



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΠΟΤΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ
ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΟΥΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ
Listeria monocytogenes ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ**

**ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ ΔΕΣΠΟΙΝΑ Β. ΠΑΤΛΑΚΑ
ΑΘΗΝΑ 2015**

Επιβλέπων καθηγητής: Δροσινός Ελευθέριος

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ
ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΟΥΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ
Listeria monocytogenes ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ
ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ*

ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ ΔΕΣΠΟΙΝΑ Β. ΠΑΤΛΑΚΑ

Επιβλέπων καθηγητής: Δροσινός Ελευθέριος

Εξεταστική Επιτροπή: Δροσινός Ελευθέριος

Πανάγου Ευστάθιος

Σκανδάμης Παναγιώτης

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να απευθύνω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης και Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων κ. Δροσινό Ελευθέριο για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και συμβολή του καθ'όλη τη διάρκεια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών αλλά και για την ανάθεση του θέματος της μελέτης. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να απευθύνω στο Δρ. Παραμυθιώτη Σπυρίδωνα, μέλος, του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε και την ανεκτίμητη συνεισφορά του στην εκπόνηση αυτής της μελέτης.

Ιδιαίτερη μνεία και πολλές ευχαριστίες στην υποψήφια Διδάκτορα Χατζηλούκα Αγνή για την άψογη και εποικοδομητική συνεργασία μας, η βοήθεια της οποίας όχι μόνο υπήρξε αποφασιστικής σημασίας για την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης αλλά και καταλυτική για τη διεξαγωγή των μοριακών τεχνικών για τη γονιδιακή έκφραση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, για την προθυμία της να προσφέρει αγόγγυστα τις γνώσεις της, και για την ψυχολογική υποστήριξη που μου προσέφερε σε όλο το διάστημα διεξαγωγής της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους γονείς μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξή τους καθ'όλη τη διάρκεια ολοκλήρωσης της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης.

Αποστολία Δέσποινα Β. Πατλάκα

Αθήνα 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
B. ABSTRACT	8

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	10
1.1.1 Εισαγωγικές πληροφορίες.....	10
1.1.2 Ταξινόμηση.....	10
1.1.3 Κατανομή.....	10
1.1.4 Ανάπτυξη	11
1.1.5 Επιβίωση.....	11
1.2 Λιστερίωση.....	12
1.2.1 Χαρακτηριστικά της νόσου στον άνθρωπο.....	12
1.2.2 Παθογένεια.....	13
1.2.3 Υπεύθυνα τρόφιμα	13
1.2.4 Πρόληψη.....	15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

2.1.1 Εισαγωγικές πληροφορίες.....	17
2.1.2 Η αρχή λειτουργίας της αντίδρασης της PCR.....	17
2.2.1 Η αρχή λειτουργίας της Real Time PCR	20
2.2.2 Συστήματα Real Time PCR	21
2.2.2.1 Μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης.....	21
2.2.2.2 Ειδικά συστήματα ανίχνευσης	22
2.2.3 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης.....	26
2.2.3.1 Απόλυτη ποσοτικοποίηση	26
2.2.3.2 Σχετική ποσοτικοποίηση.....	27
2.2.4 Καμπύλης Αποδιάταξης (Melting Curve Ή Dissociation Curve)	30
2.3 Συσκευή Real Time PCR - Περιγραφή του οργάνου	31

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕ- ΝΟΥΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *Listeria monocytogenes* ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΕ ΓΑΣΤΡΙ- ΚΟ ΚΑΙ ΔΩΔΕΚΑΔΑΚΤΥΛΙΚΟ ΥΓΡΟ

3.1.1 Γονίδια παθογένειας του βακτηρίου <i>L. monocytogenes</i>	35
3.1.2 Επιβίωση του μικροοργανισμού <i>L. monocytogenes</i> υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης έπειτα από έκθεση σε γαστρικό υγρό του ανθρώπινου στομάχου	39

3.1.2.1 Το σύστημα GAD και ο ρόλος του παράγοντα σ^B στη ρύθμισή του	39
3.1.2.2 Το σύστημα απαμινάσης της αργινίνης	41
3.2 Επιβίωση του μικροοργανισμού <i>L. monocytogenes</i> έπειτα από έκθεση σε ανθρώπινο δωδεκαδακτυλικό υγρό	42
3.3 Σκοπός και αντικείμενο μεταπτυχιακής μελέτης	44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Αναλώσιμα υλικά	46
4.1.1 Θρεπτικά υποστρώματα	46
4.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός	47
4.3 Μικροβιακό στέλεχος	48
4.4 Πειραματική διαδικασία	48
4.4.1 Μικροβιολογικές τεχνικές ανάλυσης	48
A) Ανανέωση του στελέχους του παθογόνου μικροοργανισμού <i>L.monocytogenes</i> R.9.1	48
B) Συλλογή γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού υγρού	48
Γ) Εμβολιασμός	49
Δ) Μικροβιολογική επεξεργασία δείγματος-Διαδοχικές αραιώσεις	50
E) Καταμέτρηση των βακτηριακών πληθυσμών	50
4.4.2 Μοριακές τεχνικές ανάλυσης	51
A) Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA)	51
B) Ποσοτικοποίηση και ποιοτικός έλεγχος του ριβονουκλεϊκού οξέος	53
Γ) Αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription) –Σύνθεση cDNA	53
Δ) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)	55
1. Χρήσιμοι όροι	55
2. Χημική βάση των μεθόδων ανίχνευσης των προϊόντων της Real Time PCR (Detection chemistries)	56
3. Βελτιστοποίηση συνθηκών της Real Time PCR	56
4. Ποσοτικοποίηση με Real-Time PCR (Quantitative Real-Time PCR, QRT-PCR)	57
4.1 Σχετική ποσοτικοποίηση (Real-Time Relative QRT-PCR), εύρεση γονιδίου αναφοράς και αποδοτικότητας της μεθόδου	57
5. Συνθήκες της Real Time PCR	58
6. Οι εκκινητές στη Real Time PCR	59
7. Υπολογισμός CFU (Colony Forming Unit)	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Μικροβιακές αναλύσεις	64
---------------------------------	----

5.2 Προσδιορισμός αποδοτικότητας μεθόδου (Efficiency)	65
5.3 REAL TIME PCR	66
5.3.1 Αποτελέσματα βάσει του μαθηματικού τύπου κατά Pfaffl.....	66
5.3.2 Αποτελέσματα υπολογισμού CFU (Colony Forming Unit)	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	76
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	83
I. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ <i>Listeria</i> spp	83
II. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	85
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	88
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ	94
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ - ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	96

Α. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεια του τροφιμογενούς παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*, έπειτα από έκθεση του μικροοργανισμού σε ανθρώπινο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες του στελέχους R.9.1 του παθογόνου που είχαν απομονωθεί από δείγματα φράουλας. Τα γονίδια παθογένειας που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα : *sigB*, *plcA*, *plcB*, *hlyA*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *lmo2672* και *lmo2470*. Οι λήψεις των υγρών πραγματοποιούνταν με το πέρας διαγνωστικής ενδοσκόπησης, τα υγρά τοποθετούνταν σε έτερα αποστειρωμένα δοχεία και μεταφέρονταν άμεσα και υπό ψύξη στον εργαστηριακό χώρο για την διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν κατά τον εμβολιασμό του γαστρικού υγρού με το βακτηριακό στέλεχος (9 log CFU/mL), μετά την επώασή του (37°C/ 100 min), κατά την επαναιώρηση του στελέχους στο δωδεκαδακτυλικό υγρό και μετά την επώαση του εμβολιασμένου δωδεκαδακτυλικού υγρού (37°C/ 2h). Μελετήθηκαν οι μεταβολές του πληθυσμού σε κάθε στάδιο δειγματοληψίας και εξετάστηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την παθογόνο δράση μέσω της μεθόδου της Real Time PCR. Η μεταβολή του πληθυσμού του μικροοργανισμού φαίνεται να μην μπορεί να εκτιμηθεί με κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές καθώς επηρεάζεται από το pH και την σύσταση των υγρών καθώς και από την ηλικία και το ιατρικό ιστορικό των ασθενών. Όσον αφορά στα γονίδια παθογένειας, κάποια φάνηκε να επηρεάζονται από το pH των γαστρικών υγρών και να παρουσιάζουν υποέκφραση μετά την επώασή του γαστρικού υγρού με το στέλεχος (π.χ. *sigB*), άλλα γονίδια παρουσίασαν μια γενική υπερέκφραση σε σχέση με αντίστοιχη έκφρασή τους έπειτα από επώαση του στελέχους σε γενικό θρεπτικό υπόστρωμα, άλλοτε μεγαλύτερη (*hly*, *inlC*) και άλλοτε μικρότερη (*plcA*, *plcB*, *inlJ*, *lmo2470*, *lmo2672*), ενώ άλλα γονίδια δεν φάνηκε να επηρεάζονται από την έκθεση του μικροοργανισμού στα υγρά (*inlA*, *inlB*).

Λέξεις-κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, όξινη καταπόνηση, γαστρικό υγρό, δωδεκαδακτυλικό υγρό, γαστρεντερικός σωλήνας, λοιμογόνα γονίδια, έκφραση γονιδίων, παθογένεια, λοίμωξη

B. ABSTRACT

The aim of this study was to determine the expression of genes associated with the pathogenicity of the bacterial foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*, after the exposure of the microorganism in human gastric and duodenal fluid. Cultures of the R.9.1 strain of the pathogen, isolated from strawberry samples, were used for the study. The pathogenic genes studied in this work are: *sigB*, *plcA*, *plcB*, *hlyA*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *lmo2672* and *lmo2470*. The collection of fluids was held by the end of diagnostic endoscopy. The fluids were placed in separate sterile containers, and transported directly to the laboratory in refrigerated space for carrying out the experimental procedures. Samplings were made at inoculation of gastric fluid with the bacterial strain (9 log CFU / mL), after incubation (37°C / 100 min), by resuspending the strain in the duodenal fluid and after incubation of the inoculated duodenal fluid (37°C / 2h). We studied the changes in the population at each sampling step and examined the expression of genes associated with the pathogenic effects through the Real Time PCR method. The change in the microorganism population appears that can not be assessed by standard microbiological techniques as influenced by the pH, the composition of fluids, the age and the medical history of the patient. Regarding the pathogenic genes, some appear to be influenced by the pH of gastric juice and exhibit down-regulation after incubation of the gastric fluid with the stem (e.g. *sigB*), other genes showed a general up-regulation compared to the corresponding expression after incubation of the strain on a general nutrient medium, sometimes more (*hly*, *inlC*) and sometimes less (*plcA*, *plcB*, *inlJ*, *lmo2470*, *lmo2672*), while other genes did not appear to be affected by exposure of the microorganism in the fluids (*inlA*, *inlB*).

Keywords: *Listeria monocytogenes*, acid stress, gastric fluid, duodenal fluid, gastrointestinal tract, virulence genes, gene expression, pathogenesis, infection

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

1.1 *Listeria monocytogenes*

1.1.1 Εισαγωγικές πληροφορίες

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* (Λιστέρια μονοκυτταρογόνος) είναι το παθογόνο αίτιο της λιστερίωσης (listeriosis). Η λιστερίωση είναι μια νόσος με μεγάλη σημασία για τη δημόσια υγεία λόγω της σοβαρότητάς της (εκδηλώνεται με μηνιγγίτιδα, σηψαιμία και αποβολή), της υψηλής θνησιμότητας (περίπου 20-30% των περιπτώσεων), του μεγάλου χρόνου επώασης και την ευπάθεια που παρουσιάζουν μεμονωμένα άτομα με μειωμένη ανοσία. Η σημασία του ως παράγοντα πρόκλησης τροφιμογενούς νόσου έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια επειδή είναι ένα από τα λίγα παθογόνα βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα που μπορούν να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ψύξης κάτω από αναερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες (Nyati, 2000).

1.1.2 Ταξινόμηση

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι θετικό κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο με ποικιλία στη μορφολογία, ανάλογα με τις συνθήκες περιβάλλοντος (Janda και Abbott, 1999). Είναι ένα από τα δέκα είδη *Listeria*. Τα υπόλοιπα είδη είναι οι μικροοργανισμοί: *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* (Rocourt, 1999), *L. rocourtiae*, *L. marthii*, *L. weihenstephanensis* και *L. fleischmannii* (den Bakker *et al.* 2013). Από τα είδη του γένους *Listeria* μόνο ο *L. monocytogenes* και ο *L. ivanovii* θεωρούνται παθογόνα. Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι παθογόνος για τον άνθρωπο, ενώ ο *L. ivanovii* είναι κυρίως παθογόνος για τα ζώα.

1.1.3 Κατανομή

Έχει απομονωθεί από το έδαφος (Welshimer, 1960), το νερό και τα φυτά σε αποσύνθεση (Welshimer, 1968, Weis, 1975), όπου παρουσιάζει ιδιαίτερη αντοχή (Watkins και Sleath, 1981). Η χρήση των περιττωμάτων ως λίπασμα σε καλλιέργειες έχει ενοχοποιηθεί ότι συνέβαλλε σε μαζικές εκδηλώσεις λιστερίωσης σε ανθρώπους, επιμολύνοντας κυρίως τρόφιμα φυτικής προέλευσης (Schlech και συν., 1983).

Στα ευπαθή ζώα ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* προκαλεί αποβολές και μινιγγοεγκεφαλίτιδα ("circling disease"), όμως και υγιή ζώα μπορεί να είναι εντερικοί φορείς του *L. monocytogenes*. Έχει απομονωθεί από βοοειδή, χοίρους, πρόβατα, κοτόπουλα, γαλοπούλες και πολλά άλλα είδη. Η λιστερίωση θεωρείται ζωοανθρωπονόσος και τα ζώα θεωρούνται η κύρια δεξαμενή του μικροοργανισμού (Bojsen-Moller, 1972).

Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη φορέων και μεταξύ των ανθρώπων. Απομονώθηκε από δείγματα κοπράνων από υγιείς ανθρώπους σε ποσοστό από 2 έως 6% (Schuchat και συν., 1991).

1.1.4 Ανάπτυξη

- Θερμοκρασία

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι ψυχρόφιλο βακτήριο και μπορεί να αναπτύσσεται ακόμη και σε θερμοκρασίες ψύξης. Ανάπτυξη παρατηρήθηκε σε εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 0 και 45°C, με βέλτιστη ανάπτυξη στους 30-37°C. Τα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν με χρόνο διπλασιασμού 20-30 ωρών και 100-186 ωρών στους 3°C και 0°C, αντίστοιχα (Swaminathan, 2001).

- pH

Το εύρος τιμών pH που επιτρέπει την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* είναι 5,6-9,6. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο οργανισμός μπορεί να αναπτυχθεί σε υποστρώματα σε τιμή pH έως και 4,4. Σε pH<4,3 επιβιώνουν αλλά δεν πολλαπλασιάζονται (Swaminathan, 2001).

- a_w

Η ανάπτυξη ευνοείται σε τιμές $a_w \geq 0,97$. Για τα περισσότερα στελέχη η ελάχιστη τιμή για ανάπτυξη είναι 0,93, ωστόσο, ορισμένα στελέχη αναπτύσσονται σε τιμές έως και 0,90 (Lou και Yousef, 1999).

- Ατμόσφαιρα (Eh)

Αναπτύσσεται σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες.

- Θρεπτικά συστατικά

Σύμφωνα με τα δημοσιευμένα δεδομένα αναφορικά με τις απαιτήσεις του παθογόνου *L. monocytogenes* σε θρεπτικά συστατικά, εκτός των γνωστών πηγών άνθρακα και αζώτου που απαιτούνται, οι παράγοντες εκείνοι οι οποίοι συμβάλλουν στη μικροβιακή αύξηση περιλαμβάνουν την παρουσία στο υπόστρωμα αύξησης του μικροοργανισμού των αμινοξέων: κυστίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, αργινίνη, μεθειονίνη, βαλίνη, κυστεΐνη, καθώς και των βιταμινών: ριβοφλαβίνη, βιοτίνη, θυαμίνη και λιποϊκό οξύ (Premaratne, Lin, & Johnson, 1991· Siddiqi & Khan, 1989· Welshimer, 1963). Επίσης, η αύξηση διεγείρεται από την ύπαρξη τρισθενούς σιδήρου και φαινυλαλανίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα.

1.1.5 Επιβίωση

- Θερμική επεξεργασία

Σχετικά με τη θερμοανθεκτικότητα του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* υπολογίστηκαν τιμές D_{70} μεταξύ 0,11 και 0,27 min (Gaze και συν. 1989, Boyle και συν. 1990, Mackey και συν. 1990). Σύμφωνα με τις τιμές αυτές, συνιστάται το σημείο το οποίο υφίσταται τη χαμηλότερη θέρμανση σε ένα προϊόν να παραμένει στους 70°C επί 2 λεπτά, ώστε ο πληθυσμός του παθογόνου *L. monocytogenes* να υποστεί μείωση κατά 6 λογαρίθμους και το τρόφιμο να θεωρηθεί απαλλαγμένο από τον παθογόνο.

Έχει αποδειχθεί ότι η θέρμανση σε αερόβιες συνθήκες έχει μεγαλύτερη επίδραση στη θερμοανθεκτικότητα του βακτηρίου, συγκριτικά με τη θέρμανση σε αναερόβιες συνθήκες (Kim και συν., 1994, George και συν., 1998). Η αναγέννηση επίσης των κυττάρων που έχουν υποστεί θερμική επίδραση έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται σε αναερόβιες συνθήκες (Knabel και συν., 1990, George και συν., 1998). Για το λόγο αυτό ιδιαίτερη ανησυχία έχει εκδηλωθεί για τη δυνατότητα ανάπτυξης των κυττάρων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που έχουν υποστεί την επίδραση της θερμότητας στα προϊόντα που υφίστανται θερμική επεξεργασία συσκευασμένα υπό κενό όπως τα τρόφιμα sousvide (Knabel και συν., 1990).

Ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν ότι η έκθεση των κυττάρων του *L. monocytogenes* σε θερμική επεξεργασία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεϊνών, οι οποίες

προστατεύουν το μικροοργανισμό από την επιβλαβή επίδραση περαιτέρω θερμικής επεξεργασίας (“heat-shock” proteins) (Socolovic και συν. 1990).

- Κατάψυξη

Η επιβίωση στη διάρκεια της κατάψυξης εξαρτάται από το τρόφιμο και το ρυθμό κατάψυξης. Γενικά η κατάψυξη των τροφίμων μειώνει ελάχιστα τον αρχικό αριθμό του παθογόνου, λιγότερο από 1 λογάριθμο.

- a_w

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε τιμές a_w έως 0,83 (Shahamat και συν., 1980).

- NaCl

Είναι δυνατή η ανάπτυξη σε παρουσία μέχρι και 10-12% NaCl, και αναπτύσσεται σε υψηλούς πληθυσμούς σε μέσες συγκεντρώσεις (6,5%).

- Ακτινοβολία

Έχει διαπιστωθεί ότι ακτινοβολία 3 kGy σε προϊόντα κρέατος επιτρέπει μείωση του πληθυσμού του *L. monocytogenes* κατά 6 λογαρίθμους (Augustin, 1996).

- Απολυμαντικά

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* μπορεί να προσκολληθεί σε διάφορες επιφάνειες και έχει διαπιστωθεί η ικανότητά του να σχηματίζει βιομεμβράνη (biofilm) σε εξοπλισμούς σε γαλακτοβιομηχανίες και βιομηχανίες κρέατος (Joeng και Frank, 1994), παρουσιάζοντας μεγάλη αντοχή στα κοινά απολυμαντικά. Τα είδη του γένους *Listeria* μπορούν να επιβιώσουν επίσης στα χέρια μετά το πλύσιμο και στις σόλες παπουτσιών.

1.2 Λιστερίωση

1.2.1 Χαρακτηριστικά της νόσου στον άνθρωπο

Γενικά είναι σπάνια νόσος, με μέση συχνότητα 2-7 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού. Η δόση εξαρτάται από την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος των ατόμων. Δεδομένα που έχουν δημοσιευθεί αναφέρουν ότι ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στα μολυσμένα τρόφιμα που απαιτείται για την εκδήλωση νόσου είναι περισσότερα από 100 cfu/g. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες επιδημιολογικές έρευνες για να επιβεβαιωθούν τα στοιχεία.

Η νόσος συνήθως εμφανίζεται σε ορισμένες ευπαθείς ομάδες, μεταξύ των οποίων έγκυες γυναίκες, νεογνά και ανοσοκατεσταλμένοι ενήλικες. Προδιαθέτοντες παράγοντες για την εκδήλωση λιστερίωσης σε ενήλικες είναι οι καταστάσεις που προκαλούν ανοσοκαταστολή, όπως η μεταμόσχευση οργάνων ή μόλυνση με ιούς που προσβάλλουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Η λιστερίωση είναι 300 φορές περισσότερο συχνή σε πάσχοντες από AIDS (Jurado και συν., 1993). Ωστόσο, περιστασιακά εμφανίζεται και σε άτομα χωρίς σαφείς προδιαθέτοντες παράγοντες.

Σε ενήλικες προκαλεί κυρίως σηψαιμία, μηνιγγίτιδα και μηνιγγοεγκεφαλίτιδα με θνησιμότητα 20-25%. Σπάνιες επιλοκές είναι η ενδοκαρδίτιδα σε άτομα με καρδιακά προβλήματα και διάφορες τοπικές μολύνσεις, όπως ενδοφθαλμίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα και περιτονίτιδα (Slutsker και Schuchat, 1999). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, σπασμούς, ρίγος, κεφαλαλγία, διάρροια και έμετο (Sutherland, 1989).

Αν και οι έγκυες γυναίκες, κυρίως στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, μπορεί να εκδηλώσουν μόνο ήπια συμπτώματα που μοιάζουν με κοινό κρυολόγημα (πυρετό, μυαλγία, με ή χωρίς διάρροια), η μόλυνση με *L. monocytogenes* έχει σοβαρές επιπτώσεις για το έμβryo, προκαλώντας πρόωρο τοκετό ή αποβολή. Σε νεογνά κάτω

των 7 ημερών η μόλυνση εκδηλώνεται κυρίως ως σήψη και πνευμονία, ενώ σε μεγαλύτερης ηλικίας εκδηλώνεται κυρίως ως μηνιγγίτιδα και σήψη (Slutsker και Schuchat, 1999).

Υπάρχει και μια γαστρεντερική εκδήλωση που απαιτεί υψηλή δόση κυττάρων. Στην μορφή αυτή ο χρόνος επώασης είναι σημαντικά μικρότερος (20-27 ώρες) και τα κυριότερα συμπτώματα είναι πυρετός και διάρροια (Dalton και συν., 1997).

1.2.2 Παθογένεια

Όταν ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* προσλαμβάνεται μέσω των τροφίμων, διαπερνά τον εντερικό φραγμό και εισχωρεί στα κύτταρα. Τα δενδριτικά κύτταρα στις πλάκες του Peyer φαίνεται να είναι τα κυριότερα κύτταρα όπου εισχωρούν τα βακτήρια και πολλαπλασιάζονται (Kolb-Maurer και συν., 2000).

Ακολούθως τα βακτήρια προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα, μέσα στα οποία μπορούν να επιβιώσουν και να πολλαπλασιάζονται, και, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, φτάνουν στα επιχώρια λεμφογάγγλια. Όταν φτάσουν στο ήπαρ και στο σπλήνα τα περισσότερα βακτήρια γρήγορα θανατώνονται. Ανάλογα με την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου που μολύνεται, και κυρίως την ανταπόκριση των T-κυττάρων τις πρώτες ημέρες μετά την μόλυνση, μπορεί να ακολουθήσει διασπορά του βακτηρίου μέσω του αίματος στον εγκέφαλο ή σε περίπτωση εγκυμοσύνης, στον πλακούντα. Έτσι η μόλυνση δεν περιορίζεται στο σημείο της αρχικής εστίας αλλά ακολουθεί η είσοδος του βακτηρίου και ο πολλαπλασιασμός του σε πολλά κύτταρα και ιστούς, με αποτέλεσμα μια ποικιλία συμπτωμάτων ανάλογα με τους ιστούς και τα όργανα που προσβάλλονται (Swaminathan, 2001).

1.2.3 Υπεύθυνα τρόφιμα

Τρόφιμα υψηλού κινδύνου είναι τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση (“ready-to-eat”) που διατηρούνται υπό ψύξη για μεγάλο χρόνο και αυτά που είναι μολυσμένα με *L. monocytogenes* σε επίπεδα >100 cfu/g ή /ml. Μεταξύ των προϊόντων ενοχοποιούνται για τα περιστατικά λιστερίωσης συχνότερα τα αλλαντικά φραγκφούρτης, τα μαλακά τυριά και τα καπνιστά ψάρια και ειδικότερα:

- Γάλα και τυριά

Το νωπό γάλα είναι πηγή *L. monocytogenes*. Υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις για τη θερμική καταστροφή του. Αν και ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι το παθογόνο βακτήριο δεν αδρανοποιείται πλήρως κατά την παστερίωση (Bearn και Gerard, 1958, Bradshaw και συν., 1985), οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι η υψηλή παστερίωση (HTST, 71,6°C για 16 sec) του γάλακτος είναι αποτελεσματική στην αδρανοποίηση του παθογόνου. Η HTST παστερίωση του γάλακτος επιτρέπει τουλάχιστον 11 λογαρ. μειώσεις στον πληθυσμό της και ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο επιβίωσης του μικροοργανισμού (Augustin, 1996).

Η ανησυχία για τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* από την κατανάλωση γάλακτος ενισχύεται από την ικανότητά του να αναπτύσσεται σε παστεριωμένο γάλα που διατηρείται υπό ψύξη. Έχει διαπιστωθεί ότι ο πληθυσμός των κυττάρων αυξάνεται κατά 10 φορές σε 7 ημέρες σε παστεριωμένο γάλα στους 4°C (Northholt και συν., 1988). Για τον λόγο αυτό ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην θερμοκρασία διατήρησης του παστεριωμένου γάλακτος και στις επιμολύνσεις, καθώς το γάλα που έχει επιμολυνθεί μετά τη θερμική επεξεργασία και διατηρηθεί υπό ψύξη μπορεί να έχει υψηλούς πληθυσμούς του *L. monocytogenes* (Dalton και συν., 1997).

Εξαιτίας της σχετικής ανθεκτικότητας στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, της ικανότητας να πολλαπλασιάζεται σε θερμοκρασίες ψύξης και της ανθεκτικότητας σε αλάτι, ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει κατά την παρασκευή τυριών και την διαδικασία της ωρίμανσης. Η ανάπτυξή του επιβραδύνεται από την δράση της οξυγαλακτικής καλλιέργειας, αλλά δεν αναστέλλεται πλήρως. Συγκεντρώνεται κυρίως στο τυρόπηγμα, ενώ ένα μικρό ποσοστό διαφεύγει στον ορό. Η κατανάλωση των μαλακών τυριών από ευπαθή άτομα είναι παράγοντας κινδύνου για σποραδική και επιδημική λιστερίωση. Γάλλοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι το 49% της σποραδικής λιστερίωσης στη Γαλλία αποδίδεται στην κατανάλωση μαλακών τυριών (deValk και συν, 1998).

- Κρέας, προϊόντα κρέατος και πουλερικών

Η μόλυνση του κρέατος με τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* είναι συνήθως επιμόλυνση του σφάγιου μετά την σφαγή ή κατά τον τεμαχισμό και χειρισμό του κρέατος. Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* επιμολύνει την επιφάνεια του κρέατος και δύσκολα απομακρύνεται ή αδρανοποιείται (Swaminathan, 2001).

Εφόσον το κρέας μολυνθεί από *L. monocytogenes* η δυνατότητα πολλαπλασιασμού του εξαρτάται από τον τύπο του κρέατος, το pH και το είδος και τον πληθυσμό της ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας. Μεταξύ των διαφόρων ειδών κρέατος, το κρέας των πουλερικών ευνοεί περισσότερο την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* πολλαπλασιάζεται σε προϊόντα κρέατος σε pH περίπου 6,0 ενώ μικρός ή και καθόλου πολλαπλασιασμός παρατηρείται σε τιμή pH περίπου 5,0 (Farber και Peterkin, 1999, Glass και Doyle, 1989).

Σύμφωνα με αρχικές έρευνες θεωρήθηκε ότι ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* πιθανώς να επιβιώνει της θερμικής επεξεργασίας στα βραστά κρεατοσκευάσματα (Farber, 1989; Boyle και συν., 1990, Fain και συν. 1991). Ωστόσο, μεταγενέστερες έρευνες έδειξαν ότι, αν και ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* ήταν σε μεγάλους πληθυσμούς σε νωπό κρέας, με μια θερμική επεξεργασία στους 70°C για 2 min οι πληθυσμοί του μειώθηκαν κατά 6 λογαρίθμους. Επειδή τα κρεατοσκευάσματα υφίστανται συνήθως μια τέτοια επεξεργασία, ο κίνδυνος της επιβίωσης του παθογόνου θεωρείται απίθανος (Nyati, 2000a).

Προϊόντα θερμικής επεξεργασίας κρέατος και πουλερικών που προορίζονται να καταναλωθούν ωμά έχουν ενοχοποιηθεί ως πηγές σποραδικών τροφολοιμώξεων λιστερίωσης στην Ευρώπη. Κατανάλωση αλλαντικών Φραγκφούρτης που δεν θερμάνθηκαν επαρκώς και κοτόπουλο που δεν είχε υποστεί κατάλληλη θερμική επεξεργασία είναι τρόφιμα που εμπλέκονται συχνά σε τροφολοιμώξεις λιστερίωσης (Schwartz, 1989, Swaminathan, 2001).

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί είναι ψυχρόφιλο παθογόνο βακτήριο και μπορεί να αναπτύσσεται σε διάφορα προϊόντα κρέατος κατά τη συντήρησή τους στην ψύξη (0-4°C) και σε συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα ή υπό κενό (Walker και συν., 1990, Grau και Vanderlinde, 1990, 1992, Varabioff, 1992, Hudson και συν., 1994).

- Αλιεύματα

Μεταξύ των αλιευμάτων, τα προϊόντα που ενέχουν κινδύνους για λιστερίωση είναι κυρίως μαλάκια (φρέσκα και καταψυγμένα), νωπά ψάρια ή άλλα προϊόντα ψαριών που έχουν υποστεί διάφορες μορφές επεξεργασίας συντήρησης, όπως αλίπαστα, μαριναρισμένα, καπνισμένα με ψυχρή κάπνιση και ήπια θερμική επεξεργασία (Ericsson και συν., 1997, Huss και συν., 2000).

1.2.4 Πρόληψη

Τα άτομα υψηλού κινδύνου, όπως εγκυμονούσες γυναίκες και άτομα σε ανοσοκαταστολή, πρέπει να αποφεύγουν την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων από απαστερίωτο γάλα καθώς και ατελώς ψημένου κρέατος. Η κατανάλωση αυγών χωρίς κατάλληλη θερμική επεξεργασία μπορεί να είναι παράγοντας κινδύνου λιστερίωσης και πρέπει να αποφεύγεται από ευπαθείς πληθυσμούς.

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην αποφυγή επιμόλυνσης των μαγειρεμένων τροφίμων λόγω της επαφής με νωπά προϊόντα. Τα λαχανικά πρέπει να πλένονται πολύ καλά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

2.1.1 Εισαγωγικές πληροφορίες

Η δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μίας προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA ή RNA μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο σε τομείς όπως η ιατρική (π.χ. για διάγνωση ασθενειών), η μοριακή βιολογία, η ιατροδικαστική και η βιομηχανία τροφίμων. Οι μοριακές διαγνωστικές τεχνικές είναι αρωγοί στην προσπάθεια για την τυποποίηση των μικροοργανισμών, αλλά και την αύξηση της διαγνωστικής ευαισθησίας ταυτόχρονα με τη συντόμευση της διαγνωστικής πράξης. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ταχύτερη και ακριβέστερη αντιμετώπιση των παθογόνων μικροβίων, είτε αυτά έχουν ήδη προσβάλει ανθρώπους, ζώα και φυτά είτε υπάρχουν στα τρόφιμα και στο περιβάλλον των συγκεκριμένων ξενιστών.

Η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (συμβατική PCR) είναι μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση προεπιλεγμένων αλληλουχιών. Η μέθοδος αυτή είναι η πρώτη μέθοδος που αναπτύχθηκε για αυτό το σκοπό το 1984 από τον Kerry Mullis και βασίζεται στην συνεχή επανάληψη τριών σταδίων σε κάθε κύκλο. Στην συνέχεια αναπτύχθηκαν και άλλες μέθοδοι που βασίστηκαν στην ιδέα της συμβατικής PCR και αποτέλεσαν παραλλαγές της αρχικής μεθόδου, όπως είναι η PCR θερμής εκκίνησης (Hot Start-PCR) η συνδιαστική PCR (Multiplex PCR) και η PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), η PCR επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR), η φωλιασμένη PCR (nested PCR), η μελέτη πολυμορφισμών τυχαίως ενισχυμένου DNA (RAPD), η μελέτη πολυμορφισμών ενισχυμένου μήκους θραύσματος (AFLP), η ανάλυση μεγέθους μεταβλητού αριθμού πολλαπλών περιοχών (MLVA), η PCR και ηλεκτροφόρηση πηκτής με βαθμίδωση αποδιατακτικού παράγοντα (PCR-DGGE).

Η μέθοδος της Real Time PCR αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου, η οποία μπορεί να ενισχύσει, να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει μια αλληλουχία-στόχο με μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα. Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου αποτέλεσε η δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης σε οποιοδήποτε στάδιο της βρίσκεται η αντίδραση. Η λειτουργία της τεχνολογίας Real Time PCR βασίζεται στην χρήση μηχανισμών ανίχνευσης, με τη βοήθεια ειδικών χρωστικών που διεγείρονται και εκπέμπουν συγκεκριμένου μήκους κύματος φως, (λ), όπως η SYBR Green καθώς και ιχνηλατών (probes) αλλά και στις ειδικά διαμορφωμένες συσκευές Real Time PCR που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή της. Οι συσκευές της Real Time PCR βασίζονται τόσο στο σύστημα ανίχνευσης που διαθέτουν, για την ανίχνευση του σήματος που εκπέμπει ο εκάστοτε μηχανισμός ανίχνευσης, όσο και στο ειδικό λογισμικό με το οποίο αναλύονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά την διάρκεια της αντίδρασης.

2.1.2 Η αρχή λειτουργίας της αντίδρασης της PCR

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος της PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης επιλεγμένων αλληλουχιών

νουκλεϊκών οξέων. Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την *in vitro* αντιγραφή του DNA με τη μέθοδο PCR είναι:

α) **Εκκινητές (primers)**. Ως εκκινητές χρησιμοποιούνται δύο μικρά μόρια (ζεύγος) ολιγονουκλεοτιδίων, που παρασκευάζονται τεχνητά με διάφορες μεθόδους. Καθεμιά έχει αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς εκείνη που βρίσκεται στο 3'-OH άκρο των 2 αντίπαράλληλων αλυσίδων του DNA-προτύπου. Καθορίζουν τα άκρα του τμήματος που θα αντιγραφεί και αντιπροσωπεύουν τις περιοχές από τις οποίες θα ξεκινήσει η διαδικασία σύνθεσης αντιγράφων DNA. Η παρουσία τους είναι απαραίτητη, γιατί το ένζυμο DNA πολυμεράση δεν είναι ικανό να συνθέσει εκ νέου καινούργια αλυσίδα DNA. Οι εκκινητές έχουν μήκος συνήθως 20-30 βάσεις. Επιπλέον, η θερμοκρασία μετουσίωσης - τήξης (melting temperature, T_m) του ενός εκκινητή πρέπει να είναι παραπλήσια με την T_m του δεύτερου και να κυμαίνεται μεταξύ 55°C και 80°C. Η T_m του κάθε εκκινητή εξαρτάται από την ποσοστιαία σύστασή της σε ζεύγη βάσεων κυρίως GC, αλλά και AT και βρίσκεται με διάφορους μαθηματικούς τύπους.

β) **DNA πολυμεράση**. Το ένζυμο DNA πολυμεράση δρα ως καταλύτης κατά τη διαδικασία αντιγραφής του DNA *in vivo* και *in vitro*. Για να δράσει, απαιτεί την παρουσία μονόκλωνου DNA-προτύπου, καθώς και την παρουσία 5'-τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Καταλύει την προσθήκη μονονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των αφετηριών στην κατεύθυνση 5'-3' και κατ' αυτόν τον τρόπο οι εκκινητές επιμηκύνονται. Έτσι συνθέτονται δύο νέες αλυσίδες DNA, συμπληρωματικές προς τις πρότυπες. Τα τελευταία χρόνια, ως ένζυμο χρησιμοποιείται η θερμοανθεκτική *Taq*- DNA πολυμεράση (*Taq* πολυμεράση), που απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Taq*).

γ) **Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)**. Τα τέσσερα 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP και dTTP) είναι ουσιώδη δομικά στοιχεία για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων. Προμηθεύουν τα μονονουκλεοτίδια που είναι απαραίτητα για την επιμήκυνση των αφετηριών, για την επίτευξη βέλτιστης ειδικότητας και πιστότητας σε υψηλούς ρυθμούς ενσωμάτωσης. Οι συγκεντρώσεις τους πρέπει να είναι από 20 έως 200μM για κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο και ισοδύναμες για κάθε ένα, για την ελαχιστοποίηση των λαθών.

δ) **Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης**. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει τα εξής συστατικά: Tris-HCl (pH 8,3-8,9 στους 20°C), MgCl₂, KCl, Tween 20 και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη. Τα συστατικά αυτά υποβοηθούν τη διαδικασία αντιγραφής. Για παράδειγμα, το KCl διευκολύνει την ένωση των αφετηριών στο DNA-πρότυπο και ενισχύει τη δραστηριότητα της πολυμεράσης, ενώ τα ελεύθερα ιόντα Mg⁺⁺, το απορρυπαντικό (Tween 20) και οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητα για τη λειτουργία και τη σταθερότητα του ενζύμου, καθώς και την ενίσχυση της ειδικότητας και τη μεγαλύτερη παραγωγή του πολλαπλασιασθέντος προϊόντος (Oste, 1989).

