

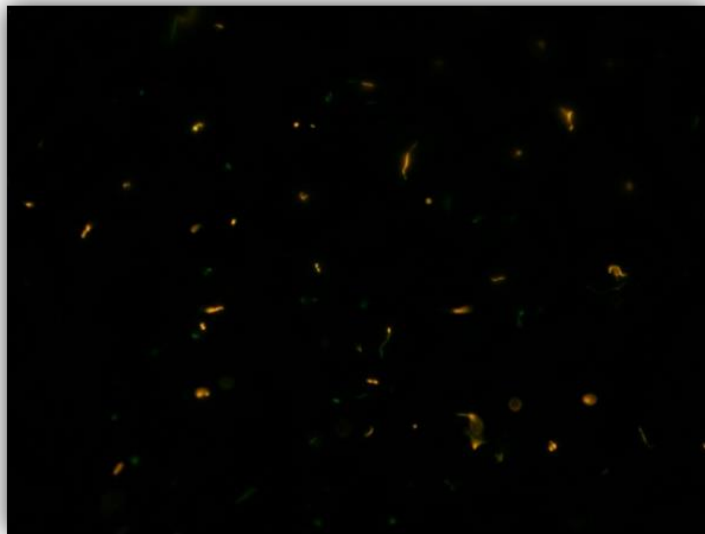


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ
& ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Συγκριτική μελέτη υποθανάτιου τραυματισμού του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων και επίπεδο πληθυσμού κατά την αναθέρμανση λουκάνικων Φρανκφούρτης



Ελένη Α. Βλάχου
Χημικός

Επιβλέπων Καθηγητής:
Παναγιώτης Σκανδάμης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2022

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Συγκριτική μελέτη υποθανάτιου τραυματισμού του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων και επίπεδο πληθυσμού κατά την αναθέρμανση λουκάνικων Φρανκφούρτης

“Comparative study of *Listeria monocytogenes* sublethal injury at single cell level and population level during reheating of frankfurters”

Ελένη Α. Βλάχου

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Σκανδάμης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Δροσινός Ελευθέριος, Καθηγητής ΓΠΑ

Πανάγου Ευστάθιος, Καθηγητής ΓΠΑ

Συγκριτική μελέτη υποθανάτιου τραυματισμού του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων και επίπεδο πληθυσμού κατά την αναθέρμανση λουκάνικων Φρανκφούρτης

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων & Ποτών

Περίληψη

Ο σκοπός της μελέτης ήταν η αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού των κυττάρων *Listeria monocytogenes* σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων και επίπεδο πληθυσμού ύστερα από εφαρμογή ήπιας θέρμανσης στην επιφάνεια λουκάνικων Φρανκφούρτης. Με αυτό τον τρόπο θέλαμε να προσομοιάσουμε την επίδραση των θερμοκρασιών που μπορεί να εμφανιστούν στην επιφάνεια των προϊόντων κατά την αναθέρμανσή τους. Παράλληλα, θέλαμε να εκτιμήσουμε συγκριτικά την κατανομή των καλλιεργήσιμων, τραυματισμένων και νεκρών κυττάρων ύστερα από την έκθεση σε θερμικό στρες, με τη βοήθεια μεθόδων που βασίζονται σε καλλιέργεια και μικροσκοπία φθορισμού.

Αρχικά τα λουκάνικα Φρανκφούρτης εμβολιάστηκαν με *L. monocytogenes* στελέχους EGDe (αρχικός πληθυσμός 7,2 λογάριθμοι) και υποβλήθηκαν σε υποθανάτια θερμική επεξεργασία σε υδατόλουτρο στους 61°C (60 min) and 64°C (20 min). Ο προσδιορισμός των τραυματισμένων υποπληθυσμών έγινε με την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών σε TSA με 0,6% Yeast Extract συμπληρωμένο με 5% NaCl από εκείνες σε TSAYE με 0,5% NaCl. Στη συνέχεια, ακολούθησε η σύγκριση των αποτελεσμάτων υποθανάτιου τραυματισμού των κυττάρων από τη μέθοδο επιφανειακής επίστρωσης, με εκείνα της μικροσκοπίας φθορισμού, χρησιμοποιώντας τα φθοροφθόρα cFDA και Ιωδιούχο Προπίδιο, προκειμένου να προσδιοριστούν τα μεταβολικά ενεργά και νεκρά κύτταρα.

Ο μικροοργανισμός έδειξε ανιχνεύσιμη λογαριθμική μείωση και πρόκληση τραυματισμού κατά τη θερμική επεξεργασία στις συγκεκριμένες θερμοκρασίες, με υψηλότερο τραυματισμό να καταγράφηκε ύστερα από 2 και 4 λεπτά ή στα 6 λεπτά στους 64°C και 61°C, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και μικροσκοπικά σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Ωστόσο, στους 61°C ύστερα από 60 λεπτά θερμικής επεξεργασίας, το σύνολο του πληθυσμού βρισκόταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ σε ένα σημαντικό αριθμό μεμονωμένων κυττάρων προκλήθηκε υποθανάτιος τραυματισμός (CFDA + /PI +), υποδηλώνοντας την υποεκτίμηση της βιωσιμότητας του παθογόνου, όταν βασίζεται αποκλειστικά στην απαρίθμηση με βάση την καλλιέργεια.

Επομένως, η αξιολόγηση του *in situ* υποθανάτιου τραυματισμού της *L. monocytogenes* μπορεί να καταστεί κρίσιμη για την μικροβιολογία τροφίμων, προσφέροντας γνώσεις σχετικά με τους κινδύνους υπερεκτίμησης μιας διεργασίας θανάτωσης.

Επιστημονική περιοχή: Ασφάλεια τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, υποθανάτιος τραυματισμός, λουκάνικα Φρανκφούρτης, θερμική καταπόνηση

Comparative study of *Listeria monocytogenes* sublethal injury at single cell level and population level during reheating of frankfurters

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

Abstract

This study aims to evaluate the sub-lethal thermal injury of *L. monocytogenes* on frankfurters surface at single cell versus population level using mild temperatures. Applying this method, we wanted to simulate the effect of temperatures that may occur on product surface during reheating of frankfurters. Furthermore, we wanted to compare the distribution of pathogen's culturable, injured and dead cells during exposure to heat stress, using culture-based methods and fluorescent microscopy.

Frankfurters were first inoculated with *L. monocytogenes* strain EGDe and subjected to sub-lethal heat treatment in a water bath at 61°C (60 min) and 64°C (20 min). Determination of injured sub-populations was performed by subtracting the number of colonies on TSA with 0.6% Yeast Extract supplemented with 5% NaCl (sodium chloride) from those on TSAYE with 0.5% NaCl. This was followed by a comparison of the results of sub-lethal injury from the culture-based method with those assessed by fluorescent microscopy, coupled with cFDA and PI to detect metabolically active and dead cells.

The microorganism showed a detectable logarithmic reduction and injury induction during heat treatment at specific temperatures, with higher injury being recorded after 2 and 4 minutes or 6 minutes at 64°C and 61°C, respectively. These results were also confirmed microscopically at the single cell level. However, at 61°C after 60 minutes of heat treatment, the whole population was below the detection limit and a considerable number of single cells appeared as CFDA+/PI+, suggesting the induction of sub-lethal injury and the underestimation of pathogen viability, when relying solely on culture-based enumeration.

Evaluation of in situ *L. monocytogenes* sub-lethal injury could be crucial for food microbiology, offering insights on the risk associated with the overestimation of a process lethality.

Scientific area: Food safety

Keywords: *Listeria monocytogenes*, sub-lethal injury, frankfurters, thermal stress

Στον πατέρα μου

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract	5
Ευχαριστίες.....	3
Εισαγωγή.....	4
1. Ο μικροοργανισμός <i>Listeria monocytogenes</i>	4
1.1. Ιστορική Αναδρομή	4
1.2. Ταξινόμηση	4
1.3. Μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά	5
1.4. Παράγοντες ανάπτυξης της <i>L. monocytogenes</i>	6
1.5. Πηγές μικροοργανισμού	9
1.6. Οδοί επιμόλυνσης τροφίμων	13
1.7. Λιστερίωση.....	18
1.8. Νομοθεσία- Αγορανομικοί Κανονισμοί	27
1.9. Απόκριση σε θερμική καταπόνηση	29
2. Παρουσία της <i>Listeria monocytogenes</i> σε λουκάνικα frankfurters	34
2.1. Λουκάνικα Frankfurters	34
2.2. Επιμόλυνση λουκάνικων Φρανκφούρτης με <i>Listeria monocytogenes</i>	36
3. Σκοπός μελέτης	38
4. Υλικά και Μέθοδοι.....	39
4.1. Στελέχη του μικροοργανισμού <i>L. monocytogenes</i> και αποθήκευση των βακτηριακών κυττάρων.....	39
4.2. Προετοιμασία εμβολίου	39
4.3. Επιλογή θρεπτικών υλικών ανάπτυξης	41
5. Προετοιμασία δειγμάτων και εμβολιασμός.....	42
6. Θερμική καταπόνηση	42
6.1. Καταγραφή θερμοκρασίας	43
7. Βακτηριακή απαρίθμηση.....	43
7.1. Ανάλυση αποτελεσμάτων	44
8. Παρακολούθηση της θερμικής καταπόνησης με μικροσκοπία φθορισμού.....	45
8.1. Μικροσκοπία φθορισμού	45
8.2. Φθορίζουσες χρωστικές	46
8.3. Θερμική καταπόνηση και μικροσκοπία φθορισμού	47
8.4. Ανάλυση εικόνων μικροσκοπίου με ImageJ	48
8.5. Στατιστική Ανάλυση.....	48
9. Αποτελέσματα.....	49

9.1. Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού μέσω θερμικής καταπόνησης στους 61 και 64°C.....	49
9.1.1. Θερμοκρασία.....	49
9.1.2. Υποθανάτιος τραυματισμός σε επίπεδο πληθυσμού	50
9.1.3. Υποθανάτιος τραυματισμός σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων	54
10. Συζήτηση	59
11. Συμπεράσματα	65
12. Βιβλιογραφία	66
13. Παράρτημα	73

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής, στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Παναγιώτη Ν. Σκανδάμη.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας Παναγιώτη Σκανδάμη, για την εμπιστοσύνη του, την καθοδήγηση του και το χρόνο που αφιέρωσε για να εκπαιδευτώ κατάλληλα.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μεταδιδάκτορα Ερευνήτρια Αναστασία Καπετανάκου και την υποψήφια Διδάκτωρ Μαριάννα Αρβανίτη για τις χρήσιμες και απαραίτητες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μελέτης.

Θα ήθελα, επίσης να ευχαριστήσω την υποψήφια Μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Κουρτέλη και την υποψήφια Προπτυχιακή φοιτήτρια Όλγα Απολλωνίου για την πολύτιμη βοήθειά τους, καθώς η συμβολή τους ήταν σημαντική για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης μελέτης. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επιστημονικής ομάδας του κ. Σκανδάμη για τις ευχάριστες στιγμές, την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την υποστήριξη και την αγάπη τους.

Εισαγωγή

1. Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*

1.1. Ιστορική Αναδρομή

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* περιγράφηκε αρχικά το 1924 από τους E.G.D. Murray, R.A. Webb και M.B. Swann, οι οποίοι απομόνωσαν τον μικροοργανισμό από κουνέλια και ινδικά χοιρίδια. Η μόλυνση που προκλήθηκε σε αυτά τα ζώα ήταν μια μορφή μονοπυρηνικής λευκοκυττάρωσης. Για το λόγο αυτό, αρχικά το βακτήριο ονομάστηκε *Bacterium monocytogenes*. Το 1927 μετονομάστηκε σε *Listerella hepatolytica* από τον Pirie, ενώ η σημερινή του ονομασία δόθηκε το 1940. (Pirie, 1940) Ο μικροοργανισμός αναγνωρίστηκε ως παθογόνο το 1929. Κατά τη διάρκεια των δεκαετιών 1970 και 1980, ο αριθμός των απομονώσεων του παθογόνου αυξήθηκε σημαντικά, ενώ από το 1983 και ύστερα, εξαιτίας μια σειράς επιδημικών κρουσμάτων σε ανθρώπους στη Βόρεια Αμερική, το Καναδά και την Ευρώπη, το βακτήριο αναγνωρίστηκε ως ο κύριος τροφιμογενής παράγοντας λιστερίωσης. (Dortet *et al.*, 2019; Vazquez-Boland *et al.*, 2001) Έκτοτε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας αυξήθηκε σημαντικά, καθώς το βακτήριο αυτό εμφανίζει ορισμένα χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδιαίτερα επικίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών.

1.2. Ταξινόμηση

Το γένος *Listeria* σχετίζεται με τα *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* και *Brochothrix*. Σε αυτό το γένος περιλαμβάνονται 6 αναγνωρισμένα είδη : *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. grayi*. Η ταξινόμηση αυτή βασίζεται σε τιμές ομολογίας DNA, 16S rRNA και πληροφορίες αλληλουχίας DNA. (Khelef *et al.*, 2006; Rocourt and Buchrieser, 2007). Από αυτά τα είδη μόνο δύο, τα *L. monocytogenes* και *L. ivanovii*, θεωρούνται παθογόνα για τον άνθρωπο. (Orsi and Wiedmann, 2016) Το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι ένα παθογόνο βακτήριο που συναντάται στον άνθρωπο και είναι υπεύθυνο για τη πρόκληση λιστερίωσης, ενώ το *L. ivanovii* είναι παθογόνο βακτήριο που απομονώνεται από ζώα, κυρίως πρόβατα και βοειδή.

Τα είδη της *Listeria* διαφοροποιούνται από κάποια βιοχημικά χαρακτηριστικά. Για τον χαρακτηρισμό τους χρησιμοποιούνται ορισμένα βιοχημικά τεστ όπως η παραγωγή οξέων από D- ξυλόζη, L- ραμνόζη, α- μεθυλ-D-μαννόζη και D-μαννιτόλη. Παράλληλα, η *L. monocytogenes* διαφοροποιείται από τα παθογόνα είδη της *Listeria* από την ικανότητα της να λύει τα ερυθροκύτταρα του αίματος. Ωστόσο, τα μη παθογόνα είδη απομονώνονται συνήθως από τα ίδια τρόφιμα και περιβάλλοντα όπως η *L. monocytogenes*. (Matthews *et al.*, 2017)

Τα στελέχη της *L. monocytogenes* που απομονώνονται χαρακτηρίζονται σε επιμέρους τύπους του ίδιου είδους με τη χρήση διάφορων μεθόδων. Η πιο συνηθισμένη δοκιμή βασίζεται στην αναγνώριση αντιγόνων που βρίσκονται στην επιφάνεια του βακτηρίου χρησιμοποιώντας ειδικούς αντιορούς. Υπάρχουν 13 ορότυποι του παθογόνου *L. monocytogenes*, από τους οποίους πάνω από το 98% των στελεχών που απομονώνονται από ανθρώπινη λιστερίωση ανήκουν μόνο σε τέσσερις ορότυπους: 1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b. Πάνω από 50% των στελεχών που απομονώθηκαν από τα τρόφιμα και το περιβάλλον είναι ο ορότυπος 1/2 (ειδικά οι 1/2a και 1/2b), ενώ τα στελέχη του ορότυπου 4b αποτελεί την πιο διαδεδομένη αιτία τροφικών εξάρσεων ανθρώπινης λιστερίωσης. (Nho *et al.*, 2015)

1.3. Μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά

Τα είδη του γένους *Listeria* είναι Gram-θετικά, προαιρετικά αναερόβια, μη σπορογόνα, ραβδόμορφα βακτήρια. Είναι θετικά στην αντίδραση καταλάσης και αρνητικά στην αντίδραση της οξειδάσης. Διαθέτουν περίτριχα μαστίγια, που τους δίνουν μια χαρακτηριστική περιστροφική κίνηση, η οποία εμφανίζεται σε ένα στενό εύρος θερμοκρασιών (20-25 °C). Ωστόσο πολλά στελέχη του γένους *Listeria* δεν έχουν την ικανότητα κίνησης στους 37 °C λόγω της μειωμένης έκφρασης μαστιγίνης σε αυτή τη θερμοκρασία. (Peel *et al.*, 1988).

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes*, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, μη σπορογόνο. Έχει την ικανότητα να αναπτυχθεί τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας ως κύρια πηγή ενέργειας τη γλυκόζη. (Pine, L. *et al.*, 1989). Η ικανότητα αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για την μικροβιολογία συσκευασμένων τροφίμων, καθώς έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν στα προϊόντα, μετά την διαδικασία παραγωγής και συσκευασίας τους. Οι αποικίες που σχηματίζονται είναι λείες, σχεδόν επίπεδες,

χρώματος λευκού-κρεμ, ενώ παίρνουν μια χαρακτηριστική κυανοπράσινη χρώση κατά την παρατήρησή τους με πλάγιο φωτισμό. (Henry, 1933)

Η μορφολογία των κυττάρων του παθογόνου είναι είτε κοκκοειδής, είτε ραβδόμορφη. Η διάμετρος των κυττάρων κυμαίνεται από 0,4 έως 0,5 μm , ενώ το μήκος τους από 0,5 έως 2 μm . Συνήθως τα κύτταρα του παθογόνου αναπτύσσονται μεμονωμένα. Τα βακτηριακά κύτταρα έχουν όμως και την ικανότητα να σχηματίζουν κοντές αλυσίδες μορφής V ή Y, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η κίνηση του βακτηρίου οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ύπαρξη βλεφαρίδων. Η ενδοκυτταρική κίνηση γίνεται μέσω του πολυμερισμού ακτίνης. (Holley and Cordeiro, 2014).

Η χαρακτηριστική αντίδραση, στην οποία οφείλεται η παραγωγή της λιστεριολυσίνης O και, κατά συνέπεια, η παθογένεια του βακτηρίου, είναι η αντίδραση της β -αιμόλυσης. Κατά την παραγωγή της λιστεριολυσίνης O σε συνδυασμό με την αιμόλυση, προκαλείται η αιμόλυση στο αίμα. (Adams and Moss, 2000)

1.4. Παράγοντες ανάπτυξης της *L. monocytogenes*

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες, οι οποίοι καθορίζουν την συμπεριφορά των μικροοργανισμών που είναι ικανοί να προκαλέσουν λοιμώξεις. Ορισμένοι από αυτούς τους παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι η θερμοκρασία, το pH, η ενεργότητα νερού, η παρουσία άλατος και οξυγόνου. (McMeekin *et al.*, 1997)

Επίδραση θερμοκρασίας

Το παθογόνο *L. monocytogenes* πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, από 1 έως 45 °C, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30- 37 °C. Η θερμοκρασία κατάψυξης δεν μειώνει σημαντικά το μέγεθος του βακτηριακού πληθυσμού. Η επιβίωση καθώς και η πρόκληση βλαβών στο μικροοργανισμό κατά τη διάρκεια κατάψυξης εξαρτώνται από ορισμένους παράγοντες όπως το τρόφιμο και ο ρυθμός κατάψυξης. Η ικανότητα αυτή του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται και να επιβιώνει σε θερμοκρασίες κατάψυξης δημιουργεί πρόβλημα στη βιομηχανία των τροφίμων, ενώ ταυτόχρονα αναζητούνται μέθοδοι αδρανοποίησης του παθογόνου. Θανάτωση του μικροοργανισμού επέρχεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 50°C. (Ramaswamy *et al.*, 2007; Low *et al.*, 1997).

Η δυνατότητα του μικροοργανισμού να επιβιώνει σε τόσο χαμηλές θερμοκρασίες έχει αποδοθεί στις μεμβράνες των φωσφολιπιδίων. Οι μεμβράνες αυτές βρίσκονται σε υγρο-κρυσταλλική κατάσταση, προκειμένου να διατηρηθούν η ρευστότητά τους και να ευνοηθεί η ανάπτυξη του βακτηρίου σε αυτές τις θερμοκρασίες. Οι μεμβράνες αποτελούνται από λιπαρά οξέα, τα οποία βρίσκονται σε αναλογία περισσότερο από 96% της ολικής σύστασης της μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου του παθογόνου. Κατά τη διάρκεια των χαμηλών θερμοκρασιών, οι μεμβράνες των φωσφολιπιδίων «πακετάρουν» σφικτά, διατηρώντας έτσι την ρευστότητα της μεμβράνης, η οποία ευθύνεται για την επιβίωση του μικροοργανισμού.

Ταυτόχρονα, τα διάφορα στελέχη του μικροοργανισμού εμφανίζουν μεταβλητότητα στην επίδραση της θερμοκρασίας, ιδίως σε περιοριστικές τιμές. Η σύσταση του τροφίμου σε συνδυασμό με την ταχύτητα ελάττωσης της θερμοκρασίας κατάψυξης ευθύνονται για τον τραυματισμό και την επιβίωση των κυττάρων του παθογόνου, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης σε αυτές τις θερμοκρασίες. (Swaminathan *et al.*, 2007).

Επίδραση pH

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή ανάπτυξη και την επιβίωση του μικροοργανισμού είναι το pH. Ο μικροοργανισμός αυτός έχει την ικανότητα να αναπτυχθεί σε τιμές pH από 5,6 έως 9,5, με άριστη ανάπτυξη στο ουδέτερο και ελαφρά αλκαλικό pH. (Seeliger και Jones, 1986) Αντίθετα, σε εργαστηριακά θρεπτικά υλικά αναπτύσσεται σε χαμηλότερες τιμές pH μέχρι και 4,4. Σε τιμές pH κάτω από 4,3 τα κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν, αλλά χάνουν την ικανότητα να αναπτυχθούν. Η θερμοκρασία επώασης του μικροοργανισμού, η ενεργότητα νερού, η συγκέντρωση του NaCl και άλλων αλάτων, καθώς και το είδος οξέος, το οποίο ρυθμίζει το pH, αποτελούν τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν την τιμή του ελάχιστου pH, στο οποίο το παθογόνο βακτήριο μπορεί να αναπτυχθεί. (Jay *et al.*, 2005) Οργανικά οξέα, όπως το κιτρικό, το οξικό και το γαλακτικό, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου σε ποσοστό 0.1%. Η αντιλιστεριακή δραστηριότητα αυτών των οξέων, όμως, διαφοροποιείται, καθώς εξαρτάται από το βαθμό διάστασή των οξέων.

Η επίδραση των όξινων συνθηκών στην ανάπτυξη του παθογόνου έχει μελετηθεί εκτενώς. Η συμπεριφορά των κυττάρων συχνά μελετάται πρώτα με την

έκθεση του βακτηρίου σε ήπιο όξινο περιβάλλον και στη συνέχεια εξετάζεται η απόκριση του μικροοργανισμού σε όξινες συνθήκες. (Eom *et al.*, 2009) Όταν αρχικά τα βακτηριακά κύτταρα έχουν καλλιεργηθεί σε χαμηλό pH για ορισμένο χρονικό διάστημα, τα βακτήρια εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αυτές τις τιμές pH. Όσα βακτήρια δεν έχουν προσαρμοστεί σε αυτές τις συνθήκες, θανατώνονται στις οριακές τιμές του pH. Η φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων, καθώς και η θερμοκρασία ανάπτυξης των μικροοργανισμών επηρεάζουν τη προσαρμογή των κυττάρων. (Lado and Yousef, 2007)

Επίδραση ενεργότητας νερού

Οι τιμές ενεργότητας νερού ενός τροφίμου έχει παρατηρηθεί ότι πρέπει να είναι μεγαλύτερες από 0.97, προκειμένου το υπόστρωμα να είναι ευνοϊκό για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη του παθογόνου μπορούν να αναπτυχθούν σε χαμηλότερες τιμές ενεργότητας νερού.

Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε πολύ χαμηλές τιμές ενεργότητας νερού. ($a_w \leq 0.83$). Η ικανότητα του μικροοργανισμού να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε τόσο χαμηλή ενεργότητα νερού, καθιστά το μικροοργανισμό ένα ιδιαίτερα επικίνδυνο παθογόνο βακτήριο. Η σύσταση του υποστρώματος και οι φυσικές του ιδιότητες μπορούν να επηρεάσουν την ενεργότητα νερού. (Farber *et al.*, 1992) Τέλος, η ωσμοπροστατευτική δράση που εμφανίζει το παθογόνο είναι αποτέλεσμα των διαλυτών ουσιών, οι οποίες προσλαμβάνονται και συσσωρεύονται από το μικροοργανισμό. (Ko *et al.*, 1994)

Επίδραση ωσμωτικής πίεσης

Μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιείται για την συντήρηση των τροφίμων είναι η αύξηση της ωσμωτικής πίεσης. Η αύξηση αυτή επιτυγχάνεται με την μείωση της ενεργότητας νερού του τροφίμου. Η επίδραση της ωσμωτικής πίεσης στον εκάστοτε μικροοργανισμό είναι η ελάττωση του διαθέσιμου νερού. Τα άλατα, όπως NaCl και KCl, τα σάκχαρα και η γλυκερόλη αποτελούν εκείνες τις διαλυμένες ουσίες που χρησιμοποιούνται στο τρόφιμο, προκειμένου να μειωθεί η ενεργότητα νερού. (Beals, 2004) Το βακτήριο έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται όταν βρίσκεται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις αλάτων (6,5%). Ωστόσο, όταν η συγκέντρωση του αλάτος στο τρόφιμο φτάσει το 10%, το παθογόνο έχει την ικανότητα να επιβιώσει και

να αναπτυχθεί στο τρόφιμο, ανεξάρτητα από τις δυσμενείς συνθήκες που επικρατούν. (Miller, 1992)

Κατά την απόκριση της αλατότητας, τα σημεία του βακτηρίου που επηρεάζονται είναι οι πολικές κεφαλές των μεμβρανικών λιποειδών. Κατά τη προσθήκη άλατος στο θρεπτικό υλικό, η ανάπτυξη του παθογόνου επηρεάζεται σημαντικά. Ταυτόχρονα, οι ωσμωλύτες μπορεί να αποτελέσουν μόρια προστασίας, τα οποία όταν συσσωρευτούν, έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν ωσμωρυθμιστικές μεταβολές. Τέλος, επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση ορισμένων πρωτεϊνών και ενδοκυτταρικών ενζύμων, και κατά επέκταση, η συνέχιση της κανονικής λειτουργίας τους. (Parker and Hutkins, 1997)

1.5. Πηγές μικροοργανισμού

Τόσο το βακτήριο *Listeria monocytogenes* όσο και τα υπόλοιπα είδη του *Listeria spp.* είναι ελεύθερα ζωντανά βακτήρια ευρέως διαδεδομένα στη φύση. Ο μικροοργανισμός απαντάται συνήθως στο έδαφος, το νερό, τα φυτά και τη βλάστηση. Ωστόσο, ο φυσικός βιότοπος ή η προτιμώμενη θέση που συναντάται το βακτήριο δεν έχει ακόμη αναγνωριστεί.

