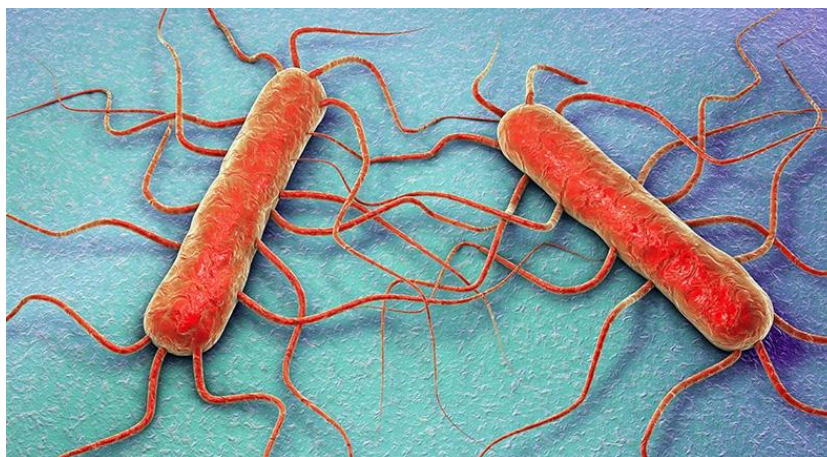




**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΠΟΤΩΝ  
ΠΜΣ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
Κατεύθυνση: “Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων”

**Μελέτη της έκφρασης γονιδίων παθογένειας της *Listeria monocytogenes* σε υγρό θρεπτικό μέσο και σε φυτικές επιφάνειες**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**  
**ΚΩΤΣΑΚΟΥ Β. ΧΡΙΣΤΙΝΑ**  
Επιβλέπων: Δρ. Δροσινός Ελ.

ΑΘΗΝΑ 2017

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

ΠΜΣ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
Κατεύθυνση: “Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων”

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία

Μελέτη της έκφρασης γονιδίων παθογένειας της *Listeria monocytogenes*  
σε υγρό θρεπτικό μέσο και σε φυτικές επιφάνειες

**ΚΩΤΣΑΚΟΥ Β. ΧΡΙΣΤΙΝΑ**

Επιβλέπων: Δρ. Δροσινός Ελ., Καθηγητής

Αθήνα 2017

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία

Μελέτη της έκφρασης γονιδίων παθογένειας της *Listeria monocytogenes*  
σε υγρό θρεπτικό μέσο και σε φυτικές επιφάνειες

ΚΩΤΣΑΚΟΥ Β. ΧΡΙΣΤΙΝΑ

Επιβλέπων: Δρ. Δροσινός Ελ., Καθηγητής

Μέλη εξεταστικής επιτροπής: Δρ. Νυχάς Γ.Ι., Καθηγητής

Δρ. Σκανδάμης Π., Αν. Καθηγητής



**AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS**  
**DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE & HUMAN NUTRITION**  
Laboratory of Food Quality Control and Hygiene

MASTER PROGRAM  
IN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY & HUMAN NUTRITION

**EXPRESSION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* KEY  
VIRULENCE GENES IN LIQUID MEDIUM AND ON  
PLANT SURFACES**

**By**

**Kotsakou Christine**

Master Thesis submitted to the Department of Food Science & Human Nutrition of the Agricultural University of Athens in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Food Safety and Food Quality Management Systems

**Athens, Greece, July 2017**

## ***A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ***

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης γονιδίων παθογένειας του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια ανάπτυξής του σε υγρό θρεπτικό υλικό καθώς και στην επιφάνεια τομάτας, καρότου και αγγουριού, σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Για το σκοπό αυτό, το παθογόνο *L. monocytogenes* στέλεχος LQC 15257 ορότυπος 4b απομονωμένο από φράουλα, ενοφθαλμίστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό BHI (108 CFU/mL) καθώς και στην επιφάνεια τεμαχίων τομάτας, καρότου και αγγουριού (108 CFU/g). Ακολούθησε επώαση σε τρεις θερμοκρασίες 4, 10 και 30 °C κατά τη διάρκεια της οποίας πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό (0 ώρες) καθώς και μετά από 0.5, 6 και 24 ώρες. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την συγκριτική μελέτη της έκφρασης των γονιδίων παθογένειας *prfA*, *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ* με εφαρμογή της μεθόδου RT-qPCR, χρησιμοποιώντας ως γονίδια αναφοράς τα *16S*, *rpoB* και *IGS*. Καλλιέργεια του παθογόνου σε BHI υγρό θρεπτικό υλικό που επώαστηκε στις ίδιες θερμοκρασίες, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Η έκφραση των γονιδίων επηρεάστηκε από την θερμοκρασία, τον χρόνο επώασης καθώς και το είδος του τροφίμου-υποστρώματος. Μόνο τα *inlC* και *inlJ* παρουσίασαν το ίδιο μοτίβο έκφρασης και συγκεκριμένα εμφάνισαν ρύθμιση μείωσης (downregulation), όταν το παθογόνο αναπτύχθηκε σε αγγούρι και τομάτα στους 10 και 4 °C, αντίστοιχα. Η μεταγραφή του γονιδίου *hly* επηρεάστηκε περισσότερο από τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν εμφανίζοντας ρύθμιση μείωσης κατά την ανάπτυξη σε αγγούρι στους 10 και 30 °C, σε τομάτα στους 4 και 10 °C και σε καρότο στους 10 °C, ενώ εμφάνισε ρύθμιση αύξησης (upregulation) κατά την ανάπτυξη σε τομάτα στους 30 °C και σε καρότο στους 4 °C. Αντίθετα, τα γονίδια *sigB* και *prfA* επηρεάστηκαν πολύ λιγότερο εμφανίζοντας ρύθμιση μείωσης κατά την ανάπτυξη σε τομάτα στους 4°C και σε αγγούρι στους 10 °C, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι αβιοτικοί παράγοντες δύνανται να επηρεάζουν την έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων παθογένειας, επισημαίνουν την περιπλοκότητα του φαινομένου της ρύθμισης των γονιδίων και διευκολύνουν την κατανόηση της φυσιολογίας του εν λόγω παθογόνου κατά τη ανάπτυξή του σε τρόφιμο ως υπόστρωμα.

Λέξεις-κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, λοιμογόνα γονίδια, υγρό θρεπτικό υλικό, τομάτα, αγγούρι, καρότο, έκφραση γονιδίων, παθογένεια

## ***B. ABSTRACT***

The aim of the present study was to investigate the expression of *Listeria monocytogenes* key virulence genes during growth in liquid medium, on tomato, carrot and cucumber at different temperatures. For that purpose, *L. monocytogenes* strain LQC 15257, serotype 4b, isolated from strawberry was used to inoculate BHI broth (108 CFU/mL) and the surface of tomato, carrot and cucumber pieces (108 CFU/g) and incubated at 4, 10 and 30 °C. Sampling took place at 0, 0.5, 6.0 and 24h after inoculation and the comparative expression of *prfA*, *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ* as well as *16S*, *rpob*, and *IGS* as reference genes was assessed by RT-qPCR. Culture, grown in BHI broth under identical conditions, was used as a control. The effect of incubation temperature, time as well as food matrix has been exhibited. Only *inlC* and *inlJ* exhibited identical expression pattern throughout the experiment, they were downregulated when the pathogen was grown on cucumber and tomato at 10 and 4 °C, respectively. *hly* was the gene whose transcription was affected the most by the conditions of the experiment, it was downregulated upon growth on cucumber at 10 and 30 °C, tomato at 4 and 10 °C and carrot at 10 °C and upregulated upon growth on tomato at 30 °C and carrot at 4 °C. On the contrary, *sigB* and *prfA* were genes least affected by the conditions of the experiment, they were downregulated only upon growth on tomato at 4 °C and cucumber at 10 °C, respectively. These results indicate that abiotic factors may affect *L. monocytogenes* virulence gene expression, highlight the complexity of regulation of gene expression and facilitate understanding of the microorganism's physiology during growth at food matrices.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, virulence genes, liquid medium, tomato, cucumber, carrot, gene expression, pathogenesis

*Στην αγαπημένη μου μητέρα,*

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στην διάρκεια εκπόνησης και διαμόρφωσης του παρόντος πονήματος, σε μια πορεία προσέγγισης του θέματος με έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον, ήταν σημαντική η συμβολή ανθρώπων για την επίλυση αποριών και προβληματισμών που παρουσιάστηκαν κατά την διάρκεια της εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης και Καθηγητή Συστημάτων Διασφάλισης Ποιότητας και Υγιεινής Τροφίμων κ. Δροσινό Ελευθέριο για την ανάθεση του θέματος της μελέτης. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον 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, καθώς και την Επίκουρο Καθηγήτρια, κα Παπαδέλλη Μαρίνα, του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Πελοποννήσου, για την προθυμία της να προσφέρει αλόγιστα τις γνώσεις της και την βοήθεια της στην υλοποίηση της παρούσας πειραματικής μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στους γονείς μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια ολοκλήρωσης των μεταπτυχιακών μου σπουδών, στα αδέρφια μου καθώς και στους φίλους μου για την πολύτιμη συμβολή τους.

***Χριστίνα Β. Κωτσάκου***

***Αθήνα 2017***



A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	v
B. ABSTRACT .....	vi
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i></b>	<b>1</b>
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	1
1.1.1 Φυλογενετική ταξινόμηση του γένους <i>Listeria</i> .....	2
1.1.2 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού.....	4
1.1.2.1 Μορφολογία.....	4
1.1.2.2 Απαιτήσεις μικροβιακής ανάπτυξης .....	5
1.1.2.3 Ορολογική τυποποίηση.....	10
1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία .....	12
1.3 Παθογένεια.....	15
1.3.1 Είσοδος και διασπορά του παθογόνου στον ανθρώπινο οργανισμό .	15
1.3.2 Γονίδια σχετιζόμενα με την παθογένεια.....	17
1.4 Χαρακτηριστικά νόσου στον άνθρωπο.....	23
1.5 Διάγνωση και θεραπεία.....	26
1.6 Πρόληψη.....	29
1.7 Κρούσματα λιστερίωσης από φρέσκα φρούτα και λαχανικά .....	31
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....</b>	<b>37</b>
<b>2 ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ</b>	<b>37</b>
2.1.1 Εισαγωγικές πληροφορίες .....	37
2.1.2 Η αρχή λειτουργίας της αντίδρασης της PCR .....	38
2.1.3 Η αρχή λειτουργίας της Real Time PCR.....	41
2.1.3.1 Απόλυτη και σχετική ποσοτικοποίηση .....	43
2.1.3.2 Συστήματα σήμανσης αλληλουχιών-στόχων.....	45
2.2 Συσσκευή Real Time PCR - Περιγραφή του οργάνου.....	49
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	52
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....</b>	<b>53</b>
<b>3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>53</b>
3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	53
I. Χώρος διεξαγωγής των πειραμάτων .....	53
II. Πειραματικό σχέδιο .....	53
3.1.1 Παρασκευή ενοφθαλμίματος και προετοιμασία δειγμάτων.....	53
3.1.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις .....	54
3.1.3 <i>In vitro</i> και <i>in situ</i> γονιδιακή έκφραση .....	55
3.1.3.1 Ανίχνευση γονιδίων .....	55

3.1.3.2	Προετοιμασία δειγμάτων .....	58
3.1.3.3	Μελέτη γονιδιακής έκφρασης.....	59
3.1.3.3.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) 59	
3.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	71
3.2.1	Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική έκφραση των γονιδίων ( <i>prfA</i> , <i>sigB</i> , <i>hly</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i> , <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>inlC</i> και <i>inlJ</i> ). .....	73
3.2.2	Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στη σχετική έκφραση των γονιδίων ( <i>prfA</i> , <i>sigB</i> , <i>hly</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i> , <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>inlC</i> και <i>inlJ</i> ). .....	82
3.3	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	89
<b>4</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>92</b>
	<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....</b>	<b>xi</b>
	<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>xi</b>
	<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....</b>	<b>xiii</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 1:** Πίνακας των τριών εξελικτικών καταγωγών (lineages) και οροτύπων (serovars) του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* βάσει του συνδυασμού των σωματικών αντιγόνων (O antigen) και των αντιγόνων μαστιγίου (H antigens) (Gorski 2008, Hyden et al. 2016). (σελ.25)

**Πίνακας 2:** Αλληλουχίες των μορίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό των υπό μελέτη γονιδίων και μεγέθη των αμπλικονίων που σχηματίζουν μεταξύ τους τα ζεύγη των εκκινητών. (σελ.71)

**Πίνακας 3:** Μεταβολές του πληθυσμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε θρεπτικό υλικό BHI, σε αγγούρι, καρότο και ντομάτα κατά την επώαση στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.85)

**Πίνακας 4:** Γονίδια που μελετήθηκαν και αποδοτικότητα μεθόδου. (σελ.86)

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

**Διάγραμμα 1:** Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική έκφραση του γονιδίου *sigB* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.74)

**Διάγραμμα 2:** Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική έκφραση του γονιδίου *prfA* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.75)

**Διάγραμμα 3:** Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική έκφραση του γονιδίου *plcA* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.75)

**Διάγραμμα 4:** Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική έκφραση του γονιδίου *plcB* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.76)

**Διάγραμμα 5:** Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική έκφραση του γονιδίου *hly* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.77)

**Διάγραμμα 6:** Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική έκφραση του γονιδίου *inlA* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.78)

**Διάγραμμα 7:** Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική έκφραση του γονιδίου *inlB* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.78)

**Διάγραμμα 8:** Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική έκφραση του γονιδίου *inlC* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.79)

**Διάγραμμα 9:** Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική έκφραση του γονιδίου *inlJ* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.80)

**Διάγραμμα 10:** Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στη σχετική έκφραση του γονιδίου *sigB* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.81)

**Διάγραμμα 11:** Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στη σχετική έκφραση του γονιδίου *prfA* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.82)

**Διάγραμμα 12:** Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στη σχετική έκφραση του γονιδίου *plcA* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C (σελ.82)

**Διάγραμμα 13:** Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στη σχετική έκφραση του γονιδίου *plcB* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.83)

**Διάγραμμα 14:** Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στη σχετική έκφραση του γονιδίου *hly* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.83)

**Διάγραμμα 15:** Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στη σχετική έκφραση του γονιδίου *inlA* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.84)

**Διάγραμμα 16:** Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στη σχετική έκφραση του γονιδίου *inlB* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.85)

**Διάγραμμα 17:** Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στη σχετική έκφραση του γονιδίου *inlC* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.86)

**Διάγραμμα 18:** Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στη σχετική έκφραση του γονιδίου *inlJ* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. (σελ.86)

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

**Εικόνα 1.** Φυλογενετική θέση των ειδών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria* βάσει της μεθόδου ανάλυσης αποστάσεων (Neighbor-Joining distance analysis) των αλληλουχιών του γονιδίου 16S-rRNA. (σελ.18)

**Εικόνα 2.** Χρώση κατά Gram του βακτηρίου *L. monocytogenes*. (σελ.19)

**Εικόνα 3.** Επιλεκτικά υποστρώματα PALCAM (Α) και OXFORD (Β) για ανίχνευση και απομόνωση των *Listeria* spp. και ALOA (Γ) και Rapid<sup>®</sup> L. mono (Δ) για ανίχνευση και απομόνωση του *Listeria monocytogenes*. (σελ.24)

**Εικόνα 4.** Είσοδος του βακτηρίου *L. monocytogenes* μέσω τροφής στον ανθρώπινο οργανισμό και διασπορά του στα διάφορα όργανα. (σελ.30)

**Εικόνα 5.** Ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. (σελ.31)

**Εικόνα 6.** Φυσική οργάνωση του συμπλέγματος γονιδίων παθογένειας LIPI-1 στους μικροοργανισμούς *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* και *L. seeligeri*. (σελ.34)

**Εικόνα 7.** Μεταγραφική οργάνωση της νησίδας LIPI-1 στον *L. monocytogenes*. (σελ.35)

**Εικόνα 8.** Εξαρτώμενη από το PrfA ρύθμιση μεταγραφής των γονιδίων *inlA*, *inlB*, *inlC* και *hpt* (Kuhn et al., 2008). (σελ.35)

**Εικόνα 9.** Τα στάδια της PCR και τρόπος λειτουργίας της μεθόδου. (σελ.54)

**Εικόνα 10.** Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης (σελ.56)

**Εικόνα 11.** Καμπύλη αναφοράς (standard curve) (σελ.58)

**Εικόνα 12.** Καμπύλες ενίσχυσης γονιδίων στόχων και γονιδίων αναφοράς. (σελ.59)

**Εικόνα 13.** Ιχνηλάτες ειδικών συστημάτων ανίχνευσης (σελ.60)

**Εικόνα 14.** Μη ειδικό σύστημα ανίχνευσης, μέσω χρήσης της φθορίζουσας χρωστικής SYBR green I (Bio-Rad, 2010). (σελ.61)

**Εικόνα 15.** Καμπύλες αποδιάταξης (σελ.62)

**Εικόνα 16.** Διάγραμμα με τον βασικό τρόπο λειτουργίας γενικά όλων των συσκευών Real Time PCR. (σελ.63)

**Εικόνα 17.** Η συσκευή StepOne Plus Real Time PCR της εταιρείας Applied Biosystems International. (σελ.64)

**Εικόνα 18.** Αναλυτική περιγραφή των τμημάτων που αποτελούν την συσκευή StepOne Plus Real Time PCR της εταιρείας Applied Biosystems International. (σελ.65)

**Εικόνα 19.** Πρότυπη καμπύλη πέντε διαφορετικών γονιδίων. (σελ.76)

**Εικόνα 20.** Σύνθεση cDNA από mRNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής και δημιουργία δίκλωνου μορίου cDNA κατά τον πρώτο κύκλο της Real-time PCR. (σελ.79)

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

### **1 Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ LISTERIA MONOCYTOGENES**

#### **1.1 LISTERIA MONOCYTOGENES**

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* (Λιστέρια μονοκυτταρογόνος) είναι ένας από τους πιο μελετημένους μικροοργανισμούς των τελευταίων 30 ετών και αποτελεί την αιτία για την ανθρώπινη και ζωική λιστερίωση. Αν και είχε γίνει αναφορά στον μικροοργανισμό από το 1891, περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Murray et al., το 1926. Συγκεκριμένα, το 1924, οι Murray, Webb και Swann, παρατήρησαν αρχικά 6 περιπτώσεις αιφνίδιου θανάτου νεαρών κουνελιών, στις εγκαταστάσεις εκτροφής ζώων του Τμήματος Παθολογίας του Πανεπιστημίου του Κέμπριτζ, κρούσματα που αυξήθηκαν κατά πολύ τους επόμενους 15 μήνες. Τα συμπτώματα που παρουσίαζε η νόσος σε συνδυασμό με την αυξημένη θνησιμότητα έθεσαν την ασθένεια ως σημαντική για περαιτέρω μελέτη. Το εξέχον χαρακτηριστικό της νόσου από την οποία έπασχαν τα τρωκτικά ήταν η παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού μονοπύρηνων λευκοκυττάρων στο αίμα. Από το χαρακτηριστικό αυτό ο παθογόνος μικροοργανισμός ονομάστηκε αρχικά *Bacterium monocytogenes* (Murray et. al., 1926).

Το 1927, κατά τη διάρκεια ερευνών για το θάνατο γερβίλων (άγριων τρωκτικών) κοντά στο Γιοχάνεσμπουργκ της Νοτίου Αφρικής, ο Pirie απομόνωσε ένα Gram θετικό βακτήριο το οποίο ονόμασε *Listerella hepatolytica*, προς τιμήν του Άγγλου χειρουργού λόρδου Joseph Lister (1827-1912) (Pirie, 1927).

Οι ερευνητές Murray και Pirie έστειλαν τα στελέχη που απομόνωσαν στην Εθνική Συλλογή Καλλιεργειών (National Collection of Type Cultures, NCTC) του Ινστιτούτου Lister στο Λονδίνο. Εκεί παρατηρήθηκε η ομοιότητα των δύο μικροοργανισμών και κατέστη σαφές ότι τα στελέχη ανήκαν στο ίδιο είδος βακτηρίου. Αποτέλεσμα αυτού ήταν ο διευθυντής του ινστιτούτου να φέρει τους ερευνητές σε επαφή οι οποίοι και αποφάσισαν, συνδυάζοντας τα δύο προτεινόμενα ονόματα, να καταχωρήσουν το βακτήριο ως *Listerella monocytogenes* (Rocourt & Buchrieser, 2007). Τελικά, το 1940 η ονομασία του γένους *Listerella* άλλαξε για

λόγους ταξινόμησης και ο μικροοργανισμός έλαβε το όνομα *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940).

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).

### **1.1.1 Φυλογενετική ταξινόμηση του γένους *Listeria***

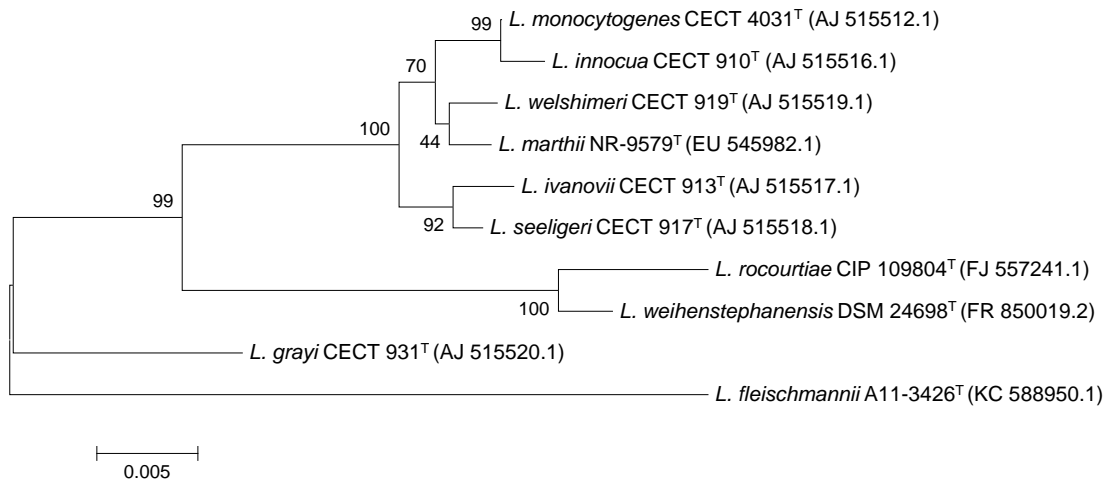
Μέχρι τη δεκαετία του 1970 η σχέση του μικροοργανισμού με τα άλλα βακτήρια δεν είχε διευκρινιστεί, ενώ στην πορεία πραγματοποιήθηκαν αρκετές ανακατατάξεις του γένους *Listeria* spp. μέχρι την κατοχύρωση της ακριβούς φυλογενετικής του θέσης. Από το 1934 έως το 1974 το γένος *Listeria* spp. είχε ενταχθεί στην οικογένεια *Corynebacteriaceae*, ενώ μετέπειτα, στο Εγχειρίδιο Συστηματικής Βακτηριολογίας του Bergey (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) που δημοσιεύτηκε το 1974, ταξινομήθηκε μαζί με τα βακτήρια *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* και *Caryophanon* (Rocourt & Buchrieser, 2007). Ωστόσο, οι αναπτυσσόμενες μέθοδοι ταξινόμησης όπως η αριθμητική ανάλυση στοιχείων για ένα μεγάλο αριθμό φαινοτυπικών χαρακτηριστικών (numerical taxonomy), η μελέτη χημειοταξινομικών (chemotaxonomic) χαρακτηριστικών (π.χ. περιεκτικότητα του DNA σε βάσεις G+C), ο υβριδισμός DNA/DNA καθώς και η εύρεση της αλληλουχίας (sequencing) του ριβοσωμικού RNA (rRNA) αλλά και ολόκληρου του γονιδιώματος (whole genome sequencing), κατέδειξαν ότι το γένος *Listeria* spp. αποτελεί μια αυτοτελή ταξινομική βαθμίδα (taxon) με διακριτά χαρακτηριστικά ικανά να τη διαφοροποιήσουν έναντι άλλων γειτονικών ταξινομικών βαθμίδων (Feresu & Jones 1988, Hartford & Sneath 1993, Glaser et. al. 2001, Rocourt & Buchrieser 2007).

