. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* 13. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4329>
- Feiner, G., 2006. 35 - Casings and packaging material, in: *Feiner, G. (Ed.), Meat Products Handbook, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.* Woodhead Publishing, pp. 552–562. <https://doi.org/10.1533/9781845691721.2.552>
- Fuller, M.E., Streger, S.H., Rothmel, R.K., Mailloux, B.J., Hall, J.A., Onstott, T.C., Fredrickson, J.K., Balkwill, D.L., DeFlaun, M.F., 2000. Development of a Vital Fluorescent Staining Method for Monitoring Bacterial Transport in Subsurface Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4486–4496. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4486-4496.2000>
- Gill, A.O., Greer, G.G., Nattress, F.M., 2014. MICROBIOLOGICAL ANALYSIS | Standard Methods, in: *Encyclopedia of Meat Sciences.* Elsevier, pp. 306–316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00064-7>
- Hartsell, S.E., 1951. The Longevity and Behavior of Pathogenic Bacteria in Frozen Foods: The Influence of Plating Media. *Am. J. Public Health Nations Health* 41, 1072–1077. <https://doi.org/10.2105/AJPH.41.9.1072>

- Hinkens, J.C., Faith, N.G., Lorang, T.D., Bailey, P., Buege, D., Kaspar, C.W., Luchansky, J.B., 1996. Validation of Pepperoni Processes for Control of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 59, 1260–1266. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.12.1260>
- Holley, R.A., Cordeiro, R.P., 2014. MICROBIOLOGICAL SAFETY OF MEAT | *Listeria monocytogenes*, in: *Encyclopedia of Meat Sciences*. Elsevier, pp. 348–356. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00039-8>
- Huang, L., Hwang, C.-A., 2012. In-package pasteurization of ready-to-eat meat and poultry products, in: *Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging*. Elsevier, pp. 437–450. <https://doi.org/10.1533/9780857095718.3.437>
- Hudson, J.A., Mott, S.J., Penney, N., 1994. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on Vacuum and Saturated Carbon Dioxide Controlled Atmosphere-Packaged Sliced Roast Beef. *J. Food Prot.* 57, 204–208. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.3.204>
- Jay, J.M., 2000. *Modern food microbiology*, 6th ed. ed, Aspen food science text series. Aspen Publishers, Gaithersburg, Md.
- Kang, D.-H., Fung, D.Y.C., 1999. Thin Agar Layer Method for Recovery of Heat-Injured *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 62, 1346–1349. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.11.1346>
- Kapetanakou, A.E., Gkerekou, M.A., Vitzilaiou, E.S., Skandamis, P.N., 2017. Assessing the capacity of growth, survival, and acid adaptive response of *Listeria monocytogenes* during storage of various cheeses and subsequent simulated gastric digestion. *Int. J. Food Microbiol.* 246, 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.015>
- Koseki, S., Mizuno, Y., Sotome, I., 2011. Modeling of Pathogen Survival during Simulated Gastric Digestion. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1021–1032. <https://doi.org/10.1128/AEM.02139-10>
- Koziolek, M., Schneider, F., Grimm, M., Modeß, C., Seekamp, A., Roustom, T., Siegmund, W., Weitschies, W., 2015. Intra-gastric pH and pressure profiles after intake of the high-caloric, high-fat meal as used for food effect studies. *J. Controlled Release* 220, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.022>
- Lado, B.H., Yousef, A.E., 2007. Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors, in: Ryser, E.T., Marth, E.H. (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety*, Food science and technology. CRC Press, Boca Raton.
- Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon, C., Lecuit, M., 2019. *Listeria thailandensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69, 74–81. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003097>
- Lianou, A., Sofos, J.N., 2007. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *J. Food Prot.* 70, 2172–2198. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.9.2172>
- Loneragan, S.M., Topel, D.G., Marple, D.N., 2019. Sausage processing and production, in: *The Science of Animal Growth and Meat Technology*. Elsevier, pp. 229–253. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815277-5.00014-7>
- Lopes-Luz, L., Mendonça, M., Bernardes Fogaça, M., Kipnis, A., Bhunia, A.K., Bühner-Sékula, S., 2021. *Listeria monocytogenes*: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays. *Crit. Rev. Microbiol.* 47, 647–666. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1911930>
- Luque-Sastre, L., Arroyo, C., Fox, E.M., McMahon, B.J., Bai, L., Li, F., Fanning, S., 2018. Antimicrobial Resistance in *Listeria* Species. *Microbiol. Spectr.* 6, 6.4.19. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0031-2017>
- Lovitt, R.W., Wright, C.J., 2014. MICROSCOPY | Light Microscopy, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 684–692. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00213-5>
- Magalhães, R., Mena, C., Ferreira, V., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P., Teixeira, P., 2014. Bacteria: *Listeria monocytogenes*, in: *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier, pp. 450–461. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00101-3>