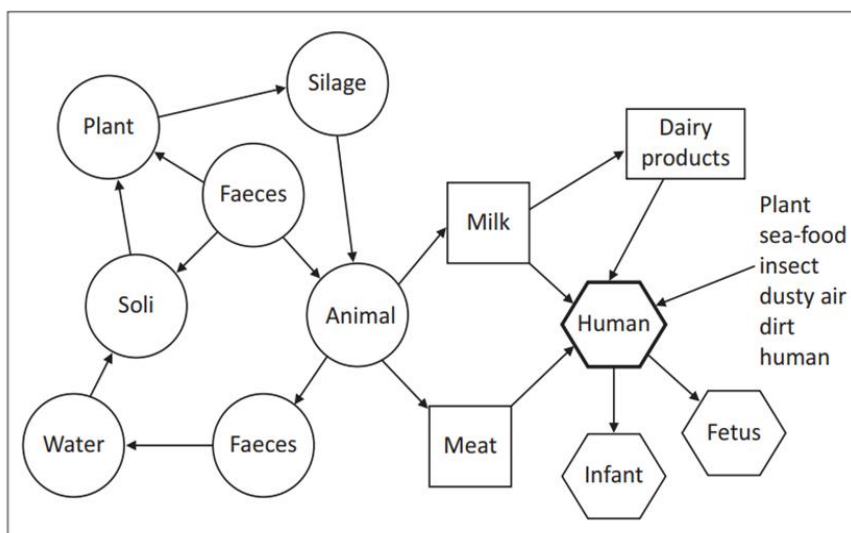
Το έδαφος και η βλάστηση αποτελούν τις σημαντικότερες εστίες του μικροοργανισμού στο φυσικό περιβάλλον. Έχει απομονωθεί από καλλιεργούμενες εκτάσεις και κτηνοτροφικές μονάδες, ενώ στο χώμα εντοπίζεται κυρίως επιφανειακά. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην επιφανειακή υγρασία και στην αποσύνθεση της βλάστησης. Η αποσύνθεση του φυτικού και του περιττωματικού υλικού πιθανότατα συμβάλλει στη παρουσία του παθογόνου στο έδαφος. Παράλληλα, το έδαφος παρέχει ένα δροσερό, υγρό περιβάλλον, το οποίο μαζί με τα θρεπτικά συστατικά που παρέχονται από το αποσυνθετικό υλικό, δημιουργούν ένα ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη του παθογόνου.

Τα νερά απορροής, ιδίως εκείνα που προέρχονται από γεωργικές περιοχές, έχουν χαρακτηριστεί ως η κύρια οδός για την είσοδο της *Listeria monocytogenes* σε επιφανειακά ύδατα, όπως λίμνες, ποτάμια και ρυάκια. Παράλληλα, άλλες πηγές όπως τα περιττώματα ζώων αυξάνουν το ποσοστό επικράτειας του παθογόνου σε υδάτινα οικοσυστήματα. (Jami *et al.*, 2014) Το γεγονός αυτό δικαιολογείται από την παρουσία υψηλών επίπεδων υγρασίας και θρεπτικών ουσιών, ελλείψει των οποίων το βακτήριο

δεν έχει την ικανότητα να αναπτυχθεί. Ωστόσο, σε καθαρό νερό δεν έχει απομονωθεί το βακτήριο, καθώς δεν ευνοείται η ανάπτυξή του. (Liu, 2008)

Ταυτόχρονα, η *Listeria monocytogenes* έχει τη δυνατότητα να εισέρχεται στις μονάδες επεξεργασίας τροφίμων, συνήθως στο τελευταίο στάδιο επεξεργασίας. Όταν το περιβάλλον επεξεργασίας είναι στεγνό, η δυνατότητα αύξησης του μικροοργανισμού είναι περιορισμένη. Ωστόσο, η αυξημένη υγρασία δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Το νερό που χρησιμοποιείται για τις διαδικασίες υγιεινής μετά τη διαδικασία επεξεργασίας μπορεί να συμβάλλει στην εντατική εξάπλωση του παθογόνου στους χώρους επεξεργασίας των τροφίμων. Το βακτήριο βρίσκει κατάλληλες περιοχές, συνήθως σημεία με αυξημένη υγρασία, στα οποία έχει την ικανότητα να κατοικήσει και να πολλαπλασιαστεί. Τα κρίσιμα αυτά σημεία μπορεί να περιλαμβάνουν επίσης κρυφές επιφάνειες εξοπλισμού, μέσω των οποίων μπορεί να διεισδύσει στα τρόφιμα. Οι μέθοδοι θερμικής επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται στις μονάδες επεξεργασίας για να καταστήσουν τα τρόφιμα ασφαλή απενεργοποιούν αποτελεσματικά τον μικροοργανισμό. Ωστόσο, το παθογόνο είναι δύσκολο να εξαφανιστεί από τα εργοστάσια επεξεργασίας, καθώς έχει την ικανότητα να προσκολλάται σε επιφάνειες και να αναπτύσσει βιοϋμένια, τα οποία του προσδίδει την ικανότητα να επιβιώνει σε αντίξοες συνθήκες, καθιστώντας δύσκολη την εφαρμογή αποτελεσματικών μέτρων υγιεινής. (Lakicevic *et al.*, 2015) Η μεγάλη ποσότητα νερού που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια επεξεργασίας των τροφίμων συμβάλλει στο σχηματισμό βιοϋμενίων. Κατά κανόνα, οι διαδικασίες καθαρισμού και απολύμανσης του χώρου και του εξοπλισμού επεξεργασίας των τροφίμων μπορούν να εξαλείψουν τον παθογόνο παράγοντα σε αυτές τις περιοχές. Υπάρχει, όμως, η πιθανότητα να επανεμφανιστεί ο μικροοργανισμός μετά τη διαδικασία επεξεργασίας. Γι' αυτό το λόγο, είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψιν παράγοντες, όπως η κατάλληλα αποτύπωση του εξοπλισμού επεξεργασίας των τροφίμων, οι λεπτομερείς οδηγίες εργασίας για τους υπαλλήλους και η παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών καθαρισμού και απολύμανσης στις εγκαταστάσεις παραγωγής, προκειμένου να μειωθεί και να εξαλειφθεί η πιθανότητα εμφάνισης και ανάπτυξης του μικροοργανισμού στις εγκαταστάσεις παραγωγής. (Jami *et al.*, 2014)

Οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν βιοϋμένια συνήθως εμφανίζουν υψηλή αντοχή σε απολυμαντικά, αντιβιοτικά και αντιμικροβιακά παρασκευάσματα, καθιστώντας ιδιαίτερα δύσκολη την αδρανοποίησή τους. Η παραγωγή εξωκυτταρικών υλικών, το φορτίο του βακτηρίου, καθώς και η κίνηση του βακτηρίου είναι άμεσα συνδεδεμένα με την προσκόλληση και το σχηματισμό βιοϋμενίων. Η προσαρμογή του παθογόνου σε αντίξοες συνθήκες επιτυγχάνεται με την τροποποίηση της σύστασης των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης, μεταβάλλοντας, με αυτό το τρόπο, το βακτηριακό φορτίο. (Meelheuc *et al.*, 2006)



Εικόνα 1. Εμπλεκόμενες οδοί μετάδοσης της μόλυνσης από *Listeria monocytogenes* στον άνθρωπο (Matle *et al.*, 2020)

Σχηματισμός biofilms σε αδρανείς επιφάνειες

Ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς του παθογόνου που συμβάλλουν στην επιβίωση και τη μετάδοση του είναι ο σχηματισμός biofilms. Τα biofilms σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα έχουν αναγνωριστεί ως μία από τις βασικότερες αιτίες για την ανθεκτικότητα του παθογόνου και την επακόλουθη μόλυνση του προϊόντος. Η ικανότητα των μικροοργανισμών να σχηματίζουν βιοϋμένια, τους προσδίδει υψηλή αντοχή σε διάφορες μεθόδους επεξεργασίας των τροφίμων, καθιστώντας ιδιαίτερα δύσκολη την αδρανοποίησή τους. (Gandhi and Chikindas, 2007; Gianotti *et al.*, 2008)

Ως biofilms ορίζονται πολύπλοκες μικροβιακές κοινότητες, προσκολλημένες σε μία βιοτική ή αβιοτική επιφάνεια, ενώ βρίσκονται ενσωματωμένες σε μία

εξωκυτταρική μήτρα συστατικών, επηρεάζοντας τον ρυθμό ανάπτυξης και τη γονιδιακή μεταγραφή του μικροοργανισμού. Η ικανότητα αυτή του παθογόνου να σχηματίζει biofilms είναι μια στρατηγική προσαρμογής και αντοχής σε διάφορες αντίξοες συνθήκες. (Moretro and Solveig, 2004) Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι το περιβάλλον επεξεργασίας των τροφίμων αποτελούν την κυριότερη πηγή επιμολύνσεων. Εκτός από την επιμόλυνση των τροφίμων, η πιθανή διάβρωση των μεταλλικών επιφανειών επεξεργασίας τους μπορεί να είναι αποτέλεσμα της δημιουργίας biofilms στον εξοπλισμό από τους παθογόνους μικροοργανισμούς. (Beech and Gaylarde, 1989)

Η δημιουργία των biofilms είναι μια δυναμική διαδικασία που λαμβάνει χώρα διαδοχικά και περιλαμβάνει πέντε στάδια. Η αρχική προσκόλληση είναι το πρώτο στάδιο της διαδικασίας. Αποτελεί ένα μη αναστρέψιμο τύπο προσκόλλησης, όπου τα πλαγκτονικά μικροβιακά κύτταρα προσκολλώνται σε μια επιφάνεια μέσω φυσικών δυνάμεων. Ο τύπος της επιφάνειας, η θερμοκρασία και η πίεση μπορούν να μεταβάλλουν αυτό το φαινόμενο. Το ηλεκτρικό φορτίο της επιφάνειας του κυττάρου, οι δυνάμεις Van der Waals, η υδροφοβία της επιφάνειας και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία. Κατά το δεύτερο στάδιο της διαδικασίας, πραγματοποιούνται διάφορες ομοιοπολικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, προκειμένου τα κύτταρα να προσκολληθούν μόνιμα μεταξύ τους και στην επιφάνεια. Στο τρίτο στάδιο, η παραγωγή εξωκυτταρικών υλικών μαζί με τη συσσώρευση και ανάπτυξη προσκολλημένων μικροοργανισμών οδηγεί στο σχηματισμό μικροαποικιών. Στο τέταρτο στάδιο της διαδικασίας υπάρχει ένα ώριμο biofilm λόγω της ανάπτυξης ενός εξαιρετικά οργανωμένου οικοσυστήματος και μιας άκαμπτης δομής. Τέλος, το πέμπτο στάδιο σχετίζεται με τη διασπορά, όπου άμισχα κύτταρα μπορούν να επιστρέψουν στις πλαγκτονικές τους μορφές και να μεταφερθούν στο περιβάλλον, ικανά να αποικίσουν σε νέες επιφάνειες. Η αποκόλληση μπορεί να οφείλεται σε χαμηλή περιεκτικότητα θρεπτικών συστατικών, ως μηχανισμός επιβίωσης.

Στη περίπτωση της *L. monocytogenes*, τα μαστίγια που διαθέτει διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο, τουλάχιστον στα αρχικά στάδια του σχηματισμού biofilms. Ταυτόχρονα, η προσκόλληση του παθογόνου σε αδρανείς επιφάνειες γίνεται μέσω μιας διαδικασίας παθητικής δέσμευσης των μαστιγίων. Η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το pH επηρεάζουν με διαφορετικό βαθμό τη

κυτταρική προσκόλληση και κατά επέκταση το σχηματισμό biofilms. (Moretro and Solveig, 2004)

1.6. Οδοί επιμόλυνσης τροφίμων

Οι τροφιμογενείς ασθένειες αφορούν ασθένειες που προκαλούνται από κατανάλωση τροφίμων, τα οποία έχουν μολυνθεί από βακτήρια, ιούς, παράσιτα ή τοξίνες. Σύμφωνα με κατευθυντήριες γραμμές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (2015-2017), οι τροφιμογενείς ασθένειες ευθύνονται για το ένα τρίτο των θανάτων σε παιδιά ηλικίας κάτω των πέντε ετών, ενώ ετησίως 420.000 άνθρωποι πεθαίνουν λόγω τροφιμογενών ασθενειών. Οι πιο διαδεδομένοι παράγοντες που προκαλούν αυτές τις ασθένειες είναι οι βακτηριακοί. Το γένος *Listeria* αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες που ευθύνονται για σοβαρές ασθένειες του ανθρώπου και των ζώων μέσω της κατανάλωσης γάλακτος και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς και κρέατος, πουλερικών και έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων. (Shamloo *et al.*, 2019)

Η μόλυνση από *Listeria monocytogenes* μπορεί να συμβεί σε όλα τα στάδια της τροφικής αλυσίδας, από το αγρόκτημα στο τραπέζι. Το αντίκτυπο της μόλυνσης στη δημόσια υγεία εξαρτάται από το στάδιο εντός της αλυσίδας παραγωγής τροφίμων, καθώς και από τον τύπο του τροφίμου. Ακατέργαστα είδη όπως κρέας, πουλερικά, θαλασσινά και μερικά φρούτα και λαχανικά μπορεί να αποτελέσουν κατάλληλο περιβάλλον για την παρουσία και ανάπτυξη του παθογόνου. Η θερμική ή οι χημικές επεξεργασίες αποτελούν τις κατάλληλες μεθόδους για την καταστροφή του παθογόνου μικροοργανισμού. Ωστόσο η ανεπαρκής θερμική επεξεργασία ή η διασταυρούμενη επιμόλυνση μπορούν να αποτελέσουν την αιτία μόλυνσης τροφίμων μετά από επεξεργασία. (Lakicevic *et al.*, 2015)

Τα τρόφιμα μπορούν να αποτελέσουν ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια της παραγωγής, μεταφοράς και αποθήκευσής τους. Το βακτήριο έχει ευρεία κατανομή, λόγω της ικανότητάς του να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε ξηρά, κρύα και υψηλά αλατούχα περιβάλλοντα. Παράλληλα, μπορεί να προσαρμοστεί και να πολλαπλασιαστεί σε διαφορετικές μήτρες τροφίμων, τα οποία διατηρούνται υπό ψύξη. Το γεγονός αυτό προκαλεί ανησυχία για τη δημόσια υγεία, ιδιαίτερα για ομάδες ατόμων υψηλού κινδύνου. Η έκθεση του καταναλωτή στο μικροοργανισμό εξαρτάται από την συχνότητα και το επίπεδο του μικροοργανισμού

στο τρόφιμο, την πιθανότητα να αναπτυχθεί κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του τροφίμου, καθώς και από τις συνθήκες και τη διάρκεια αποθήκευσης του τροφίμου. (Swaminathan et al., 2007)

Προϊόντα κρέατος και πουλερικά

Η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε νωπά ή μαγειρεμένα κρέατα και πουλερικά εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες, όπως είναι ο τύπος του κρέατος, το pH, η ενεργότητα νερού, το στέλεχος του παθογόνου καθώς και η παρουσία άλλων βακτηρίων σε αυτά τα τρόφιμα. Τα πουλερικά αποτελούν καλύτερο περιβάλλον για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο είδος κρέατος. Το ψητό βοδινό κρέας και τα ξηρά (ζυμούμενα) λουκάνικα είναι δύο τρόφιμα στα οποία ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται λιγότερο. Η μόλυνση του μυϊκού ιστού των ζώων από *L. monocytogenes* μπορεί να προκληθεί είτε στο ζώο πριν τη σφαγή είτε στο χώρο του σφαγείου μετά τη διαδικασία της σφαγής. Επειδή το παθογόνο συγκεντρώνεται και πολλαπλασιάζεται στο νεφρό, στο συκώτι και στο σπλήνα, η κατανάλωση των οργάνων αυτών του κρέατος μπορεί να είναι περισσότερο επικίνδυνη από την κατανάλωση του μυϊκού ιστού. Παράλληλα, η ευρεία εξάπλωση του μικροοργανισμού έχει διαπιστωθεί και στην επιφάνεια του ακατέργαστου κρέατος, καθιστώντας δύσκολη την αφαίρεση ή/και τη θανάτωσή του. (Matthews et al., 2017)

Κρεατοσκευάσματα έτοιμα προς κατανάλωση μπορούν επίσης να ευνοήσουν την ανάπτυξη του παθογόνου. Η παρουσία της *L. monocytogenes* σε αυτά τα προϊόντα εξαρτάται από το είδος του σκευάσματος και τη διεργασία παραγωγής του, από τα συστατικά του τροφίμου και άλλα ενδογενή χαρακτηριστικά του. Ορθώς ζυμούμενα λουκάνικα ή κρεατοσκευάσματα, καθώς και νωπό κρέας, το οποίο θα υποστεί την τυπική θερμική επεξεργασία χωρίς να υπάρχει κάποια εκ νέου επιμόλυνση, δεν αποτελούν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, καθώς δεν ευνοούν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Ωστόσο, έχουν καταγραφεί ορισμένες περιπτώσεις στις οποίες εντοπίστηκε η παρουσία του παθογόνου σε προϊόντα κρέατος έτοιμα για κατανάλωση. Η παρουσία του βακτηρίου σε αυτά τα προϊόντα οφείλεται κυρίως σε επιμόλυνσή τους ύστερα από την επεξεργασία τους στη μονάδα παραγωγής. Επίσης, η μόλυνση μπορεί να συμβεί κατά το λανθασμένο χειρισμό των προϊόντων σε καταστήματα λιανικής πώλησης ή σε καταστήματα εστίασης. (Lianou & Sofos, 2007)

Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα

Η κατανάλωση ακατέργαστου γάλακτος καθίσταται ανασφαλής για την υγεία του καταναλωτή. Παράλληλα, η χρήση του για την παραγωγή τροφίμων μπορεί να αποτελέσει δυνητική πηγή μόλυνσης από το παθογόνο. Μελέτες σχετικά με την αδρανοποίηση του μικροοργανισμού στο γάλα μέσω θέρμανσης έδωσαν αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την θερμοανθεκτικότητα και την ικανότητα του μικροοργανισμού να επιβιώνει σε υψηλές θερμοκρασίες. Παράλληλα, η ικανότητα του μικροοργανισμού να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, καθιστούν την κατανάλωση ακατέργαστων γαλακτοκομικών προϊόντων επικίνδυνη.

Η παστερίωση αποτελεί μια διεργασία σημαντική για την μείωση του αριθμού των κυττάρων του μικροοργανισμού σε νοπό γάλα, σε επίπεδα που δεν αποτελούν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, η παρουσία και η ανάπτυξη του παθογόνου σε παστεριωμένο γάλα οφείλεται σε επιμόλυνση του τροφίμου μετά την επεξεργασία, γεγονός που αποτελεί την κύρια ανησυχία. Παράλληλα η μη ορθή θερμοκρασιακή μεταχείριση μετά τη διαδικασία της παστερίωσης μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, με αποτέλεσμα οι πληθυσμοί του μικροοργανισμού να φτάνουν σε υψηλά επίπεδα ακατάλληλα για την δημόσια υγεία.

Όσον αφορά τα τυριά, η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να επιβιώνει κατά την παραγωγή και την ωρίμανσή τους, λόγω της θερμοκρασιακής αντοχής που εμφανίζει, της ικανότητάς της να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψύξης και της ανοχής της στο αλάτι. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση και την ανάπτυξη του παθογόνου είναι το είδος και το μέγεθος της καλλιέργειας, η παρουσία ή μη αντιμικροβιακών παραγόντων, καθώς και τα διάφορα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τυριού. Αξίζει να σημειωθεί πως ο μικροοργανισμός εντοπίζεται κυρίως στο τυρόπηγμα, ενώ η συμπεριφορά του επηρεάζεται από το είδος του τυριού. (Matthews *et al.*, 2017)

Ψάρια και οστρακοειδή

Η *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί από φρέσκα, κατεψυγμένα και έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα θαλασσιών. Το ποσοστό μόλυνσης ωμών ψαριών μπορεί να ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών και των μονάδων επεξεργασίας. Επιπλέον, οι μη τυποποιημένες διαδικασίες και οι διαφορετικές τεχνικές δειγματοληψίας αποτελούν τους συχνότερους παράγοντες που επηρεάζουν την

αναφερόμενη επικράτηση μόλυνσης. Παράλληλα, τα σφαγεία και ο τόπος δειγματοληψίας θεωρείται ότι επηρεάζουν τα αποτελέσματα ελέγχου του μικροοργανισμού.

Τα οστρακοειδή αποτελούν μια σημαντική πηγή τροφικής ασθένειας. Λόγω του τρόπου με τον οποίο τρέφονται, το κέλυφος μπορεί να συσσωρεύσει βακτήρια από μολυσμένα υδάτινα περιβάλλοντα. Η μετάδοση της *L. monocytogenes* μέσω αυτών των τροφίμων, είτε ως φορέας άμεσης πηγής, αποτελεί συστατικό ενός προτεινόμενου κύκλου για τη μόλυνση των ανθρώπων από το παθογόνο. Το βακτήριο αυτό έχει βρεθεί επίσης σε γαρίδες και προϊόντα γαρίδας, με την μόλυνση αυτών των τροφίμων να κυμαίνεται από χαμηλά επίπεδα έως 50%. Αν και αυτά τα προϊόντα μπορεί να περιέχουν το παθογόνο παράγοντα, δεν αποτελούν κίνδυνο για την πλειοψηφία των καταναλωτών, καθώς μαγειρεύονται γενικά πριν από την κατανάλωση.

Τα ελαφρά διατηρημένα προϊόντων θαλασσινών (LPSP) αποτελούν μια ευρεία ομάδα έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων με pH > 5,0 και NaCl < 6% στην υδατική φάση του προϊόντος. Κατά την τελευταία δεκαετία, η *L. monocytogenes*, έχει απομονωθεί από RTE και LPSP τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου του σολομού κρύου και θερμού καπνίσματος και ζυμούμενα ψάρια. Τα καπνιστά θαλασσινά αναγνωρίζονται ως δυνητικοί φορείς του παθογόνου. Επίσης αρκετοί παράγοντες έχουν ως αποτέλεσμα τη μόλυνση των προϊόντων καπνιστών θαλασσινών, όπως ο σχετικά υψηλός επιπολασμός του παθογόνου αμέσως μετά την τελική συσκευασία, η ικανότητα του να αναπτύσσεται στα τρόφιμα αυτά, η διαδικασία παραγωγής που παρέχει πολλαπλές δυνατότητες μόλυνσης ή επιμόλυνσης και η ανοχή του μικροοργανισμού σε θερμοκρασίες ψύξης για μεγάλες περιόδους. (Jami *et al.*, 2014)

Τέλος τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα θαλασσινών μπορεί να μολυνθούν από το παθογόνο παράγοντα και να καθίστανται ακατάλληλα για κατανάλωση. Πρόκειται για τρόφιμα τα οποία μπορούν να καταναλωθούν χωρίς να απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία ή μαγείρεμα. Η έλλειψη βαθμίδας θέρμανσης πριν από την κατανάλωση των τροφίμων απαιτεί καλές συνθήκες υγιεινής και κατάλληλες συνθήκες συντήρησης και αποθήκευσης, προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια αυτών των τροφίμων καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους. Η παρουσία της *L. monocytogenes*, σε αυτά τα προϊόντα μπορεί να οφείλεται σε μολυσμένες πρώτες ύλες ή σε διασταυρούμενη μόλυνση κατά τη διαδικασία μεταποίησης, συσκευασίας ή την διάθεση σε

καταστάματα λιανικής πώλησης. Η αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση συντηρητικών και προσθήκη οργανικών οξέων σε συνδυασμό με την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασίες ψύξης. Ωστόσο, όταν η μόλυνση προέρχεται από ένα ανθεκτικό στέλεχος του παθογόνου, τότε η στρατηγική αυτή συντήρησης των τροφίμων μπορεί να είναι αναποτελεσματική και έτσι να υπονομεύεται η ασφάλεια των τροφίμων και κατά επέκταση η υγεία των καταναλωτών. (Jami *et al.*, 2014; Matthews *et al.*, 2017)

1.7. Λιστερίωση

Το βακτήριο *L. monocytogenes* και η ασθένεια λιστερίωση που προκαλείται αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά σε πειραματόζωα στο Cambridge το 1924. Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι η ασθένεια επηρεάζει και τους ανθρώπους. Η ιδιαίτερη αύξηση του αριθμού των ανθρώπινων κρουσμάτων σε πολλές χώρες και τα δεδομένα που υπήρχαν για τη μετάδοση του παθογόνου μέσω της τροφής αποτέλεσαν την αφορμή για περαιτέρω μελέτη αυτής της ασθένειας. Η μελέτη αυτή οδήγησε στη κατανόηση της κατανομής του βακτηρίου μαζί με πολύ βελτιωμένες μεθόδους ανίχνευσης. Παράλληλα, υπήρξε πρόοδος στη κατανόηση της συνολικής νοσηρότητας, θνησιμότητας και επιδημιολογίας της νόσου, μαζί με την παθογένεια και τους μηχανισμούς της ασθένειας που χρησιμοποιούνται από το παθογόνο. (McLauchlin *et al.*, 2004)

Η επίπτωση της ασθένειας είναι δύσκολο να διαπιστωθεί, καθώς τα συμπτώματα μπορεί να θεωρηθούν εσφαλμένα ως γριπώδη νόσο ή γαστρεντερίτιδα και να μην έχουν ληφθεί οι κατάλληλες καλλιέργειες. Το 2006, η λιστερίωση αναγνωρίστηκε ως εθνικά γνωστοποιήσιμη ασθένεια από την Υπηρεσία Δημόσιας Υγείας του Καναδά. Μεταξύ του 1995 και 1999, σημειώθηκαν 25-51 κρούσματα ασθένειας ετησίως στο Καναδά. (Bortolussi, 2008) Τα ποσοστά θνησιμότητας ποικίλλουν από χώρα σε χώρα, αλλά πολλές περιπτώσεις ασθένειας με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας έχουν καταγραφεί κυρίως σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένων νεογνών, εγκύων γυναικών, ηλικιωμένων και ανοσοκατεσταλμένων ατόμων. (Muchaamba *et al.*, 2020)

Παθογένεια

Ένα χαρακτηριστικό της φυσικής ασθένειας τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα είναι συνήθως το χαμηλό ποσοστό προσβολής. Η ευαισθησία στη μόλυνση μπορεί να αυξηθεί από εξωτερικούς παράγοντες, όπως αναφέρθηκαν προηγουμένως. Υπάρχουν, ωστόσο, και άλλοι παράγοντες (άλλοι μολυσματικοί παράγοντες, η φύση της μήτρας του τροφίμου ή τα μεταβολικά προϊόντα άλλων μικροοργανισμών), οι οποίοι κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση αυτής της ευαισθησίας. Η γνώση της παθογόνου δράσης του μικροοργανισμού, πηγάζει κυρίως από επιδημιολογικά δεδομένα σε ανθρώπους και ζώα, καθώς και από μελέτες μόλυνσης σε διάφορα ζωικά μοντέλα.