Το γένος *Listeria* έχει πλέον ταξινομηθεί στην οικογένεια *Listeriaceae* μαζί με το γένος *Brochothrix*. Και τα δύο γένη ανήκουν στην τάξη *Bacillales* της ομοταξίας *Bacilli*, η οποία περιλαμβάνει όλους τους βακίλους, και η οποία με τη σειρά της εντάσσεται στο φύλο



*Firmicutes* του βασιλείου *Bacteria* (Garrity et. al., 2004). Αρχικά το γένος περιλάμβανε μόνο το είδος *L. monocytogenes*. Αριθμητικές ταξινομικές έρευνες όμως επιβεβαίωσαν ότι το βακτήριο *L. monocytogenes* δεν αποτελούσε μια αυτοτελή ταξινομική βαθμίδα (taxon), κάτι το οποίο ορίστηκε στην όγδοη έκδοση του Εγχειριδίου Προσδιοριστικής Βακτηριολογίας του Bergey (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) (Rocourt & Buchrieser, 2007). Σήμερα, το γένος αποτελείται από τα ακόλουθα δέκα είδη: *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. rocourtiae*, *L. marthii*, *L. weihenstephanensis* και *L. fleischmannii*, με τα τέσσερα τελευταία είδη να έχουν περιγραφεί μόλις πρόσφατα (Leclercq et. al. 2010, Lang Halter et. al. 2013, Graves et. al. 2010, den Bakker et. al. 2013). Παλαιότερα υφίστατο ξεχωριστά ως είδος και το *L. murrayi* το οποίο όμως πλέον έχει ενσωματωθεί στο *L. grayi* (Rocourt et. al., 1992). 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.

Στην **Εικόνα 1** παρουσιάζεται η σχετική φυλογενετική θέση των ειδών που στηρίζεται στη μέθοδο ανάλυσης αποστάσεων (Neighbor-Joining distance analysis) των αλληλουχιών του γονιδίου *16S-rRNA*. Φαίνεται ότι οι μικροοργανισμοί *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. ivanovii* και *L. seeligeri* σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα έξι ειδών, οι μικροοργανισμοί *L. rocourtiae* και *L. weihenstephanensis* ένα σύμπλεγμα δύο ειδών, ενώ οι μικροοργανισμοί *L. grayi*, και *L. fleischmannii* δεν ανήκουν σε κανένα από τα δύο αυτά συμπλέγματα. Όσον αφορά το σύμπλεγμα των έξι ειδών, η αλληλούχιση του γονιδίου *16S-rRNA* δεν μπορεί να προσφέρει καλύτερη ανάλυση στις φυλογενετικές τους σχέσεις, χάρη στον υψηλό βαθμό ομοιότητας. Για τον λόγο αυτό, απαραίτητη κρίνεται η ανάλυση αλληλουχιών επιπρόσθετων γονιδιωματικών περιοχών (Paramithiotis et. al., 2014).

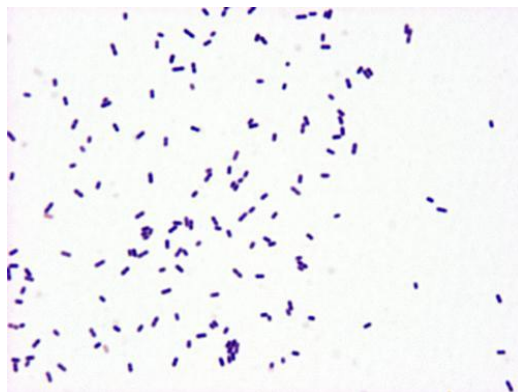


**Εικόνα 1.** Φυλογενετική θέση των ειδών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria* βάσει της μεθόδου ανάλυσης αποστάσεων (Neighbor-Joining distance analysis) των αλληλουχιών του γονιδίου *16S-rRNA*. Οι τιμές Bootstrap στον κόμβο υπολογίστηκαν από 1000 δειγματοληψίες. Οι αριθμοί πρόσβασης GenBank / EMBL / DDBJ δίνονται στην παρένθεση (Paramithiotis et. al., 2014).

## 1.1.2 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού

### 1.1.2.1 Μορφολογία

Όλα τα είδη του γένους *Listeria* σχηματίζουν συμμετρικές, βραχείες ράβδους διαστάσεων από 0.4-0.5 έως 1-2  $\mu\text{m}$ , με παράλληλες πλευρές και στρογγυλεμένα άκρα. Τα κύτταρα εμφανίζονται συνήθως είτε σε μεμονωμένες μονάδες, είτε σε μικρές αλυσίδες, είτε διατάσσονται σε V, Y και πιο πολύπλοκους σχηματισμούς (palisades). Τα βακτήρια του γένους είναι Gram θετικά, έχει παρατηρηθεί όμως, κύτταρα καλλιιεργειών όταν χάσουν την ικανότητά τους να συγκρατούν το κρυσταλλικό ιώδες, να θεωρηθούν λανθασμένα ως *Hemophilus* (Rocourt & Buchrieser 2007, Wagner & McLauchlin 2008). Στην **Εικόνα 2** παρουσιάζεται το παρασκεύασμα της χρώσης Gram του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* όπου και παρατηρούνται τα μπλε-ιώδη κύτταρα.



**Εικόνα 2.** Χρώση κατά Gram του βακτηρίου *L. monocytogenes*

Το γένος *Listeria* δεν παράγει σπόρια και δε δημιουργεί κάψες (Seeliger & Bockemühl, 1968). Εμφανίζει κινητικότητα χάρη στα περίτριχα μαστίγια όταν καλλιεργείται μεταξύ των 20 και 25°C, ενώ στους 37°C παρουσιάζει μειωμένη ή και καθόλου κινητικότητα (Galsworthy et. al., 1990).

#### **1.1.2.2 Απαιτήσεις μικροβιακής ανάπτυξης**

##### **➤ Οξυγόνο (O<sub>2</sub>)**

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι αερόβιος, μικροαερόφιλος και προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός, ο οποίος αναπτύσσεται καλύτερα σε συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα 5-10% (Rocourt & Buchrieser, 2007).

##### **➤ Θερμοκρασία**

Τα θερμοκρασιακά όρια ανάπτυξης του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* κυμαίνονται από 1-2°C έως 45°C, με βέλτιστη ανάπτυξη στους 30-37°C (Seeliger & Jonesy 1986, Junttila et. al. 1988). Είναι επομένως ένα ψυχρόφιλο βακτήριο καθώς μπορεί να αναπτύσσεται και σε θερμοκρασίες ψύξης. Η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται σε αυτές τις θερμοκρασίες χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Gray et. al. (1948) για επιλεκτικό εμπλουτισμό μολυσμένου δείγματος και είναι αυτή που καθιστά την ψύξη ανεπαρκή για τον έλεγχο του παθογόνου. Στις χαμηλές αυτές θερμοκρασίες, παρ' όλα αυτά, η μικροβιακή αύξηση είναι σχετικά αργή, καθώς τα στελέχη αναπτύσσονται με χρόνο διπλασιασμού 20-30 και 100-186 ωρών στους 3 και 0°C, αντίστοιχα (Swaminathan, 2001).

### ➤ *pH*

Σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα το βακτήριο *L. monocytogenes* αυξάνεται μεταξύ pH 4.5 και 9.2, με βέλτιστη τιμή pH 7 (Parish & Higgins 1989, George & Lund, 1992). Τιμές pH μικρότερες του 5.5 οδηγούν σε σημαντική μείωση του ρυθμού αύξησης του μικροοργανισμού (Adams & Moss, 2008), ενώ σε τιμές μικρότερες του 4.3 ο μικροοργανισμός επιβιώνει αλλά δεν πολλαπλασιάζεται (Swaminathan, 2001).

### ➤ *Ενεργότητα νερού ( $a_w$ )*

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι ένα από τα λίγα τροφιμογενή παθογόνα που μπορεί να αναπτύσσεται σε τιμές ενεργότητας νερού χαμηλότερες του 0.93 (Petran & Zpttola 1989, Farber & Addison 1994). Γενικά, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού πραγματοποιείται σε τιμές ενεργότητας νερού από 0.90 έως 0.99, με βέλτιστη ανάπτυξη στο 0.97. Μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε τιμές έως 0.83 (Shahamat et. al., 1980), ενώ σε τιμές έως 0.90 επιβιώνει απλώς χωρίς να αναπτύσσεται (FSAI, 2011).

Επιπλέον, παρουσιάζει ικανότητα ανάπτυξης σε συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (NaCl) 10% (w/v) και επιβιώνει σε ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (Seeliger & Jonesy, 1986). Τέλος, η επιβίωσή του σε χαμηλές τιμές pH και υψηλές συγκεντρώσεις άλατος εξαρτάται σημαντικά από την θερμοκρασία (Cole et. al., 1990).

### ➤ *Μεταβολικά χαρακτηριστικά*

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι θετικός στην αντίδραση της καταλάσης (στελέχη αρνητικά στην καταλάση έχουν παρατηρηθεί σπάνια) και αρνητικός στην αντίδραση της οξειδάσης (Rocourt & Buchrieser, 2007). Είναι ένας ομοζυμωτικός μικροοργανισμός που οξειδώνει τα ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης (Cotoni, 1942) και διαθέτει τα ένζυμα οξειδάσης της γλυκόζης και οξειδάσης του NADH (Patcett et. al., 1991).

Το βακτήριο αναπτύσσεται παρουσία γλυκόζης και υπό αερόβιες συνθήκες σχηματίζει γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και ακετοΐνη ως κύρια τελικά προϊόντα (Pine et. al. 1989, Romick et. al. 1996). Κάτω από αναερόβιες συνθήκες η ακετοΐνη δεν παράγεται, ενώ στις συγκεκριμένες συνθήκες η ανάπτυξη πραγματοποιείται μόνο παρουσία εξοζών και πεντοζών. Σε αντίθεση με τη σακχαρόζη, η μαλτόζη και η λακτόζη υποστηρίζουν την ανάπτυξη κάποιων στελεχών υπό αναερόβιες συνθήκες (Pine et. al., 1989). Τέλος, ο καταβολισμός της γλυκόζης πραγματοποιείται μέσω του βιοχημικού μονοπατιού των Embden-Meyerhof, τόσο

αερόβια όσο και αναερόβια (Seeliger & Jonesy, 1986), ενώ ο καταβολισμός άλλων σακχάρων οδηγεί σε παραγωγή οξέων αλλά όχι αερίων (Wagner & McLauchlin, 2008).

#### ➤ *Βιοχημικά χαρακτηριστικά*

Η βασική δομή του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας αρκετά σκληρής στιβάδας που ονομάζεται πεπτιδογλυκάνη ή μουρεΐνη (η οποία αποτελεί το 35% του ξηρού βάρους του κυτταρικού τοιχώματος), τειχοϊκά οξέα (τα οποία αποτελούν το 60-70% του ξηρού βάρους του κυτταρικού τοιχώματος και ενώνονται με ομοιοπολικούς δεσμούς με το μουραμικό οξύ στην πεπτιδογλυκάνη) και λιποτειχοϊκά οξέα (τα οποία χρησιμεύουν στην αγκίστρωση του κυτταρικού τοιχώματος στην υποκείμενη πλασματική μεμβράνη). Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί ένα απαραίτητο μακρομοριακό σύμπλοκο του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος καθώς χρησιμεύει στα βακτήρια για τη διατήρηση της ωσμωτικής τους πίεσης (Shockman et al., 1996). Τα τειχοϊκά οξέα φαίνεται ότι αποτελούν το 20% του βάρους του κυτταρικού τοιχώματος του στελέχους *L. monocytogenes* EGD, το οποίο αποτελείται από N-ακετυλογλυκοζαμίνη, ραμνόζη, ριβιτόλη και φώσφορο σε μοριακή αναλογία 0.95:1.0:0.97:0.98. Το μοριακό βάρος των τειχοϊκών οξέων στο συγκεκριμένο στέλεχος έχει υπολογιστεί περίπου 120 kDa, ενώ η ανοσολογική τους δραστηριότητα αποδίδεται στα υπολείμματα ραμνόζης που λειτουργούν ως σημαντικός αντιγονικός προσδιοριστής (O-παράγοντας ή σωματικό αντιγόνο) (Wagner & McLauchlin, 2008).

Τα είδη του γένους *Listeria* χρησιμοποιούν μαστίγια που τους παρέχουν *in vitro* κινητικότητα, ιδιότητα που ενισχύει την πρόσφυση και την εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα των ξενιστών. Στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* παράγονται πέντε με έξι περίτριχα μαστίγια, ενώ η έκφραση των γονιδίων των μαστιγίων κινητικότητας ρυθμίζεται από τη ρυθμιστική πρωτεΐνη MogR, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *mogR* (Wagner & McLauchlin, 2008). Στο περιβάλλον, τα βακτήρια χρησιμοποιούν τα μαστίγια για να κινηθούν προς τα θρεπτικά συστατικά. Τα μαστίγια είναι επίσης σημαντικά στα παθογόνα είδη για την πρόκληση ασθενειών. Ωστόσο, με την είσοδο του βακτηρίου στον ανθρώπινο οργανισμό, η παρουσία φλαγγελίνης διεγείρει το ανοσοποιητικό του σύστημα. Κατά συνέπεια, πολλά βακτήρια μειώνουν την παραγωγή μαστιγίων αμέσως μετά την μόλυνση (Shen & Higgins, 2006). Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* ρυθμίζει την παραγωγή αυτή μέσω της πρωτεΐνης MogR, η οποία προσδένεται στην περιοχή εκκίνησης του

γονιδίου *flaA* και προκαλεί μείωση της έκφρασής του, καθώς και άλλων γονιδίων κινητικότητας (Wagner & McLauchlin, 2008).

Εκτός από την παραγωγή δομικών μορίων που συμμετέχουν στο σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος, των μαστιγίων αλλά και άλλων βασικών δομών, στον παθογόνο παράγεται επίσης μία μεγάλη σειρά από εξειδικευμένες πρωτεΐνες που στηρίζουν την επιβίωση του μικροοργανισμού σε στρεσογόνες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και αλάτων (π.χ. BetL, Bsh, Lmo1421, OpuB και OpuC), αλλά και πρωτεΐνες που τον βοηθούν να εισάγεται στα κύτταρα των ξενιστών, να διαφεύγει από τα κενοτόπια, να αντιγράφεται στο κυτταρόπλασμα και να εξαπλώνεται σε γειτονικά κύτταρα (π.χ. InlA, InlB, InlC, InlJ, LLO, PI-PLC, PC-PLC, Mpl και Acta).

#### ➤ *Ανάπτυξη σε θρεπτικά υποστρώματα*

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, όπως και όλα τα είδη του γένους *Listeria*, είναι σχετικά απαιτητικός σε θρεπτικά συστατικά. Συγκεκριμένα, εκτός από τις γνωστές πηγές άνθρακα και αζώτου (γλυκόζη και γλουταμίνη), για την βέλτιστη ανάπτυξή του συνήθως απαιτούνται τα αμινοξέα κυστίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, αργινίνη, μεθειονίνη, βαλίνη, κυστεΐνη και οι βιταμίνες ριβοφλαβίνη, βιοτίνη, θειαμίνη και θειοκτικό οξύ (α-λιποϊκό οξύ) (Welshimer 1963, Seeliger & Jonesy 1986, Siddiqi & Khan 1989, Premaratne et. al. 1991). Η αύξηση διεγείρεται επιπλέον και από την ύπαρξη τρισθενούς σιδήρου ( $Fe^{3+}$ ) και φαινυλαλανίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα (Siddiqi & Khan 1989, Premaratne et. al. 1991).

Σε γενικές γραμμές, ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται καλά σε έναν αριθμό μη επιλεκτικών θρεπτικών μέσων που υποστηρίζουν την ανάπτυξη βακτηρίων. Ο παθογόνος μπορεί να αναπτυχθεί τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες σε μη εκλεκτικά τεχνητά μέσα όπως οι ζωμοί tryptone soy broth (TSB) και brain heart infusion (BHI), ενώ σε περίπτωση ανάπτυξής του σε ζωμό BHI και επώασης στους 30°C, εισέρχεται στη στατική φάση έπειτα από 12 ώρες (Wagner & McLauchlin, 2008).

Υπάρχει μία σειρά από στερεά και υγρά επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση των ειδών του γένους *Listeria* spp. από μη αποστειρωμένα δείγματα τροφίμων, περιβάλλοντος και περιττωμάτων. Αρχικά, τα επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα άγαρ Polymyxin Acriflavine Lithium chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol (PALCAM) και OXFORD προτάθηκαν από τα ISO 11290-1:1996 και ISO 11290-2:1998 ως πρωταρχικά μέσα επίστρωσης για την ανίχνευση και αρίθμηση όλων των ειδών του γένους *Listeria* spp. Τα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα διαφοροποιούν τα είδη του γένους αυτού από τα άλλα

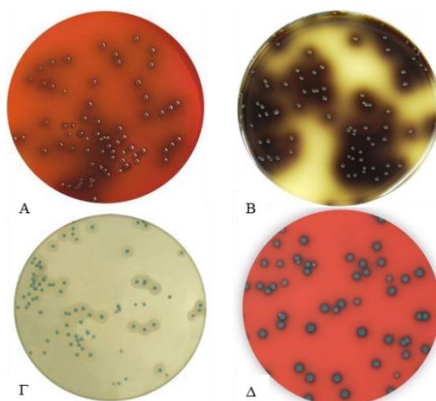
βακτήρια στηριζόμενα στην υδρόλυση του γλυκοζίτη εσκουλίτη. Ο γλυκοζίτης αυτός υδρολύεται από όλα τα είδη του γένους *Listeria* spp. και το προϊόν υδρόλυσής του (εσκουλετίνη ή 6,7-διϋδροξυκουμαρίνη) αντιδρά με το τρισθενές κιτρικό σίδηρο που εμπεριέχεται στο υπόστρωμα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία σκουρόχρωμου γκρι-λαδί συμπλόκου και την ανίχνευση του μικροοργανισμού (**Εικόνα 3**).

Πλέον έχουν αναπτυχθεί και επιλεκτικά μέσα για την ανίχνευση του είδους *L. monocytogenes* με βάση χρωμογόνα υποστρώματα. Το *Listeria* agar όπως περιγράφηκε από τους Ottaviani και Agosti (ALOA) (Ottaviani et al., 1997) ήταν το πρώτο χρωμογόνο υλικό που προτάθηκε στις τροποποιήσεις του 2004 του ISO 11290-1 και 11290-2 (ISO 11290-1/Amd.1:2004 και ISO 11290-2/Amd.1:2004) (ISO, 1996, ISO, 1998).

Η γενική δραστηριότητα διαφοροποίησης του ALOA έγκειται στην παρουσία του χρωμογόνου συστατικού 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γλυκοκυρανοσίδιο που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό του ενζύμου β-D-γλυκοσιδάση, το οποίο παράγεται από όλα τα είδη του γένους *Listeria* spp. Αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ του ενζύμου και του χρωμογόνου συστατικού είναι η ανάπτυξη αποικιών χρώματος μπλε-τιρκουάζ με μέση διάμετρο 1 χιλιοστό στην επιφάνεια του άγαρ. Η ειδική δε δραστηριότητα διαφοροποίησης πραγματοποιείται χάρη στην παρουσία της L-α-φωσφατιδυλινοσιτόλης, η οποία υδρολύεται από την φωσφολιπάση C, έναν παράγοντα μολυσματικότητας που παράγεται από τα δύο παθογόνα είδη *L. monocytogenes* και *L. ivanovii*. Χάρη στον συνδυασμό των δύο αυτών συστατικών, είναι εφικτό να διαχωριστούν οι αποικίες των βακτηρίων *Listeria* spp. που εμφανίζονται με μπλε-τιρκουάζ απόχρωση, από τις αποικίες των στελεχών του *L. monocytogenes* που εμφανίζονται με μπλε-τιρκουάζ απόχρωση περιβαλλόμενες από μία αδιαφανή ζώνη άλω (**Εικόνα 3**). Σχεδόν όλοι οι παρασκευαστές μικροβιολογικών θρεπτικών υποστρωμάτων προσφέρουν μέσα καλλιέργειας βασισμένα στην αρχική σύνθεση του ALOA, όπως οι: Biolife (ALOA<sup>®</sup>), AES (ALOA<sup>®</sup> 1 day), Oxoid (OCLA), CHROMagar (CHROMagar<sup>™</sup>), Merck (Chromoplate<sup>®</sup>), Biomerieux (AEX) και Biorad (AL).

Πέραν του συνδυασμού των παραπάνω ιδιοτήτων που διαφοροποιούν τον παθογόνο *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα είδη *Listeria*, κάποια χρωμογόνα μέσα στηρίζονται μόνο στην ανίχνευση της φωσφολιπάσης C. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η διαφοροποίηση του παθογόνου γίνεται μέσω του σχηματισμού αποικιών χρώματος μπλε-τιρκουάζ έναντι των άσπρων αποικιών που σχηματίζουν τα υπόλοιπα είδη του γένους *Listeria* spp (**Εικόνα 3**). Οι παρασκευαστές αυτού του τύπου άγαρ είναι οι: Biosynth (BCM<sup>®</sup> LMPM), Biorad

(Rapid'L.mono) και Heipha (LIMONO-Ident). Η χρήση επιλεκτικών χρωμογόνων θρεπτικών μέσων καλλιέργειας οδηγεί στην ανίχνευση ύποπτων αποικιών στελεχών *L. monocytogenes* εντός 24 ή 48 ωρών επώασης στους 37° C. Ωστόσο, περαιτέρω δοκιμές για την επιβεβαίωση της ταυτότητας των απομονώσεων είναι υποχρεωτικές (Wagner & McLaughlin, 2008).



**Εικόνα 3.** Επιλεκτικά υποστρώματα PALCAM (A) και OXFORD (B) για ανίχνευση και απομόνωση των *Listeria* spp. και ALOA (Γ) και Rapid' L. mono (Δ) για ανίχνευση και απομόνωση του *Listeria monocytogenes*.

### 1.1.2.3 Ορολογική τυποποίηση

Τα είδη του γένους *Listeria* διαθέτουν πολλαπλούς δείκτες επιφάνειας όπως τα σωματικά αντιγόνα O και τα αντιγόνα μαστιγίου H, τα οποία αποδίδουν εξειδίκευση της εκάστοτε ομάδας και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι για την ανοσολογική αναγνώριση και την ορολογική τους τυποποίηση, με χρήση αντίστοιχων μονόκλωνων και πολύκλωνων αντιγόνων (Seeliger, 1979). Τα σωματικά (O) αντιγόνα των βακτηρίων του γένους *Listeria* spp. έχουν διαχωριστεί σε δεκαπέντε υπό-τύπους (I-XV), ενώ τα αντιγόνα μαστιγίου σε τέσσερις υπό-τύπους (A-D). Μέσω των μοναδικών συνδυασμών των O και H αντιγόνων εξακριβώνονται οι ορότυποι των μεμονωμένων στελεχών των βακτηρίων *Listeria* spp. Από το συνδυασμό αυτό έχουν διακριθεί τουλάχιστον δεκατρείς ορότυποι για το είδος *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, και 7) οι οποίοι και εντάσσονται σε 4 εξελικτικές καταγωγές (lineages) (Ward et al., 2008). Συγκεκριμένα, στην πρώτη εξελικτική καταγωγή (lineage I) εντάσσονται οι ορότυποι 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e και 7, στη δεύτερη (lineage II) οι ορότυποι 1/2a, 1/2c, 3a και 3c, στην τρίτη (lineage III) οι ορότυποι 4b, 1/2a, 4a και 4c και στην τέταρτη (lineage IV) οι ορότυποι 4a και 4c (Hyden et al., 2016). Κάθε εξελικτική καταγωγή χαρακτηρίζεται από γονίδια τα οποία αποτελούν συγκεκριμένους



δείκτες για τα στελέχη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που ανήκουν σε αυτές (Doumith et al., 2004).

**Πίνακας 1** Πίνακας των τριών εξελικτικών καταγωγών (lineages) και οροτύπων (serovars) του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* βάσει του συνδυασμού των σωματικών αντιγόνων (O antigen) και των αντιγόνων μαστιγίου (H antigens) (Gorski 2008, Hyden et al. 2016).

Εξελικτική καταγωγή	Ορότυπος	Ο-αντιγόνα	Η-αντιγόνα
I	1/2b	I, II	A, B, C
	3b	II, IV	A, B, C
	4b	V, VI	A, B, C
	4d	(V) <sup>a</sup> , VI, VIII	A, B, C
	4e	V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
	7	XII, XIII	A, B, C
II	1/2a	I, II	A, B
	1/2c	I, II	B, D
	3a	II, IV	A, B
	3c	II, IV	B, D
III	4a	(V), VII, IX	A, B, C
	4b	V, VI	A, B, C
	4c	V, VII	A, B, C
IV	1/2a	I, II	A, B
	4a	(V), VII, IX	A, B, C
	4c	V, VII	A, B, C

<sup>a</sup> Τα εντός παρένθεσης αντιγόνα μπορεί να μην ανιχνεύονται σε όλες τις απομονώσεις του μικροοργανισμού.