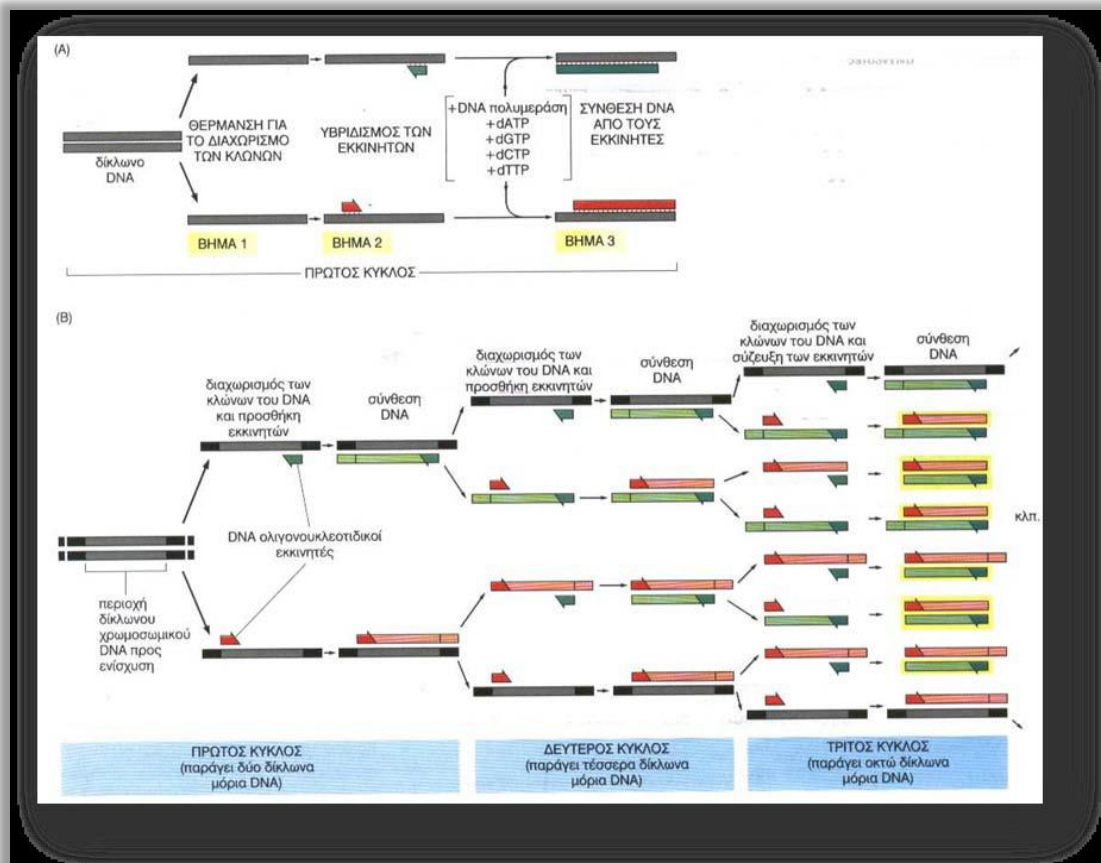
Το DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο μπορεί να προστεθεί στο μείγμα αντίδρασης της PCR σε μονο- αλλά και δίκλωνη μορφή. Το μέγεθος του DNA δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα, αλλά έχει δείχθει ότι είναι καλύτερο μεγάλα τμήματα DNA να χρησιμοποιούνται αφού πρώτα γίνει η διάσπασή τους με διάφορα ένζυμα περιορισμού. Επιπλέον, θα πρέπει, το DNA να μην είναι αποδομημένο στην περιοχή του στόχου, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί αυτή η περιοχή και ταυτόχρονα να είναι υψηλής καθαρότητας και να υπάρχει απουσία φαινολών, πολυσακχαριτών, EDTA ή άλλων χημικών που μπορούν να έχουν ανασταλτική επίδραση στην αντίδραση (Makatsori and Karamanos, 1998).

Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τρία στάδια: (α) Αποδιάταξη DNA, στην οποία η διπλή έλικα του DNA-στόχου αποδιατάσσεται, (β) υβριδοποίηση των

εκκινητών, που πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, στην οποία οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο-στόχο και (γ) επιμήκυνση της αντίδρασης, στην οποία η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τις αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'–3' χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον DNA-στόχο όπου έχουν προσδεθεί οι εκκινητές. Στο τέλος του κάθε κύκλου (ο καθένας αποτελείται από τα παραπάνω τρία στάδια), η ποσότητα των προϊόντων της PCR θεωρητικά διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία διεξάγεται σε έναν προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και ολοκληρώνεται μετά από 30–50 κύκλους, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του συνολικού αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου.

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

- Εκθετική (exponential) φάση: Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA.
- Γραμμική (linear) φάση: Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων.
- Φάση Plateau: Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων.



Εικόνα 1: Τα στάδια της PCR και τρόπος λειτουργίας της μεθόδου

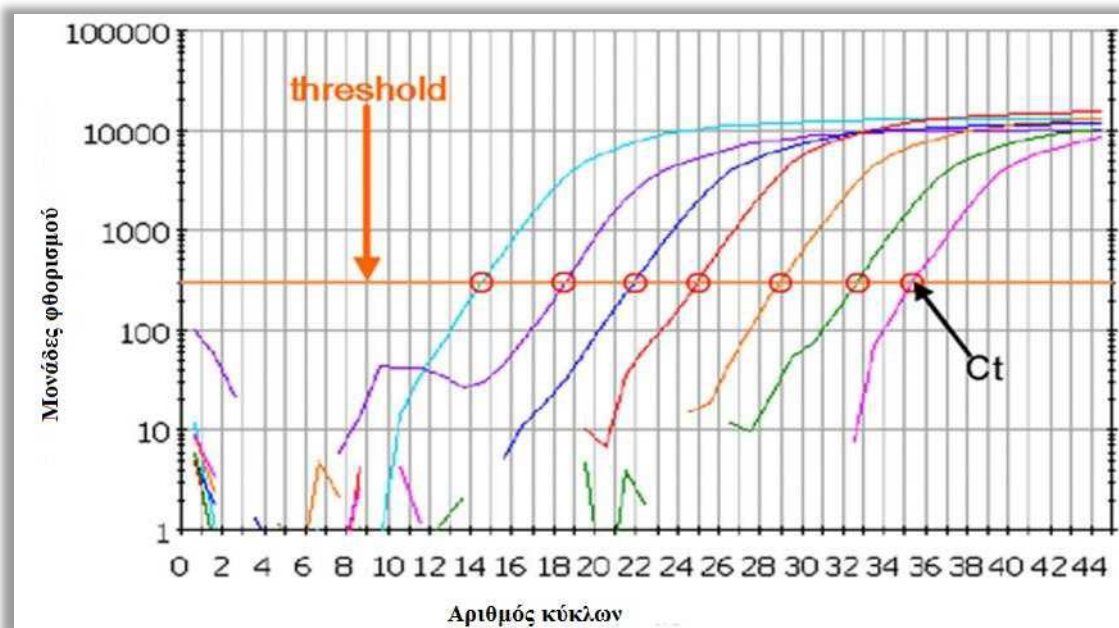
Η αξιολόγηση του προϊόντος της PCR γίνεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου ή αγαρόζης. Η πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται πιο συχνά στο διαχωρισμό τμημάτων DNA μήκους από λίγες εκατοντάδες έως και 20.000 ζεύγη

βάσεων (base pairs, bp). Το DNA γίνεται ορατό με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide). Το πολυακρυλαμίδιο χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μικρότερων τμημάτων DNA, λιγότερων bp. Το μήκος του προϊόντος συγκρίνεται με το μήκος γνωστού μάρτυρα (DNA ladder) το οποίο ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα.

2.2.1 Η αρχή λειτουργίας της Real Time PCR

Η Real Time PCR ή PCR στον πραγματικό χρόνο είναι μία ποσοτική αντίδραση PCR κατά την οποία η μεγέθυνση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη Real Time PCR. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της μεγέθυνσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: α) την εκθετική, β) τη γραμμική και γ) τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης.

Η γραμμή Threshold είναι το σημείο στο οποίο ξεχωρίζει έντονα το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real time PCR από το φόντο, ενώ ο κύκλος κατά την διάρκεια του οποίου, το δείγμα φτάνει την γραμμή Threshold ονομάζεται Threshold cycle (Ct) ή τιμή Ct. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA στο κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή Ct για κάθε δείγμα, δηλαδή αναλογικά η Ct θα είναι μικρότερη (Wong *et al*, 2005).



Εικόνα 2: Με την οριοθέτηση του σημείου threshold γίνεται πιο εύκολος ο προσδιορισμός της τιμής Ct, (Hunt, 2006)

2.2.2 Συστήματα Real Time PCR

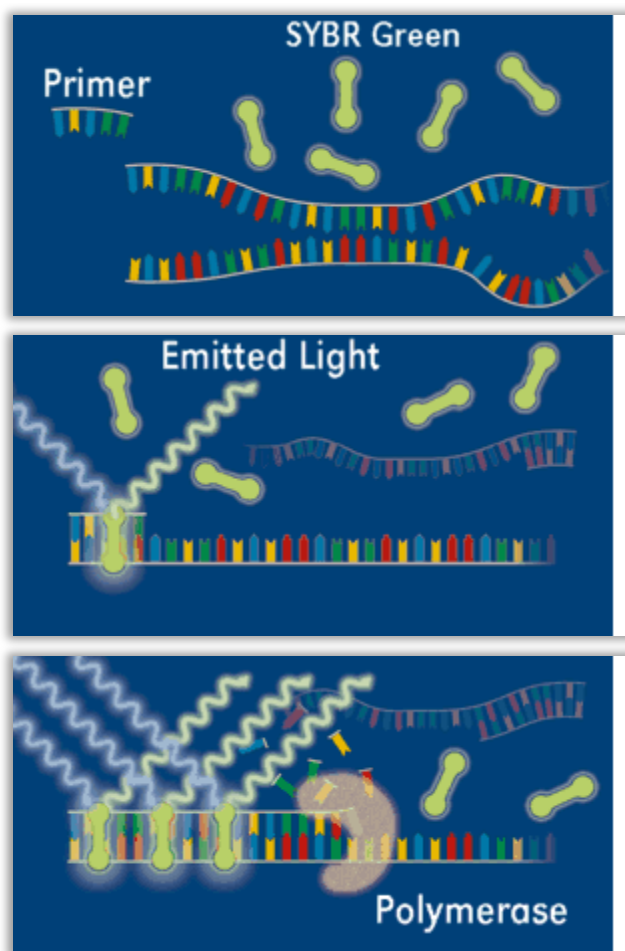
Υπάρχουν δύο είδη χημειών για την ανίχνευση της ενισχυόμενης αλληλουχίας του DNA, με Real-Time PCR: τα μη ειδικά και τα ειδικά συστήματα. Στην πρώτη περίπτωση ανιχνεύονται όλα τα δίκλινα μόρια DNA, τα οποία ενισχύονται κατά την αντίδραση, ενώ στη δεύτερη περίπτωση επιτυγχάνεται διαχωρισμός της ενισχυόμενης αλληλουχίας-ενδιαφέροντος από τυχόν μη ειδικά προϊόντα, που ενισχύονται παράλληλα, καθώς και από πιθανά διμερή των εκκινητών.

2.2.2.1 Μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης

Συνήθως στα μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία ενσωματώνεται σε δίκλινο μόριο DNA (dsDNA). Μια τέτοια ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι η SYBR green I. Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Σημειώνεται ότι η SYBR green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Η χρήση μη ειδικών συστημάτων ανίχνευσης παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ειδικού ανιχνευτή (probe). Επιπλέον, συνιστά μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, καθώς σε κάθε μόριο DNA που συντίθεται δεσμεύονται πολλά μόρια χρωστικής, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του προκύπτοντος σήματος. Αντίθετα, σημαντικό μειονέκτημα της SYBR green αποτελεί το γεγονός ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου. Παρ'όλ'αυτά υπάρχει τρόπος να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί. Ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών όπως

επίσης και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Επιπλέον, η μελέτη των καμπύλων αποδιάταξης (melting curves) μετά το πέρας της αντίδρασης, δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.



Εικόνα 3: Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green I. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

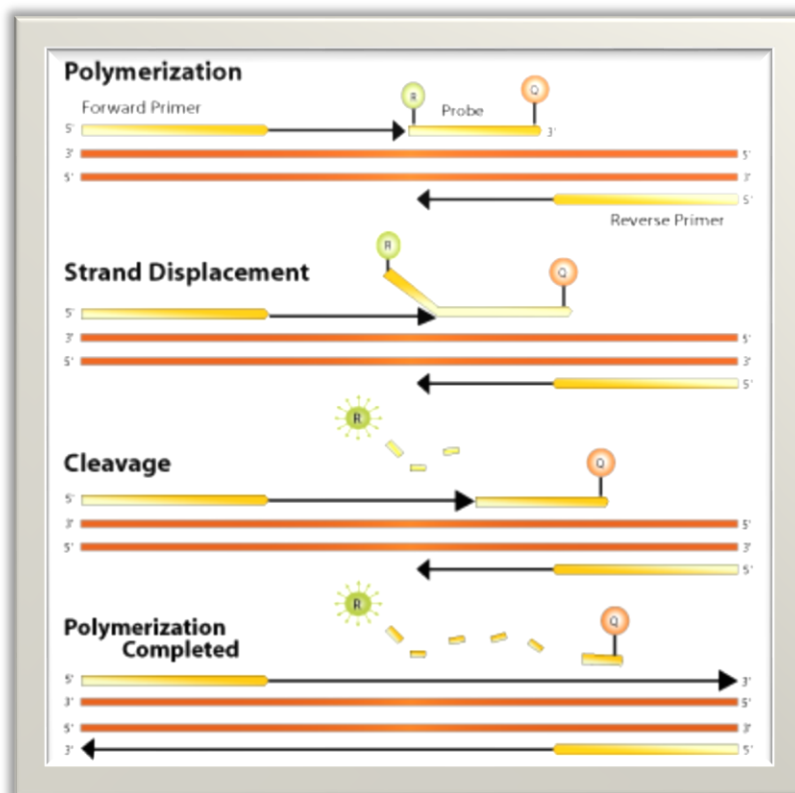
2.2.2.2 Ειδικά συστήματα ανίχνευσης

Μεγαλύτερη ειδικότητα στη Real Time PCR επιτυγχάνεται με την χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών (oligoprobes), οι οποίοι είναι σημασμένοι με φθοριοχρώματα, ένα μόριο δότη και ένα μόριο απόσβεσης (quencher), και υβριδίζονται στο πρότυπο DNA. Ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι που ανήκουν στη συγκεκριμένη κατηγορία αποτελούν οι Taqman probes, Molecular beacon probes και Scorpions.

- Taqman probes

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, γίνεται χρήση τριών ολιγονουκλεοτιδίων: δύο εκκινητών και ενός ανιχνευτή που αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά σε εσωτερική

αλληλουχία του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος της PCR. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δράση 5'-νουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιείται για την υδρόλυση του ανιχνευτή. Αναλυτικότερα, ο ανιχνευτής είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει στο 5' άκρο του μια χρωστική που φθορίζει και στο 3' άκρο του μια άλλη χρωστική η οποία απορροφά και εξουδετερώνει το σήμα που προέρχεται από την πρώτη. Έτσι, όταν ο ανιχνευτής είναι άθικτος δεν παρατηρείται φθορισμός. Όμως, ο πολυμερισμός κατά την αντίδραση ενίσχυσης, οδηγεί στην αποκοπή του άκρου του ανιχνευτή, από τη πολυμεράση, και κατ'έπекταση στη διακοπή της αλληλοεξουδετέρωσης του σήματος, με αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Καθώς ο πολυμερισμός συνεχίζεται αυξάνονται τα φθορίζοντα άκρα του ανιχνευτή που απελευθερώνονται και, συνεπώς, αυξάνεται παράλληλα η ένταση του φθορισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού, ο οποίος αυξάνεται ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος κατά την αντίδραση ενίσχυσης.



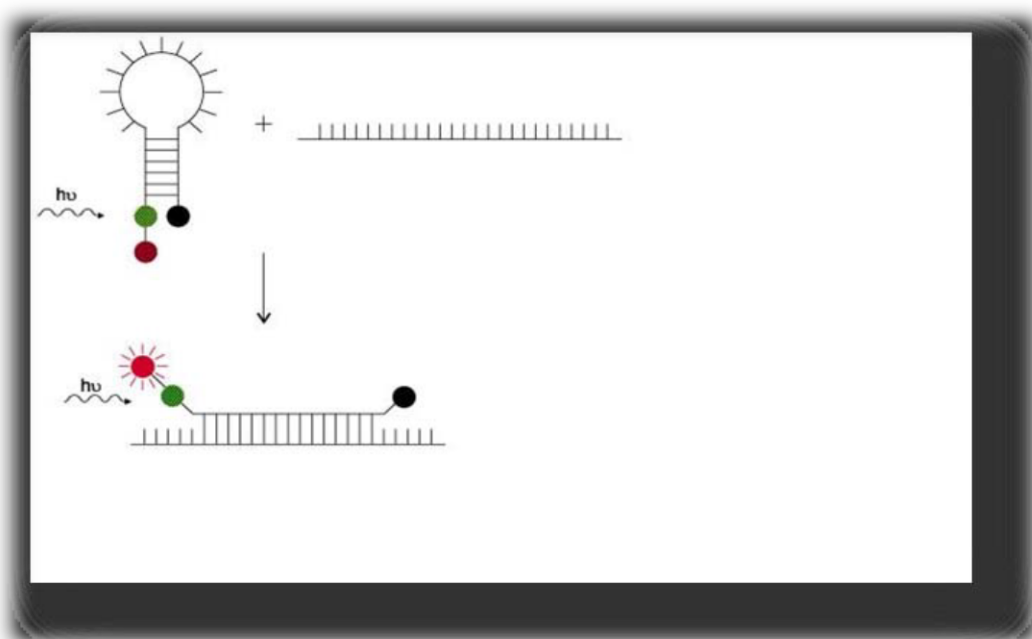
Εικόνα 4: Αρχή της μεθόδου Taqman probes. Διακρίνονται οι δύο εκκινητές καθώς και ο ειδικός ανιχνευτής, ο οποίος προσδένεται σε εσωτερική αλληλουχία του προϊόντος. Η δράση 5'-νουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, συμβάλλει στην υδρόλυση του ανιχνευτή, και κατ'έπекταση στην απελευθέρωση της φθορίζουσας χρωστικής που βρίσκεται στο 5' άκρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού, ο οποίος αυξάνεται ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος κατά την αντίδραση ενίσχυσης.

- Molecular beacons

Όταν το ολιγονουκλεοτίδιο βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα σχηματίζει μια δομή, η οποία αποτελείται από ένα δίκλωνο μίσχο και μία μονόκλωνη θηλιά. Η δομή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τα δύο μόρια χρωστικής, που βρίσκονται στα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου, να έρχονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο, κάτι που αποτρέπει

την παραγωγή φθορισμού λόγω του φαινομένου FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Η πρόσδεση του ολιγονουκλεοτιδίου στο προϊόν της αντίδρασης συμβάλλει στην απομάκρυνση των δύο χρωστικών, στην αδυναμία εκδήλωσης του φαινομένου FRET και κατά συνέπεια στην παραγωγή φθορισμού.

Οι Molecular beacon ανιχνευτές είναι πολύ πιο ειδικοί από τους συμβατικούς ανιχνευτές ίδιου μήκους. Επιπλέον, παρουσιάζουν ευρεία εφαρμογή κυρίως στον εντοπισμό σημειακών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών, στην ποσοτικοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, καθώς επίσης και στον προσδιορισμό του φύλου των εμβρύων.



Εικόνα 5: Αρχή της μεθόδου Molecular Beacon. Όταν το ολιγονουκλεοτίδιο βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα σχηματίζει μια δομή, η οποία αποτελείται από ένα δίκλωνο μίσχο και μία μονόκλωνη θηλιά. Η δομή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τα δύο μόρια χρωστικής, που βρίσκονται στα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου, να έρχονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο, κάτι που αποτρέπει την παραγωγή φθορισμού λόγω του φαινομένου FRET. Η πρόσδεση του ολιγονουκλεοτιδίου στο προϊόν της αντίδρασης συμβάλλει στην απομάκρυνση των δύο χρωστικών, στην αδυναμία εκδήλωσης του φαινομένου FRET και κατά συνέπεια στην παραγωγή φθορισμού.

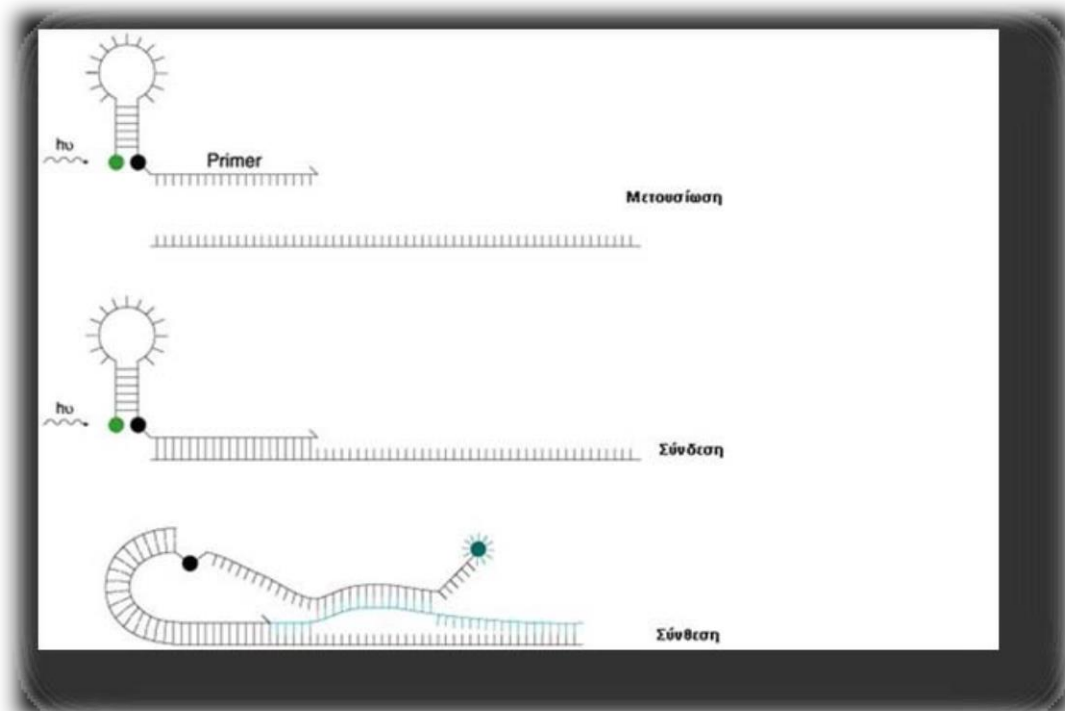
- Scorpions

Στη μέθοδο αυτή γίνεται χρήση δύο ολιγονουκλεοτιδίων: ενός εκκινήτη και ενός ολιγονουκλεοτιδίου, που χρησιμεύει τόσο ως εκκινήτης όσο και ως ανιχνευτής. Το ολιγονουκλεοτίδιο αυτό αποτελείται από μία αλληλουχία που δρα ως εκκινήτης, δίπλα από την οποία εκτείνεται ένα νουκλεοτιδικό τμήμα με δομή θηλιάς-μίσχου, το οποίο φέρει στο 5' άκρο ένα φθορίζον μόριο και στο 3' άκρο ένα μόριο χρωστικής. Το δεύτερο μόριο χρωστικής, εξουδετερώνει το σήμα από το πρώτο λόγω του φαινομένου FRET. Η δομή θηλιάς-μίσχου διαχωρίζεται από το τμήμα του εκκινήτη μέσω μιας χημικά τροποποιημένης αλληλουχίας, η οποία παρεμποδίζει την αντιγραφή του σχηματισμού θηλιάς-μίσχου από την Taq πολυμεράση. Αυτό χρειάζεται γιατί αν επιτρεπόταν η αντιγραφή του νουκλεοτιδικού τμήματος, αυτό θα οδηγούσε στη μη ειδική αποδιάταξη της δομής και συνεπώς στην παραγωγή μη ειδικού σήματος.

Σημειώνεται ότι, όπως και στην περίπτωση των Molecular probes, η θηλιά είναι συμπληρωματική προς μια εσωτερική περιοχή της ενισχυόμενης αλληλουχίας-στόχου. Μετά την αντίδραση ενίσχυσης, ο ανιχνευτής υβριδοποιείται μέσω της

θηλιάς στον ίδιο κλώνο του προϊόντος της αντίδρασης. Η υβριδοποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των δύο μορίων χρωστικής και την εμφάνιση φθορισμού.

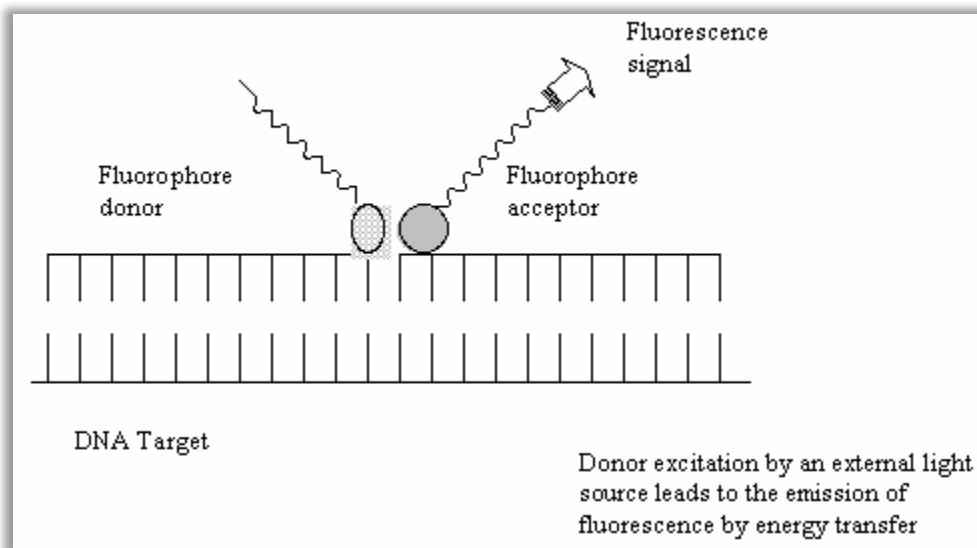
Οι εκκινητές Scorpions χρησιμοποιούνται όπως και οι Molecular Beacon για την ανίχνευση μεταλλάξεων, καθώς και σε μελέτες ποσοτικοποίησης. Παρουσιάζουν, όμως, επιπλέον πλεονεκτήματα λόγω του γρηγορότερου μηχανισμού αντίδρασής τους και της εμφάνισης χαμηλότερου μη ειδικού σήματος (background).



Εικόνα 6: Σχηματική παράσταση Real Time PCR με Scorpion εκκινητές.

- Hybridisation probes

Στη περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται τέσσερα oligονουκλεοτίδια: δύο εκκινητές και δύο ανιχνευτές. Οι ανιχνευτές είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να δεσμεύονται στο προϊόν της αντίδρασης σε παρακείμενες θέσεις. Επιπλέον, ο πρώτος ανιχνευτής φέρει στο 3' άκρο του ένα φθορίζον μόριο που δρα ως δότης ενέργειας, ενώ ο άλλος ανιχνευτής φέρει στο 5' άκρο του ένα φθορίζον μόριο που δρα ως δέκτης ενέργειας. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ενίσχυσης, οι δύο ανιχνευτές προσδένονται στο προϊόν, με αποτέλεσμα τη γειτνίαση των δύο φθορίζόντων μορίων και τη μεταξύ τους μεταφορά ενέργειας μέσω φθορισμού (FRET). Η μεταφορά ενέργειας από την μια χρωστική (δότης) στην άλλη (δέκτης) οδηγεί στην παραγωγή φθορισμού σε διαφορετικό μήκος κύματος. Η ένταση του παρατηρούμενου φθορισμού είναι ανάλογη του συνολικού DNA που παράγεται κατά την αντίδραση.



Εικόνα 7: Αρχή της μεθόδου Hybridisation probes.

2.2.3 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης

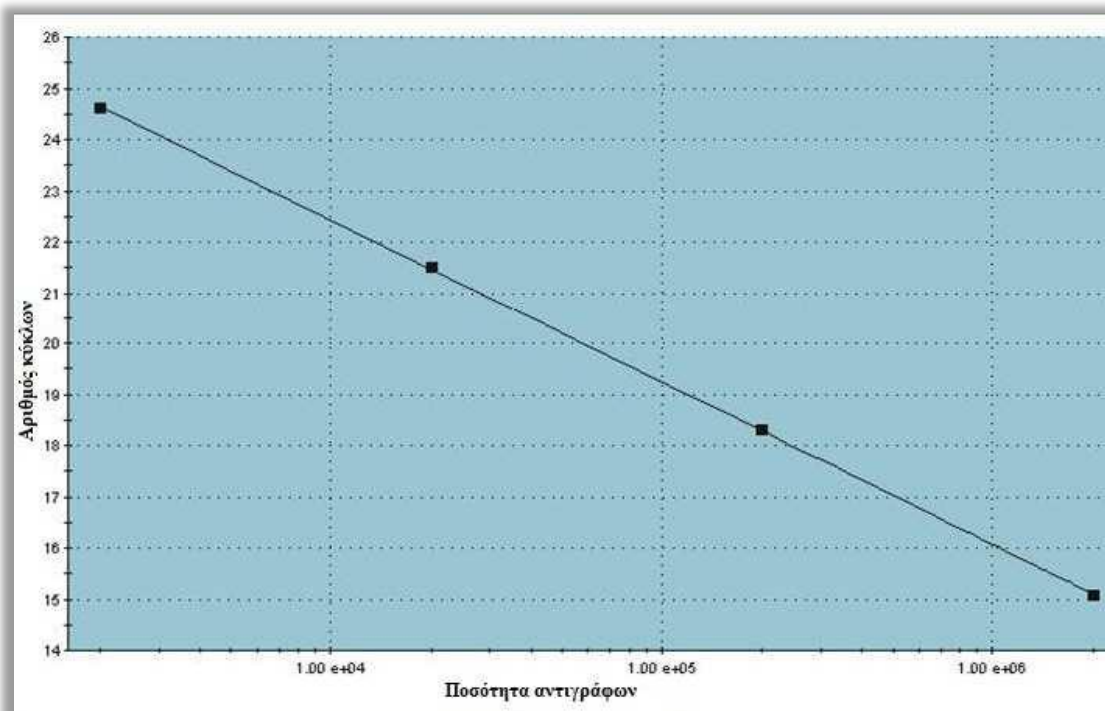
Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της PCR: η απόλυτη και η σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης.

2.2.3.1 Απόλυτη ποσοτικοποίηση

Η Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) παρέχει την μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση δειγμάτων της Real time PCR και χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητο για το πείραμα να μετρηθεί η ακριβής ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται μια πρότυπη καμπύλη, η οποία κατασκευάζεται με βάση διαδοχικές αραιώσεις δείγματος RNA γνωστής συγκέντρωσης. Η καμπύλη αυτή χρησιμοποιείται ως καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης άγνωστων δειγμάτων mRNAs. Αν και η χρήση πρότυπης καμπύλης προερχόμενης από γνωστά δείγματα RNA είναι χρήσιμη για τον ακριβή υπολογισμό των αντιγράφων άγνωστων δειγμάτων mRNAs, εντούτοις, παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Συγκεκριμένα, η σταθερότητα των μορίων RNA μπορεί να ποικίλει επηρεάζοντας έτσι την τελική ανάλυση. Επιπλέον, η διαδικασία της παραγωγής των δειγμάτων RNA γνωστής συγκέντρωσης είναι αρκετά χρονοβόρα, καθώς προϋποθέτει την κατασκευή cDNA πλασμιδίων, την *in vitro* μεταγραφή τους καθώς και την ακριβή ποσοτικοποίησή τους. Για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς θα πρέπει να επιλέχθει μια γνωστή συγκέντρωση-μάρτυρα, που μπορεί να προέρχεται από DNA, γενωμικό DNA, RNA, cDNA, ανασυνδιασμένο (recombinant) πλασμιδιακό DNA (recDNA) ή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια. Αυτή η συγκέντρωση-μάρτυρα θα υποβληθεί σε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων και στη συνέχεια τα αραιωμένα δείγματα θα περάσουν από τις ίδιες συνθήκες της Real Time PCR μαζί με τα πειραματικά δείγματα.

Αυτός ο τρόπος ποσοτικοποίησης χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό του ιικού ή βακτηριακού φορτίου σε βιολογικά υγρά. Επίσης, μπορεί να εφαρμοστεί για την εκτίμηση αλλαγών στην έκφραση mRNAs, σε περίπτωση απουσίας κατάλληλων ενδογενών γονιδίων-ελέγχου (housekeeping genes), τα οποία θα χρησιμοποιούνταν για την κανονικοποίηση. Ένα σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης εξωτερικών δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, για την ποσοτικοποίηση άγνωστων δειγμάτων, αποτελεί η αδυναμία εντοπισμού και διόρθωσης πιθανών αναστολέων που

επηρεάζουν την πορεία της αντίδρασης. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί χρησιμοποιώντας κάποιο εσωτερικό δείγμα-ελέγχου (control), όπως για παράδειγμα ένα συνθετικό νουκλεϊνικό τμήμα που πολλαπλασιάζεται σε παράλληλη αντίδραση με τα δείγματα προς ανάλυση.



Εικόνα 8: Μετά το τέλος της αντίδρασης η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται σε γράφημα ως μια ευθεία γραμμή που εκφράζει τον αριθμό των αντιγράφων του αρχικού μάρτυρα και τις Ct values της κάθε αραίωσης. Η καμπύλη αναφοράς πρέπει να βασίζεται σε τουλάχιστον 4 σημεία (γνωστής συγκέντρωσης) και θα πρέπει τα σημεία αυτά να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων. Στην περίπτωση που δεν καλύπτει όλο το εύρος των συγκεντρώσεων τότε μπορεί η ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη δειγμάτων να μην είναι αξιόπιστη (Stratagene, 2006). Στη συνέχεια μπορεί με την βοήθεια της συσκευής της Real time PCR να γίνει σύγκριση των τιμών Ct των πειραματικών δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και έτσι να ποσοτικοποιηθούν τα άγνωστα δείγματα.

2.2.3.2 Σχετική ποσοτικοποίηση

Η σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification) είναι πιο εύκολη στη χρήση της σε σχέση με την απόλυτη ποσοτικοποίηση και με την μέθοδο αυτή δεν είναι απαραίτητη η χρήση της καμπύλης αναφοράς. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπό μελέτη γονιδίου μετά από αλυσιδωτή ενίσχυση με εκείνη ενός γονιδίου αναφοράς (reference ή control gene) του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση (Pfaffl, 2002), και ονομάζεται μέθοδος του «συγκριτικού Ct» (Comparative Ct Method). Με τη μέθοδο αυτή οι τιμές Ct δειγμάτων και μαρτύρων κανονικοποιούνται ως προς μία αλληλουχία-γονίδιο αναφοράς (η συγκέντρωση της οποίας παραμένει σταθερή ανά κύτταρο), και στη συνέχεια συγκρίνονται με μάρτυρα υπολογίζοντας το πηλίκο του λόγου του φθορισμού που προέρχεται από την αλληλουχία-στόχο στο υπό εξέταση δείγμα προς το φθορισμό που προέρχεται από την αλληλουχία αναφοράς, προς τον αντίστοιχο λόγο του μάρτυρα. Η κανονικοποίηση ως προς το ενδογενές γονίδιο απαιτείται για τη

διόρθωση των πιθανών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες οφείλονται σε διαφορετική συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (cDNA) ή σε διαφορές στην αποδοτικότητα της αντίδρασης ενίσχυσης. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για να υπολογίσουμε την αυξημένη ή μειωμένη γονιδιακή έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (π.χ. το μαθηματικό μοντέλο του Pfaffl 2002 ή των Livak and Schmittgen, 2001).

Το παραπάνω πηλίκο υπολογίζεται με τον τύπο:

$$(1) R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

όπου $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ δείγματος (μέση Ct στόχου – μέση Ct αναφοράς) - ΔCt μάρτυρα (μέση Ct στόχου – μέση Ct αναφοράς). Μέση Ct είναι η μέση τιμή της τριάδας κάθε δείγματος.

Η εξίσωση αυτή προκύπτει ως εξής: ο γενικός τύπος που περιγράφει τον αριθμό μεταγραφών X_n αλληλουχίας-στόχου μετά από n κύκλους PCR για δείγμα με αρχικό αριθμό μεταγραφών $X_{0\sigma}$ είναι: $X_n = X_0(1 + E)^n$ ή $X_{Ct\sigma} = X_{0\sigma}(1 + E_\sigma)^{Ct\sigma}$, όπου E_σ η απόδοση των εκκινητών για την αλληλουχία-στόχο σ και $X_{Ct\sigma}$ ο αριθμός μεταγραφών μετά από αριθμό κύκλων ίσο με Ct .

Παρομοίως για την αλληλουχία αναφοράς a ο τύπος είναι $X_{Ct a} = X_{0 a}(1 + E_a)^{Ct a}$. Αντί για αριθμό μεταγραφών μπορούμε να θεωρήσουμε το ποσό του φθορισμού. Ο λόγος μεταξύ τους, που αντικατοπτρίζει την κανονικοποιημένη ως προς την αλληλουχία αναφοράς τιμή φθορισμού της αλληλουχίας-στόχου είναι:

$$R = \frac{X_{0\sigma} (1 + E_\sigma)^{Ct\sigma}}{X_{0a} (1 + E_a)^{Ct a}}. \text{ Αν } E_\sigma = E_a = E \text{ τότε η εξίσωση γίνεται } R = \frac{X_{0\sigma}}{X_{0a}} (1 + E)^{Ct\sigma - Ct a} = \frac{X_{0\sigma}}{X_{0a}} (1 + E)^{-\Delta Ct X} \Rightarrow \frac{X_{0\sigma}}{X_{0a}} = R(1 + E)^{\Delta Ct X} = X_{NORM} \text{ (κανονικοποιημένη τιμή φθορισμού δείγματος).}$$

Αν γράψουμε τις ίδιες εξισώσεις για ένα μάρτυρα M τότε $M_{NORM} = R'(1 + E)^{-\Delta Ct M}$. Εφόσον όμως οι μετρήσεις λαμβάνονται σε αριθμό κύκλων ίσο με το Ct , στο σημείο αυτό ο φθορισμός είναι εξ' ορισμού ίσος σε όλα τα δείγματα της ίδιας αντίδρασης δηλαδή $R = R'$. Έτσι, το πηλίκο δείγματος-μάρτυρα R_{NORM} θα είναι:

$$R_{NORM} = \frac{X_{NORM}}{M_{NORM}} = \frac{R(1 + E)^{-\Delta Ct X}}{R'(1 + E)^{-\Delta Ct M}} = \frac{(1 + E)^{-\Delta Ct X}}{(1 + E)^{-\Delta Ct M}} = (1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}. \text{ Για εκκινητές σχεδιασμένους με ιδανική απόδοση } E=1 \text{ η εξίσωση μετατρέπεται στον τύπο (1).}$$

Σημαντική παράμετρος για την ποσοτικοποίηση είναι ο υπολογισμός της απόδοσης (efficiency) της αντίδρασης για ένα δεδομένο ζεύγος εκκινητών, δηλαδή του αριθμού νέων μεταγραφών ανά κύκλο. Η κλίση της καμπύλης αναφοράς παρέχει την εκτίμηση της απόδοσης και συγκεκριμένα :

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{κλίση})}$$

Προκειμένου να εφαρμοστεί η μέθοδος του συγκριτικού C_t , οι εκκινητές για την αλληλουχία αναφοράς και για την αλληλουχία-στόχο πρέπει να έχουν ίση απόδοση. Αυτό μπορεί να πιστοποιηθεί απλά με τον έλεγχο της γραφικής παράστασης των ΔC_t μεταξύ των γονιδίων αναφοράς και στόχου σε διαδοχικές αραιώσεις υποστρώματος. Αν η κλίση της καμπύλης αυτής είναι σχεδόν μηδενική (<0.1), τότε οι αποδόσεις είναι παραπλήσιες. Στην αντίθετη περίπτωση πρέπει να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της καμπύλης αναφοράς ή να υπολογιστούν και να ληφθούν υπόψη οι διαφορετικές τους αποδόσεις. Αυτό γίνεται με τη μαθηματική μέθοδο του Pfaffl, σύμφωνα με την οποία:

$$(2) R = \frac{E_\sigma^{\Delta Ct\sigma} (\text{μέση } Ct_M - \text{μέση } Ct_X)}{E_a^{\Delta Ct a} (\text{μέση } Ct_M - \text{μέση } Ct_X)} \text{ όπου } E_\sigma \text{ και } E_a \text{ είναι οι αποδόσεις των γονιδίων στόχου } \sigma \text{ και αναφοράς αντίστοιχα, } Ct_M, Ct_X \text{ είναι το } Ct \text{ μάρτυρα } M \text{ και δείγματος } X \text{ και } \Delta Ct_\sigma, \Delta Ct_a \text{ είναι η διαφορά } Ct_M - Ct_X \text{ των γονιδίων στόχου ή αναφοράς αντίστοιχα.}$$

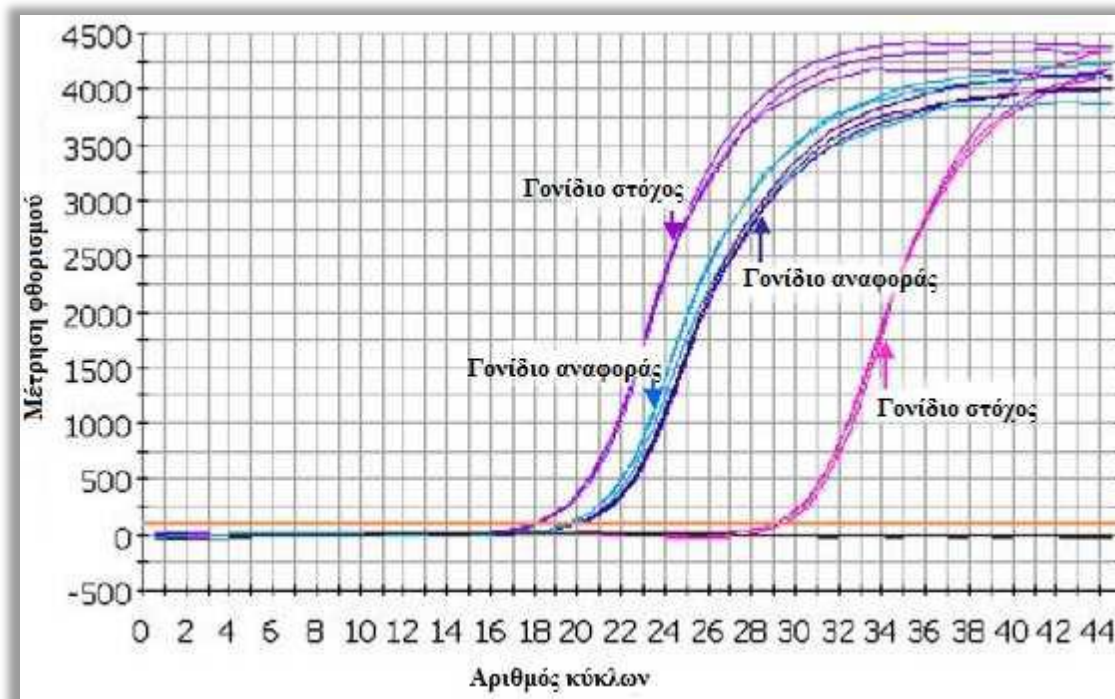
Βλέπουμε πως εάν $E_{\sigma} = E_{\alpha} = 2$ (ιδανική περίπτωση 100% απόδοσης), τότε η εξίσωση (2) γίνεται ταυτόσημη με την εξίσωση (1).