Η ιστοπαθολογική ανάλυση υποδηλώνει ότι η εντερική οδός μπορεί να λειτουργήσει ως τόπος εισβολής για το παθογόνο, το οποίο στη συνέχεια μπορεί εύκολα να εισβάλει σε διάφορους τύπους επιθηλιακών και ινοβλαστικών κυττάρων που αναπτύσσονται *in vitro*. Στο τυφλό έντερο και στο κόλον των ζώων μετά από εμβολιασμό δια του στόματος, τα βακτήρια μπορούν να παρατηρηθούν μαζί με μια φλεγμονώδη αντίδραση σε φαγοκύτταρα που υπάρχουν στο lamina propria. Μετά από αυτή τη φάση, η εισβολή στο περιεχόμενο της μήτρας ή στο κεντρικό νευρικό σύστημα μπορεί να συμβεί πιθανώς μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Στη μη ενεργοποιημένη κατάστασή τους, μερικά βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν και να διαφύγουν στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου και στη συνέχεια να εξαπλωθούν στα ηπατοκύτταρα. Ο σχηματισμός εντοπισμένων βλαβών εμφανίζεται στο συκώτι και στο σπλήνα.

Η ενδομήτρια λοίμωξη του εμβρύου οφείλεται στην εξάπλωση του αιματογενούς διασποράς από τη μητέρα. Ο σχηματισμός αποστήματος λαμβάνει χώρα στο πλακούντα και μέσω της ομφαλικής φλέβας ή του αμνιακού υγρού μπορεί να εξαπλωθεί στα εσωτερικά όργανα του εμβρύου. Το βακτήριο *L.monocytogenes* συνήθως δεν είναι σε θέση να επιβιώσει και να αναπτυχθεί στο αμνιακό υγρό και η αναρρόφηση του βακτηρίου μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές αλλαγές στις αναπνευστικές οδούς του εμβρύου. Η παρουσία υψηλών αριθμών του οργανισμού στο αμνιακό υγρό έχει ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη μόλυνση των επιφανειακών σημείων του νεογνού και της μητέρας κατά τον τοκετό, καθώς και του μεταγεννητικού περιβάλλοντος, οδηγώντας σε πιθανές περιπτώσεις διασταυρούμενης νεογνικής μόλυνσης.

Μοριακές βιολογικές τεχνικές σε συνδυασμό με μοντέλα που χρησιμοποιούν μόλυνση σε πειραματόζωα και εισβολή σε κύτταρα θηλαστικών που αναπτύσσονται *in vitro* έχουν φέρει επανάσταση στην κατανόηση της διαδικασίας της παθογόνου δράσης του βακτηρίου. Σε κυτταρικό επίπεδο, πραγματοποιούνται τρεις διακριτές διεργασίες: η κυτταρική εισβολή, η διαφυγή από το ενδοκυτταρικό κενότοπιο και η κινητικότητα που βασίζεται στην ακτίνη, συμπεριλαμβανομένης της εξάπλωσης από κύτταρο σε κύτταρο.

Κυτταρική εισβολή

Η *L. monocytogenes* έχει τη δυνατότητα να εισβάλει σε έναν αριθμό μη φαγοκυτταρικών κυττάρων. Η εισβολή προκαλείται από δύο επιφανειακές πρωτεΐνες πλούσιες σε λευκίνη, οι οποίες ονομάζονται ιντερναλίνες, τις InlA και InlB. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες του κυττάρου- ξενιστή και μεσολαβούν στην προσκόλληση και την εσωτερίκευση. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη InlA εμπλέκεται στην διέλευση του εντερικού και μητρικού φραγμού και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη προσκόλλησης στην επιφάνεια των κυττάρων των θηλαστικών E-καντερίνη, η οποία για τον εντερικό ιστό, λαμβάνει χώρα στην άκρη της εντερικής λάχνης. Η πρωτεΐνη InlB είναι μια διαλυτή εξοκυτταρική πρωτεΐνη που προάγει την είσοδο του βακτηρίου στα επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, ηπατοκύτταρα και ινοβλαστικά κύτταρα. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρων, ο οποίος είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας σηματοδότησης που εμπλέκεται στην ανάπτυξη, μετανάστευση και διαφοροποίηση των κυττάρων των θηλαστικών. Ως αποτελέσματα αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι η ανατροπή των μοριακών κυτταροσκελετικών δομών και της δυναμικής της F-ακτίνης για τη δημιουργία συσταλτικών δυνάμεων, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την εισροή του βακτηρίου σε ένα ενδοκυτταρικό διαμέρισμα που συνδέεται με τη μεμβράνη.

Διαφυγή από το ενδοκυτταρικό κενοτόπιο

Το παθογόνο έχει την ικανότητα να διαφύγει από το δεσμευμένο στη μεμβράνη διαμέρισμα, το οποίο διαλύεται με τη δράση μιας ενεργοποιημένης με θειόλη αιμολυσίνης. Αυτό επιτυγχάνεται με αλληλεπίδραση της μεμβράνης του ξενιστή με χοληστερόλη. Το βακτήριο παράγει επίσης δύο φωσφολιπάσες (PlcA και PlcB), η μία εκ των οποίων ενεργοποιείται από μια μεταλλοπρωτεάση που παράγεται επίσης από το βακτήριο. Η συνδυασμένη δράση της αιμολυσίνης και μιας φωσφολιπάσης συμβάλλει επίσης στη διαδικασία διαφυγής από διαμερίσματα που συνδέονται με τη μεμβράνη, ειδικά όταν εξαπλώνονται από κύτταρο σε κύτταρο.

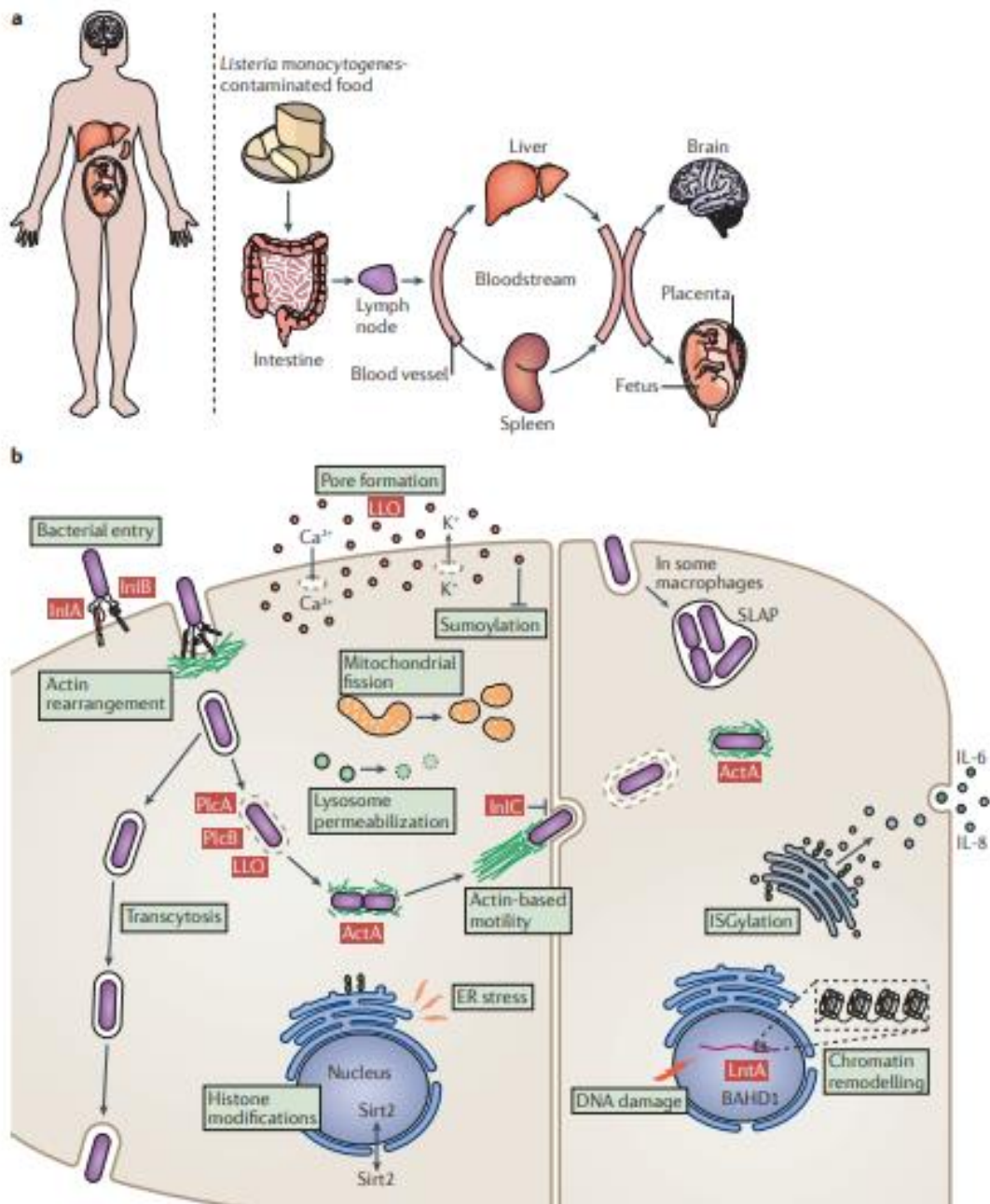
Κινητικότητα με βάση την ακτίνη, συμπεριλαμβανομένης της εξάπλωσης από κύτταρο σε κύτταρο

Ο μικροοργανισμός, μετά την λύση των πρωτογενών χυμοτοπίων, εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή, όπου πολλαπλασιάζεται. Τα κύτταρα του παθογόνου έχουν την ασυνήθιστη ικανότητα να χρησιμοποιούν τα μόρια ακτίνης του

ξενιστή για να διασχίσουν τα ανθρώπινα κύτταρα. Για το λόγο αυτό, μόλις εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, το βακτήριο περιβάλλεται από πολυμερισμένη ακτίνη του κυττάρου-ξενιστή, η οποία πολυμερίζεται από την πρωτεΐνη της επιφάνειας του κυττάρου, ActA. Ο πολυμερισμός της ακτίνης προσδίδει ενδοκυτταρική κινητικότητα στο βακτήριο που επιτρέπει την εισβολή σε ένα γειτονικό κύτταρο του ξενιστή. Το βακτήριο στη συνέχεια ενθυλακώνεται σε ένα διαμέρισμα με διπλή μεμβράνη και όλη η διαδικασία επαναλαμβάνεται χωρίς το βακτήριο να εισέλθει σε εξωκυτταρικό περιβάλλον.

Μοριακή οργάνωση γονιδίων μολυσματικότητας

Τα γονίδια που εμπλέκονται στη παθογένεια βρίσκονται όλα μαζί σε ένα μόνο οπερόνιο (plcA, hly, μεταλλοπρωτεάση, actA και plcB), τα οποία ρυθμίζονται από τον ρυθμιστικό παράγοντα rpfA που βρίσκεται στο ίδιο οπερόνιο. Το γονίδιο αυτό ρυθμίζει επίσης τα γονίδια InlA και InlB, τα οποία βρίσκονται πολύ κοντά στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Το ένζυμο τροποποίησης της πεπτιδογλυκάνης PgdA αποκετυλιώνει τα υπολείμματα N-ακετυλογλυκοζαμίνης του κυτταρικού τοιχώματος του παθογόνου και προσδίδει αντίσταση στη λυσοζύμη, ενώ οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο εξασθενούν σε μεγάλο ποσοστό. (McLauchin *et al.*, 2014)



Εικόνα 2. Επισκόπηση της μόλυνσης από *Listeria monocytogenes*. **(α)** Σχηματική λοίμωξη από *Listeria monocytogenes* ενός ανθρώπου. Ύστερα από την κατάποση μολυσμένων τροφίμων, το βακτήριο μπορεί να διασχίσει το εντερικό φραγμό και να εξαπλωθεί στην κυκλοφορία του αίματος μέσω λεμφαδένων, προκειμένου να διαδοθεί στους ιστούς-στόχους, όπως το ήπαρ και ο σπλήνας. Σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, το βακτήριο μπορεί να διασχίσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ή τον εμβρυοπλακουντικό φραγμό και να προκαλέσει δυνητικά μηνιγγίτιδα, σήψη, πρόωρο τοκετό ή αποβολή. **(β)** Η *Listeria monocytogenes* εισέρχεται σε μη φαγοκυτταρικά κύτταρα, όπως τα επιθηλιακά, μέσω ενδοκυττάρωσης που προκαλείται από υποδοχείς και στις περισσότερες περιπτώσεις διαφεύγει από το κενοτόπιο. Στη συνέχεια το βακτήριο πολυμερίζει την ακτίνη και μπορεί να εξαπλωθεί από κύτταρο σε κύτταρο. (Radoshevich and Cossart, 2017)

Συμπτώματα και θεραπεία

Η κλινική εικόνα της λιστερίωσης δεν είναι πανομοιότυπη για όλους τους ανθρώπους. Τα αρχικά συμπτώματα της λοίμωξης περιλαμβάνουν μη ειδικά συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη, όπως ναυτία, εμετό, διάρροια και πυρετό. Υπάρχουν όμως λίγα κλινικά χαρακτηριστικά που είναι μοναδικά για τη λιστερίωση. Επομένως, οι κλινικοί γιατροί είναι απαραίτητο να εξετάσουν μια ποικιλία πιθανών αιτιών μόλυνσης, συμπεριλαμβανομένων των ιογενών λοιμώξεων (γρίπη) και άλλων βακτηριακών λοιμώξεων που μπορεί να προκαλέσουν σήψη ή μηνιγγίτιδα. Οι παράγοντες που καθορίζουν την ένταση των συμπτωμάτων της ασθένειας είναι η ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, ο πληθυσμός των βακτηρίων που εισέρχονται σε αυτόν και η μολυσματικότητα του παθογόνου. (Bortolussi, 2008)

Εκτός από την κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο έμβρυο, οι περισσότερες περιπτώσεις λιστερίωσης ξεκινούν με την κατανάλωση ενός μολυσμένου τροφίμου με *L. monocytogenes*. Οι περισσότεροι υγιείς ενήλικες και παιδιά που καταναλώνουν μολυσμένα τρόφιμα εμφανίζουν μόνο ήπια έως μέτρια συμπτώματα. Λίγα άτομα με φυσιολογική ανοσοποιητική λειτουργία μπορούν να εμφανίζουν σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή μορφές λιστερίωσης, οι οποίες χαρακτηρίζονται από σηπτικό σοκ, μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα.

Αντίθετα, τα άτομα με ανεπαρκή ανοσοποιητική λειτουργία διατρέχουν πολύ μεγαλύτερο κίνδυνο σοβαρών μορφών λιστερίωσης. Στις ομάδες υψηλού κινδύνου περιλαμβάνονται οι έγκυες γυναίκες, τα νεογέννητα, οι ηλικιωμένοι άνθρωποι και άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Άτομα με χρόνιες ασθένειες ή που υποβάλλονται σε ανοσοκατασταλτική θεραπεία, διαβητικοί ή καρδιοπαθείς μπορούν επίσης να προσβληθούν ακόμη και από χαμηλούς πληθυσμούς του παθογόνου.

Οι έγκυες γυναίκες με λιστερίωση μπορεί να έχουν μόνο ήπια συμπτώματα της λοίμωξης. Ωστόσο, διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να πάθουν αποβολή κατά το πρώτο τρίμηνο ή να γεννήσουν πρόωρο βρέφος με οξεία σήψη, σε περίπτωση που εκτεθούν αργότερα στην εγκυμοσύνη. Τα νεογνά μπορεί να εμφανιστούν κλινικά με πρώιμες ή όψιμες έναρξης μορφές λοίμωξης. Εκείνα που έχουν τη πρώιμη μορφή συχνά διαγιγνώσκονται τις πρώτες 24 ώρες της ζωής τους με σήψη. Η πρώιμη λιστερίωση αποκτάται συχνότερα από τη μητέρα μέσω διαπλακουντιακής μετάδοσης. Η όψιμη νεογνική λιστερίωση είναι λιγότερο συχνή από την πρώιμη μορφή. Τα κλινικά

συμπτώματα μπορεί να είναι διακριτικά και περιλαμβάνουν ευερεθιστικότητα, πυρετό και κακή σίτιση. Ο τρόπος απόκτησης της όψιμης μορφής λιστερίωσης είναι ελάχιστα κατανοητός, εμπλέκεται όμως η απόκτηση του μικροοργανισμού μετά τη γέννηση, καθώς δεν υπάρχει μητρική λοίμωξη σε τέτοιες περιπτώσεις. (Bortolussi, 2008)

Διάφορα αντιβιοτικά έχουν προταθεί για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Η χρήση των αντιβιοτικών εξαρτάται από την κλινική κατάσταση του ασθενή. Ωστόσο, θεραπευτική αποτελεσματικότητα μιας συμβατικής θεραπείας εξακολουθεί να μην είναι πλήρως ικανοποιητική, λόγω της ικανότητας του βακτηρίου να μολύνει διαφορετικά κύτταρα του ξενιστή και να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται εντός αυτών. Μεταξύ των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται είναι η αμπικιλίνη, η πενικιλίνη, η τετρακυκλίνη, η ερυθρομυκίνη και η βανκομυκίνη. (McLauchin *et al.*, 2014)

Επιδημιολογία

Οι περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης και ο αριθμός των επιδημιών που οδήγησαν σε πολλούς θανάτους είχαν αυξηθεί σημαντικά σε πολλές χώρες. Η αύξηση αυτή αποδόθηκε κυρίως στην αλλαγή των καταναλωτικών συμπεριφορών, καθώς πολλοί άνθρωποι καταναλώνουν τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση. Παράλληλα, η παγκοσμιοποίηση του εμπορίου τροφίμων και οι δημογραφικές αλλαγές, όπως η αύξηση των ευπαθών πληθυσμών λόγω γήρανσης και η ύπαρξη λοιμώξεων που υποβαθμίζουν το ανοσοποιητικό, έχουν αυξήσει τον κίνδυνο λιστερίωσης. (Shamloo *et al.*, 2019)

Μελέτες επιδημιολογικής επιτήρησης έδειξαν ότι η γεωγραφική κατανομή της ανθρώπινης λιστερίωσης περιορίζεται κυρίως σε υψηλού εισοδήματος και βιομηχανικές χώρες λόγω του κατάλληλου συστήματος επιτήρησης για τις τροφιμογενείς ασθένειες. Στον Πίνακα φαίνεται η συνολική συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας ανά 100.000 άτομα σε διάφορες ανεπτυγμένες χώρες. Η επιτήρηση της ανθρώπινης λιστερίωσης που διενεργήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) για την περίοδο 2006-2012 σε 18 κράτη μέλη ανέφερε ποσοστό κοινοποίησης 0,41 κρουσμάτων ανά 100.000 πληθυσμού. Υψηλότερα ποσοστά κοινοποίησης εντοπίστηκαν στην Φιλανδία, Ισπανία και Δανία με ποσοστό νοσηλείας 91,6% κατά μέσο όρο. Αυξημένη συχνότητα παρατηρήθηκε επίσης στην Ελλάδα (0,3), τη Σουηδία (0,2), τη Νορβηγία (1,0), τη Γαλλία (0,6) και τη Σκανδιναβία (0,2). Η αύξηση αυτή

αποδόθηκε στο ηλικιακό προφίλ των ανθρώπων (≥ 60 έτη), καθώς και στην αυξημένη κατανάλωση καπνιστών ψαριών σε αυτές τις χώρες. Ταυτόχρονα η ΕΕ διεξήγαγε έρευνα σε 26 κράτη μέλη την περίοδο 2010-2011, προκειμένου να προσδιοριστεί ο επιπολασμός του παθογόνου μικροοργανισμού σε προϊόντα διατροφής που βρίσκονται σε καταστήματα λιανικής πώλησης. Στην έρευνα αυτή ελέγχθηκαν 13.088 δείγματα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων καπνιστών ψαριών (3053, προϊόντων κρέατος (3530) και διάφορων τύπων τυριού (3452).

Πίνακας 1. Σημαντικά περιστατικά λιστερίωσης που μεταδίδονται μέσω προϊόντων κρέατος στον κόσμο. (Matle et al., 2020)

Countries/regions	Period	Incidence of listeriosis per 100 000 people	Reference
Canada	1990–1998	0.18–0.34	Todd and Notermans (2011)
England-Wales	1990–2000 2001–2009	0.21; 0.36	Jadhav (2015)
European Union	2000–2005	0.10–0.30	Jadhav (2015)
Belgium	2000–2005	0.43–0.86	Goulet et al. (2008)
Finland	2000–2005	0.35–0.79	Goulet et al. (2008)
Sweden	2000–2005	0.44–0.75	Goulet et al. (2008)
Germany	2001; 2005	0.26; 0.62	Jadhav (2015)
Switzerland	2001–2005	0.38–0.98	Goulet et al. (2008)
Netherlands	2002–2005	0.20–0.56	Doorduyn et al. (2006) Goulet et al. (2008)
US	2004–2009	0.25–0.32	Silk et al. (2013)
Denmark	2005–2008	0.52–0.85	Goulet et al. (2008)
New Zealand	2009–2010	0.50–0.60	Cruz et al. (2011)
Japan	2008–2011	0.14	Miya et al. (2015)

Το ποσοστό κοινοποίησης της ανθρώπινης λιστερίωσης που εντοπίστηκε στις ΗΠΑ ήταν 0,3 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα, το οποίο ήταν παρόμοιο με αυτό που εντοπίστηκε στον Καναδά και τη Νέα Ζηλανδία. Στις ΗΠΑ, αναφέρεται ότι περίπου 1.600 άνθρωποι παθαίνουν λιστερίωση ετησίως, ενώ το ποσοστό θνησιμότητας είναι 21%. Σχεδόν όλοι οι θάνατοι αφορούσαν άτομα που ανήκαν σε ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως οι έγκυες γυναίκες, ηλικιωμένοι και ανοσοκατεσταλμένα άτομα. (Matle et al., 2020)

Σύμφωνα με έρευνα της EFSA, το 2019 αναφέρθηκαν συνολικά 2.621 επιβεβαιωμένα κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης. Συγκεκριμένα, 1.803 επιβεβαιωμένα κρούσματα λιστερίωσης εντοπίστηκαν εγχώρια (δηλαδή εντός της χώρας καταγωγής), τα οποία αποτελούσαν το 99,3% του αριθμού των αναφερόμενων

κρουσμάτων της ασθένειας που εντοπίστηκαν στην ΕΕ (εγχώρια ή μετάδοση μέσω ταξιδιών εντός ΕΕ) κατά το 2019.

Την περίοδο 2010-2019, παρατηρήθηκε εποχιακό μοτίβο στα κρούσματα λιστερίωσης που αναφέρθηκαν στην ΕΕ, όπου τους καλοκαιρινούς μήνες να εντοπίστηκαν υψηλές αιχμές, ακολουθούμενες από μικρότερες το χειμώνα. Κατά τη περίοδο 2015-2019, η τάση των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων λιστερίωσης ήταν σταθερή. Ωστόσο τρία κράτη μέλη (Εσθονία, Πολωνία και Πορτογαλία) παρουσίασαν σημαντικά αυξητική τάση, ενώ η Ελλάδα ήταν το μόνο κράτος μέλος που ανέφερε πτωτική τάση.

Το 2015, τα μεγαλύτερα ποσοστά παρατήρησης της λιστερίωσης εμφανίστηκαν σε ηλικιωμένους άνω των 65 ετών και στα παιδιά κάτω του 1 έτους. Παράλληλα, μεγαλύτερο ποσοστό κρουσμάτων λιστερίωσης αφορούσαν άνδρες ηλικίας 65-74, σε αντίθεση με τις γυναίκες αντίστοιχου ηλικιακού προφίλ. (EFSA,2021)

Το παθογόνο απομονώθηκε από όλες τις κατηγορίες τροφίμων και όλα αυτά έχουν συσχετιστεί με μεγάλο αριθμό κρουσμάτων, αλλά το γάλα και ειδικότερα τα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς και προϊόντα έτοιμα προς κατανάλωση έχουν εμπλακεί επανειλημμένες φορές. Κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και παγωτού συνδέονται με χαμηλά έως μέτρια ποσοστά κρουσμάτων από το παθογόνο. (Shamloo *et al.*, 2019)

Εντός του είδους του μικροοργανισμού φαίνεται να υπάρχουν διαφορές ως προς την ιογόνο δράση μεταξύ των στελεχών. Επιδημιολογικά δεδομένα αναφέρουν ότι όλα τα στελέχη του παθογόνου δεν έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες στον άνθρωπο. Από τους συνολικά 13 ορότυπους μόνο οι 3 (1/2a, 1/2b και 4b) θεωρούνται υπεύθυνοι για το 98% των περιπτώσεων λιστερίωσης στον άνθρωπο. Ταυτόχρονα, τα κρούσματα λιστερίωσης που προκλήθηκαν με την κατανάλωση τροφίμων, καθώς και η πλειονότητα των σποραδικών περιπτώσεων, οφείλονται στα στελέχη του ορότυπου 4b. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα στελέχη αυτά μπορεί να έχουν μοναδικές μολυσματικές ιδιότητες. (Dortet *et al.*, 2019)

1.8. Νομοθεσία- Αγορανομικοί Κανονισμοί

Η νομοθεσία με την οποία ορίζεται το πλαίσιο αποδοχής της παρουσίας της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα βασίζεται στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων. Ο κανονισμός αυτός καθορίζει τα μικροβιολογικά κριτήρια για συγκεκριμένους μικροοργανισμούς και τους κανόνες εφαρμογής προς τους οποίους πρέπει να συμμορφώνονται οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων.

Σύμφωνα με τον συγκεκριμένο κανονισμό διακρίνονται οι εξής κατηγορίες:

- i. Τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση που προορίζονται για βρέφη και ειδικούς ιατρικούς σκοπούς. Το αποτέλεσμα θεωρείται ικανοποιητικό, εάν όλες οι τιμές που παρατηρούνται υποδεικνύουν απουσία του βακτηρίου σε προϊόντα που διατίθενται στην αγορά.
- ii. Τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του παθογόνου διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς. Το αποτέλεσμα θεωρείται ικανοποιητικό όταν κατά την εξέταση του τροφίμου πριν αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης τροφίμων που το παρήγαγε το βακτήριο απουσιάζει σε 25 gr προϊόντος σε όλες τις μονάδες του δείγματος που ελέγχονται ή κατά την εξέταση σε προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους ο μικροοργανισμός δεν υπερβαίνει το όριο των 100 cfu/gr σε όλες τις μονάδες του δείγματος που ελέγχονται.
- iii. Τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του παθογόνου διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς. Το αποτέλεσμα θεωρείται ικανοποιητικό όταν κατά την εξέταση σε προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους ο μικροοργανισμός δεν υπερβαίνει το όριο των 100cfu/gr σε όλες τις μονάδες του δείγματος που ελέγχονται.