Από τα έως τώρα αναγνωρισμένα είδη του γένους *Listeria* spp. μόνο τα *Listeria monocytogenes* και *Listeria ivanovii* έχουν χαρακτηριστεί ως παθογόνα (Wagner και McLauchlin, 2008). Σχεδόν όλες οι περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης έχουν αποδοθεί στον παθογόνο *L. monocytogenes*, ωστόσο, σπάνιες περιπτώσεις οφειλόμενες στα είδη *L. ivanovii* (Cummins et al. 1994, Guillet et al. 2010), *L. seeligeri* (Rocourt et al., 1986) και *L. grayi* (Todeschini et al., 1998) έχουν καταγραφεί. Από τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί τα τελευταία χρόνια αποδεικνύεται ότι ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία στην παρουσία των οροτύπων του που προκαλούν τοξικότητα και παθογένεια. Ωστόσο, ενώ πολλά στελέχη έχουν αδιαμφισβήτητα υψηλή μολυσματικότητα και είναι πολλές φορές θανατηφόρα, άλλα στελέχη εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα να

προκαλέσουν λοίμωξη και είναι σχετικά μη μολυσματικά (Conner et al. 1989, Tabouret et al. 1991). Συγκεκριμένα, από τους 13 ορότυπους του είδους *L. monocytogenes* μόνο οι 4 ορότυποι (1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b) έχουν ενοχοποιηθεί για την εκδήλωση ανθρώπινης λιστερίωσης, καθ' ότι αυτοί αντιπροσωπεύουν πάνω από το 96% των απομονώσεων των ανθρώπινων κλινικών υποθέσεων. Από τους τέσσερις αυτούς ορότυπους, τα στελέχη που ανήκουν στην εξελικτική καταγωγή II είναι ευρέως διαδεδομένα στα τρόφιμα και στο περιβάλλον, ενώ απομονώνονται συχνά από περιπτώσεις λιστερίωσης σε ζώα και σποραδικά από κλινικές περιπτώσεις λιστερίωσης σε άνθρωπο. Ωστόσο, τα περισσότερα κρούσματα λιστερίωσης στον άνθρωπο σχετίζονται με στελέχη της εξελικτικής καταγωγής I (Orsi et al., 2011). Αντιθέτως, τα στελέχη των εξελικτικών καταγωγών III και IV δεν εμφανίζονται συχνά, απομονώνονται κυρίως από ζώα και συσχετίζονται σπάνια με την ανθρώπινη λιστερίωση (Roche et al. 2008, Orsi et al. 2011).

## 1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα είδη του γένους *Listeria* απαντώνται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον και έχουν απομονωθεί από μία πληθώρα δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων και του νερού, των λυμάτων, της λάσπης και του εδάφους ιδιαίτερα σε περιπτώσεις παρουσίας αποσυντιθέμενων φυτικών υλικών (Farber & Peterkin, 1991). Μελέτες της ευρείας γεωγραφικής κατανομής και προέλευσης των βακτηριακών ειδών *Listeria*, έχουν επιβεβαιώσει ότι το περιβάλλον αποτελεί φυσική δεξαμενή για το γένος αυτό (Rocourt & Seeliger, 1985).

Εξαιτίας του ότι τα είδη του γένους *Listeria* spp. είναι τόσο ευρέως διαδεδομένα, η μίανση των τροφίμων μπορεί να προκληθεί πριν από τη συγκομιδή, κυρίως για τα τρόφιμα που έρχονται σε άμεση επαφή με το έδαφος όπως τα φρέσκα προϊόντα (π.χ. λαχανικά). Επιπλέον, ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα ζώων (θηλαστικά, πουλιά, ψάρια και ασπόνδυλα) αποτελεί φορέα των βακτηρίων *Listeria* χωρίς να εμφανίζει τη νόσο, αποτελώντας έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες διάδοσής του στο περιβάλλον.

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, εκτός από κυριότερος παράγοντας πρόκλησης της ανθρώπινης λιστερίωσης, είναι και ο πιο σημαντικός παθογόνος του γένους που οδηγεί στη νόσο και των υπολοίπων ζώων, παρόλο που σχεδόν το 10% της σπυραιμίας στα πρόβατα έχει αποδοθεί στο βακτήριο *L. ivanovii* (Low & Donachie, 1997). Όπως και όλα τα είδη *Listeria*, είναι ευρέως διαδεδομένος στην επιφάνεια του εδάφους, στα

αποσυντιθέμενους φυτικούς ιστούς, στα ζώα και στα κόπρανα ζώων, στα ύδατα ποταμών και καναλιών, στα λιπάσματα και στα φυτά. Επιβιώνει σε φυτικές ύλες για 10-12 χρόνια (Beuchat, 1996), στο έδαφος και στο νερό η επιβίωσή του μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 1-2 χρόνια, ενώ στα κόπρανα των ζώων μπορεί να διαρκέσει 1-6 χρόνια (Sauders & Wiedmann, 2007). Γενικά, ο μικροοργανισμός απομονώνεται από θηλαστικά, πτηνά, τρωκτικά, ερπετά, ψάρια, όστρακα, έντομα και είναι ικανός να μολύνει πάνω από 50 είδη οικόσιτων και άγριων ζώων και πτηνών (Wesley, 2007).

Η κατανόηση της λιστερίωσης ως τροφιμογενούς ασθένειας και των παραγόντων κινδύνου της μόλυνσης που προκαλείται από τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία 30 χρόνια, χάρη στις μελέτες των επιδημιολογικών και σποραδικών περιπτώσεων λοίμωξης που έχουν εκδηλωθεί. Η νόσος, αν και σπάνια, είναι συχνά πολύ σοβαρή και προκαλεί υψηλά ποσοστά νοσηλείας και θνητότητας. Σε σύγκριση δε με άλλες τροφιμογενείς ασθένειες που προκαλούνται από βακτήρια, τα διάφορα χαρακτηριστικά της λιστερίωσης, συμπεριλαμβανομένων και της σχετικά χαμηλής συχνότητας εμφάνισης αλλά και της μακράς περιόδου επώασης, δυσχεραίνουν τον εντοπισμό των εστιών της λοίμωξης. Παρ' όλα αυτά, οι βελτιωμένες εργαστηριακές μελέτες βοηθούν στο να ξεπεραστούν οι δυσκολίες αυτές (Painter & Slutsker, 2007).

Η έντονη ερευνητική δραστηριότητα για τον εντοπισμό των εστιών της νόσου, ξεκίνησε μετά από το κρούσμα λιστερίωσης που συνδέθηκε με κατανάλωση λαχανοσαλάτας το 1981. Από τότε κι έπειτα, με την εμφάνιση περιστατικών λιστερίωσης οργανώνονται μελέτες από ερευνητικές ομάδες, με στόχο τον αμεσότερο εντοπισμό της πηγής μόλυνσης της νόσου και τον εντοπισμό όλων των κρουσμάτων που σχετίζονται με αυτήν. Σύμφωνα με τον Wesley (2009), στις Ηνωμένες Πολιτείες καταγράφονται περίπου 2500 περιπτώσεις λιστερίωσης κάθε χρόνο, 2289 νοσηλείες σε νοσοκομείο και 449 θάνατοι, με το ποσοστό θνησιμότητας να κυμαίνεται περίπου στο 28% το υψηλότερο μεταξύ των τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το 2009 αναφέρθηκαν 1645 περιπτώσεις λιστερίωσης οι περιπτώσεις αυξήθηκαν κατά 19.1% σε σύγκριση με το 2008- και 270 θάνατοι. Το 2010, ο αριθμός παρέμεινε περίπου στα ίδια επίπεδα με 1601 περιπτώσεις, ενώ το 2011 αναφέρθηκαν 1470 περιστατικά λιστερίωσης με ποσοστό θνησιμότητας 12.7% (EFSA, 2011, 2012, 2013). Το 2013, αναφέρθηκαν 1763 περιστατικά λιστερίωσης και η δηλούμενη επίπτωση ήταν 0.44 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα, αυξημένη κατά 8.6% συγκριτικά με το 2012. Παρότι όμως στη Βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη αναφέρονται

συχνά κρούσματα λιστερίωσης, στην Αφρική, την Ασία και την Νότια Αμερική, σπάνια καταγράφονται περιστατικά της νόσου (Low & Donachie, 1997). Στη χώρα μας, την περίοδο 2004-2013 αναφέρθηκαν 74 επιβεβαιωμένα κρούσματα. Συγκεκριμένα, αναφέρθηκαν τρία περιστατικά το 2004, οκτώ το 2005, επτά το 2006, δέκα το 2007, ένα το 2008, τέσσερα το 2009, δέκα το 2010 και 2011, έντεκα το 2012 και δέκα το 2013 (EFSA και ECDC, 2010, 2011, 2015).

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είχε αναγνωριστεί ως ανθρώπινο παθογόνο από το 1924 (Nyfeldt, 1929). Ωστόσο, ο τρόπος μετάδοσής του ήταν αδιευκρίνιστος μέχρι τη δεκαετία του 1980, όταν μία σειρά από κρούσματα υπέδειξαν τη μετάδοση του παθογόνου μέσω τροφίμων (Fleming et al. 1985, Ho et al. 1986, Bille 1990, Linnan et al. 1988, Goulet et al. 1995). Πλέον είναι γνωστό ότι σχεδόν όλες οι περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης είναι τροφιμογενείς (Schuchat et al. 1992, Adak et al. 2002) και η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων θεωρείται ο κυριότερος τρόπος διάδοσης της μόλυνσης. Πουλερικά, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, κρέας και κρεατοσκευάσματα, φρέσκα φρούτα και λαχανικά καθώς και ψάρια και οστρακοειδή, έχουν ενοχοποιηθεί κατά καιρούς ως μέσα διάδοσης της ασθένειας (EFSA και ECDC, 2015). Η δε επιμόλυνση των παραπάνω τροφίμων από τον μικροοργανισμό, πραγματοποιείται είτε απευθείας από τα μολυσμένα ζώα, είτε μέσω των κοπράνων ανθρώπων και ζώων, είτε έπειτα από διαμείανση των έτοιμων προς κατανάλωση τελικών προϊόντων. Ωστόσο, πέραν των τροφίμων, στον άνθρωπο η ασθένεια μεταδίδεται και μέσω της άμεσης επαφής είτε με το μολυσμένο περιβάλλον και τα ζώα, είτε μέσω διαμείανσης μεταξύ ασθενών (McLauchlin & Low 1994, McLauchlin 1996).

Η ανθρώπινη λιστερίωση είναι σχετικά σπάνια αλλά σοβαρή ζωνοσός, με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας, νοσηλείας και θνητότητας στους ευάλωτους πληθυσμούς. Κατά το έτος 2013, από το σύνολο των ζωνοσογόνων ασθενειών που βρίσκονται υπό μελέτη και επιτήρηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης, προκάλεσε την πιο σοβαρή λοίμωξη στους ανθρώπους, με το 99.1% των περιπτώσεων να νοσηλεύεται και με 191 περιπτώσεις θανάτου (θνησιμότητα στο 15.6%) (EFSA, 2015). Τα παραπάνω στοιχεία καταδεικνύουν τον λόγο για τον οποίο η ασθένεια αυτή βρίσκεται στο επίκεντρο της εποπτείας της Ε.Ε. ως μία σοβαρή συστηματική λοίμωξη.

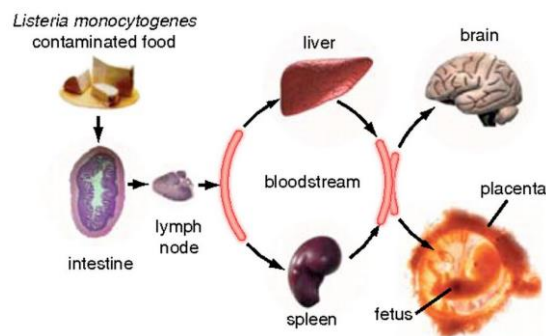
## 1.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

### 1.3.1 Είσοδος και διασπορά του παθογόνου στον ανθρώπινο οργανισμό

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* ως προαιρετικά ενδοκυτταρικό βακτήριο είναι σε θέση να εισέρχεται, να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται σε φαγοκυτταρικά και μη-φαγοκυτταρικά συστήματα, καθώς και να διασχίζει τα εντερικά, αιματο-εγκεφαλικά και εμβρυοπλακουντιακά εμπόδια (Farber & Peterkin 1991, Cossart & Lecuit 1998).

Έπειτα από την κατάποση μiasμένων τροφίμων, ο παθογόνος εισέρχεται αρχικά στο στομάχι. Το χαμηλό pH του στομάχου (1-3) δημιουργεί ένα πολύ όξινο περιβάλλον, το οποίο είναι δυσμενές για πολλά συνήθη παθογόνα. Ωστόσο, ο *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να αντιμετωπίζει ποικίλες συνθήκες καταπόνησης, συμπεριλαμβανομένης και της οξύτητας. Έχοντας επιβιώσει στο στομάχι, ο μικροοργανισμός καταλήγει μαζί με την τροφή στο λεπτό έντερο. Αφού διαπεράσει και τον εντερικό φραγμό και έχοντας επιβιώσει από το ισχυρά όξινο περιβάλλον, τα πρωτεολυτικά ένζυμα, τα χολικά άλατα και μια σειρά από μη ειδικούς μηχανισμούς φλεγμονών του ανοσοποιητικού, διεισδύει στον εντερικό βλεννογόνο και με τη βοήθεια της ενεργού ενδοκύττωσης εισχωρεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα δενδριτικά κύτταρα στις πλάκες του Peyer φαίνεται να είναι τα κυριότερα κύτταρα όπου εισχωρεί και πολλαπλασιάζεται το βακτήριο (Kolb-Maurer et al., 2000). Ακολούθως, ο παθογόνος προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα, εντός των οποίων είναι ικανός να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται. Παράλληλα, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος φτάνει στα επιχώρια λεμφογάγγλια, ενώ τα περισσότερα κύτταρα του μικροοργανισμού θανατώνονται γρήγορα όταν φτάσουν στο ήπαρ και στο σπλήνα (**Εικόνα 4**).

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. Με αυτόν το τρόπο 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).

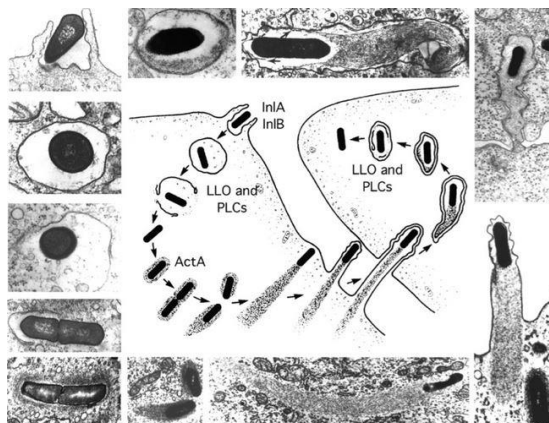


**Εικόνα 4.** Είσοδος του βακτηρίου *L. monocytogenes* μέσω τροφής στον ανθρώπινο οργανισμό και διασπορά του στα διάφορα όργανα.

Όσον αφορά στον ενδοκυτταρικό κύκλο ζωής του παθογόνου, ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* προσκολλάται και εισέρχεται στα κύτταρα ξενιστές είτε παθητικά μέσω φαγοκύτωσης, είτε ενεργητικά μέσα από τη δράση μίας ομάδας πρωτεϊνών του, γνωστών ως ιντερναλινών. Τα μακροφάγα κύτταρα προσλαμβάνουν ενεργά το βακτήριο, αλλά η ενδοκύττωσή του από μη φαγοκύτταρα προκαλείται από τον ίδιο τον παθογόνο. Ωστόσο εκτός από το στάδιο της ενδοκύτωσης, ο ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής του βακτηρίου σε φαγοκύτταρα και μη, είναι παρόμοιος.

Μετά την είσοδό του εντός του κυττάρου, ο μικροοργανισμός βρίσκεται αρχικά μέσα σε ένα κενοτόπιο. Στη συνέχεια το κενοτόπιο αυτό λύεται, επιτρέποντας έτσι στον παθογόνο να διαφύγει μέσα στο κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα τα περισσότερα από τα βακτήρια αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται, ενώ εκείνα που παραμένουν εντός των φαγοσωμάτων θανατώνονται και πέπτονται. Ταυτόχρονα με την έναρξη της ενδοκυτταρικής αντιγραφής, ο παθογόνος επάγει πυρηνοποίηση νηματίων υποδοχής ακτίνης διατεταγμένων σε μία πολική ουρά. Ο σχηματισμός ουράς στον ένα πόλο του βακτηριακού κυττάρου παράγει μια προωθητική δύναμη που κινεί το βακτήριο μέσα στο κυτταρόπλασμα. Εν συνεχεία, τα βακτήρια που φτάνουν εσωτερικά στην επιφάνεια του μολυσμένου κυττάρου-ξενιστή επάγουν το σχηματισμό δομών που μοιάζουν με ψευδοπόδια ή αλλιώς ‘λιστεριοπόδια’ στο ένα άκρο του βακτηρίου. Λόγω αυτών των δομών, ο παθογόνος καθίσταται ικανός να κινείται από το μολυσμένο κύτταρο στα γειτονικά υγιή κύτταρα. Τέλος, το βακτήριο εισέρχεται στα γειτονικά κύτταρα εντός κενοτοπίου, το οποίο περιβάλλεται από μια διπλή μεμβράνη. Η μεμβράνη αυτή υποβάλλεται σε λύση και έτσι απελευθερώνεται ο παθογόνος μέσα στο

κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή επαναλαμβάνοντας τον ενδοκυτταρικό κύκλο ζωής (Εικόνα 5) (Kuhn & Goebel, 2007).



Εικόνα 5. Ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*.

### 1.3.2 Γονίδια σχετιζόμενα με την παθογένεια

Ο ενδοκυτταρικός παρασιτισμός απαιτεί την έκφραση μιας σειράς γονιδίων, τα οποία ονομάζονται γονίδια μολυσματικότητας, λόγω της επίδρασής τους στον ξενιστή. Οι εκτεταμένες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχουν εντοπίσει πολλά γονίδια του παθογόνου σχετιζόμενα με τη μολυσματικότητα. Τα πιο αξιοσημείωτα βρίσκονται συγκεντρωμένα σε μία νησίδα γονιδίων μεγέθους 9-kb, η οποία ονομάζεται *Listeria Pathogenicity Island (LPI-1)*. Επιπρόσθετα, τα γονίδια των ιντερναλινών που είναι σχετιζόμενα με τη μολυσματικότητα, θεωρούνται πολύ σημαντικά γι' αυτήν. Την τελευταία δεκαετία έχουν διεξαχθεί μελέτες σε στελέχη *L. monocytogenes* που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα και κλινικά δείγματα, με στόχο τον καθορισμό μίας αξιόπιστης διαδικασίας για τον χαρακτηρισμό της παθογόνου δυναμικότητας του μικροοργανισμού και τον διαχωρισμό παθογόνων από μη παθογόνα στελέχη, με βάση την παρουσία ή την απουσία των παραπάνω γονιδίων (Hadjilouka et al., 2015).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ενεργητική εισβολή του παθογόνου στα κύτταρα-ξενιστές πραγματοποιείται μέσω μίας οικογένειας πρωτεϊνών επιφάνειας, των ιντερναλινών. Οι ιντερναλίνες ανήκουν στην οικογένεια των LLR (leucine-rich repeat) πρωτεϊνών, στην οποία οι πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από αμινοτελικό άκρο (N-άκρο) που περιέχει πολλές διαδοχικές επαναλήψεις 22 αμινοξέων και ένα πεπτίδιο που λειτουργεί ως 'σήμα' και

επιτρέπει την εξαγωγή των πρωτεϊνών στην επιφάνεια του κυττάρου. Οι ιντερναλίνες ταξινομούνται σε τρεις διακριτές κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται αυτές που έχουν σχετικά μεγάλο μέγεθος και συνδέονται ομοιοπολικά με τα τοιχώματα των βακτηριακών κυττάρων, λόγω του μοτίβου LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly) που διαθέτουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο (C-άκρο) (π.χ. InlA). Στη δεύτερη κατηγορία κατατάσσονται οι ιντερναλίνες που στο C-άκρο τους δεν φέρουν το μοτίβο LPXTG, αλλά το μοτίβο GW (Gly-Trp), το οποίο δημιουργεί χαλαρή μη ομοιοπολική σύνδεση με την επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου (π.χ. InlB). Τέλος, στην τρίτη κατηγορία περιλαμβάνονται οι σημαντικά μικρότερες LLR πρωτεΐνες, οι οποίες δεν έχουν ικανότητα πρόσδεσης με την επιφάνεια του βακτηρίου και ως εκ τούτου βρίσκονται απελευθερωμένες στο κυτταρόπλασμα (π.χ. InlC) (Kuhn et al., 2008). Στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, από τις 25 ιντερναλίνες ή πρωτεΐνες που μοιάζουν με ιντερναλίνες, οι InlA και InlB αναγνωρίζονται ως οι πιο σημαντικές.

Η πρώτη ιντερναλίνη που μελετήθηκε ήταν η InlA, μία πρωτεΐνη που αποτελείται από 800 αμινοξέα και κωδικοποιείται από το γονίδιο *inlA*. Όντας ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου, μέσω του μοτίβου LPXTG που φέρει στο C-άκρο της, η InlA αντιδρά με την πρωτεΐνη προσκόλλησης του κυττάρου-ξενιστή, E-κατχερίνη, προκαλώντας τοπικές αναδιατάξεις του κυτταροσκελετού και επιτρέποντας τελικώς την εισβολή του παθογόνου στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή (Roche et al., 2008). Η πρωτεΐνη InlB είναι μία πρωτεΐνη 630 αμινοξέων, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *inlB*. Η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται μη ομοιοπολικά με τα λιποτειχοϊκά οξέα της επιφάνειας του βακτηριακού κυττάρου (μέσω του μοτίβου GW που φέρει στο C-άκρο της), αναγνωρίζει τον κυτταρικό της υποδοχέα Met και συν-υποδοχέα Clq-R και διευκολύνει κατ' αυτόν τον τρόπο την ενδοκύτωση του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε ηπατοκύτταρα, ινοβλάστες και επιθηλιοειδή κύτταρα (Braun et al., 1997). Τα γονίδια *inlA* και *inlB* σχηματίζουν το οπερόνιο *inlAB*, παρόλο που και τα δύο γονίδια μπορούν να μεταγραφούν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Η μεταγραφή του γονιδίου *inlA* πραγματοποιείται μέχρι και τέσσερις υποκινητές, με έναν εκ των οποίων να ελέγχεται από τον κεντρικό ρυθμιστή PrfA. Ο υποκινητής αυτός είναι επίσης υπεύθυνος και για την έκφραση του γονιδίου *inlB* (Lingnau et al. 1995, Sheehan et al. 1995, Dramsi et al. 1997). Τέλος, όσον αφορά στην εξειδίκευση στα κύτταρα που στοχεύουν οι δύο αυτές ιντερναλίνες, η InlA μεσολαβεί στην είσοδο του παθογόνου κατά κύριο λόγο στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και σε ορισμένα



ηπατοκύτταρα (Dramsi et al. 1995, Lecuit et al. 1997, Lecuit et al. 2004), ενώ η InlB προωθεί την εισβολή του μικροοργανισμού σε ένα ευρύτερο φάσμα κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ηπατοκυττάρων και των επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων (Dramsi et al. 1995, Gregory et al. 1997, Greiffenberg et al. 1998, Parida et al. 1998). Οι διαφορές αυτές οφείλονται πιθανότατα στην διαφορετική παρουσία των αντίστοιχων υποδοχέων των διαφορετικών κυτταρικών τύπων (Kuhn et al., 2008).

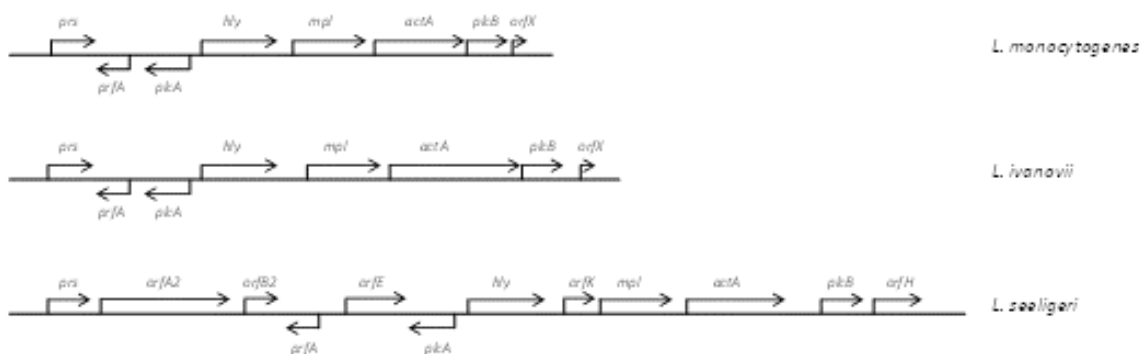
Εκτός από τις πολύ καλά μελετημένες InlA και InlB, στον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* κωδικοποιείται ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που σχετίζονται με τις ιντερναλίνες (Cabanes, 2002). Από αυτές, οι ιντερναλίνες InlC και InlJ (ή lmo2821) φέρονται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια, καθώς πραγματοποιούν την εισβολή του παθογόνου σε κύτταρα κατά τα τελευταία στάδια της λοίμωξης (μετ' εντερικά) (Roche et al., 2008). Η InlJ (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *inlJ*), συμμετέχει στην επιτυχή διέλευση του παθογόνου από τον εντερικό φραγμό, χωρίς ωστόσο να έχει διευκρινιστεί ακριβώς η λειτουργία της (Sabet et al., 2005). Αντιθέτως, μελέτες για την InlC (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *inlC*) έχουν καταδείξει ότι 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) (Leung et al., 2013).