- Mazzantini, D., Celandroni, F., Calvigioni, M., Panattoni, A., Labella, R., Ghelardi, E., 2021. Microbiological Quality and Resistance to an Artificial Gut Environment of Two Probiotic Formulations. *Foods* 10, 2781. <https://doi.org/10.3390/foods10112781>
- McLauchlin, J., 2006. 15 - Listeria, in: Motarjemi, Y., Adams, M. (Eds.), *Emerging Foodborne Pathogens*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 406–428. <https://doi.org/10.1533/9781845691394.2.406>
- Miller, A.J., 1992. Combined Water Activity and Solute Effects on Growth and Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. *Food Prot.* 55, 414–418. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.6.414>
- Molly, K., Woestyne, M.V., Smet, I.D., Verstraete, W., 1994. Validation of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) Reactor Using Microorganism-associated Activities. *Microb. Ecol. Health Dis.* 7, 191–200. <https://doi.org/10.3109/08910609409141354>
- Mulet-Cabero, A.-I., Egger, L., Portmann, R., Ménard, O., Marze, S., Minekus, M., Le Feunteun, S., Sarkar, A., Grundy, M.M.-L., Carrière, F., Golding, M., Dupont, D., Recio, I., Brodkorb, A., Mackie, A., 2020. A standardised semi-dynamic in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* 11, 1702–1720. <https://doi.org/10.1039/C9FO01293A>
- Murphy, R.Y., Marks, B.P., Johnson, E.R., Johnson, M.G., 2000. Thermal Inactivation Kinetics of *Salmonella* and *Listeria* in Ground Chicken Breast Meat and Liquid Medium. *J. Food Sci.* 65, 706–710. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16076.x>
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R., 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29, 407–439. <https://doi.org/10.1002/path.1700290409>
- Naim, F., Messier, S., Saucier, L., Piette, G., 2004. Postprocessing in vitro digestion challenge to evaluate survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented dry sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6637–6642. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6637-6642.2004>
- Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F.H., Rox Anderson, R., Schwarzenberger, K., Young, R.C., 2012. Introduction to Confocal Microscopy. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 1–5. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.429>
- Orsi, R.H., Wiedmann, M., 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5273–5287. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>
- Pienaar, J.A., Singh, A., Barnard, T.G., 2020. Membrane modification as a survival mechanism through gastric fluid in non-acid adapted enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Microb. Pathog.* 144, 104180. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104180>
- Pirie, J.H.H., 1940. *Listeria*: Change of Name for a Genus Bacteria. *Nature* 145, 264–264. <https://doi.org/10.1038/145264a0>
- Poimenidou, S.V., Chatzithoma, D.-N., Nychas, G.-J., Skandamis, P.N., 2016. Adaptive Response of *Listeria monocytogenes* to Heat, Salinity and Low pH, after Habituation on Cherry Tomatoes and Lettuce Leaves. *PLOS ONE* 11, e0165746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165746>
- Ray, B., 1979. Methods to Detect Stressed Microorganisms. *J. Food Prot.* 42, 346–355. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-42.4.346>
- Ren, Q., Jiang, C., Liu, J., 2019. CFDA-SE Combined with MACSiBeads™ Particles to Evaluate the Inhibitory Effect of Treg Cells in vitro. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 49, 740–747.