Στις κατηγορίες (i) και (iii) οι τακτικές δοκιμές δεν είναι συνήθως χρήσιμες για τα τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωσης που έχουν υποστεί θερμική ή άλλη επεξεργασία αποτελεσματική για να σκοτώσει το παθογόνο, εφόσον δεν γίνει επιμόλυνση ύστερα από την επεξεργασία μέσα στη τελική τους συσκευασία. Παράλληλα, τακτικές δοκιμές δεν χρησιμεύουν για τρόφιμα όπως νωπά, ατεμάχιστα και μη επεξεργασμένα λαχανικά

και φρούτα, ψωμί, μπισκότα και παρόμοια προϊόντα, εμφιαλωμένο ή συσκευασμένο νερό, αναψυκτικά, αλκοολούχα ποτά, ζάχαρη, μέλι, προϊόντα σοκολάτας και ζώντα δίθυρα μαλάκια.

Ταυτόχρονα στη κατηγορία (iii) ανήκουν 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 πέντε ημέρες. Ωστόσο, άλλες κατηγορίες προϊόντων μπορούν να ανήκουν επίσης σ' αυτή τη κατηγορία, εφόσον αποδεικνύεται επιστημονικά.

Στην κατηγορία (ii) το κριτήριο των 100 cfu/gr εφαρμόζεται στη περίπτωση που ο παρασκευαστής μπορεί να αποδείξει, ικανοποιώντας την αρμόδια αρχή, ότι το προϊόν δεν θα υπερβεί το όριο των 100 cfu/gr καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησης του τροφίμου. Ο υπεύθυνος της επιχείρησης τροφίμων μπορεί να ορίσει ενδιάμεσα όρια κατά τη διάρκεια της διαδικασίας τα οποία πρέπει να είναι αρκετά χαμηλά, προκειμένου να εξασφαλίζεται ότι δεν υπερβαίνει το όριο των 100 cfu/gr καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησης. Όσον αφορά το κριτήριο απουσίας του μικροοργανισμού σε 25gr προϊόντος, αυτό εφαρμόζεται για τα προϊόντα πριν αποδεσμευτούν από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης τροφίμων που τα παρήγαγε, όταν δεν μπορεί να αποδείξει, ικανοποιώντας την αρμόδια αρχή, ότι το προϊόν δεν θα υπερβαίνει το όριο των 100 cfu/gr καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησης.

Οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων έχουν την υποχρέωση να διασφαλίζουν ότι τα τρόφιμα πληρούν τα σχετικά μικροβιολογικά κριτήρια. Για το σκοπό αυτό, οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων πρέπει να λαμβάνουν μέτρα σε κάθε στάδιο της παραγωγής, επεξεργασίας και διανομής τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της λιανικής πώλησης. Όταν είναι απαραίτητο, οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων που είναι αρμόδιοι για την παρασκευή του προϊόντος διεξάγουν μελέτες προκειμένου να ελέγξουν τη συμμόρφωση προς τα κριτήρια καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησης. Οι μελέτες αυτές περιλαμβάνουν τις προδιαγραφές των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του προϊόντος όπως το pH, a_w , η περιεκτικότητα άλατος, η συγκέντρωση των συντηρητικών και ο τύπος συσκευασίας. Ταυτόχρονα λαμβάνονται υπόψη οι συνθήκες αποθήκευσης και μεταποίησης των τροφίμων καθώς και οι δυνατότητες επιμόλυνσης και η προβλεπόμενη διάρκεια διατήρησης. Είναι απαραίτητο να γίνεται αναδρομή στη διαθέσιμη επιστημονική βιβλιογραφία και δεδομένα έρευνας που είναι σχετικά με τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης και επιβίωσης των υπό εξέταση μικροοργανισμών. Με

βάση τις παραπάνω μελέτες, όταν είναι αναγκαίο, ο υπεύθυνος επιχείρησης τροφίμων μπορεί να διενεργεί πρόσθετες μελέτες, οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν προγνωστικά μαθηματικά μοντέλα καθιερωμένα για το εν λόγω τρόφιμο με τη χρήση συντελεστών κρίσιμης ανάπτυξης ή επιβίωσης για τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς στο προϊόν. Μπορούν επίσης να διεξαχθούν δοκιμές για τη διερεύνηση της ικανότητας του καταλλήλως ενοφθαλισμένου εξεταζόμενου μικροοργανισμού να αναπτύσσεται ή να επιβιώνει στο προϊόν υπό διαφορετικές λογικά προβλεπόμενες συνθήκες αποθήκευσης. Στις επιπρόσθετες μελέτες μπορεί να περιλαμβάνονται και μελέτες για την αξιολόγηση της ανάπτυξης ή της επιβίωσης των εξεταζόμενων μικροοργανισμών που μπορεί να εντοπίζονται στο προϊόν κατά τη διάρκεια διατήρησης υπό τις λογικά προβλεπόμενες συνθήκες διανομής, αποθήκευσης και χρήσης του προϊόντος. Οι παραπάνω μελέτες να λαμβάνουν υπόψη την εγγενή διακύμανση που συνδέεται με το προϊόν, τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς καθώς και τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης του προϊόντος.

Όλες οι ανωτέρω μελέτες εφαρμόζονται κυρίως στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που είναι δυνατόν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* και μπορούν να παρουσιάζουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. (Κανονισμός 2073/2005)

1.9. Απόκριση σε θερμική καταπόνηση

Γενικά, ο όρος “καταπόνηση” περιγράφει την επίδραση υποθανάτιων διαδικασιών στα κύτταρα μικροοργανισμών. Η θερμική επεξεργασία αποτελεί μία από τις σημαντικές μεθόδους που ακολουθούνται στη βιομηχανία τροφίμων. Υπάρχουν διάφορα επίπεδα θερμικής καταπόνησης, τα οποία ανάλογα με την ένταση και το χρόνο εφαρμογή τους, μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικά αποτελέσματα. Η απόκριση του βακτηρίου στη θερμική καταπόνηση μπορεί να προκαλέσει αυξημένη ανοχή αλλά και γενετική ποικιλότητα του μικροοργανισμού. Η εφαρμογή ήπιας μορφής θερμικής καταπόνησης προκαλεί μείωση του ρυθμού μικροβιακής ανάπτυξης, χωρίς όμως τα κύτταρα να χάνουν τη βιωσιμότητά τους. Μέτριας έντασης θερμική καταπόνηση μπορεί να προκαλέσει είτε τον τραυματισμό μεγάλου ποσοστού μικροβιακών κυττάρων είτε το θάνατό τους. Αντίθετα, η εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών οδηγεί σε μη αναστρέψιμο τραυματισμό, οδηγώντας στο θάνατο της πλειοψηφίας ή όλου του μικροβιακού πληθυσμού που εκτίθεται σε αυτές τις καταπονήσεις.

Η επιβίωση και η θερμική αντίσταση σε διαφορετικές συνθήκες θερμικής καταπόνησης επηρεάζεται από παράγοντες, όπως είναι το στέλεχος του μικροοργανισμού, η έκθεση σε μη θανατηφόρα (non-lethal) θερμοκρασία, το όξινο περιβάλλον και η σύσταση του μέσου. Με τη πάροδο του χρόνου, έχουν διατυπωθεί διάφορα μοντέλα, τα οποία μπορούν να προβλέψουν τις συνέπειες των μεταβολών ορισμένων εκ των παραπάνω παραγόντων στην θερμοαντοχή του βακτηρίου. (Doyle *et al.*, 2001)

Όσον αφορά την επεξεργασία του κρέατος και των πουλερικών, έχει διαπιστωθεί ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να εξαλειφθεί κατά τη θερμική επεξεργασία. Ορισμένες μελέτες, όμως, υποστηρίζουν ότι η διαδικασία παστερίωσης πολλές φορές δεν είναι ικανή να θανατώσει το παθογόνο μικροοργανισμό. Η αποτελεσματικότητα των διάφορων μεθόδων θέρμανσης μπορεί να επηρεαστεί από τα χαρακτηριστικά του κρέατος, όπως το pH του, η περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες, η συγκέντρωση του άλατος και η απουσία αντιμικροβιακών ουσιών, την πηγή της θέρμανσης, τον ρυθμό και την ένταση της έκθεσης των κυττάρων στις καταπονήσεις. Τα βακτηριακά κύτταρα του παθογόνου αποκτούν υψηλή θερμοανθεκτικότητα, όταν εκτεθούν σε μη θανατηφόρες θερμοκρασίες για το βακτήριο, προτού υποβληθούν στην τελική θερμοκρασία και στον τελικό χρόνο παστερίωσης. Οι παράγοντες που συμβάλλουν στην θερμοανθεκτικότητα του βακτηρίου είναι οι πρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται ως “heat-shock”, καθώς και η ημίρρευστη μεμβράνη του βακτηρίου. (Farber and Peterkin, 1991).

Απόκριση θερμικού στρες (Heat shock response)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, όταν τα κύτταρα ή ολόκληροι μικροοργανισμοί εκτεθούν σε μη θανατηφόρες θερμοκρασίες για ορισμένο χρονικό διάστημα, αποκτούν μια ανεκτικότητα σε μια επακόλουθη θερμική επεξεργασία. Πρόκειται για έναν προστατευτικό μηχανισμό που είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των μικροοργανισμών και την προσαρμογή τους σε μη ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες. (Roncarati and Scarlato, 2017) Η παρατηρούμενη αυτή αύξηση της θερμοαντοχής του μικροοργανισμού έχει αποδοθεί στην παραγωγή ενός αριθμού ειδικών πρωτεϊνών που ονομάζονται « πρωτεΐνες θερμικού στρες» (“*heat shock proteins*”) από τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας. Εκτός, όμως, από το ρόλο τους στην προστασία των κυττάρων από μη ευνοϊκές

περιβαλλοντικές συνθήκες, ορισμένες HSPs αποτελούν σημαντικούς παράγοντες λοιμογόνου δράσης, ενώ άλλες φαίνεται να επηρεάζουν έμμεσα την παθογένεση των μικροοργανισμών. (Maleki *et al.*, 2016; Roncarati and Scarlato, 2017)

Η πρώτη περιγραφή της απόκρισης θερμικού στρες έγινε το 1962 από τον Ritossa (Ritossa, 1962), ως ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε στα πολυτενικά χρωμοσώματα των σιελογόν αδένων των μυγών *Drosophila melanogaster* όταν μετακινήθηκαν από την ευνοϊκή θερμοκρασία ανάπτυξής τους στους 37° C. Η απόκριση θερμικού στρες προκαλείται με την σύνθεση μιας ομάδας πρωτεϊνών που βοηθούν το κύτταρο να επιβιώσει υπό συνθήκες που κανονικά θεωρούνται θανατηφόρες. Κατά την εφαρμογή του στρες, το κομμάτι των κυττάρων που επηρεάζεται κυρίως είναι η ομοιόσταση των κυτταρικών πρωτεϊνών, θέτοντας σε κίνδυνο την ακεραιότητά τους. Οι HSPs εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες στα βακτηριακά κύτταρα, όπως είναι η υποβοήθηση της αναδίπλωσης πρωτεϊνών που έχουν συντεθεί πρόσφατα, η αποτροπή συσσώρευσης πρωτεϊνών υπό συνθήκες στρες και η ανάκτηση πρωτεϊνών που ξεδιπλώθηκαν μερικώς ή πλήρως εξαιτίας του στρες.

Παράλληλα, ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες είναι απαραίτητες κατά τη διάρκεια φυσιολογικής ανάπτυξης του μικροοργανισμού, ενώ βρίσκονται σε αφθονία σε όλες τις μεταβολικές συνθήκες. Οι GroEL και DnaK, αντιπρόσωποι των βακτηρίων των δύο μεγάλων οικογενειών πρωτεϊνών-συνοδών Hsp60 και Hsp70, αντίστοιχα, έχουν σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών ακόμη και σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, με πιο σημαντική, όμως, να είναι η δράση τους κατά τη διάρκεια του στρες. Ενώνουν υδρόφοβες επιφάνειες των ξεδιπλωμένων πρωτεϊνών και μαζί με συμπαράγοντες (GroES και DnaJ-GrpE) και την υδρόλυση του ATP, προάγουν την απόκτηση σωστής αναδίπλωσης από τα πολυπεπίδια του υποστρώματος μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Οι GroEL συγκεντρώνονται σε ένα κυλινδρικό σύμπλεγμα για να σχηματίσουν δύο επταμερικούς δακτυλίους που περικλείουν ολόκληρη τη πρωτεΐνη υποστρώματος σε μια μεγάλη κοιλότητα, δίνοντας στο πολυπεπίδιο την ευκαιρία να διπλωθεί χωρίς να υπάρχουν αλληλεπιδράσεις με οποιαδήποτε άλλη πρωτεΐνη. Αντίθετα, οι DnaK είναι κυρίως μονομερείς, ασκώντας τη δράση τους δεσμεύοντας σύντομες επιφανειακά εκτεθειμένες υδρόφοβες αλληλουχίες αμινοξέων.

Μια άλλη ομάδα πρωτεϊνών που εκφράζεται από το βακτηριακό κύτταρο κατά τη διάρκεια του στρες αποτελείται από πρωτεάσες. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες ουσιαστικά για την αφαίρεση κατεστραμμένων πολυπεπτιδίων από τα στρεσογόνα κύτταρα. Ορισμένες πρωτεάσες είναι συστήματα πολλαπλών συστατικών, στα οποία μια καταλυτική υπομονάδα (π.χ. ClpP και HslV) συνδέεται με υπομονάδες αναγνώρισης του υποστρώματος, οι οποίες είναι ικανοί συνοδοί για να αναδιαμορφώσουν πολυπεπτίδια του υποστρώματος κατά την υδρόλυση του ATP και να τα οδηγήσουν σε πρωτεολυτική αποικοδόμηση.

Οι μικρές πρωτεΐνες θερμικού στρες αποτελούν μια εξαιρετικά ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών της οποίας η έκφραση προκαλείται μόνο υπό συνθήκες στρες. Ο κύριος ρόλος τους είναι να δεσμεύουν και να προστατεύουν τις ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες, διατηρώντας τις σε μια διαμόρφωση που δεν υπόκειται σε αποικοδόμηση, μέχρι να αναδιπλωθούν αποτελεσματικά από πρωτεΐνες-συνοδούς, εξαρτώμενες από ATP.

Τέλος, ορισμένες πρωτεΐνες θερμικού στρες έχουν προταθεί ως σημαντικοί λοιμογόνοι παράγοντες, ενώ άλλες φαίνεται να επηρεάζουν έμμεσα την παθογένεια του μικροοργανισμού. Για παράδειγμα, οι GroEL1 του *Mycobacterium smegmatis*, εμπλέκονται στη σύνθεση του μυκολικού οξέος και στο σχηματισμό biofilms. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες-συνοδοί έχουν την ικανότητα σηματοδότησης από κύτταρο σε κύτταρο, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις μπορούν να επάγουν τη σύνθεση προφλεγμονωδών κυτοκινών και να προάγουν την απόπτωση.

Τραυματισμός και ανάκτηση της L. monocytogenes κατά τη θερμική επεξεργασία

Όταν οι μικροοργανισμοί υπόκεινται σε διάφορα στρες, όπως η θερμότητα, η κατάψυξη, η ακτινοβολία και τα απολυμαντικά, τα κύτταρα τραυματίζονται. Γενικά, τα τραυματισμένα κύτταρα δεν έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν σε επιλεκτικά μέσα, στα οποία μπορούν να ανακτηθούν εκείνα τα οποία δεν έχουν τραυματιστεί. Οι μηχανισμοί τραυματισμού των κυττάρων μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο του περιβαλλοντικού στρες, στο οποίο εκτίθενται τα κύτταρα.

Κατά την θερμική επεξεργασία, εκτός από το μεταβολικό τραυματισμό, προκαλούνται βλάβες στο κυτταρικό τοίχωμα και τη κυτταρική μεμβράνη, στα ριβοσώματα, στο DNA και τις πρωτεΐνες. (Hurst, 1977) Συγκεκριμένα, η κυτταρική

μεμβράνη φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο από τη θερμότητα, λόγω των λιπιδικών συστατικών της, τα οποία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη θερμότητα. Παράλληλα, κατά την εφαρμογή θέρμανσης έχει διαπιστωθεί απώλεια νατρίου, καλίου και μαγνησίου από τα τραυματισμένα κύτταρα. Οι ζημιές στα ριβοσώματα, επίσης, τεκμηριώνεται και θεωρείται σημαντικό γεγονός λόγω της καταστροφής του 16S RNA. Μάλιστα, οι Strange και Shon (1964) ανέφεραν ότι η βλάβη των ριβοσωμάτων αρχικά οφειλόταν στην απώλεια μαγνησίου, το οποίο είναι απαραίτητο για την ακεραιότητα των ριβοσωμάτων, ενώ χρησιμεύει για την αναστολή μιας ριβονουκλεάσης. Η θερμότητα, επίσης, μπορεί να οδηγήσει στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών όπως είναι τα ένζυμα.

Η αξιολόγηση του τραυματισμού μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους. Συνήθως γίνεται με την απόκριση της ανάπτυξης ή μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε επιλεκτικά μέσα. Τα κύτταρα, που έχουν υποστεί υποθανάτιο τραυματισμό, χάνουν την δυνατότητά τους να σχηματίσουν ορατές αποικίες σε μέσα που περιέχουν επιλεκτικούς παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι το χλωριούχο νάτριο (NaCl), αντιβιοτικά, χολικά άλατα και θειώδες βισμούθιο. Συνήθως ο παράγοντας που επιλέγεται είναι το χλωριούχο νάτριο, καθώς δεν θεωρείται τοξικός για τον άνθρωπο, μη κοστοβόρο, εύκολα διαθέσιμο στην αγορά και εύκολο στη παρασκευή του. Ωστόσο, ο παράγοντας αυτός μπορεί να έχει επιρροή στο παράγοντα καταπόνησης, αλλοιώνοντας το πραγματικό αποτέλεσμα. (Smolka *et al.*, 1974) Για αυτό το λόγο, συνήθως χρησιμοποιούνται και άλλες τεχνικές, όπως η κυτταρομετρία ροής, οι μοριακές μέθοδοι, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε καλύτερη εκτίμηση του υποθανάτιου τραυματισμού. (Amor *et al.*, 2002).

Η διαδικασία ανάκτησης ορίζεται ως μια διαδικασία αποκατάστασης των ιδιοτήτων που χάθηκαν λόγω βλαβών από περιβαλλοντικά στρες. Για να γίνει η ανάκτηση των τραυματισμένων κυττάρων απαιτούνται ορισμένες συνθήκες. Αυτές περιλαμβάνουν την παρουσία συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών, pH, θερμοκρασία, δυναμικό οξειδοαναγωγής, ωσμωτικότητα ενεργότητα νερού, περιεκτικότητα σε άλατα, επιφανειακή τάση και οι συνθήκες αποθήκευσης.

2. Παρουσία της *Listeria monocytogenes* σε λουκάνικα frankfurters

2.1. Λουκάνικα Frankfurters

Τα λουκάνικα Φρανκφούρτης (Frankfurters), σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, ανήκουν στην κατηγορία των προϊόντων θερμικής επεξεργασίας. Σύμφωνα με τον κώδικα, τα προϊόντα αυτά υφίστανται θερμική επεξεργασία με αποτέλεσμα την πήξη των πρωτεϊνών μέχρι το κέντρο ελέγχου του προϊόντος. Η θερμική επεξεργασία μπορεί να γίνει με τη χρήση ξηρής ή υγρής θερμότητας ή συνδυασμός αυτών των δύο τεχνικών. Τα προϊόντα αυτά μπορεί να υφίστανται και κάπνισμα. Η περιεκτικότητα των προϊόντων αυτών σε λίπος πρέπει να είναι μικρότερη από 30% ως έχει. Παράλληλα, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες δεν πρέπει να είναι κατώτερη του 9% και η υγρασία δεν πρέπει να ξεπερνά το 55% στο τελικό προϊόν.

Τα λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης είναι λεπτά λουκάνικα, τα οποία παρασκευάζονται από χοιρινό και βοδινό κρέας. Πρόκειται για γαλακτώματα κρέατος, τα οποία διαμορφώνονται από μία διασπορά νερού, λίπους και πρωτεϊνών. Κατά τη θερμική επεξεργασία η διασπορά αυτή μετασχηματίζεται σε μια πρωτεϊνική πηκτή με διάσπαρτα σωματίδια λίπους. Τα τελευταία 20 χρόνια, η περιεκτικότητα λίπους έχει μειωθεί κατά 6% για το βοδινό κρέας και κατά 23% για το χοιρινό. Συνολικά η περιεκτικότητα το προϊόντος σε κρέας είναι αρκετά υψηλή, γύρω στο 80%. Το υπόλοιπο 20% αποτελείται από διάφορα καρυκεύματα, πρωτεΐνες και 15% νερό. (Jimenez-Colmenero, 1996)

Παλαιότερα, η διαδικασία θερμικής επεξεργασίας πραγματοποιούνταν πριν την παρασκευή λουκάνικων, μια διαδικασία που απαιτούσε την παραλαβή μεγάλων και καθαρών κομματιών κρέατος. Η διαδικασία αυτή ήταν αρκετά χρονοβόρα και κοστοβόρα. Σήμερα, η διαδικασία της θερμικής επεξεργασίας έχει βελτιωθεί σημαντικά, καθώς χρησιμοποιούνται φθηνότερα κομμάτια κρέατος καθώς και άλλα συστατικά, τα οποία ενισχύουν το αποτέλεσμα της θερμικής επεξεργασίας για μικρό χρονικό διάστημα. (Varnam & Sutherland, 1999)

Παραγωγή Λουκάνικων Φρανκφούρτης

Κατά τη παραγωγή των λουκάνικων Φρανκφούρτης λαμβάνουν χώρα διάφορες διεργασίες, καθεμία από τις οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καλή ποιότητα του τελικού προϊόντος.

Η πρώτη διαδικασία για την παραγωγή των λουκάνικων είναι η άλεση. Κατά τη διεργασία αυτή μεγάλα κομμάτια κρέατος αλέθονται μαζί με το λίπος, προκειμένου να σχηματίσουν μία άμορφη μάζα. Στη συνέχεια, τα κομμάτια που αποτελούνται από άπαχο κρέας και λίπος αναμειγνύονται για να πάρουν μια άμορφη κατανομή το ένα μέσα στο άλλο. Η δημιουργία αυτής της άμορφης μάζας γίνεται με τη χρήση κατάλληλου γαλακτωματοποιητή. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται προκειμένου να μειωθεί περαιτέρω το μέγεθος των σωματιδίων του κρέατος και να επιτευχθεί μια πολύ λεπτή υφή. Η θερμοκρασία πρέπει να είναι χαμηλότερη από 15°C, προκειμένου να μην διαχωριστεί το γαλάκτωμα. Αφού σχηματιστεί ομοιόμορφο γαλάκτωμα, στη συνέχεια τοποθετείται μέσα σε ειδικό περίβλημα, όπου και το λουκάνικο αποκτά το τελικό του σχήμα και μέγεθος. Τα περιβλήματα που συχνά χρησιμοποιούνται προέρχονται από το στομάχι και τα έντερα γουρουνιών, βοοειδών ή προβάτων, είναι βρώσιμα και επιτρέπουν τον καπνό και την υγρασία να διαπεράσουν το λουκάνικο κατά την επεξεργασία. Το γέμισμα γίνεται με τη χρήση ειδικών γεμιστικών μηχανημάτων, όπως αντλίες ή πιστόνια ή και με τα δύο μαζί. Στο τέλος του γεμίσματος το περίβλημα δένεται.

Μετά την παρασκευή των λουκάνικων ακολουθεί η διαδικασία της παστερίωσης. Σε αυτό το στάδιο, το γαλάκτωμα αποκτά στερεή μορφή δημιουργώντας μια πηκτή. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της παστερίωσης είναι το μέγεθος του προϊόντος, ο χρόνος, η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία και η κυκλοφορία του αέρα του θαλάμου, μέσα στον οποίο γίνεται η θερμική επεξεργασία. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται προσεκτικά προκειμένου να διασφαλιστεί ότι το προϊόν φτάνει σε μια συγκεκριμένη εσωτερική θερμοκρασία για καθορισμένο χρονικό διάστημα. Μετά τη παστερίωση τα λουκάνικα υποβάλλονται σε ξέπλυμα με κρύο νερό. Με τη διεργασία αυτή διατηρείται η υγρασία του προϊόντος και σταματά η θερμική επεξεργασία μειώνοντας τη θερμοκρασία του προϊόντος όσο το δυνατόν γρηγορότερα. Ταυτόχρονα, βοηθάς στην πρόληψη της συρρίκνωσης και ρυτίδωσης του περιβλήματος του προϊόντος. Μερικές φορές χρησιμοποιούνται αποφλοιωτές

προκειμένου να αφαιρεθούν μη βρώσιμα περιβλήματα από προϊόντα λουκάνικων κατά τα τελευταία στάδια της παραγωγικής διαδικασίας. Τέλος, το τελικό προϊόν λουκάνικου συσκευάζεται. Η συσκευασία συνήθως πραγματοποιείται με το τύλιγμα του τελικού προϊόντος σε πλαστική μεμβράνη υπό κενό. Με τη διαδικασία της συσκευασίας το προϊόν προστατεύεται από διασταυρούμενες μολύνσεις, ενώ παράλληλα επιβραδύνεται η αλλοίωσή του, η οποία προκαλείται από την επαφή με τον αέρα.