Εκτός από τις παραπάνω ιντερναλίνες, οι ιντερναλίνες InlC2, InlD, InlE, InlF και InlH φέρονται να συμμετέχουν στο δυναμικό μολυσματικότητας του παθογόνου, χωρίς όμως να έχει κατανοηθεί καλά ο ρόλος τους (Orsi et al., 2011). Οι InlC2, InlD, InlE, και InlF θεωρούνται χρήσιμες σε στάδιο της παθογένειας διαφορετικό από αυτό της εισβολής (Dramsi et al., 1997), ενώ κύτταρα με μεταλλαγμένα γονίδια *inlG*, *inlH* και *inlE*, έχουν παρουσιάσει μειωμένη *in vivo* λοιμογόνο δύναμη, χωρίς όμως καμία επίδραση στην είσοδο του παθογόνου στα επιθηλιακά κύτταρα ή στον ενδοκυτταρικό του πολλαπλασιασμό (Rafflesbauer et al., 1998). Επιπλέον, οι InlC, InlD, InlE, InlF, InlG, InlH και InlJ έχουν αναφερθεί ως μη ικανές να πραγματοποιήσουν μόνες τους φαγοκύτωση σε κύτταρα θηλαστικών (Engelbrecht et al. 1996, Dramsi et al. 1997, Sabet et al. 2005). Ωστόσο, μελέτες μεταλλάξεων σε διαφορετικά γονίδια ιντερναλινών, συμπεριλαμβανομένων και των *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlG*, *inlH* και *InlE*, έδειξαν ότι η συμβολή της InlA διευκολύνεται από την παρουσία και άλλων ιντερναλινών,

γεγονός το οποίο υποδηλώνει μια συνεργασία μεταξύ των διαφόρων ιντερναλινών κατά την εισβολή του παθογόνου στο κύτταρο-ξενιστή (Bergmann et al., 2002).

Προκειμένου να προσδιοριστεί η παθογόνος δυναμικότητα στελεχών του βακτηρίου *L. monocytogenes*, οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι λοιμογόνοι παράγοντες, μαζί με τις ιντερναλίνες, είναι τα γονίδια που ανήκουν στη νησίδα γονιδίων παθογένειας LIPI-1, καθώς εκεί βρίσκονται τα σημαντικότερα γονίδια της λοιμογόνου δράσης του μικροοργανισμού. Η νησίδα είναι παρούσα και λειτουργική στα βακτήρια *L. monocytogenes* και *L. ivanovii*, παρουσιάζει μια μη-λειτουργική εκδοχή της στον μικροοργανισμό *L. seeligerii* και είναι εντελώς απύσα από τα είδη *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. marthii* και *L. grayi*. Όσον αφορά στα βακτηριακά είδη *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis* και *L. fleischmannii*, δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία επί του παρόντος. Ωστόσο, τα είδη αυτά έχουν περιγραφεί ως μη-αιμολυτικά και μη λοιμογόνα.

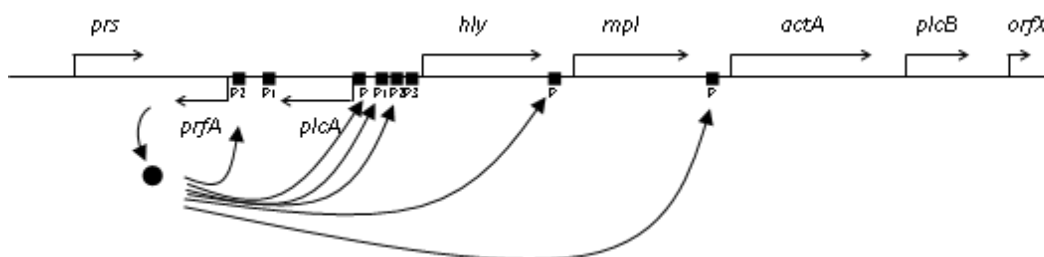
Η νησίδα που βρίσκεται στον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* πλαισιώνεται από τα γονίδια *prs* και *orfX* και αποτελείται από τα έξι γονίδια *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* και *plcB*. Πανομοιότυπη είναι και η φυσική οργάνωση την νησίδας που υπάρχει στο είδος *L. ivanovii*, ενώ η εκδοχή της που είναι παρούσα στον μικροοργανισμό *L. seeligerii* είναι διαφοροποιημένη και επιπλέον, μη-λειτουργική (Εικόνα 6) (Paramithiotis et al., 2014).



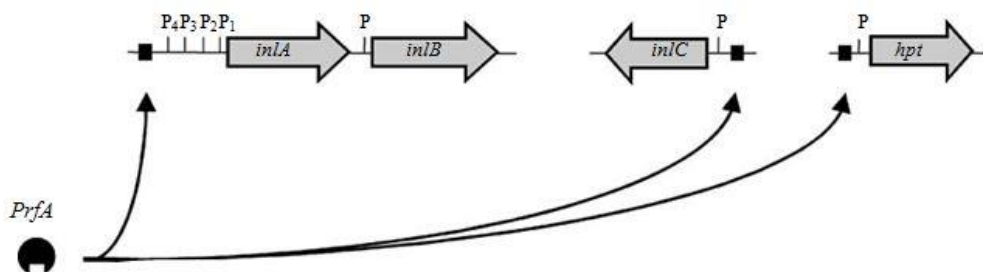
**Εικόνα 6.** Φυσική οργάνωση του συμπλέγματος γονιδίων παθογένειας LIPI-1 στους μικροοργανισμούς *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* και *L. seeligerii*. Η κατεύθυνση της μεταγραφής υποδεικνύεται από τα αντίστοιχα βέλη (Patamithiotis et al., 2014).

Η μεταγραφή των γονιδίων που υπάρχουν στο σύμπλεγμα LIPI-1 ελέγχεται κυρίως από το μεταγραφικό εκκινητή PrfA, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *prfA* και είναι μέλος των κυκλικών μονοφωσφορικών αδενοσινών (cAMP) πρωτεϊνών-υποδοχέων, της

(CRP)/FNR οικογένειας των βακτηριακών ρυθμιστών. Η μεταγραφή του PrfA απαιτεί την παρουσία της κοινής αλληλουχίας TTAACANNTGTTAA, η οποία αποτελεί μία αλληλουχία 14 ζευγών βάσεων δυαδικής συμμετρίας και αναφέρεται ως ‘PrfA-box’ (Εικόνα 7). Επιπλέον, η έκφραση περισσότερων από 140 γονιδίων επηρεάζεται άμεσα ή έμμεσα από το PrfA, υπογραμμίζοντας έτσι τη σημαντικότητα του συγκεκριμένου μορίου στην ομοίωση του *L. monocytogenes* (Paramithiotis et al., 2014) (Εικόνα 8).



**Εικόνα 7.** Μεταγραφική οργάνωση της νησίδας LIPI-1 στον *L. monocytogenes*. Το P αντιστοιχεί στις θέσεις των γνωστών υποκινητών. Τα μαύρα κουτάκια υποδεικνύουν την παρουσία του ‘PrfA-box’ και τα βέλη την εξαρτώμενη από το PrfA ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο, (Paramithiotis et al., 2014).



**Εικόνα 8.** Εξαρτώμενη από το PrfA ρύθμιση μεταγραφής των γονιδίων *inlA*, *inlB*, *inlC* και *hpt* (Kuhn et al., 2008).

Το γονίδιο *hly* κωδικοποιεί μια τοξίνη δέσμησης χοληστερίνης και σχηματισμού πόρου, τη λιστεριολυσίνη O (listeriolysin O, LLO). Η λιστεριολυσίνη O είναι μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη μεγέθους 58-60 kDa (Palmer, 2001) και η βέλτιστη αιμολυτική της δράση πραγματοποιείται σε pH 5.5 (Geoffroy et al., 1987). Η τοξίνη αυτή είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική διαφυγή του παθογόνου από τα φαγοκυτταρικά κενοτόπια, επιτρέποντας έτσι την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, με βάση πρόσφατες

μελέτες όπου επανεξετάστηκε ο ρόλος της LLO κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, έχουν εισηγηθεί απόψεις για επιπλέον δράση της, πριν από την εσωτερίκευση του βακτηρίου εντός του κυττάρου (Hamon et al., 2012). Ως εκ τούτου, η ύπαρξή της θεωρείται αναγκαία για την αποτελεσματική έκφραση της παθογένειας του μικροοργανισμού, γεγονός το οποίο υποστηρίζεται και από μελέτες κατά τις οποίες μεταλλαγμένα μη αιμολυτικά και μη λοιμογόνα στελέχη αποκτούσαν παθογονικότητα έπειτα από εισαγωγή του γονιδίου *hly* σε αυτά (Gaillard et al. 1986, Portnoy et al. 1988, Cossart et al. 1989).

Για τη λύση των κενотоπίων και των φαγοσωμάτων εντός των οποίων βρίσκεται ο παθογόνος, η LLO συνεργάζεται με δύο φωσφολιπάσες C που κωδικοποιούνται στο LIPI-1: την PlcA και την PlcB. Η πρώτη είναι μία φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη φωσφολιπάση C (PI-PLC) μεγέθους 33 kDa, η οποία είναι ενεργή σε εύρος pH από 5.5 έως 7 και κωδικοποιείται από το γονίδιο *plcA* (Aurora et al., 2008). Η δεύτερη είναι μια φωσφατιδυλο-χολίνη φωσφολιπάση C (PC-PLC) μεγέθους 29 kDa η οποία είναι ενεργή σε εύρος pH από 6 έως 7 και κωδικοποιείται από το γονίδιο *plcB*. Η PC-PLC υδρολύει την φωσφατιδυλοχολίνη, το κύριο συστατικό του φωσφολιπιδίου της λεκιθίνης και γι' αυτό είναι γνωστή και ως 'λεκιθινάση'. Γενικά έχει αποδειχθεί ότι υδρολύει ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, όπως η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλοσερίνη και η σφιγγομυελίνη, αλλά δεν είναι ικανή να υδρολύσει την φωσφατιδυλινοσιτόλη (Kuhn et al., 2008). Η PC-PLC σε συνεργασία με την PI-PLC και την LLO προωθούν λύση του αρχικού κενотоπίου. Επιπλέον, η PC-PLC με την LLO προάγουν τη λύση των κενотоπίων διπλού στρώματος μεμβράνης (Roche et al., 2008). Ωστόσο, η PlcB είναι ικανή να προκαλέσει τη λύση του αρχικού κενотоπίου και απουσία της LLO (Grundling et al., 2003).

Η PC-PLC εκφράζεται ως ένα προένζυμο, του οποίου η ενεργοποίηση πραγματοποιείται στο όξινο περιβάλλον των κενотоπίων και επάγεται από την βακτηριακή μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου Mpl (Domann et al. 1991, Raveneau et al. 1992). Η Mpl είναι μια θερμολυσίνη μεγέθους 35 kDa, η οποία είναι ενεργή σε πολύ μεγάλο εύρος pH και θερμοκρασιών (Coffey et al., 2000) και κωδικοποιείται από το γονίδιο *mpl* (Mengaud et al., 1991). Μελέτες έχουν καταδείξει ότι εμπλέκονται δύο ανεξάρτητες οδοί στην ενεργοποίηση του PC-PLC εντός των κενотоπίων. Η μία είναι εξαρτώμενη από την Mpl και η άλλη είναι ανεξάρτητη από αυτήν, με την τελευταία να είναι πολύ ευαίσθητη σε αναστολές πρωτεασών κυστεΐνης. Είναι αρκετά ενδιαφέρον ωστόσο, ότι η ενεργοποίηση της PC-PLC, είτε με τον ένα είτε με τον άλλο τρόπο, είναι ευαίσθητη στη βαφιλομυκίνη A<sub>1</sub>. Η βαφιλομυκίνη A<sub>1</sub>

(bafilomycin A<sub>1</sub>) είναι ένας αναστολέας της ΑΤΡάσης των κενοτοπίων, ο οποίος παράλληλα αναστέλλει και την αυτοφαγία, εμποδίζοντας έτσι την κενοτοπική οξίνιση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση του προενζύμου εξαρτάται από την οξίνιση των κενοτοπίων και ως εκ τούτου ελέγχεται από ένα συνδυασμό παραγόντων τόσο του βακτηρίου όσο και του ξενιστή (Marquis et al., 1997).

Το γονίδιο *actA* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ActA, μια πρωτεΐνη επιφάνειας που φαίνεται να είναι ένα πολυλειτουργικός παράγοντας της λοιμοτοξικότητας. Το γονίδιο αυτό είναι απαραίτητο για την ενδο και δια-κυτταρική κινητικότητα η οποία βασίζεται στην ακτίνη. Παράλληλα όμως, φέρεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στην εισβολή του παθογόνου εντός των επιθηλιακών κυττάρων (Suarez et al., 2001). Ανάλυση της διεισδυτικής ικανότητας στελεχών τα οποία είτε δεν έφεραν το γονίδιο είτε παρουσίαζαν υπερέκφρασή του, κατέδειξαν ότι η ActA μπορεί να λειτουργήσει ως πρωτεΐνη-μεσολαβητής της εισβολής, τουλάχιστον όταν υπερεκφράζεται (Suarez et al., 2001). Τέλος, έχει αναγνωριστεί ως μία από τους πολλαπλούς μηχανισμούς, όπως οι PI-PLC και PC-PLC, που χρησιμοποιεί ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* για να αποφύγει την καταστροφή του από την αυτοφαγία των κυττάρων ξενιστών (Birmingham et al., 2007).

Την τελευταία δεκαετία, οι μελέτες που διεξάγονται για τον προσδιορισμό παθογονικότητας στελεχών *L. monocytogenes*, μελετούν όλα τα παραπάνω γονίδια μαζί με το γονίδιο *iap* (invasion associated protein). Το γονίδιο *iap*, γνωστό και ως *p60*, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Iap, η οποία βρίσκεται σε όλα τα στελέχη του βακτηρίου *L. monocytogenes* (Kuhn et al. 1989, Bubert et al. 1992) και είναι παρούσα στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων (Wood et al., 1993). Έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διεκπεραίωση της εισβολής του παθογόνου σε ινοβλάστες, ηπατοκύτταρα και μακροφάγα ποντικών, ενώ θεωρείται και απαραίτητη για τη σωστή διαίρεση του κυττάρου καθώς έχει ικανότητα υδρόλυσης της μουρεΐνης (Bubert et al. 1992, Haase et al. 1995).

#### **1.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ**

Στους ανθρώπους η λοίμωξη εμφανίζεται συνήθως σε ευπαθείς ομάδες, μεταξύ των οποίων οι έγκυες γυναίκες, τα νεογνά και οι ανοσοκατεσταλμένοι ενήλικες. Παράλληλα, παράγοντες που προκαλούν ανοσοκαταστολή όπως η μεταμόσχευση οργάνων ή η μόλυνση με ιούς που προσβάλλουν το ανοσοποιητικό σύστημα, μπορούν να οδηγήσουν σε εκδήλωση

της ασθένειας. Στους πάσχοντες από AIDS, για παράδειγμα, η λιστερίωση είναι 300 φορές περισσότερο συχνή (Jurado et al., 1993). Παρόλα αυτά, περιστασιακά εμφανίζεται και σε άτομα στα οποία οι προδιαθέτοντες παράγοντες είναι ασαφείς.

Η συχνότητα εμφάνισης της μόλυνσης αυξάνεται με την ηλικία, με αποτέλεσμα η μέση ηλικία των ασθενών να είναι μεγαλύτερη από 55 έτη. Οι άνδρες ηλικίας μεγαλύτερης των 40 ετών μολύνονται συχνότερα από τις γυναίκες, ενώ παράλληλα, επειδή οι γυναίκες μολύνονται συνήθως κατά την αναπαραγωγική ηλικία, η συνολική κατανομή της λοίμωξης ως προς το φύλο, συγκεντρώνεται στον ανδρικό ηλικιωμένο και ανοσοκατεσταλμένο πληθυσμό (Wagner & McLauchlin, 2008).

Η λιστερίωση εμφανίζεται στον άνθρωπο υπό μορφή σποραδικών κρουσμάτων, εξάρσεων ή επιδημιών. Εμφανίζει έντονη εποχικότητα και σε αντίθεση με τη λιστερίωση που εκδηλώνεται στα ζώα και έχει αιχμή την άνοιξη, η ανθρώπινη λιστερίωση εμφανίζει έξαρση στα τέλη του καλοκαιριού και κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου. Η περίοδος επώασης στους ανθρώπους μεταξύ έκθεσης (κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων) και κλινικής διάγνωσης της νόσου ποικίλλει ευρέως μεταξύ των ατόμων, από 1 έως 90 ημέρες με ένα μέσο για την ενδομήτρια μόλυνση περίπου στις 30 ημέρες (McLauchlin et al., 1991).

Η ελάχιστη μολυσματική δόση για τη λιστερίωση δεν έχει διευκρινιστεί, παρόλο που είναι πιθανό να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ατόμων. Ωστόσο, είναι γενικώς αποδεκτό ότι υπάρχει μία σχέση μεταξύ δόσης-απόκρισης και ότι η πιθανότητα εκδήλωσης της ασθένειας έπειτα από κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν λιγότερα από 100 CFU (colony-forming units) ανά γραμμάριο, είναι μικρή (Wagner & McLauchlin, 2008). Ως εκ τούτου, ο Κανονισμός (ΕΚ) 2073/2005 της επιτροπής της 15<sup>ης</sup> Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, απαιτεί απουσία του παθογόνου στα 25 g έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων που προορίζονται για βρέφη και για ειδική ιατρική διατροφή. Παράλληλα, επιτρέπει την παρουσία του στα υπόλοιπα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που διατίθενται στην αγορά, θέτοντας σαν όριο τα 100 CFU/g, υπό την προϋπόθεση ότι τα τρόφιμα είτε υποστηρίζουν την ανάπτυξη αυτού του βακτηρίου είτε όχι, δε θα χρησιμοποιηθούν για σίτιση βρεφών και ασθενών, καθώς και ότι το όριο αυτό δε θα έχει ξεπεραστεί στο τέλος της εμπορευσιμότητας του προϊόντος (EC, 2005). Σε αντίθεση με την παραπάνω προσέγγιση, οι Ηνωμένες Πολιτείες έχουν ορίσει από τη δεκαετία του 1980 μηδενικό όριο ανοχής για τον παθογόνο σε επεξεργασμένα τρόφιμα (Dawson et al., 2006). Το επίπεδο μόλυνσης στα τρόφιμα που έχουν συσχετιστεί με την λοίμωξη έχει καταδείξει ένα

μέσο όρο επιπέδου μόλυνσης  $10^2$ - $10^6$  CFU/ml/g στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Γενικά, δεδομένα από περιστατικά λοίμωξης και εξέτασης των επιπέδων μόλυνσης των υπαίτιων τροφίμων, έχουν υποδείξει ότι το επίπεδο μόλυνσης για την πρόκληση σοβαρής ασθένειας είναι χαμηλό (Wagner & McLauchlin, 2008).

Η λιστερίωση εμφανίζεται είτε ως μία γενικευμένη λοίμωξη, είτε ως τοπική μόλυνση διαφόρων σημείων του οργανισμού. Τα συμπτώματά της μπορεί να είναι ήπια και όμοια με εκείνα μιας γρίπης ή μιας τοπικής λοίμωξης του δέρματος. Εντούτοις, προκαλεί κυρίως σηψαιμία, μηνιγγίτιδα και μηνιγγοεγκεφαλίτιδα (Silk et al., 2012) και η θνητότητα της κυμαίνεται σε πολύ υψηλά επίπεδα (20-40%) (Farber & Peterkin, 1991). Σπάνιες επιπλοκές είναι η ενδοκαρδίτιδα σε άτομα με καρδιακά προβλήματα και διάφορες τοπικές μολύνσεις, όπως ενδοφθαλμίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα και περιτονίτιδα (Slutsker & Schuchat, 1999). Η λοίμωξη προκαλεί πολυμορφοπύρηνη λευκοκυττάρωση που εξελίσσεται σε μονοπύρηνη λευκοκυττάρωση, ενώ τα συμπτώματα συμπεριλαμβάνουν πυρετό, σπασμούς, ρίγος, κεφαλαλγία, διάρροια και έμετο (Sutherland, 1989).

Ανάλογα με την ηλικιακή ομάδα των ασθενών διακρίνονται δύο κύριες μορφές λιστερίωσης, η εμβρυομητρική/νεογνική λιστερίωση και η λιστερίωση ενηλίκων (Schuchat et al. 1991, Lorber 1996, Vázquez-Boland 2001). Η πρώτη μορφή προκύπτει από τον αποικισμό του παθογόνου στο αίμα, το οποίο καταλήγοντας στον πλακούντα οδηγεί σε εισβολή του βακτηρίου εντός του εμβρύου. Αποτέλεσμα αυτού είναι είτε η αποβολή του εμβρύου συνήθως στο τελευταίο τρίμηνο της κυοφορίας, είτε η γέννηση ενός μωρού ή ενός θνησιγενούς εμβρύου με σοβαρό και συνήθως θανατηφόρο σηψαιμικό σύνδρομο, γνωστό ως σηπτική κοκκιωμάτωση του νεογνού (granulomatosis infantiseptica). Η μόλυνση είναι συνήθως ασυμπτωματική στη μητέρα, αν και γυναίκες οι οποίες υπέστησαν αποβολή λόγω λιστερίωσης αναφέρουν εκδήλωση ήπιων συμπτωμάτων που παραπέμπουν σε κοινό κρυολόγημα (πυρετός, μυαλγία) τις τελευταίες 15 ημέρες πριν την αποβολή (Painter & Slutsker 2007, Kuhn et al. 2008, Jackson et al. 2010). Η εκδήλωση περιγεννητικής λιστερίωσης που επηρεάζει τα νεογνά ηλικίας μεταξύ 1 και 8 εβδομάδων μετά τον τοκετό, είναι λιγότερο συχνή και μπορεί να προκληθεί από χαμηλού επιπέδου διαπλακουντιακή λοίμωξη, εισρόφηση μολυσμένων εκκρίσεων από τη μητέρα ή από οριζόντια μετάδοση στους θαλάμους νεογνών λόγω μολυσμένων αντικειμένων ή ανεπαρκούς υγιεινής του προσωπικού. Σε αυτήν την περίπτωση τα νεογνά εμφανίζουν εμπύρετο σύνδρομο το οποίο συνδέεται συνήθως με μηνιγγίτιδα, αν και μπορεί να παρατηρηθούν επίσης γαστρεντερίτιδα και

πνευμονία. Σε σχέση με τη λιστερίωση που εκδηλώνεται νωρίς στα έμβρυα, η θνησιμότητα είναι γενικά χαμηλότερη (Farber & Peterkin 1991, Farber et al. 1991, Slutsker & Schuchat 1999, Vázquez-Boland et al. 2001). Η δεύτερη μορφή λιστερίωσης, που αφορά ενήλικες στους οποίους δεν συμπεριλαμβάνονται οι έγκυες, συνδέεται κατά κανόνα (50-70% των περιπτώσεων) με λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και εκδηλώνεται ως μηνιγγίτιδα ή συχνότερα ως μηνιγγοεγκεφαλίτιδα. Απόστημα στον εγκέφαλο εκδηλώνεται στο 10% των λοιμώξεων του ΚΝΣ, ενώ η θνησιμότητα λόγω μόλυνσης του εγκεφάλου από το βακτήριο *Listeria* κυμαίνεται μεταξύ 20 και 60%, ανάλογα με την υποκείμενη κατάσταση του ασθενούς. Η δεύτερη πιο κοινή εκδήλωση της λοίμωξης του παθογόνου σε ενήλικα ασθενή είναι η βακτηριαμία, η οποία ακολουθείται από προβλήματα στο καρδιαγγειακό σύστημα (ενδοκαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, αρτηρίτιδα), στο αναπνευστικό σύστημα (πνευμονία, πλευρίτιδα, ιγμορίτιδα), στο μυοσκελετικό σύστημα (αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα) και στους οφθαλμούς (οφθαλμίτιδα, επιπεφυκίτιδα) (Allcock 1992, Gauto et al. 1992, Gallaguer & Watakunakorn 1998, Slutsker & Schuchat 1999, Doganay 2003). Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* συνδέεται έως και με το 10% της εξωνοσοκομειακής βακτηριακής μηνιγγίτιδας και είναι η τρίτη πιο κοινή αιτία της βακτηριακής μηνιγγίτιδας στον ενήλικο πληθυσμό, μετά από τους μικροοργανισμούς *Streptococcus pneumoniae* και *Neisseria meningitidis*. Τέλος, σε ορισμένες ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως ασθενείς με καρκίνο, ο *L. monocytogenes* κατέχει την πρώτη θέση μεταξύ των αιτιών βακτηριακής μηνιγγίτιδας (Schuchat et al. 1991, Brouwer et al. 2006), ενώ στα ανοσοκατεσταλμένα άτομα μπορεί να εμφανίσει οξεία εμπύρετη γαστρεντερίτιδα αλλά ή και καθόλου συμπτώματα (Riedo et al. 1994, Dalton et al. 1997).