Ο παραπάνω λόγος προκύπτει από το λόγο της έκφρασης του γονιδίου-στόχου (σ) σε ένα δεδομένο δείγμα, κανονικοποιημένης ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (α), δια την αντίστοιχη κανονικοποιημένη έκφραση δεδομένου μάρτυρα. Η κανονικοποιημένη έκφραση ενός δείγματος X δίδεται από τον τύπο :

$$(3) X_{NORM} = \frac{E_{\sigma}^{\alpha} - μέση C_{\sigma}}{E_{\alpha}^{\alpha} - μέση C_{\alpha}}$$

Για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής χρειάζεται η δημιουργία καμπύλης αναφοράς προκειμένου να υπολογιστεί η απόδοση. Μετά από βελτιστοποίηση των συνθηκών και αφού βεβαιωθούμε για την επαναληψιμότητα της τιμής E σε αλληπάλληλες αντιδράσεις, μπορούμε πλέον να την εφαρμόζουμε κρατώντας μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Τέλος, μια ακόμη μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης είναι η μέθοδος της «απόλυτης αύξησης φθορισμού», που εφαρμόζεται χρησιμοποιώντας ειδικά προγράμματα λογισμικού και με τα οποία είναι θεωρητικά δυνατή η ακριβής μέτρηση της απόδοσης της αντίδρασης για κάθε δείγμα χωριστά (δηλαδή όχι συνολικά για ένα ζεύγος εκκινητών). Αυτό γίνεται δημιουργώντας μια προσομοίωση της καμπύλης αύξησης του δείγματος (παράγωγος καμπύλη), η οποία απεικονίζει το \log (φθορισμού) προς τον αριθμό των κύκλων. Με εφαρμογή ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression) στο κεντρικό, εκθετικό τμήμα της σιγμοειδούς καμπύλης προκύπτει μια γραμμική καμπύλη, από την κλίση της οποίας υπολογίζεται αυτόματα η απόδοση E . Στη συνέχεια μπορεί να υπολογιστεί μια μέση E και να αντικατασταθεί στην εξίσωση (2), ή να υπολογισθεί η αρχική συγκέντρωση κάθε δείγματος χωριστά χρησιμοποιώντας το ξεχωριστό E κάθε δείγματος.



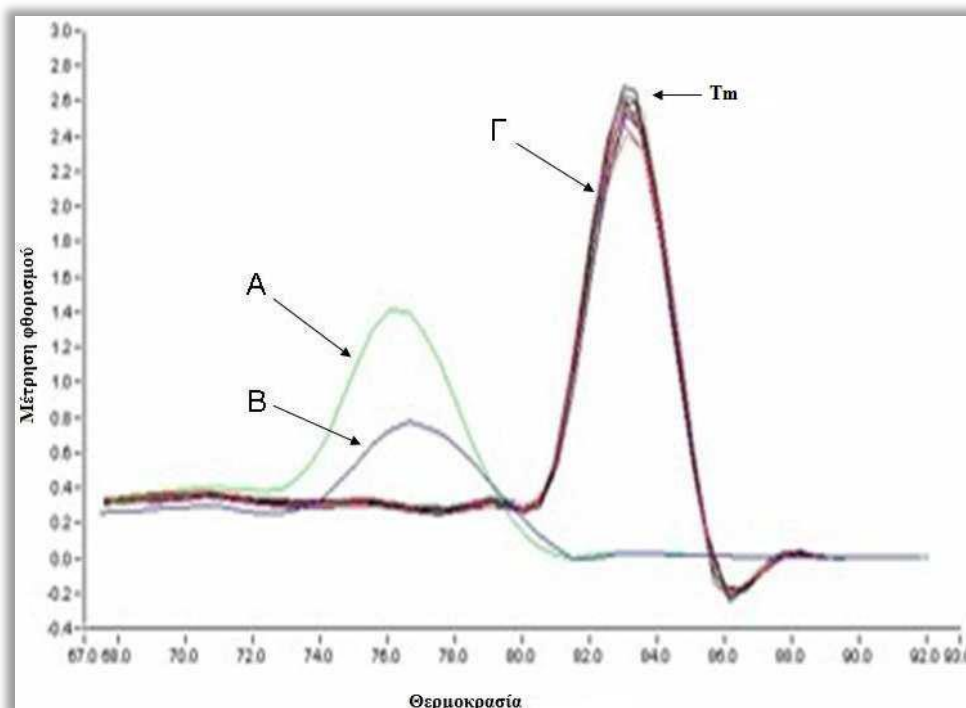
Εικόνα 9: Σύγκριση καμπύλης του υπο μελέτη γονιδίου (γονίδιο στόχος) με το γονίδιο αναφοράς (reference gene).

2.2.4 Καμπύλης Αποδιάταξης (Melting Curve ή Dissociation Curve)

Μια ακόμα δυνατότητα που παρέχει η τεχνολογία της Real Time PCR είναι η κατασκευή καμπύλης αποδιάταξης (Melting curve ή Dissociation curve) με την οποία μπορούν να αξιολογηθούν τα προϊόντα της αντίδρασης, να δούμε δηλαδή αν τα προϊόντα που παρήχθησαν είναι αυτά που θέλουμε ή όχι. Η καμπύλη αυτή βασίζεται στην θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature ή T_m) των προϊόντων της αντίδρασης.

Η T_m είναι η θερμοκρασία στην οποία αποδιατάσσεται το κάθε τμήμα DNA και εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA. Τα προϊόντα της αντίδρασης θα πρέπει να έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, εκτός και αν υπάρχει επιμόλυνση ή τμήματα που προέρχονται από ένωση μεταξύ των εκκινητών ή τμήματα που προέρχονται από τοποθέτηση των εκκινητών σε παρόμοιες συμπληρωματικές αλληλουχίες (mismatching). Εάν τα προϊόντα έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης τότε θα εμφανιστεί μια κορυφή στην καμπύλη, ενώ στην περίπτωση που ανάμεσα στα προϊόντα υπάρχουν και τμήματα διαφορετικού μεγέθους, τότε θα παρατηρηθούν στην καμπύλη και άλλες κορυφές που θα αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης (T_m), επειδή για κάθε προϊόν η αποδιάταξη γίνεται σε διαφορετική θερμοκρασία.

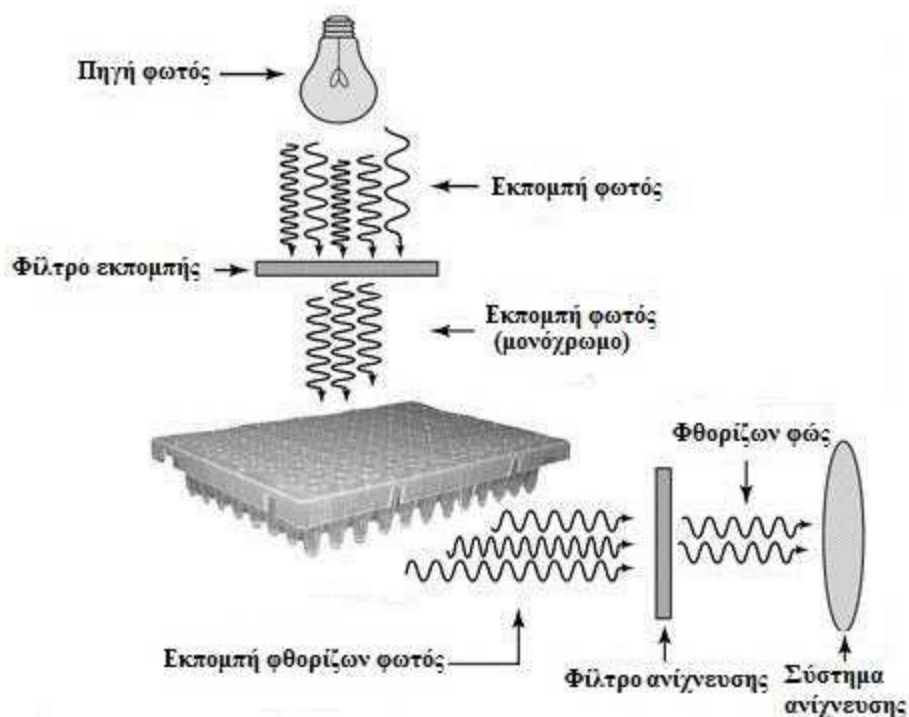
Η μεθοδολογία της εφαρμογής της αντίδρασης της Real Time PCR θα πρέπει να περιλαμβάνει πάντα και αρνητικούς μάρτυρες (κενά DNA) μαζί με άγνωστα δείγματα προς ανάλυση. Τα αρνητικά αυτά δείγματα αφορούν την εφαρμογή κανονικής αντίδρασης με χρήση όλων των υλικών της PCR πλην της προσθήκης του DNA (όπως στην περίπτωση της αντίδρασης των αγνώστων δειγμάτων). Συνήθως χρησιμοποιείται νερό αντί του αντίστοιχου όγκου DNA, για να εξεταστεί η περίπτωση επιμόλυνσης του διαλύματος της αντίδρασης PCR του αγνώστου δείγματος υπό εξέταση με DNA άλλου οργανισμού.



Εικόνα 10: Παράδειγμα καμπύλης αποδιάταξης στην οποία εμφανίζονται τρεις διαφορετικές κορυφές (A, B και Γ). Η υψηλότερη κορυφή (Γ) αντιστοιχεί στην θερμοκρασία αποδιάταξης του επιθυμητού προϊόντος. Οι κορυφές A και B αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης από αυτή της κορυφής Γ (Lee *et al*, 2006).

2.3 Συσκευή Real Time PCR - Περιγραφή του οργάνου

Όλες οι συσκευές της Real time PCR συνδιάζουν την τεχνολογία της συμβατικής PCR για την παραγωγή/ πολλαπλασιασμό προϊόντων με τα συστήματα για παραγωγή, ανίχνευση και ανάλυση του φθορίζον σήματος που παράγεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Υπάρχουν πολλές εταιρίες που διαθέτουν συσκευές Real Time PCR και το κόστος της κάθε μιας διαφέρει ανάλογα με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Fraga *et al*, 2008).



Εικόνα 11: Διάγραμμα με τον βασικό τρόπο λειτουργίας γενικά όλων των συσκευών Real Time PCR (Fraga, 2008).

Η μεγαλύτερη διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στις διάφορες συσκευές είναι το λογισμικό που διαθέτει η κάθε συσκευή για την ανάλυση των δεδομένων και το σύστημα ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης χρωστικής φθορισμού.

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας που θα αναφερθεί στην ενότητα του πειραματικού μέρους και το οποίο περιγράφεται είναι το μοντέλο StepOne Plus Real Time PCR.

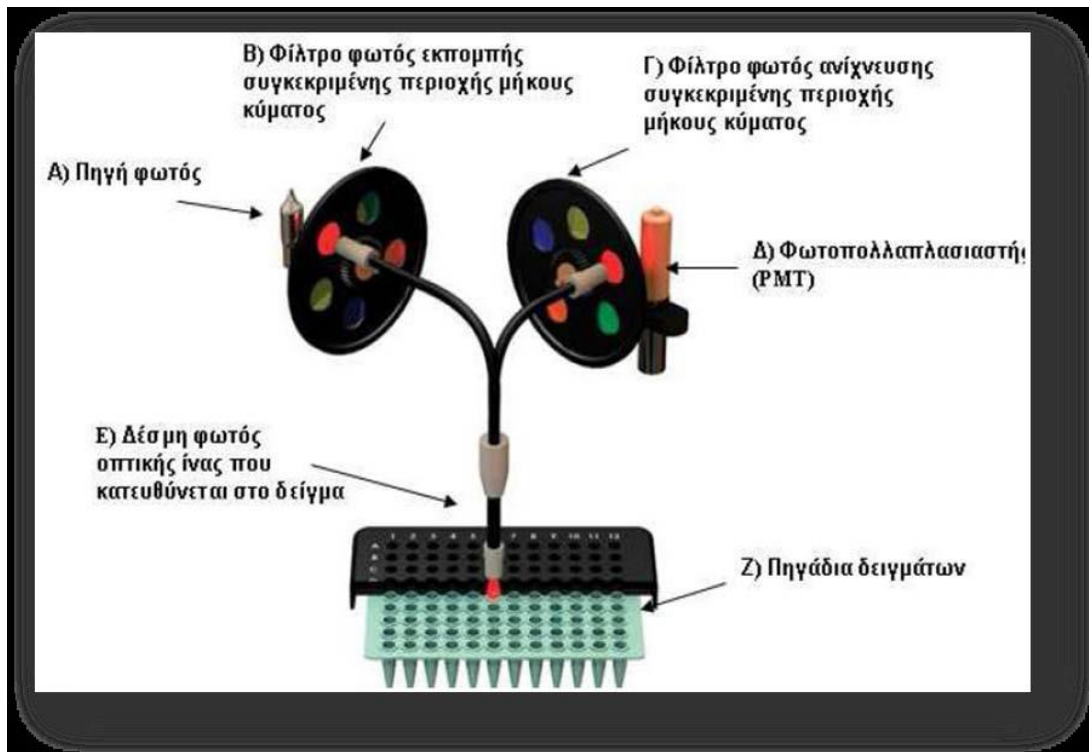


Εικόνα 12: Η συσκευή StepOne Plus Real Time PCR της εταιρείας Applied Biosystems International

Η συσκευή αυτή έχει τη δυνατότητα διεξαγωγής αντίδρασης Real Time PCR, ολοκλήρωσης της αντίδρασης σε 40 κύκλους και διαχωρισμό δειγμάτων με 5000 και 10000 αντίγραφα της αλληλουχίας με ποσοστό βεβαιότητας 99,7%. Το οπτικό σύστημα του StepOne Plus Real Time PCR αποτελείται από την πηγή φωτός (λάμπα), τα φίλτρα και την κεφαλή ανίχνευσης. Η συσκευή είναι συνδεδεμένη με έναν υπολογιστή που συλλέγει και αναλύει τα δεδομένα της αντίδρασης.

Τα διάφορα μέρη του οργάνου είναι :

- Πηγή φωτός
- Είδη φίλτρων, αριθμός και ποιότητα φωτός
- Ανίχνευση και συστήματα ανίχνευσης
- Πηγάδια δειγμάτων
- Λογισμικό
- Είδη Ανάλυσης



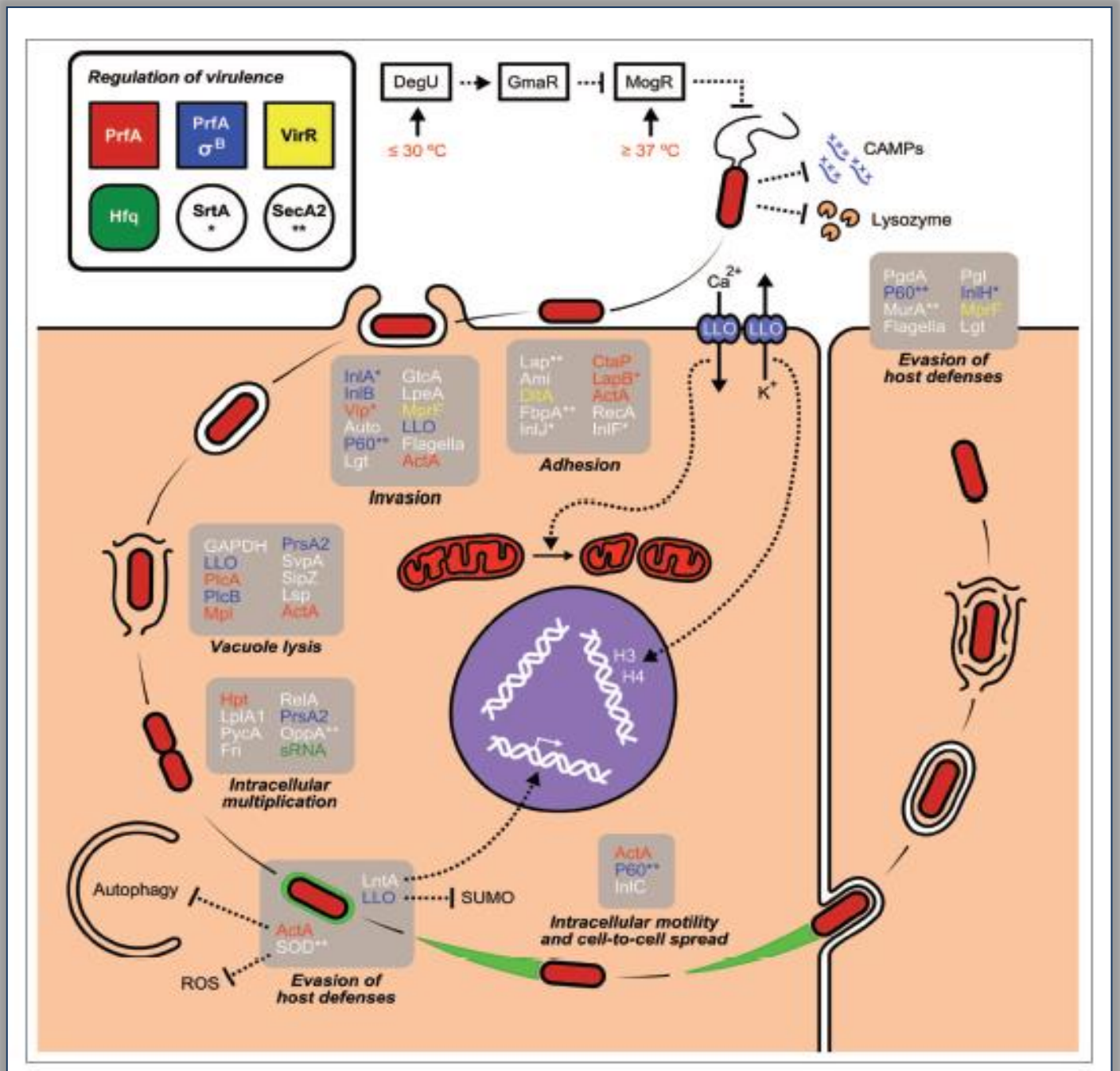
Εικόνα 13: Αναλυτική περιγραφή των τμημάτων που αποτελούν την συσκευή StepOne Plus Real Time PCR της εταιρείας Applied Biosystems International

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

**ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ
ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΟΥΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *Listeria monocytogenes*
ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΕ ΓΑΣΤΡΙΚΟ ΚΑΙ
ΔΩΔΕΚΑΔΑΚΤΥΛΙΚΟ ΥΓΡΟ**

3.1.1 Γονίδια παθογένειας του βακτηρίου *L. monocytogenes*

Η ανθρώπινη μόλυνση από τον παθογόνο μικροοργανισμό συνηθέστερα προκύπτει μετά από κατανάλωση μiasμένου τροφίμου. Αρχικά, ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* επιβιώνει της γαστρικής διέλευσης από τον στόμαχο και αυξάνεται στο έντερο, ενώ στη συνέχεια κύτταρα του μικροοργανισμού διηθούν τον εντερικό βλεννογόνο, με τη βοήθεια ενεργού ενδοκύττωσής τους από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του μολυσμένου οργανισμού, ο οποίος όντας ένα προαιρετικό ενδοκυτταρικό παθογόνο μπορεί να επιζήσει και να πολλαπλασιαστεί στα κύτταρα του συστήματος «μονοκύτταρο-μακροφάγο». Η ενδοκύτωση υποβοηθείται από διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένης της ιντερναλίνης, μιας βακτηριακής πρωτεΐνης επιφανείας 800 αμινοξέων που κωδικοποιείται από ένα χρωμοσωμικό γονίδιο το *inlA*, άλλων προϊόντων της *inl* οικογένειας γονιδίων, και την p60 (κωδικοποιείται από το γονίδιο *iap*), μια εξωκυτταρική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 60 kDa. Αποτέλεσμα αυτής της ενδοκύτωσης είναι ο εσωκλεισμός του βακτηρίου σε ένα φαγόσωμα. Προκειμένου να πολλαπλασιαστεί ενδοκυτταρικά ο μικροοργανισμός πρέπει να επιζήσει στο φαγόσωμα και να διαφύγει γρήγορα προτού καταστραφεί από τα λυσοσώματα, μια διαδικασία που θα σκότωνε το βακτήριο. Ως εκ τούτου παράγει τη λιστεριολυσίνη O (LLO, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *hly*) μια αιμολυσίνη μοριακού βάρους 58 kDa, τη φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη-φωσφολιπάση C (PI-PLC, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *plcA*), τη φωσφατιδυλο-χολίνη-φωσφολιπάση C (PC-PLC, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *plcB*) και με τη βοήθεια αυτών των ενζύμων που προαναφέρθηκαν αποδομεί τη διπλή λιπώδη μεμβράνη του φαγοσώματος, επέρχεται λύση της μεμβράνης και έτσι απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα όπου και πολλαπλασιάζεται. Σημαντικό στοιχείο της παθογένειας του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* είναι η ικανότητά του να εισβάλλει σε γειτονικά κύτταρα. Για να το επιτύχει αυτό, το βακτήριο κινητοποιεί μηχανισμούς του κυττάρου-ξενιστή, οι οποίοι μεταξύ αυτών περιλαμβάνουν τον πολυμερισμό της ακτίνης (η πρωτεΐνη ActA, εμπλέκεται στον πολυμερισμό της ακτίνης και κωδικοποιείται από το γονίδιο *actA*), για τη δημιουργία βλεφαρίδας στον έναν από τους δύο πόλους του. Η βλεφαρίδα αυτή εξυπηρετεί στην προώθηση του παθογόνου και στη μετατόπισή του δίπλα στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή. Εξαιτίας της υφιστάμενης ώθησης από τον μικροοργανισμό, στο σημείο αυτό δημιουργείται μια προεκβολή της κυτταρικής μεμβράνης η οποία μπορεί να εισχωρήσει σε ένα γειτονικό κύτταρο. Ομοίως, όπως και στην περίπτωση του φαγοσώματος, ακολουθεί λύση της κυτταρικής μεμβράνης της προεκβολής που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του παθογόνου στο κυτταρόπλασμα του νεοπροσβαλλόμενου κυττάρου, αποφεύγοντας παράλληλα το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών σταδίων δράσης του βακτηρίου *L. monocytogenes* καθώς και των γνωστών γονιδίων που συνδέονται με τη λοιμοτοξικότητά της. Απεικονίζεται ο ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής του μικροοργανισμού, την προσκόλληση του μικροοργανισμού στο κύτταρο-ξενιστή, την είσοδό του στο κύτταρο, το βακτήριο εντός του κενοτοπίου, το βακτήριο ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα), την προώθηση του βακτηρίου και τέλος το βακτήριο περιβαλλόμενο από διπλή μεμβράνη κατά την εξάπλωσή του από κύτταρο σε κύτταρο. Λοιμογόνοι παράγοντες που ρυθμίζονται στο μεταγραφικό (PrfA, PrfA και σ_B , VirR), μετα-μεταγραφικό (Hfq) και μετα-μεταφραστικό (SrtA, SecA2) επίπεδο επισημαίνονται αναλόγως. CAMPs: κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια, H3 and H4: ιστόνες 3 and 4, ROS: reactive oxygen species (σημαντικοί μεσολαβητές της μικροβιοκτόνου δράσης των φαγοκυττάρων).

Στον Πίνακα 1 που ακολουθεί παρουσιάζονται κάποια γονίδια του βακτηρίου *L. monocytogenes* γνωστά για τη λοιμοτοξικότητά τους (virulence).

Πίνακας 1

Γονίδιο	Ιδιότητα
<i>sigB</i>	RNA πολυμεράση σίγμα παράγοντας παίζει ρόλο στην όξινη, οξειδωτική και ωσμωτική ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού
<i>plcA</i>	Φωσφολιπάση C 38-kd εξειδικευμένη στη φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη
<i>plcB</i>	Λεκιθινάση 29 και 32 kDa πολυπεπίδια
<i>hly</i>	Αιμολυσίνη (λιστεριολυσίνη O) 58kDa
<i>inlA</i>	Ιντερναλίνη 88 kDa πρωτεΐνη (744 αμινοξέα)
<i>inlB</i>	Ιντερναλίνη 65 kDa πρωτεΐνη (630 αμινοξέα). Το γονίδιο εμπλέκεται στην ηπατική προσβολή
<i>inlC</i>	Πρωτεΐνη 30 kDa ομόλογη με τις πρωτεΐνες InlA, InlB
<i>inlJ</i>	Ιντερναλίνη επιφανειακή πρωτεΐνη συμβάλλει στη βακτηριακή προσκόλληση σε κύτταρα ξενιστές
<i>prfA</i>	Μεταγραφικός εκκινητής των <i>hly</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i> , <i>actA</i> , <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , and <i>mpl</i> με μοριακό βάρος 27 kDa. Μέλος της οικογένειας CAP/FnR
<i>clpC</i>	Μεταγραφικός τροποποιητής 100 kDa που συμμετέχει στην προσκόλληση και επίθεση και ρυθμίζει την έκφραση των <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , καθώς και του γονιδίου <i>actA</i>

Τα περισσότερα γονίδια παθογένειας στο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* βρίσκονται υπό τον έλεγχο της ενεργοποιού πρωτεΐνης *prfA*, η οποία είναι μέλος της CAP/FnR οικογένειας των μεταγραφικών ρυθμιστών. Στο χρωμόσωμα που βρίσκεται στο λεγόμενο PrfA-εξαρτώμενο μολυσματικό σύμπλεγμα γονιδίων περιλαμβάνονται γνωστά γονίδια παθογένειας όπως τα *actA*, *hly*, *plcA* και *plcB*. Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη της έκφρασης δέκα γονιδίων παθογένειας: *lmo2672*, *lmo2470*, *sigB*, *hlyA*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*.

Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων εμπλέκονται στον ενδοκυτταρικό κύκλο ζωής του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Πιο συγκεκριμένα, ο μικροοργανισμός χρησιμοποιεί δύο βασικές επιφανειακές πρωτεΐνες, τις ιντερναλίνες InlA και InlB, που κωδικοποιούνται από το οπερόνιο *inlAB*. Ένα κοινό στοιχείο σε όλες τις ιντερναλίνες είναι οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες λευκίνης LRR-περιοχή που αποτελείται από 22 αμινοξέα, με λευκίνη ή ισολευκίνη στις θέσεις 3, 6, 9, 11, 16, 19, και 22 (-L- -L- -L- -L- -N-I- -I / L-E). Η ιντερναλίνη A έχει μία αλληλουχία μεταφοράς σημάτων στο N-τελικό άκρο η οποία μαζί με το C-τελικό άκρο αποτελεί το LPXTG μοτίβο, το οποίο είναι συνδεδεμένο με την πεπτιδογλυκάνη του βακτηρίου και είναι υπεύθυνο για την προσκόλληση της InlA στα κύτταρα. Η ιντερναλίνη B περιέχει επίσης μία αλληλουχία μεταφοράς σημάτων στο N-τελικό άκρο, οχτώ επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες λευκίνης και τρία μόρια GW τα οποία βρίσκονται στο C-τελικό άκρο. Αντίθετα με την InlA δεν διαθέτει LPXTG μοτίβο. Αντ' αυτού, η InlB έχει μια περιοχή 232 αμινοξέων που αποτελείται από διαδοχικά διατεταγμένες

αλληλουχίες μήκους περίπου 80 αμινοξέων, η καθεμία αρχίζοντας με τα μόρια GW. Αυτή η περιοχή, είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση της InlB στην βακτηριακή επιφάνεια. Η InlB στοχεύει στην επιφάνεια του βακτηρίου μέσω της αλληλεπίδρασης των μορίων GW (G:γλυκίνη W:τρυπτοφάνη) με το λιποτειχοϊκό οξύ στο κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου. Είναι προφανές ότι η InlA είναι απαραίτητη και επαρκής για την είσοδο του μικροοργανισμού στο εσωτερικό των εντεροκυττάρων στον άνθρωπο και για την αλληλεπίδραση με την E-καντχερίνη, η οποία βρίσκεται στα εντεροκύτταρα και σε άλλους ιστούς (όπως ο πλακούντας), ενώ η InlB μπορεί να είναι εφεδρική για την είσοδο του μικροοργανισμού σε άλλα κύτταρα του ξενιστή. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι το 96% των 300 απομονώσεων του μικροοργανισμού από ασθενή άτομα, περιείχε ένα πλήρους μήκους, λειτουργικό αντίγραφο της InlA. Είναι πιθανό ότι άλλες ιντερναλίνες (InlC, InlJ και InlH) είναι σε θέση να αντισταθμίσουν την έλλειψη InlB και να βοηθήσουν την είσοδο του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε άλλα κύτταρα, όμως στα τελικά στάδια της μόλυνσης, επειδή καμία τους δεν μπορεί να προκαλέσει φαγοκύτωση στα κύτταρα των θηλαστικών από μόνη της και επειδή η εναλλαγή των γονιδίων *inlC* και *inlJ* έχει αρνητικές επιπτώσεις στην παθογένεια του βακτηρίου κατά τη διάρκεια προσβολής των εντερικών κυττάρων. Έρευνες έχουν δείξει ότι η ιντερναλίνη C (InlC) συμβάλλει στο σχηματισμό προεξοχών και σε λέπτυνση της εξωτερικής στιβάδας των επιθηλιακών κυττάρων στο βλεννογόνο του εντέρου μέσω αναστολής της δραστηριότητας και αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Tuba και N-WASP (πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη δομή των συνδέσεων των επιθηλιακών κυττάρων στα θηλαστικά). Επιπλέον ενδιαφέρον αποτελεί ότι η InlJ εκφράζεται μόνο αποτελεσματικά στην επιφάνεια των βακτηρίων που ανακτώνται από το ήπαρ και το αίμα των μολυσμένων ζώων και ότι διασφαλίζει τη σωστή έκφραση της παθογένειας σε λοιμογόνα στελέχη, ενώ όταν διαταράσσεται η έκφραση του γονιδίου *inlJ* παρεμποδίζεται η έκφραση της παθογένειας των στελεχών.

Η λιστεριολυσίνη O (LLO) αποτελεί τον κύριο λοιμογόνο παράγοντα, που παίζει καθοριστικό ρόλο για τη διαφυγή του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* από τα φαγосώματα και η έλλειψή της δηλώνει ότι το στέλεχος δεν είναι παθογόνο. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την LLO (*hly*) ήταν το πρώτο γονίδιο παθογένειας που προσδιορίστηκε στον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, και αποτελεί μέρος ενός ενός συμπλέγματος γονιδίων παθογένειας το οποίο ονομάζεται LIPI-1 (Listeria pathogenicity island 1). Το παραπάνω σύμπλεγμα αποτελείται από τρία μεταγραφικά μόρια. Στη κεντρική θέση του συμπλέγματος γονιδίων βρίσκεται το γονίδιο *hly*, πάνω (upstream) από το *hly* βρίσκεται το *plcA-prfA* οπερόνιο ενώ κάτω (downstream) από το *hly* βρίσκεται ένα οπερόνιο το οποίο περιλαμβάνει τρία γονίδια: *mpl*, *actA* και *plcB*. Οι φωσφολιπάσες C, PI-PLC (*plcA*) και PC-PLC (*plcB*), συνεργούν με την LLO στην αποσταθεροποίηση των φαγосωμάτων. Η PC-PLC εκφράζεται ως ένα προένζυμο, του οποίου η ενεργοποίηση συμβαίνει στο όξινο περιβάλλον των κενοτοπίων και επάγεται από τη βακτηριακή μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου Mpl.

Εν κατακλείδι, ο ρυθμιστής PrfA παίζει το βασικότερο ρόλο στην ενδοκυτταρική μόλυνση και στην έναρξη της μεταγραφής των παραπάνω γονιδίων. Μια πρόσφατη μεταγραφική ανάλυση αποκάλυψε ότι ο παράγοντας σ^B ρυθμίζει ένα μεγάλο και διαφορετικό σύνολο γονιδίων (περίπου 200) που προβλέπεται να λειτουργούν σε περίπτωση καταπόνησης, να παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των διαδικασιών μεταφοράς, ενδοκύτωσης, και παθογένειας. Επιπλέον, πρόσφατα στοιχεία έχουν δείξει ότι ο παράγοντας σ^B ελέγχει την έκφραση του *prfA* μέσα στα κύτταρα ξενιστές για να αποφευχθεί η υπερέκφραση των λοιμογόνων γονιδίων, η

οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπερβολική βλάβη του κυττάρου-ξενιστή και σε μη επιτυχή βακτηριακή μόλυνση (Ollinger J, *et al.*, 2009). Η διαπίστωση αυτή αναδεικνύει την επικάλυψη που υπάρχει μεταξύ του ελέγχου της γενικής απόκρισης στο στρες και στον έλεγχο των λειτουργιών που σχετίζονται με την παθολογία.

3.1.2 Επιβίωση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης έπειτα από έκθεση σε γαστρικό υγρό του ανθρώπινου στομάχου

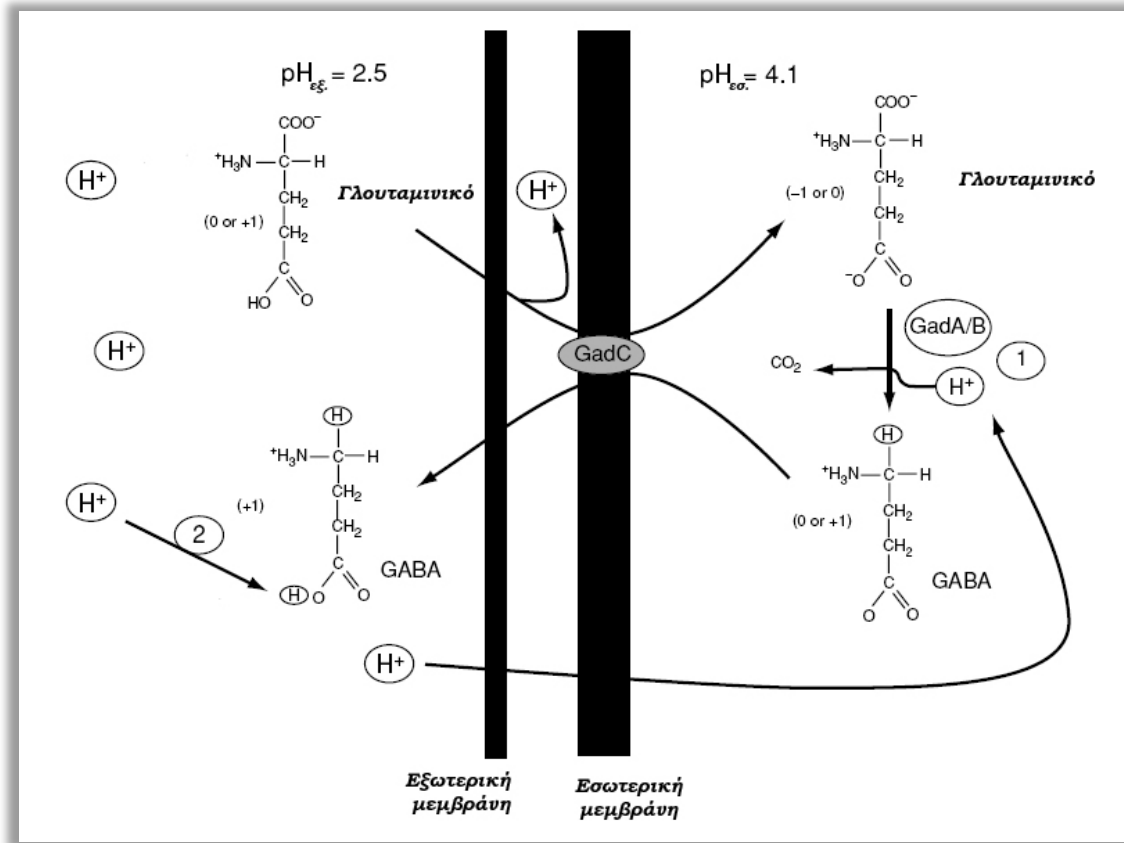
Η προσαρμοστική απόκριση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, που καλείται ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση (acid tolerance response-ATR), μετά από έκθεση σε όξινες συνθήκες με αποτέλεσμα αλλαγή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, περιλαμβάνει διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς για την προσαρμογή και την επιβίωση στα όξινα περιβάλλοντα προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση του pH και την παραγωγή πρωτεϊνών όξινης καταπόνησης (Acid Shock Proteins-ASPs). Πολλές μελέτες συσχετίζουν την ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση με την παθολογία του μικροοργανισμού που όχι μόνο επιζεί της όξινης καταπόνησης αλλά και απαιτεί πτώση του pH προκειμένου να ενεργοποιήσει την αιμολυσίνη έτσι ώστε να διαφύγει από το μακροφάγο-φαγόσωμα. Επιπλέον διαθέτει και άλλους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση όπως είναι η αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού, την απαμινάση της αργινίνης και το σύστημα της F₀F₁ ATPάσης.