2.2. Επιμόλυνση λουκάνικων Φρανκφούρτης με *Listeria monocytogenes*

Ο έλεγχος του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στις βιομηχανίες παραγωγής προϊόντων κρέατος είναι μια διαρκής και σημαντική πρόκληση. Γενικά, ανάλογα με την μέθοδο παραγωγής που ακολουθείται, τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο επιρρεπή σε μικροβιολογικούς κινδύνους. Ιδιαίτερα τα προϊόντα, τα οποία είναι πλήρως μαγειρεμένα για άμεση κατανάλωση ή απαιτούν προηγουμένως ένα ελάχιστο περαιτέρω χειρισμό, εκτίθενται σε μικροβιολογικούς κινδύνους, καθώς η διαδικασία μαγειρέματος και η γρήγορη περίοδος προετοιμασίας δεν περιορίζουν πλήρως την πιθανότητα έκθεσης αυτών των προϊόντων σε αυτούς τους κινδύνους. (Castrica *et al.*, 2021) Συνεπώς, ορθές βιομηχανικές πρακτικές και πρακτικές υγιεινής και προγράμματα HACCP έχουν υιοθετηθεί και εφαρμοστεί στις μονάδες επεξεργασίας και παραγωγής των προϊόντων, προκειμένου να παραχθούν ασφαλή προς κατανάλωση προϊόντα. Ωστόσο, δεν εξασφαλίζεται η πλήρης εξάλειψη του παθογόνου μικροοργανισμού, καθώς το βακτήριο μπορεί να εμφανίσει ανθεκτικότητα σε συνθήκες που χρησιμοποιούνται ως θεμελιώδεις στρατηγικές στη συντήρηση τροφίμων. Η ανησυχία αυτή, έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον για την εφαρμογή θερμικών επεξεργασιών του προϊόντος μετά την επεξεργασία ή την διαδικασία σε φούρνο μικροκυμάτων, ατμό ή σε ζεστό νερό. Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η μείωση των επιφανειακών ρύπων και η αύξηση διάρκειας ζωής των συσκευασμένων προϊόντων. (Angelidis and Koutsoumanis, 2006)

Την περίοδο 2010-2011 η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) μελέτησε τρεις κατηγορίες έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων σε επίπεδο λιανικής πώλησης σχετικά με τον επιπολασμό της *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα αυτά. Τα υψηλότερα ποσοστά επίσημων δειγμάτων που υπερέβαιναν τα ρυθμιστικά όρια για το παθογόνο μικροοργανισμό ήταν από προϊόντα μαλακών τυριών (0,06%), προϊόντα αλειίας έτοιμα προς κατανάλωση (1,47%) και προϊόντα κρέατος έτοιμα προς κατανάλωση (0,43%). (EFSA 2013) Από το 2016, τα κράτη μέλη

συνέχιζαν να αυξάνουν τη δειγματοληψία τους για τις περισσότερες κατηγορίες έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων. Το 2019, η εμφάνιση του παθογόνου διέφερε ανάλογα με την κατηγορία τροφίμων, κυμαίνοντας από 0,04% για τυριά από παστεριωμένο γάλα έως 4,3% για έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα αλειείας. (EFSA 2019)

Το 2006 οι Angelidis and Koutsoumanis πραγματοποίησαν μια έρευνα για την παρουσία της *L. monocytogenes* σε έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα κρέατος που αφορούσαν την ελληνική αγορά. Από τα 209 δείγματα που εξέτασαν ανέφεραν την παρουσία του παθογόνου σε ποσοστό 8,1%. (Angelidis and Koutsoumanis, 2006) Ταυτόχρονα, σε μία άλλη έρευνα, στην οποία εξετάστηκαν 300 δείγματα από σημεία λιανικής πώλησης στην Αττική Ελλάδα, το παθογόνο εντοπίστηκε σε συγκέντρωση κάτω από το όριο ανίχνευσης των 10 CFU/g, με τον εκτιμώμενο επιπολασμό του βακτηρίου στα προϊόντα να βρίσκεται σε ποσοστό 0,33%. Τα περισσότερα θετικά δείγματα αφορούσαν προϊόντα κρέατος κομμένα σε φέτες και κύβους. Πολλοί ερευνητές, μάλιστα, τονίζουν ότι παρά τους χαμηλούς πληθυσμούς του μικροοργανισμού που εντοπίζονται, η διασταυρούμενη μόλυνση κατά τον τεμαχισμό και χειρισμό των προϊόντων στο λιανικό εμπόριο αποτελεί την κύρια πηγή της παρουσίας του παθογόνου στα τρόφιμα. (Tsaloumi *et al.*, 2021)

Τα περισσότερα από τα διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με τον παθογόνο μικροοργανισμό σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση, αφορούν προϊόντα που είναι προπαρασκευασμένα, ενώ η συνεχής κατανάλωση μη παρασκευασμένων τροφίμων, τα οποία χειρίζονται οι εργαζόμενοι σε καταστήματα λιανικής καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική, καθώς έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας κινδύνου. Όσον αφορά συσκευασμένα προϊόντα RTE, η πιθανή μόλυνση που μπορεί να εμφανιστεί συμβαίνει κατά τη διαδικασία παρασκευής. Αντίθετα, στα μη συσκευασμένα προϊόντα, τα οποία διακινούνται σε καταστήματα λιανικής πώλησης, ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται, το προσωπικό που τα χειρίζεται και το περιβάλλον στο οποίο γίνεται αυτός ο χειρισμός μπορεί να προκαλέσουν διασταυρούμενη επιμόλυνση αυτών τροφίμων. (Lin *et al.*, 2006) Συνοψίζοντας, επιμόλυνση των τροφίμων με *L. monocytogenes* μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο από τη παραγωγή μέχρι την κατανάλωση του τροφίμου, καθιστώντας ιδιαίτερα σημαντική την χρήση και εφαρμογή κατάλληλων πρακτικών τόσο από τις βιομηχανίες παραγωγής και των καταστημάτων λιανικής πώλησης όσο και από τους ίδιους τους καταναλωτές. Παράλληλα, διαπιστώνουμε ότι η εφαρμογή μεθόδων και τεχνολογιών που συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου μόλυνσης του τροφίμου μετά την επεξεργασία, μία εκ των οποίων είναι η θερμική καταπόνηση

προϊόντος μετά τη συσκευασία, μπορεί να δώσουν λύση στο πρόβλημα αυτό, καθώς θα επιτευχθεί καλύτερος έλεγχος του μικροοργανισμού σε τρόφιμα RTE, . (Farber *et al.*, 2021)

3. Σκοπός μελέτης

Στόχοι αυτής της μελέτης ήταν:

- i. Η αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* πάνω στην επιφάνεια λουκάνικων Φρανκφούρτης σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων και επίπεδο πληθυσμού, σε θερμοκρασίες που μπορεί να επιτευχθούν στην επιφάνεια του τροφίμου κατά την διαδικασία αναθέρμανσής του.
- ii. Η συγκριτική εκτίμηση της κατανομής καλλιεργήσιμων, τραυματισμένων και νεκρών κυττάρων του παθογόνου κατά την έκθεση σε θερμική επεξεργασία, χρησιμοποιώντας μεθόδους που βασίζονται στη καλλιέργεια και τη μικροσκοπία φθορισμού.

4. Υλικά και Μέθοδοι

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Σκανδάμη.

4.1. Στελέχη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* και αποθήκευση των βακτηριακών κυττάρων

Για την εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης επιλέχθηκε το στέλεχος του μικροοργανισμού *listeria monocytogenes* EGD-e. Το στέλεχος αυτό ανήκει στον ορότυπο 1/2a. Για την αποθήκευση του μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Tryptone Soy Broth, το οποίο ενισχύθηκε με 0,6% Yeast Extract (TSB-YE) και 20% v/v γλυκερόλη. Το θρεπτικό αυτό υλικό αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Η πρώτη ανανέωση της καλλιέργειας επιτεύχθηκε με την μεταφορά 100μl από το stock αναφοράς σε 10ml αποστειρωμένου TSBYE και ακολούθησε καλή ανάδευση με τη χρήση vortex και επώαση στους 37°C για 24h. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η δεύτερη ανανέωση της καλλιέργειας με τη μεταφορά 100μl της πρώτης ανανέωσης σε 10ml νέου αποστειρωμένου TSBYE. Έπειτα έγινε καλή ανάδευση και επώαση στους 37 °C για 18h. Μετά το πέρας της επώασης, ακολούθησε γραμμική εξάπλωση (streaking) της καλλιέργειας σε τρυβλία, τα οποία περιείχαν θρεπτικό υλικό Tryptone Soy Agar με 0,6% Yeast Extract (TSA-YE). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για δύο ημέρες, και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο, όπου φυλάχθηκαν στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την εκπόνηση της μελέτης.

4.2. Προετοιμασία εμβολίου

Λόγω των συνθηκών αποθήκευσης (ψύξη ή κατάψυξη) των στελεχών του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, πριν την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκαν δύο ανανεώσεις της καλλιέργειας. Η διαδικασία αυτή έχει ως στόχο οι μικροοργανισμοί να ανακτήσουν την ζωτικότητα τους. Η πρώτη ανανέωση επιτεύχθηκε με τη μεταφορά μιας καθαρής βακτηριακής αποικίας του μικροοργανισμού με τη χρήση κρίκου υπό ασηπτικές συνθήκες σε 10ml αποστειρωμένου TSBYE. Ακολούθησε καλή ανάδευση με τη βοήθεια vortex και επώαση στους 37 °C για 24h. Μετά το πέρας της επώασης, έγινε ισόποση μεταφορά, υπό ασηπτικές συνθήκες, του διαλύματος της πρώτης ανανέωσης (2,5ml) σε 4 κωνικές

φιάλες, η καθεμία από τις οποίες περιείχε 150ml αποστειρωμένου TSBYE. Οι κωνικές φιάλες επώστηκαν σε κλίβανο στους 37 °C για 18h. Ύστερα από την πραγματοποίηση των διαδικασιών ανανέωσης της καλλιέργειας, τα κύτταρα βρίσκονται στη μέση στατική φάση ανάπτυξής τους.

Στο τέλος της επώασης, η καλλιέργεια του μικροοργανισμού μεταφέρθηκε σε μεγάλους περιέκτες και κάθε κωνική φιάλη εκπλένεται με 100ml αποστειρωμένου TSBYE. Ακολούθως, το περιεχόμενο των κωνικών φιαλών μεταφέρονται ασηπτικώς στους περιέκτες με την καλλιέργεια του μικροοργανισμού. Στο τέλος, κάθε περιέκτης περιείχε συνολικά 250ml θρεπτικού υλικού TSBYE με τα κύτταρα του μικροοργανισμού. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε δύο φυγοκεντρήσεις, η πρώτη στις 4000 στροφές/λεπτό (rpm) για 30 min στους 4 °C και η δεύτερη στις 4000 στροφές (rpm) για 15 λεπτά στους 4 °C. Μετά το πέρας της πρώτης φυγοκέντρωσης, απορρίφθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό με τη χρήση ηλεκτρονικής πιπέτας, μέχρι η στάθμη του υγρού να φτάσει το ύψος ενός δακτύλου. Στη συνέχεια τα κύτταρα ανασηκώθηκαν και μεταφέρθηκαν σε περιέκτες falcon 50ml. Κάθε περιέκτης εκπλύθηκε με μικρή ποσότητα αποστειρωμένου TSBYE και μεταφέρθηκε στα falcon, ώστε ο τελικός όγκος του θρεπτικού υλικού να είναι 45-50ml. Ακολούθησε η δεύτερη φυγοκέντρωση, έγινε η απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και η επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε κάθε περιέκτη με 1,5ml ισοτονικού διαλύματος Ringer. Το διάλυμα κάθε περιέκτη, στη συνέχεια, μεταφέρθηκε σε falcon 10ml. Κάθε περιέκτης falcon εκπλύθηκε με 1ml ισοτονικού διαλύματος Ringer, το οποίο στη συνέχεια προστέθηκε στον περιέκτη με τα βακτηριακά κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό, ο τελικός περιέκτης περιείχε συνολικά 10ml ισοτονικού διαλύματος Ringer μαζί με τη καλλιέργεια. Ο τελικός πληθυσμός του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* ήταν 10^{10} CFU/ml.

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε, προκειμένου να απομακρυνθεί του θρεπτικό υλικό καθώς και όλα τα μικροβιακά προϊόντα που υπάρχουν στο θρεπτικό υλικό, λόγω μεταβολισμού των κυττάρων. Η διαδικασία του καθορισμού στη συγκεκριμένη μελέτη, διέφερε από τη συνηθισμένη διαδικασία καθαρισμού του εμβολίου. Τα κύτταρα μετά τη πρώτη φυγοκέντρωση, λόγω της μεγάλης επιφάνειας του περιέκτη ανασηκώνονταν γρήγορα και υπήρχε η πιθανότητα απώλειας σημαντικής ποσότητας κυττάρων. Για το λόγο αυτό, τροποποιήσαμε τις παραμέτρους φυγοκέντρωσης και τις διαδικασίες καθαρισμού του εμβολίου, με σκοπό να παραλάβουμε τη μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα της βιομάζας των κυττάρων για την διεκπεραίωση της συγκεκριμένης μελέτης.

4.3. Επιλογή θρεπτικών υλικών ανάπτυξης

Στη παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη θρεπτικών υλικών, ένα επιλεκτικό και δύο μη επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, για την επιφανειακή ανάπτυξη του μικροοργανισμού χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Tryptone Soy Agar, το οποίο ενισχύθηκε με 0.6% Yeast Extract (TSAYE). Για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού ακολουθήσαμε τις οδηγίες της εταιρείας, οι οποίες ήταν αναγραφόμενες στη συσκευασία του υλικού. Μετά την ενυδάτωση του υλικού με απιονισμένο νερό, αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 λεπτά. Η επώαση των κυττάρων σε αυτό το γενικό υπόστρωμα έγινε για δύο ημέρες στους 37 °C, και μετά το πέρας της επώασης έγινε η καταμέτρηση των αποικιών. Με ανάλογο τρόπο παρασκευάστηκε και το υγρό θρεπτικό μέσο TSBYE, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των καλλιεργειών.

Παράλληλα, κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, εκτός από γενικό θρεπτικό υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε και ένα επιλεκτικό μέσο ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό TSAYE, στο οποίο προστέθηκε 5% w/v NaCl. Η χρήση του συγκεκριμένου υποστρώματος έγινε με στόχο τη διαφοροποίηση εκείνου του υποπληθυσμού των κυττάρων που επιβίωσαν της καταπόνησης, ενώ παράλληλα επιδιώχθηκε η εκτίμηση του ποσοστού των τραυματισμένων κυττάρων. Η εκτίμηση αυτή επιτυγχάνεται με την διαφορά των σχηματιζόμενων αποικιών στο επιλεκτικό υπόστρωμα, από εκείνες που αναπτύσσονται στο γενικό υπόστρωμα. Η καταμέτρηση των αποικιών στο γενικό υπόστρωμα έγινε στις 2 ημέρες παραμονής τους στους 37°C, ενώ εκείνες των τρυβλίων με το επιλεκτικό υπόστρωμα καταμετρήθηκαν στις 5 ημέρες. Σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα, έχει αποδειχθεί ότι η συγκεκριμένη συγκέντρωση του άλατος δεν επιτρέπει την ανάπτυξη των τραυματισμένων κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα δεν παρεμποδίζεται η ανάπτυξη των υγιών κυττάρων.

Τέλος, κατά τη πειραματική διαδικασία έγινε η χρήση του επιλεκτικού μέσου ALOA. Το υπόστρωμα αυτό χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Για την παρασκευή του ακολουθήσαμε τις αναγραφόμενες οδηγίες της εταιρείας. Το υπόστρωμα αυτό περιέχει λεκιθίνη, με την οποία ανιχνεύεται η παραγωγή του ενζύμου φωσφολιπάσης από αποικίες του μικροοργανισμού. Η παραγωγή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία άλω που περιβάλλει τις σχηματιζόμενες αποικίες.



Εικόνα 3. Ανάπτυξη *Listeria monocytogenes* στο θρεπτικό υλικό ALOA (<http://www.fischersci.com/>)

5. Προετοιμασία δειγμάτων και εμβολιασμός

Εμπορικές συσκευασίες λουκάνικων Φρανκφούρτης προμηθεύτηκαν από τοπικά καταστήματα. Επιλέχθηκαν λουκάνικα Cocktail Party τ. Φρανκφούρτης, κοντά στην ημερομηνία παραγωγής τους, τα οποία έχουν κατάλληλες διαστάσεις (1cm x 4cm x 1cm) για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας. Αφού ανοίχτηκε η συσκευασία τους, υπό ασηπτικές συνθήκες, τα λουκάνικα τοποθετήθηκαν σε καθαρή επιφάνεια κοπής και κόπηκαν σε ισοπαχή κομμάτια. Στη συνέχεια ακολούθησε ο εμβολιασμός τους, υπό ασηπτικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, 40 μL του αρχικού εμβολίου μεταφέρθηκε στην επιφάνεια κάθε λουκάνικου με τη μορφή κηλίδων κατά μήκος της επιφάνειας του τροφίμου. Στη συνέχεια, με τη χρήση ενός αποστειρωμένου κρίκου έγινε η εξάπλωση του εμβολίου σε όλη την επιφάνεια και τα δείγματα έμειναν για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να επιτευχθεί η προσκόλληση του εμβολίου. Τα λουκάνικα συσκευάστηκαν ανά κομμάτι σε πλαστικές σακούλες υπό κενό.

6. Θερμική καταπόνηση

Η μελέτη της επίδρασης θερμικής καταπόνησης στο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, 61 και 64°C. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν μέσα σε ένα υδατόλουτρο με κυκλοφορία νερού που διατηρήθηκε στις συγκεκριμένες θερμοκρασίες και στερεώθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε τα δείγματα να βρίσκονται κάτω από την επιφάνεια του νερού. Η στάθμη του

υδατόλουτρου ελεγχόταν πάντα πριν την έναρξη της θερμικής επεξεργασίας, προκειμένου να εξασφαλιστεί η επίδραση της θέρμανσης σε όλη την επιφάνεια του δείγματος. Τα δείγματα αφαιρέθηκαν από το νερό σε διάφορα χρονικά διαστήματα από 2 έως 60 λεπτά, ανάλογα με τη θερμοκρασία της επεξεργασίας. Ως μηδενική χρονική στιγμή καθορίστηκε το σημείο εκείνο, στο οποίο η θερμοκρασία της επιφάνειας του λουκάνικου έφτασε την επιθυμητή θερμοκρασία καταπόνησης. Μετά τις θερμικές επεξεργασίες, τα δείγματα απομακρύνθηκαν από το υδατόλουτρο και τοποθετήθηκαν αμέσως σε παγωμένο υδατόλουτρο για 5s, προκειμένου να επιτευχθεί εξισορρόπηση θερμοκρασίας και πιθανή μείωση κρύων και θερμών σημείων. Το επίπεδο *L. monocytogenes* στα δείγματα ελέγχου (εμβολιασμένο μη επεξεργασμένο δείγμα) ήταν 10^9 CFU/cm².

6.1. Καταγραφή θερμοκρασίας

Σε κάθε δοκιμή, ο έλεγχος της πορείας της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικού καταγραφέα θερμοκρασίας (Pronto H199551, Hanna Instruments). Από το ζεύγος θερμοστοιχείων του, ο ένας αισθητήρας τοποθετήθηκε στο πάτο του υδατόλουτρου, ενώ ο δεύτερος τοποθετήθηκε 2mm κάτω από την επιφάνεια ενός μη ενοφθαλμισμένου μάρτυρα. Ο ανιχνευτής του λουκάνικου συσκευάστηκε υπό κενό και υποβλήθηκε σε θερμική επεξεργασία όπως περιγράφεται παραπάνω.

7. Βακτηριακή απαρίθμηση

Τα σακουλάκια, αφού απολυμάνθηκαν με 70% αιθανόλη, ανοίχτηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν με τη χρήση πιπέτας 3ml ισοτονικού διαλύματος Ringer και ακολούθησε μάλαξη για 3 min. Στη συνέχεια, ακολούθησε ο κατάλληλος αριθμός δεκαδικών αραιώσεων και η απαρίθμηση του μικροοργανισμού έγινε με την τεχνική της επίστρωσης σε τρυβλία που περιείχαν τα θρεπτικά υποστρώματα που αναφέρθηκαν νωρίτερα. (TSAYE και TSAYE με 5%w/v NaCl). Εμβολιασμένα μη θερμαινόμενα δείγματα και μη ενοφθαλμισμένα θερμαινόμενα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες σε κάθε δοκιμή. Τα τρυβλία με TSAYE επωάστηκαν στους 37 °C για 48h, ενώ εκείνα που περιείχαν το αλάτι επωάστηκαν στους 37 °C για 5d. Οι πειραματικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε δύο

βιολογικές επαναλήψεις και κάθε βιολογική επανάληψη υπήρξαν δύο τεχνικές επαναλήψεις.

7.1. Ανάλυση αποτελεσμάτων

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, μετά την ολοκλήρωση της δειγματοληψίας, έγινε η καταμέτρηση των ορατών αποικιών και κατά επέκταση του πληθυσμού του δείγματος της στιγμής της δειγματοληψίας. Ο υπολογισμός του $\log\text{CFU}/\text{cm}^2$ του αρχικού δείγματος έγινε με τη χρήση του τύπου:

$$\text{Log} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{cm}^2} \right) = \text{Log}[\text{CFU} * 10^{\text{Dilution Factor}-1}] \quad (1)$$

Από κάθε τεχνική επανάληψη υπολογίστηκε ο μέσος όρος του εκτιμώμενου πληθυσμού ανά χρονικό σημείο. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε ραβδόγραμμα, στο οποίο αποτυπώνεται το επίπεδο του συνολικού πληθυσμού, καθώς και του υποπληθυσμού που άντεξε τη θερμική καταπόνηση κάθε χρονική στιγμή. Στο διάγραμμα παρατίθεται επίσης και η τυπική απόκλιση.

Για τον υπολογισμό του υποθανάτιου τραυματισμού, για κάθε τεχνική και βιολογική επανάληψη, αφαιρείται ο αριθμός των ορατών αποικιών στα μη επιλεκτικά υποστρώματα από τις ορατές αποικίες των επιλεκτικών υποστρωμάτων. Το ποσοστό του τραυματισμού υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση (2):

$$\% \text{sublethal injury} = \left(1 - \frac{\text{counts on selective media}}{\text{counts on nonselective media}} \right) * 100 \quad (2)$$

Από το μέσο όρο του τραυματισμού των κυττάρων κάθε τεχνικής και βιολογικής επανάληψης υπολογίζεται ο τραυματισμός του δείγματος για το δεδομένο χρονικό σημείο. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε διάγραμμα, στο οποίο απεικονίζεται ο τραυματισμός των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου, για κάθε συνθήκη καταπόνησης. Με αυτό τον τρόπο προκύπτει ο τραυματισμός για κάθε χρονική στιγμή.

Παράλληλα, για την αξιολόγηση του τραυματισμού θέσαμε μια τιμή-όριο κάτω από την οποία η διαφορά των δύο διαφορετικών υποστρωμάτων θεωρείται αποτέλεσμα βιολογικής παραλλακτικότητας.

8. Παρακολούθηση της θερμικής καταπόνησης με μικροσκοπία φθορισμού

8.1. Μικροσκοπία φθορισμού

Η μικροσκοπία φθορισμού αποτελεί ένα βασικό εργαλείο της βιολογίας και της επιστήμης των υλικών, καθώς έχει ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που δεν διατίθενται άμεσα από άλλες τεχνικές οπτικής μικροσκοπίας. Σε συνδυασμό με κατάλληλα φθοροφθόρα αποτελεί ένα θεμελιώδες εργαλείο για τη παρακολούθηση των ζωντανών κυττάρων αλλά και της μεταβολικής τους δραστηριότητας, των κυτταρικών συστατικών ή της γονιδιακής έκφρασης σε μεμονωμένα κύτταρα. (Bridier *et al.*, 2015)

Στα πλαίσια της διπλωματικής μελέτης χρησιμοποιήθηκε Ανάστροφο Μικροσκόπιο Φθορισμού Leica DMi8 αντίθετης φάσης (phase contrast). Η συλλογή εικόνων έγινε με χρήση κάμερα DFC 7000T, με δυνατότητα αυτόματης εστίασης. Για την παρατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε αντικειμενικός φακός σε λάδι (emersion oil) 63x, με αριθμητικό άνοιγμα NA=1.25. Για την απομόνωση ακτινοβολιών συγκεκριμένου μήκους κύματος χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα φίλτρα. (Πίνακας 1)

Πίνακας 2. Φάσματα απορρόφησης/εκπομπής φίλτρων

ΦΙΛΤΡΟ	GFP	Y3
Excitation	450-490 nm	532-558 nm
Emission	500-550 nm	570-640 nm
DC	495 nm	565 nm



Εικόνα 4. Ανάστροφο Μικροσκόπιο Φθορισμού Leica DMi8 αντίθετης φάσης (phase contrast)

8.2. Φθορίζουσες χρωστικές

Η χρήση κατάλληλων φθοροφθόρων παίζει σημαντικό ρόλο στη λήψη σημαντικών μετρήσεων λόγο φθορισμού. Η επιλογή κάθε φθοροφθόρου εξαρτάται από την παράμετρο που μας ενδιαφέρει. Προκειμένου να ανιχνεύσουμε και να διακρίνουμε τις διαφορετικές φυσιολογικές καταστάσεις των κυττάρων ύστερα από καταπόνηση, χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές, το φθοροφθόρο cFDA της εταιρείας Sigma Aldrich και το ιωδιούχο προπίδιο (PI) της εταιρείας BacLight/ Live Dead kit L7012. Και οι δύο αυτές χρωστικές έχουν την ικανότητα να συνδέονται με το DNA των κυττάρων, έχουν όμως διαφορετική διεισδυτική ικανότητα στη κυτταρική μεμβράνη. Το cFDA χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης σήμανσης των ζωντανών κυττάρων, καθώς δείχνει ότι η κυτταρική μεμβράνη διατηρείται ακέραιη και οι κυτταρικές εστεράσες είναι ενεργές, παράγοντας έντονο πράσινο φθορισμό. Αντίθετα, το ιωδιούχο προπίδιο (PI) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των τραυματισμένων και νεκρών κυττάρων. Κύτταρα τα οποία παράγουν έντονο κόκκινο φθορισμό, χαρακτηρίζεται ως νεκρό, καθώς η κυτταρική του μεμβράνη έχει καταστραφεί.

Για την παρασκευή διαλύματος της χρωστικής cFDA 25mg σκόνης διαλύθηκαν σε 1ml DMSO (Stock solution, $V=54\text{mM}$). Στη συνέχεια, 9,25μl από το Stock solution μεταφέρθηκαν σε 1ml DMSO (Working Solution, $V=500\ \mu\text{M}$). Για την χρώση των κυττάρων, όγκος 2 μl από το Working Solution μεταφέρθηκε σε 100 μl

καλλιέργειας. ($V_{\text{τελ}}=100\mu\text{M}$). Για το PI αντίστοιχα, όγκος 100 μl από το Stock ($V=20\text{mM}$) μεταφέρθηκε σε 1230 μl DMSO (Working Solution, $V=1,5 \mu\text{M}$). Από αυτό το διάλυμα, όγκος 2 μl από το Working Solution μεταφέρθηκαν στα 100 μl καλλιέργειας ($V_{\text{τελ}}=30\mu\text{M}$).

Για την αξιολόγηση της λειτουργικότητας των χρωστικών χρησιμοποιήθηκαν δύο θετικά (positive) control, ένα για κάθε χρωστική. Μετά τη 2^η ανανέωση της καλλιέργειας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10ml ισοτονικού διαλύματος Ringer. Για το θετικό control cFDA σε 100 μl της καλλιέργειας προστέθηκαν 2 μl διαλύματος χρωστικής ($C_{\text{τελ}}=100\mu\text{M}$) και ακολούθησε επώαση για 20min σε σκιερό μέρος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13300 στροφές (rpm) για 2 min. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl διαλύματος Ringer. Πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση και 10 μl από το διάλυμα μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Το δείγμα παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο φθορισμού, όπου αναμενόταν πράσινος φθορισμός. Για το θετικό PI control, 100 μl της καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν στις 13300 στροφές (rpm) για 2 min. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl 70% v/v αιθανόλης. Ακολούθησε επώαση για 20min, φυγοκέντρηση στις 13300 στροφές (rpm) για 2 min, απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και επαναιώρηση του ιζήματος σε 100 μl διαλύματος Ringer. Τέλος, έγινε ήπια ανάδευση, μεταφορά όγκου 10 μl σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Ο φθορισμός αναμένεται να είναι κόκκινος.