## **1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Η διάγνωση της λιστερίωσης καθορίζεται από την απομόνωση του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* από φυσιολογικά άσηπτο σημείο, όπως το αίμα ή το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Επιπλέον, εξαιτίας του ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να θεωρηθεί εσφαλμένα ως διφθεροειδές έπειτα από χρώση Gram, πρέπει να πραγματοποιείται ολοκληρωμένη βακτηριολογική αξιολόγηση. Η ανάκτηση του μικροοργανισμού από δείγματα κοπράνων είναι χρήσιμη όταν υπάρχει υπόνοια για εμπύρετη γαστρεντερίτιδα, αλλά η απομόνωση από τα κόπρανα από μόνη της δεν είναι διαγνωστική, λόγω ύπαρξης



ασυμπτωματικών φορέων. Γενικά, για να τεκμηριωθεί ένα κρούσμα εμπύρετης γαστρεντερίτιδας πρέπει το ποσοστό απομόνωσης μεταξύ συμπτωματικών ατόμων να είναι σημαντικά υψηλότερο από αυτό των ασυμπτωματικών ατόμων.

Τα στελέχη *L. monocytogenes* που απομονώνονται από τα δείγματα αναπτύσσονται σε συνήθη θρεπτικά μέσα. Τα δείγματα επιστρώνονται απευθείας σε αγαρ τρυπτικής σόγιας (tryptic soy agar) που περιέχει 5% αίμα προβάτου, αλόγου ή κουνελιού και ο μικροοργανισμός ταυτοποιείται εντός 36 ωρών. Απομόνωση του μικροοργανισμού από άλλες πηγές, όπως δείγματα κοπράνων που περιέχουν μεγάλο αριθμό ανταγωνιστικών μικροοργανισμών είναι πιο δύσκολη. Σε αυτήν την περίπτωση τα δείγματα πρέπει αρχικά να εμπλουτίζονται επιλεκτικά πριν ενοφθαλμιστούν σε στερεό επιλεκτικό μέσο (Painter & Slutsker, 2007). Η ταυτοποίηση των στελεχών *L. monocytogenes* με χρήση μεθόδων φθορίζοντων αντισωμάτων ή προσεγγίσεων που χρησιμοποιούν ανιχνευτές DNA σε συνδυασμό με την τεχνολογία PCR, μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη για ορισμένα δείγματα. Επιπλέον, πειραματικές δοκιμές για αντισώματα λιστεριολυσίνης O έχουν αποδειχθεί χρήσιμες σε κάποιες επιδημιολογικές μελέτες (Dalton et al., 1997) και έχουν χρησιμοποιηθεί για την υποστήριξη διάγνωσης αρνητικής ως προς τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό της λιστερίωσης του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) (Gaillard et al., 1992).

Όσον αφορά στη θεραπεία της νόσου, δεν έχουν οριστεί ακόμα ούτε το καταλληλότερο αντιβιοτικό για την καταπολέμηση της λιστερίωσης αλλά ούτε και η απαιτούμενη διάρκεια της θεραπείας, καθώς δεν έχουν πραγματοποιηθεί έως τώρα τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές για τον καθορισμό της βέλτιστης αντιμετώπισής της. Η τελευταία, στηρίζεται στη χορήγηση αντιβιοτικών με βάση την πενικιλίνη (αμινοπενικιλινών). Μέχρι πρότινος η λιστερίωση αντιμετωπιζόταν με χορήγηση αμπικιλλίνης (ampicillin) σε συνδυασμό με μικρή ποσότητα γενταμικίνης (gentamicin) (Safdar & Armstrong, 2003). Η αντιμετώπισή της όμως πλέον στηρίζεται στη χορήγηση υψηλών δόσεων αμοξικιλλίνης (amoxicillin) (2-3 γρ./3-4 φορές ημερησίως) με μία επιπλέον δόση γενταμικίνης (gentamicin) (360 mg μία φορά την ημέρα) για τους ενήλικες, με εξαίρεση τις εγκυμονούσες (Hof, 2004). Ο ρόλος των αμινογλυκοσιδών, όπως η γενταμικίνη, δεν είναι ακόμα κατανοητός. Διεισδύουν στα κύτταρα ελάχιστα και μπορεί να είναι αναποτελεσματικές για την ενδοκυτταρική αντιμετώπιση του μικροοργανισμού στο κύτταρο ξενιστή, ενώ ο παθογόνος έχει αποδείξει ικανότητα ανάπτυξης εντός των κυττάρων παρά τις

υψηλές συγκεντρώσεις των εξωκυτταρικών αμινογλυκοσιδών (Havell, 1986). Ωστόσο, στην πλειοψηφία των κρουσμάτων μηνιγγίτιδας, ο μικροοργανισμός βρίσκεται εξωκυτταρικά (Hof, 2003). Σε ασθενείς με λιστερίωση που εμφανίζουν υπερευαισθησία στην πενικιλίνη, έχει αποδειχθεί αποτελεσματική η χορήγηση τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλης (trimethoprim-sulfamethoxazole, TMP-SMX), η οποία εισέρχεται εύκολα στα κύτταρα και δρα αποτελεσματικά σκοτώνοντας τον *L. monocytogenes* (Armstrong, 1995). Συγκριτικά με τις αμινοπενικιλίνες, νέες αντιμικροβιακές κινολόνες φαίνεται να έχουν αυξημένη βακτηριοκτόνο δράση. Φέρονται ως ικανές να διασχίζουν το φράγμα αίματος-εγκεφάλου στο ΚΝΣ και να συσσωρεύονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή, χωρίς όμως να έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές μελέτες ακόμα που να επιβεβαιώνουν αυτές τους τις ιδιότητες (Hof, 2004). Τα βακτηριοστατικά φάρμακα όπως η χλωραμφαινικόλη (chloramphenicol) ή η τετρακυκλίνη (tetracycline) έχουν συσχετιστεί με υψηλά ποσοστά αποτυχίας της θεραπείας και για το λόγο αυτό δε συνιστώνται (Southwick & Purich, 1996). Η μικρή ανταπόκριση των βακτηριοστατικών φαρμάκων και η αργή ανταπόκριση στην πενικιλίνη οφείλονται πιθανώς στην ικανότητα του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* να αναπτύσσεται και να επιβιώνει εντός των κυττάρων. Παρομοίως, για τη θεραπεία της νόσου δεν συνιστώνται ούτε οι κεφαλοσπορίνες, (cephalosporines) εξαιτίας όμως της χαμηλής συγγένειας που παρουσιάζουν με την πρωτεΐνη δέσμευσης της πενικιλίνης του βακτηρίου *Listeria* (Vicente et al., 1990).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ούτε η βέλτιστη διάρκεια θεραπείας της νόσου έχει τεκμηριωθεί ακόμα. Παρ' όλα αυτά, μία συνετή θεραπεία κατά την εγκυμοσύνη διαρκεί 2 εβδομάδες, σε νεογνά με λιστερίωση διαρκεί 2 με 3 εβδομάδες, σε ανοσοκατεσταλμένους ενήλικες με μηνιγγίτιδα και βακτηραιμία 2 με 4 εβδομάδες, ενώ σε πιο πολύπλοκες περιπτώσεις μολύνσεων, όπως η ενδοκαρδίτιδα, το χρονικό διάστημα είναι μεγαλύτερο. Λόγω του ότι οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς έχουν μειωμένη ικανότητα να «καθαρίσουν» τα μολυσμένα κύτταρα, συνιστάται αντιβιοτική θεραπεία διάρκειας από 3 έως 6 εβδομάδες (Armstrong & Fung, 1993). Ωστόσο, υποτροπές έχουν αναφερθεί σε ανοσοκατεσταλμένους έπειτα από 2 εβδομάδες θεραπείας με πενικιλίνη (Watson et al., 1978).

## 1.6 ΠΡΟΛΗΨΗ

Ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης της τροφιμογενούς λιστερίωσης είναι η πρόληψη. Το 2001 και το 2003, η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA), το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) και το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ (U.S. Department of Agriculture, USDA) δημοσίευσαν ένα εθνικό σχέδιο δράσης για το παθογόνο βακτήριο *Listeria* (*Listeria* Action Plan), ώστε να βοηθηθούν οι προσπάθειες οδηγιών ελέγχου που πραγματοποιούνταν από τη βιομηχανία, τις ρυθμιστικές αρχές και τις αρχές δημόσιας υγείας (Painter & Slutsker, 2007).

Τα εν λόγω σχέδια αναφέρονταν σε πολλαπλά σημεία δράσης, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης ρυθμιστικής οδηγίας κατά τη διάρκεια της παραγωγής των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων. Επιπλέον, το 2003, μετά από τη μεγάλη επιδημία που συνδέθηκε με το κρέας γαλοπούλας, το USDA εξέδωσε νέους κανονισμούς με στόχο την περαιτέρω μείωση της μόλυνσης με *L. monocytogenes* των έτοιμων προς κατανάλωση κρεάτων και των προϊόντων από πουλερικά (USDA, 2003). Παράλληλα, διατροφικές συστάσεις δημοσιεύτηκαν προς τους καταναλωτές, οι οποίες και συνέβαλαν στη μείωση της συχνότητας εμφάνισης της νόσου (CDC 1992, U.S. FDA 1992). Τέλος, συστάσεις δημιουργήθηκαν τόσο για το γενικό πληθυσμό όσο και για τις ομάδες αυξημένου κινδύνου (π.χ. ανοσοκατεσταλμένα άτομα, έγκυες, ηλικιωμένοι) (Wagner & McLauchlin, 2008):

### Συστάσεις για το γενικό πληθυσμό

- ✓ Καλό μαγείρεμα των ωμών τροφίμων από ζωικές πηγές, όπως μοσχάρι, χοιρινό και πουλερικά.
- ✓ Καλό πλύσιμο σε σαλάτες, φρούτα και λαχανικά που καταναλώνονται ωμά.
- ✓ Διαχωρισμός μεταξύ άψητων κρεάτων και λαχανικών από μαγειρεμένα και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα.
- ✓ Αποφυγή κατανάλωσης ωμού (μη παστεριωμένου) γάλακτος ή τροφίμων που παρασκευάζονται από νωπό γάλα.
- ✓ Καλό πλύσιμο χεριών, εργαλείων (π.χ. μαχαίρια) και σκευών μαγειρικής (π.χ. επιφάνειες κοπής) έπειτα από χειρισμό ωμών τροφίμων.
- ✓ Διατήρηση των τροφίμων για όσο το δυνατόν μικρότερο χρονικό διάστημα.

- ✓ Τήρηση των οδηγιών αποθήκευσης και κατανάλωση των προϊόντων βάσει των ημερομηνιών λήξης.
- ✓ Καλή αναθέρμανση μαγειρεμένων γευμάτων διατηρημένων με απλή ψύξη και σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στην ετικέτα.
- ✓ Ψύξη όσο το δυνατόν ταχύτερα μαγειρεμένων τροφίμων που δεν καταναλώθηκαν.
- ✓ Συχνός έλεγχος ορθής λειτουργίας των ψυκτικών συσκευών ώστε να διατηρούνται οι θερμοκρασίες ψύξης στα σωστά επίπεδα.

#### Συστάσεις για ομάδες αυξημένου κινδύνου

- ✓ Πολύ καλή αναθέρμανση των περισσευόμενων τροφίμων ή των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων (π.χ. hot dog).
- ✓ Αποφυγή κατανάλωσης μαλακών τυριών (π.χ. φέτα, Brie, Camembert, μπλε τυριά, τυριά μεξικάνικου τύπου). Σκληρά τυριά, επεξεργασμένα τυριά, τυρί κρέμα, τυρί cottage, ή γιαούρτι δεν χρειάζεται να αποφεύγονται.
- ✓ Αποφυγή κατανάλωσης râté.
- ✓ Αποφυγή τροφίμων που προέρχονται από πάγκους αλλαντικών ή αναθέρμανση των αλλαντικών πριν από την κατανάλωση.

Πέραν όμως των εξατομικευμένων συμβουλών προς τους καταναλωτές, ο έλεγχος της λιστερίωσης απαιτεί την ανάληψη δράσης και από τις υπηρεσίες δημόσιας υγείας και τη βιομηχανία τροφίμων. Οι σημαντικές στρατηγικές ελέγχου από τις υπηρεσίες δημόσιας υγείας περιλαμβάνουν την ανάπτυξη και τη διατήρηση έγκαιρων και αποτελεσματικών προγραμμάτων επιτήρησης της ασθένειας, άμεση διερεύνηση των περιπτώσεων λιστερίωσης και επιβολή των ισχυόντων κανονισμών που αποσκοπούν στην ελαχιστοποίηση της παρουσίας του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε τρόφιμα που καταναλώνονται χωρίς περαιτέρω μαγείρεμα. Παράλληλα, είναι επιτακτικό οι βιομηχανίες τροφίμων να μελετούν προσεχτικά τους παράγοντες μόλυνσης και στη συνέχεια να εφαρμόζουν προγράμματα ανάλυσης κινδύνων και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP), για την ελαχιστοποίηση της παρουσίας των παθογόνων μικροοργανισμών σε σημαντικά σημεία της μεταποίησης, της διανομής και της εμπορίας των τροφίμων (Painter & Slutsker, 2007).

## 1.7 ΚΡΟΥΣΜΑΤΑ ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗΣ ΑΠΟ ΦΡΕΣΚΑ ΦΡΟΥΤΑ ΚΑΙ ΛΑΧΑΝΙΚΑ

Αν και ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είχε χαρακτηριστεί ως ανθρώπινο παθογόνο από τη δεκαετία του 1920 (θεωρούμενος λανθασμένα ως αιτία της λοιμώδους μονοπυρήνωσης), το πρώτο τεκμηριωμένο κρούσμα σχετιζόμενο με αυτό το βακτήριο καταγράφηκε το 1979, ενώ η πρώτη επιβεβαιωμένη περίπτωση λιστερίωσης οφειλόμενη σε κατανάλωση τροφής καταγράφηκε το 1981 (Δημόσια Υπηρεσία Υγείας του Καναδά). Ήδη από το 1967, οι Blenden & Szatalowicz ανέφεραν ότι 731 περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης είχαν καταγραφεί μεταξύ 1933 και 1966, επισημαίνοντας ότι φυτικά προϊόντα όπως το μαρούλι ή άλλα φρέσκα λαχανικά επιμολυσμένα με *L. monocytogenes*, ίσως να ήταν υπεύθυνα για μερικές από αυτές τις περιπτώσεις (Hadjilouka et al., 2014).

Η συχνότητα των κρουσμάτων που σχετίζονται επιδημιολογικά με τα φρέσκα φρούτα και λαχανικά έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, λόγω των αλλαγών στις διατροφικές συνήθειες των καταναλωτών και της παγκοσμιοποίησης στην προσφορά τροφίμων. Τα έξι σημαντικότερα περιστατικά λιστερίωσης που έχουν συνδεθεί με την κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών καταγράφηκαν το 1979 στη Βοστώνη, το 1981 στον Καναδά, το 2010 στο Τέξας, το 2011 στο Κολοράντο, το 2015 στο Οχάιο και το 2016 στην Ουάσιγκτον:

### ο Βοστώνη 1979

Το 1986 οι Ho και συν., ανέφεραν ένα κρούσμα λοίμωξης οφειλόμενο σε *L. monocytogenes*, το οποίο εκδηλώθηκε το 1979 και συμπεριελάμβανε 23 ασθενείς από οκτώ νοσοκομεία της Βοστώνης. Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι οι ασθενείς κατανάλωναν συχνότερα ψάρι, τόνο, σαλάτα με κοτόπουλο και τυρί. Ωστόσο, τα μόνα κοινά τρόφιμα ήταν το σέλινο, οι τομάτες και το μαρούλι. Αποτέλεσμα αυτού ήταν να υποθεθεί ότι η κατανάλωση αυτών των λαχανικών είχε πιθανότητα προκαλέσει το κρούσμα της λιστερίωσης, κάτι το οποίο όμως δεν αποδείχθηκε, καθώς κατά τη διάρκεια της επιδημίας δεν έγινε καμία προσπάθεια για να απομονωθούν στελέχη *L. monocytogenes* από τα ύποπτα λαχανικά, ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία του μικροοργανισμού σε αυτά. Τέλος, με το πέρας της ασθένειας είχαν καταγραφεί συνολικά πέντε θάνατοι ασθενών.

### ο Καναδάς 1981

Το πρώτο κρούσμα λιστερίωσης που μπορούσε αδιαμφισβήτητα να συνδεθεί με την κατανάλωση τροφίμων, προκλήθηκε από εμπορικά παρασκευασμένα λαχανοσαλάτα το 1981, στις επαρχίες Prince Edward Island, Nova Scotia και New Brunswick του Καναδά (Schlech et al., 1983). Σαράντα-μία περιπτώσεις (7 ενήλικες και 34 περιγεννητικές) έλαβαν χώρα μεταξύ

1<sup>ης</sup> Μαρτίου και 1<sup>ης</sup> Σεπτεμβρίου 1981 (Beuchat, 1996). Από τις 34 περιγεννητικές περιπτώσεις, υπήρξαν 9 περιπτώσεις θνησιγένειας, 23 περιπτώσεις γέννησης άρρωστου βρέφους με επακόλουθο ποσοστό θνησιμότητας 27% και 2 περιπτώσεις γέννησης υγιούς βρέφους. Το ποσοστό θνησιμότητας των ενηλίκων ήταν 28,6% (Farber & Peterkin, 1991).

Οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν κατέδειξαν τη λαχανοσαλάτα ως πηγή της λοίμωξης. Ο παθογόνος απομονώθηκε από συσκευασία λαχανοσαλάτας από το ψυγείο ασθενούς και από δύο κλειστά πακέτα που είχαν αγοραστεί από δύο διαφορετικές υπεραγορές στη Nova Scotia και παραχθεί από τον ίδιο επεξεργαστή. Και από τις 3 συσκευασίες, καθώς και από το αίμα του ασθενούς, απομονώθηκαν στελέχη *L. monocytogenes* οροτύπου 4b, ο οποίος ήταν και ο ορότυπος του στελέχους της επιδημίας.

Η λαχανοσαλάτα αποτελούνταν από λάχανο και καρότα, τα οποία προμηθεύονταν από χονδρέμπορους και τοπικούς αγρότες. Οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στους προμηθευτές των πρώτων υλών εντόπισαν το γεωργό που ήταν υπεύθυνος για την εξάπλωση του παθογόνου. Ο γεωργός αυτός, πέραν της καλλιέργειας λάχανου διατηρούσε και ένα κοπάδι προβάτων, δύο από τα οποία είχαν πεθάνει από λιστερίωση το 1979 και το 1981. Ο γεωργός χρησιμοποίησε την κοπριά των προβάτων αυτών για την ανάπτυξη των λάχανων, με αποτέλεσμα την εξάπλωση του παθογόνου στην καλλιέργεια. Κατά την περίοδο της επιδημίας, λάχανο από τη συγκεκριμένη καλλιέργεια εντοπίστηκε στον εμπλεκόμενο επεξεργαστή λαχανοσαλάτας, γεγονός που οδήγησε στην πρόταση ότι η λαχανοσαλάτα ήταν η πηγή της νόσου (U.S. FDA, 2013). Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε έπειτα από την απομόνωση του στελέχους 4b από τα εμπλεκόμενα τρόφιμα (Beuchat, 1996).

#### ο Τέξας 2010

Το 2012, οι Gaul et al., ερεύνησαν ένα κρούσμα λιστερίωσης που διήρκεσε επτά μήνες και αφορούσε πέντε νοσοκομεία στο Τέξας. Συνολικά εντοπίστηκαν δέκα ασθενείς (5 γυναίκες), οι οποίοι ήταν κάτοικοι του Τέξας. Οι ηλικίες κυμαίνονταν από 56 έως 93, με μέση ηλικία τα 80 έτη. Πέντε ασθενείς απεβίωσαν εντός 3 μηνών από την πρώτη ημέρα συλλογής των δειγμάτων η οποία επιβεβαίωσε την παρουσία του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Η λιστερίωση φάνηκε να έχει συμβάλει στο θάνατο των 2 ασθενών, ενώ για τους υπόλοιπους 3 ασθενείς που απεβίωσαν, η λιστερίωση καταγράφηκε στα πιστοποιητικά θανάτου ως άμεση ή έμμεση αιτία. Ο τελευταίος ασθενής εντοπίστηκε τον Αύγουστο του 2010. Σύμφωνα με τα ιατρικά αρχεία των περισσότερων ασθενών δεν εντοπίστηκε κανένα κοινό φάρμακο, διαδικασία ή άλλη πιθανή έκθεση, οι ασθενείς όμως δεν περιορίζονταν στο

να καταναλώνουν τροφές που συνήθως συνδέονται με τη λιστερίωση. Επιπλέον, εννέα από αυτούς είχαν νοσηλευτεί σε νοσοκομείο για 5-23 ημέρες, ενώ 1 ασθενής είχε επισκεφτεί 3 νοσοκομεία κατά την τυπική περίοδο επώασης της λιστερίωσης.

Τα παραπάνω στοιχεία οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι ασθενείς είχαν νοσήσει από ένα τρόφιμο το οποίο προμηθεύονταν πολλαπλά νοσοκομεία. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε όταν μια έρευνα διαπίστωσε ότι τα 5 νοσοκομεία χρησιμοποιούσαν τον ίδιο διανομέα για την πλειοψηφία των ειδών διατροφής (κρέας, πουλερικά, παρασκευασμένα και κατεψυγμένα τρόφιμα) και ότι όλοι οι ασθενείς, εκτός από έναν, είχαν καταναλώσει σέλινο σε κύβους συγκεκριμένης μονάδας επεξεργασίας προϊόντων. Η μονάδα αυτή έκλεισε οριστικά τον Φεβρουάριο του 2011. Ωστόσο, η αρχική πηγή του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* δεν προσδιορίστηκε. Το σέλινο που χρησιμοποιούνταν στην εγκατάσταση είχε αναπτυχθεί σε άλλη πολιτεία, προήλθε από πολλές εταιρίες και αγροκτήματα και διανεμήθηκε σε εθνικό επίπεδο.

#### ο Κολοράντο 2011

Το χειρότερο τροφιμογενές κρούσμα λιστερίωσης στην ιστορία των Ηνωμένων Πολιτειών, δεδομένου ότι το CDC άρχισε να παρακολουθεί τα κρούσματα στη δεκαετία του 1970, συνδέθηκε με την κατανάλωση ολόκληρων πεπονιών που προέρχονταν από ένα αγρόκτημα στο Κολοράντο. Το κρούσμα της νόσου σημειώθηκε από τον Ιούλιο μέχρι τον Οκτώβριο του 2011. Σύμφωνα με την τελική έκθεση του CDC στις 27 Αυγούστου του 2012, η λοίμωξη είχε ως αποτέλεσμα 147 νοσηλείες, 33 θανάτους και 1 αποβολή σε 28 πολιτείες. Ο αριθμός των ατόμων που μολύνθηκαν σε κάθε πολιτεία ήταν ο εξής: Alabama (1), Arkansas (1), California (4), Colorado (40), Idaho (2), Illinois (4), Indiana (3), Iowa (1), Kansas (11), Louisiana (2), Maryland (1), Missouri (7), Montana (2), Nebraska (6), Nevada (1), New Mexico (15), New York (2), North Dakota (2), Oklahoma (12), Oregon (1), Pennsylvania (1), South Dakota (1), Texas (18), Utah (1), Virginia (1), West Virginia (1), Wisconsin (2) και Wyoming (4).

Σύμφωνα με ανθρώπους από τους οποίους υπήρχαν διαθέσιμα στοιχεία, το πρώτο κρούσμα καταγράφηκε στις 31 Ιουλίου 2011 και το τελευταίο στις 27 Οκτωβρίου 2011. Μεταξύ των 145 ασθενών με διαθέσιμες πληροφορίες, 143 εισήχθησαν στο νοσοκομείο. Πενήντα οκτώ τοις εκατό των ασθενών ήταν γυναίκες. Οι ηλικίες κυμαίνονταν από <1 έως 96, με μέση ηλικία τα 78 έτη, ενώ οι περισσότεροι από τους ασθενείς ήταν άνω των 60 ετών. Η ηλικία των ανθρώπων που έχασαν τη ζωή τους κυμαινόταν από 48 έως 96, με μέση ηλικία

τα 81 έτη, ενώ οι 33 θάνατοι καταγράφηκαν στις πολιτείες: Colorado (9), Indiana (1), Kansas (3), Louisiana (2), Maryland (1), Missouri (3), Montana (1), Nebraska (1), New Mexico (5), New York (2), Oklahoma (1), Texas (2), και Wyoming (2). Επτά από τις ασθένειες σχετίστηκαν με εγκυμοσύνη. Συγκεκριμένα τρεις διαγνώστηκαν σε νεογέννητα και τέσσερις διαγνώστηκαν σε εγκύους (CDC, 2012).