- Renzoni, A., Cossart, P., Dramsi, S., 1999. PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts. *Mol. Microbiol.* 34, 552–561. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01621.x>
- Roberts, B.N., Chakravarty, D., Gardner, J.C., Ricke, S.C., Donaldson, J.R., 2020. *Listeria monocytogenes* Response to Anaerobic Environments. *Pathogens* 9, 210. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030210>
- Ryser, E.T., Buchanan, R.L., 2012. *Listeria monocytogenes*, in: Doyle, M.P., Buchanan, R.L. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, DC, USA. <https://doi.org/10.1128/9781555818463>
- Ryser, E.T., Marth, E.H. (Eds.), 2007. *Listeria, listeriosis, and food safety*, 3rd ed. ed, *Food science and technology*. CRC Press, Boca Raton.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., Broome, C.V., 1983. Epidemic Listeriosis — Evidence for Transmission by Food. *N. Engl. J. Med.* 308, 203–206. <https://doi.org/10.1056/NEJM198301273080407>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schottroff, F., Fröhling, A., Zunabovic-Pichler, M., Krottenthaler, A., Schlüter, O., Jäger, H., 2018. Sublethal Injury and Viable but Non-culturable (VBNC) State in Microorganisms During Preservation of Food and Biological Materials by Non-thermal Processes. *Front. Microbiol.* 9, 2773. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02773>
- Seeliger, H.P.R., 1988. Listeriosis — History and actual developments. *Infection* 16, S80–S84. <https://doi.org/10.1007/BF01639726>
- Sewell, D., Allen, S.C., Phillips, C.A., 2015. Oxygen limitation induces acid tolerance and impacts simulated gastrointestinal transit in *Listeria monocytogenes* J0161. *Gut Pathog.* 7, 11. <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0058-0>
- Siderakou, D., Zilelidou, E., Poimenidou, S., Tsipra, I., Ouranou, E., Papadimitriou, K., Skandamis, P., 2021. Assessing the survival and sublethal injury kinetics of *Listeria monocytogenes* under different food processing-related stresses. *Int. J. Food Microbiol.* 346, 109159. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109159>
- Siderakou, D., Zilelidou, E., Poimenidou, S., Tsipra, I., Ouranou, E., Papadimitriou, K., Skandamis, P., 2021. Assessing the survival and sublethal injury kinetics of *Listeria monocytogenes* under different food processing-related stresses. *Int. J. Food Microbiol.* 346, 109159. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109159>
- Skandamis, P.N., Gounadaki, A.S., Geornaras, I., Sofos, J.N., 2012. Adaptive acid tolerance response of *Listeria monocytogenes* strains under planktonic and immobilized growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 159, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.027>
- Skandamis, P.N., Yoon, Y., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* 25, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.008>
- Song, R., Lin, Y., Li, Z., 2022. Ultrasonic-assisted preparation of eucalyptus oil nanoemulsion: Process optimization, in vitro digestive stability, and anti-*Escherichia coli* activity. *Ultrason. Sonochem.* 82, 105904. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105904>
- Straka, R.P., Stokes, J.L., 1959. METABOLIC INJURY TO BACTERIA AT LOW TEMPERATURES. *J. Bacteriol.* 78, 181–185. <https://doi.org/10.1128/jb.78.2.181-185.1959>