8.3. Θερμική καταπόνηση και μικροσκοπία φθορισμού

Η θερμική καταπόνηση πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία που περιγράφηκε αναλυτικά παραπάνω. Αφού εφαρμόστηκε θέρμανση σε λουκάνικα, τα οποία είχαν εμβολιαστεί, τα σακουλάκια ανοίχτηκαν ασηπτικώς και σε αυτά προστέθηκαν 3 ml διαλύματος Ringer. Ακολούθησε μάλαξη για 3 min, προκειμένου να αποκολληθούν πλήρως τα κύτταρα από την επιφάνεια του τροφίμου. Στη συνέχεια σε ένα αποστειρωμένο erpendorf συλλέχθηκαν 100 μl της καλλιέργειας. Στο διάλυμα αυτό προστέθηκαν 2 μl cFDA ($C_{\text{τελ}}=100\mu\text{M}$) και 2 μl PI ($C_{\text{τελ}}=30\mu\text{M}$). Ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 13.300 στροφές (rpm) για 2 min. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό, μαζί με τη περίσσεια των χρωστικών, και το ίζημα επαναιωρήθηκε

σε 20ml διαλύματος Ringer. 5ml από το διάλυμα τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα και έγινε παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Η καταπόνηση των δειγμάτων αφορούσε θερμική καταπόνηση στους 61 και 64°C. Για την πρώτη θερμοκρασία επιλέχθηκαν τα χρονικά σημεία 0, 6, 12, 18, 60 min, ενώ για τη δεύτερη συνθήκη επιλέχθηκαν τα χρονικά σημεία 0,2,4 και 6 min. Και αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με δύο βιολογικές επαναλήψεις για κάθε συνθήκη καταπόνησης.

8.4. Ανάλυση εικόνων μικροσκοπίου με ImageJ

Από τη παρατήρηση της θερμικής καταπόνησης στο μικροσκόπιο φθορισμού ελήφθησαν περίπου 10 εικόνες για κάθε χρονικό σημείο που επιλέχθηκαν για τη καθεμία συνθήκη. Οι εικόνες αυτές υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και αναλύθηκαν με στόχο τη ποσοτικοποίηση των ζωντανών (CFDA+/PI-), τραυματισμένων (CFDA+/PI+) και νεκρών (CFDA-/PI+) κυττάρων, σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Για αυτή την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένοι αλγόριθμοι αναλόγως με την επεξεργασία του συγκεκριμένου τύπου εικόνων και τις ανάγκες του μικροπεριβάλλοντος, όπως η παρουσία θορύβου, υπολείμματα τροφίμου κλπ. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την ανάλυση ήταν το ImageJ. Με τη καταμέτρηση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων, η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε διαχωρίζει τις εικόνες και ποσοτικοποιεί τις βιοφυσικές ιδιότητες και την ένταση του φθορισμού, λαμβάνοντας δεδομένα για πληθυσμιακό κλάσμα που είναι ζωντανό, νεκρό ή βρίσκεται σε κατάσταση ληθάργου.

8.5. Στατιστική Ανάλυση

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση. Χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Microsoft Excel® 2007 και STATGRAPHICS® Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., USA). Έγινε συσχέτιση μεταξύ των δύο τεχνικών αναλύσεων για κάθε συνθήκη καταπόνησης. Η ανάλυση έγινε με One Way ANOVA και χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της επίδρασης θερμοκρασίας στην επιβίωση του πληθυσμού του παθογόνου. Επιλέχθηκε η δοκιμασία (test) Tuckey-HSD, όπου η τιμή πιθανότητας μικρότερη του 0,05 ($P < 0,05$) θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Τα γράμματα του λατινικού αλφαβήτου που χρησιμοποιήθηκαν εκφράζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών.

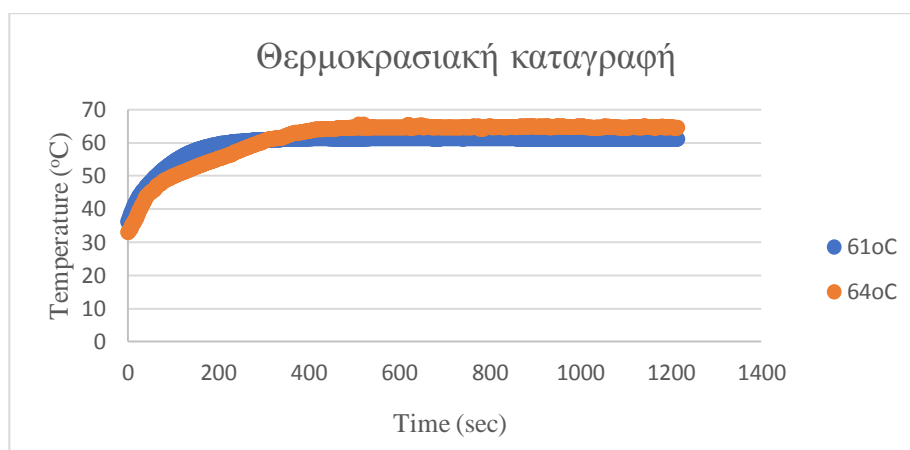
9. Αποτελέσματα

9.1. Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού μέσω θερμικής καταπόνησης στους 61 και 64°C

Η εμπορική θερμική επεξεργασία που εμπλέκεται στην παραγωγή λουκάνικων Φρανκφούρτης καταστρέφει όλα τα βλαστικά παθογόνα συμπεριλαμβανομένου του παθογόνου *L. monocytogenes*. (Zaika *et al.*, 1990) Ως εκ τούτου, το παθογόνο που βρίσκεται σε έτοιμα προς κατανάλωση λουκάνικα είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης, η οποία μπορεί να επιτευχθεί κατά την αφαίρεση του περιβλήματος και τη συσκευασία. (Wenger *et l.*, 1990) Κατάλληλες θερμικές επεξεργασίες, όπως η αναθέρμανση, μετά την επεξεργασία που υφίστανται το λουκάνικο κατά τη διάρκεια παραγωγής του, θα μειώναν σημαντικά τα επίπεδα του παθογόνου χωρίς αλλαγή της εμφάνισης ή της υφής του τροφίμου. Παράλληλα, θα πρέπει να εφαρμόζονται στο συγκεκριμένο προϊόν για να αποφευχθεί περαιτέρω διασταυρούμενη μόλυνση.

9.1.1. Θερμοκρασία

Οι μέγιστες θερμοκρασίες που επιτεύχθηκαν κατά τη θερμική επεξεργασία στην επιφάνεια του λουκάνικου καθώς και του υδατόλουτρου παρατίθενται στο Παράρτημα. Το **Σχήμα 1** παρουσιάζει το θερμοκρασιακό προφίλ της επιφάνειας του λουκάνικου κατά την θερμική επεξεργασία στις δύο διαφορετικές συνθήκες. Όπως ήταν αναμενόμενο, η μεγαλύτερη θερμοκρασία καταπόνησης (64°C) επιτεύχθηκε σε μικρότερο χρόνο (10 min) στην επιφάνεια του τροφίμου.



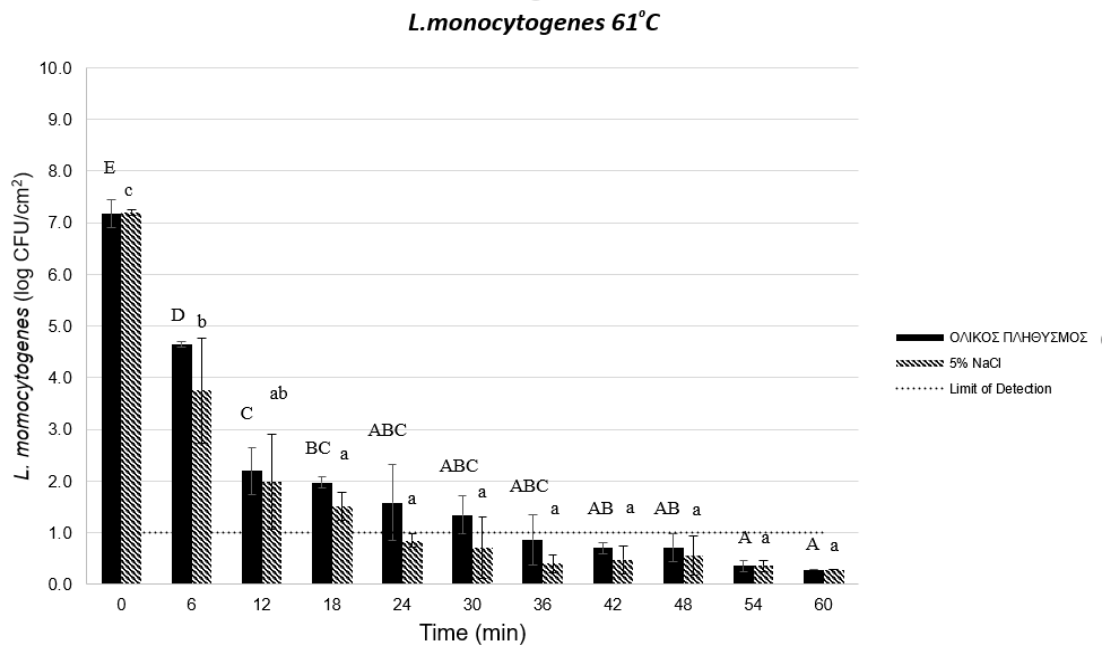
Σχήμα 1. Προφίλ μέσης θερμοκρασίας σε επιφάνειες της Φρανκφούρτης κατά τη διάρκεια θερμικής επεξεργασίας σε υδατόλουτρο στους 61°C και 64°C (τα δεδομένα λαμβάνονται κάθε δευτερόλεπτο κατά τη διάρκεια της θέρμανσης).

9.1.2. Υποθανάτιος τραυματισμός σε επίπεδο πληθυσμού

Κύτταρα στατικής φάσης του μικροοργανισμού εμβολιάστηκαν σε λουκάνικα, τα οποία θερμάνθηκαν στους 61 και 64 °C για 60 και 20 min, αντίστοιχα. Για την πρώτη θερμοκρασία καταπόνησης οι δειγματοληψίες έγιναν ανά 6 min, ενώ για τη δεύτερη συνθήκη καταπόνησης έγιναν ανά 2 min.

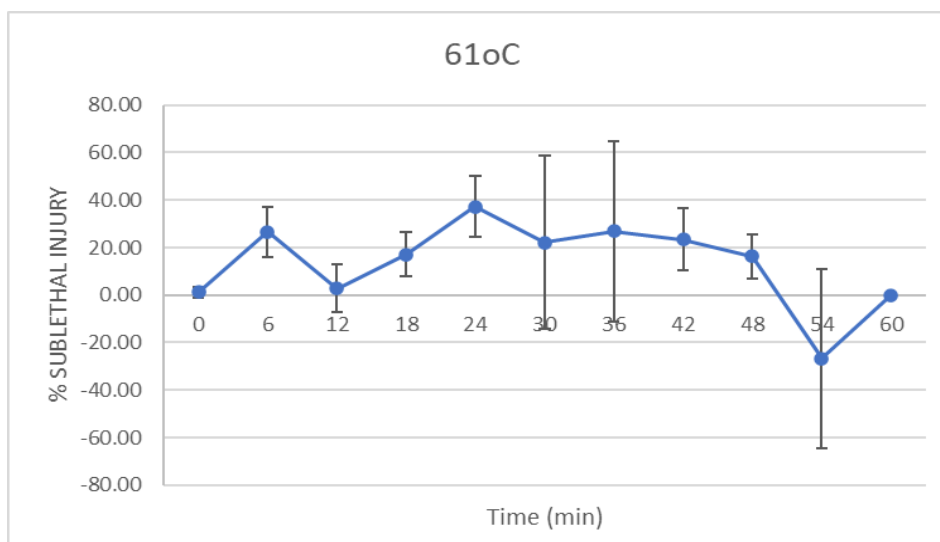
Όπως παρατηρείται από το **Σχήμα 2**, το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης ήταν περίπου $\sim 10 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$. Τη μηδενική στιγμή έκθεσης στο παράγοντα καταπόνησης, το επίπεδο του πληθυσμού ήταν περίπου $\sim 7 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$. Η έκθεση των κυττάρων στους 61°C προκάλεσε σημαντική μείωση στο συνολικό πληθυσμό του στελέχους EGDe. Συγκεκριμένα, από τα πρώτα 6 min παρατηρείται μείωση του πληθυσμού, συνολικός και ανθεκτικός, περίπου $\sim 2,5 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$, ενώ έπειτα από 18 min θερμικής καταπόνησης επιτεύχθηκε μείωση του πληθυσμού $\sim 5 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$. Και οι δύο παρατηρούμενες μειώσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

Στο **Σχήμα 3** διαγράφεται ο % τραυματισμός του στελέχους EGDe συναρτήσει του χρόνου, ύστερα από 60min θερμικής επεξεργασίας στους 61°C. Όπως παρατηρούμε, ο τραυματισμός αυξάνεται στα πρώτα 6 min καταπόνησης, με το 26,7% των κυττάρων να είναι τραυματισμένα. Ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό (37%) τραυματισμένων κυττάρων διαπιστώνεται έπειτα από 24min υπό καταπόνηση. Ωστόσο, το μικροβιακό φορτίο των ζωντανών κυττάρων έχει μειωθεί σημαντικά. Ταυτόχρονα, ύστερα από 60 min θερμικής επεξεργασίας ολόκληρος ο πληθυσμός βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης ($0,28 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$), ενώ ο τραυματισμός των κυττάρων μηδενίστηκε στα 60 min έκθεσης.



Σχήμα 2. Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, στέλεχος EDGe (συμπαγές ραβδόμορφο) στους 61 °C για 60 min. Ο πληθυσμός καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 °C σε TSAYE με 0% NaCl (μαύροι ράβδοι) και για 5 ημέρες στους 37 °C σε TSAYE με 5% NaCl (Γκρι ανοικτοί ράβδοι). Παράλληλα, αποτυπώνεται και το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης της μεθόδου. (ο.κ. = 10CFU/cm²). Τα μεγάλα λατινικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές του στελέχους στις διάφορες χρονικές στιγμές σε TSAYE με 5% NaCl, ενώ τα μικρά γράμματα σε TSAYE με 5% NaCl.

Συνολικά, η καταπόνηση στους 61°C, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού των κυττάρων *Listeria monocytogenes* κατά περίπου 5 log έπειτα από 18 min θερμικής επεξεργασίας, ενώ σε διάστημα 60 min ο συνολικός πληθυσμός βρισκόταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν στα πρώτα 18 min καταπόνησης, στο διάστημα το οποίο παρατηρήθηκε και η μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού. Ο τραυματισμός που προκλήθηκε στα κύτταρα αρχικά ήταν ιδιαίτερα σημαντικός στα πρώτα λεπτά της θερμικής επεξεργασίας, ενώ στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας μηδενίστηκε.



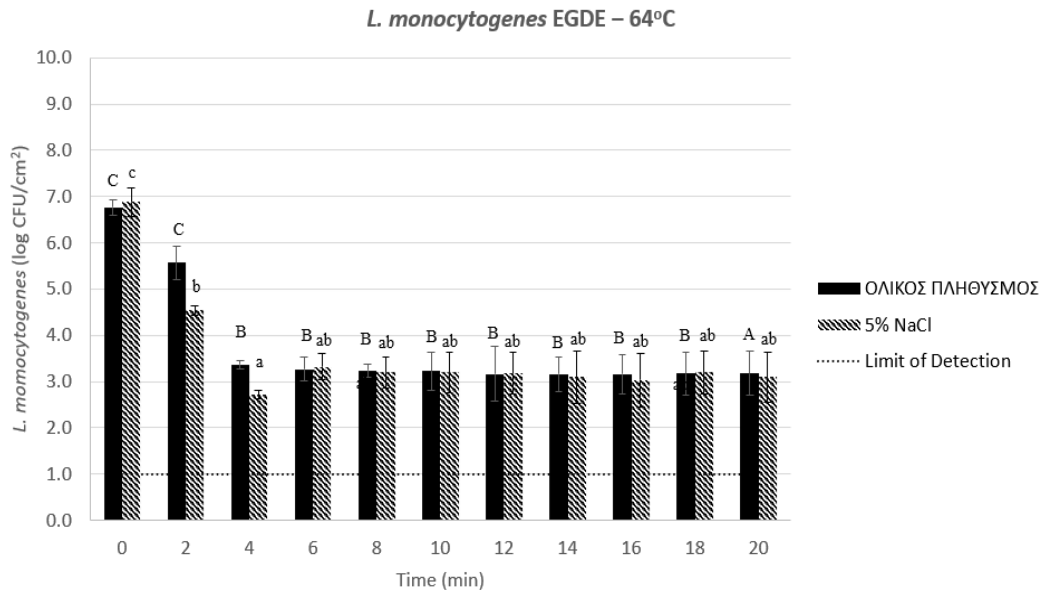
Σχήμα 3. Αποτύπωση του τραυματισμού των κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes*, στέλεχος EDGe στους 61 °C για 60 min.

Από την άλλη πλευρά, η έκθεση των κυττάρων στους 64 °C δεν προκάλεσε τον ίδιο βαθμό μείωσης του συνολικού πληθυσμού του στελέχους EGDe. Σύμφωνα με το **Σχήμα 4**, ο συνολικός πληθυσμός, καθώς και ο ανθεκτικός υποπληθυσμός στα πρώτα 4min μειώθηκαν σημαντικά ($p < 0,05$). Συγκεκριμένα, ο συνολικός πληθυσμός μειώθηκε κατά περίπου κατά 1,2 logCFU/cm², ενώ ο ανθεκτικός υποπληθυσμός περίπου 2,5 logCFU/cm². Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου το επίπεδο του συνολικού πληθυσμού παρέμεινε σχεδόν σταθερός. Παρατηρήθηκε μια ανοχή στη θερμική επεξεργασία μέχρι τα 20 min καταπόνησης. Παράλληλα, διαπιστώνουμε ότι ο πληθυσμός σε αυτή τη συνθήκη καταπόνησης δεν βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης, όπως συμβαίνει στους 61 °C.

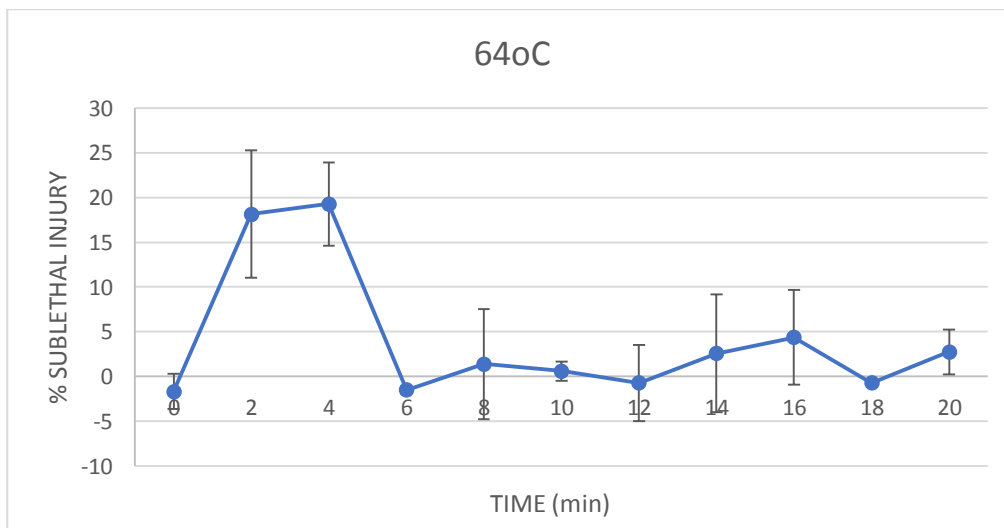
Από το **Σχήμα 5** παρατηρούμε στατιστικά σημαντικό τραυματισμό των κυττάρων του μικροοργανισμού έπειτα από 2 και 4 min θερμικής επεξεργασίας στους 64°C. Συγκεκριμένα, στα 2 min έκθεσης το 18% των κυττάρων είχαν τραυματιστεί, ενώ έπειτα από 4 min το ποσοστό αυτό είχε αυξηθεί στο 19%. Ωστόσο από τα 6 min της πειραματικής διαδικασίας και μέχρι την ολοκλήρωσή της, το ποσοστό των τραυματισμένων παρέμενε χαμηλό και μη σημαντικός.

Συνοψίζοντας, στη συγκεκριμένη συνθήκη καταπόνησης, τα επίπεδα του τραυματισμού διέφεραν από τα αντίστοιχα στους 61°C. Στη μεγαλύτερη θερμοκρασία, ο τραυματισμός πραγματοποιήθηκε στα πρώτα λεπτά της πειραματικής πορείας, ενώ

στη συνέχεια και μέχρι την ολοκλήρωσή της παρέμενε σχετικά χαμηλός και σταθερός. Σε αντίθεση, με παρατηρήσεις που αφορούν την προηγούμενη καταπόνηση, ο τραυματισμός αυξήθηκε σταδιακά, μέχρι τα τελευταία λεπτά επεξεργασίας, στα οποία μηδενίστηκε.



Σχήμα 4. Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes*, στέλεχος EDGe (συμπαγές ραβδόμορφο) στους 64 °C για 20 min. Ο πληθυσμός καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 °C σε TSAYE με 0% NaCl (μαύροι ράβδοι) και για 5 ημέρες στους 37 °C σε TSAYE με 5% NaCl (Γκρι ανοικτοί ράβδοι). Παράλληλα, αποτυπώνεται και το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης της μεθόδου. (ο.κ. = 10CFU/cm²). TSAYE με 5% NaCl

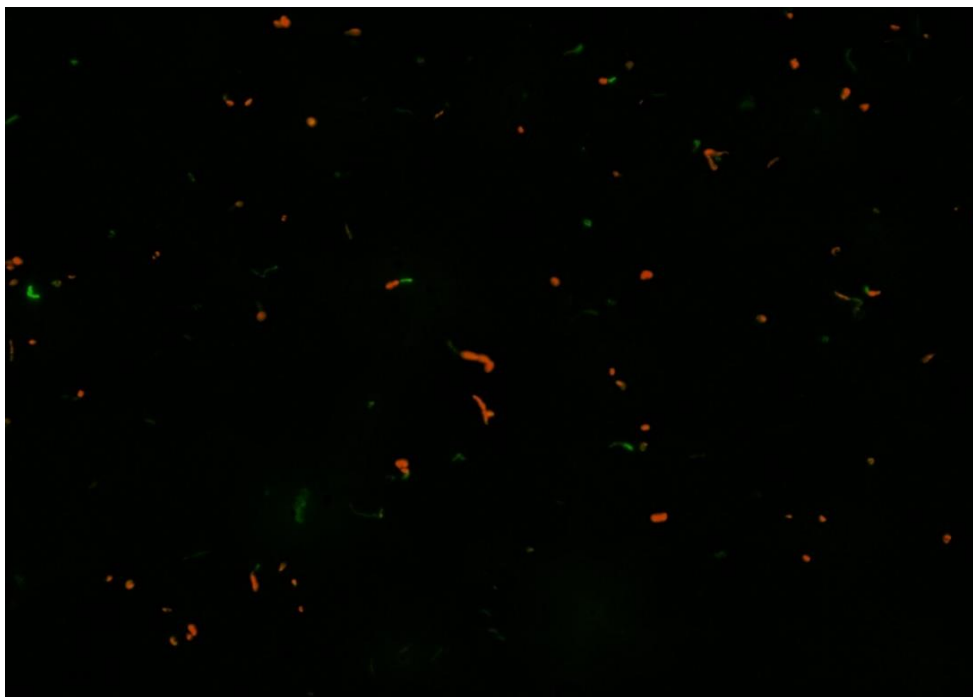


Σχήμα 5. Αποτύπωση του τραυματισμού των κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes*, στέλεχος EDGe στους 61 °C για 60 min.

9.1.3. Υποθανάτιος τραυματισμός σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων

Η καταπόνηση των κυττάρων σε θερμοκρασία 61 και 64°C έδωσε σημαντικές πληροφορίες για τον υποθανάτιο τραυματισμό. Η χρήση μικροσκοπίας φθορισμού μας επιτρέπει να κατανοήσουμε και να εκτιμήσουμε την κατανομή του υποθανάτιου τραυματισμού που προκαλείται από την έκθεση του μικροοργανισμού στις διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης.

Για την αξιολόγηση του τραυματισμού των κυττάρων, μελετήθηκαν τα χρονικά σημεία στα οποία παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού. Για την πρώτη συνθήκη καταπόνησης (61°C), στο μικροσκόπιο φθορισμού μελετήθηκαν τα 0 και 6 min της θερμικής επεξεργασίας. Παράλληλα, μελετήσαμε την κατάσταση των κυττάρων κατά τη χρονική στιγμή που η διαδικασία ήταν στη μέση της πορείας της, καθώς και στο τελευταίο χρονικό σημείο της διαδικασίας. Οι φωτογραφίες που ελήφθησαν είχαν την εξής μορφή.