- ο Οχάιο 2015

Το Σεπτέμβριο του 2015, ένα κρούσμα λιστερίωσης ξεκίνησε να μελετάται από το CDC, τις υπηρεσίες δημόσιας υγείας διαφόρων πολιτειών και την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (U.S FDA). Παρόλο που η έρευνα άρχισε το Σεπτέμβριο του 2015, η πηγή της μόλυνσης παρέμενε άγνωστη έως τον Ιανουάριο του 2016, όταν τα εργαστηριακά αποτελέσματα από συσκευασμένες σαλάτες, συνέδεσαν το κρούσμα της νόσου με την μονάδα επεξεργασίας Dole στο Springfield του Οχάιο.

Από τις 5 Ιουλίου του 2015 έως τις 25 Μαρτίου του 2016, αναφέρθηκε μόλυνση δεκαεννιά ανθρώπων από το βακτήριο *Listeria monocytogenes* σε εννέα πολιτείες: Indiana (1), Massachusetts (1), Michigan (4), New Jersey (1), New York (6), Connecticut (1), Missouri (2), Ohio (2) και Pennsylvania (1). Οι ηλικίες των ασθενών κυμάνθηκαν από 3 έως 83, με μέση ηλικία τα 64 έτη. Εβδομήντα τέσσερα τοις εκατό των πασχόντων ήταν γυναίκες, ενώ μία εξ' αυτών ήταν έγκυος. Και οι 19 ασθενείς ανέφεραν ότι είχαν εισαχθεί στο νοσοκομείο, συμπεριλαμβανομένου και του ενός ατόμου από το Michigan που έχασε τη ζωή του λόγω της νόσου.

Από τις 5 Ιουλίου 2015 έως και τις 31 Ιανουαρίου 2016 πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία βακτηριακών στελεχών *Listeria* και από τους 19 ασθενείς. Η αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος (whole genome sequencing) που πραγματοποιήθηκε στα κλινικά αυτά δείγματα έδειξε ότι υπήρχε σημαντική γενετική συσχέτιση των απομονώσεων. Παράλληλα, οι επιδημιολογικές και εργαστηριακές μελέτες κατέδειξαν ως πιθανή πηγή της διάδοσης του παθογόνου συσκευασμένες σαλάτες που παρασκευάζονταν στη μονάδα επεξεργασίας Dole στο Springfield του Οχάιο. Οι σαλάτες αυτές διατίθεντο στην αγορά με διάφορες εμπορικές ονομασίες, συμπεριλαμβανομένων και των 'Dole, 'Fresh Selections', 'Simple Truth', 'Marketside', 'The Little Salad Bar' και 'President's Choice Organics'.

Από τους 14 ασθενείς που ερωτήθηκαν, 13 (93%) ανέφεραν κατανάλωση συσκευασμένης σαλάτας πριν από την εκδήλωση της ασθένειας. Οι 9 από αυτούς καθόρισαν και την ονομασία της εταιρίας, αναφέροντας κατανάλωση διαφόρων ειδών συσκευασμένης



σαλάτας της εταιρίας Dole. Επιπρόσθετα, ως μέρος ενός τακτικού προγράμματος δειγματοληψίας προϊόντων, το Υπουργείο Γεωργίας του Οχάιο συνέλεξε συσκευασμένη σαλάτα τη εταιρίας από μια τοποθεσία λιανικής πώλησης και πραγματοποίησε έλεγχο για *Listeria*. Η συγκεκριμένη σαλάτα είχε παραχθεί στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας που διέθετε η εταιρία στο Springfield. Ο έλεγχος ήταν θετικός ως προς την παρουσία του παθογόνου και η αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος που πραγματοποιήθηκε, κατέδειξε ότι το απομονωθέν στέλεχος είχε φυλογενετική εγγύτητα με τα στελέχη που είχαν απομονωθεί από τους ασθενείς. Οι πληροφορίες αυτές συνέδεσαν τη νόσο με τις συσκευασμένες σαλάτες Dole που παράγονταν στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας της εταιρίας στο Springfield. Επιπλέον, ο Οργανισμός Δημόσιας Υγείας του Καναδά επιβεβαίωσε την παρουσία του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria* σε συσκευασμένες σαλάτες που είχαν παραχθεί στις ίδιες εγκαταστάσεις επεξεργασίας.

Στις 21 Ιανουαρίου 2016, η Dole ενημέρωσε το CDC ότι είχε σταματήσει την παραγωγή στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας στο Springfield. Επιπλέον, στις 27 Ιανουαρίου 2016, η εταιρία απέσυρε συσκευασμένες σαλάτες που κυκλοφορούσαν στην αγορά και είχαν παραχθεί στη συγκεκριμένη μονάδα επεξεργασίας. Η απόσυρση συμπεριελάμβανε αρκετά είδη και ποικιλίες μειγμάτων σαλάτας που διανέμονταν σε όλες τις Ηνωμένες Πολιτείες και τον ανατολικό Καναδά. Παρόλα αυτά, δεν υπήρξαν στοιχεία που να δείχνουν ότι συσκευασμένες σαλάτες άλλων εγκαταστάσεων επεξεργασίας Dole που βρίσκονται στις Ηνωμένες Πολιτείες, συνδέονται με την ασθένεια (CDC, 2016a).

- Ουάσιγκτον 2016

Το Μάρτιο του 2016, το CDC σε συνεργασία με τις υπηρεσίες δημόσιας υγείας διαφόρων πολιτειών και την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων ξεκίνησαν να ερευνούν ένα κρούσμα λιστερίωσης, το οποίο πρωτοεμφανίστηκε το Σεπτέμβριο του 2013.

Από τις 13 Σεπτεμβρίου 2013, το στέλεχος του συγκεκριμένου κρούσματος επιμόλυνε συνολικά 8 άτομα σε 3 πολιτείες: California (6), Maryland (1) και Washington (1). Το 2016 αναφέρθηκαν δύο ασθενείς, ενώ οι υπόλοιποι έξι που είχαν αναφερθεί τη χρονική περίοδο 2013-2015, συσχετίστηκαν με το κρούσμα μέσω αναδρομικής ανασκόπησης της βάσης δεδομένων PulseNet. Επιπλέον, από τις 23 Σεπτεμβρίου 2013 έως τις 28 Μαρτίου 2016 συλλέχθηκαν δείγματα του παθογόνου και από τους οχτώ ασθενείς. Οι ηλικίες των ασθενών κυμάνθηκαν από 56 έως 86, με μέση ηλικία τα 76 έτη κι εβδομήντα πέντε τοις εκατό των πασχόντων ήταν γυναίκες. Και οι οχτώ ασθενείς εισήχθησαν στο νοσοκομείο, ενώ οι δύο

ασθενείς από το Μέριλαντ και την Ουάσιγκτον έχασαν τη ζωή τους, αν και η λιστερίωση δεν θεωρήθηκε ως η αιτία θανάτου για κανέναν από αυτούς.

Επιδημιολογικές και εργαστηριακές μελέτες κατέδειξαν ως πιθανή πηγή των ασθενειών τα κατεψυγμένα λαχανικά της εταιρίας CRF Frozen Foods of Pasco στην Ουάσιγκτον, τα οποία πωλούνταν με διάφορες εμπορικές ονομασίες. Τρεις από τους οκτώ ασθενείς ερωτήθηκαν για τις τροφές που κατανάλωσαν πριν από την εκδήλωση της ασθένειας. Δύο από αυτούς δήλωσαν την αγορά και κατανάλωση κατεψυγμένων λαχανικών κατά το μήνα πριν από την έναρξη της ασθένειας, ενώ και οι δύο ανέφεραν τη μάρκα κατεψυγμένων λαχανικών ‘Organic by Nature’, η οποία παραγόταν από τη CRF Frozen Foods. Κατά την ίδια χρονική περίοδο, ως μέρος ενός τακτικού προγράμματος δειγματοληψίας προϊόντων, το Τμήμα Γεωργίας του Οχάιο συνέλεξε συσκευασίες κατεψυγμένων λαχανικών από μια τοποθεσία λιανικής πώλησης. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν παρουσία του παθογόνου βακτηρίου *Listeria* σε συσκευασίες που περιείχαν κατεψυγμένο βιολογικό λευκό γλυκό κομμένο καλαμπόκι και κατεψυγμένο βιολογικό αρακά, υπό την εμπορική ονομασία True Goodness by Meijer. Και τα δύο προϊόντα είχαν παραχθεί από την CRF Frozen Foods. Η αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος που πραγματοποιήθηκε σε αυτά τα δείγματα έδειξε σημαντική γενετική συσχέτιση μεταξύ των απομονώσεων του κατεψυγμένου καλαμποκιού και επτά βακτηριακών στελεχών που είχαν απομονωθεί από ασθενείς, καθώς και μεταξύ των απομονώσεων του κατεψυγμένου αρακά και του στελέχους που είχε απομονωθεί από έναν ασθενή. Αυτή η στενή γενετική σχέση επιβεβαίωσε τη συσχέτιση της εκδήλωσης του συγκεκριμένου ξεσπάσματος λιστερίωσης με την κατανάλωση κατεψυγμένων λαχανικών της CRF Frozen Foods.

Στις 23 Απριλίου 2016, η CRF Frozen Foods απέσυρε 11 προϊόντα κατεψυγμένων λαχανικών τα οποία είχαν πιθανώς μολυνθεί με *Listeria*. Στις 2 Μαΐου 2016, η εταιρία επέκτεινε την αρχική ανάκληση και πρόσθεσε σε αυτήν όλα τα προϊόντα βιολογικών και παραδοσιακών κατεψυγμένων λαχανικών που προέρχονταν από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας της στο Pasco της Ουάσιγκτον και είχαν ημερομηνία παρασκευής από την 1<sup>η</sup> Μαΐου του 2014 κι έπειτα (CDC, 2016b).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **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 συντόμηση 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, ( $\lambda$ ), 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 θερμοφιλο 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 200μΜ 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 200C), MgCl<sub>2</sub>, 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 δραστικότητα της πολυμεράσης, ενώ τα ελεύθερα ιόντα Mg<sup>++</sup>, 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).

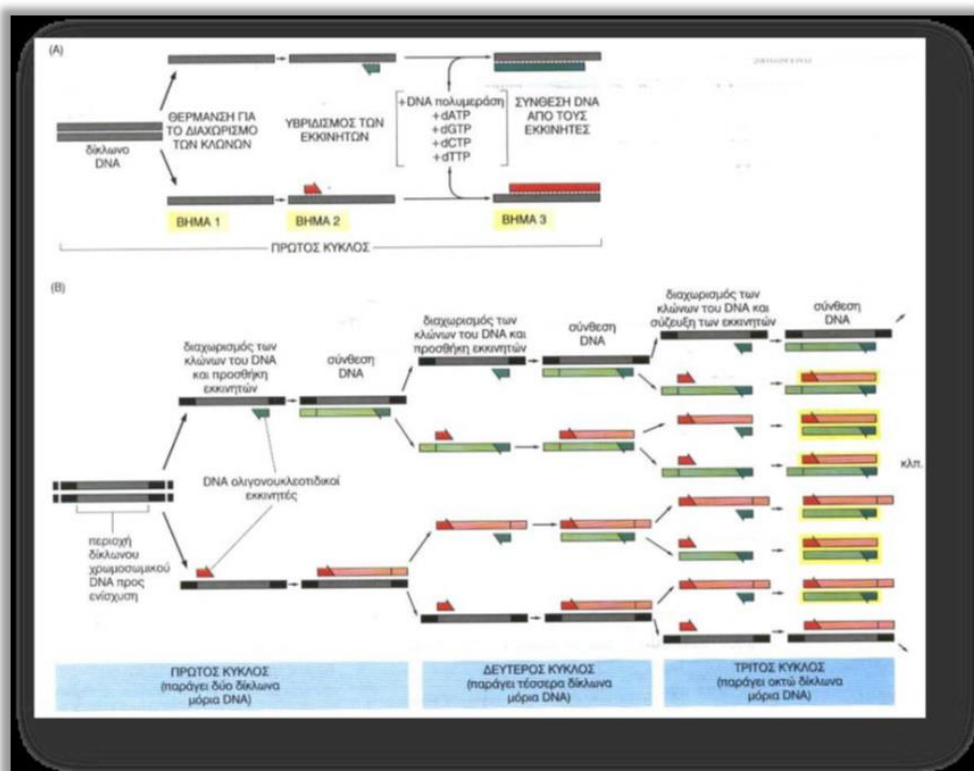
Το DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο μπορεί να προστεθεί στο μείγμα αντίδρασης της PCR σε μονο- αλλά και δίκλωνη μορφή. Το μέγεθος του DNA δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα, αλλά έχειδειχθεί ότι είναι καλύτερο μεγάλα τμήματα DNA να χρησιμοποιούνται αφού πρώτα γίνει η διάσπασή τους με διάφορα ένζυμα 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 τους και (γ) επιμήκυνση της

αντίδρασης, στην οποία η DNA πολυμεράση επιμηκώνει 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 9. Τα στάδια της PCR και τρόπος λειτουργίας της μεθόδου.

### 2.1.3 Η αρχή λειτουργίας της Real Time PCR

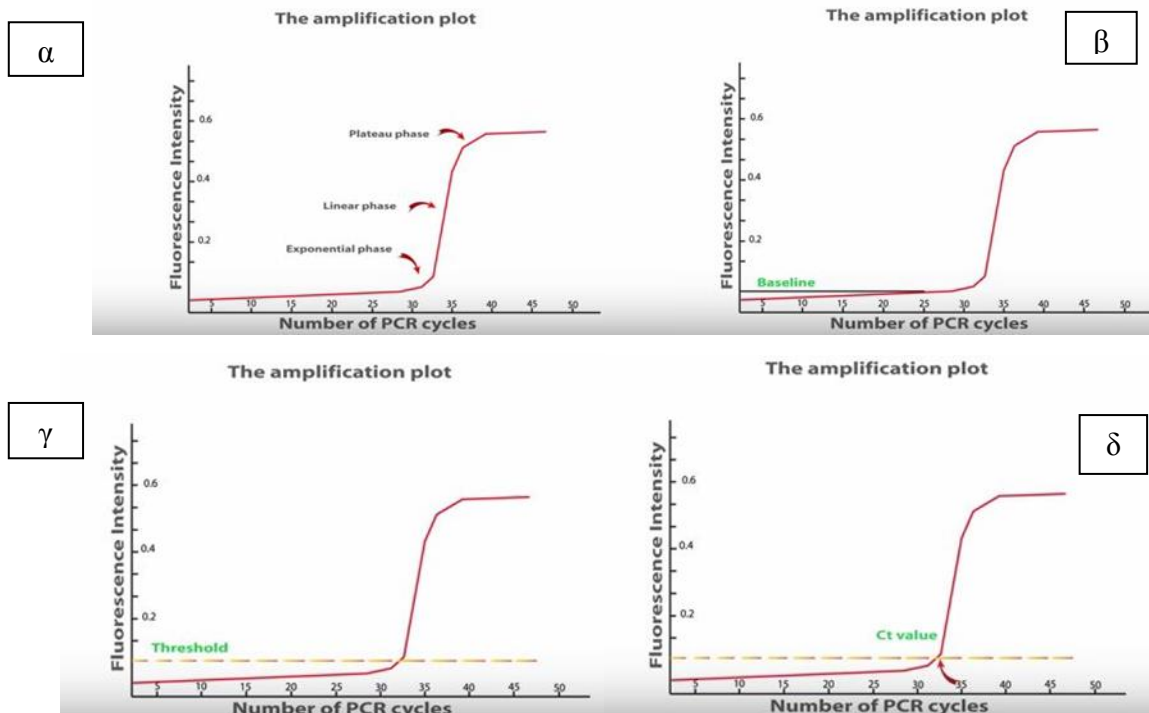
Η Real-Time PCR ή PCR στον πραγματικό χρόνο αποτελεί μία παραλλαγή της συμβατικής PCR, κατά την οποία πραγματοποιείται ανίχνευση και πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων, με τη διαφορά όμως ότι υπάρχει δυνατότητα παρακολούθησης της ενίσχυσης του στοχευόμενου μορίου DNA κατά την διάρκεια της αντίδρασης, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο (Real-time), και όχι στο τέλος, όπως συμβαίνει στη συμβατική PCR. Είναι γνωστή και ως Kinetic PCR, ενώ πολύ συχνά συγχέεται με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcription PCR), εξαιτίας της συντομογραφίας RT-PCR.

Η Real-time μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως ποσοτική PCR (quantitative Real-time PCR). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η μέτρηση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιων ειδικών φθοριζόντων μορίων (fluorescent reporter molecules) που συνδέονται ή ενσωματώνονται στην ενισχυόμενη αλληλουχία. Η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνεται σταδιακά και είναι ανάλογη με την ποσότητα του συντιθέμενου προϊόντος σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Stratagene, 2006), ενώ ο φθορισμός που μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR οδηγεί στη δημιουργία μίας καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot) που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί την αντίδραση καθ' όλη τη διεκπεραίωσή της (Houghton & Cockerill, 2006).

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: α) την εκθετική (exponential phase), β) τη γραμμική (linear phase) και γ) τη φάση κορεσμού (plateau phase) (Εικόνα 10α). Κατά την εκθετική φάση σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται εκθετικός πολλαπλασιασμός του προϊόντος, καθώς βρίσκονται σε περίσσεια τα απαραίτητα συστατικά για τη διεξαγωγή της PCR (dNTP's, πολυμεράση, μόρια εκκινητές). Μόλις ξεκινήσουν τα αντιδραστήρια να εξαντλούνται και αρχίσουν να συσσωρεύονται σταδιακά αναστολείς της αντίδρασης, επέρχεται η γραμμική φάση, κατά την οποία η αντίδραση επιβραδύνεται και οδεύει προς τον τερματισμό της. Τέλος, με την πλήρη εξάντληση των αντιδραστηρίων, η αντίδραση περνάει στη φάση κορεσμού. Οι τρεις φάσεις αυτές διαφέρουν χρονικά μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων, καθώς εξαρτώνται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους.

Οι μετρήσεις που πραγματοποιούνται κατά τη διεξαγωγή ποσοτικής Real-time PCR, αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Το σημείο στο οποίο κάθε δείγμα εισέρχεται

στην εκθετική φάση, ορίζεται ως το ‘κατώφλι’ (threshold cycle ή Ct) (Εικόνα 10δ) της μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος και είναι στατιστικά σημαντικό. Πρόκειται, δηλαδή, για τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται ώστε το φθορίζον σήμα των προϊόντων της αντίδρασης να προσεγγίσει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold) (Εικόνα 10γ), πάνω από το οποίο παρατηρείται σημαντική αύξηση του σήματος, με αποτέλεσμα να ξεχωρίσει έντονα από το επίπεδο ‘θορύβου’ (baseline) (Εικόνα 10β). Ως επίπεδο θορύβου θεωρούνται οι αρχικοί κύκλοι της αντίδρασης κατά τη διάρκεια των οποίων υπάρχει πολύ μικρή αλλαγή στην εκπομπή σήματος και επομένως, μη διαχωρισμός των διαφορετικών σημάτων. Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του προϊόντος που βρίσκεται στο υπό μελέτη δείγμα (Bustin et al., 2005, Kubista et al., 2006). Ως εκ τούτου, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA στο κάθε δείγμα, τόσο νωρίτερα εμφανίζεται το σήμα που προέρχεται από αυτήν και επομένως και τόσο μικρότερη είναι και η τιμή της Ct.



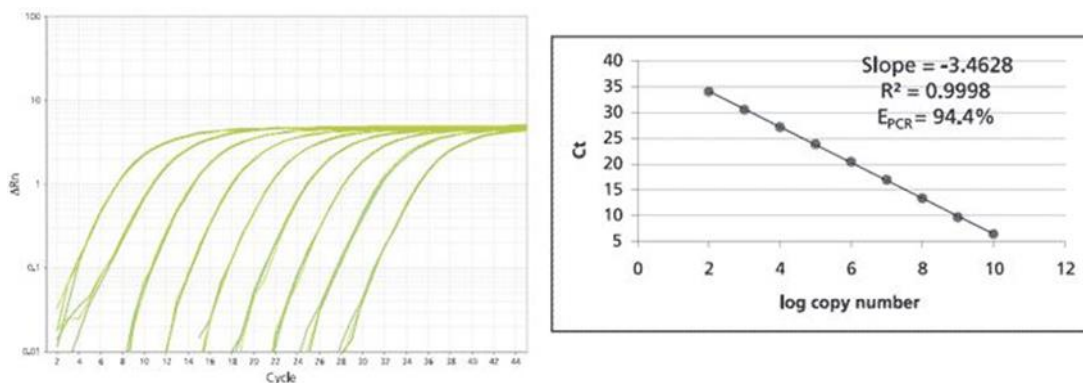
**Εικόνα 10.** Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, στην οποία διακρίνονται α) η εκθετική φάση (exponential), η γραμμική φάση (linear) και η φάση κορεσμού (plateau), β) το επίπεδο ‘θορύβου’ (baseline), γ) το όριο ανίχνευσης σήματος (threshold) και δ) η τιμή Ct.



### **2.1.3.1 Απόλυτη και σχετική ποσοτικοποίηση**

Ανάλογα με το αν απαιτείται υπολογισμός της σχετικής ποσότητας του DNA ή του ακριβούς αριθμού των αντιγράφων του, υπάρχουν δύο διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης: η απόλυτη ποσοτικοποίηση (absolute quantification) και η σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantification) (Livak et al., 2001).

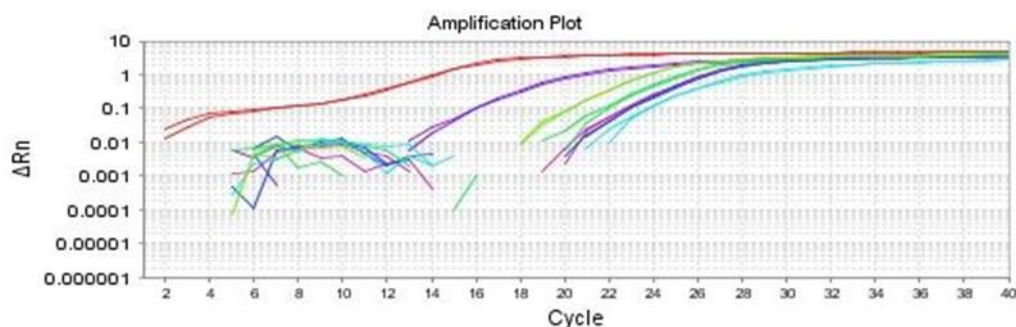
Η απόλυτη ποσοτικοποίηση μέσω Real-time PCR, παρέχει τη μεγαλύτερη ακρίβεια ποσοτικοποίησης δειγμάτων και χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητη η μέτρηση της ακριβούς ποσότητας της αλληλουχίας-στόχου στο δείγμα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη δημιουργία καμπύλης αναφοράς (standard curve) (Εικόνα 11), η οποία χρησιμοποιείται για τη σύγκριση του σήματος που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Για την κατασκευή αυτής της καμπύλης επιλέγεται μία γνωστή συγκέντρωση κάποιου δείγματος, το οποίο μπορεί να προέρχεται από ποικίλες πηγές, όπως πλασμιδιακό DNA, γενωμικό DNA, cDNA, συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια ή και ολικό RNA. Η αρχική αυτή συγκέντρωση υποβάλλεται σε μία σειρά διαδοχικών αραιώσεων και τα δείγματα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται μαζί με τα πειραματικά δείγματα κατά τη διεξαγωγή της Real-time PCR. Μετά το τέλος της αντίδρασης, η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται ως μία ευθεία γραμμή σε γράφημα που εκφράζει τον αριθμό κύκλων (Ct) σε σχέση με την ποσότητα των αντιγράφων της κάθε αραιώσης του αρχικού μάρτυρα. Επομένως, με τη δημιουργία του γραφήματος αυτού είναι εφικτή η σύγκριση των τιμών Ct των πειραματικών δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς, καταλήγοντας έτσι σε ποσοτικοποίηση των αγνώστων δειγμάτων. Ιδανικά, η καμπύλη αναφοράς πρέπει να αποτελείται από τουλάχιστον 4 σημεία και κάθε συγκέντρωση θα πρέπει να επαναλαμβάνεται τουλάχιστον δύο φορές. Επιπλέον, θα πρέπει οι αραιώσεις που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των δειγμάτων που μελετώνται, διαφορετικά τα αποτελέσματα του υπολογισμού της συγκέντρωσης των υπό μελέτη δειγμάτων μπορεί να είναι μη αξιόπιστα. Τέλος, η καμπύλη αναφοράς πρέπει να είναι γραμμική σε όλο το μήκος των συγκεντρώσεων. Σε περίπτωση που χάσει τη γραμμικότητά της σε χαμηλές συγκεντρώσεις, προσεγγίζει πιθανότατα το όριο ανίχνευσης (Stratagene, 2006).