3.1.2.1 Το σύστημα GAD και ο ρόλος του παράγοντα σ^B στη ρύθμισή του

Τα δομικά στοιχεία του συστήματος αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού-GAD (glutamate decarboxylase system, GAD) περιλαμβάνουν τα ισοένζυμα GadA (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *gadA*) και GadB (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *gadB*) της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος και τον αντιμεταφορέα GadC που κωδικοποιείται από το γονίδιο *gadC* (Hersh *et al.*, 1996). Οι δύο αποκαρβοξυλάσες του γλουταμινικού που κωδικοποιούνται από τα *gadA* και *gadB* είναι ισοένζυμα με άριστο pH δράσης 3.8 (Boeker και Snell, 1972·Smith *et al.*, 1992) και καταλύουν τη μετατροπή του γλουταμινικού σε γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) με πρόσληψη ενός πρωτονίου και απελευθέρωση ενός μορίου CO₂. Σε περίπτωση μεταλλάξεων στον αντιμεταφορέα GadC (γονίδιο *gadC*) ή στις αποκαρβοξυλάσες του γλουταμινικού (διπλή μετάλλαξη στα *gadA* και *gadB*) παρεμποδίζεται ο μηχανισμός ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση χωρίς όμως να συμβαίνει το ίδιο αν συμβεί μετάλλαξη στα γονίδια μιας εκ των δύο αποκαρβοξυλασών (*gadA* και *gadB*).

Η κατανάλωση ενδοκυτταρικών πρωτονίων κατά τη διάρκεια της αποκαρβοξυλίωσης ώστε να διατηρηθεί το εσωτερικό pH σε επίπεδα τέτοια που να συμβάλλουν στην επιβίωση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, αποτελεί την επικρατέστερη υπόθεση για την περιγραφή του συστήματος ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση. Συγκεκριμένα σε περιβάλλον όξινου pH (2.5) πρωτόνια κινούνται εντός του κυττάρου και αυξάνουν την κυτταροπλασματική οξύτητα. Όταν συμβεί αυτό το γλουταμινικό οξύ μεταφέρεται από τον αντιμεταφορέα GadC, αποκαρβοξυλιώνεται από το ζεύγος αποκαρβοξυλασών GadA/B προς γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), με την κατανάλωση όπως προαναφέρθηκε ενός πρωτονίου και την απελευθέρωση CO₂. Το GABA μεταφέρεται έπειτα εκτός του κυττάρου με τη συνακόλουθη πρόσληψη γλουταμινικού. Πιθανότατα τα πρωτόνια που βρίσκονται στην καρβοξυλομάδα του γλουταμινικού θα απελευθερωθούν στο περιβάλλον πριν μεταφερθούν εντός του κυττάρου από το μεταφορέα GadC ή κατά τη διάρκεια του περάσματος τους μέσω του καναλιού. Αντίστοιχα υπάρχουν δύο πιθανά σημεία όπου τα πρωτόνια μπορούν να «καταναλωθούν» (Εικόνα 15): στο σημείο 1 εντός του κυτταροπλάσματος κατά

την αποκαρβοξυλίωση του γλουταμινικού και στο σημείο 2 στον εξωκυττάριο χώρο από μόριο GABA κάτι το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι το τελικό προϊόν της αποκαρβοξυλίωσης του γλουταμινικού, πιθανότατα λειτουργεί ως δέκτης πρωτονίων κατόπιν απελευθέρωσής του στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και δημιουργεί προστατευτικό περιβάλλον (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μοντέλου δράσης του συστήματος ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση. (Richard και Foster, 2003)

Με αυτόν τον τρόπο, το σύστημα GAD αποτελεί τον κύριο μηχανισμό για τη διατήρηση της ομοιόστασης του pH στο βακτήριο *L. monocytogenes* και την απόκτηση της ανθεκτικότητας που χρειάζεται για να ανταπεξέλθει στις ακραία όξινες συνθήκες του γαστρικού υγρού. Επιπλέον το σύστημα GAD (*gadT1*) φαίνεται να παίζει ρόλο στην επιβίωση του παθογόνου στη χολή, ενδεχομένως εξουδετερώνοντας το χαμηλό κυτταροπλασματικό pH που προκύπτει από τον ενδοκυτταρικό διαχωρισμό των χολικών αλάτων (Begley *et al.*, 2002).

Τα γονίδια των αποκαρβοξυλασών του γλουταμινικού οξέος (*gadD1*: *lmo0447*, *gadD2*: *lmo2363*, και *gadD3*: *lmo2434*) και τα δύο του αντιμεταφορέα γλουταμινικού:γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) (*gadT1*: *lmo0448* και *gadT2*: *lmo2362*) βρίσκονται εντοπισμένα πάνω σε τρεις ευδιάκριτες περιοχές στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* (Conte *et al.*, 2002·Cotter *et al.*, 2001·Cotter *et al.*, 2005). Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε ήπια όξινα περιβάλλοντα παίζει το οπερόνιο των γονιδίων *gadDIT1* (μέρος ενός οπερονίου πέντε γονιδίων), ενώ αντίστοιχα το οπερόνιο των *gadD2T2* στην επιβίωση του μικροοργανισμού σε συνθήκες ισχυρά όξινης καταπόνησης.

Για την ρύθμιση του συστήματος GAD στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* συμμετέχει μια μεγάλη ποικιλία ρυθμιστικών παραγόντων, όπως αποδεικνύεται μέσα από τη σύνθετη μεταγραφική διαδικασία των *gad* γονιδίων. Καθοριστικό ρόλο στην προσαρμοστική απόκριση του μικροοργανισμού σε συνθήκες όξινης, οξειδωτικής και οσμωτικής καταπόνησης, όπως επίσης και σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και έλλειψης πηγής άνθρακα από το μέσο ανάπτυξης, φαίνεται ότι παίζει ο παράγων σ^B που κωδικοποιείται από το γονίδιο *sigB*. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορα στελέχη του βακτηρίου *L. monocytogenes* αποδείχτηκε η καθοριστική σημασία του συστήματος GAD και του παράγοντα σ^B για την επιβίωση των στελεχών σε συνθήκες όξινης καταπόνησης με γαστρικό υγρό, όπως και η ενδεχόμενη ρύθμιση του συστήματος GAD από τον παράγοντα σ^B (Cotter *et al.*, 2001• Ferreira *et al.*, 2003), γεγονός που επιβεβαιώνεται και από μεταγενέστερες μελέτες στο στέλεχος *L. monocytogenes* EGDe που έχουν δείξει ότι τα γονίδια *gad* (*gadD1T1*, *gadD2T2* και *gadD3*) σε όξινες συνθήκες ρυθμίζονται από το σ^B (Wempkamp-Kamphuis *et al.*, 2004• Ryan, 2006). Επιπροσθέτως οι μελέτες των Kazmierczak *et al.* (2003) κατέληξαν σε συμπέρασμα ότι η ρύθμιση του συστήματος GAD από τον παράγοντα σ^B , είναι μια συνάρτηση του στελεχούς, της φάσης ανάπτυξης και του pH του μέσου.

3.1.2.2 Το σύστημα απαμινάσης της αργινίνης

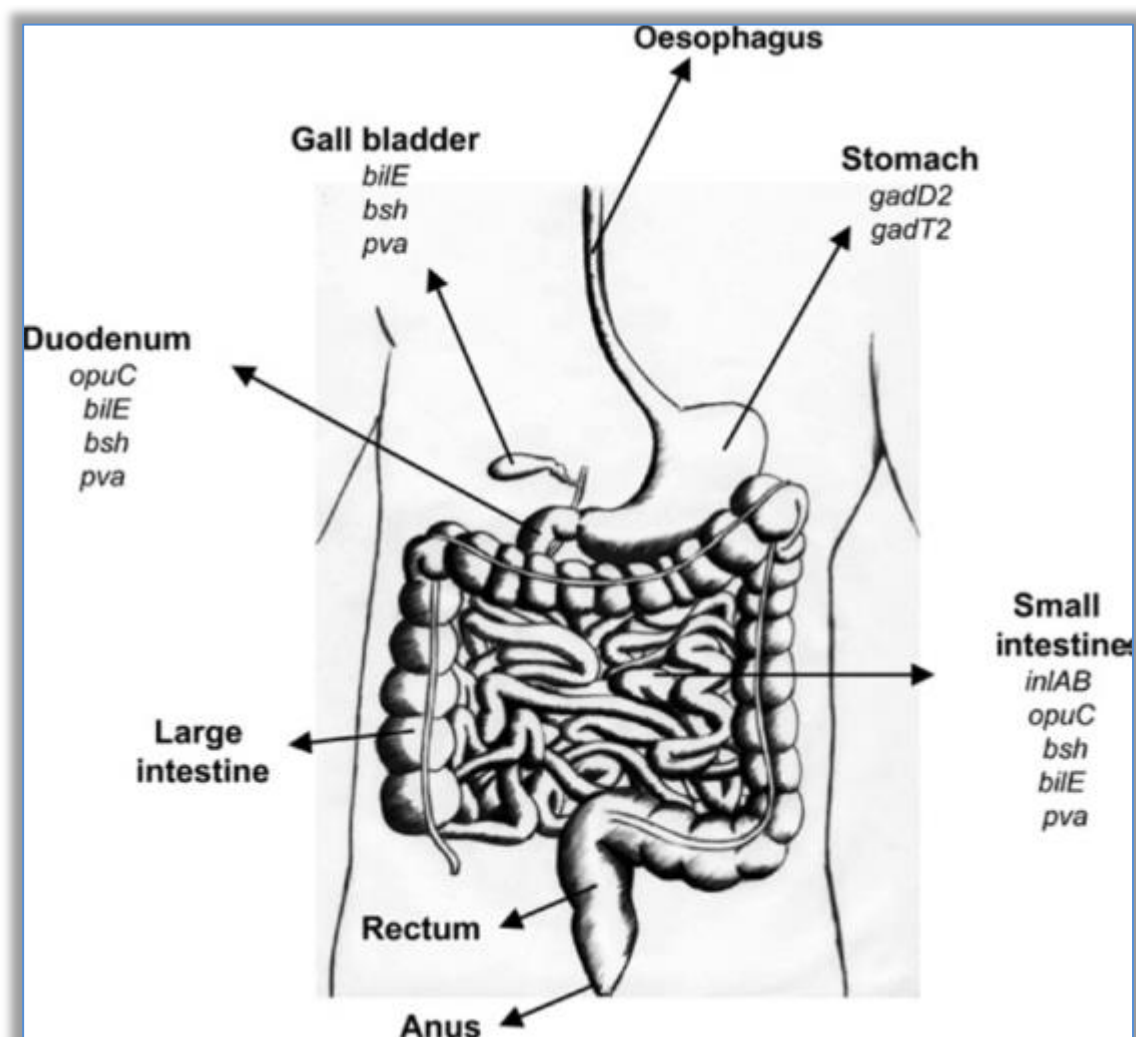
Ένα άλλο σύστημα που έχει βρεθεί σε διάφορα βακτήρια και συμμετέχει συχνά στη βακτηριακή ανθεκτικότητα σε όξινα περιβάλλοντα (Gruening *et al.*, 2006), είναι αυτό της απαμινάσης της αργινίνης (arginine deiminase – ADI). Η μετατροπή της αργινίνης σε ορνιθίνη, αμμωνία και διοξειδίο του άνθρακα καταλύεται από τα παρακάτω τρία ένζυμα: α) η απαμινάση της αργινίνης, β) η καταβολική καρβαμοϋλοτρανσφεράση της ορνιθίνης (catabolic ornithine carbamoyltransferase, COTCase) και γ) η καρβαμική κινάση (carbamate kinase). Η καταβολική καρβαμοϋλοτρανσφεράση της ορνιθίνης κωδικοποιούμενη από το *arcB* γονίδιο (*lmo0036*), ο μεταφορέας αργινίνης:ορνιθίνης κωδικοποιούμενος από το *arcD* (*lmo0037*) και η καρβαμική κινάση που κωδικοποιείται από το *arcC* (*lmo0039*) είναι μέρος ενός οπερονίου που περιέχει επίσης ένα επιπλέον γονίδιο (*lmo0038*) που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της οικογένειας των απαμινασών της πεπτιδυλαργινίνης. Το γονίδιο της απαμινάσης της αργινίνης που κωδικοποιείται από το *arcA* (*lmo0043*) είναι χωρισμένο από τα άλλα γονίδια που περιλαμβάνονται στο σύστημα ADI από ένα μη χαρακτηρισμένο οπερόνιο τριών γονιδίων (*lmo0040-lmo0042*). Σε μειωμένη ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* στην όξινη καταπόνηση έχει οδηγήσει η απώλεια του μεταφορέα αργινίνης-ορνιθίνης (*arcD*), ενώ παρατηρήθηκε αύξηση σε ευαισθησία υπό όξινες συνθήκες, όταν υπήρξε ταυτόχρονη μετάλλαξη του μεταφορέα και του βιοσυνθετικού γονιδίου *arcG* της αργινίνης (αναβολισμός αργινίνης ενδοκυτταρικά). Ο τρόπος δράσης του συστήματος ADI συνίσταται στο ότι η ορνιθίνη που παράγεται ενδοκυτταρικά ως αποτέλεσμα του καταβολισμού της αργινίνης μεταφέρεται εξοκυτταρικά με ταυτόχρονη εισαγωγή ενός μορίου αργινίνης από τον μεταφορέα αργινίνης:ορνιθίνης. Για κάθε mole αργινίνης που καταβολίζεται μέσω του συστήματος ADI, δύο mole αμμωνίας (NH_3) και ένα mole ATP παράγεται. Η αμμωνία που παράγεται ως συνέπεια του καταβολισμού της αργινίνης, μπορεί να γίνει δέκτης ενδοκυτταρικών πρωτονίων και να παράξει ιόντα αμμωνίου (NH_4^+), αυξάνοντας μ'αυτό τον τρόπο το ενδοκυτταρικό pH και διατηρώντας την ομοιόσταση του pH. Η παροχή ATP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μικροβιακή αύξηση υπό ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες ή εναλλακτικά, για να εξωθήσει τα πρωτόνια μέσω της F0F1 ATPάσης, που αποδεδειγμένα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του pH στο βακτήριο *L. monocytogenes* (Cotter *et al.*, 2000). Αν και το

σύστημα ADI του *L. monocytogenes* εμπλέκεται στην ανάπτυξη και επιβίωση σε χαμηλό pH, δεν είναι εξίσου αποτελεσματικό όσο το σύστημα GAD.

3.2 Επιβίωση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* έπειτα από έκθεση σε ανθρώπινο δωδεκαδάκτυλικό υγρό

Μετά την διέλευσή του από το στομάχι το βακτήριο *L. monocytogenes* εντοπίζεται στο δωδεκαδάκτυλο, όπου και εκκρίνεται χολή από τη χοληδόχο κύστη (Εικόνα 16). Τα χολικά οξέα που παράγονται από τη χοληστερόλη στο ήπαρ, αποθηκεύονται στην χοληδόχο κύστη και απελευθερώνονται μέσα στο δωδεκαδάκτυλο μετά από κάθε γεύμα (Begley *et al.*, 2005a). Τα χολικά οξέα όντας ένα από τα πιο σημαντικά συστήματα άμυνας του σώματος ενάντια των εντερικών παθογόνων (Hofmann και Eckmann, 2006) μπορεί να οδηγήσουν στη διαλυτοποίηση και γαλακτωματοποίηση των λιπιδίων που περιέχονται στις βακτηριακές μεμβράνες (Begley *et al.*, 2005, Hofmann, 1999, Hofmann and Eckmann, 2006), να προκαλέσουν διάσπαση των πρωτεϊνών της μεμβράνης, βλάβη στο DNA και οξειδωτικό στρες στα βακτηριακά κύτταρα (Begley *et al.*, 2005a). Αυτές οι κυτταρικές προσβολές αντανακλώνται σε πρόσφατες αναλύσεις του συνόλου των πρωτεϊνών του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που έχει εκτεθεί σε χολικά οξέα σε αναερόβιες συνθήκες (Payne *et al.*, 2013). Από μελέτες διαπιστώθηκαν σημαντικές μεταβολές σε πρωτεΐνες που συνδέονται με την επιδιόρθωση του DNA, την απόκριση στο οξειδωτικό στρες, συμπεριλαμβανομένων των αυξημένων επιπέδων των εξωνουκλεασών ABC (UvrABC), πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA και των πρωτεϊνών DnaK (Payne *et al.*, 2013). Επιπροσθέτως διάφορα πειράματα έδειξαν ότι η έκθεση σε χολή ρυθμίζει πολλούς παράγοντες λοιμοτοξικότητας στο βακτήριο *L. monocytogenes* και ότι μπορεί να λειτουργήσει και η ίδια ως ένα ειδικό σήμα κατά τη διάρκεια της γαστρεντερικής διέλευσης του παθογόνου (Quillin *et al.*, 2011), συγκεκριμένα εξακριβώθηκε ένας ρυθμιστής (τύπου TetR) [μετονομάστηκε σε μεταγραφικό παράγοντα A (BrtA)], που ανιχνεύει τη χολή (ιδίως το χολικό οξύ) και ρυθμίζει την έκφραση των MdrM και MDRT (αντλίες εκροής χολής και σημαντικοί παράγοντες που μεσολαβούν στον αποικισμό του ήπατος και της χοληδόχου κύστης) (Quillin *et al.*, 2011). Εύρημα ιδιαίτερα σημαντικό, δεδομένου του ευρύτερου ρόλου των παραγόντων MdrM / Tin στη επαγωγή της έκκρισης του δικυκλικού-AMP (σηματοδοτικό μόριο για την παραγωγή της ιντερφερόνης-βήτα και σημαντικός παράγοντας για επιβίωση του παθογόνου *in vivo* (Crimmins *et al.*, 2008, Woodward *et al.*, 2010, Schwartz *et al.*, 2012, Burdette and Vance, 2013). Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη χολή από τα εντερικά παθογόνα είναι απαραίτητη για την ικανότητά τους να αποικίζουν τον ξενιστή. Η λειτουργία του συστήματος BilE είναι απαραίτητη για την ανθεκτικότητα και την επιβίωση του βακτηρίου *L. monocytogenes* σε συνθήκες καταπόνησης από την χολή. Τα γονίδια *bilEA* και *bilEB* αποτελούν μέρος ενός οπερονίου και κωδικοποιούν τα εμπλεκόμενα σ' αυτό το σύστημα στοιχεία. Ο τρόπος δράσης του συστήματος BilE επικεντρώνεται στη μεταφορά της χολής έξω από το κύτταρο (Sleator *et al.*, 2005), αφού σε στέλεχος με αδρανοποιημένο το οπερόνιο που κωδικοποιεί το σύστημα παρατηρήθηκε συσσώρευση της χολής ενδοκυτταρικά. Εκτός από τους μηχανισμούς απομάκρυνσης χολής, πολλά βακτήρια έχουν επίσης μηχανισμούς τροποποίησης χολής. Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, διαθέτει ένα ένζυμο (BSH) που επάγει την υδρόλυση των χολικών αλάτων και που κατά την διάρκεια της ανάπτυξης στο έντερο ρυθμίζεται από το μεταγραφικό εκκινητή PrfA (Dussurget *et al.*, 2002), τον παράγοντα σ^B (Sue *et al.*, 2003), που εμφανίζεται να διαδραματίζει έναν πιο σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του πρώτου (Begley *et al.*, 2005), και από την

αλληλεπίδραση του παθογόνου με τους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος (Archambaud *et al.*, 2012). Ωστόσο πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι το ένζυμο BSH και ο παράγοντας σ^B δεν είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στην χοληδόχο κύστη ποντικών (Dowd *et al.*, 2011), όπου το παθογόνο, αντίθετα, στηρίζεται στην έκφραση οδών που απαιτούνται για την απόκτηση των θρεπτικών συστατικών ή σύνθεση μονομερών βιομορίων (Dowd *et al.*, 2011; Faith *et al.*, 2012). Αντίθετα, όταν το pH της χολής είναι μειωμένο (όπως συμβαίνει στο δωδεκαδάκτυλο), η τοξικότητα των χολικών οξέων αυξάνεται (Begley *et al.*, 2005a) και το παθογόνο βακτήριο απαιτεί το ένζυμο BSH, το σύστημα (BilE) (σύστημα πρωτεΐνης αποκλεισμού της χολής) (Sleator *et al.*, 2005) και άλλους δυνητικά σ^B -ρυθμιζόμενους μηχανισμούς, όπως το ένζυμο PVA, που φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού στη χολή χωρίς, ωστόσο, να επηρεάζει την υδρόλυση των χολικών αλάτων (Dowd *et al.*, 2011).



Εικόνα 16: Γονίδια εξαρτώμενα από τον παράγοντα σ^B που απαιτούνται για την επιβίωση και τον αποικισμό του ξενιστή από το τροφιμογενές παθογόνο *L. monocytogenes*. Τα κύτταρα του βακτηρίου *L. monocytogenes* προσλαμβάνονται μαζί με τα μολυσμένα τρόφιμα και μετά το πέρασμα μέσω του οισοφάγου εισέρχονται στο στομάχι, όπου τα γονίδια *gadD2*, *gadT2* παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση σε όξινες συνθήκες (Cotter *et al.*, 2001a). Στο δωδεκαδάκτυλο, ο συνδυασμός της υψηλής οσμωτικής πίεσης και της χολής, οδηγεί στην ενεργοποίηση του γονιδίου *opuCA*, *bsh* (Sue *et al.*, 2004), και του *bilE* (Sleator *et al.*, 2005), ενώ στη χοληδόχο κύστη του *bsh* (Sue *et al.*, 2004), του *bilE*

(Sleator *et al.*, 2005) και του *pnA* (Begley *et al.*, 2005), όλα γονίδια σημαντικά για την επιβίωση του βακτηρίου. Όταν τα κύτταρα είναι στο λεπτό έντερο τα γονίδια που ενεργοποιούνται είναι τα *oruCA*, *sbh* (Sue *et al.*, 2004), *bilE* (Sleator *et al.*, 2005), και, τέλος, τα γονίδια *inlA* και *inlB* (Lecuit *et al.*, 2004), τα οποία βοηθούν την βακτηριακή είσοδο στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Ο ρόλος του μεταγραφικού ενεργοποιητή (PtfA) των γονιδίων παθογένειας, φαίνεται να είναι σε μεγάλο βαθμό επουσιώδης για την επιβίωση του μικροοργανισμού εντός του γαστρεντερικού σωλήνα (Faith *et al.*, 2005).

3.3 Σκοπός και αντικείμενο μεταπτυχιακής μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός της έκφρασης γονιδίων παθογένειας στελεχών του τροφιμογενούς παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε συνθήκες καταπόνησης, έπειτα από έκθεση του στελέχους **R.9.1** σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα. Για τη διενέργεια της μελέτης χρησιμοποιήθηκε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό από 15 ασθενείς, που προσήλθαν για ενδοσκοπικό έλεγχο του ανώτερου πεπτικού στην Ηπατογαστρεντερολογική Μονάδα της Β' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και Μονάδας Έρευνας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ». Η λήψη των δειγμάτων γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού υγρού έγινε κατά τη διάρκεια προγραμματισμένης γαστροσκόπησης μία φορά εβδομαδιαίως. Στο πρώτο πειραματικό σκέλος μελετήθηκαν οι μεταβολές του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέσω των κλασικών μικροβιολογικών τεχνικών στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Υπεύθυνος Αν. Καθ. Ε. Χ. Δροσινός), ενώ στο δεύτερο σκέλος εξετάστηκε η έκφραση γονιδίων, που σχετίζονται με την παθογόνο δράση του μικροοργανισμού, με την εφαρμογή της μεθόδου Real Time PCR. Τέλος, κατάλληλες στατιστικές προσεγγίσεις χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Αναλώσιμα υλικά

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας και τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε μια πληθώρα υλικών εκ των οποίων ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια αλλά και τυποποιημένα σκευάσματα θρεπτικών υποστρωμάτων.

4.1.1 Θρεπτικά υποστρώματα

Ως θρεπτικά υλικά σε όλη την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν το στερεό σε μορφή σκόνης υπόστρωμα Brain Heart Infusion (BHI) Broth (LAB 049) και το στερεό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα, που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και καταμέτρηση των στελεχών της *Listeria spp.*, PALCAM *Listeria* agar (Polymyxin Acriflavine Lithium Chloride Ceftazidime Mannitol) που περιέχει το αντιβιοτικό Polymyxin B (LAB 148). Από την άλλη μεριά τα θρεπτικά συστατικά που κατά περιπτώσεις χρησιμοποιούνταν ήταν το γενικό θρεπτικό υπόστρωμα BHI Brain Heart Infusion Agar (LAB 048) και το εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα ALOA (OXOID CM 1084 CHROMOGENIC LISTERIA AGAR (ISO) BASE).

Η αρχή της μεθόδου ανίχνευσης για τα κοινά εκλεκτικά υποστρώματα, όπως είναι το PAMCAM, βασίζεται στην ικανότητα υδρόλυσης της αισκουλίνης από το σύνολο των ειδών *Listeria*, καθιστώντας δύσκολο τον διαχωρισμό του παθογόνου *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα *Listeria spp.* λόγω των παρόμοιων μορφολογικών χαρακτήρων που παρουσιάζουν οι αποικίες σε αυτά τα υποστρώματα, ενώ τα χρωμογόνα υποστρώματα, όπως είναι το ALOA επιτρέπει τη διάκριση του *L. monocytogenes*, αξιοποιώντας τις χρωματικές αλλαγές που προκαλούνται τόσο στο θρεπτικό υλικό όσο και στις σχηματιζόμενες αποικίες, εξαιτίας της ενεργότητας του ενζύμου β-γλυκοζιδάση που διασπά ένα χρωμογόνο συστατικό που περιέχεται στο υπόστρωμα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός γαλαζοπράσινου χρωματισμού για τις αποικίες. Επιπλέον, η παρουσία λεκιθίνης στο υπόστρωμα συνεισφέρει στη διάκριση της *L. monocytogenes* μέσω της δημιουργίας μίας άλω (halo) γύρω από την αποικία, η οποία προκύπτει ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης της λεκιθίνης από τη φωσφολιπάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης. Εν κατακλείδι σε κάθε περίπτωση εμφάνιση στο ALOA χαρακτηριστικής γαλαζοπράσινης αποικίας με άλω κρίνεται σκόπιμη η θεώρηση της αποικίας ως *L. monocytogenes* (Hitchins & Jinnerman, 2011). Ως εκ τούτου κατά την πρώτη ανανέωση του στελέχους του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* R.9.1 αποικίες του, που είχαν ενοφθαλμιστεί σε 5ml θρεπτικού υγρού BHI με παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 30% του συνολικού όγκου (αποθηκευμένες στη κατάψυξη στους -22°C), απομονώθηκαν με αποστειρωμένο μικροβιακό κρίκο και ακολούθησε γραμμωτή ράβδωση σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό ALOA και επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 24 h. Οι αποικίες που προέκυψαν στο θρεπτικό υλικό είχαν την παραπάνω χαρακτηριστική εμφάνιση με αποτέλεσμα την επιβεβαίωση της παρουσίας *L. monocytogenes*.

Η σύσταση των χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υποστρωμάτων παρουσιάζεται στο **Παράρτημα I**. Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της αντίστοιχης προμηθευτικής εταιρείας, με προσθήκη αποιονισμένου νερού και ακόλουθη θερμική μεταχείριση (αποστείρωση) του υλικού. Μετά την παρασκευή τους, τα χρησιμοποιούμενα υδατικά διαλύματα και όλα τα θρεπτικά υποστρώματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκιερό μέρος, όπως συνιστάται από τις προμηθευτικές εταιρείες.

4.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Η εργαστηριακή υποδομή που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας περιελάμβανε τα σκεύη, όργανα και συσκευές που αναφέρονται παρακάτω:

A) Σκεύη:

1. γυάλινες φιάλες duran
2. γυάλινα φιαλίδια universal
3. δοκιμαστικοί σωλήνες
4. λύχνος Bunsen
5. μαγνήτες αναδέυσεως (διαφόρων μεγεθών)
6. μικροβιολογικός κρίκος
7. ογκομετρικοί κύλινδροι
8. πλαστικοί περιέκτες erpendorf (χωρητικότητας 1,5 ml)
9. πλαστικοί περιέκτες falcon (χωρητικότητας 15 ml)
10. ποτήρια ζέσεως
11. ρύγχι (tips) των 1 μl (=0,001 ml), 100 μl (=0,1 ml) και 1000 μl (=1 ml) για τις πιπέτες μεταβλητού όγκου
12. στατό δοκιμαστικών σωλήνων
13. τρυβλία Petri (Sarstedt)
14. παγοκύστεις-ψυγείακι

B) Συσκευές και όργανα: Όπως αναφέρονται στον κατωτέρω Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Χρησιμοποιηθέντα όργανα ή συσκευές

A/A	Όργανο ή συσκευή	Μοντέλο	Εταιρεία
1.	Αναλυτικοί ζυγοί	Mark (0,01 g) BP 3105 (0,001 g)	BEL ENGINEERING Sartorius
2.	Επωαστικοί θάλαμοι	BE 500	Memmert
3.	Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής	NU-425-400E	NuAire
4.	Κλίβανος αποστείρωσης	OT 4060	nüve
5.	Πεχάμετρο	pH 526	WTW
6.	Πιπέτες μεταβλητού όγκου	Labopette (20-200 μl) (100-1000μl)	HIRSCHMANN LABORGERÄTE
7.	Συσκευή ανάμιξης	K-550-GE	Vortex-GENIE
8.	Συσκευή ανάδευσης με θέρμανση	ARE	VELP Scientifica
9.	Συσκευή υπερήχων	UP50H	hielscher
10.	Φυγόκεντροι	Mini Spin Eppendorf Thermo scientific Heraeus Fresco 21 centrifuge Labofuge 200 Heraeus SEPATECH	Milian Heraeus instruments
11.	Φωτόμετρο	NanoPhotomer TM	IMPLEN
12.	Συσκευή αυτόματου θερμικού κυκλοποιητή	ProFlex PCR System	Applied Biosystems by Life Technologies
13.	Συσκευή θερμοκυκλοποιητή των αντιδράσεων της RT PCR	StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems

4.3 Μικροβιακό στέλεχος

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συμπεριφορά του τροφιμογενούς παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* υπό συγκεκριμένες συνθήκες καταπόνησης. Το μελετηθέν στέλεχος *L. monocytogenes* R.9.1 προέρχεται από συλλογή απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών που διατηρεί το Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων. Το στέλεχος συντηρείται στους -22°C σε Nutrient broth, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 30% του συνολικού όγκου, για προστασία των κυττάρων από τη χαμηλή θερμοκρασία διατήρησης.

4.4 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε και οι μικροβιακοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν – σε κάθε περίπτωση υπό ασηπτικές συνθήκες – παρουσιάζονται παρακάτω, ενώ για λόγους καθαρά επαναληψιμότητας πραγματοποιείται πάντα διπλή επανάληψη του όλου πειράματος.

4.4.1 Μικροβιολογικές τεχνικές ανάλυσης

A) Ανανέωση του στελέχους του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* R.9.1

Πρόκειται για το στάδιο εκείνο το οποίο μεσολαβεί πριν από τον εμβολιασμό των δειγμάτων γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού υγρού με τον παθογόνο μικροοργανισμό, προκειμένου οι καλλιέργειες του στελέχους να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους και να καταστούν άμεσα έτοιμες για ανάπτυξη. Πριν τον εμβολιασμό γίνονται πάντα δύο ανανεώσεις προς επίτευξη των καλύτερων δυνατών αποτελεσμάτων από πλευράς ζωτικότητας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση αποικίες του στελέχους *L. monocytogenes* R.9.1 που είχαν ενοφθαλμιστεί σε 5ml θρεπτικού υγρού BHI με παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 30% του συνολικού όγκου (αποθηκευμένες στη κατάψυξη στους -22°C) απομονώνονταν με αποστειρωμένο μικροβιακό κρίκο και ακολουθούσε γραμμωτή ράβδωση σε μη επιλεκτικό θρεπτικό υλικό BHI Brain Heart Infusion Agar και επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 24 h. Εν συνεχεία γινόταν εισαγωγή ποσότητας από τις καλλιέργειες αποικιών, που απομονώνονταν από την επιφάνεια των ενοφθαλμισμένων με βακτηριολογικό κρίκο (streaking) γενικών θρεπτικών υποστρωμάτων BHI Brain Heart Infusion Agar, σε πλαστικούς περιέκτες falcon (χωρητικότητας 15 ml) που περιείχαν περίπου 5 ml BHI broth και ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 16 - 18 ώρες (overnight culture). Επιπροσθέτως κατά την διάρκεια του πρώτου εμβολιασμού του μικροοργανισμού σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα και εμβολιασμός σε BHI broth (αντί για γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό προστέθηκε θρεπτικό υλικό BHI) ακολουθώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία (περιγράφεται παρακάτω) που έγινε στο κανονικό πείραμα. Η καταμέτρηση των αποικιών που προέκυψαν μετά την επώαση στο BHI broth οδήγησε στην επιβεβαίωση του αρχικού πληθυσμιακού αριθμού του στελέχους στα $9 \log \text{cfu/mL}$.

B) Συλλογή γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού υγρού

Η λήψη των δειγμάτων γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού υγρού έγινε στην Ηπατογαστρεντερολογική Μονάδα της Β' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και Μονάδας Έρευνας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ». (Υπεύθυνος Επικ. Καθ. Κ. Τριανταφύλλου). Η συλλογή έγινε, κατόπιν έγγραφης συγκατάθεσης μετά από ενημέρωση, από νηστικούς από δώρου ασθενείς, που προσήλθαν για ενδοσκοπικό έλεγχο του ανώτερου πεπτικού λόγω δυσπεψίας.

Εξαιρέθηκαν ασθενείς με πρόσφατο ιστορικό λήψης αντιβιοτικών (3 μήνες) καθώς και πρόσφατο επεισόδιο αιμορραγίας πεπτικού (1 μήνας). Με το πέρας της διαγνωστικής ενδοσκόπησης αναρροφήθηκαν, σε αποστειρωμένο δοχείο, ~2cc δωδεκαδακτυλικού υγρού και στη συνέχεια, σε έτερο αποστειρωμένο δοχείο, ~15-20cc γαστρικού υγρού. Αμφότερα τα δοχεία διατηρήθηκαν υπό ψύξη (4°C) και μεταφέρθηκαν άμεσα στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Υπεύθυνος Αν. Καθ. Ε. Χ. Δροσινός) για την περαιτέρω διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας. Το pH του κάθε δείγματος μετρήθηκε πριν την έναρξη της μικροβιολογικής ανάλυσης, σύμφωνα με τη σχετική μέθοδο αναφοράς του Διεθνή Οργανισμού Τυποποίησης (International Organization for Standardization, ISO) (ISO, 1999), με χρήση ψηφιακού πεχάμετρου (WTW, pH 526, Weilheim, Γερμανία).

Γ) Εμβολιασμός

1. Έπειτα από 16 ώρες επώασης, οι καλλιέργειες του στελέχους *L. monocytogenes* R.9.1 φυγοκεντρήθηκαν στις 3600 rpm στροφές για 10 min
2. Ξεπλύθηκαν με ισοτονικό διάλυμα Ringer
3. Επαναιωρήθηκαν μετά από προσθήκη ίσης ποσότητας ισοτονικού διαλύματος Ringer (στη συγκεκριμένη περίπτωση οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 4,5-6 ml) με τον αρχικό όγκο του BHI broth που περιείχαν οι πλαστικοί περιέκτες falcon για την επίτευξη πληθυσμιακού αριθμού του στελέχους στα 9 log cfu/mL.
4. Φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 rpm στροφές για 10 min σωλήνες erpendorf του 1 ml με καπάκι, στους οποίους πρώτα τοποθετήθηκαν ποσότητες επαναιωρήματος του 1ml, απορρίφθηκαν τα υπερκείμενα υγρά και στα ίζηματα που σχηματίστηκαν σε κάθε σωληνάκι erpendorf, εισήχθησαν ποσότητες γαστρικού υγρού του 1 ml.
5. Ποσότητες εμβολιασμένου γαστρικού υγρού (ομογενοποιημένο δείγμα) ίσες κάθε φορά με 0,1 ml (περίπου 1% του τελικού όγκου), ελήφθησαν από τους σωλήνες erpendorf αμέσως (Στάδιο 1) μετά την εισαγωγή του γαστρικού υγρού, και μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, έκαστος των οποίων περιείχε 9 ml Buffered Peptone Water. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα Buffered Peptone Water για την επίτευξη της επιθυμητής αραιώσης, τον ενοφθαλμισμό των θρεπτικών υποστρωμάτων και την αρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού (ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΑΡΑΚΑΤΩ).
6. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η δεύτερη δειγματοληψία (Στάδιο 2) για την αρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού στα εμβολιασμένα δείγματα γαστρικού υγρού, αφού προηγήθηκε επώαση στους 37°C για 100 min. Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (12,000 x g, 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου). Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε υγρό δωδεκαδακτύλου (ποσότητες που κυμάνθηκαν σε τιμές από 0,3-0,5ml), ακολούθησε η τρίτη δειγματοληψία (Στάδιο 3) για την αρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού στα εμβολιασμένα δείγματα δωδεκαδακτυλικού υγρού, ενώ τα υπόλοιπα εμβολιασμένα δείγματα επώασθηκαν στους 37°C για 120 min. Με το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε η τέταρτη και τελευταία δειγματοληψία (Στάδιο 4).

Δ) Μικροβιολογική επεξεργασία δείγματος-Διαδοχικές αραιώσεις

Καταμετρήθηκαν σε όλα τα δείγματα οι μικροβιακοί πληθυσμοί με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και της επίστρωσης σε εκλεκτικά υποστρώματα (PALCAM *Listeria* agar (LAB 148)).

Ως κατάλληλο μέσο για την πραγματοποίηση των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων επιλέχθηκε το διάλυμα Buffered Peptone Water (ISO) (LAB 204), 9 mL του οποίου έχουν μοιρασθεί σε γυάλινα φιαλίδια Universal με τη χρήση διανομέα. Με τη βοήθεια πιπέττας των 20-200μL, μεταφέρθηκαν ασηπτικά 0,1 ml από το ομογενοποιημένο δείγμα στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα (αραίωση -2). Ακολούθησε ανάδευση με περιστροφικό αναδευτήρα προκειμένου να επιτευχθεί επαρκή διασπορά. Ακολούθως μεταφέρθηκε ασηπτικά 1 ml από τον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα (αραίωση -2) στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα (αραίωση -3). Με τον ίδιο τρόπο ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία και με τους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες έως την αραιώση -6. Στη συνέχεια ακολούθησε ο ενοφθαλμισμός του βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό υπόστρωμα με την ποσοτική τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης (spread plate technique). Μεταφέρθηκε, στο κέντρο του τρυβλίου (η βάση του εκάστοτε τρυβλίου επισημάνθηκε με τους συντελεστές αραιώσης με τους οποίους είχε ενοφθαλμιστεί το θρεπτικό υπόστρωμα, όπως επίσης με τη φάση της δειγματοληψίας (Στάδιο 1 ή 2 ή 3 ή 4) και με την αρίθμηση της επανάληψης) με το στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό, 100μL βακτηριακού εναιωρήματος από τους δοκιμαστικούς σωλήνες με την αντίστοιχη αναγραφόμενη αραιώση (συγκεκριμένα αραιώση -2,-4,-6). Με μικροβιολογική κεκαμένη τριγωνική ράβδο και με σειρά επίστρωσης από τη μεγαλύτερη προς τη μικρότερη αραιώση εξapλώθηκε το βακτηριακό εναιώρημα σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με κυκλικές κινήσεις. Έπειτα τα τρυβλία αναποδογυρίστηκαν και τοποθετήθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 24 h ώστε να εξασφαλιστεί η βέλτιστη μικροβιακή αύξηση.