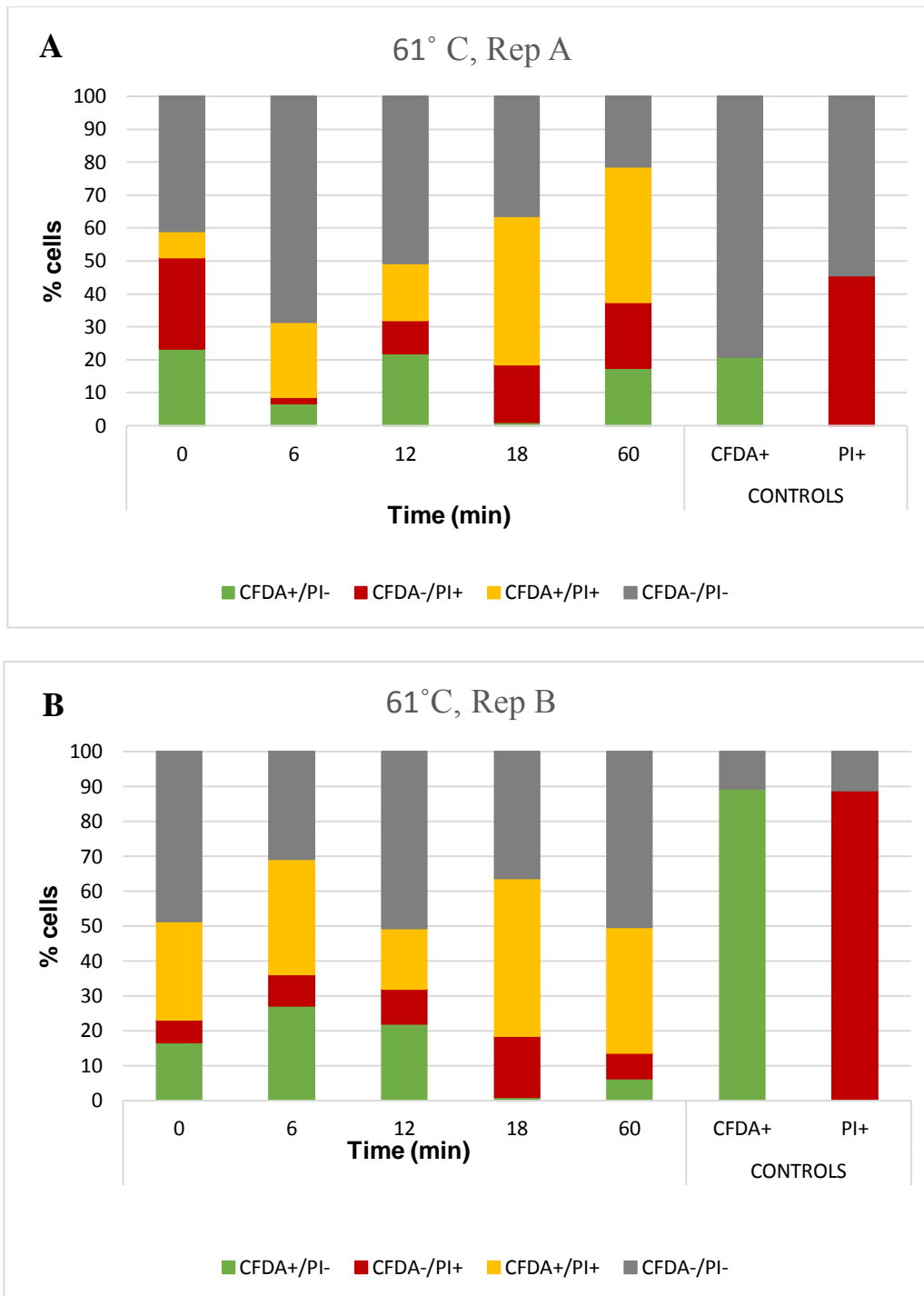


Εικόνα 5. Αποτύπωση των διαφορετικών χρώσεων των κυττάρων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* ύστερα από εφαρμογή θερμικής καταπόνησης. Ο πράσινος φθορισμός (CFDA+/PI-) αποτυπώνει τα υπάρχοντα ζωντανά κύτταρα, ο κόκκινος φθορισμός (CFDA-/PI+) τα νεκρά κύτταρα, ενώ τα διπλά χρωσμένα κύτταρα (πορτοκαλί φθορισμός, CFDA+/PI+) αποτελούν την ομάδα των τραυματισμένων κυττάρων.

Λαμβάνοντας τουλάχιστον 10 διαφορετικά οπτικά πεδία κάθε χρονικής στιγμής και κάνοντας την κατάλληλη επεξεργασία των ληφθέντων εικόνων, ποσοτικοποιήσαμε τις διάφορες καταστάσεις στις οποίες βρίσκονταν τα κύτταρα κάθε χρονική στιγμή της καταπόνησης που μελετήθηκε. Από τα αποτελέσματα που λάβαμε, κατασκευάσαμε κατάλληλα διαγράμματα, προκειμένου να συγκριθούν μεταξύ τους και να αξιολογηθούν.

Όπως φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα (**Σχήμα 6**), για τους 61°C για τα 5 χρονικά σημεία που μελετήθηκαν δεν υπήρχε σημαντικά υψηλός πληθυσμός ζωντανών (CFDA+/PI-) κυττάρων και για τις δύο βιολογικές επαναλήψεις. Παράλληλα, υπήρχε σημαντική διακύμανση στο ποσοστό των νεκρών (CFDA-/PI+) κυττάρων. Ωστόσο, μεγαλύτερο ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων (CFDA+/PI+) παρατηρήθηκε στους δύο τελευταίους χρόνους που μελετήθηκαν στις δύο ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα, μεγαλύτερο ποσοστό άβαφων (CFDA-/PI-) καταγράφηκε στην πρώτη επανάληψη. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η λειτουργικότητα των χρωστικών ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική στη δεύτερη επανάληψη και για τα δύο είδη χρωστικών, ενώ, αντίθετα, στη πρώτη επανάληψη καλύτερη λειτουργικότητα έδειξε η χρωστική PI.

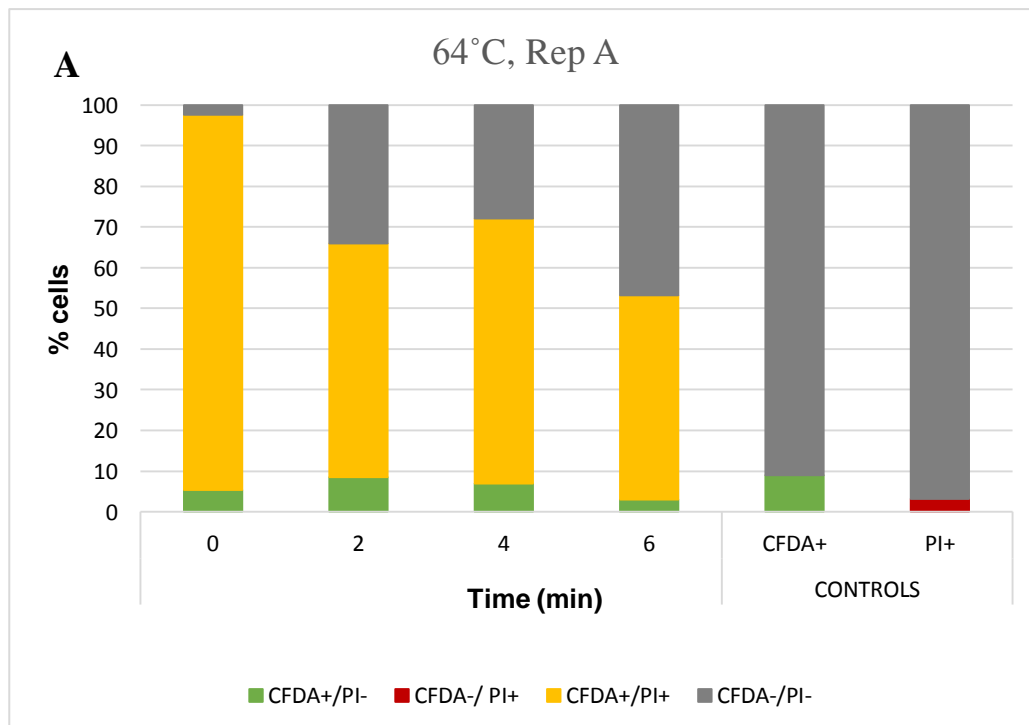
Τα δεδομένα αυτά, συγκριτικά με τα αποτελέσματα της καταμέτρησης του πληθυσμού των κυττάρων, δεν συμφωνούν πλήρως για όλα τα χρονικά σημεία. Σύμφωνα, με τα αποτελέσματα κλασσικής μικροβιολογίας, σημαντικό ποσοστό τραυματισμού καταγράφηκε στα πρώτα 6 με 24 min. Από από τα δεδομένα μικροσκοπίας φθορισμού τα περισσότερα τραυματισμένα κύτταρα εντοπίστηκαν στο 18^ο λεπτό της συνθήκης καταπόνησης, καθώς και στο τελευταίο χρονικό σημείο της διαδικασίας. Ταυτόχρονα, στο τελευταίο χρονικό σημείο της καταπόνησης, σε επίπεδο πληθυσμού ο πληθυσμός του μικροοργανισμού βρέθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ ο τραυματισμός των κυττάρων μηδενίστηκε. Αντίθετα, σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων η έκθεση στους 61°C για 60min υποδεικνύει υψηλό ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων (CFDA+/PI+), αλλά και νεκρών κυττάρων (CFDA-/PI+), κυρίως στην δεύτερη βιολογική επανάληψη. Αξιοσημείωτο είναι η ύπαρξη μικρού ποσοστού κυττάρου που διατηρούνται ζωντανά (CFDA+/PI-) και για τις δύο επαναλήψεις.

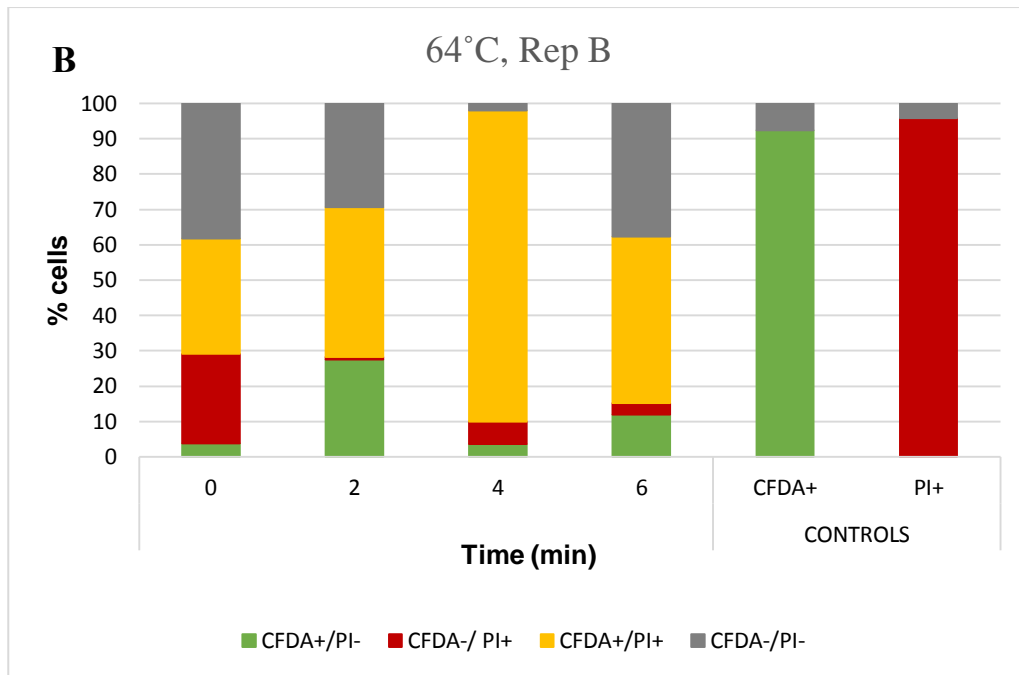


Σχήμα 6. Αποτελέσματα διαφορετικών χρώσεων των κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes*, στέλεχος EDGe στους 61 °C για 60 min.. Το διάγραμμα **A** αφορά την πρώτη βιολογική επανάληψη, ενώ το διάγραμμα **B** αφορά τη δεύτερη ανεξάρτητη βιολογική επανάληψη.

Όσον αφορά τη δεύτερη συνθήκη καταπόνησης (64°C), στη πρώτη βιολογική επανάληψη παρατηρείται μεγάλο ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων από τη μηδενική χρονική στιγμή. Και για τα τέσσερα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν το μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων αφορούσε τα τραυματισμένα κύτταρα (CFDA+/PI+),

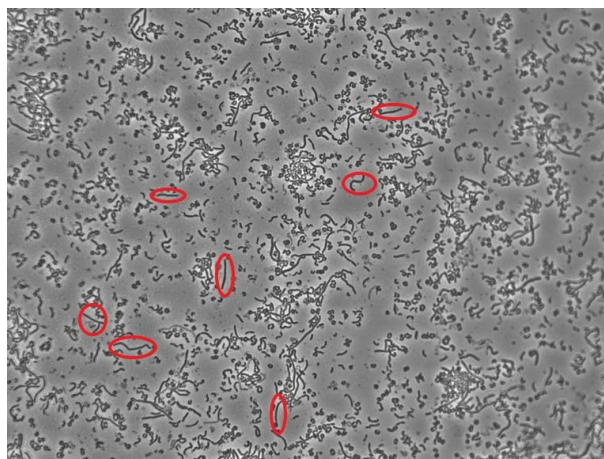
ενώ ένα μικρό ποσοστό υποδείκνυε την ύπαρξη ζωντανών κυττάρων (CFDA+/PI-). Σε κανένα χρονικό σημείο δεν ανιχνεύτηκαν νεκρά κύτταρα (CFDA-/PI+). Αντίθετα, στη δεύτερη βιολογική επανάληψη παρατηρήθηκε πολύ διαφορετικό προφίλ. Συγκεκριμένα, σε αυτή τη συνθήκη παρατηρήθηκαν και οι τρεις καταστάσεις των κυττάρων (ζωντανά, νεκρά και τραυματισμένα). Το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων ήταν υψηλότερο σε σχέση με την πρώτη βιολογική επανάληψη, ενώ το μεγαλύτερο των κυττάρων ήταν διπλά χρωσμένο (CFDA+/PI+). Επιπρόσθετα, και στα τέσσερα χρονικά σημεία υπήρχε ένα μικρό ποσοστό κυττάρων, τα οποία ήταν νεκρά (CFDA-/PI+). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κλασσικής μικροβιολογίας αυτής της συνθήκης, τα κύτταρα διατηρούν την καλλιεργησιμότητά τους. Ωστόσο, σημαντικός τραυματισμός καταγράφηκε στα 2 και 4 min της καταπόνησης, ενώ παρέμεινε σταθερός και αρκετά χαμηλός στα επόμενα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν. Αντίθετα, στο επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων ο τραυματισμός υπήρχε από τη μηδενική χρονική στιγμή της θερμικής επεξεργασίας και παρέμεινε σε υψηλό σημείο καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Και σε αυτή τη περίπτωση, η λειτουργικότητα των χρωστικών ήταν εμφανώς ικανοποιητική στη δεύτερη βιολογική επανάληψη. (Σχήμα 7)





Σχήμα 7. Αποτελέσματα διαφορετικών χρώσεων των κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes*, στέλεχος EDGe στους 64°C για 6 min.. Το διάγραμμα **A** αφορά την πρώτη βιολογική επανάληψη, ενώ το διάγραμμα **B** αφορά τη δεύτερη ανεξάρτητη βιολογική επανάληψη.

Τέλος, κατά την παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο διαπιστώσαμε την αλλαγή σχήματος του μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, το παθογόνο έχασε το ραβδόμορφο σχήμα του και απέκτησε μια νηματοειδή μορφή. Η αλλαγή αυτή αποδίδεται στην επίδραση της μήτρας του τροφίμου στο μικροοργανισμό. Συγκεκριμένα, η μήτρα του τροφίμου είναι περίπλοκη και μεταβλητή. Τα βακτήρια υφίστανται επίδραση από ένα συνδυασμό παραγόντων, όπως το pH, η συγκέντρωση αλατιού και οι χαμηλές θερμοκρασίες, προκαλώντας νηματοειδείς μορφές παρουσία γαλακτικού οξέος.



Εικόνα 6. Νηματοειδείς μορφές *L. monocytogenes* όταν βρίσκονται στην επιφάνεια του λουκάνικου.

10. Συζήτηση

Τα λουκάνικα Φρανκφούρτης αποτελούν ένα από τα πιο γνωστά προϊόντα κρέατος, που προτιμώνται στην αγορά. Η θερμική επεξεργασία, που υπόκεινται κατά τη διάρκεια παραγωγή τους, τα καθιστά ασφαλή προς κατανάλωση. Ωστόσο, η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών σε αυτά τα τρόφιμα, αποτελούν σημαντική απειλή για τις βιομηχανίες τροφίμων. Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* ανιχνεύεται συχνά στην επιφάνεια προϊόντων κρέατος έτοιμα προς κατανάλωση, οδηγώντας σε ανακλήσεις τροφίμων και προκαλώντας σημαντικό οικονομικό πρόβλημα στις βιομηχανίες τροφίμων. (Mugiana *et al.*, 2002)

Τα θερμικής επεξεργασίας τρόφιμα, είναι επιρρεπή σε μόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως το βακτήριο *Listeria monocytogenes*, μετά την επεξεργασία τους. Πολλές έρευνες, μάλιστα υποστηρίζουν ότι η επιμόλυνση αυτή μπορεί να οφείλεται σε λάθους χειρισμούς κατά την οικιακή χρήση. Επομένως, σε πολλές συσκευασίες τέτοιων τροφίμων συνίσταται η διαδικασία αναθέρμανσης, πριν την κατανάλωσή τους. (Karpetanakou *et al.*, 2016)

Οι μικροοργανισμοί, όταν βρεθούν σε αντίξοες συνθήκες ανάπτυξης, αναπτύσσουν μηχανισμούς επιβίωσης. Όταν βρεθούν σε αυτές τις συνθήκες, οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητας. Μια συνθήκη καταπόνησης, ωστόσο, μπορεί να επιδράσει με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικό βαθμό μεμονωμένα κύτταρα μικροβιακού πληθυσμού. Καθίσταται, επομένως αναγκαίο, η χρήση μεθόδων που θα διευκολύνει την αξιολόγηση την περιγραφή της κατανομής επίδρασης μιας συνθήκης καταπόνησης σε επίπεδο πληθυσμού αλλά και ενός κυττάρου, πάνω σε ένα τρόφιμο.

Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα του παθογόνου *Listeria monocytogenes*, τα οποία βρίσκονταν στην επιφάνεια του λουκάνικου, εκτέθηκαν σε ήπιες θερμοκρασίες καταπόνησης (61 και 64°C), για 60 και 20 min, αντίστοιχα. Οι καταπονήσεις που εξετάστηκαν, προκάλεσαν υποθανάτιο τραυματισμό στα κύτταρα του μικροοργανισμού. Με εφαρμογή μιας υποθανάτιας επεξεργασίας, δημιουργούνται υποπληθυσμοί κυττάρων, τα οποία μπορεί να είναι ζωντανά, νεκρά ή τραυματισμένα. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, ο υποθανάτιος τραυματισμός διέφερε στις συνθήκες που μελετήθηκαν, ενώ ταυτόχρονα προκάλεσε διαφορετικές μεταβολικές καταστάσεις των κυττάρων που εκτίθενται στην καταπόνηση.

Στη μελέτη μας, λάβαμε υπόψιν διάφορες παραμέτρους που ενδεχομένως να επηρέαζαν την αξιολόγηση της θερμικής καταπόνησης μετά τη συσκευασία λουκάνικων Φρανκφούρτης. Σε αυτές τις παραμέτρους συμπεριλήφθηκαν η εφαρμογή εμβολιασμού, το σχήμα θέρμανσης χρόνου-θερμοκρασίας, η μικροβιακή ανάκτηση και η αξιολόγηση του επιπέδου μείωσης του μικροοργανισμού. Η επεξεργασία πραγματοποιήθηκε σε προϊόν λουκάνικου, το οποίο προηγουμένως είχε ψυχθεί στους 4 °C. Η εφαρμογή ψύξης πριν τη θερμική καταπόνηση δεν επηρέασε τη θερμική ικανότητα του υδατόλουτρου, το οποίο διατηρούσε σταθερές θερμοκρασίες καθ' όλη τη διάρκεια επεξεργασίας.

Παράλληλα, μελετήσαμε τις επιφανειακές θερμοκρασίες του λουκάνικου χρησιμοποιώντας κατάλληλο ζεύγος θερμοστοιχείων ηλεκτρονικού καταγραφέα. Με τη χρήση αυτών των θερμοστοιχείων, τοποθετημένων περίπου 4mm κάτω από την επιφάνεια μη εμβολιασμένου λουκάνικου, μπορέσαμε να εξετάσουμε τις θερμοκρασιακές διαφορές που παρατηρήθηκαν στις δύο συνθήκες καταπόνησης, προκειμένου να ελέγξουμε τυχόν μεγάλες αποκλίσεις. Παράλληλα, έγινε συνεχή καταγραφή της θερμοκρασίας του υδατόλουτρου, καθ' όλης της διάρκειας των πειραμάτων. Στο Σχήμα 1 φαίνονται οι μέσες μέγιστες θερμοκρασίες που επιτεύχθηκαν στην επιφάνεια των λουκάνικων. Σύμφωνα με ορισμένες έρευνες, στις οποίες μελετήθηκε η θερμική αδρανοποίηση σε πολτούς λουκάνικων Φρανκφούρτης, η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή κατά τη διάρκεια της καταπόνησης. Ωστόσο, με την εφαρμογή θερμικής καταπόνησης στις δύο συγκεκριμένες θερμοκρασίες (61 και 64 °C), η θερμοκρασία των επιφανειών των λουκάνικων δεν ήταν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της επεξεργασίας, λόγω των χρόνων ανόδου της κάθε επιφάνειας. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι οι μέσοι χρόνοι ανόδου στην επιφάνεια των λουκάνικων στους 61 °C και 64°C ήταν περίπου 15 και 10 λεπτά, αντίστοιχα. Όπως, ήταν αναμενόμενο, η μετάδοση θερμότητας και συνεπώς η επίτευξη της θερμοκρασίας-στόχου στην επιφάνεια των λουκάνικων έγινε πιο γρήγορα στη μεγαλύτερη θερμοκρασίας καταπόνησης.

Χρησιμοποιήσαμε εμβόλιο μεγάλου πληθυσμού κυττάρων (10^7 έως 10^8 CFU/ml), προκειμένου να γινόταν η απαρίθμηση των επιζώντων κυττάρων και να καθοριζόταν το εύρος μικροβιακής μείωσης για διάφορους συνδυασμούς χρόνου-θερμοκρασίας. Τέτοιο υψηλό επίπεδο πληθυσμού *L. monocytogenes* δεν είναι δυνατόν να αντιμετωπιστεί ως διασταυρούμενη μόλυνση σε χώρους συσκευασία τροφίμων.

Ωστόσο, είναι ικανό να χρησιμοποιηθεί ως αισθητήρας κυττάρων που πιθανόν να διεισδύσουν σε ρωγμές της επιφάνειας του τροφίμου. Αντίθετα, η χρήση ενός εμβολίου χαμηλού επιπέδου κυττάρων δεν θα είχε αντιμετωπίσει το ζήτημα των επιφανειακών τομών και σχισμών, τα οποία μπορούν να προστατεύσουν το μικροοργανισμό από επακόλουθη θερμική επεξεργασία. Ταυτόχρονα, ένα πρωτόκολλο εμβολιασμού χαμηλού επιπέδου δεν θα ήταν επαρκές για την ποσοτική απαρίθμηση του υπολειπόμενου πληθυσμού και θα απαιτούσε μεγαλύτερο αριθμό προϊόντων για να αποδειχθεί στατιστικά οποιοδήποτε επίπεδο μείωσης.

Η έκθεση του μικροοργανισμού στους 61 °C, είχε ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να χάνουν την καλιεργησιμότητά τους με αύξηση του χρόνου έκθεσης στην συνθήκη καταπόνησης. Συγκεκριμένα, με θέρμανση των βακτηριακών κυττάρων στη συγκεκριμένη θερμοκρασία και για το χρόνο που επιλέχθηκε, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, όσον αφορά την μείωση του πληθυσμού. Έπειτα από 60 min θερμικής επεξεργασίας, ο πληθυσμός βρέθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης. Παρόμοια έρευνα, που μελέτησε την επίδραση θερμικής καταπόνησης στους 62,5 °C, οδήγησε σε αδρανοποίηση του μικροοργανισμού σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (Lianou A. *et al.*, 2007) Παράλληλα, οι Boyle *et al.* (1990) ανέφεραν μία μείωση του πληθυσμού κατά 2,1-2,3 log σε βοδινό κρέας, ύστερα από θερμική επεξεργασία στους 60 °C. Σημαντικός υποθανάτιος τραυματισμός παρατηρήθηκε έπειτα από 6 min θερμικής καταπόνησης. **(Σχήμα 2)** Ο τραυματισμός που παρατηρήθηκε σταδιακά αυξήθηκε, ενώ στο τέλος του πειράματος μηδενίστηκε. Βιβλιογραφικά, οι Golden *et al.* (1988) παρατήρησαν ότι ο τραυματισμός αυξάνεται, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία ή η διάρκεια καταπόνησης.

Αντίθετα, η εφαρμογή μεγαλύτερης θερμοκρασίας (64 °C), για την αξιολόγηση της επίδρασής στην επιβίωση του μικροοργανισμού, οδήγησε σε διαφορετικά ευρήματα. Συγκεκριμένα, έπειτα από 4 min θερμικής επεξεργασίας προκλήθηκε μείωση του πληθυσμού κατά ~3,5 logCFU/cm². Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου τα κύτταρα διατήρησαν την καλιεργησιμότητά τους και, σε αντίθεση με την προηγούμενη συνθήκη, το επίπεδο του συνολικού πληθυσμού βρισκόταν πάνω από το όριο ανίχνευσης. **(Σχήμα 4)** Παρόμοια αποτελέσματα διαπίστωσαν οι Murphy *et al.* (2003), οι οποίοι αξιολόγησαν την αδρανοποίηση του μικροοργανισμού κατά την παστερίωση (96 °C) πλήρως μαγειρεμένου προϊόντος κρέατος. Μάλιστα, την παρατηρούμενη αντοχή στη θερμική επεξεργασία, την απέδωσαν στην ικανότητα των

κυττάρων να εισχωρούν στην επιφάνεια του τροφίμου, λόγω των επιφανειακών ατελειών. Παράλληλα, η εφαρμογή πίεσης κενού, που εφαρμόζεται κατά τη συσκευασία του προϊόντος, μπορεί να επιταχύνει την διείσδυση των βακτηριακών κυττάρων. Παράλληλα, οι Muriana *et al.* (2002), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση θερμικής καταπόνησης μετά την παστερίωση, παρατήρησαν μια τάση χαμηλότερης μείωσης του πληθυσμού στους 96,18°C συγκριτικά με αυτή που ελήφθη στους 90,68°C ή στους 93,38°C. Στη συγκεκριμένη συνθήκη, ο τραυματισμός που παρατηρήθηκε ήταν στατιστικά σημαντικός για τα 4 πρώτα λεπτά, ενώ μέχρι την ολοκλήρωση της καταπόνησης δεν διέφερε σημαντικά.