**Εικόνα 11.** Καμπύλη αναφοράς (standard curve) ( $\beta$ ) που σχηματίστηκε από 9 σημεία, δηλαδή από 9 αραιώσεις του αρχικού μάρτυρα ( $\alpha$ ) (Thermo Fisher Scientific, 2016).

Αν και η απόλυτη ποσοτικοποίηση είναι χρήσιμη στον ακριβή προσδιορισμό της ποσότητας μίας αλληλουχίας-στόχου, η πλειοψηφία των επιστημονικών ζητημάτων που αφορούν τη γονιδιακή έκφραση, μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια και επαναληψιμότητα μέσω της σχετικής ποσοτικοποίησης των υπό μελέτη γονιδίων. Η σχετική ποσοτικοποίηση είναι πιο εύκολη στη χρήση της σε σχέση με την απόλυτη και για τη διεξαγωγή της δεν απαιτείται χρήση καμπύλης αναφοράς. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στη σύγκριση της έντασης φθορισμού του γονιδίου που έχει απομονωθεί από το υπό μελέτη δείγμα, με εκείνη που εκπέμπεται από το αντίστοιχο γονίδιο το οποίο έχει απομονωθεί από ένα δείγμα ελέγχου (control sample). Το δείγμα ελέγχου αποτελεί τη βάση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου και μπορεί να είναι είτε το σημείο μηδενικού χρόνου σε μία πειραματική διαδικασία, είτε ένα μη επεξεργασμένο δείγμα, το οποίο χρησιμοποιείται γενικά ως σημείο αναφοράς για την πραγματοποίηση της σύγκρισης των υπόλοιπων δειγμάτων με αυτό (Stratagene, 2006). Ωστόσο, πέραν της χρήσης του δείγματος ελέγχου απαραίτητη κρίνεται και η χρήση ενός γονιδίου αναφοράς (reference gene). Με τη χρήση του γονιδίου αναφοράς, εκτός από τη σύγκριση που δημιουργείται μεταξύ των αγνώστων δειγμάτων και των δειγμάτων ελέγχου, επιτυγχάνεται η ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων, καθώς η έκφραση του γονιδίου αυτού είναι σταθερή τόσο στα άγνωστα δείγματα όσο και στα δείγματα ελέγχου. Επομένως, για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων πραγματοποιείται και σύγκριση της έντασης του φθορισμού του υπό μελέτη γονιδίου έπειτα από την αλυσιδωτή ενίσχυσή του, με εκείνη του γονιδίου αναφοράς που έχει απομονωθεί από τον ίδιο οργανισμό και έχει υποστεί τις ίδιες συνθήκες καταπόνησης (Pfaffl, 2002) (Εικόνα 12). Χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη προσέγγιση, οι διαφορές των τιμών Ct του ίδιου γονιδίου μεταξύ του αγνώστου δείγματος και του δείγματος

ελέγχου και η εξομάλυνση των τιμών αυτών μέσω των αντίστοιχων τιμών ενός γονιδίου αναφοράς, μεταφράζονται τελικώς ως μεταβολές της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου (υπέρ ή υπό έκφραση).



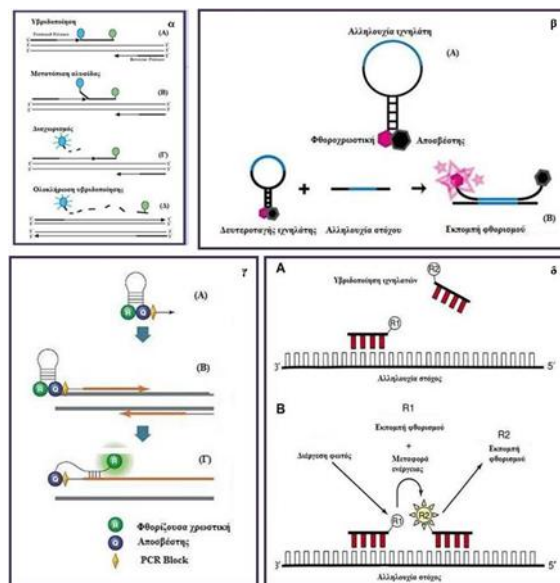
**Εικόνα 12.** Καμπύλες ενίσχυσης γονιδίων στόχων και γονιδίων αναφοράς

### 2.1.3.2 Συστήματα σήμανσης αλληλουχιών-στόχων

Στην ποσοτική Real-time PCR για τη σήμανση των ενισχυόμενων αλληλουχιών υπάρχει δυνατότητα χρήσης δύο διαφορετικών συστημάτων ανίχνευσης των παραγόμενων προϊόντων. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης, μέσω των οποίων ανιχνεύονται όλα τα δίκλινα μόρια που ενισχύονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, ενώ στη δεύτερη κατηγορία εντάσσονται τα ειδικά συστήματα ανίχνευσης, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται στοχευμένος διαχωρισμός της επιθυμητής αλληλουχίας από μη ειδικά προϊόντα που έχουν τυχόν ενισχυθεί, αλλά και από πιθανά διμερή των μορίων εκκινητών (Bustin, 2000, Guilietti et al., 2001).

Στα ειδικά συστήματα ανίχνευσης χρησιμοποιούνται μόρια ανιχνευτές, ειδικά σχεδιασμένα για τις υπό μελέτη αλληλουχίες. Τα ειδικά συστήματα ανίχνευσης έχουν μεγάλη ακρίβεια και εξειδίκευση, καθώς ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται έχει σχεδιαστεί βάσει της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του στόχου ώστε να υβριδοποιείται μόνο σε αυτόν. Συγκεκριμένα, ο ιχνηλάτης (probe) που χρησιμοποιείται φέρει στο ένα του άκρο μία φθορίζουσα χρωστική (fluorophore) και στο άλλο του άκρο ένα μόριο απόσβεσης του φθορισμού (quencher) (Stratagene, 2006). Η εκπομπή φθορισμού από τους ιχνηλάτες πραγματοποιείται όταν κατά την υβριδοποίηση του ιχνηλάτη στην αλληλουχία-στόχο διαχωριστεί η φθορίζουσα χρωστική από το μόριο απόσβεσης (Gibson, 2006). Έτσι, σε περίπτωση απουσίας της αλληλουχίας-στόχου στην αντίδραση ο ιχνηλάτης δεν υβριδοποιείται, το φθορίζον σήμα της χρωστικής απορροφάται από το μόριο απόσβεσης και,

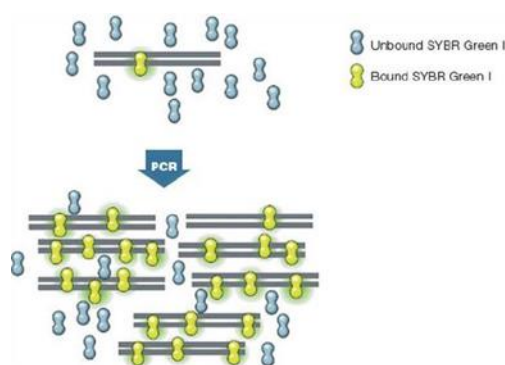
ως εκ τούτου, δεν παρατηρείται φθορισμός εντός του διαλύματος. Αντιθέτως, σε περίπτωση υβριδισμού με την αλληλουχία-στόχο ο ιχνηλάτης φθορίζει και το σήμα ανιχνεύεται και ποσοτικοποιείται από το μηχάνημα της Real-time PCR. Στη συγκεκριμένη κατηγορία συστημάτων ανίχνευσης χρησιμοποιούνται διάφορα είδη ιχνηλατών, όπως οι γραμμικοί ιχνηλάτες (linear probes), οι ιχνηλάτες με δευτεροταγή δομή (structured probes), οι ιχνηλάτες τύπου σκορπιού (Scorpion probe) και οι ιχνηλάτες τύπου FRET (fluorescence resonance energy transfer) (Εικόνα 13). Εκτός από την ακρίβεια και την εξειδίκευση, ένα ακόμα πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου αποτελεί η ικανότητα χρήσης πολλαπλών ιχνηλατών σε μία αντίδραση, οι οποίοι μπορεί να φέρουν διαφορετικές χρωστικές, επιτρέποντας καθ' αυτόν τον τρόπο την ταυτόχρονη ανίχνευση περισσότερων αλληλουχιών στην ίδια αντίδραση (Stratagene, 2006). Σημαντικό μειονέκτημα ωστόσο της μεθόδου, αποτελεί το υψηλό της κόστος.



**Εικόνα 13.** Ιχνηλάτες ειδικών συστημάτων ανίχνευσης: α) γραμμικοί ιχνηλάτες (Gloffke, 2003), β) ιχνηλάτες με δευτεροταγή δομή (Arga et al., 2005), γ) ιχνηλάτες τύπου Σκορπιού (Bio-Rad, 2010) και δ) ιχνηλάτες τύπου FRET (Houghton & Cockerill, 2006).

Στα μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης χρησιμοποιούνται φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες ενσωματώνονται σε δίκλινα μόρια DNA (dsDNA). Μία τέτοια ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι η SYBR green I, η οποία έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται σε οποιοδήποτε δίκλινο μόριο DNA. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη εντός του διαλύματος της αντίδρασης, παρουσιάζει έναν πολύ αγνό φθορισμό. Ωστόσο, η

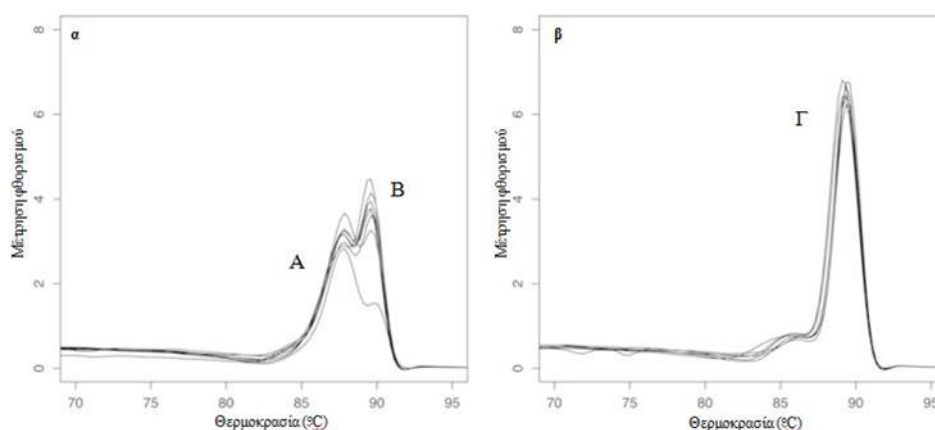
ενσωμάτωσή της στο DNA έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης φθορισμού πάνω από 1000 φορές, ανάλογα με τη συγκέντρωση του παραγόμενου προϊόντος (Stratagene, 2006). Έτσι, με την ενίσχυση του στόχου ενισχύεται αυξάνεται το σήμα φθορισμού και μετριέται άμεσα η αυξανόμενη συγκέντρωση των δίκλωνων μορίων DNA (**Εικόνα 14**). Το γεγονός ότι η SYBR green I μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, την καθιστά πολύ πιο οικονομική σε σχέση με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στα ειδικά συστήματα ανίχνευσης που απαιτούν ειδικό σχεδιασμό των ιχνηλατών. Ωστόσο αυτό αποτελεί ταυτόχρονα και μειονέκτημα, καθώς η πρόσδεση σε όλα τα ενισχυμένα τμήματα DNA που βρίσκονται στο διάλυμα της αντίδρασης συμπεριλαμβάνει πιθανότατα και πρόσδεση σε τυχόν μη ειδικά προϊόντα και διμερή των μορίων εκκινητών. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου. Παρόλα αυτά το συγκεκριμένο μειονέκτημα μπορεί να ξεπεραστεί, μέσω του σωστού σχεδιασμού των μορίων εκκινητών, καθώς και μέσω της βελτιστοποίησης των συνθηκών αντίδρασης ώστε να αποτρέπονται η δημιουργία διμερών των εκκινητών και η ενίσχυση μη επιθυμητών τμημάτων του DNA, αν και δεν είναι πάντα δυνατό να αποφευχθεί η ύπαρξη ενός λανθασμένου σήματος. Η παρουσία του όμως και, ως εκ τούτου, και η ύπαρξη διαφορετικών προϊόντων μπορεί εύκολα και αξιόπιστα να ανιχνευθεί, μέσω της καμπύλης αποδιάταξης (melting curve) που σχηματίζεται μετά το τέλος κάθε αντίδρασης (Wong & Medrano, 2005, Stratagene, 2006).



**Εικόνα 14.** Μη ειδικό σύστημα ανίχνευσης, μέσω χρήσης της φθορίζουσας χρωστικής SYBR green I (Bio-Rad, 2010).

### 2.1.3.3 Καμπύλη αποδιάταξης (Melting Curve / Dissociation Curve)

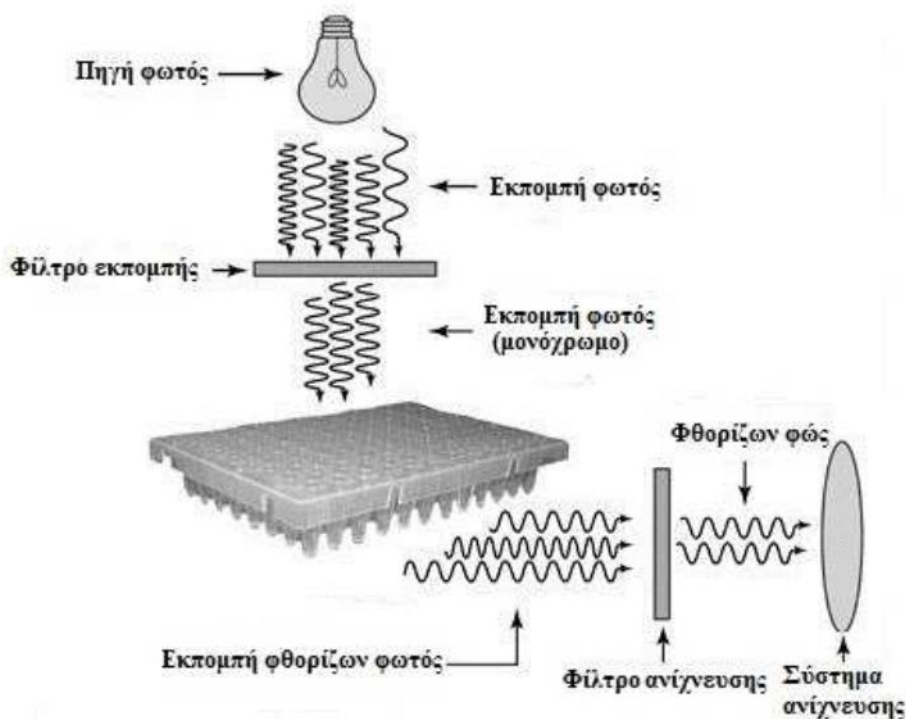
Μία πολύ σημαντική δυνατότητα που παρέχει η Real-time PCR, είναι η κατασκευή καμπύλης αποδιάταξης (melting curve ή dissociation curve). Η καμπύλη αυτή δημιουργείται μετά το τέλος της αντίδρασης και μέσω αυτής πραγματοποιείται αξιολόγηση των προϊόντων που ενισχύθηκαν κατά τη διάρκειά της. Η κατασκευή της βασίζεται στη θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature,  $T_m$ ) των παραγόμενων προϊόντων (Houghton & Cockerill, 2006), στη θερμοκρασία δηλαδή εκείνη όπου πραγματοποιείται αποδιάταξη ενός τμήματος DNA. Η τιμή της  $T_m$  εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA και ως εκ τούτου, τα προϊόντα της ίδιας αντίδρασης θα πρέπει να έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, εκτός και αν υπάρχει επιμόλυνση από άλλες ουσίες, έχουν δημιουργηθεί διμερή εκκινητών ή έχουν ενισχυθεί λανθασμένα και άλλα μη επιθυμητά τμήματα κατά την αντίδραση (Hunt, 2006). Επομένως, σε περίπτωση που τα παραγόμενα προϊόντα έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, εμφανίζεται μία κορυφή στην καμπύλη. Αντιθέτως, στην περίπτωση που ανάμεσα στα επιθυμητά προϊόντα υπάρχουν και μη επιθυμητά, παρατηρούνται κι άλλες κορυφές στην καμπύλη, οι οποίες οφείλονται στη διαφορετική θερμοκρασία αποδιάταξης των συγκεκριμένων προϊόντων (Εικόνα 15). Η ανάλυση των προϊόντων πραγματοποιείται με τήξη τους 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.



**Εικόνα 15.** Καμπύλες αποδιάταξης στις οποίες φαίνεται: α) ύπαρξη μη επιθυμητών προϊόντων (πολλαπλές κορυφές A και B) και β) ενίσχυση μόνο του επιθυμητού προϊόντος (μοναδική κορυφή Γ) (Stüken et al., 2015).

## 2.2 ΣΥΣΚΕΥΗ REAL TIME PCR - ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ

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 16.** 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.





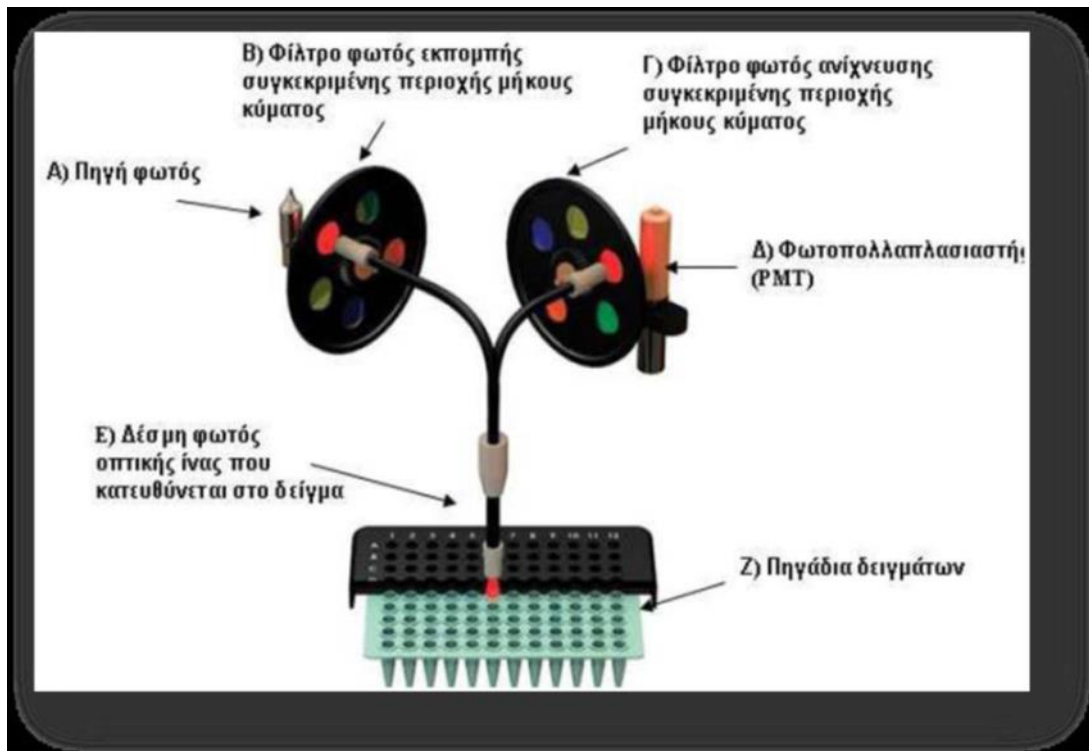
**Εικόνα 17.** Η συσκευή StepOne Plus Real Time PCR της εταιρείας Applied Biosystems International

Η συσκευή (**Εικόνα 17**) 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 18.** Αναλυτική περιγραφή των τμημάτων που αποτελούν την συσκευή StepOne Plus Real Time PCR της εταιρείας Applied Biosystems International.

## **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης γονιδίων παθογένειας του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια ανάπτυξής του σε υγρό θρεπτικό υλικό καθώς και στην επιφάνεια τομάτας, καρότου και αγγουριού, σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Για το σκοπό αυτό, ο στόχος που τέθηκε ήταν η εκτίμηση και η αξιολόγηση της έκφρασης των παθογόνων γονιδίων του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* κατά την ανάπτυξή τους σε επιφάνειες τεμαχίων αγγουριού, τομάτας και καρότου κάτω από τις εξής θερμοκρασίες, 4, 10 και 30 °C. Κατά τη διάρκεια της επώασης πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό (0 ώρες) καθώς και μετά από 0.5, 6 και 24 ώρες. Το παθογόνο *L. monocytogenes* στέλεχος LQC 15257 ορότυπος 4b απομονωμένο από φράουλα, ενοφθαλμίστηκε και σε υγρό θρεπτικό υλικό BHI ( $10^8$  CFU/mL). Η καταμέτρηση του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε με κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές ενώ η έκφραση των γονιδίων *sigB*, *prfA*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* & *inlJ* με RT-qPCR.

Η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεια (*hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* & *inlJ*) καθώς και γονιδίων που έχουν κεντρικό ρόλο στην κυτταρική ομοίωση (*sigB* & *prfA*) του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* κατά την ανάπτυξη σε διάφορα τρόφιμα μελετάται εντατικά τα τελευταία χρόνια χωρίς όμως να έχει μελετηθεί ακόμα στην επιφάνεια των φυτικών ειδών της παρούσας εργασίας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

##### I. Χώρος διεξαγωγής των πειραμάτων

Το παρακάτω πείραμα διεξήχθη στις πειραματικές εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

##### II. Πειραματικό σχέδιο

#### 3.1.1 Παρασκευή ενοφθαλμίματος και προετοιμασία δειγμάτων

Για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *L. monocytogenes* LQC 15257, το οποίο είχε απομονωθεί προηγουμένως από δείγμα φράουλας. Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος ταυτοποιήθηκε ως *L. monocytogenes* μέσω μικροβιολογικών, βιοχημικών και μοριακών μεθόδων. Οι μικροβιολογικές και βιοχημικές μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν βάσει του ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 (ISO, 2004a) και για τη μοριακή ταυτοποίηση του παθογόνου διεξήχθη PCR, από προηγούμενη ερευνητική εργασία του εργαστηρίου, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε από τους D' Agostino et al. (2004). Ορολογική τυποποίηση του στελέχους πραγματοποιήθηκε από την Hadjilouka (2016) σύμφωνα με τους Doumith et al., (2004) η οποία ενέταξε τον παθογόνο στον ορότυπο 4b. Το στέλεχος διατηρούνταν στους -20°C σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI (LABM), παρουσία γλυκερόλης 50%. Πριν από τη διεξαγωγή κάθε πειραματικής διαδικασίας γινόταν ανανέωσή του, μέσω απόψυξης και ανακαλλιέργειάς του δύο φορές σε ζωμό BHI στους 37 °C για 24 h.

Για τη παρασκευή του ενοφθαλμίματος, αρχικά μελετήθηκε ο πληθυσμός του στελέχους έπειτα από ανάπτυξή του σε ζωμό BHI, στους 37 °C για 18 h. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι στους 37 °C έπειτα από 18 h, ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* ανέπτυξε πληθυσμό της τάξεως των 9 log CFU/mL. Για κάθε πείραμα η παρασκευή του ενοφθαλμίματος πραγματοποιείται με ανανέωση αρχικά του στελέχους από τους -20 °C, η οποία ακολουθείται από ανάπτυξη του παθογόνου σε ζωμό BHI στους 37 °C για 18 h. Εν συνεχεία, οι καλλιέργειες των 18 h φυγοκεντρώνταν στους 4 °C, στις 12000 στροφές για 10 λεπτά και εκπλένονταν δύο φορές με ισοτονικό διάλυμα Ringer (LABM). Τέλος,

ακολουθούσε επαναιώρηση τους στον ίδιο διάλυμα, σε όγκο ίδιο με τον αρχικό στον οποίο και είχαν αναπτυχθεί (5mL).

Ο ενοφθαλμισμός σε ζωμό BHI, ντομάτα, αγγούρι και καρότο πραγματοποιούνταν με πληθυσμό της τάξεως των 7.5 με 8 log CFU/mL, μέσω διαδοχικών αραιώσεων. Συγκεκριμένα, φέτες ντομάτας, αγγουριού και καρότου τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους περιέκτες και ψεκάζονταν με περίπου 200  $\mu$ L από την κατάλληλη αραιώση του ενοφθαλμίσματος, ώστε να επιτευχθεί η μίανση των προϊόντων αυτών με τον επιθυμητό πληθυσμό του παθογόνου. Παράλληλα, γινόταν ο ενοφθαλμισμός του ζωμού BHI με το στέλεχος του παθογόνου στα ίδια πληθυσμιακά επίπεδα. Έπειτα από τον ενοφθαλμισμό του ζωμού BHI, της ντομάτας, του αγγουριού και του καρότου, τα δείγματα τοποθετούνταν στους επωαστικούς θαλάμους των 4, 10 και 30 °C. Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι τα υλικά που θα χρησιμοποιούνταν σε κάθε πειραματική διαδικασία (ζωμός BHI, ντομάτα, αγγούρι, καρότο) τοποθετούνταν στους αντίστοιχους θαλάμους επώασης από το προηγούμενο βράδυ, ώστε να έχει ήδη πραγματοποιηθεί εξισορρόπηση της θερμοκρασίας πριν από τον ενοφθαλμισμό.