- Takeoka, K., Abe, H., Koyama, K., Koseki, S., 2022. Experimentally observed *Campylobacter jejuni* survival kinetics in chicken meat products during model gastric digestion tended to be lower than model predictions. *Food Microbiol.* 102, 103932. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103932>
- Tsilia, V., Kerckhof, F.-M., Rajkovic, A., Heyndrickx, M., Van de Wiele, T., 2016. *Bacillus cereus* NVH 0500/00 Can Adhere to Mucin but Cannot Produce Enterotoxins during Gastrointestinal Simulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 289–296. <https://doi.org/10.1128/AEM.02940-15>
- United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. 1994. Code of Federal Regulations. Title 9, 318.10. Office of the Federal Register, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- USDA-FSIS (U.S. Dept. of Agriculture, Food Safety and Inspection Service), 1996. Pathogen Reduction: Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) Systems. Final rule. Fed Regist 61, 38806-38989.
- USDHHS-FDA-CFSAN and USDA-FSIS (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, and U.S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service), 2003. Quantitative Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-eat Foods (Washington, D.C).
- van der Veen, S., Hain, T., Wouters, J.A., Hossain, H., de Vos, W.M., Abee, T., Chakraborty, T., Wells-Bennik, M.H.J., 2007. The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response. *Microbiology* 153, 3593–3607. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006361-0>
- Wang, S., Orsi, R.H., 2013. *Listeria*, in: *Foodborne Infections and Intoxications*. Elsevier, pp. 199–216. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416041-5.00011-1>
- Wesche, A.M., Gurtler, J.B., Marks, B.P., Ryser, E.T., 2009. Stress, Sublethal Injury, Resuscitation, and Virulence of Bacterial Foodborne Pathogens†. *J. Food Prot.* 72, 1121–1138. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.1121>
- Wideman, N.E., Oliver, J.D., Crandall, P.G., Jarvis, N.A., 2021. Detection and Potential Virulence of Viable but Non-Culturable (VBNC) *Listeria monocytogenes*: A Review. *Microorganisms* 9, 194. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010194>
- Wilson, P.D.G., Brocklehurst, T.F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J.W.T., Van Impe, J.F., 2002. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology* 73, 275–289. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00660-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00660-2)
- Wu, V.C.H., 2008. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiol.* 12.
- Yang, Y., Kadim, M.I., Khoo, W.J., Zheng, Q., Setyawati, M.I., Shin, Y.-J., Lee, S.-C., Yuk, H.-G., 2014. Membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression of *Salmonella* Enteritidis cells adapted to lactic acid and trisodium phosphate and their resistance to lethal heat and acid stress. *Int. J. Food Microbiol.* 191, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.034>
- Yousef, A., Courtney, P., 2002. Basics of Stress Adaptation and Implications in New-Generation Foods, in: Yousef, A., Juneja, V. (Eds.), *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420012828.ch1>
- Βλάχου, Ε., 2022. Συγκριτική μελέτη υποθανάτιου τραυματισμού του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων και επίπεδο πληθυσμού κατά την αναθέρμανση λουκάνικων Φρανκφούρτης. Μεταπτυχιακή μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Αποτελέσματα ανάλυσης ANOVA για την περίπτωση μη ρυθμιζόμενου pH κατά τη δοκιμασία προσομοίωσης πέψης σε κύτταρα *Listeria monocytogenes* EGD-e σε λουκάνικα Φρανκφούρτης. Παρουσιάζονται οι τιμές πιθανότητας p για δύο διαλύματα (SGF και Ringer/HCl), για δύο επίπεδα pH (1,5 και 2,5) και για τα δύο θρεπτικά υποστρώματα (TSA-YE και TSA-YE + 5% NaCl) που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις. Για τιμές $p < 0.05$ (σημασμένες με κόκκινο χρώμα), η μείωση του πληθυσμού στα συγκεκριμένα χρονικά σημεία είναι στατιστικά σημαντική.

Χρόνος έκθεσης (min)	ANOVA p-value							
	SGF				RINGER / HCl			
	pH 1,5		pH 2,5		pH 1,5		pH 2,5	
	TSA-YE	TSA-YE +5%NaCl	TSA-YE	TSA-YE +5%NaCl	TSA-YE	TSA-YE +5%NaCl	TSA-YE	TSA-YE+ 5%NaCl
0	0.001	0.025	0.932	0.986	0.000	0.000	0.393	0.231
10	0.000	0.000	-	-	0.000	0.000	0.037	0.019
20	0.000	0.000	-	-	0.000	0.000	0.041	0.011
30	0.000	0.000	0.411	0.269	0.000	0.000	0.039	0.005
60	0.000	0.000	0.117	0.156	0.000	0.000	-	-