Όταν παρατηρήσαμε την επίδραση δύο διαφορετικών θερμοκρασιών στη μείωση του πληθυσμού *L. Monocytogenes*, τα αποτελέσματα που λάβατε δεν ήταν αναμενόμενα. Συγκεκριμένα, με εφαρμογή μεγαλύτερης θερμοκρασίας τα κύτταρα του μικροοργανισμού παρουσίασαν μια σημαντική ανθεκτικότητα. Μία πιθανή εξήγηση στο φαινόμενο αυτό είναι ότι κύτταρα τα οποία έχουν εισχωρήσει σε βαθύτερα επίπεδα από την επιφάνεια του λουκάνικου, δεν θα λάβουν την ίδια θανατηφόρα επίδραση της θερμότητας με εκείνα που βρίσκονται στην επιφάνεια του τροφίμου. (Muriana *et al.*, 2002) Μία ακόμη προστασία από τη θερμική καταπόνηση, θα μπορούσε να δοθεί από μερικές ατέλειες της επιφάνειας του τροφίμου, όπως κοψίματα, βαθιές αυλακώσεις ή ραβδώσεις. Η θέρμανση επιφανειών δεν διεισδύει απαραίτητα σε όλες τις τομές, σχισμές ή πτυχές που πιθανόν να προσπελάσουν οι μικροοργανισμοί και ως εκ τούτου οι ενδείξεις θερμοκρασίας ενός ή περισσότερων σημείων την εξωτερική επιφάνεια μπορεί να έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα (Gande *et al.*, 2003)

Μία τρίτη πιθανή εξήγηση είναι ότι το φαινόμενο που παρατηρήσαμε μπορεί να οφείλεται στη μεμβράνη της συσκευασίας του τροφίμου. Συγκεκριμένα, με την εφαρμογή μεγαλύτερης θερμοκρασίας, η συσκευασία του τροφίμου μπορεί να συρρικνωθεί σε μεγαλύτερο βαθμό, σε αντίθεση με τη μικρότερη θερμοκρασία. Η συρρίκνωση αυτή δεν επιτρέπει τη γρήγορη μεταφορά θερμότητας από την επιφάνεια του τροφίμου προς το παγωμένο εσωτερικό του, λόγω ψύξης πριν την θερμική καταπόνηση, μειώνοντας την συνολική θέρμανση και την ταυτόχρονη μείωση των κυττάρων του μικροοργανισμού. (Muriana *et al.*, 2002) Τέλος, η πίεση κενού που εφαρμόστηκε στο τελευταίο στάδιο της συσκευασίας μπορεί να επιταχύνει τη διάχυση των βακτηριακών κυττάρων, καθώς το υγρό μπορεί να εισχωρήσει σε βαθύτερες

σχισμές της επιφάνειας του τροφίμου. Η διάχυση αυτή μπορεί να συνεχιστεί και κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας, μετά το στάδιο της συσκευασίας, εφόσον υπάρχει ελεύθερο υγρό που κινείται γύρω από το τρόφιμο. (Murphy, Duncan *et al.*, 2003)

Ύστερα από τις παραπάνω διαδικασίες, στις οποίες μελετήθηκαν οι συνθήκες που επάγουν υποθανάτιο τραυματισμό, ακολούθησε η παρατήρηση ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων στο Μικροσκόπιο Φθορισμού. Ο αριθμός των κυττάρων ανά οπτικό πεδίο που μελετήθηκε, στη συνέχεια αναλύθηκε χρησιμοποιώντας κατάλληλους αλγορίθμους.

Για την πρώτη συνθήκη καταπόνησης μελετήθηκαν πέντε διαφορετικά σημεία, στα περισσότερα από τα οποία είχε διαπιστωθεί τραυματισμός. Μελετώντας την επίδραση της συγκεκριμένης συνθήκης, παρατηρήθηκε σημαντικό ποσοστό υποθανάτιου τραυματισμού, το οποίο αυξήθηκε κατά την παρατεταμένη έκθεση στη θερμική επεξεργασία. Ωστόσο, ένα μέρος των κυττάρων του μικροβιακού πληθυσμού διατήρησε την καλλιεργησιμότητά του, μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας. (Σχήμα 6) Ωστόσο, όπως φαίνεται στο διάγραμμα, κατά την έκθεση στη συγκεκριμένη θερμοκρασία, το ποσοστό CFDA+/PI+ κυττάρων αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, υποδεικνύοντας μια ενδιάμεση κατάσταση, στην οποία τα κύτταρα βρίσκονται σε μια συνεχή κατάσταση ληθάργου.

Παράλληλα, στη συγκεκριμένη συνθήκη ένα μεγάλο ποσοστό κυττάρων παραμένει άβαφο (CFDA-/PI-). Μια πιθανή εξήγηση αυτής της κατάστασης, μπορεί να είναι η επίδραση της καταπόνησης στη λειτουργία των εστερασών, προκαλώντας μείωση της μεταβολικής τους δραστηριότητας, χωρίς, όμως, να καταστρέφεται η κυτταρική τους μεμβράνη.

Αντίθετα, από την παρατήρηση της επίδρασης της δεύτερης συνθήκης καταπόνησης στην αδρανοποίηση του μικροοργανισμού, διαπιστώθηκε από την αρχή (μηδενική χρονική στιγμή) ένα υψηλό ποσοστό κυττάρων διπλά χρωσμένο. Υπήρχε, όμως, ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων, τα οποία είχαν διατηρήσει τη ζωτικότητα τους και εξέπεμπαν πράσινο φθορισμό. Τα αποτελέσματα αυτά, βρίσκονται σε συμφωνία με τα μικροβιολογικά δεδομένα.

Ένα ακόμα εύρημα της μελέτης αυτής, ήταν η αλλαγή σχήματος των κυττάρων του μικροοργανισμού. Αναλυτικότερα, ο μικροοργανισμός έχανε το καθορισμένο

ραβδόμορφο σχήμα του και αποκτούσε νηματοειδή μορφή. Καθώς το τρόφιμο αποτελεί ένα περίπλοκο σύστημα, τα κύτταρα του μικροοργανισμού, όταν βρεθούν πάνω στην επιφάνεια ή τη μήτρα του τροφίμου, δέχονται ένα συνδυασμό επιδράσεων, οι οποίες οδηγούν στη αλλαγή του σχήματος και της μεταβολικής λειτουργίας του μικροοργανισμού.

Κάθε καταπόνηση που εφαρμόζεται, ανάλογα με τον τρόπο δράσης της στα κύτταρα του μικροοργανισμού, προκαλεί περισσότερο ή λιγότερο ποσοστό τραυματισμού στη συνθήκη που μελετάται. Η μικροβιακή συμπεριφορά σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων σε διάφορα στρες, έχει μελετηθεί υπό άριστες και θανατηφόρες συνθήκες. Λίγα είναι τα δεδομένα που περιγράφουν την συμπεριφορά των κυττάρων σε ενδιάμεσες συνθήκες καταπόνησης. Δεδομένου ότι η παραλλακτικότητα αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των βιολογικών συστημάτων, τα βακτηριακά κύτταρα παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ικανότητα να εκδηλώσουν διαφορετική απόκριση σε διάφορες περιβαλλοντικές αλλαγές. Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί κρίσιμη για την γενετική ποικιλομορφία που υπάρχει μεταξύ των διάφορων στελεχών και στην παρουσία διαφορετικών γονιδίων, τα οποία τα διαφοροποιούν μεταξύ τους.

Τα δεδομένα που ελήφθησαν από την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία αποτελούν σημαντικά ευρήματα, καθώς μπορεί να συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση και εκτίμηση του υποθανάτιου τραυματισμού, καθώς αποτελεί ένα αναδυόμενο κίνδυνο για την βιομηχανία τροφίμων. Αυτό συμβαίνει, διότι εκτός από την υποεκτίμηση του μικροβιακού φορτίου σε ένα τρόφιμο, κύτταρα, τα οποία έχουν τραυματιστεί, δεν χάνουν την λοιμογόνο δράση τους.

11. Συμπεράσματα

Ο τρόπος λειτουργίας των μικροβιακών κοινοτήτων αποτελεί ένα ιδιαίτερο κομμάτι για την Μικροβιολογία τροφίμων. Αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την κατανόηση λειτουργίας του μικροβιακού πληθυσμού. Παράλληλα, παίζει σημαντικό ρόλο για τον έλεγχο μόλυνσης τροφίμων από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η ανάπτυξη μεθόδων φθορισμομετρικών τεχνικών μπορεί να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη δομή και τη μεταβολική τους λειτουργικότητα, καθώς και τις βακτηριακές αλληλεπιδράσεις.

Η αξιολόγηση *in situ* υποθανάτιου τραυματισμού μπορεί να καταστεί κρίσιμη για την βιομηχανία τροφίμων. Με την βοήθεια αυτής της μελέτης, θα μπορούν να διακρίνουμε τη συνεχή μεταβατική κατάσταση ληθάργου, στην οποία μπορεί να βρίσκονται τα κύτταρα, «απειλώντας» σημαντικά την ασφάλεια τροφίμων. Παράλληλα, η χρήση νέων, γρήγορων μεθόδων ανίχνευσης μπορεί να καταστεί κρίσιμη για την βιομηχανία τροφίμων, καθώς μπορεί να προσφέρει γνώσεις σχετικά με τους κινδύνους υπερεκτίμησης μιας διεργασίας θανάτωσης, δεδομένου ότι οι κλασσικές μέθοδοι μικροβιολογίας δεν προσφέρουν επαρκείς πληροφορίες.

Ένα περαιτέρω βήμα, όπως η φαινοτυπική και μικροσκοπική παρατήρηση κυττάρων, θα προσφέρει περαιτέρω πληροφορίες για τον τρόπο επίδρασης σε μια συνθήκη καταπόνηση, σημαντικές για την αποφυγή πιθανής ανάκλησης και απόσυρσης προϊόντων από τι βιομηχανίες τροφίμων.

12. Βιβλιογραφία

- Adams, M.R. and Moss, M.O. (2000). *Bacterial agents of foodborne illness*. In: Food Microbiology, 2nd ed., RSC Publishing, UK, pp. 225-232.
- Angelidis, A. and Koutsoumanis, K. (2006). *Prevalence and concentration of Listeria monocytogenes in sliced ready-to-eat meat products in the Hellenic retail market*. Journal of Food Protection, 69(4), pp. 938-942.
- Beales, N. (2004). *Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress: a review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 3(1), pp. 1-20.
- Beech, I. B. & Gaylarde, C. C. (1989). *Adhesion of Desulfovibrio desulfuricans and Pseudomonas fluorescens to mild steel surfaces*. Journal of Applied Bacteriology, 67, pp. 201-207.
- Bortolussi, R. (2008). *Listeriosis: a primer*. Canadian Medical Association Journal, 179(8), pp. 795-797.
- Bridier, A., Hammes, F., Canette, A., Bouchez, T. and Briandet, R. *Fluorescence-based tools for single-cell approaches in food microbiology*. International Journal of Food Microbiology, 213, pp. 2-16.
- Castrica, M., Andoni, E., Intaina, I., Curoce, G., Copelotti, E., Massacci, F.R., Terio, V., Colombo, S. and Balzaretto, C.M. (2021). *Prevalence of Listeria monocytogenes and Salmonella spp. In Different Ready to Eat Foods from Large Retailers and Canteens over a 2-Year Period in Northern Italy*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 18(20), pp. 1-11.
- Dortet, L., Radoshevich, L., Veiga, E. and Cossat, P. (2019). *Listeria monocytogenes*. In: Encyclopedia of Microbiology, 4th ed., Academic Press, pp. 803-818.
- Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W., and Scott, V. N. (2001). *Heat resistance of Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 64, pp. 410-429.
- EFSA (2013). *Analysis of the baseline survey on the prevalence of Listeria monocytogenes in certain ready-to-eat (RTE) foods in the 87 EU, 2010-2011 Part A: Listeria monocytogenes prevalence estimates*. The EFSA Journal, 11, pp. 75.

EFSA (2019). *Quantitative risk assessment of Listeria monocytogenes in a traditional RTE product*. The EFSA Journal, pp. 1-9. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.e170906>

EFSA (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. The EFSA Journal, pp. 78-93. doi: [10.2903/j.efsa.2021.6406](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406)

Eom, S., Jung, Y. and Yoon, K. (2009). *Effect of sanitizer stress response on the growth kinetics of Listeria monocytogenes on imitation crabmeat and in broth, as a function of temperature*. Journal of Food Safety, 29(4), pp. 564-574.

Farber, J.M. and Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes: a food-borne pathogen*. Microbiological Reviews, 55(3), pp. 476-511.

Farber, J.M., Zwietering, M., Wiedmann, M., Schaffner, D., Hedberg, G.W., Harrison, M.A., Hartnett, E., Chapman, B., Donnelly, C.W., Goodburn, K.E. and Gummalla, S. (2021). *Alternative approaches to the risk management of Listeria monocytogenes in low-risk foods*. Food Control, 123, pp. 1-26.

Gande, N and Muriana, P. (2003) *Prepackage Surface Pasteurization of Ready-to-Eat Meats with a Radiant Heat Oven for Reduction of Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 66 (9), pp. 1623-1630.

Radiant Heat Oven for Reduction of Listeria monocytogenes

Gandhi, M. and Chikindas, M.L. (2007) *Listeria: A Foodborne Pathogen That Knows How to Survive*. International Journal of Food Microbiology, 113, pp. 1-15.

Gianotti, A., Serrazarietti, D., Kamderri, S. S., and Guerzoni, M. E. (2008). *Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 123, pp. 9–17.

Henry, B.S. (1933). *Dissociation in the genus Brucella*. The Journal of Infectious Diseases., 52, pp. 374-402.

Holley, R.S. and Cordeiro, R.P. (2014). *Microbiological Safety of meat: Listeria monocytogenes*. In: Encyclopedia of Meat Sciences, 2nd ed., Academic Press, pp. 348-356.

- Hurst, A. (1977). *Bacterial injury: a review*. Canadian Journal of Microbiology, 23(8), pp. 935-944.
- Jami, M., Ghanbari, M., Zunabovic, M., Doming, K.J. and Kneifel, W. (2014). *Listeria monocytogenes in Aquatic Food Products: a review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13, pp. 798-813.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. (2005). *Modern Food Microbiology*., Springer Science and Business Media, 7th edition, New York, pp. 595-598.
- Jimenez-Colmenero, F. (1996). *Technologies foe developing low-fat meat products*. Trends in Food Science & Technology, 7(2), pp. 41-48.
- Khefel, N., Lecuit, M., Buchieser, C. and Cabanes, D. (2006). *Listeria monocytogenes and the Genus Listeria*. In: The Prokaryotes, 4th ed., Springer Heidelberg, New York, pp. 404-476. doi:[10.1007/0-387-30744-3_11](https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_11)
- Ko, R., Smith, L.T. and Smith G.M. (1994). *Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on Listeria monocytogenes*. Journal of Bacteriology, 176(2), pp. 426-431.
- Lado, B. and Yousef, A.E. (2007). *Characteristics of Listeria monocytogenes important to food processors*. In: *Listeria, listeriosis and food safety*, 3rd ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 157-219.
- Lakicevic, B., Nastasijevic, I. and Raseta, M. (2015). *Sources of Listeria monocytogenes contamination in retail establishments*. Procedia Food Science, 5, pp. 160-163.
- Lianou, A. and Sofos, J.N. (2007). *A review of the incidence and transmission of Listeria monocytogenes in ready-to-eat products in retail and food service environments*. Journal of Food Protection, 70(9), pp. 2172-2198.
- Lianou, A., Geornaras, I., Kendall, P.A., Belk, K.E., Scanga, J.A., Smith, C.G. and Sofos, J.N. (2007). *Fate of Listeria monocytogenes in Commercial Ham, Formulated with or without Antimicrobials, under Conditions Simulating Contamination in the Processing or Retail Environment and during Home Storage*. Journal of Food Protection, 70(2), pp. 378-385.

Lin C.M., Takeuchi, K., Zhang, L., Dohm, C.B., Meyer, J.D., Hall, P.A. and Doyle, M.P. (2006). *Cross-contamination between processing equipment and deli meats by Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 69(1), pp. 71-79.

Liu, D. (2008). *Biology and Pathogenicity*. In: Handbook of Listeria monocytogenes, Taylor and Francis CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.3-100.

Low, J.C. and Donachie, W. (1997). *A review of Listeria monocytogenes and listeriosis*. The Veterinary Journal, 153(1), pp. 9-29. doi:[10.1016/s1090-0233\(97\)80005-6](https://doi.org/10.1016/s1090-0233(97)80005-6)

Maleki, F.J., Khosravi, A., Nasser, A., Taghinejad, H. and Azizian, M. (2016). *Bacterial Heat Shock Protein Activity*. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 10(3), pp. 1-3.

Matle, I., Mbatha, K.R. and Madoroba, E. (2020). *A review of Listeria monocytogenes from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 87(1), pp. 1-20.

Matthews, K.R., Montville, T.J. and Kniel, K.E. (2017) *Listeria monocytogenes*. In: Food Microbiology: An Introduction, 4th ed., ASM Press, Washington, pp. 267-290.

McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J. and Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods*. International Journal of Food Microbiology, 92, pp. 15-33.

McLauchlin, J., Rees, C.E.D. and Dodd, C.E.R. (2014) *Listeria monocytogenes and the Genus Listeria*. In: The Prokaryotes, 4th ed., Springer Heidelberg, New York, pp. 241-260.

Mcmeekin, T.A., Brown, J.L., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D.S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D.A., Boss, T., Salter, M. and Soontranon, S. (1997). *Quantitative Microbiology: a basis for food safety*. Emerging Infectious Diseases, 3, pp. 541-550.

Meelheuc, T., Methivier, C., Renault, M., Herry, J.M., Pradier, C.M. and Bellon-Fontaine, M.N. (2006). *Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants*

produced by gram-negative and gram-positive bacteria: Consequence on the bioadhesive behavior of Listeria monocytogenes. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 52, pp. 128-137.

Miller, A.J. (1992). *Combined water activity and solute effects on growth and survival of Listeria monocytogenes* Scott A. Journal of Food Protection, 55, pp. 414-418.

Moretro, T. and Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes: biofilm formation and persistence in food-processing environments.* Biofilms, 1(2), pp. 107-121.

Muchaamba, F., Eshwar, A.K., Von Ah, U., Stevens, M.J.A. and Tasara, T. (2020). *Evolution of Listeria monocytogenes During a Persistent Human Prosthetic Hip Joint Infection.* Frontiers in Microbiology, 11, pp. 1-19.

Muriana, P.M., Quimby, W., Davidson, C.A. and Grooms, J. *Postpackage Pasteurization of Ready-to-Eat Deli Meats by Submersion Heating for Reduction of Listeria monocytogenes.* Journal of Food Protection, 65(6), pp. 963-969.

Murphy, R.Y., Duncan, L.K., Driscoll, K.H., Marcy, J.A. and Beard, B.L. (2003) *Thermal Inactivation of Listeria monocytogenes on Ready-to-Eat Turkey Breast Meat Products during Postcook In-Package Pasteurization with Hot Water.* Journal of Food Protection, 66 (9), pp. 1618-1622.

Murphy, R.Y., Osaili, T., Duncan, L.K. and Marcy, J.A. (2003) *Thermal Inactivation of Salmonella and Listeria monocytogenes in Ground Chicken Thigh/Leg Meat and Skin.* Poultry Science, 83, pp. 1218-1225.

Nho, S.W., Abdelhamed, H., Reddy, S., Karsi, A. and Lawrence, M.L. (2015). *Identification of high-risk Listeria monocytogenes serotypes in lineage I (serotype 1/2a, 1/2c, 3a and 3c) using multiplex PCR.* Journal of Applied Microbiology, 119, pp.845-852.

Orsi, R.H. and Wiedmann. M. (2016). *Characteristics and distribution of Listeria spp., including Listeria species newly described since 2009.* Applied Microbiology and Biotechnology, 100, pp. 5273-5287.

Parker, C. and Hutkins, R.W. (1997). *Listeria monocytogenes* Scott A transports glucose by high- affinity and low-affinity glucose transport systems. Applied and Environmental Microbiology, 63(2), pp. 543-546.

Peel, M., Donachie, W. and Shaw, A. (1988). *Temperature-dependent expression of flagella of Listeria monocytogenes studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting*. The Journal of General Microbiology, 134(8), pp. 2171-2178. doi:[10.1099/00221287-134-8-2171](https://doi.org/10.1099/00221287-134-8-2171).

Pine, L., Malcolm, G.B., Brooks, J.B. and Daneshvar, M.I. (1989). *Physiological studies on the growth and utilization of sugars by Listeria species*. Canadian Journal of Microbiology, 35, 245–254. doi: [10.1139/m89-037](https://doi.org/10.1139/m89-037)

Pirie, J.H.H. (1940). *Listeria: Change of Name for a Genus Bacteria*. Nature, 145(3668), pp. 264. doi:[10.1038/145264a0](https://doi.org/10.1038/145264a0)

Radoshevich, L., and Cossart, P. (2017). *Listeria monocytogenes: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis*. Nature Reviews Microbiology, 16(1), pp. 32–46.

Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Suryaprasad, P.P. and Vijila, H.M. (2007). *Listeria-review of epidemiology and pathogenesis*. Journal of Microbiology, immunology and infection, 40(1), pp. 4-13.

Ritossa, F.M. (1962). *A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in Drosophila*. Experientia, 18, pp. 571–573.

Rocourt, J. and Buchrieser, C. (2007). *The genus Listeria and Listeria monocytogenes: phylogenetic position, taxonomy and identification*. In: *Listeria, listeriosis and food safety*, 3rd ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 1-20.

Roncarati, D., and Scarlato, V. (2017). *Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output*. FEMS Microbiology Reviews, 41(4), pp. 549-574.

Seeliger, H.P.R and Jones, D. (1986) *Genus Listeria*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2., The Wiliam's & Wilkins Co., Baltimore, pp. 1235-1245.

Shamloo, E., Hosseini, H., Abdi, M.Z., Halberg, L.M., Haslberger, A. and Alebouyeh, M. (2019) *Importance of Listeria monocytogenes in food safety: a review of its prevalence, detection and antibiotic resistance*. Iranian Journal of Veterinary Research, 20(4), pp. 241-254.

- Swaminathan, B. and Gerner-Smidt, P. (2007). *The epidemiology of human listeriosis*. *Microbes and Infection*, 9(10), pp. 91236–1243.
- Swaminathan, B., Cabanes, D., Zhang, W., & Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes*. In: *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*, 3rd ed., DC: ASM., Washington, pp. 457–491.
- Tsaloumi, S., Aspidou, Z., Tsigarida, E., Gaitis, F., Garofalakis, G., Barberis, K., Tzoumanika, F., Dandoulaki, M., Skiadas, R. and Koutsoumanis, K. (2021). *Quantitative risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat (RTE) cooked meat products sliced at retail stores in Greece*. *Food Microbiology*, 99, pp. 1-12.
- Varnam, A.H. and Sutherland, J.P. (1995). *Meat and meat products: technology, chemistry and microbiology*. Chapman and Hall, pp. 1-430.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. and Kreft, J. (2001). *Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), pp. 584-640. doi:[10.1128/CMR.14.3.584-640.2001](https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001)
- Wenger, J. D., Swaminathan, B., Hayes, P. S., Green, S. S., Pratt, M., and Pinner, R. W. (1990). *Listeria monocytogenes contamination of turkey franks: evaluation of a production facility*. *Journal of Food Protection*, 53, pp. 1015–1019.
- Zaika, L.L., Palumbo, J.L., Fernando del corral, S., Bhaduri, C.O., Joones and Kim, A.H. (1990) *Destruction of Listeria monocytogenes during processing*. *Journal of Food Protection*, 53(1), pp. 18-21.

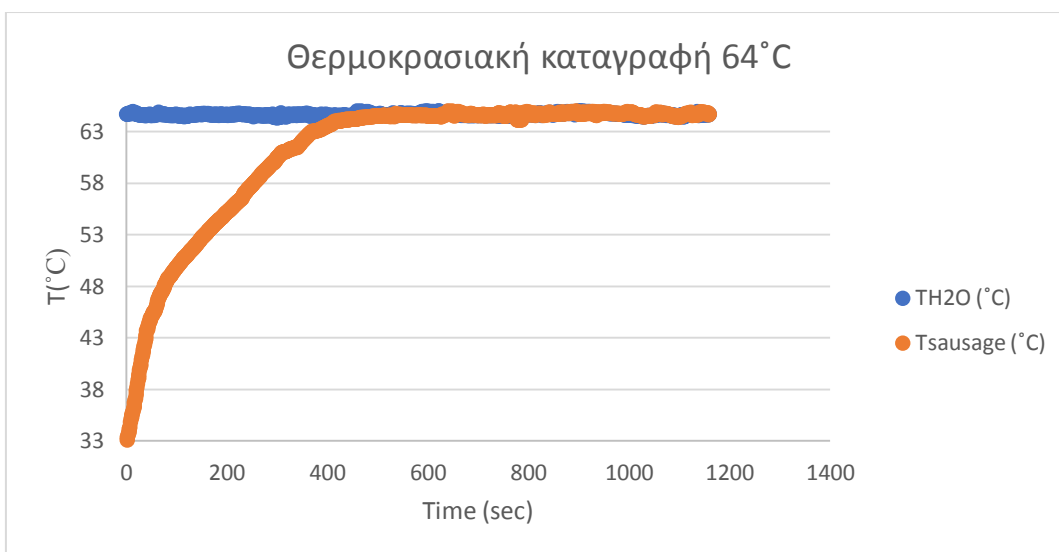
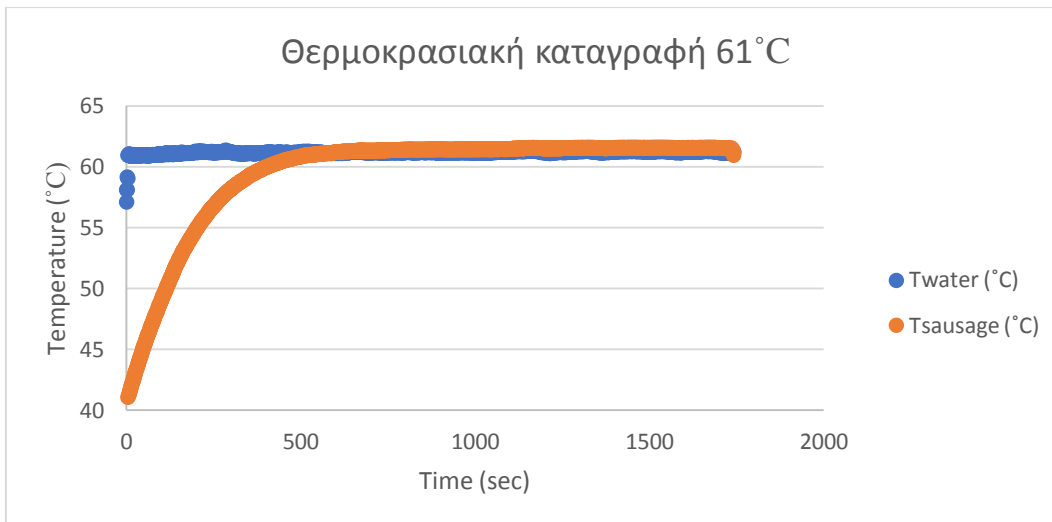
13. Παράρτημα

Πίνακας 3. Χρονικές στιγμές της πειραματικής διαδικασίας στους 61°C του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Με -, *, **, *** και **** υποδηλώνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής μείωσης του πληθυσμού.

ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ (61°C)		
TIME (min)	TSA-YE	TSA-YE + NaCl
0	-	-
6	****	**
12	***	*
18	**	-
24	*	-
30	*	-
36	*	-
42	*	-
48	*	-
54	-	-
60	-	-

Πίνακας 4. Χρονικές στιγμές της πειραματικής διαδικασίας στους 64°C του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Με -, *, **, *** και **** υποδηλώνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής μείωσης του πληθυσμού

ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ (64°C)		
TIME (min)	TSA-YE	TSA-YE + NaCl
0	-	-
2	***	*
4	**	*
6	**	-
8	**	-
10	**	-
12	**	-
14	**	-
16	**	-
18	**	-
20	**	-



Σχήμα 8. Προφίλ μέσης θερμοκρασίας σε επιφάνειες των λουκάνικων Φρανκφούρτης κατά τη διάρκεια θερμικής επεξεργασίας σε υδατόλουτρο στους 61°C και 64 °C και του νερού, μέσα στο οποίο γίνεται η επεξεργασία (τα δεδομένα λαμβάνονται κάθε δευτερόλεπτο κατά τη διάρκεια της θέρμανσης).