Μετά από το τέλος της κάθε δειγματοληψίας, τα ομογενοποιημένα δείγματα που περιέχονταν στους σωλήνες erpendorf (εμβολιασμένα δείγματα γαστρικών και δωδεκαδακτυλικών υγρών), φυγοκεντρήθηκαν (12,000 x g για 2 min, σε θερμοκρασία δωματίου), τα ιζήματά τους επαναιωρήθηκαν, ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα 200 μl RNA Later και τελικά τοποθετήθηκαν απευθείας στους -22°C για βραχυχρόνια αποθήκευση πριν την απομόνωση του ολικού RNA της ληφθείσας βιομάζας.

Ε) Καταμέτρηση των βακτηριακών πληθυσμών

Μετά την επώαση ακολούθησε η καταμέτρηση των αποικιών (colony count), που σχηματίζονται στο ενοφθαλμισμένο στερεό θρεπτικό υλικό, και πραγματοποιήθηκε ανά τρυβλίο με γυμνό μάτι και με τη χρήση εργαστηριακού οργάνου μέτρησης αποικιών. Για τον υπολογισμό των μικροβιακών πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των αριθμήσεων των δύο επαναλήψεων, επιλέγοντας την περισσότερο αξιόπιστη εκ των τριών αραιώσεων (αραίωση -2,-4,-6). Η αρίθμηση προέκυπτε λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των αποικιών σε κάθε τρυβλίο της αραιώσης, ο οποίος έπρεπε να κυμαίνεται μεταξύ 30 έως 300 αποικίες και εάν πρόκυπτε μεγάλος αριθμός αποικιών στα τρυβλία η καταμέτρηση γινόταν μετά από διαίρεση του τρυβλίου σε τομείς, ώστε να πραγματοποιηθεί προσέγγιση στο πλησιέστερο δυνατό ακριβές πλήθος των αποικιών.

4.4.2 Μοριακές τεχνικές ανάλυσης

A) Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA) Από την απομόνωση του RNA στο εργαστήριο το 90-95% είναι δομικό, ενώ το 5-10% είναι mRNA. Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time two step RT PCR) βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό του mRNA του γονιδίου. Συχνή είναι η διαφωνία για το αν θα πρέπει να χρησιμοποιείται το mRNA ή το ολικό RNA στις μελέτες αυτές (Burchill *et al.*, 1999). Συνιστάται όμως να προτιμάται το ολικό RNA γιατί, για την απομόνωση του mRNA απαιτείται ένα επιπλέον βήμα με το οποίο μπορεί να υπάρχουν απώλειες, διότι όλα τα μόρια mRNA δεν είναι πολυαδενυλιωμένα (στα ευκαρυωτικά κύτταρα) και η συγκέντρωσή του τελικού δείγματος σε κεκαθαμένο mRNA μπορεί να μην επαρκεί για να γίνουν οι αντιδράσεις με αξιοπιστία (Bustin *et al.*, 2004). Στην παρούσα εργασία έγινε απομόνωση ολικού RNA (Total RNA isolation) με τη χρήση του εμπορικού σκευάσματος Nucleospin® RNA, DNA, RNA and protein purification Kit της εταιρίας Macherey – Nagel, Γερμανίας. Τα βήματα για την απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

ΒΗΜΑ 1 ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα αρχικά βρίσκονταν σε κατάψυξη (-22°C), αφού παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, ακολούθησε φυγοκέντρωσή τους στις 13.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C, απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος και τελικά σχηματισμός του ιζήματος που περιέχει το RNA στους σωλήνες eppendorf.

ΒΗΜΑ 2 ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

- Ακολούθως έγινε προσθήκη 350μl Buffer RA1 και 3.5μl β-μερκαπτεθανόλης σε κάθε σωλήνα eppendorf και ήπια ανάδευση (Vortex) για 3-4 δευτερόλεπτα για το σχηματισμό ομογενοποιημένου μίγματος. Για την πρόσληψη των ενδοκυτταρικών προϊόντων από το εσωτερικό των μικροοργανισμών στην παρούσα μελέτη έγινε με χρήση μηχανικής μεθόδου (υπέρηχοι (25 W x 2.5 min) λύση των κυττάρων που προκαλείται εξαιτίας της αποδιάταξης του κυτταρικού περιβλήματος, το οποίο αποδιοργανώνεται χωρίς την παρουσία πρόσθετων χημικών ή άλλων παραγόντων, οι οποίοι δύνανται να επηρεάσουν στη συνέχεια το αποτέλεσμα της πειραματικής διαδικασίας. Οι υπέρηχοι αποτελούν ήχους υψηλής συχνότητας παραγόμενους ηλεκτρονικά, οι οποίοι μεταφέρονται μέσω ενός μεταλλικού ρύγχους στο κυτταρικό εναιώρημα με την προαναφερθείσα συγκέντρωση και δημιουργούν κοιλότητες. Λόγω ανάπτυξης υψηλών θερμοκρασιών, ικανών να προκαλέσουν ανεπιθύμητες αλλοιώσεις στα ριβονουκλεϊκά οξέα, η όλη διαδικασία διεξήχθη υπό ψύξη με μεταλλικό ρύγχος, με ενδιάμεσες διακοπές.

ΒΗΜΑ 3 ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΑ ΤΟΥ ΛΥΜΑΤΟΣ

- Μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, τα εναιωρήματα εντός των διαλυμάτων των δειγμάτων μεταφέρθηκαν σε νέα φιαλίδια με ειδικό φίλτρο, ούτως ώστε να μειωθεί το ιξώδες και να διαχωριστούν κυτταρικά υπολείμματα και τμήματα του κυτταρικού τοιχώματος από το υπόλοιπο διάλυμα, το οποίο περιέχει τα ριβονουκλεϊκά οξέα που απελευθερώθηκαν από το εσωτερικό του κυττάρου. Ακολούθησε φυγοκέντρωσή τους στις 11.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό.

ΒΗΜΑ 4 ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ RNA

- Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση, η υπερκείμενη υδατική φάση από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο τύπου erpendorf, ακολούθησε προσθήκη 350 μ L αιθανόλης (70%) και ομογενοποίηση του μίγματος με ήπια μηχανική ανάδευση (pipetting up and down 5 times).

ΒΗΜΑ 5 ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΟΥ RNA

- Ακολούθησε μεταφορά 600 μ L ομογενοποιημένου δείγματος στην παρεχόμενη στήλη Nucleospin® RNA Column (light blue ring), η οποία είχε τοποθετηθεί σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf τελικού όγκου 2 mL. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση στις 11.000 x g για 30 sec, σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του διηθήματος. Στη συνέχεια έγινε επανάληψη του προηγούμενου βήματος με το υπόλοιπο του δείγματος και τοποθέτηση της στήλης σε νέο erpendorf τελικού όγκου 2 mL.

ΒΗΜΑ 6 ΑΦΑΛΑΤΩΣΗ ΤΗΣ MEMBRANΗΣ

- Προστέθηκαν 350 μ L διαλύματος MDB (Membrane Desalting Buffer) στη στήλη και φυγοκεντρήθηκαν στις 11.000 x g για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου, και ακολούθησε απόρριψη του διηθήματος και επανάληψη της φυγοκέντρησης στις 11.000 x g για 30 sec.

ΒΗΜΑ 7 ΠΕΨΗ ΤΟΥ DNA

- Προστέθηκαν 10 μ L διαλύματος rDNάσης και 90 μ L διαλύματος RBD (Reaction Buffer for rDNase) σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf και ακολούθησε ήπια ανάμιξη. Προστέθηκαν 95 μ L από το παραπάνω μίγμα στο κέντρο της μεμβράνης πυριτίου της στήλης. Πραγματοποιήθηκε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.

ΒΗΜΑ 8 ΕΚΠΛΥΣΗ ΚΑΙ ΞΗΡΑΝΣΗ ΤΗΣ MEMBRANΗΣ

- Προστέθηκαν 250 μ L διαλύματος RAW2 (αδρανοποίηση της rDNάσης) στη στήλη. Έγινε φυγοκέντρηση στις 11.000 x g για 30sec, σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε τοποθέτηση της στήλης σε νέο erpendorf τελικού όγκου 2 mL. Προστέθηκαν 600 μ L διαλύματος RA3 στη στήλη. Φυγοκεντρήθηκαν στις 8.000x g για 30 sec, σε θερμοκρασία δωματίου και έγινε απόρριψη του διηθήματος. Προστέθηκαν 250 μ L διαλύματος RA3 στη στήλη. Φυγοκεντρήθηκαν στις 11.000x g για 2 min, σε θερμοκρασία δωματίου για την πλήρη ξήρανση της μεμβράνης και μεταφέρθηκε η στήλη του ιοντοανταλλάκτη, σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf των 1.5 mL.

ΒΗΜΑ 9 ΕΚΛΟΥΣΗ RNA

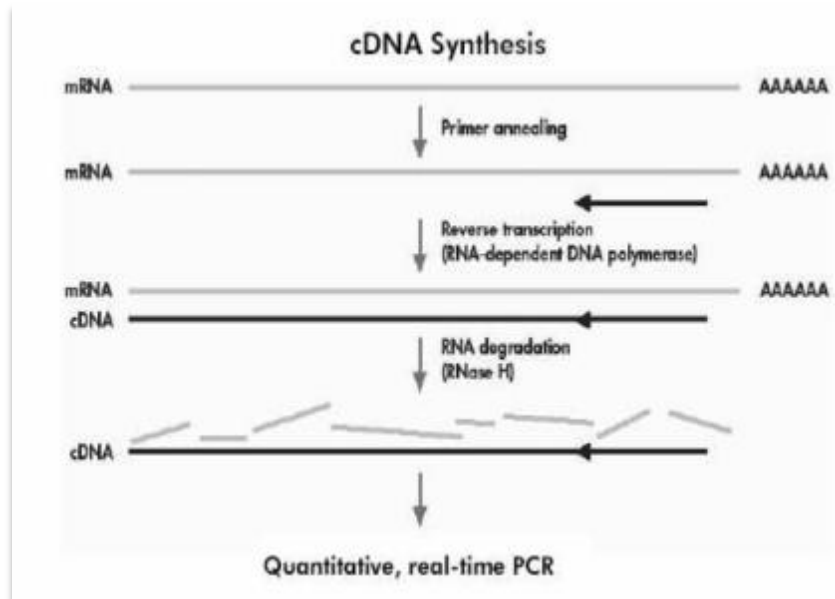
- Προστέθηκαν 60 μ L RNase free water (νερό ελεύθερο από RNάσες). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11.000x g για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να αποκτηθεί, καθαρό πλέον, το ολικό RNA, το οποίο εκλύεται από τη στήλη του ιοντοανταλλακτική. Τέλος τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -22°C για περαιτέρω χρήση.

B) Ποσοτικοποίηση και ποιοτικός έλεγχος του ριβονουκλεϊκού οξέος

Ο έλεγχος της συγκέντρωσης του RNA (ng/μl) και της καθαρότητάς του όσον αφορά την ποιοτική και ποσοτική ανάλυσή του, έγινε με τη χρήση της συσκευής IMPLEN NanoPhotometerTM σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ποιοτική ανάλυση ελέγχεται με το λόγο A260/A280. Λόγος A260/A280: Ως ένα κριτήριο για την αξιολόγηση του ποσοστού επιμόλυνσης του RNA μπορούμε να θεωρήσουμε την απορρόφηση των 2 πλευρικών της αλυσίδων αμινοξέων (όπως η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη) στην υπεριώδη (UV) ακτινοβολία στο μήκος κύματος 280 nm μέσω της φασματοφωτομέτρησης. Η μέτρηση αυτή μπορεί να ληφθεί ταυτόχρονα με ποσοτικοποίηση του RNA στο μήκος κύματος 260 nm. Ωστόσο η μέγιστη απορρόφηση των πρωτεϊνών είναι στα 280 nm. Στο πλήρες φάσμα όμως των UV απορροφήσεων έχουμε ακόμα μια σημαντική απορρόφηση στα 260 nm. Για το RNA ισχύει το αντίστροφο. Ο λόγος αυτός ουσιαστικά δείχνει την πρόσμιξη του μίγματος των νουκλεϊνικών οξέων σε πρωτεΐνες. Αν ο λόγος αυτός είναι μεταξύ 1,8-2, τότε το δείγμα RNA είναι καθαρό από τέτοιες προσμίξεις, η απομόνωση του θεωρείται επιτυχής και η ποσότητά του επαρκής (4-640 ng/μl). Ένα καθαρό δείγμα του RNA θα πρέπει να αποδώσει επίσης μια τιμή περίπου 2,0 ιδανικά ή να είναι τουλάχιστο μεγαλύτερη από 1,7. Αναφορικά με τις επιμέρους απορροφήσεις, όταν η λαμβανόμενη A260 ήταν μικρότερη της τιμής 0,010 (0,010-1,6), η ποσότητα RNA του δείγματος κρίνονταν ως ανεπαρκής, ενώ μεγάλες τιμές A280 υποδήλωναν την υψηλή περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη και ως εκ τούτου τον ατελή καθαρισμό του. Σε γενικές γραμμές η διαδικασία που ακολουθήθηκε μπορεί να περιγραφεί ως εξής: 4μl RNase free H₂O φωτομετρούνται στα 260 nm και το φωτόμετρο μηδενίζεται. Ακολουθεί φωτομέτρηση 4μl δείγματος με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UVVIS) στα 260 nm. Υπολογισμός του λόγου 260nm/ 280nm, με το οποίο εκτιμάται η καθαρότητα του απομονωθέντος RNA. Η τιμή πρέπει να είναι περίπου 2.

Γ) Αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription) –Σύνθεση cDNA

Η διαδικασία σύνθεσης cDNA από RNA ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή και καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) (**Εικόνα 17**). Το ένζυμο που απομονώνεται από ορισμένους RNA ιούς, χρησιμοποιεί το RNA ως υπόστρωμα για να συνθέσει μια αλυσίδα DNA (complementary DNA, cDNA). Παράγονται έτσι υβριδικά μόρια cDNA-RNA. Στη συνέχεια καταστρέφεται η αλυσίδα RNA και το γονίδιο-στόχος εντοπίζεται στη cDNA αλυσίδα και ενισχύεται με τη χρήση ειδικών εκκινητών και με τη δράση της DNA πολυμεράσης.



Εικόνα 17: Περιγραφή της μεθόδου σύνθεσης του cDNA με αντίστροφη μεταγραφή. Μετά την υβριδοποίηση των κατάλληλων εκκινητών, η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει συμπληρωματικό cDNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα mRNA. Επίσης, το RNA των RNA-cDNA υβριδίων υδρολύεται χωρίς να επηρεάζει το ελεύθερο RNA, οπότε στο τέλος της αντίδρασης υπάρχει μόνο μονόκλωνο cDNA.

Επομένως, με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (RT reaction) συντίθενται *in vitro* αλληλουχίες cDNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα μια αλυσίδα RNA. Το προϊόν της αντίστροφης μεταγραφής, cDNA, μπορεί να αποθηκευθεί για τον έλεγχο της έκφρασης πολλών γονιδίων εκφραζόμενων στο ίδιο δείγμα.

Υλικά

1. 10 mM μίγμα τριφωσφονουκλεοτιδίων (dNTPs)
2. Διάλυμα 50 ng/μL εξαμερών εκκινητών (random hexamer primers)
3. Διάλυμα DEPC 0.1%
4. Ρυθμιστικό διάλυμα 10x:
 - 200 mM Tris-HCl, pH 8.4
 - 500 mM KCl
5. 25 mM MgCl₂
6. 0.1 M DTT
7. Αντίστροφη μεταγραφάση: SuperScript™ II RT (50 U/μL)
8. RnaseOUT™, Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/μL)
9. *E.coli* Rnase H (2 U/μL)
10. Control RNA (50 ng/μL)
11. Control εκκινητής A (10 μM)
12. Control εκκινητής B (10 μM)

Για την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε το σύστημα SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA). Το σύστημα χρησιμοποιεί την αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT). Η σύνθεση του cDNA μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας διάφορα είδη εκκινητών, όπως εξαμερή ολιγονουκλεοτίδια (random hexamer primers), oligo-dT, ή ειδικούς για το γονίδιο εκκινητές (target specific primers). Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια εξαμερών (random hexamer primers), που είναι μη ειδικά μόρια, με ικανότητα να ενισχύουν το RNA σε όλο το

μήκος του, γι' αυτό και προκύπτει cDNA με την υψηλότερη απόδοση (Bustin *et al.*, 2004).

Στο σύστημα ανάστροφης μεταγραφής μπορεί να εισαχθεί αρχική ποσότητα RNA 1ng-5μg. Σε όλες τις αντιδράσεις της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκε 1 μg ολικού RNA, επιτυγχάνοντας έτσι την ομαλοποίηση (normalization) των αποτελεσμάτων ως προς το ολικό RNA και την αποφυγή υπέρ- ή υπό- έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου που οφείλεται στη λιγότερη ή περισσότερη ποσότητα RNA (ng/μL). Το αρχικό μίγμα αντίδρασης περιείχε 1 μg ολικού RNA, μίγμα τριφωσφονουκλεοτιδίων (dNTPs) 1 mM, 15 ng/μL εκκινητών (random hexamer primers) και διάλυμα DEPC-treated water H₂O όγκου 5 μL.

Το μίγμα RNA/εκκινητών υπέστη θερμική αποδιάταξη για 5 λεπτά στους 65⁰C και αμέσως τοποθετήθηκε σε πάγο (0⁰C) για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 9 μL από το μίγμα που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα RT 1x, MgCl₂ 5mM, DTT 0.01 M και 40 IU RnaseOUT™; Recombinant Ribonuclease Inhibitor. Το νέο μίγμα αντίδρασης παρέμεινε για 2 λεπτά στους 25⁰C και έπειτα προστέθηκαν 50 IU από την αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript™ II Reverse Transcriptase, το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση, και τα φιαλίδια παρέμειναν για άλλα 10 λεπτά στους 25⁰C. Ακολούθησε επώαση για 50 λεπτά στους 42⁰C και για 15λεπτά στους 70⁰C. Στη συνέχεια, αφού διατηρήθηκαν οι αντιδράσεις σε πάγο για 2 λεπτά, προστέθηκαν 2 IU RNase H και επώασθηκαν στους 37⁰C για 20 λεπτά. Η RNase H είναι το ένζυμο που πέπτει την αλυσίδα RNA από το δίκλωνο υβριδικό μόριο, ώστε να μείνει το μονόκλωνο cDNA. Στο τέλος της διαδικασίας γίνεται έλεγχος της συγκέντρωσης και ποιότητας του cDNA κάθε δείγματος με συσκευή φωτομέτρησης IMPLEN NanoPhotometer™ σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή στα 260 και 280 nm. Η ποιοτική ανάλυση ελέγχεται με το λόγο A260/A280. Σε αυτό το στάδιο τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους -20⁰C ή να ακολουθήσει PCR.

4) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

1. Χρήσιμοι όροι:

1) threshold: Το επίπεδο φθορισμού στο οποίο λαμβάνονται οι τιμές που χρησιμοποιούνται στους υπολογισμούς. Σε αυτό το επίπεδο γίνεται η ανάλυση των δεδομένων. Το threshold καθορίζεται αυτόματα ή από τον ερευνητή, στο επίπεδο όπου ο ρυθμός παραγωγής προϊόντος είναι ο υψηλότερος κατά την εκθετική φάση.

2) threshold cycle (Ct value): Ο αριθμός κύκλων στους οποίους το δείγμα φτάνει το επίπεδο φθορισμού που γίνονται οι υπολογισμοί.

3) slope: Είναι η κλίση της καμπύλης αναφοράς, έχει βέλτιστο εύρος τιμών $-3 < \text{slope} < -3.6$ και υπολογίζεται από τον τύπο $\text{slope} = -1/\log(1+E)$

4) efficiency (E): Η απόδοση της αντίδρασης αποτελεί σημαντικό δείκτη αξιοπιστίας και επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Επίσης, πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν και όταν γίνεται σύγκριση αποτελεσμάτων διαφορετικών αντιδράσεων. Στην περίπτωση αυτή, επιδιώκεται η επίτευξη παρεμφερών αποδόσεων, ώστε να μειώνονται κατά το δυνατό οι αποκλίσεις μεταξύ των αντιδράσεων.

5) CFU (Colony Forming Unit): Είναι ο αριθμός βιώσιμων βακτηριακών μονάδων, δηλαδή ο αριθμός βακτηρίων ικανών να σχηματίσουν μια αποικία. Δεδομένου ότι μια αποικία, θεωρητικά, προέρχεται από ένα κύτταρο, ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσονται σε ένα τρυβλίο αντιστοιχεί σε ίδιο αριθμό αρχικών βακτηριακών κυττάρων.

6) Fluorescence acquisition: Είναι η μέτρηση του φθορισμού των προϊόντων. Για να μειωθεί ο «θόρυβος» από την πιθανή παραγωγή μη ειδικών τμημάτων ή το

σηματισμό διμερών από τα μόρια των εκκινητών, τίθεται μια θερμοκρασία στην οποία η συσκευή μετράει το φθορισμό που εκπέμπουν τα προϊόντα. Η θερμοκρασία αυτή πρέπει να είναι υψηλότερη από το σημείο τήξης (T_m) των ανεπιθύμητων προϊόντων και χαμηλότερη από το T_m της αλληλουχίας στόχου.

2. Χημική βάση των μεθόδων ανίχνευσης των προϊόντων της Real Time PCR (Detection chemistries)

Όπως έχει προαναφερθεί τυπικά η αντίδραση PCR μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις χαρακτηριστικές φάσεις: η 1^η φάση είναι κρυμμένη κάτω από το «θόρυβο» του φθορισμού, η 2^η περιλαμβάνει την εκθετική ενίσχυση, η 3^η τη γραμμική ενίσχυση και απότομη αύξηση του φθορισμού, ενώ η 4^η φάση χαρακτηρίζεται από την εξασθένηση του ρυθμού της εκθετικής συσσώρευσης προϊόντος (Kainz *et al*, 2000). Η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος είναι ευθέως ανάλογη με την αρχική ποσότητα του στόχου στην αντίδραση μόνο κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης (Pfaffl, 2004). Συνεπώς, η φάση όπου βασίζεται η εφαρμογή της Real Time PCR είναι η έναρξη της 2^{ης} φάσης, δηλαδή της εκθετικής.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των παρεμβαλλόμενων φθορίζουσών χρωστικών διότι έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των υπολοίπων και γ'αυτό χρησιμοποιείται συχνότερα ερευνητικά. Είναι εύχρηστη, αφού μπορεί να προστεθεί απλά στο υπόλοιπο μίγμα της αντίδρασης. Επίσης, επιτρέπεται η ανάλυση με τήξη των προϊόντων μετά το τέλος της αντίδρασης, δηλαδή ανάλυση με χρήση της καμπύλης τήξης (melt curve analysis). Κατά τη διάρκεια της καμπύλης τήξης μετράται ο φθορισμός που εκπέμπεται, καθώς τα προϊόντα της αντίδρασης θερμαίνονται από θερμοκρασία χαμηλότερη του σημείου τήξης τους (T_m) μέχρι θερμοκρασία μεγαλύτερη του T_m τους και αποδιατάσσονται. Το θερμοκρασιακό εύρος το θέτει ο ερευνητής, ανάλογα με το σημείο τήξης των προϊόντων που προκύπτουν, και εξαρτάται από το μήκος και το περιεχόμενο των προϊόντων σε G/C. Οι κορυφές (peaks) που εμφανίζονται στην καμπύλη τήξης αντιστοιχούν στα προϊόντα που έχουν ενισχυθεί με την αντίδραση και είναι ανάλογες των ζωνών στην απλή ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Συνεπώς, η ανάλυση στο τέλος του πειράματος είναι σημαντική γιατί επιτρέπει την ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων.

Η μέθοδος μειονεκτεί ακριβώς επειδή δεν είναι ειδική και γ'αυτό μπορεί να προκύψουν μη ειδικά προϊόντα ή/και διμερή των εκκινητών, καθώς και στο ότι μπορεί να ενισχύσει σχετικά μικρό τμήμα αλληλουχίας (80-250 bp). Με τη χρήση όμως της καμπύλης τήξης, μπορεί σε μεγάλο βαθμό να γίνει διαφοροποίηση των προϊόντων στόχων από ο,τιδήποτε μη ειδικό, ελέγχοντας τις κορυφές, δηλαδή τα T_m που αντιστοιχούν σε κάθε προϊόν, το ύψος τους και τα C_t τους.

3. Βελτιστοποίηση συνθηκών της Real Time PCR

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι το μοντέλο StepOne Plus Real Time PCR της εταιρείας Applied Biosystems International.

Για ένα επιτυχημένο πείραμα Real Time PCR είναι απαραίτητη αρχικά η βελτιστοποίηση των συνθηκών οι οποίες διαφέρουν για κάθε αλληλουχία-στόχο, και εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της χρωστικής, των εκκινητών και του $MgCl_2$, τις θερμοκρασίες και τους χρόνους.

Η συγκέντρωση της χρωστικής είναι σημαντική, γιατί τα μόριά της ουσιαστικά επεμβαίνουν στην αντίδραση, αφού δεσμεύονται στο DNA. Έτσι, πολύ υψηλή συγκέντρωση SG μπορεί να προκαλέσει αναστολή της αντίδρασης, ενώ η πολύ χαμηλή συγκέντρωση μπορεί να μην επαρκεί για τη σήμανση των προϊόντων. Η

βέλτιστη συγκέντρωση της χρωστικής προσδιορίζεται με σειρά αντιδράσεων που περιέχουν διαφορετικές αραιώσεις της SG.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των εκκινητών χρησιμοποιούνται επίσης, διαδοχικές αραιώσεις και των δυο εκκινητών. Οι αποδεκτές συγκεντρώσεις των εκκινητών έχουν εύρος 50 nM – 400 nM. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν και η καμπύλη τήξης των προϊόντων και για τα δυο μόρια του ζεύγους των εκκινητών, στην οποία θα πρέπει να υπάρχει μόνο μια κορυφή.

Ακριβώς επειδή η σήμανση με τη χρωστική SYBR Green I είναι μη ειδική, υπάρχει κίνδυνος να προκύψουν μη ειδικά προϊόντα κατά την αντίδραση. Για την αποφυγή αυτής της πιθανότητας θα πρέπει να καθορισθεί η συγκέντρωση του MgCl₂, ώστε τελικά να ενισχύεται μόνο η επιθυμητή αλληλουχία. Το MgCl₂ επιδρά στην ενεργότητα της DNA πολυμεράσης και κατ'επέκταση και στην ειδικότητά της. Τα dNTPs και το δείγμα δεσμεύουν το μαγνήσιο με αποτέλεσμα να μειώνεται η ποσότητα του ελεύθερου μαγνησίου που απαιτείται για να δράσει το ένζυμο. Ετσι, υψηλή συγκέντρωση MgCl₂, που σημαίνει και υψηλή συγκέντρωση μη δεσμευμένου μαγνησίου, οδηγεί σε υψηλότερη ποσότητα προϊόντος, αλλά και μεγαλύτερο κίνδυνο να ενισχυθούν και μη ειδικά προϊόντα. Οι χρόνοι και οι θερμοκρασίες αναφέρονται στις συνθήκες ενίσχυσης και βέβαια είναι ειδικοί για κάθε αλληλουχία, αφού εξαρτώνται από το μήκος της, την περιεκτικότητα σε G/C και το είδος της. Στην περίπτωση αυτή δεν υπάρχει κάποιο βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας, αφού η κάθε αλληλουχία έχει διαφορετικό σημείο τήξης (T_m) ανάλογα με την G/C περιεκτικότητα, και χρειάζεται διαφορετικό χρόνο αποδιάταξης. Για παράδειγμα, το γονομικό DNA θεωρείται ότι χρειάζεται μεγαλύτερο χρόνο αποδιάταξης από το πλασμιδιακό και διαφορετικό χρόνο επιμήκυνσης, ανάλογα με το μήκος. Γενικά όμως συνιστάται η αποδιάταξη να γίνεται στους 95 °C και η επιμήκυνση στους 72 °C.

4. Ποσοτικοποίηση με Real-Time PCR (Quantitative Real-Time PCR, QRT-PCR)

Με την τεχνική της Real Time PCR υπάρχει η δυνατότητα όχι μόνο της παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, αλλά και του προσδιορισμού της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού δείγματος με χρήση καμπύλης ποσοτικοποίησης, ενώ η σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζει το ρυθμό έκφρασης σε σχέση με την παραγωγή mRNA του κυττάρου.

4.1 Σχετική ποσοτικοποίηση (Real-Time Relative QRT-PCR), εύρεση γονιδίου αναφοράς και αποδοτικότητας της μεθόδου

Με τη σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζονται οι αλλαγές των επιπέδων του mRNA ενός γονιδίου σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης ενός εσωτερικού γονιδίου αναφοράς. Συνεπώς δε χρειάζεται η κατασκευή καμπύλης ποσοτικοποίησης με δείγματα αναφοράς γνωστών συγκεντρώσεων, αφού όλα τα δείγματα εκφράζονται σαν λόγος ως προς το γονίδιο αναφοράς και εν συνεχεία συγκρίνονται οι λόγοι. Το γονίδιο αναφοράς συνήθως είναι ένα διατηρημένο (housekeeping) γονίδιο. Τα housekeeping γονίδια είναι παρόντα σε όλα τα γονιδιώματα, αφού είναι υπεύθυνα για ζωτικές για το κύτταρο λειτουργίες. Η σύνθεση mRNA αυτών των γονιδίων θεωρείται ότι παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από τις συνθήκες στις οποίες εκτίθεται το κύτταρο, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων κάτω από διάφορες συνθήκες. Κυρίως χρησιμοποιούνται το γονίδιο της β-ακτίνης, τα γονίδια των ριβοσωμικών υπομονάδων (18S και 28S rRNA για ευκαρυωτικά κύτταρα ή 16S και 23S rRNA για προκαρυωτικά κύτταρα), το GAPDH, το γονίδιο της β-2

μικροσφαιρίνης, της φωσφογλυκεροκινάσης, της β-γλυκουρονιδάσης, της ριβοσυλο-τρανσφεράσης της υποξανθίνης, και άλλα.

Στην εργασία αυτή, η επιλογή του γονιδίου αναφοράς έγινε βάσει ενός στατιστικού προγράμματος. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται NormFinder. Έπειτα από στατιστική επεξεργασία, αποδείχθηκε ότι κατάλληλο γονίδιο αναφοράς είναι το γονίδιο *IGS*, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό έκφρασης και σταθερότητας και έχει χρησιμοποιηθεί και παλαιότερα για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Το μέγεθος του ενισχυμένου τμήματος του γονιδίου αναφοράς (135 bp) επιλέχθηκε ώστε να βρίσκεται στα βέλτιστα όρια της αντίδρασης με SYBR® Green I (60-400 bp), για να προκύψουν αποτελέσματα διαφορετικής απόδοσης (Efficiency). Η διαφορά στις αποδόσεις έχει σημασία στο να γίνει η εκτίμηση των μαθηματικών μοντέλων, καθώς η απόδοση είναι ο κύριος παράγων που διαφοροποιεί τα δυο μαθηματικά συστήματα.

Στην εργασία αυτή, για την αντίδραση της Real Time PCR μετρήθηκαν συνολικά 3 γονίδια housekeeping (*16S*, *rpoB*, *IGS*) και μελετήθηκαν 10 γονίδια παθογένειας. Πριν την διεξαγωγή της Real-Time PCR προηγήθηκε η εύρεση της αποδοτικότητας της μεθόδου (efficiency). Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για τον υπολογισμό της τιμής της απόδοσης (efficiency, E), όπως με βάση την κλίση (slope) της καμπύλης αναφοράς, την αύξηση του φθορισμού στη γραμμική φάση (3^n), την αύξηση του φθορισμού στην εκθετική φάση (2^n) ή τη συνολική μεταβολή του σήματος φθορισμού. Για τον υπολογισμό της τιμής του E στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η κλίση (slope) της πρότυπης καμπύλης και η εξίσωση $E = 10^{-1/\text{slope}}$. Οι τιμές που προκύπτουν από την εξίσωση κυμαίνονται από E=1.95 έως E=2.10. Αυτός ο τρόπος υπολογισμού του E, σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να δώσει αποτέλεσμα υψηλότερο (E>2.10), που πρακτικά είναι αδύνατο. Υπάρχουν, όμως, προηγούμενες έρευνες (Pfaffl, 2001), που έχουν δώσει τέτοια αποτελέσματα με υψηλή επαναληψιμότητα και σταθερότητα. Αυτό προφανώς οφείλεται στο ότι η συγκεκριμένη μέθοδος υπολογισμού του E υπερεκτιμά την πραγματική τιμή του (Pfaffl, 2004). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν συμβατικές PCR και για τα 13 γονίδια και ακολούθησε ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για τον έλεγχο της παρουσίας όλων των γονιδίων στο στέλεχος R.9.1 του μικροοργανισμού και ποσοτικοποίηση (υπολογισμός συγκέντρωσης ng/μL) στα 260 nm. Στη συνέχεια έγινε ανάμιξη όλων των γονιδίων, που λήφθηκαν από τις PCR παίρνοντας από κάθε διάλυμα γονιδίου ποσότητα 5μL, σε ένα γενικό μίγμα. Κατόπιν το μίγμα (αρχική συγκέντρωση 37.5 ng/μL) υποβλήθηκε σε 5 διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις (έως την συγκέντρωση 0.00375ng/μL). Έπειτα τα αραιωμένα δείγματα για κάθε γονίδιο πέρασαν από τις ίδιες συνθήκες της Real Time PCR με τα πειραματικά δείγματα. Μετά το τέλος της αντίδρασης, η καμπύλη αναφοράς εμφανίστηκε σε γράφημα ως μια ευθεία γραμμή που εκφράζει, για κάθε αραιώση, τον αριθμό των αντιγράφων του εκάστοτε γνωστής συγκέντρωσης γονιδίου συναρτήσει των τιμών Ct. Ο συντελεστής συσχέτισης (Correlation coefficient, R^2) αποτελεί ένα μέτρο του πόσο καλά ταιριάζουν κάθε φορά τα δεδομένα στην καμπύλη αναφοράς. Επί της ουσίας, η τιμή του R^2 εκφράζει την γραμμικότητα της καμπύλης και στην ιδανική περίπτωση είναι $R^2=1$, ενώ στην πραγματικότητα η μέγιστη τιμή του είναι 0,999.

5. Συνθήκες της Real Time PCR

Σε κάθε αντίδραση της Real Time PCR τοποθετήθηκε 1μl cDNA (αραιωμένο 1:3), 5μl 2x μίγματος αντίδρασης (KAPA SYBR® FAST qPCR master mix (KAPA BIOSYSTEMS) και 1μl από κάθε εκκινητή (ανοδικός και καθοδικός τελικής συγκέντρωσης 1μM ο καθένας). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ανερχόταν στα

10μl. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές για το κάθε δείγμα. Στο πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των διαφόρων αντιδράσεων περιλαμβάνονταν οι εξής κύκλοι:

- i. Αποδιάταξη της διπλής έλικας στους 95°C για 20 δευτερόλεπτα
- ii. Αποδιάταξη της έλικας για 20 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 95°C, ακολούθως υβριδισμός των εκκινητών για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 60°C και δράση της πολυμεράσης στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα ώστε να επιμηκυνθεί η αλυσίδα. Ο δεύτερος κύκλος επαναλαμβάνεται 40 φορές.

Τα προϊόντα PCR που προέκυψαν επαληθεύτηκε ότι ήταν τα επιθυμητά με την ανάλυση της καμπύλης τήξης. Το πρόγραμμα για την καμπύλη τήξης, κοινό για όλα τα γονίδια, είχε ένα πρώτο βήμα ανύψωσης της θερμοκρασίας στους 95°C για 15 sec, στη συνέχεια μείωση της θερμοκρασίας μέχρι τους 60°C για 1 min και τέλος ένα τρίτο βήμα ανύψωσης της θερμοκρασίας στους 95°C για 15 sec. Η πτώση της θερμοκρασίας γινόταν κατά 0,3°C/sec, με 2s hold/step. Η μέτρηση του φθορισμού (fluorescence acquisition) πραγματοποιήθηκε στους 72°C. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα της συσκευής StepOnePlus RT-PCR System Software v2.1. Η απόδοση όλων των αντιδράσεων Real Time PCR υπολογίστηκε με βάση την κλίση της πρότυπης καμπύλης (slope) σύμφωνα με την εξίσωση $E=10^{-1/slope}$. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και οι λόγοι έκφρασης υπολογίστηκαν με το μαθηματικό μοντέλο του Pfaffl (Pfaffl, 2001, Pfaffl *et al.*, 2002, Pfaffl, 2004). Το μαθηματικό μοντέλο του Pfaffl προβλέπει εξομάλυνση των αποδόσεων των διαφορετικών αντιδράσεων και γι' αυτό θεωρείται πιο ακριβής τρόπος προσέγγισης. Οι λόγοι έκφρασης υπολογίζονται από την εξίσωση $R = \frac{E_{target}^{\Delta Ct_{target}}}{E_{ref}^{\Delta Ct_{ref}}}$ (Pfaffl, 2001, Pfaffl *et al.*, 2002).

6. Οι εκκινητές στη real-time PCR

Για τη σωστή λειτουργία της μεθόδου RT - PCR ο σχεδιασμός των εκκινητών έχει ιδιαίτερη σημασία, οι οποίοι πρέπει να έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να είναι ειδικοί για την αλληλουχία-στόχο, χωρίς παραπροϊόντα από μη ειδικές συνδέσεις. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ορισμένοι κανόνες στο σχεδιασμό τους όπως:

α) αποφυγή της συμπληρωματικότητας άνω των 3 συνεχόμενων βάσεων μεταξύ τους ιδιαίτερα στο 3' άκρο, η οποία μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση “διμερών εκκινητών” (primer dimer), φαινόμενο το οποίο προκαλείται όταν ο ένας εκκινητής προεκτείνεται από την πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τον άλλο εκκινητή ή και τον εαυτό του, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός λανθασμένου μικρού προϊόντος.

β) περιεκτικότητα σε GC παρόμοια με την αλληλουχία-στόχο και μεταξύ 40-60%

γ) αποφυγή εκτάσεων με πολυπυρίνες, πολυπυριμιδίνες ή επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

δ) παραπλήσιο μεταξύ τους μέγεθος περίπου 20 βάσεων και μέγεθος μεταγράφου 80-150bp

ε) Tm* (θερμοκρασία τήξης) μεταξύ 60-65°C που να μη διαφέρει περισσότερο από 1°C ανάμεσά τους. (*Tm: η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων του DNA είναι αποσυνδεδεμένα και το 50% είναι συνδεδεμένα.)