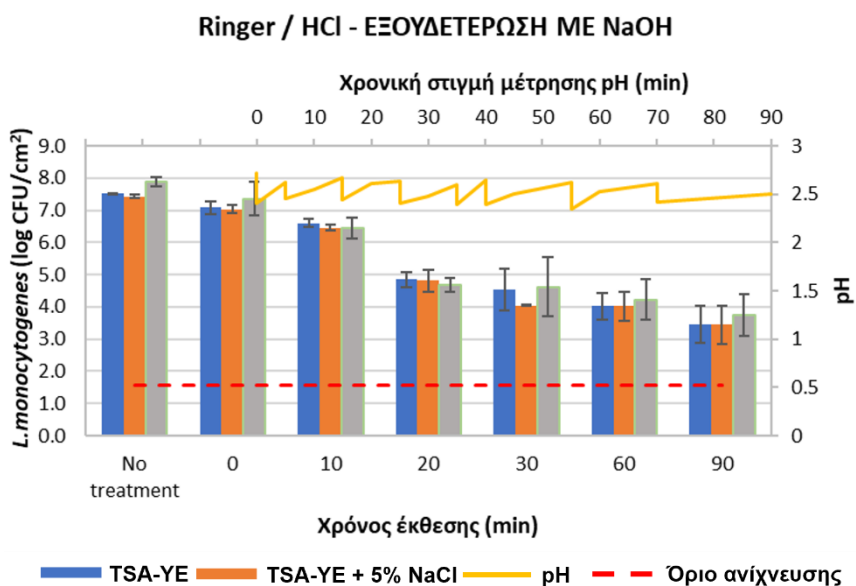
Πίνακας 2: Αποτελέσματα ανάλυσης ANOVA για την περίπτωση ρυθμιζόμενου pH κατά τη δοκιμασία προσομοίωσης πέψης σε κύτταρα *Listeria monocytogenes* EGD-e σε λουκάνικα Φρανκφούρτης. Παρουσιάζονται οι τιμές πιθανότητας p για 3 διαλύματα (SGF, αραιωμένο SGF 1/3 strength και Ringer/HCl), για δύο επίπεδα pH (1,5 και 2,5) και για τα δύο θρεπτικά υποστρώματα (TSA-YE και TSA-YE + 5% NaCl) που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις. Για τιμές $p < 0.05$ (σημασμένες με κόκκινο χρώμα), η μείωση του πληθυσμού στα συγκεκριμένα χρονικά σημεία είναι στατιστικά σημαντική. Με παύλα (-) σημειώνονται τα ενδεχόμενα για τα οποία τα δεδομένα δεν επαρκούν για στατιστική ανάλυση ANOVA.

Χρόνος έκθεσης (min)	ANOVA p-value							
	SGF				RINGER / HCl			
	pH 1,5		pH 2,5		pH 1,5		pH 2,5	
	TSA-YE	TSA-YE +5%NaCl	TSA-YE	TSA-YE +5%NaCl	TSA-YE	TSA-YE +5%NaCl	TSA-YE	TSA-YE+ 5%NaCl
0	0.031	0.000	0.980	0.988	0.000	0.000	0.779	0.375
10	0.001	0.000	0.522	0.407	0.000	0.000	0.005	0.001
20	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-
60	0.000	0.000	0.000	-	0.000	0.000	-	-

Χρόνος έκθεσης (min)	ANOVA p-value			
	SGF (1/3 strength)			
	pH 1,5		pH 2,5	
	TSA-YE	TSA-YE +5%NaCl	TSA-YE	TSA-YE +5%NaCl
0	0.000	0.000	0.907	0.830
10	0.000	0.000	0.389	0.175
20	0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.000
60	0.000	0.000	-	-

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ανάλυσης ANOVA για την περίπτωση όξινου διαλύματος Ringer/HCl σε ρυθμιζόμενο pH 2,5 κατά τη δοκιμασία προσομοίωσης πέψης σε κύτταρα *Listeria monocytogenes* EGD-e σε λουκάνικα Φρανκφούρτης. Παρουσιάζονται οι τιμές πιθανότητας p για τα δύο θρεπτικά υποστρώματα (TSA-YE και TSA-YE + 5% NaCl) που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις. Για τιμές p < 0.05 (σημασμένες με κόκκινο χρώμα), η μείωση του πληθυσμού στα συγκεκριμένα χρονικά σημεία είναι στατιστικά σημαντική.

Χρόνος έκθεσης (min)	ANOVA (p-value)	
	Ringer / HCl – pH 2,5	
	TSA-YE	TSA-YE + 5% NaCl
0	0.995	0.997
10	0.156	0.189
20	0.008	0.010
30	0.002	0.004
60	0.000	0.000
90	0.000	0.000



Εικόνα 1. Επίδραση της δοκιμασίας προσομοίωσης πέψης στον πληθυσμό κυττάρων *Listeria monocytogenes* EGD-e εμβολιασμένων στην επιφάνεια λουκάνικων Φρανκφούρτης. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα HCl σε Ringer ρυθμισμένο σε pH 2,5. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης, γινόταν επαναφορά του pH σε χαμηλότερες τιμές κοντά στην αρχική τιμή, ώστε το pH να διατηρηθεί εντός ενός στενού εύρους τιμών. “No treatment”: δείγματα που έγινε προσθήκη Ringer για την προσδιορισμό της αρχικής συγκέντρωσης του πληθυσμού. Σε κάθε χρονικό σημείο, μετά την όξινη καταπόνηση έγινε εξουδετέρωση του διαλύματος σε pH 6,5. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου υπολογίζεται στους 1,6 log CFU/cm².