Για το σχεδιασμό των εκκινητών υπάρχουν αρκετά βοηθητικά προγράμματα λογισμικού, όπως το Primer Express Software v.2 (Applied Biosystems), το οποίο και χρησιμοποιήσαμε. Για την επιβεβαίωση της μη ειδικής ενίσχυσης ψευδογονιδίων ή άλλων τμημάτων χρησιμοποιήσαμε το Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) του National Center for Biotechnology Information (NCBI). Τέλος, η απουσία μη

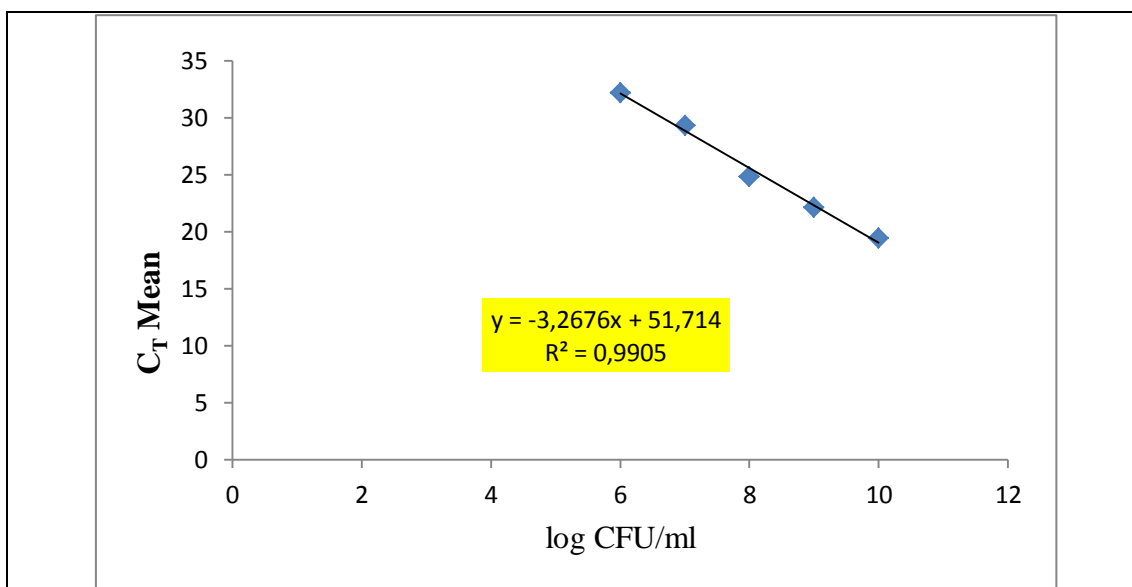
ειδικής ενίσχυσης και δημιουργίας παραπροϊόντων ελέγχθηκε με τις καμπύλες τήξης των προϊόντων στο τέλος κάθε αντίδρασης Real-Time PCR.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των εκκινητών της real-time RT-PCR για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων *sigB*, *plcA*, *plcB*, *hlyA*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *lmo2672* και *lmo2470*

ΓΟΝΙΔΙΑ	PRIMERS	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΜΕΓΕΘΟΣ
<i>l6S</i>	16S_f	GATGCATAGCCGACCTGAGA	1 μM	135bp
	16S_r	CTCCGTCAGACTTTCGTCCA	1 μM	
<i>rpob</i>	Rpob_f	CCGCGATGCGAAAACAAT	1 μM	69bp
	Rpob_r	CCWACAGAGATACGGTTATCRAATGC	1 μM	
<i>IGS</i>	IGS_f	GGCCTATAGCTCAGCTGGTTA	1 μM	114bp
	IGS_r	GCTGAGCTAAGGCCCCGTA	1 μM	
<i>sigB</i>	sigB_f	CCAAGAAAATGGCGATCAAGAC	1 μM	166bp
	sigB_r	CGTTGCATCATATCTTCTAATAGCT	1 μM	
<i>hlyA</i>	hlyA_f	TACATTAGTGGAAAGATGG	1 μM	153bp
	hlyA_r	ACATTCAAGCTATTATTTACA	1 μM	
<i>plcA</i>	plcA_f	CTAGAAGCAGGAATACGGTACA	1 μM	115bp
	plcA_r	ATTGAGTAATCGTTTCTAAT	1 μM	
<i>plcB</i>	plcB_f	CAGGCTACCACTGTGCATATGAA	1 μM	72bp
	plcB_r	CCATGCTTCYGTTGCTTGATAATTG	1 μM	
<i>inlA</i>	inlA_f	AATGCTCAGGCAGCTACAMTTACA	1 μM	114bp
	inlA_r	CGTGTCTGTTACRTTCGTTTTTCC	1 μM	
<i>inlB</i>	inlB_f	AAGCAMGATTTTCATGGGAGAGT	1 μM	78bp
	inlB_r	TTACCGTTCCATCAACATCATAACTT	1 μM	
<i>inlC</i>	inlC_f	ACTGGTCAGAAATGTGTGAATGA	1 μM	80bp
	inlC_r	CCATCTGGGTCTTTGACAGT	1 μM	
<i>inlJ</i>	inlJ_f	TGCGTAAATGCTCACATCCAAG	1 μM	81bp
	inlJ_r	TTGCCCTTCAGCATCCAAGT	1 μM	
<i>Lmo2672</i>	Lmo2672_f	CGGCACACTTGGATTCTCAT	1 μM	90bp
	Lmo2672_r	AAACACATGGGACTTGCACC	1 μM	
<i>Lmo2470</i>	Lmo2470_f	TGATTCCATGCAATTACTAGAACG	1 μM	86bp
	Lmo2470_r	ACTCCGTTAGTTTAGCCCCA	1 μM	

7. Υπολογισμός CFU (Colony Forming Unit)

Για τον υπολογισμό του αριθμού κυττάρων (CFU), ώστε να αντιστοιχίσουμε με βάση τους κύκλους ποσοτικοποίησης την ποσότητα του μικροοργανισμού στα τέσσερα στάδια της δειγματοληψίας χρειάζεται η κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *inlB*. Το γονίδιο *inlB* επιλέχθηκε ως κατάλληλο βάσει του στατιστικού προγράμματος NormFinder καθώς είναι σταθερός δείκτης και χαρακτηρίζεται από μη μεταβολή στην έκφρασή του, όπως προέκυψε από τους λόγους έκφρασης που υπολογίστηκαν με το μαθηματικό μοντέλο του Pfaffl. Στην περίπτωση αυτή, η καμπύλη προέκυψε από διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις υγρής καλλιέργειας του στελέχους R.9.1 που είχε προσδιορισθεί ο αριθμός αποικιών/mL, (εμβολιασμός του στελέχους σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI broth αντί για γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό ακολουθώντας ακριβώς τα ίδια χρονικά διαστήματα επώασης και στάδια δειγματοληψίας που έγιναν στο κανονικό πείραμα). Το εύρος των αραιώσεων ήταν $10^{10} - 10^2$ CFU/mL. Στη συνέχεια έγινε απομόνωση ολικού RNA. Το RNA, στη συνέχεια, μεταγράφηκε σε cDNA και ακολούθησε Real – Time PCR. Μετά το τέλος της αντίδρασης, εμφανίστηκε η πρότυπη καμπύλη κατόπιν εφαρμογής ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression), όπου ο συντελεστής R^2 ήταν ίσος με 0,990 δηλαδή η συσχέτιση των τιμών Ct-log ήταν γραμμική. Η συνάρτηση που περιγράφει την πρότυπη καμπύλη έχει τη μορφή $y=ax+b$ και χρησιμοποιήθηκε για τον απευθείας υπολογισμό του λογαρίθμου της συγκέντρωσης (x) από την τιμή του Ct (y) κάθε δείγματος. Ακολούθως οι τιμές Ct που προέκυψαν από τη Real Time PCR των δειγμάτων, για το γονίδιο *inlB*, προβλήθηκαν πάνω στην πρότυπη καμπύλη και βρέθηκε η αντίστοιχη τιμή CFU/mL. Αυτή η τιμή θεωρητικά αντιστοιχεί στον αριθμό βιώσιμων κυττάρων που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης που σχηματίζεται από πέντε σημεία, δηλαδή από πέντε αραιώσεις του γονιδίου *inlB*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Μικροβιακές αναλύσεις

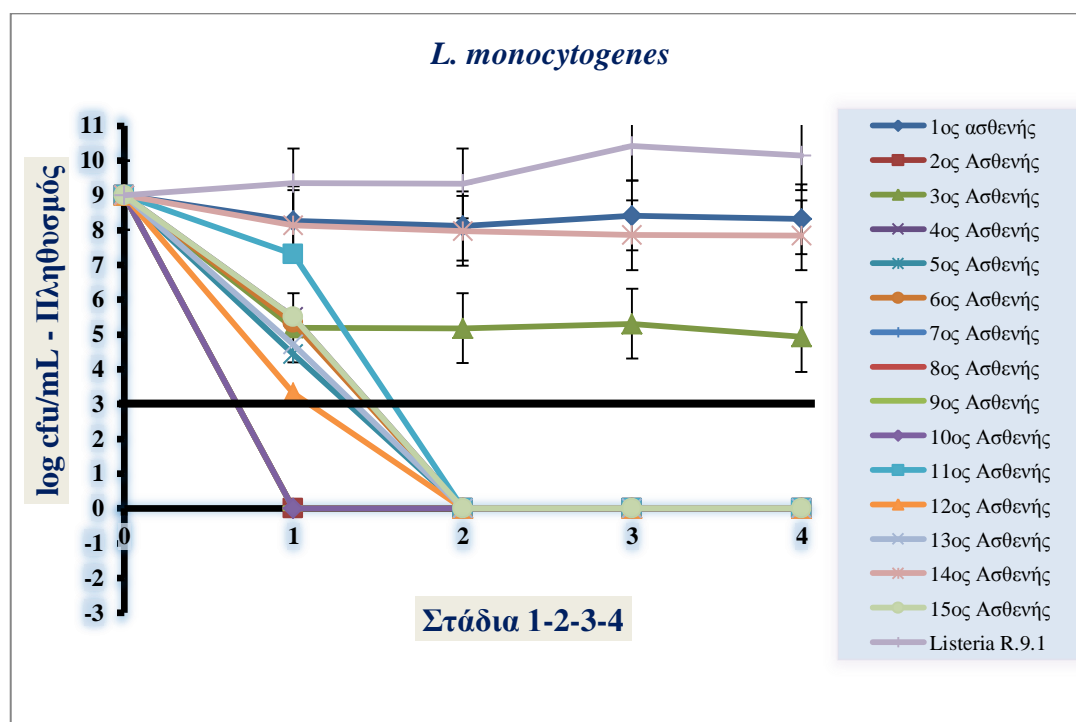
Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις δειγματοληψίες:

1. Κατά τον εμβολιασμό του γαστρικού υγρού με καλλιέργειες του στελέχους *L. monocytogenes* R.9.1 (Στάδιο 1).
2. Μετά την επώαση του γαστρικού υγρού με το στέλεχος (επώαση στους 37°C για 100 λεπτά – Στάδιο 2).
3. Κατά την επαναϊώρηση του στελέχους στο δωδεκαδακτυλικό υγρό (Στάδιο 3)
4. Και μετά την επώαση του εμβολιασμένου δωδεκαδακτυλικού υγρού (επώαση στους 37°C για 2 ώρες – Στάδιο 4).

Με την ολοκλήρωση των πειραμάτων στο σύνολο των δειγμάτων παρατηρήθηκε ότι δεν καθίσταται δυνατή η εκτίμηση των μεταβολών του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού με τις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές (καλλιέργεια).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω δειγματοληψιών παρατίθενται στο παρακάτω διάγραμμα Σταδίων (1, 2, 3, 4) και Πληθυσμού CFU/mL. Επισημαίνεται ότι ο αρχικός πληθυσμός του στελέχους είναι 9 log CFU/mL και το 0 αντιστοιχεί στην πραγματικότητα σε πληθυσμό κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης (όριο ανίχνευσης 3 log CFU/mL).

Διάγραμμα 2: Διάγραμμα Σταδίων 1-2-3-4 (x) - log CFU/mL (y)



5.2 Προσδιορισμός αποδοτικότητας της μεθόδου (Efficiency)

Έπειτα από την διαδικασία που περιγράφηκε στο αντίστοιχο κεφάλαιο (βλ σελ 58) και χρησιμοποιώντας την εξίσωση $E = 10^{-1/\text{slope}}$ παρατηρούμε ότι οι τιμές που προκύπτουν για την αποδοτικότητα της μεθόδου κυμαίνονται ανάμεσα στις επιθυμητές τιμές δηλαδή από $E=1.95$ έως $E=2.10$. Οι τιμές με $E > 2.10$ οφείλονται στο ότι η συγκεκριμένη μέθοδος υπολογισμού του E υπερεκτιμά την πραγματική τιμή του (Pfaffl, 2004), και για αυτό το λόγο δεν απορρίφθηκαν τα γονίδια.

Πίνακας 4: Γονίδια που μελετήθηκαν και αποδοτικότητα μεθόδου

ΓΟΝΙΔΙΑ	Efficiency
<i>I6S</i>	2.05
<i>rpoB</i>	2.04
<i>IGS</i>	2.09
<i>sigB</i>	2.13
<i>plcA</i>	1.94
<i>plcB</i>	2
<i>hlyA</i>	1.98
<i>inlA</i>	2.12
<i>inlB</i>	2.04
<i>inlC</i>	2.06
<i>inlJ</i>	2.03
<i>lmo2470</i>	2.1
<i>lmo 2672</i>	2.1

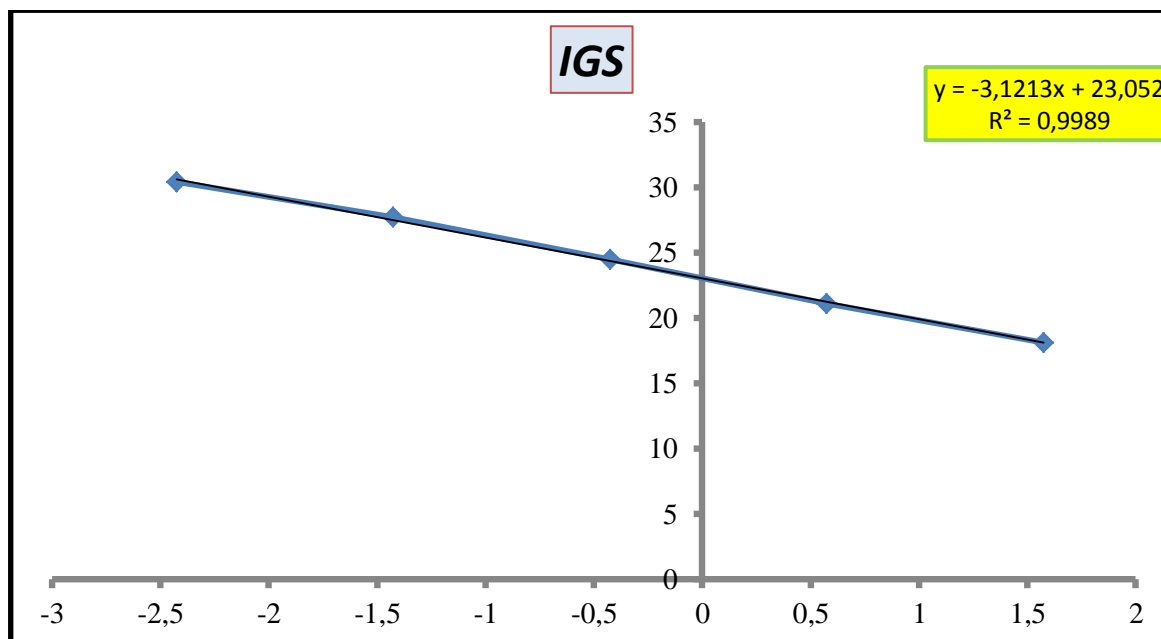
Παρακάτω παρατίθενται ως παράδειγμα τα αποτελέσματα της μεθόδου Real Time PCR για το γονίδιο αναφοράς *IGS*

Πίνακας 5: Επεξεργασμένα δεδομένα του γονιδίου *IGS*

Ποσό (amount) (ng)	Ct			Average Ct	Log ποσό (amount)
37.5	18.54	17.9	17.92	18.12	1.574031
3.75	21.07	21.07	21.27	21.13667	0.574031
0.375	24.66	24.49	24.36	24.50333	-0.42597
0.0375	27.62	27.71	27.8	27.71	-1.42597
0.00375	30.42	30.33	30.57	30.44	-2.42597

Slope Κλίση	Efficiency Αποδοτικότητα
-3.12133	2.09

Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς (standard curve) που σχηματίζεται από πέντε σημεία, δηλαδή από πέντε αραιώσεις του γονιδίου αναφοράς *IGS*



5.3 REAL TIME PCR

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεθόδου Real Time PCR όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με το μαθηματικό μοντέλο του Pfaffl (Pfaffl, 2001, Pfaffl *et al.*, 2002, Pfaffl, 2004). Οι λόγοι έκφρασης υπολογίζονται από την εξίσωση $R = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$ (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002).

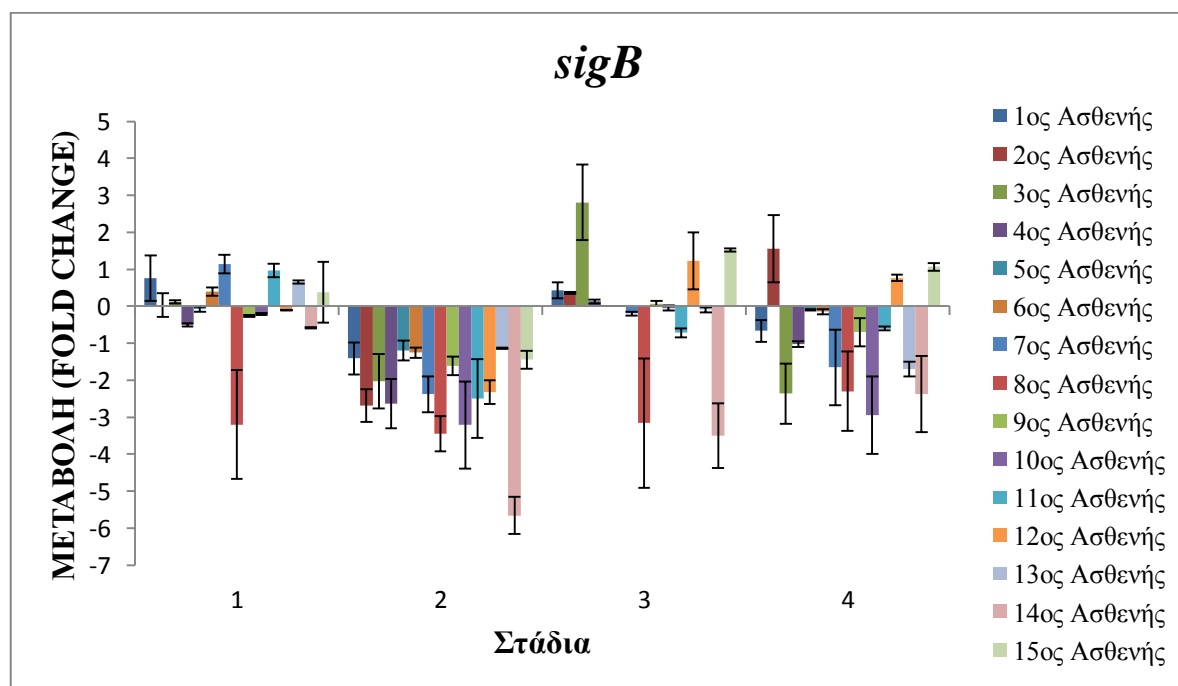
5.3.1 Αποτελέσματα βάσει του μαθηματικού τύπου κατά Pfaffl

Ύστερα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεθόδου Real Time PCR μεταβολές παρατηρήθηκαν στην έκφραση των γονιδίων παθογένειας σε σχέση με αντίστοιχη έκφρασή τους έπειτα από ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε γενικό θρεπτικό υπόστρωμα και αντίστοιχες συνθήκες καλλιέργειας. Η έκφραση επηρεάστηκε σε όλα τα υπό μελέτη γονίδια και κυρίως μετά το στάδιο της επώασης του μικροοργανισμού στο γαστρικό υγρό και κατά το στάδιο της επαναδιάλυσης του ιζήματος του μικροοργανισμού σε δωδεκαδακτυλικό υγρό.

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η συγκεντρωτική αποτελεσμάτων της μεταβολής της έκφρασης των γονιδίων με τη χρήση RT-PCR εκφρασμένη σε λογάριθμο του δύο (log₂) και δείχνουν πόσες φορές περισσότερο ή λιγότερο εκφράζεται ένα γονίδιο στα τέσσερα στάδια της δειγματοληψίας (Στάδιο 1- 2- 3- 4). Σύμφωνα με τη μέθοδο κατά Pfaffl όταν η έκφραση είναι πάνω από 2 θεωρούμε ότι το γονίδιο υπέρ-εκφράζεται. Ενώ όταν η έκφραση είναι κάτω από -2 θεωρούμε ότι το γονίδιο υπό-εκφράζεται.

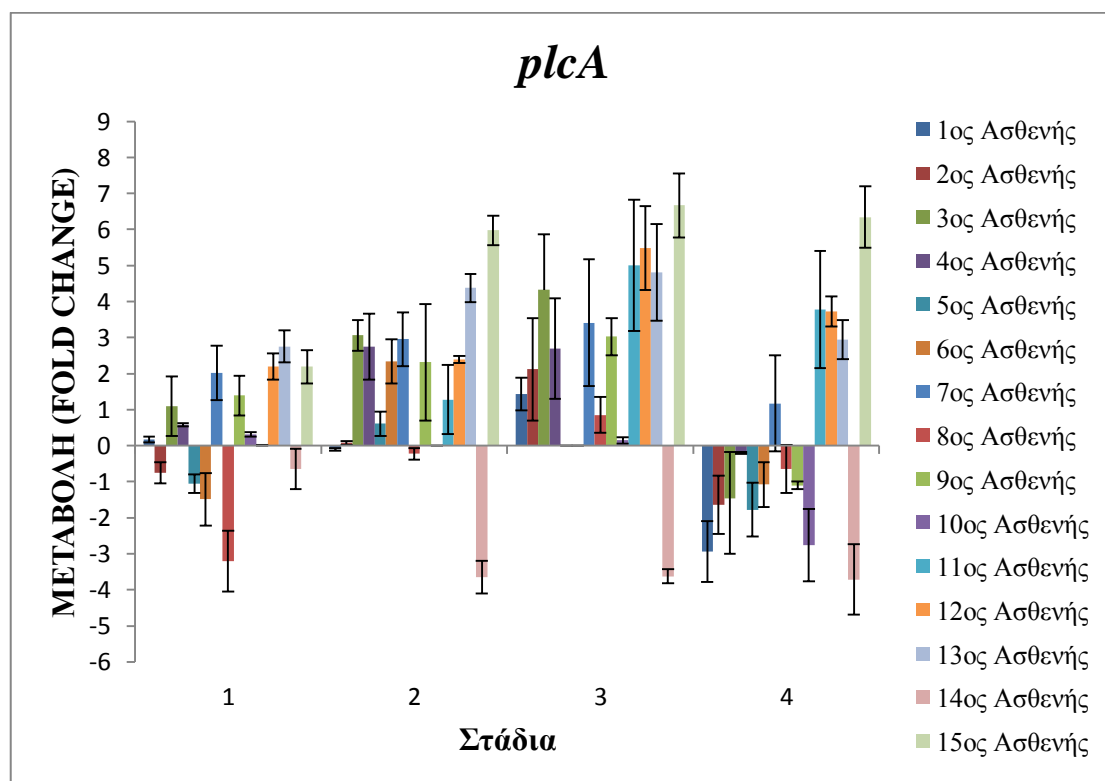
Στις επόμενες σελίδες παρουσιάζονται τα διαγράμματα των αποτελεσμάτων για κάθε γονίδιο παθογένειας ξεχωριστά.

Στο διάγραμμα 4 φαίνεται ότι η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου *sigB* παρουσίασε σταθερότητα στους 10 ασθενείς και υποέκφραση από $2,31 \pm 0,31$ έως $5,65 \pm 0,49$ φορές σε 5 ασθενείς (2, 4, 8, 12, 14), κυρίως στο στάδιο μετά την επώαση του μικροοργανισμού στο γαστρικό υγρό.



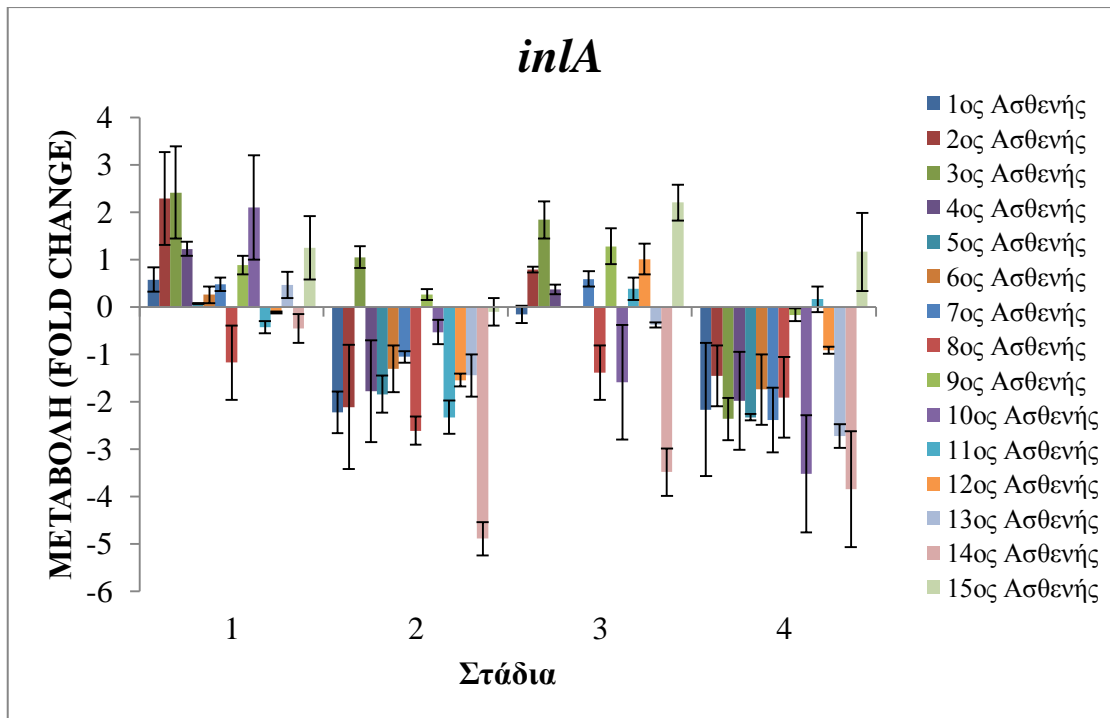
Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *sigB* σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα \log_2 .

Στο διάγραμμα 5 παρατηρείται ότι το γονίδιο *plcA* παρουσίασε σταθερότητα στην έκφρασή του σε 5 ασθενείς (2, 4, 5, 6, 10), υπερέκφραση από $2,39 \pm 0,09$ έως $6,66 \pm 0,89$ φορές σε 7 ασθενείς (3, 7, 9, 11, 12, 13, 15) και υποέκφραση από $2,90 \pm 0,84$ έως $3,71 \pm 0,97$ φορές στους 3 ασθενείς (1, 8, 14) των οποίων το pH του γαστρικού υγρού μετρήθηκε να έχει αρκετά υψηλές τιμές (7,99, 7,36 και 7,93 αντίστοιχα).

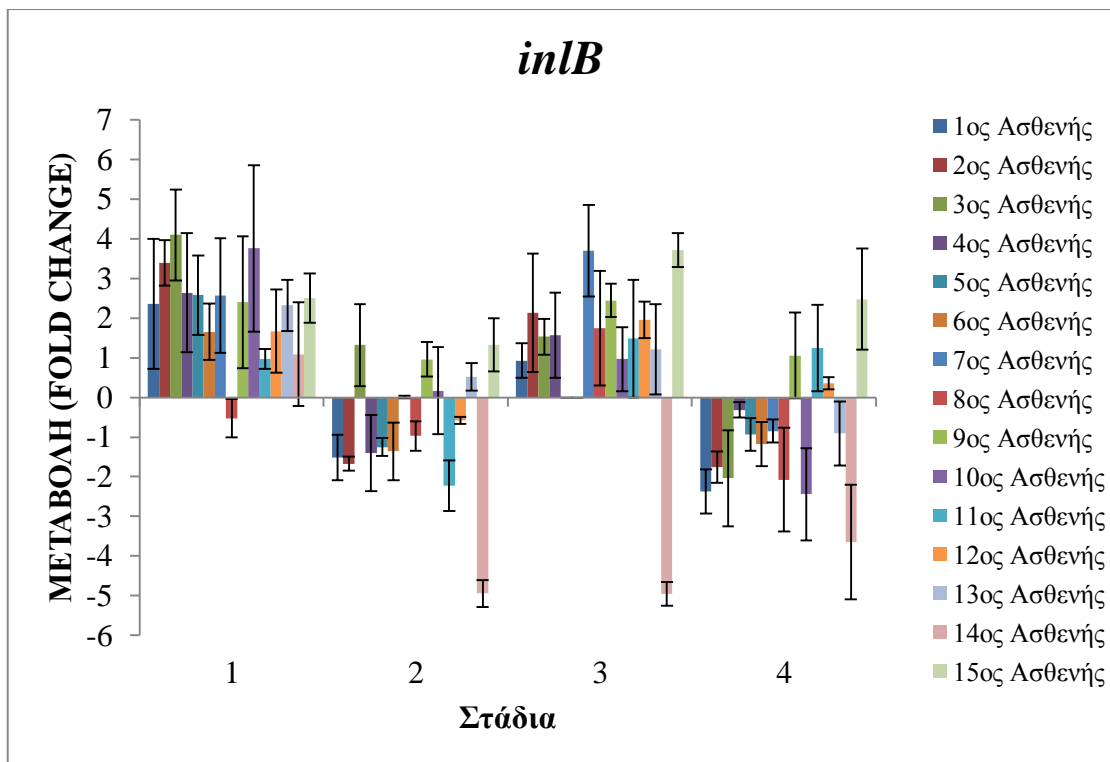


Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *plcA* σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα \log_2 .

Στα διαγράμματα 6 και 7 παρατηρείται κυρίως μη μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων *inlA* και *inlB*. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις τα γονίδια είτε υπερεκφράστηκαν είτε υποεκφράστηκαν. Το γονίδιο *inlA* παρουσίασε υποέκφραση σε 3 ασθενείς (5, 10, 13) κατά το τελευταίο στάδιο της μελέτης, σε 2 ασθενείς (8, 11) κατά το δεύτερο στάδιο της μελέτης καθώς και σε 1 ασθενή (14) κατά τα τρία τελευταία στάδια της μελέτης, η οποία κυμάνθηκε από $2,32 \pm 0,06$ έως $4,88 \pm 0,35$ φορές. Το γονίδιο *inlB* παρουσίασε υπερέκφραση σε 5 ασθενείς (2, 3, 7, 9, 15 - κατά το τρίτο στάδιο της μελέτης) από $2,44 \pm 0,41$ έως $4,09 \pm 1,14$ φορές και υποέκφραση σε 1 ασθενή (14) από $3,64 \pm 1,45$ έως $4,95 \pm 0,29$ φορές.

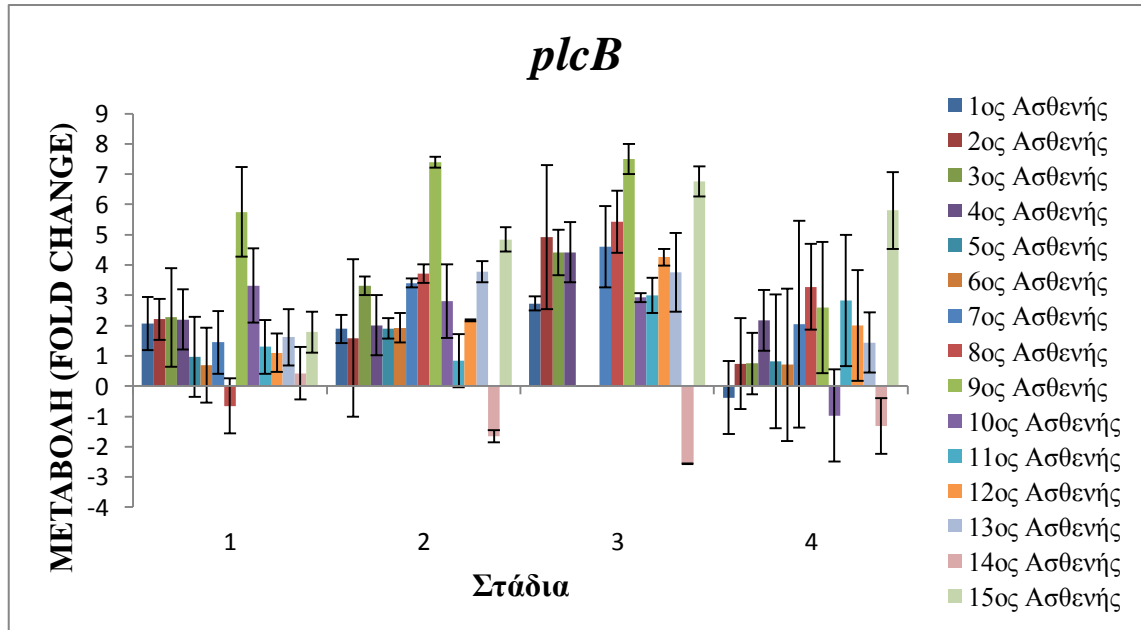


Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *inlA* σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα \log_2 .

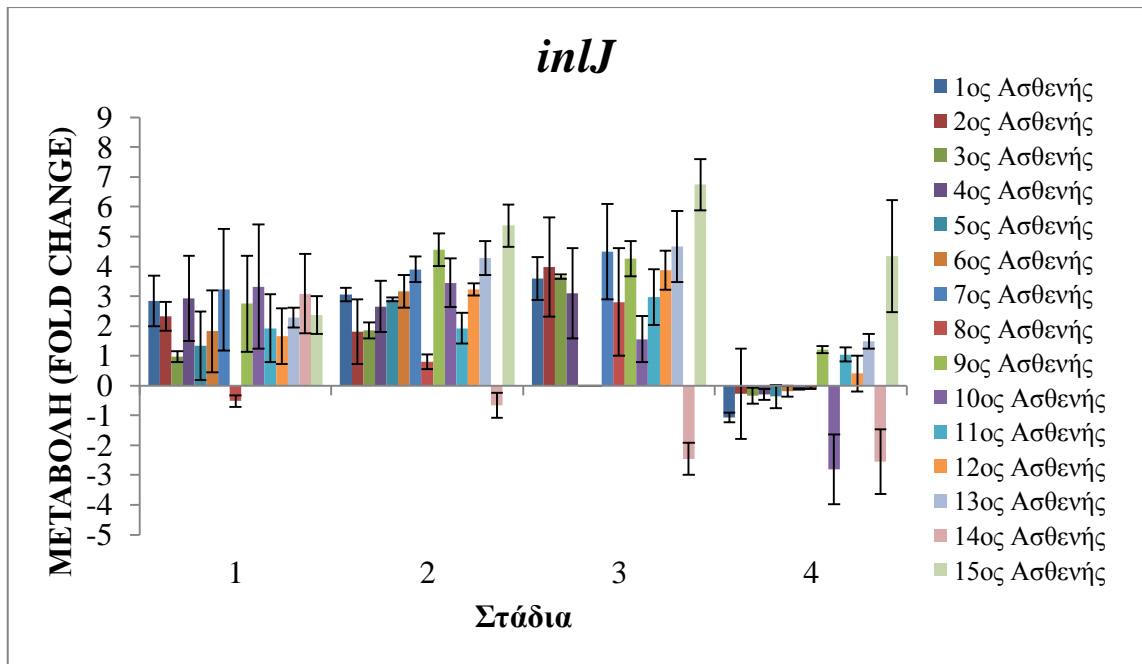


Διάγραμμα 7: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *inlB* σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα \log_2 .

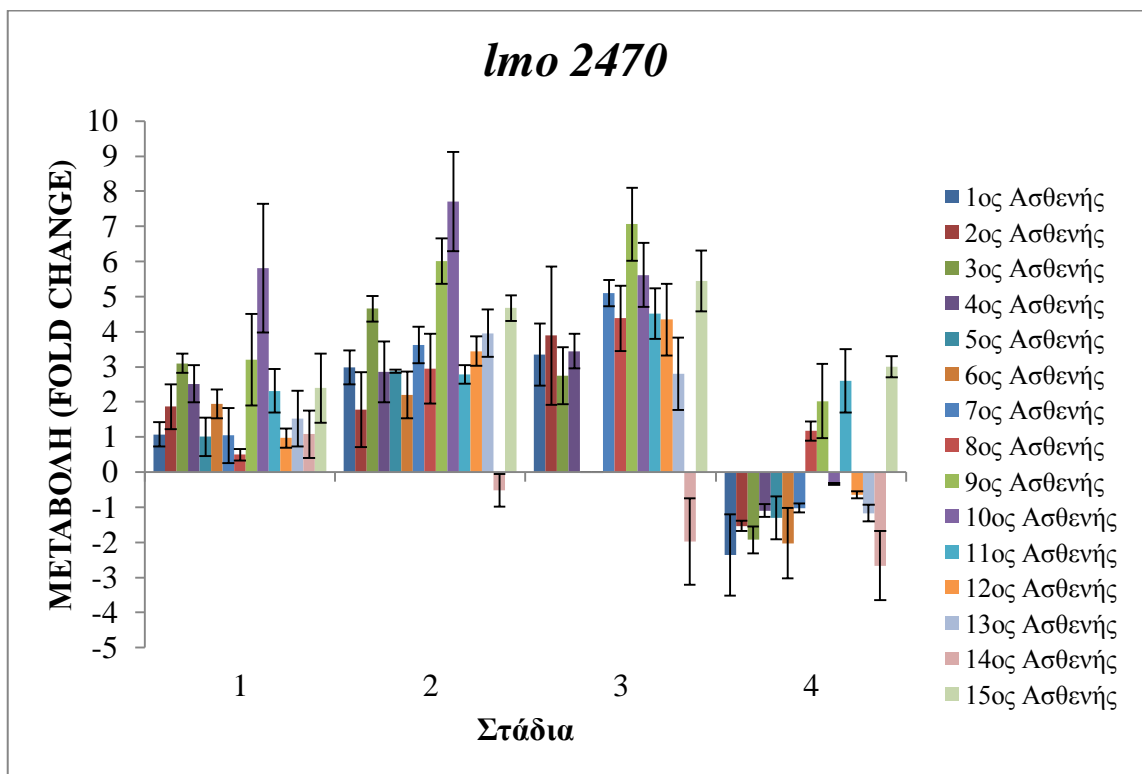
Στα γονίδια *plcB*, *inlJ*, *lmo2470* και *lmo2672* (διαγράμματα 8, 9, 10, 11) παρατηρήθηκε σε ορισμένους ασθενείς σταθερότητα και σε άλλους υπερέκφραση. Συγκεκριμένα το γονίδιο *plcB* παρέμεινε σταθερό σε 2 ασθενείς (5, 6), παρουσίασε υποέκφραση ($2,56 \pm 0,01$) σε 1 ασθενή (14) κατά το τρίτο στάδιο της μελέτης και στους υπόλοιπους υπερεκφράστηκε από $2,17 \pm 0,02$ έως $7,49 \pm 0,49$ φορές. Τα γονίδια *inlJ* και *lmo2470* υπερεκφράστηκαν από $2,83 \pm 0,84$ έως $6,74 \pm 0,85$ φορές και από $2,78 \pm 0,26$ έως $7,71 \pm 1,41$ φορές, αντίστοιχα, σε 12 ασθενείς. Σταθερότητα στην έκφρασή τους παρατηρήθηκε σε 2 διαφορετικούς (4, 8 και 2, 6, αντίστοιχα,) και ένα κοινό ασθενή (14). Το γονίδιο *lmo2672* υπερεκφράστηκε από $2,46 \pm 0,36$ έως $5,98 \pm 0,52$ φορές και διατήρησε σταθερή την έκφρασή του σε 6 ασθενείς (2, 4, 6, 9, 13, 14).



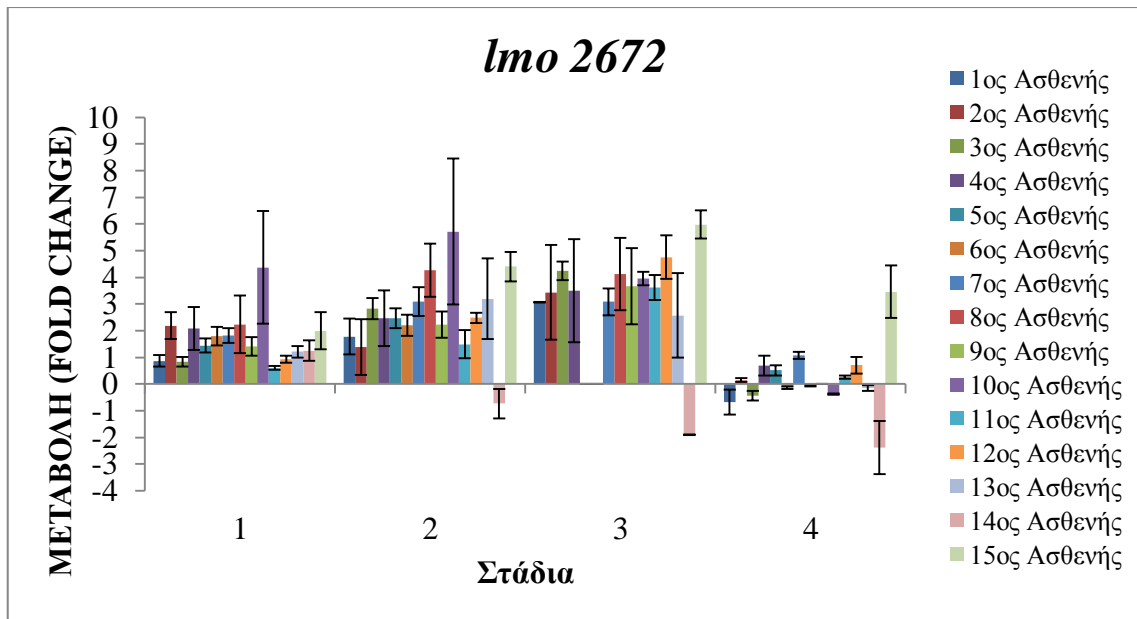
Διάγραμμα 8: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *plcB* σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα \log_2 .



Διάγραμμα 9: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *inlJ* σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα \log_2 .

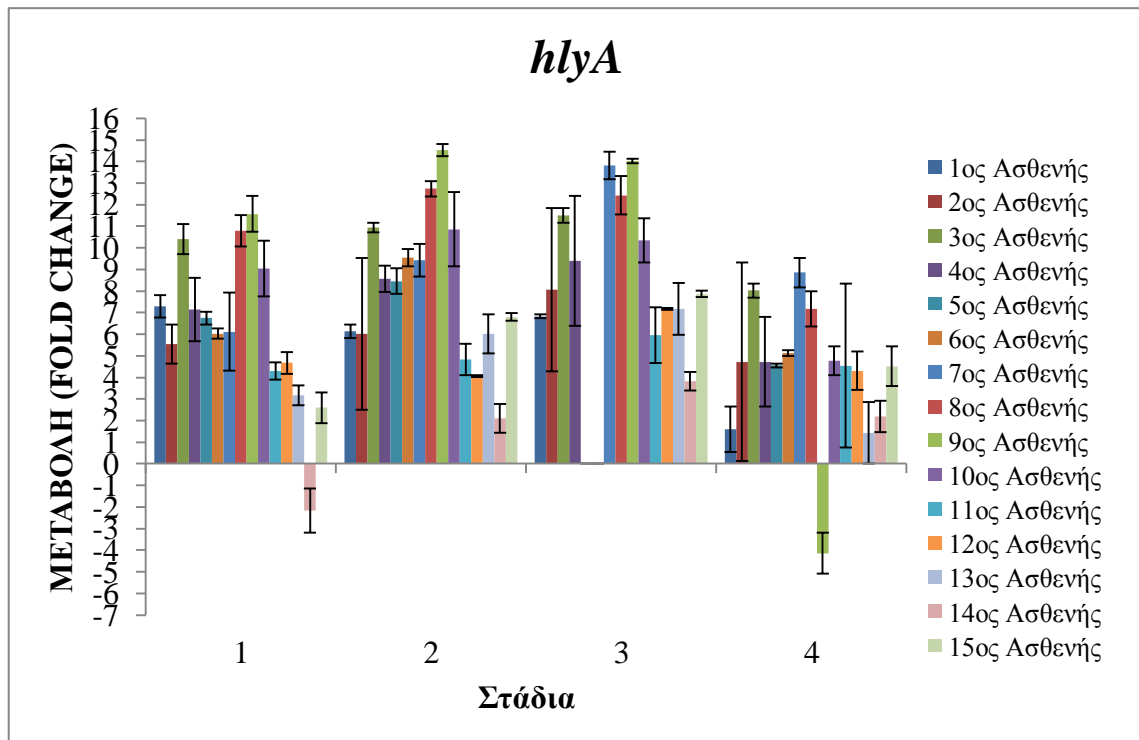


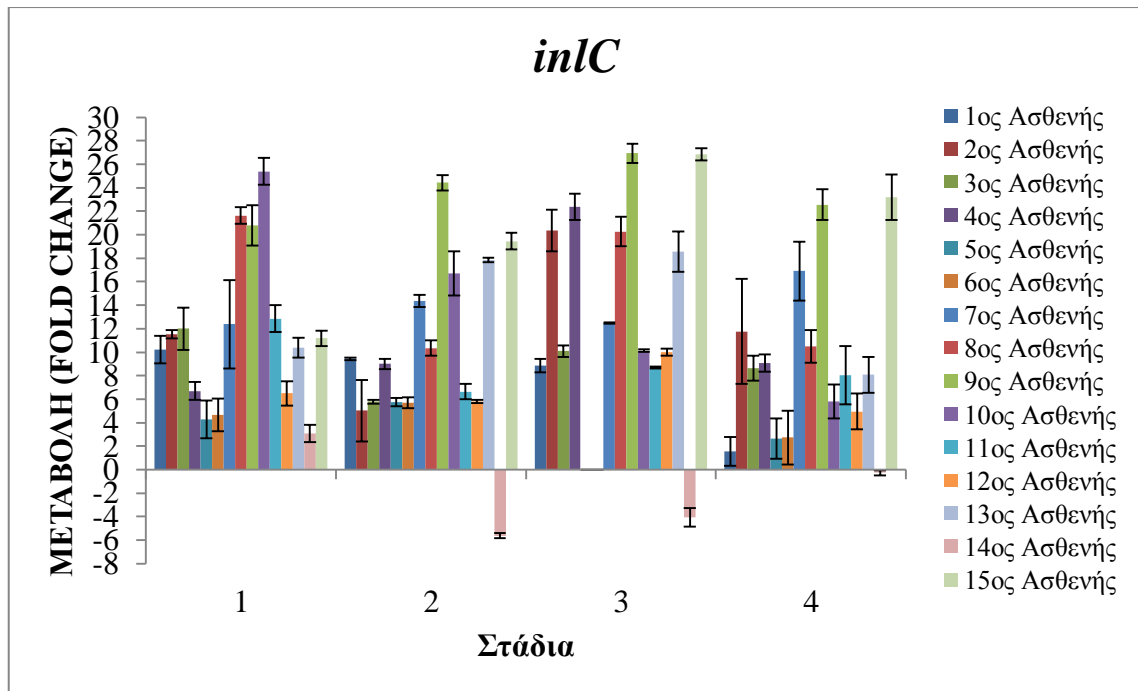
Διάγραμμα 10: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *lmo2470* σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα \log_2 .



Διάγραμμα 11: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *lmo2672* σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα \log_2 .

Στα διαγράμματα 12 και 13 φαίνεται ότι τα γονίδια *hly* και *inlC* παρουσίασαν υπερέκφραση στο σύνολο των ασθενών. Το *hly* υπερεκφράστηκε από $3,16 \pm 0,45$ έως $14,53 \pm 0,28$ φορές, ενώ το γονίδιο *inlC* ήταν αυτό που παρουσίασε και τη μεγαλύτερη υπερέκφραση με τιμές από $3,08 \pm 0,73$ έως $26,93 \pm 0,82$ φορές μεγαλύτερες από την αντίστοιχη έκφρασή του στο γενικό θρεπτικό υπόστρωμα.



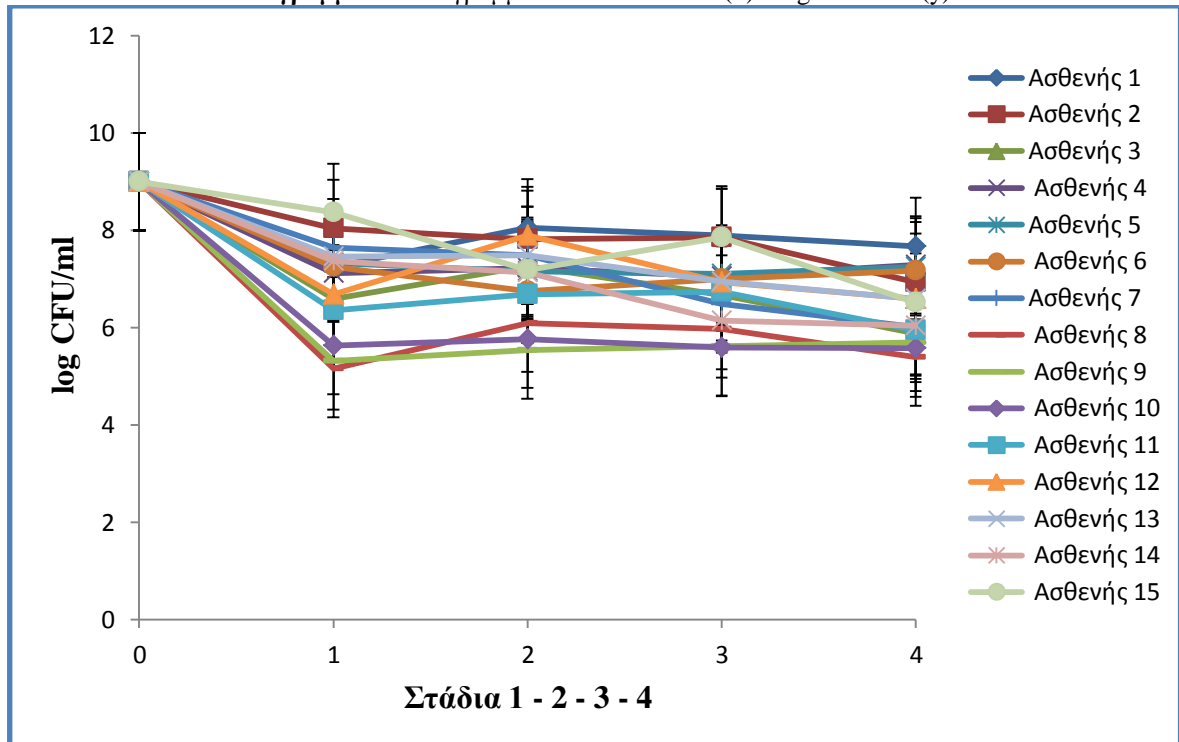


Διαγράμματα 12 και 13 (αντίστοιχα): Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση των γονιδίων *hlyA* και *inlC* σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα \log_2 .

5.3.2 Αποτελέσματα υπολογισμού CFU (Colony Forming Unit)

Όπως προαναφέρθηκε οι τιμές Ct που προέκυψαν από τη Real Time PCR των δειγμάτων, για το γονίδιο *InlB* και για τα τέσσερα στάδια της δειγματοληψίας, προβλήθηκαν πάνω στην πρότυπη καμπύλη και βρέθηκε η αντίστοιχη τιμή CFU/mL. Αυτή η τιμή θεωρητικά αντιστοιχεί στον αριθμό βιώσιμων κυττάρων που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στο παρακάτω διάγραμμα Σταδίων και Πληθυσμού log CFU/mL.

Διάγραμμα 14: Διάγραμμα Σταδίων 1-2-3-4 (x) - log CFU/mL (y)



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη της πληθυσμιακής μεταβολής και προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεια του τροφιμογενούς παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* μετά από *in vitro* έκθεση σε ανθρώπινο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό, που συλλέχθηκαν ενδοσκοπικά.

Συγκεκριμένα καλλιέργειες του στελέχους του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* LQC 15257 (R.9.1), που ανήκει στον ορότυπο 4b, και έχει απομονωθεί από δείγματα φράουλας εμβολιάστηκαν σε δείγματα γαστρικού υγρού και δωδεκαδακτυλικού υγρού. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 100 min και φυγοκέντρηση. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε δωδεκαδακτυλικό υγρό και επώαστηκε στους 37°C για 2 h. Οι μεταβολές του πληθυσμού του παθογόνου και η έκφραση των γονιδίων παθογένειας μελετήθηκαν μέσω εφαρμογής της μεθόδου Real Time PCR. Για την ανίχνευση και παρακολούθηση της παραγωγής των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR[®] Green I. Η βελτιστοποίηση της Real Time PCR είναι πολύ σημαντική για αξιόπιστα και επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα. Στη μεθοδολογία που αναπτύχθηκε, τα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν όταν η συγκέντρωση του κάθε μορίου εκκινητή ήταν ίση με 1μM και του cDNA ήταν 500-600 ng/μL. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τήξη των προϊόντων μετά το τέλος της αντίδρασης, δηλαδή ανάλυση με χρήση της καμπύλης τήξης (melt curve analysis). Κατά τη διάρκεια της καμπύλης τήξης μετράται ο φθορισμός που εκπέμπεται καθώς τα προϊόντα της αντίδρασης θερμαίνονται, από θερμοκρασία χαμηλότερη του σημείου τήξης τους (T_m) μέχρι θερμοκρασία μεγαλύτερη του T_m τους και αποδιατάσσονται. Οι κορυφές που εμφανίζονται στην καμπύλη τήξης αντιστοιχούν στα προϊόντα που έχουν ενισχυθεί με την αντίδραση και είναι ανάλογες των ζωνών στην απλή ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Συνεπώς, αυτή η ανάλυση στο τέλος του πειράματος είναι σημαντική, γιατί επιτρέπει τον ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων.

Τα δεδομένα της Real Time PCR μπορούν να ποσοτικοποιηθούν απολύτως και σχετικά. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιεί μια εσωτερική ή εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης για να υπολογίσει τον αριθμό των αντιγράφων που έχουν εισαχθεί. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση είναι σημαντική στην περίπτωση που θα πρέπει να καθοριστεί ο ακριβής αριθμός αντιγράφων, ωστόσο, η σχετική ποσοτικοποίηση είναι επαρκής για τις περισσότερες φυσιολογικές και παθολογικές μελέτες. Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται στην σύγκριση μεταξύ της έκφρασης ενός γονιδίου στόχου έναντι ενός γονιδίου αναφοράς και την έκφραση του ίδιου γονιδίου σε δείγμα στόχο έναντι δειγμάτων αναφοράς.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Michael W. Pfaffl, 2004) μεμονωμένα δείγματα παράγουν διαφορετικά ιστορικά φθορισμού σε περιβάλλον Real Time PCR. Οι καμπύλες ενισχύσεως διαφέρουν στην κλίση έπειτα από οποιαδήποτε αύξηση φθορισμού και ανάλογα με το επίπεδο του φθορισμού. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου έχει σημαντική επίπτωση στο ιστορικό φθορισμού και την ακρίβεια του αριθμητικού αποτελέσματος της έκφρασης και επηρεάζεται καθοριστικά από τα συστατικά της αντίδρασης. Η αξιολόγηση λοιπόν της αποτελεσματικότητας της μεθόδου αποτελεί βασικό δείκτη για τη διαδικασία ποσοτικοποίησης του γονιδίου. Η σταθερή ενίσχυση της αποδοτικότητας της μεθόδου σε όλα τα συγκριτικά δείγματα είναι ένα σημαντικό κριτήριο για τη αξιόπιστη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων και έτσι γίνεται καίριας σημασίας κατά την ανάλυση της σχέσης μεταξύ μίας άγνωστης αλληλουχίας και μια πρότυπης αλληλουχίας. Οι διορθώσεις στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου (Efficiency) με την βοήθεια μαθηματικών μοντέλων συνίστανται και έχουν ως αποτέλεσμα μία πιο αξιόπιστη εκτίμηση του βαθμού έκφρασης των γονιδίων. Μικρές διαφορές στην αποδοτικότητα της

μεθόδου μεταξύ γονιδίου στόχου και γονιδίου αναφοράς δημιουργούν ψευδή εκτίμηση της έκφρασης, καθώς επίσης παραπλανούν τον ερευνητή ώστε να υπερεκτιμά ή να υποεκτιμά το «πραγματικό» αρχικό ποσό του mRNA. Διαφορές στην αποδοτικότητα της μεθόδου PCR της τάξεως του (ΔE) 3% ($\Delta E = 0,03$) μεταξύ γονιδίου-στόχου και του γονιδίου αναφοράς δημιουργούν μια εσφαλμένη διατύπωση στο λόγο έκφρασης (R - ratio) από 47% σε περίπτωση όπου $E_{\text{στόχου(target)}} < E_{\text{αναφοράς(ref)}}$ (όπου E η αποδοτικότητα της μεθόδου) μέχρι και 209% στην περίπτωση όπου $E_{\text{στόχου(target)}} > E_{\text{αναφοράς(ref)}}$ μετά από 25 κύκλους. Το κενό αυτό θα αυξηθεί δραματικά από υψηλότερες διαφορές στην απόδοση $\Delta E = 0,05$ (28% και 338%, αντίστοιχα) και $\Delta E = 0,10$ (72% και 1083%, αντίστοιχα) και μεγαλύτερο αριθμό κύκλων. Συνεπώς οι διορθώσεις στην αποδοτικότητα της μεθόδου θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην μέθοδο υπολογισμού της σχετικής ποσοτικοποίησης των δειγμάτων. Η εκτίμηση της επακριβής απόδοσης των γονιδίων στόχων και του γονιδίου αναφοράς πρέπει να πραγματοποιείται πριν από κάθε υπολογισμό της κανονικής έκφρασης του γονιδίου.

Στην παρούσα μελέτη για τον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου-στόχου σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς, εφαρμόστηκε το μαθηματικό μοντέλο του Pfaffl (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002). Η μαθηματική ανάλυση κατά Pfaffl συνυπολογίζει τις διαφορετικές αποδόσεις και χρησιμοποιεί την εξίσωση, $R = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$ (όπου R είναι ο λόγος της έκφρασης των γονιδίων), δηλαδή, όχι μόνο την παραγωγή του εκάστοτε γονιδίου στόχου, αλλά και του γονιδίου αναφοράς (IGS), που δείχνει τη γενικότερη μεταγραφική δραστηριότητα του κυττάρου. Συνεπώς, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με αυτόν τον τρόπο υπολογισμού είναι πλησιέστερα στην πραγματική κυτταρική κατάσταση. Ως εκ τούτου, προτείνουμε την εφαρμογή αυτού του μαθηματικού μοντέλου στη σχετική ποσοτικοποίηση, ακόμα και σε αντιδράσεις με παρόμοιες αποδόσεις, ως πλέον αξιόπιστο και ακριβές.

Όσον αφορά την πληθυσμιακή μεταβολή του τροφιμογενούς παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* μετά από *in vitro* έκθεση σε ανθρώπινο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό, ο πληθυσμός μειώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις. Όμως, ο μικροοργανισμός ήταν μη ανιχνεύσιμος με τις κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους (διάγραμμα 2) μετά από επώαση σε γαστρικό υγρό 11 ασθενών (2^{0s} , 4^{0s} , 5^{0s} , 6^{0s} , 7^{0s} , 9^{0s} , 10^{0s} , 11^{0s} , 12^{0s} , 13^{0s} , 15^{0s} ασθενής) από τους 12 (στον 3^{0} ασθενή ο πληθυσμός του μικροοργανισμού ήταν ανιχνεύσιμος) που είχαν $pH < 2,9$ έναντι 1 ασθενή (8^{0s} ασθενής) από τους 3 (1^{0s} , 8^{0s} , 14^{0s} ασθενής) με γαστρικό $pH > 2,9$. Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι η έκθεση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε επιθανάτια επίπεδα όξινης καταπόνησης συγκεκριμένα στο ισχυρό ανόργανο οξύ HCl (υδροχλώριο) (κύριο συστατικό του γαστρικού υγρού) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη κατάφερε να επηρεάσει την επιβίωση του μικροοργανισμού (σημαντική μείωση του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου), με αποτέλεσμα ο μικροοργανισμός να φαίνεται ότι υφίσταται τη θανατηφόρο επίδραση του υδροχλωρικού οξέος. Επιπροσθέτως, ο αριθμός των βιώσιμων βακτηριακών κυττάρων φαίνεται να μην έχει τη δυνατότητα ανάπτυξης και σχηματισμού αποικιών μετά από τον ενοφθαλμισμό του σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (PALCAM *Listeria* agar (LAB 148)). Επιπλέον κατά τον υπολογισμό του αριθμού κυττάρων (CFU) (Colony Forming Unit), που επιτεύχθηκε με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης ώστε να γίνει αντιστοίχιση με βάση τους κύκλους ποσοτικοποίησης, που προέκυψαν από τη Real Time PCR των δειγμάτων, της ποσότητας του μικροοργανισμού στα τέσσερα στάδια της δειγματοληψίας (διάγραμμα 14 - Σταδίων και Πληθυσμού \log CFU/mL), παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός του *L. monocytogenes* μειώνεται σημαντικά σε όλα τα στάδια δειγματοληψίας και κυρίως κατά το στάδιο του εμβολιασμού του γαστρικού υγρού με καλλιέργειες του στελέχους *L. monocytogenes* R.9.1

και μετά το στάδιο της επώασης του ιζήματος του μικροοργανισμού σε δωδεκαδακτυλικό υγρό. Συγκεκριμένα από τους 12 ασθενείς που είχαν γαστρικό υγρό με $pH < 2,9$ σε 7 ασθενείς (2^{ος}, 3^{ος}, 7^{ος}, 11^{ος}, 12^{ος}, 13^{ος}, 15^{ος}) παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού κατά 3 λογαρίθμους (6.93±1.52, 5.87±0.55, 6.01±0.22, 5.94±0.2, 6.58±0.07, 6.58±0.09, 6.51±0.11 αντίστοιχα), σε 2 ασθενείς (9^{ος}, 10^{ος}) μείωση κατά 3.5 λογαρίθμους (5.69±0.29, 5.58±0.16 αντίστοιχα) και σε 3 (4^{ος}, 5^{ος}, 6^{ος}) ασθενείς μείωση κατά 2 λογαρίθμους (7.29±1.25, 7.24±0.15, 7,1±0.06 αντίστοιχα). Ακόμη στους 3 ασθενείς (1^{ος}, 8^{ος}, 14^{ος}) που είχαν γαστρικό υγρό με $pH > 2,9$ παρατηρήθηκε στον 1^ο ασθενή μεγαλύτερη πληθυσμιακή μείωση κατά 1,5 λογάριθμο (7.25±0.07) κατά το στάδιο της επαναδιάλυσης του ιζήματος του μικροοργανισμού σε γαστρικό υγρό, στον 8^ο ασθενή κατά 4 λογαρίθμους (5.16±0.25) κατά το στάδιο του εμβολιασμού του γαστρικού υγρού με καλλιέργειες του στελέχους *L. monocytogenes* R.9.1 και στον 14^ο ασθενή μείωση κατά 3 λογαρίθμους (6.04±0.1) μετά το στάδιο της επώασης του ιζήματος του μικροοργανισμού σε δωδεκαδακτυλικό υγρό.

Η λιστερίωση, όπως έχει προαναφερθεί, μεταδίδεται κυρίως μέσω κατανάλωσης «έτοιμων προς κατανάλωση» τροφίμων (Ready to eat – RTE foods) (Hof, 2003· McLauchlin *et al.*, 2004· Kathariou, 2002· Tompkin, 2002). Στο εσωτερικό του γαστρεντερικού σωλήνα, η λιστέρια αντιμετωπίζει μη ευνοϊκές συνθήκες περιβάλλοντος και ως εκ τούτου η επιβίωσή της στηρίζεται στη δυνατότητα να αντισταθμίζεται, να «διαισθάνεται» και να ανταποκρίνεται τις διακυμάνσεις του. Η ανθεκτικότητα στην όξινη καταπόνηση του *L. monocytogenes* ήταν το αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης κατά τη διάρκεια της προηγούμενης δεκαετίας, με πολλές μελέτες να συσχετίζουν την ανθεκτικότητα στην καταπόνηση με την παθογένεση του μικροοργανισμού (Conte *et al.*, 2000, 2002· Gahan και Hill, 1999). Επιπλέον το βακτήριο *L. monocytogenes* όχι μόνο επιζεί της όξινης καταπόνησης αλλά και απαιτεί πτώση του pH προκειμένου να ενεργοποιήσει την αιμολυσίνη του προκειμένου να διαφύγει από το μακροφάγο φαγόσωμα. Είναι εμφανές από τα παραπάνω αποτελέσματα ότι ο μικροοργανισμός κατάφερε να ενεργοποιήσει τους διάφορους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση (όπως είναι την αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού, την απαμινάση της αργινίνης και το σύστημα της F0F1 ΑΤΡασης), να ανταπεξέλθει στις ακραία όξινες συνθήκες του περιβάλλοντος (γαστρικό υγρό) και να επιβιώσει διατηρώντας την ομοιοστασία του. Το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι ένας σχετικά ανθεκτικός μικροοργανισμός, που έχει παρατηρηθεί να αναπτύσσεται σε χαμηλές τιμές pH περίπου 4.3 σε θρεπτικά μέσα που έχουν υποστεί ρύθμιση του pH με HCl (George *et al.*, 1988· Tienungoon *et al.*, 2000· Koutsoumanis *et al.*, 2004), αν και ακόμα χαμηλότερες τιμές έχουν επίσης καταγραφεί ανάλογα και με την αρχική συγκέντρωση του ενοφθαλμίσματος (Koutsoumanis και Sofos, 2005). Το HCl (υδροχλώριο) που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη των Koutsoumanis *et al.* (2004) είναι ένα ισχυρό ανόργανο οξύ και κατ'επέκταση αναποτελεσματικό στο να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να αναστείλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, με αποτέλεσμα αυτός να έχει τη δυνατότητα ανάπτυξης σε αρκετά χαμηλές τιμές pH. Έχει φανεί από μελέτες ότι τα κύτταρα *L. monocytogenes*, σε $pH < 4,3$ επιβιώνουν αλλά δεν πολλαπλασιάζονται (Swaminathan, 2001). Στο πείραμα των Conte *et al.*, (2002) κύτταρα δύο στελεχών *L. monocytogenes* (LM2 και ATCC 7644) θανατώθηκαν ταχέως κατά την έκθεση σε $pH 3,5$, >2h στους 37°C – πληθυσμιακή μείωση βιώσιμων κυττάρων 14 έως 33 φορές (ρύθμιση του pH του μέσου ανάπτυξης με γαλακτικό οξύ - το γαλακτικό είναι ασθενές οργανικό οξύ που επιτυγχάνει πολύ πιο εύκολα τη διείσδυση εντός του μικροβιακού κυττάρου – με την αδιάστατη μορφή του – και καταφέρνει να το αδρανοποιήσει (Phan-Thanh *et al.*, 2000· Jordan *et al.*, 1999), με αποτέλεσμα οι ελάχιστες τιμές pH στις οποίες η ανάπτυξη καθίσταται δυνατή να είναι σαφώς μεγαλύτερες από εκείνες του υδροχλωρίου). Ακόμη στο πείραμα των Mataragas *et al.*, (2013) κύτταρα

στελεχών (EGDe - ορότυπος 1/2a, 12 - ορότυπος 4b, 3 - ορότυπος 3c) του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* αποδείχθηκαν ευαίσθητα μετά την έκθεση τους σε συνθετικό γαστρικό και παγκρεατικό υγρό. Ωστόσο, ένας μικρός αριθμός των πληθυσμών επιβίωσαν στο τέλος της θεραπείας. Άλλοι συγγραφείς έχουν επίσης, διαπιστώσει μείωση του πληθυσμού του *L. monocytogenes* μετά από την έκθεσή του σε συνθήκες γαστρεντερικής οδού (Jiang, L. *et al.*, 2010).

Όσον αφορά τη γονιδιακή έκφραση, μεταβολή παρατηρήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεια του στελεχούς LQC 15257 (ορότυπος 4b) του παθογόνου *L. monocytogenes* όταν εκτέθηκε σε ανθρώπινο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό, σε σχέση με αντίστοιχη έκφρασή τους έπειτα από ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε γενικό θρεπτικό υπόστρωμα. Η έκφραση επηρεάστηκε κυρίως μετά το στάδιο της επώασης του μικροοργανισμού στο γαστρικό υγρό και κατά το στάδιο της επαναδιάλυσης του ιζήματος του μικροοργανισμού σε δωδεκαδακτυλικό υγρό. Η απόκριση σε διαφορετικούς περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες μπορεί να διαμορφώσει την λοιμογόνο έκφραση του παθογόνου *L. monocytogenes* (Brehm *et al.*, 1996). Ένα όξινο περιβάλλον, όπως αυτό που συναντάται από το βακτήριο κατά τη διέλευσή του μέσω της γαστρεντερικής οδού, μπορεί να θεωρηθεί ένα πρόσθετο κίνητρο για ενεργοποίηση της λοιμογόνου έκφρασης του παθογόνου, και αυτό είναι σύμφωνο με την απόδειξη ότι η επαγωγή της ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση (acid tolerance response - ATR) ενισχύει την επιβίωση του μικροοργανισμού τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (O'Driscoll *et al.*, 1996· Saklani-Jusforgues *et al.*, 2000).

Από τα γονίδια παθογένειας του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* που βρίσκονται υπό τον έλεγχο της ενεργοποιού πρωτεΐνης *prfA*, το γονίδιο *hly* παρουσίασε υπερέκφραση στο σύνολο των ασθενών (υπερεκφράστηκε στο γαστρικό υγρό 12/12 ασθενών με pH<2,9 έναντι 2/3 με pH>2,9 , από 3,16±0,45 έως 14,53±0,28 φορές μεγαλύτερες από την αντίστοιχη έκφρασή του στο γενικό θρεπτικό υπόστρωμα). Το γονίδιο *plcA* παρουσίασε υπερέκφραση σχεδόν στους μισούς ασθενείς (7 ασθενείς), ενώ το γονίδιο *plcB* υπερεκφράστηκε (από 2,17±0,02 έως 7,49±0,49 φορές) σε 12 ασθενείς. Το γονίδιο *hly* κωδικοποιεί τη λιστεριολυσίνη O (LLO), το γονίδιο *plcA* κωδικοποιεί τη φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη-φωσφολιπάση C (PI-PLC) και το γονίδιο *plcB* κωδικοποιεί τη φωσφατιδυλο-χολίνη-φωσφολιπάση C (PC-PLC) και με τη βοήθεια αυτών των ενζύμων, όταν ο μικροοργανισμός εισάγεται στο υγιές κύτταρο (φαγοκύτωση) μέσω σχηματισμού φαγοσωμάτων, αποδομεί τη διπλή λιπώδη μεμβράνη του φαγοσώματος, επέρχεται λύση της μεμβράνης και έτσι απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα όπου και πολλαπλασιάζεται. Η λιστεριολυσίνη O (LLO) είναι μια κυτταρολυσίνη (σχηματισμός πόρων) που απαιτεί τη χοληστερόλη ως υποδοχέα μεμβράνης (Geoffroy, C. *et al.*, 1987), ενώ η PI-PLC υδρολύει υπολείμματα φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης, που είναι διαδεδομένα στην κυτταροπλασματική πλευρά της φαγοσωμικής μεμβράνης (Goldfine, H., and C. Knob. 1992). Τόσο η LLO όσο και η PlcA εκφράζονται στο φαγόσωμα και συμβάλλουν στην κενοτοπιώδη διαφυγή, αλλά οι τιμές του pH για την ενζυματική τους δραστηριότητα είναι διαφορετικές. Η LLO απαιτεί ένα πιο όξινο pH (4,5 έως 6,5) από την PlcA (5.5 έως 7.5). Η μεταγραφή των παραπάνω γονιδίων ρυθμίζεται διαφορετικά ανάλογα με το pH των φαγοσωμάτων, εξασφαλίζοντας έτσι ότι η LLO και η PlcA θα παραχθούν σε περιβάλλοντα πιο ευνοϊκά για τις δραστηριότητές τους. Αμέσως μετά την κυτταρική εισβολή, το όξινο περιβάλλον του φαγοσώματος θα μπορούσε να αποτρέψει την έκφραση της PlcA, ενώ επιτρέπει στην LLO να συσσωρευτεί σε μια ενζυμικά ενεργή κατάσταση. Μέσω του σχηματισμού των πόρων από την LLO θα αυξηθεί το pH από όξινο σε ουδέτερο στο φαγόσωμα, αυξάνοντας έτσι την έκφραση της PlcA (Conte *et al.*, 2002).

Για τα γονίδια *inlA* και *inlB* παρατηρήθηκε κυρίως μη μεταβολή στην έκφρασή τους, ενώ το γονίδιο *inlJ* υπερεκφράστηκε σε 12 ασθενείς και το γονίδιο *inlC* ήταν αυτό που παρουσίασε και τη μεγαλύτερη υπερέκφραση (υπερεκφράστηκε στο γαστρικό υγρό 12/12 ασθενών με $\text{pH} < 2,9$ έναντι 2/3 με $\text{pH} > 2,9$) με τιμές από $3,08 \pm 1,60$ έως $26,93 \pm 0,82$ φορές μεγαλύτερες από την αντίστοιχη έκφρασή του στο γενικό θρεπτικό υπόστρωμα. Από τα παραπάνω παρατηρείται ότι τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού, μετά από *in vitro* έκθεση σε ανθρώπινο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό, μπορούν να προωθήσουν την διεισδυτικότητα και την προσκόλληση, ρυθμίζοντας (καταστολή) την έκφραση άλλων λοιμογόνων γονιδίων γεγονός που ενισχύεται από το ότι στο στάδιο μετά την επώαση του μικροοργανισμού στο γαστρικό υγρό το γονίδιο *sigB* (ρυθμιστής της προσαρμοστικής απόκρισης στην όξινη, οξειδωτική και ωσμωτική καταπόνηση του μικροοργανισμού, καθώς επίσης και σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και έλλειψης πηγής άνθρακα από το μέσο ανάπτυξης) παρουσίασε υποέκφραση από $2,31 \pm 0,31$ έως $5,65 \pm 0,49$ φορές σε 5 ασθενείς (2, 4, 8, 12, 14). Το γονίδιο *sigB* κωδικοποιεί τον παράγοντα σίγμα Β (σ^B), ο οποίος παίζει κείμερο ρόλο στη μεταγραφική διαδικασία των *gad* γονιδίων στο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* και στη ρύθμιση του συστήματος GAD (σύστημα αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (glutamate decarboxylase system, GAD) που προσδίδει στο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* την ανθεκτικότητα που χρειάζεται για να ανταπεξέλθει στις ακραία όξινες συνθήκες του περιβάλλοντος π.χ. γαστρικό υγρό. Το βακτήριο *L. monocytogenes* διαθέτει διάφορους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση όπως είναι την αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού, την απαμινάση της αργινίνης, το σύστημα της F0F1 ΑΤΡασης (Ryan S. *et al.*, 2008) και τον παράγοντα σ^B που σε όξινες συνθήκες ρυθμίζει τα γονίδια *gad* (*gadD1T1*, *gadD2T2* και *gadD3*), όπως έχουν δείξει μελέτες στα στελέχη *L. monocytogenes* LO28 και EGDe (Kazmierczak *et al.*, 2003· Wempkamp-Kamphuis *et al.*, 2004· Ryan, 2006), το οποίο θα μπορούσε να είναι μέρος μιας στρατηγικής του μικροοργανισμού να ενισχύσει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το στρες και να καταστείλει τη μεταγραφή γονιδίων μη συσχετιζόμενων με το στρες προκειμένου να επιβιώσει σε εχθρικά περιβάλλοντα. Στη μελέτη των Jiang, L. *et al.*, 2010 παρατηρήθηκε ότι σε στελέχη (οροτύπου 4b) του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* μετά από έκθεση σε συνθήκες που επικρατούν στη γαστρεντερική οδό ενισχύθηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το στρες (*clpC*, *clpE*, και *clpP*) και μειώθηκε η μεταγραφή ενός γονιδίου προσκολλησεως (*ami*) προκειμένου να επιβιώσει στα δυσμενή μικροπεριβάλλοντα. Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όπου το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *sigB* μειώθηκε μετά από έκθεση σε όξινο pH. Όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο *sigB* παρουσίασε σταθερότητα στην έκφρασή του στους 10 ασθενείς και υποέκφραση σε 5 ασθενείς (στο στάδιο μετά την επώαση του μικροοργανισμού στο γαστρικό υγρό). Το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι ικανό να επιβιώσει και να αντιγραφεί μέσα σε φαγοκύτταρα, το οποίο αποτελεί προϋπόθεση για να εξαπλωθεί σε γειτονικά περιβάλλοντα σε ένα πρώιμο στάδιο της μόλυνσης (Myers *et al.*, 2003; Lee and Swanson, 2007). Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι το γονίδιο *sigB* ρυθμίζει μεταγραφικά ένα σύνολο λοιμογόνων γονιδίων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (Chaturongakul *et al.*, 2008; Ollinger *et al.*, 2009; Sue *et al.*, 2004) και ότι ο παράγοντας σ^B αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή για τα γονίδια που σχετίζονται με το στρες. Ωστόσο η επαγωγή που δεν παρατηρήθηκε, μπορεί να οδηγήσει σε έκφραση άλλων γονιδίων τα οποία είναι σημαντικά για την ΑΤΡ (acid tolerance response). Στο πείραμα των Ferreira *et al.* (2003), αποδείχτηκε ότι υπάρχουν μηχανισμοί ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση εξαρτώμενοι και μη εξαρτώμενοι από τον παράγοντα σ^B . Στο στέλεχος *L. monocytogenes* 10403S αυτό που επίσης φάνηκε και έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι ότι η λειτουργία του GAD και στο στέλεχος με αδρανοποιημένο

το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα σ^B και στο άγριου τύπου στέλεχος δεν διέφερε, όπως επίσης διαφορά δεν παρατηρήθηκε και στη μετακίνηση πρωτονίων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, δείχνοντας μ' αυτό τον τρόπο ότι η δραστηριότητα του GAD δεν είναι εξαρτώμενη από το σ^B κατά τη διάρκεια της στάσιμης φάσης στο συγκεκριμένο τουλάχιστον στέλεχος (Cotter *et al.*, 2001· Ferreira *et al.*, 2003). Η μελέτη των Glaser *et al.* (2001) αποκαλύπτει ότι, μετά από ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους EGDe, ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* περιέχει τα γονίδια που απαιτούνται για τη λειτουργία του συστήματος απαμινάσης της αργινίνης. Το σύστημα απαμινάσης της αργινίνης (arginine deiminase – ADI) έχει βρεθεί σε διάφορα βακτήρια, εμπλέκεται συχνά στη βακτηριακή ανθεκτικότητα σε όξινα περιβάλλοντα (Gruening *et al.*, 2006) και συντελεί στη διατήρηση της ομοιόστασης του pH στο βακτήριο *L. monocytogenes*. Συνολικά τα δεδομένα μας καταδεικνύουν ότι, τα γονίδια *hly* και *inlC* υπερεκφράστηκαν στο γαστρικό υγρό 12/12 ασθενών με pH<2,9 έναντι 2/3 με pH>2,9 και 12/12 ασθενών με pH<2,9 έναντι 2/3 με pH>2,9, αντίστοιχα. Οι μεταβολές της έκφρασης των γονιδίων *sigB*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlJ*, *Imo2470* και *Imo2672* δεν συσχετίστηκαν με το pH του γαστρικού υγρού. Επιπλέον, ο πληθυσμός του *L. monocytogenes* μειώνεται σημαντικά όταν εκτίθεται σε ανθρώπινο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό και η μείωση αυτή είναι μεγαλύτερη σε χαμηλότερες τιμές pH.

Συμπερασματικά, μελέτες της γονιδιακής έκφρασης του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε συνθήκες που συνήθως συναντώνται κατά τη διάρκεια της πέψης στο στόμαχο και στο λεπτό έντερο μπορεί να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη βιολογία του παθογόνου και μπορεί να οδηγήσουν σε καλύτερη κατανόηση των στρατηγικών που χρησιμοποιεί για να διευκολύνει την επιβίωση και τη μετάδοσή του σε τέτοια περιβάλλοντα. Επιπροσθέτως, πρέπει να αναφερθεί ότι αυτή είναι η πρώτη μελέτη για την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό παθογένειας του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* μετά από *in vitro* έκθεση των βακτηριακών κυττάρων σε ανθρώπινο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό, που συλλέχθηκαν ενδοσκοπικά, χρησιμοποιώντας RT-PCR. Παρά το γεγονός ότι δεν μπορούν να βγουν οριστικά συμπεράσματα, λόγω των κοινών προβλημάτων που εμφανίζονται στα πειράματα που διεξάγονται *in vitro* (ασθενή έκφραση των γονιδίων), μια γενική τάση στη συμπεριφορά των βακτηριακών κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* μπορεί να παρατηρηθεί μετά από μια γαστρεντερική διέλευση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Ι. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Listeria spp.

**Θρεπτικό υλικό
(κωδικός αναφοράς)**

Συστατικά, συγκέντρωση (g/l), pH

1. ALOA (OXOID CM 1084
CHROMOGENIC LISTERIA
AGAR (ISO) BASE)

α) Βάση άγαρ:

Πεπτόνη κρέατος, 18,00· τρυπτόνη, 6,00·
εκχύλισμα ζύμης, 10,00· πυρουβικό νάτριο, 2,00·
γλυκόζη·2,00 γλυκεροφωσφορικό μαγνήσιο, 1,00·
θειικό μαγνήσιο, 0,50· χλωριούχο νάτριο, 5,00·
χλωριούχο λίθιο, 10,00· άνυδρο όξινο φωσφορικό
νάτριο, 2,50· 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολλυλ-β-D-
γλυκοπυρανοσίδιο, 0,05· άγαρ, 12.

β)Επιλεκτικοί παράγοντες

Ναλιδιξικό οξύ, 0,02· κεφταζιντίμη, 0,02·
κυκλοεξιμίδιο, 0,05· πολυμυξίνη Β, 76.700 IU.

Τελικό pH 7,2±0,2

2. Άγαρ PALCAM (LAB)

α) Βάση άγαρ (LAB 148):

Σύμπλεγμα πεπτόνης, 23,00· τρυπτόζη, 10,00·
πεπτόνη, 3,00· εκχύλισμα ζύμης, 3,00· άμυλο
αραβόσιτου, 1,00· χλωριούχο νάτριο, 5,00·
γλυκόζη, 0,50· μαννιτόλη, 10,00· αισκουλίνη,
0,80· κιτρικό αμμώνιο σιδήρου, 0,50· χλωριούχο
λίθιο, 15,00· ερυθρό της φαινόλης, 0,08· άγαρ
No.2, 12,00.

β) Επιλεκτικοί παράγοντες:

Πολυμυξίνη Β, 100.000 IU· κεφταζιντίμη, 0,020·
υδροχλωρική ακριφλαβίνη, 0,005.

Τελικό pH 7,2±0,2

PALCAM agar

Γενικά

Στερεό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και καταμέτρηση των στελεχών της *Listeria* spp.

Οδηγίες

Σε ζυγό ακριβείας 2 (δύο) δεκαδικών ψηφίων ζυγίστηκαν τα στερεά υλικά και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη του 1 (ενός) λίτρου. Στη συνέχεια σε αυτή προστέθηκαν 1000 ml αποσταγμένου νερού με τη βοήθεια ογκομετρικής φιάλης. Στη κωνική φιάλη προστέθηκε μαγνήτης που συνέβαλε στην ανάδευση των στερεών υλικών και πάωμα. Η φιάλη τοποθετήθηκε πάνω σε θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα, όπου και θα έγινε η ομογενοποίηση του υλικού. Μετά τη διαύγαση που επιτεύχθη στη κωνική φιάλη ακολούθησε η αποστείρωση του υλικού σε υγρή αποστείρωση για 15 λεπτά και σε συνθήκες 121⁰C και 1 atm. Μετά την αποστείρωση το υλικό θερμοστατήθηκε σε υδατόλουτρο στους 47⁰C και ακολούθησε η προσθήκη του συμπληρώματος X144 (LAB), με το οποίο ολοκληρώθηκε το θρεπτικό υλικό και ήταν έτοιμο για χρήση.

Χρήση

20 ml του Palcam agar ρίχτηκαν σε τρυβλία πετρί διαμέτρου 9 (εννέα) εκατοστών, τα οποία αφέθηκαν μέχρι το υλικό να πήξει και είτε χρησιμοποιήθηκαν άμεσα, είτε αποθηκεύθηκαν σε σκιερό περιβάλλον ανεστραμμένα και χρησιμοποιήθηκαν τις αμέσως επόμενες ημέρες.

ALOA (OXOID CM 1084 CHROMOGENIC LISTERIA AGAR (ISO) BASE)

Γενικά

Στερεό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και καταμέτρηση των στελεχών της *Listeria* spp.

Οδηγίες

Σε ζυγό ακριβείας 2 (δύο) δεκαδικών ψηφίων ζυγίστηκαν τα στερεά υλικά και ρίχτηκαν σε κωνική φιάλη του 1 (ενός) λίτρου. Στη συνέχεια σε αυτή προστέθηκαν 480 ml αποσταγμένου νερού με τη βοήθεια ογκομετρικής φιάλης. Στη κωνική φιάλη προστέθηκε μαγνήτης που συνέβαλε στην ανάδευση των στερεών υλικών και πάωμα. Η φιάλη τοποθετήθηκε πάνω σε θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα, όπου και έγινε η ομογενοποίηση του υλικού. Μετά τη διαύγαση που επιτεύχθη στη κωνική φιάλη ακολούθησε η αποστείρωση του υλικού σε υγρή αποστείρωση για 15 λεπτά και σε συνθήκες 121⁰C και 1 atm. Μετά την αποστείρωση το υλικό θερμοστατήθηκε σε υδατόλουτρο στους 46⁰C και ακολούθησε η προσθήκη του εκλεκτικού συμπληρώματος OCLA (ISO) (SRO226E), το οποίο είχε ανασυσταθεί σύμφωνα με τις οδηγίες, εφαρμόζοντας άσηπτη τεχνική και ενός φιαλιδίου Brilliance™ *Listeria* Selective Supplement (ISO) (SR0228E) ή ενός φιαλιδίου OCLA (ISO) Differential Supplement (SRO244E), με το οποίο ολοκληρώθηκε το θρεπτικό υλικό και μετά από καλή ανάμιξη ήταν έτοιμο για χρήση.

Χρήση

20 ml του Aloa agar ρίχτηκαν σε τρυβλία πετρί διαμέτρου 9 (εννέα) εκατοστών, τα οποία αφέθηκαν μέχρι το υλικό να πήξει και είτε χρησιμοποιήθηκαν άμεσα, είτε αποθηκεύθηκαν σε σκιερό περιβάλλον ανεστραμμένα και χρησιμοποιήθηκαν τις αμέσως επόμενες ημέρες.

II. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Θρεπτικό υλικό (κωδικός αναφοράς)	Συστατικά, συγκέντρωση (g/l), pH
1. BHI (LAB 048) Γενικό θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion Agar	τρυπτόζη, 10,00· χλωριούχο νάτριο, 5,00· γλυκόζη, 2,0· φωσφορικό νάτριο, 2,50· άγαρ No.2, 12,00· brain heart infusion solids (porcine) 17,50. Τελικό pH 7,4±0,2
2. BHI Broth (LAB 049) Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των βακτηρίων που απομονώθηκαν στο BHI agar θρεπτικό υπόστρωμα	τρυπτόζη, 10,00· χλωριούχο νάτριο, 5,00· γλυκόζη, 2,0· όξινο φωσφορικό νάτριο, 2,50· άγαρ No.2, 12,00· brain heart infusion solids (porcine) 17,50. Τελικό pH 7,4±0,2

BHI agar

Γενικά

Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα γενικής χρήσης με εφαρμογή στην απομόνωση και καταμέτρηση διάφορων μικροοργανισμών. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση των αποικιών του στελέχους *Listeria monocytogenes* R9.1.

Οδηγίες

Σε ζυγό ακριβείας 2 (δύο) δεκαδικών ψηφίων ζυγίστηκαν τα στερεά υλικά και ρίχτηκαν σε κωνική φιάλη του 1 (ενός) λίτρου. Στη συνέχεια σε αυτή προστέθηκαν 1000 ml αποσταγμένου νερού με τη βοήθεια ογκομετρικής φιάλης. Στη κωνική φιάλη προστέθηκε μαγνήτης που συνέβαλε στην ανάδευση των στερεών υλικών και πάμα. Η φιάλη τοποθετήθηκε πάνω σε θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα, όπου και έγινε η ομογενοποίηση του υλικού. Μετά τη διάγνωση που επιτεύχθη στη κωνική φιάλη ακολούθησε η αποστείρωση του υλικού σε υγρή αποστείρωση για 15 λεπτά και σε συνθήκες 121⁰C και 1 atm. Μετά την αποστείρωση το υλικό θερμοστατήθηκε σε υδατόλουτρο στους 47⁰C και ήταν έτοιμο για χρήση.

Χρήση

20 ml του BHI agar ρίχτηκαν σε τρυβλία πετρί διαμέτρου 9 (εννέα) εκατοστών, τα οποία αφέθηκαν μέχρι το υλικό να πήξει και είτε χρησιμοποιήθηκαν άμεσα, είτε αποθηκεύθηκαν σε σκιερό περιβάλλον ανεστραμμένα και χρησιμοποιήθηκαν τις αμέσως επόμενες ημέρες.

BHI Broth

Γενικά

Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα γενικής χρήσης που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη μικροοργανισμών που δεν έχουν απαιτήσεις σε ιδιαίτερες συνθήκες. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια (overnight culture) του στελέχους *Listeria monocytogenes* R9.1.

Οδηγίες

Σε ζυγό ακριβείας 2 (δύο) δεκαδικών ψηφίων ζυγίστηκαν τα στερεά υλικά και ρίχτηκαν σε κωνική φιάλη του 1 (ενός) λίτρου. Στη συνέχεια σε αυτή προστέθηκαν 1000 ml αποσταγμένου νερού με τη βοήθεια ογκομετρικής φιάλης. Στη κωνική φιάλη προστέθηκε μαγνήτης που συνέβαλε στην ανάδευση των στερεών υλικών και πόμα. Η φιάλη τοποθετήθηκε πάνω σε θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα, όπου και έγινε η ομογενοποίηση του υλικού. Μετά τη διαύγαση που επιτεύχθη στη κωνική φιάλη, το υγρό υλικό μοιράστηκε σε πλαστικούς περιέκτες falcon (χωρητικότητας 15 ml) με καπάκι και ακολούθησε η αποστείρωση του υλικού σε υγρή αποστείρωση για 120 λεπτά και σε συνθήκες 121⁰ C και 1 atm. Μετά την αποστείρωση το υλικό φυλάχτηκε σε σκιερό περιβάλλον και ήταν έτοιμο για χρήση.

Χρήση

Όταν χρειάστηκε πλαστικοί περιέκτες falcon (χωρητικότητας 15 ml) με 5 ml BHI broth βγήκαν από το μέρος όπου βρίσκονταν αποθηκευμένοι και χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ζωτικότητας και καθαρότητας των καλλιιεργειών μέσω ανανέωσης του στελέχους.

Ringer's



Γενικά

Οι ταμπλέτες ¼ Ringer's χρησιμοποιούνται κατά τις μικροβιολογικές δοκιμές.

Σύνθεση (σε gr/l)

- Sodium chloride 2.25g
- Potassium chloride 0.0105g
- Calcium chloride 0.12g
- Sodium bicarbonate 0.05g

Οδηγίες

2 (δύο) ταμπλέτες Ringer's προστέθηκαν σε φιάλη με 1000 ml αποσταγμένου νερού. Στη κωνική φιάλη προστέθηκε μαγνήτης που συνέβαλε στην ανάδευση των στερεών υλικών. Η φιάλη τοποθετήθηκε πάνω σε θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα, όπου και έγινε η ομογενοποίηση του υλικού. Μετά τη διάλυση που επιτεύχθη στη κωνική φιάλη, ακολούθησε η αποστείρωση του υγρού υλικού σε υγρή αποστείρωση για 15 λεπτά και σε συνθήκες 121⁰C και 1 atm. Μετά την αποστείρωση το υλικό φυλάχτηκε σε σκιερό περιβάλλον και ήταν έτοιμο για χρήση.

Buffered Peptone Water



Σύνθεση (σε gr/l)

- Βακτηριολογική πεπτόνη 10 gr
- Sodium chloride 5 gr
- Disodium hydrogen phosphate 3,6 gr
- Potassium dihydrogen phosphate 1,5 gr
- Αποσταγμένο νερό 1000 ml
- Τελικό pH $7,2\pm 0,2$

Γενικά

Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται κατά τις μικροβιολογικές δοκιμές στην αραίωση των δειγμάτων και συγκεκριμένα στη δημιουργία δεκαδικών αραιώσεων.

Οδηγίες

Σε ζυγό ακριβείας 2 (δύο) δεκαδικών ψηφίων ζυγίστηκαν τα στερεά υλικά και ρίχτηκαν σε κωνική φιάλη του 1 (ενός) λίτρου. Στη συνέχεια σε αυτή προστέθηκαν 1000 ml αποσταγμένου νερού με τη βοήθεια ογκομετρικής φιάλης. Στη κωνική φιάλη προστέθηκε μαγνήτης που συνέβαλε στην ανάδευση των στερεών υλικών και πάμα. Η φιάλη τοποθετήθηκε πάνω σε θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα, όπου και έγινε η ομογενοποίηση του υλικού. Μετά τη διάλυση που επιτεύχθη στη κωνική φιάλη, το υγρό υλικό μοιράστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με καπάκι και ακολούθησε η αποστείρωση του υλικού σε υγρή αποστείρωση για 15 λεπτά και σε συνθήκες 121°C και 1 atm. Μετά την αποστείρωση το υλικό φυλάχτηκε σε σκιερό περιβάλλον και ήταν έτοιμο για χρήση.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Augustin, J.C. 1996. Resistance of *Listeria monocytogenes* to physical processing, *Pathologie Biologie*, 44 (9), 790-807.
2. Bearns, R.E., and Gerard, K.F. 1958. The effect of pasteuration on *Listeria monocytogenes*. *Can.J. Microbiol.*, 4, 55-61.
3. Bojsen-Moller, J. 1972. Human listeriosis: diagnostic, epidemiologic and clinical studies. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect., B Suppl.* 229,72-92.
4. Boyle, D.L., Sofos, J.N. and Schmidt, G.R. 1990. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in a meat slurry and in ground beef. *J. Food Sci.*, 55, 327-329
5. Bradshaw, J.G., Peeler, J.T., Corwin, J.J., Hunt, J.M., Tierney, J.T., Larkin, E.P., and Twedt, R.M. 1985. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *J. Food Prot.*, 48, 743-745.
6. Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Procter, M.E. and Friffin. P.M. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.*, 336, 100-105.
7. de Valk, H., Vaillant, V., Pierre, V., Rocourt, J., Jacquet, C., Lequerrec, F., Thomas, J.C. and Goulet, V. 1998. Risk factor for sporadic listeriosis in Franche. <http://www.invs.cante.fr/epiet/seminars/1998/valk.html>.
8. Ericsson, H., Eklow, W., Danielson-Tham, M.L., Loncarevic, S., Metzging, L.O., Person, I., Unnerstad, H. and Tham W. 1997. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 2904-2907.
9. Fain, A.R., Line, L.E., Morgan, A.B., Martin, L.M., Lecowich, R.V., Carosella, J.M. and Brown, W.L. 1991. Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D- value and z-value determinations in ground beef and turkey. *J. Food Prot.*, 54, 756-761.
10. Farber, J.M. 1989. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 8, 285-291.
11. Farber, J.M., and Peterkin. P.I. 1999. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products, In: E.T. Ryser and E.H. Marth (ed). *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2nd ed. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., pp. 505-564.
12. George, S.M., Richardson, L.C.C., Pol, I.E., Peck, M.W., 1998. Effect of oxygen concentration and redox on recovery of sublethally heat-damaged cells of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 903-909.
13. Glass, K.A. and Doyle. M.P. 1989. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1565-1569.
14. Grau, F.H. and Vanderlinde, P.B. 1992. Occurrence, numbers and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *J. Food Prot.*, 55, 4-7.
15. Huss, H.H., Reilly, A.A. and Ben Embarek. P.K. 2000. Prevention and control of safety hazards in cold smoked salmon production. *Food Control*, 11, 149-156.
16. Janda, J.M. and Abbott, S.L. 1999. Unusual food-borne pathogens. *Clinical Laboratory Medicine*, 19, 553-582.

17. Joeng, D., and Frank. J. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *J. Food Prot.*, 57, 576-586.
18. Jurado, R., Farley, M., Pereira, E., Harvey, R., Schuchat, A., Wenger, J. and Stephans, D. 1993. Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patient with human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.*, 17, 224-227.
19. Kim, K., Murano, E.A. and Olson D.G. 1994. Heating and storage conditions affect survival and recovery of *Listeria monocytogenes* in ground pork. *J. Food Sci.*, 59, 30-32.
20. Knabel, S.J., Walker, H.W., Hartman, P.A. and Mendoca, A.F. 1990. Effect of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteuration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 370-376.
21. Kolb-Maurer, A., Gentschev, I., Fries, H.W., Fiedler, F., Brocker, E.B., Kampgen, E., and Goebel, W. 2000. *Listeria monocytogenes*-infected human dendritic cells: uptake and host cell response. *Infect. Immun.*, 68, 3680-3688.
22. Lou, Y. and Yousef, A.E. 1999. Characteristics of *Listeria monocytogenes* importance to food processors, In: E.T. Riser and E.H. Marth (ed.), *Listeria Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2nd ed. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., pp.131-224.
23. Mackey, B.M., Prichett, C., Norris, A. and Mead, G.C. 1990. Heat resistance of *Listeria*: Strain differences and effects of meat type and curing salts. *Lett. Appl. Microbiol.*, 10, 251-255.
24. Northholt, M.D., Beckers, H.J., Vecht, U., Toepoel L., Soentoro P.S.S. and Wisselink, H.J. 1988. *Listeria monocytogenes*: heat resistance and behavior during storage of milk and whey and making of Dutch type of cheesew. *Neth. Milk Dairy J.*, 42, 207-219.
25. Nyati H. 2000. Survival characteristics and the applicability of predictive mathematical modeling to *Listeria monocytogenes* growth in sous vide products. *International J. Food Microbiol.*, 56, 123-132.
26. Rocourt, J. 1999. The genus *Listeria* and *Listeria monogytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification, In: E.T. Ryser and E.H. Marth (ed). *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2nd ed. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., pp. 1-20.
27. Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S. and Broome, C.V. 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.*, 308, 203-206.
28. Schuchat, A., Swaminathan, B., Broome, C.V. 1991. Epidemiology of Human Listeriosis, *Clinical Microbiology Reviews*, 4 (2), 169-183.
29. Schwartz, B., Hexter, D., Broome, C., Hightower, A., Hischorn, R., Porter, J., Hayes, P., Bibb, W. Lorber, B. and Faris, D. 1989. Investigation of an outbreak of listeriosis: new hypothesis for etiology for epidemic *Listeria monocytogenes* infections. *J. Infect. Dis.*, 159, 680-685.
30. Shahamat, M., Seaman A. and Woodbine, M. 1980. Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentration. *Zentbl. Bakteriол. Hyg. Abt. 1 Orig. A* 246, 506-511.

31. Slutsker, L., and Schuchat, A. 1999. Listeriosis in humans. In: E.T. Riser and E.H. Marth (ed.), *Listeria Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2nd ed. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., pp.75-95.
32. Socolovic, Z., Fuchs, A., and Goebel, W. 1990. Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immune.*, 58, 3582-3587.
33. Sutherland, P.S., 1989. *Listeria monocytogenes*. Food borne Microorganisms of Public Health Significance, 4th Edition, AIFST NSW Food Microbiology Group, Sydney.
34. Swaminathan, B. 2001. *Listeria monocytogenes*. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd Ed. M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville (eds), ASM Press, Washington, D.C. p. 383.
35. Varabiouff, Y. 1992. Incidence of *Listeria* in smallgoods. *Lett. Appl. Microbiol.*, 14, 167-169.
36. Walker, E.T., Archer, P. and Banks, J.G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 157-162.
37. Watkins, J., and K. P. Sleath. 1981. Isolation and enumeration of *L. monocytogenes* from sewage, sewage sludge, and river water. *J. Appl. Bacteriol.*, 50, 1-9.
38. Weis, J. 1975. The incidence of *L. monocytogenes* on plants and in soil, In: M. Woodbine (ed.), *Problems of listeriosis*. Leicester University Press, Leicester, England. pp. 61-65.
39. Welshimer, H.J. 1968. Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. *J. Bacteriol.*, 95, 300-303.
40. Welshimer, H.J. 1960. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *J. Bacteriol.*, 80, 316-320.
41. Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 34, 597-601.
42. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402-408.
43. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B. & Strombom L. *et al.*, (2006). The real time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27 : 95-125.
44. Arya M., Shergill I., Williamson M., Gommersall L., Arya N. and Hiteudra RH. P., 2005. "Basic principles of Real Time quantitative PCR". *Expert Reviews Molecular Diagnostics*, London, UK. Vol 5 No2, Σελ 209-219. http://www.unictbiolmollab.it/figure_didattica/exp%20rev%20mol%202005-209.pdf.
45. Applied Biosystems, 2003. "Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Template for use in Quantitative PCR". Applied Biosystems. Σελ.19. http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.
46. Biochemica, 2001. "New FastStart Taq DNA Polymerase Broadens PCR Product Line". Biochemica. No 1, Σελ 27-29. http://www.rocheapplied-science.com/PROD_INF/BIOCHEMI/No1_01/PDF/b101leous.pdf.
47. Bio-rad, 2010. "Real Time PCR Chemistries". Bio-Rad Laboratories, Inc. <http://www3.bio-rad.com/>.
48. Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L. M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D., Wengenack N. L., Rosenblatt J. E., Cockerill F. R. and Smith T. F., 2006. "Real- Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory

- Testing”. *Clin Microbiol Rev.* Vol 19, No 1, Σελ 165–256.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1360278/>.
49. Hunt M., 2006. “Real Time PCR Tutorial”. University of South Carolina.
<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>.
 50. Pfaffl M.W., 2002. “Chapter 3: A-Z of quantitative PCR”. Εκδόσεις S.A. Bustin.
 International University Line, La Jolla, CA. Σελ 1-23.
 51. Stratagene, 2006. “Introduction to Quantitative PCR”. Stratagene, La Jolla, CA.
 Σελ. 3-8, 9-11,23-26.
 52. Vierstraete A., 1999. “Principle of PCR”. Εκδόσεις University of Ghent.
<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
 53. Bustin SA, Nolan T. “Analysis of mRNA expression by Real-Time PCR”, Chapter
 7. Real-Time PCR, an essential guide. Horizon Bioscience ed. 125- 184, 2004.
 54. Mackay IM. Real-Time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*
 2004; 10: 190-212.
 55. Pfaffl MW. Chapter 3: Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA
 (ed) *A-Z of quantitative PCR*. International University Line (IUL), La Jolla, CA,
 USA, 2004: 89-113.
 56. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in rea-ltime
 RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2002-2007.
 57. Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, *et al.* *Listeria* pathogenesis and molecular
 virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:584–640.
 58. Pizarro-Cerd’a J, Cossart P. The cell biology of invasion and intracellular growth by
Listeria monocytogenes. In *Gram Positive Pathogens* (3rd edn), Fischetti VA,
 Novick RP *et al* (eds). Academic Press: London, 2006; 646–656.
 59. Dussurget O, Pizarro-Cerd’a J, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria*
monocytogenes virulence. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:587–610.
 60. Dongyou Liu (2008). Handbook of *Listeria monocytogenes* p. 97-124, 169-187,
 241-260, 322-398
 61. Bearson Shawn, Bearson Bradley, Foster John W. (1997). Acid stress responses in
 enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 147 (1997) 173-180.
 62. Begley, M., Gahan, C.G.M., and Hill, C., (2002). Bile stress response in *Listeria*
monocytogenes LO28: adaptation, cross-protection and identification of genetic loci
 involved in bile resistance, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 6005.
 63. Conte, M.P. *et al.* (2002). Effect of acid adaptation on the fate of *Listeria*
monocytogenes in THP-1 human macrophages activated by gamma interferon,
Infect. Immun., 70, 4369.
 64. Conte, M.P. *et al.* (2000). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes* influences
 invasiveness of enterocyte-like cells and macrophage cells, *Microbial Pathog.*
 29,137.
 65. Cotter, P. D. *et al.* (2005). Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected
Listeria monocytogenes strains is associated with an ability to grow at low pH,
Appl. Environ. Microbiol., 71, 2832.
 66. Cotter, P., Gahan, C.G.M., and Hill, C., (2001). A glutamate decarboxylase system
 protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid, *Mol. Microbiol.*, 40, 465.
 67. Cotter, P. D., Gahan, C.G.M., and Hill, C., (2000). Analysis of the role of the
Listeria monocytogenes F0F1 ATPase operon in the acid tolerance response, *Int. J.*
Food Microbiol. 60, 137.

68. Davis, M. J., Coote, P. J., and O'Byrne, C. P. (1996). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: The adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phasedependent acid resistance. *Microbiology* 142(Pt 10), 2975–2982.
69. den Bakker, H.C.; Manuel, C.S.; Fortes, E.D.; Wiedmann, M.; Nightingale, K.K. Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradonensis* subsp. nov., isolated from a ranch. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*,2013, 63, 3257-3268.
- 70.
71. Farber, J. M., Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol Rev* 55: 476–511.
72. Farber, J.M., Sanders, G.W., Dunfield, S., Prescott, R., 1989. The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 9, 181–183.
73. Ferreira, A. *et al.* (2003). Role of *Listeria monocytogenes* σ B in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2692.
74. Formato, G., Geornaras, I., Barmpalia, I. M., Skandamis, P. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., Kendall, P. A., Smith, G. C., and Sofos, J. N. (2007). Effect of acid adaptation on growth during storage at 10 degrees C and resistance to simulated gastric fluid of *Listeria monocytogenes* inoculated onto bologna formulated with or without antimicrobials. *J. Food Prot.* 70, 65–69.
75. Gahan, C. G. M., and Hill, C., (1999). The relationship between acid stress responses and virulence in *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 93.
76. Kazmierczak, M. J. *et al.* (2003). *Listeria monocytogenes* σ B regulates stress response and virulence functions, *J. Bacteriol.*, 185, 5722.
77. O'Byrne, Conor P. and Karatzas, Kimon A. G. (2008). The Role of Sigma B (σ^B) in the Stress Adaptations of *Listeria monocytogenes*: Overlaps between Stress Adaptation and Virulence. *Advances in Applied Microbiology*, ISSN 0065-2164, DOI: 10.1016/S0065-2164(08)00605-9.
78. Sleator, R. D., Gahan, C. G., and Hill, C. (2003). A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1–9.
79. Wempkamp-Kamphuis, H. H. *et al.* (2004). Identification of sigma factor σ B-controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3457.
80. Abram, F., Starr, E., Karatzas, K. A., Matlawska Wasowska, K., Boyd, A., Wiedmann M., *et al.* (2008). Identification of components of the Sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6848–6858. doi:10.1128/AEM.00442-08
81. Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P., *et al.* (2002). *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol. Microbiol.* 45, 1095–1106. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03080.x
82. Payne, A., Schmidt, T. B., Nanduri, B., Pendarvis, K., Pittman, J. R., Thornton, J. A., *et al.* (2013). Proteomic analysis of the response of *Listeria monocytogenes* to bile salts under anaerobic conditions. *J. Med. Microbiol.* 62, 25–35. doi: 10.1099/jmm.0.049742-0
83. Ryan, S., Begley, M., Gahan, C.G., and Hill, C. (2009). Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in

- acid tolerance. *Environ. Microbiol.* 11, 432–445. doi:10.1111/ j. 1462-2920.2008.01782.x
84. Sleator, R.D., Watson, D., Hill, C., and Gahan, C.G. (2009). The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. *Microbiology* 155, 2463–2475. doi:10.1099/mic.0.030205-0
85. Sleator, R.D., Wemekamp-Kamphuis, H.H., Gahan, C.G., Abee, T., and Hill, C. (2005). A PrfA-regulated bile exclusion system (BiE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 55, 1183–1195. doi:10.1111/ j.1365-2958.2004.04454.x
86. Smith, J.L., Liu, Y., and Paoli, G.C. (2013). How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions? *Can. J. Microbiol.* 59, 141–152. doi:10.1139/cjm-2012-0392
87. Έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο: Nucleospin® RNA, DNA, RNA and protein purification Kit. Macherey-Nagel
88. Έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο: SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA)
89. Έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο: KAPA SYBR® FAST qPCR master mix (KAPA BIOSYSTEMS)

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Τα στάδια της PCR και τρόπος λειτουργίας της μεθόδου.....	19
Εικόνα 2: Με την οριοθέτηση του σημείου threshold γίνεται πιο εύκολος ο προσδιορισμός της τιμής Ct.....	21
Εικόνα 3: Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green I. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος	22
Εικόνα 4: Αρχή της μεθόδου Taqman probes. Διακρίνονται οι δύο εκκινητές καθώς και ο ειδικός ανιχνευτής, ο οποίος προσδέεται σε εσωτερική αλληλουχία του προϊόντος. Η δράση 5'-νουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, συμβάλλει στην υδρόλυση του ανιχνευτή, και κατ' επέκταση στην απελευθέρωση της φθορίζουσας χρωστικής που βρίσκεται στο 5' άκρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού, ο οποίος αυξάνεται ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος κατά την αντίδραση ενίσχυσης.....	23
Εικόνα 5: Αρχή της μεθόδου Molecular Beacon. Όταν το ολιγονουκλεοτίδιο βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα σχηματίζει μια δομή, η οποία αποτελείται από ένα δίκλωνο μίσχο και μία μονόκλωνη θηλιά. Η δομή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τα δύο μόρια χρωστικής, που βρίσκονται στα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου, να έρχονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο, κάτι που αποτρέπει την παραγωγή φθορισμού λόγω του φαινομένου FRET. Η πρόσδεση του ολιγονουκλεοτιδίου στο προϊόν της αντίδρασης συμβάλλει στην απομάκρυνση των δύο χρωστικών, στην αδυναμία εκδήλωσης του φαινομένου FRET και κατά συνέπεια στην παραγωγή φθορισμού.....	24
Εικόνα 6: Σχηματική παράσταση Real Time PCR με Scorpion εκκινητές.....	25
Εικόνα 7: Αρχή της μεθόδου Hybridisation probes.....	26
Εικόνα 8: Μετά το τέλος της αντίδρασης η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται σε γράφημα ως μια ευθεία γραμμή που εκφράζει τον αριθμό των αντιγράφων του αρχικού μάρτυρα και τις Ct values της κάθε αραίωσης. Η καμπύλη αναφοράς πρέπει να βασίζεται σε τουλάχιστον 4 σημεία (γνωστή συγκέντρωση) και θα πρέπει τα σημεία αυτά να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων. Στην περίπτωση που δεν καλύπτει όλο το εύρος των συγκεντρώσεων τότε μπορεί η ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη δειγμάτων να μην είναι αξιόπιστη (Stratagene, 2006). Στη συνέχεια μπορεί με την βοήθεια της συσκευής της Real time PCR να γίνει σύγκριση των τιμών Ct των πειραματικών δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και έτσι να ποσοτικοποιηθούν τα άγνωστα δείγματα.....	27
Εικόνα 9: Σύγκριση καμπύλης του υπο μελέτη γονιδίου (γονίδιο στόχος) με το γονίδιο αναφοράς (reference gene).....	29
Εικόνα 10: Παράδειγμα καμπύλης αποδιάταξης στην οποία εμφανίζονται τρεις διαφορετικές κορυφές (Α, Β και Γ). Η υψηλότερη κορυφή (Γ) αντιστοιχεί στην θερμοκρασία αποδιάταξης του επιθυμητού προϊόντος. Οι κορυφές Α και Β αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης από αυτή της κορυφής Γ(Lee, 2006).....	30
Εικόνα 11: Διάγραμμα με τον βασικό τρόπο λειτουργίας γενικά όλων των συσκευών Real Time PCR (Fraga, 2008).....	31
Εικόνα 12: Η συσκευή StepOne Plus Real Time PCR της εταιρείας Applied Biosystems International.....	32
Εικόνα 13: Αναλυτική περιγραφή των τμημάτων που αποτελούν την συσκευή StepOne Plus Real Time PCR της εταιρείας Applied Biosystems International.....	33

Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών σταδίων δράσης του βακτηρίου *L. monocytogenes* καθώς και των γνωστών γονιδίων που συνδέονται με τη λοιμοτοξικότητά της. Απεικονίζεται ο ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής του μικροοργανισμού, την προσκόλληση του μικροοργανισμού στο κύτταρο-ξενιστή, την είσοδό του στο κύτταρο, το βακτήριο εντός του κενотоπίου, το βακτήριο ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα, την προώθηση του βακτηρίου και τέλος το βακτήριο περιβαλλόμενο από διπλή μεμβράνη κατά την εξάπλωσή του από κύτταρο σε κύτταρο. Λοιμογόνοι παράγοντες που ρυθμίζονται στο μεταγραφικό (PrfA, PrfA και σB, VirR), μετα-μεταγραφικό (Hfq) και μετα-μεταφραστικό (SrtA, SecA2) επίπεδο επισημαίνονται αναλόγως. CAMPs: κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια, H3 and H4: ιστόνες 3 and 4, ROS: reactive oxygen species (σημαντικοί μεσολαβητές της μικροβιοκτόνου δράσης των φαγοκυττάρων).....**36**

Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μοντέλου δράσης του συστήματος ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση. (Richard και Foster, 2003).....**40**

Εικόνα 16: Γονίδια εξαρτώμενα από τον παράγοντα σ^B που απαιτούνται για την επιβίωση και τον αποικισμό του ξενιστή από το τροφιμογενές παθογόνο *L. monocytogenes*. Τα κύτταρα του βακτηρίου *L. monocytogenes* προσλαμβάνονται μαζί με τα μολυσμένα τρόφιμα και μετά το πέρασμα μέσω του οισοφάγου εισέρχονται στο στομάχι, όπου τα γονίδια *gadD2*, *gadT2* παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση σε όξινες συνθήκες (Cotter *et al.*, 2001a). Στο δωδεκαδάκτυλο, ο συνδυασμός της υψηλής οσμωτικής πίεσης και της χολής, οδηγεί στην ενεργοποίηση του γονιδίου *opuCA*, *bsh* (Sue *et al.*, 2004), και του *bilE* (Sleator *et al.*, 2005), ενώ στη χοληδόχο κύστη του *bsh* (Sue *et al.*, 2004), του *bilE* (Sleator *et al.*, 2005) και του *rvA* (Begley *et al.*, 2005), όλα γονίδια σημαντικά για την επιβίωση του βακτηρίου. Όταν τα κύτταρα είναι στο λεπτό έντερο τα γονίδια που ενεργοποιούνται είναι τα *opuCA*, *bsh* (Sue *et al.*, 2004), *bilE* (Sleator *et al.*, 2005), και, τέλος, τα γονίδια *inlA* και *inlB* (Lecuit *et al.*, 2004), τα οποία βοηθούν την βακτηριακή είσοδο στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Ο ρόλος του μεταγραφικού ενεργοποιητή (PrfA) των γονιδίων παθογένειας, φαίνεται να είναι σε μεγάλο βαθμό επουσιώδης για την επιβίωση του μικροοργανισμού εντός του γαστρεντερικού σωλήνα (Faith *et al.*, 2005)..... **43**

Εικόνα 17: Περιγραφή της μεθόδου σύνθεσης του cDNA με αντίστροφη μεταγραφή. Μετά την υβριδοποίηση των κατάλληλων εκκινητών, η αντίστροφη μεταγραφή συνθέτει συμπληρωματικό cDNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα mRNA. Επίσης, το RNA των RNA-cDNA υβριδίων υδρολύεται χωρίς να επηρεάζει το ελεύθερο RNA, οπότε στο τέλος της αντίδρασης υπάρχει μόνο μονόκλωνο cDNA.....**54**

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ - ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Πίνακας 1: Γονίδια του βακτηρίου <i>L. monocytogenes</i> γνωστά για την λοιμοτοξικότητά τους.....	37
Πίνακας 2: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν	47
Πίνακας 3: Primers που χρησιμοποιήθηκαν στην Real Time PCR	61
Πίνακας 4: Γονίδια που μελετήθηκαν και αποδοτικότητα μεθόδου	65
Πίνακας 5: Επεξεργασμένα δεδομένα του γονιδίου <i>IGS</i>	65
Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης που σχηματίζεται από πέντε σημεία, δηλαδή από πέντε αραιώσεις του γονιδίου <i>inlB</i>	62
Διάγραμμα 2: (Μικροβιακές Αναλύσεις) Διάγραμμα Σταδίων 1-2-3-4 (x) – log CFU /mL(y).....	64
Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς (standard curve) που σχηματίζεται από πέντε σημεία, δηλαδή από πέντε αραιώσεις του γονιδίου αναφοράς <i>IGS</i>	66
Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου <i>sigB</i> σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα log ₂	67
Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου <i>plcA</i> σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα log ₂	68
Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου <i>inlA</i> σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα log ₂	69
Διάγραμμα 7: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου <i>inlB</i> σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα log ₂	69
Διάγραμμα 8: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου <i>plcB</i> σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα log ₂	70
Διάγραμμα 9: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου <i>inlJ</i> σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα log ₂	71
Διάγραμμα 10: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου <i>lmo2470</i> σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα log ₂	71
Διάγραμμα 11: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου <i>lmo2672</i> σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα log ₂	72
Διάγραμμα 12: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου <i>hlyA</i> σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα log ₂	72
Διάγραμμα 13: Αποτελέσματα RT-PCR. Παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου <i>inlC</i> σε σχέση με τα στάδια δειγματοληψίας για το σύνολο των ασθενών. Τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα log ₂	73

Διάγραμμα 14: Αποτελέσματα υπολογισμού CFU (Colony Forming Unit) - Διάγραμμα Σταδίων

1-2-3-4(x)- logCFU /mL(y).....74