Για τη διεξαγωγή των μικροβιολογικών και μοριακών αναλύσεων, πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό (0 h) και μετά από 0.5 h, 6 h και 24 h.

### **3.1.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις**

Σε κάθε στάδιο δειγματοληψίας πραγματοποιούνταν πληθυσμιακή καταμέτρηση του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Για την αρίθμηση του παθογόνου στην περίπτωση της ντομάτας, του αγγουριού και του καρότου, μεταφέρονταν ασηπτικά 10 g δείγματος εντός σακούλας stomacher και ομογενοποιούνταν σε θερμοκρασία δωματίου με 90 mL ισοτονικού διαλύματος Ringer. Ακολουθούσε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων κι έπειτα επιστρωνόταν 0.1mL από τις επιθυμητές αραιώσεις σε τρυβλία PALCAM (LABM). Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37 °C για 48 h και καταμετρούνταν οι αποικίες που είχαν αναπτυχθεί στα τρυβλία. Για την αρίθμηση του παθογόνου στην περίπτωση των δειγμάτων ζωμού BHI, μεταφερόταν 1 mL δείγματος σε 9 mL ισοτονικού διαλύματος Ringer για την διεξαγωγή των διαδοχικών αραιώσεων και ακολουθούσαν οι διαδικασίες της επίστρωσης, επώασης και αρίθμησης των τρυβλίων, όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Ως θρεπτικά υλικά σε όλη την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν το υπόστρωμα Brain Heart Infusion (BHI) Broth (LAB 049) και το 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).

### 3.1.3 *In vitro* και *in situ* γονιδιακή έκφραση

#### 3.1.3.1 Ανίχνευση γονιδίων

Για να χαρακτηριστεί το στέλεχος *L. monocytogenes* LQC 15257 ως ικανό να συμμετέχει στη συγκεκριμένη έρευνα, μετά την ορολογική τυποποίησή του πραγματοποιήθηκε μελέτη ανίχνευσης των γονιδίων, η έκφραση των οποίων θα εξεταζόταν στην πορεία. Η μελέτη της παρουσίας των γονιδίων αυτών διεκπεραιώθηκε μέσω συμβατικής PCR, στην οποία στόχοι ήταν τα γονίδια μελέτης *prfA*, *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inlJ*. Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα *16S*, *IGS* και *rpoB*. Η διαδικασία αυτή είχε προηγηθεί κατά την ερευνητική εργασία της Hadjilouka (2016).

Η αλληλουχία του γονιδίου *16S* rRNA χρησιμοποιείται σήμερα για βακτηριακή ταυτοποίηση των ειδών από προκαρυωτικά κύτταρα, καθώς περιέχει κάποιες πολύ καλά διατηρημένες αλλά και πολυάριθμες υπερ-μεταβαλλόμενες περιοχές. Οι μεταβαλλόμενες περιοχές είναι στις περισσότερες περιπτώσεις συγκεκριμένες εντός των ίδιων ειδών ή και μερικές φορές υποειδών (Depierreux-Lafarge & Meheut, 2012). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις τα είδη που ανήκουν σε διαφορετικά ή ταυτόσημα γένη δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν μέσω του *16S* rDNA (Ogier et al., 2004). Επιπλέον, σε ορισμένα βακτηριακά είδη το γονίδιο χαρακτηρίζεται από δύο ή περισσότερα αντίγραφα, λόγω της ετερογένειας του οπερονίου *16S* rDNA (Nubel et al 1996, Crosby & Criddle, 2003). Η καλώς διατηρημένη φύση των γονιδίων rRNA δεν αποτελεί έκπληξη, δεδομένου ότι η λειτουργία τους στην πρωτεϊνοσύνθεση είναι απαραίτητη για το βακτήριο. Το 1991, οι Barry et al. έκαναν μία υπόθεση λέγοντας ότι οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των διαγονιδιακών περιοχών (intergenic spacer, *IGs*) στο ριβοσωμικό DNA δεν είναι τόσο σημαντικές όσο τα rRNA γονίδια και, ως εκ τούτου, υπόκεινται σε γενετικές παρεκκλίσεις με αποτέλεσμα να μην αποτελούν τόσο καλά συντηρημένες περιοχές. Για το λόγο αυτό οι περιοχές rDNA *IGs* έχουν γίνει τμήματα ενδιαφέροντος τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και διαφοροποίηση πολύ στενά σχετιζόμενων βακτηριακών ειδών (Barry et al. 1991, Ji et al. 1994, Drebot et al. 1996, Gurtler et al. 1996). Στη συγκεκριμένη μελέτη ενισχύθηκε η

διαγονιδιακή περιοχή (IGs) μεταξύ των 16S και 23S rRNA γονιδίων. Τέλος, το γονίδιο *rpoB* (RNA-polymerase Beta-subunit) κωδικοποιεί τη β υπομονάδα της RNA πολυμεράσης (RNAP), η οποία περιέχει ένα ενεργό κέντρο υπεύθυνο για τη σύνθεση του RNA και ένα σύνολο καθοριστικών παραγόντων για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του DNA και του σχηματιζόμενου RNA. Σε αντίθεση με το 16S, το γονίδιο *rpoB* έχει το πλεονέκτημα ότι υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο στο γονιδίωμα και ως εκ τούτου, η χρήση του γονιδίου αυτού δεν υπερεκτιμά τον αριθμό των βακτηριακών ειδών σε ένα μικροβιακό οικοσύστημα (Dahlöf et al., 2000). Το *rpoB* έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό και την ταξινόμηση βακτηριακών ειδών και έχει παρουσιάσει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από το 16S rRNA (Blackwood et al., 2004, Da Mota et al. 2004, Drancourt et al. 2004, Ki et al. 2009).

Για τη διεξαγωγή της συμβατικής PCR χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη μορίων εκκινητών που προτείνονται από τη βιβλιογραφία για ορισμένα γονίδια, ενώ για τα υπόλοιπα πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός των μορίων εκκινητών. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έλαβε χώρα έπειτα από εξέταση της συλλογής των αλληλουχιών DNA του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που βρίσκονται στη βάση δεδομένων Genebank, ενώ η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών (sequence alignment) πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Mega5.1 Beta 4 και του προγράμματος CrustalW. Οι χρησιμοποιούμενες αλληλουχίες των μορίων εκκινητών, καθώς και το μέγεθος των τμημάτων που καθορίζουν τα ζεύγη μεταξύ τους, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**. Η παραπάνω διαδικασία είχε προηγηθεί από την Hadjilouka, 2016.

Τα μείγματα αντιδραστηρίων (master mix) εντός των οποίων πραγματοποιήθηκαν οι PCR, από Hadjilouka, 2016, ήταν τα εξής:

Για τα γονίδια *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *lmo2470*, *lmo2672*, *rpoB*, *16S*

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα (1×)
- ✓ MgCl<sub>2</sub> (2mM)
- ✓ dNTP mix (0.2mM)
- ✓ *Taq* πολυμεράση (1U)
- ✓ Primer f (0.9μM)
- ✓ Primer r (0.9μM)
- ✓ Δις απεσταγμένο νερό

Για τα γονίδια *hlyA*, *plcA*, *sigB*, *IGS*

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα (1×)

- ✓ MgCl<sub>2</sub> (2mM)
- ✓ dNTP mix (0.2mM)
- ✓ Taq πολυμεράση (1U)
- ✓ Primer f (1.2μM)
- ✓ Primer r (1.2μM)
- ✓ Δις απεσταγμένο νερό

Τέλος, το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε κατά τη διεξαγωγή της PCR ήταν το ακόλουθο και στις δύο περιπτώσεις μείγματος αντιδραστηρίων:

1. 95°C για 20 sec
  2. 95°C για 10 sec
  3. 60°C για 30 sec
  4. 72°C για 30 sec
  5. 72°C για 5 min
- } ×40 φορές

**Πίνακας 2.** Αλληλουχίες των μορίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό των υπό μελέτη γονιδίων και μεγέθη των αμπλικονίων που σχηματίζουν μεταξύ τους τα ζεύγη των εκκινητών.

Γονίδια	Εκκινητές	Αλληλουχία	Αμπλικόνιο(bp)	Αναφορά
Αναφοράς				
<i>IGS</i>	IGS f	GGCCTATAGCTCAGCTGGTTA	135	Rantsiou et al., 2012a
	IGS r	GCTGAGCTAAGCCCCGTAAA		Rantsiou et al., 2012a
<i>rpoB</i>	RpoB f	CCGCGATGCGAAAACAAT	69	Olesen et al., 2009
	RpoB r	CCWACAGAGATACGGTTATCRAATGC		Olesen et al., 2009
<i>16S</i>	16S f	GATGCATAGCCGACCTGAGA	114	Van der Veen και Abee, 2010
	16S r	CTCCGTCAGACTTTCGTCCA		Hadjilouka et al., 2014
Παθογένειας				
<i>hly</i>	Hly f	TACATTAGTGGAAAGATGG	153	Rantsiou et al., 2012a
	Hly r	ACATTCAAGCTATTATTACA		Rantsiou et al., 2012a
<i>plcA</i>	PlcA f	CTAGAAGCAGGAATACGGTACA	115	Rantsiou et al., 2012a
	plcA r	ATTGAGTAATCGTTTCTAAT		Rantsiou et al., 2012a
<i>plcB</i>	PlcB f	CAGGCTACCACTGTGCATATGAA	72	Olesen et al., 2009
	PlcB r	CCATGTCTTCYGTGCTTGATAATTG		Olesen et al., 2009

<i>sigB</i>	SigB f	CCAAGAAAATGGCGATCAAGAC	166	Rantsiou et al., 2012a
	SigB r	CGTTGCATCATATCTTCTAATAGCT		Rantsiou et al., 2012a
<i>inlA</i>	InlA f	AATGCTCAGGCAGCTACAMTTACA	114	Olesen et al., 2009
	InlA r	CGTGTCTGTTACRTTCGTTTTTCC		Olesen et al., 2009
<i>inlB</i>	inlB f	AAGCAMGATTTTCATGGGAGAGT	78	Olesen et al., 2009
	inlB r	TTACCGTTCCATCAACATCATAACTT		Olesen et al., 2009
<i>inlC</i>	InlC f	ACTGGTCAGAAATGTGTGAATGA	80	Hadjilouka et al., 2014
	InlC r	CCATCTGGGTCTTTGACAGT		Hadjilouka et al., 2014
<i>inlJ</i>	InlJ f	TGCGTAAATGCTCACATCCAAG	81	Hadjilouka et al., 2014
	InlJ r	TTGCCCTTCAGCATCCAAGT		Hadjilouka et al., 2014

### 3.1.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Σε κάθε στάδιο δειγματοληψίας, παράλληλα με την πληθυσμιακή καταμέτρηση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* πραγματοποιούνταν λήψη και προετοιμασία δειγμάτων για τη μετέπειτα μελέτη της έκφρασης των γονιδίων παθογένειάς του. Στην περίπτωση των δειγμάτων ντομάτας, αγγουριού και καρότου, από το εκάστοτε ομογενοποιημένο μείγμα που χρησιμοποιούνταν για την πληθυσμιακή καταμέτρηση (10 g δείγματος & 90 mL ισοτονικό διάλυμα), μεταφέρονταν περίπου 10 mL εντός σωλήνων falcon. Αμέσως μετά τη διαδικασία αυτή, τα falcons φυγοκεντρώνταν στις 12000 στροφές για 1 λεπτό, στους 4, 10 ή 30 °C, ανάλογα με τη θερμοκρασία των δειγμάτων. Ακολουθούσε απόρριψη του υπερκειμένου, η βιομάζα αναμειγνυόταν με 100 μL διαλύματος RNAlater (Ambion, Waltham, Massachusetts, U.S.A) και τα δείγματα τοποθετούνταν στους -20 °C, μέχρι την έναρξη της μελέτης της γονιδιακής έκφρασης. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιούνταν στην περίπτωση των δειγμάτων ζωμού BHI, με τη διαφορά ότι το δείγμα δε χρειαζόταν ομογενοποίηση, επομένως μετά τη λήψη δείγματος για την πληθυσμιακή καταμέτρηση του παθογόνου τα falcons τοποθετούνταν άμεσα για φυγοκέντρηση, την οποία ακολουθούσαν η απόρριψη του υπερκειμένου και η προσθήκη του RNAlater. Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.



### 3.1.3.3 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης

#### 3.1.3.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεια του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε με χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Η Real-Time PCR αποτελεί μία παραλλαγή της συμβατικής PCR, κατά την οποία πραγματοποιείται ανίχνευση και πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων, με τη διαφορά όμως ότι υπάρχει δυνατότητα παρακολούθησης της ενίσχυσης του στοχευόμενου μορίου DNA κατά την διάρκεια της αντίδρασης, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο (Real-time), και όχι στο τέλος, όπως συμβαίνει στη συμβατική PCR. Είναι γνωστή και ως Kinetic PCR, ενώ πολύ συχνά συγγέεται με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcription PCR), εξαιτίας της συντομογραφίας RT-PCR.

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 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 τον Καθηγητή Μοριακής Φυσιολογίας 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 ( $\Delta E$ ) 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 Εστόχου(target) <Εαναφοράς(ref) (όπου Ε η αποδοτικότητα της μεθόδου) μέχρι και 209% στην περίπτωση όπου Εστόχου (target) > Εαναφοράς(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. Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικότερα η διαδικασία του πειράματος με τη χρήση της μεθόδου Real Time PCR.

❖ Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

I. Εύρεση αποδοτικότητας

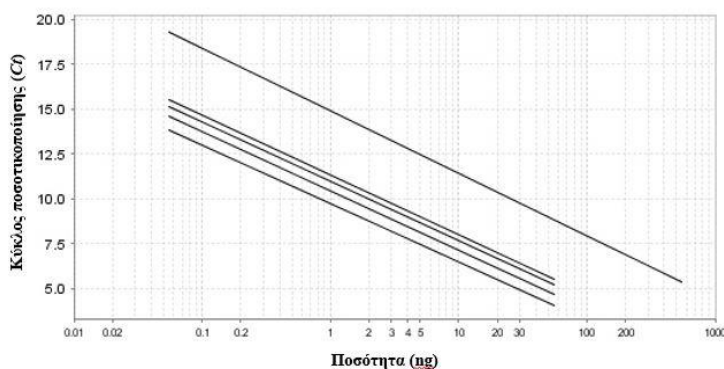
Ένα από τα σημαντικότερα στάδια για την ορθή διεξαγωγή της RT-qPCR, είναι αυτό της εύρεσης αποδοτικότητας της μεθόδου (Efficiency). Το στάδιο αυτό επιβεβαιώνει την δυνατότητα της μεθόδου να ανιχνεύει ένα γονίδιο παρουσία άλλων γονιδίων και, ως εκ τούτου, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την αντίδραση.

Η εύρεση της αποδοτικότητας της μεθόδου πραγματοποιήθηκε αρχικά με συμβατικές PCR στο στέλεχος *L. monocytogenes* LQC 15257, οι οποίες είχαν σαν στόχο ένα γονίδιο ανά αντίδραση. Επομένως διεξήχθησαν 13 συμβατικές PCR, όσες και τα γονίδια που θα χρησιμοποιούνταν στη μελέτη. Εν συνεχεία τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν, ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία των γονιδίων στο χρησιμοποιούμενο στέλεχος κι έπειτα ποσοτικοποιήθηκαν, ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωσή τους. Αφού επιβεβαιώθηκε η παρουσία όλων των γονιδίων στο στέλεχος, τα δείγματα με τα πολλαπλά αντίγραφα του

εκάστοτε γονιδίου αναμείχθηκαν, ώστε να εξεταστεί μετέπειτα η ικανότητα της RT-qPCR να ανιχνεύει το κάθε γονίδιο ξεχωριστά, παρουσία των υπολοίπων. Για τη μελέτη αυτή, το αρχικό μείγμα (SDT1) υποβλήθηκε σε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (SDT2, SDT3 κ.ο.κ.) βάσει της αρχικής του συγκέντρωσης. Έπειτα, τα αραιωμένα δείγματα υποβλήθηκαν σε RT-qPCR υπό τις ίδιες συνθήκες κάτω από τις οποίες θα υποβάλλονταν και τα υπό μελέτη δείγματα στη συνέχεια. Με το πέρας της αντίδρασης δημιουργήθηκε 1 γράφημα στο οποίο αποτυπώνονταν οι καμπύλες αναφοράς των 13 γονιδίων. Οι καμπύλες αυτές εμφανίστηκαν ως ευθείες γραμμές, σε γραφήματα που εξέφραζαν την ποσότητα του DNA ως προς τις τιμές  $Ct$  [ $Ct = f(DNA)$ ] της κάθε αραιώσης (**Εικόνα 19**). Τέλος, από την κλίση της κάθε πρότυπης καμπύλης και με τη βοήθεια του μαθηματικού τύπου  $E = 10^{(-1/slope)}$  (όπου slope είναι η κλίση της ευθείας  $y=ax+b$ ) (Stratagene, 2006), υπολογίστηκε η αποδοτικότητα της μεθόδου για κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Η παραπάνω διαδικασία και η εφαρμογή της συμβατικής PCR είχε προηγηθεί (Hadjilouka et al., 2016), τα αποτελέσματα της οποίας χρησιμοποιήθηκαν για την διαξαγωγή της παρούσας πειραματικής μελέτης.

Γενικώς, οι διαδοχικές αραιώσεις πρέπει να συμπεριλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό συγκεντρώσεων, ώστε να διαβεβαιώνεται ότι η αντίδραση είναι ικανή να πραγματοποιείται τόσο σε υψηλές όσο και σε χαμηλές συγκεντρώσεις εξ' ίσου. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις αυτές θα πρέπει να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων ώστε τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα. Όσον αφορά δε στην αποδοτικότητα της αντίδρασης, δεδομένου ότι η PCR βασίζεται στην εκθετική ενίσχυση, εάν η αντίδραση εκτελείται με τέλεια απόδοση (100%), στο τέλος του κάθε κύκλου θα πραγματοποιείται ενίσχυση κάθε επιθυμητού στόχου και η ποσότητα του προϊόντος θα διπλασιάζεται. Κλίση της καμπύλης -3.32 υποδεικνύει ότι η αντίδραση είναι 100% αποδοτική (Yilmaz et al., 2012). Στην πράξη ωστόσο, οι αντιδράσεις δεν λειτουργούν με τέλεια απόδοση καθώς τα αντιδραστήρια του μίγματος της PCR εξαντλούνται μετά από πολλούς κύκλους και, ως εκ τούτου, η αντίδραση φτάνει σε φάση σταθεροποίησης, στην οποία δεν είναι εφικτή καμία αλλαγή της ποσότητας του προϊόντος (Gibson et al., 1996, Heid et al., 1996, Valasek & Reza, 2005). Όταν η κλίση της καμπύλης είναι μεταξύ των τιμών -3.6 και -3.1 η αποδοτικότητα της μεθόδου κυμαίνεται από 90% έως 110% ( $E = 1.9-2.1$ ), τιμές οι οποίες θεωρούνται ως οι κατάλληλες για τις περισσότερες εφαρμογές που απαιτούν ακριβή ποσοτικοποίηση (Rasmussen, 2001, Tichopad et al., 2003). Παράλληλα, σημαντική παράμετρος είναι και ο συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) της καμπύλης, οποίος αποτελεί μέτρο της γραμμικότητάς της. Σε ιδανικές περιπτώσεις η

τιμή του ισούται με 1, ενώ στην πραγματικότητα η μέγιστη τιμή του είναι 0.999. Η αποδοτικότητα της μεθόδου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το μήκος του αμπλικονίου, η περιεκτικότητά του σε βάσεις γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C), καθώς και οι πιθανές επιμολύνσεις των δειγμάτων (McDowell et al., 1998). Αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν την πρόσδεση των μορίων εκκινητών, το σημείο τήξης των αλληλουχιών-στόχων και την λειτουργία της DNA πολυμεράσης (Wiesner, 1992). Για τον λόγο αυτό, συνήθως οι τιμές αποδοτικότητας που υπολογίζονται μεταξύ των γονιδίων στόχων και των γονιδίων αναφοράς είναι διαφορετικές. Επομένως, ο προσδιορισμός της αποδοτικότητας της μεθόδου για τα προς ανάλυση γονίδια πρέπει να πραγματοποιείται με πολλή προσοχή στις μελέτες της RT-PCR (Yilmaz et al., 2012).



Εικόνα 19. Πρότυπη καμπύλη πέντε διαφορετικών γονιδίων.

## II. Απομόνωση ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA)

Όταν πραγματοποιείται απομόνωση του ριβονουκλεϊκού οξέος από ένα βακτηριακό στέλεχος, το 90-95% που απομονώνεται είναι δομικό και το 5-10% είναι αγγελιαφόρο RNA (messenger RNA, *mRNA*). Για την πραγματοποίηση μελετών που αφορούν τη γονιδιακή έκφραση, η RT- qPCR στηρίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό του mRNA, καθώς το mRNA είναι αυτό που προκύπτει από τη μεταγραφή των γονιδίων και φέρει τη γενετική πληροφορία από το DNA στα ριβοσώματα για την πρωτεϊνσύνθεση των κυττάρων. Ωστόσο, πολύ συχνή είναι η διαφωνία για το αν είναι ορθότερο να χρησιμοποιείται το mRNA ή το ολικό RNA στις μελέτες αυτές (Burchill et al., 1999). Παρ' όλ' αυτά, η άποψη που επικρατεί φέρει την απομόνωση του ολικού RNA να είναι προτιμότερη, καθώς για την απομόνωση του mRNA απαιτείται ένα επιπλέον βήμα κατά το οποίο μπορεί να υπάρξουν απώλειες, λόγω του ότι δεν είναι πολυαδενυλιωμένα όλα τα μόρια mRNA (στα ευκαριωτικά κύτταρα) και η τελική συγκέντρωση του δείγματος μπορεί να μην επαρκεί για την αξιόπιστη πραγματοποίηση των αντιδράσεων (Bustin & Nolan, 2004).

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση του εμπορικού σκευάσματος Nucleospin<sup>®</sup> RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή:

1. Ομογενοποίηση δειγμάτων: Αφού πραγματοποιήθηκε απόψυξη των δειγμάτων που βρίσκονταν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , έγινε φυγοκέντρησή τους στις 13000 στροφές, στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 15 min, την οποία ακολούθησε απόρριψη του υπερκειμένου.
2. Λύση βακτηριακών κυττάρων: Σε κάθε σωλήνα eppendorf, εντός του οποίου είχε παραμείνει το ίζημα κάθε δείγματος, έγινε προσθήκη 350μL Buffer RA1 και 3.5μL β-μερκαπτοαιθανόλης. Ακολούθησε ήπια ανάδευση σε vortex για 3-4 sec και στα ομογενοποιημένα δείγματα ασκήθηκαν υπέρηχοι (50W/2.5 min) για να επέλθει λύση των κυττάρων.
3. Φιλτράρισμα του κυτταρολύματος: Για τη μείωση του ιζώδους και τον καθαρισμό του κυτταρολύματος από κυτταρικά υπολείμματα και τμήματα του κυτταρικού τοιχώματος, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε στήλες που διέθεταν ειδικό φίλτρο και φυγοκεντρήθηκαν για 1 min στις 11000 στροφές.
4. Προσαρμογή των συνθηκών δέσμευσης του RNA: Η υπερκείμενη υδατική φάση που προέκυψε από την προηγούμενη φυγοκέντρωση μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο τύπου eppendorf για κάθε δείγμα, ακολούθησε προσθήκη 350μL αιθανόλης (70%) και τα μίγματα ομογενοποιήθηκαν με ήπια μηχανική ανάδευση.
5. Δέσμευση του RNA: Τα ομογενοποιημένα δείγματα μεταφέρθηκαν σε νέα στήλη με ειδικό φίλτρο και φυγοκεντρήθηκαν στις 11000 στροφές για 30 sec.
6. Αφαλάτωση της μεμβράνης πυριτίου: Για την αφαλάτωση της μεμβράνης πυριτίου της στήλης, έγινε προσθήκη 350μL διαλύματος MDB (Membrane Desalting Buffer) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11000 στροφές για 1 min. Ακολούθησε απόρριψη του διηθήματος και επανάληψη της φυγοκέντρωσης στις 11000 στροφές για 30 sec.
7. Πέψη του DNA: Για την πέψη του DNA προστέθηκαν 95μL διαλύματος DNAάσης [10μL reconstituted DNAase (rDNAse) + 90μL reaction buffer for DNAase], ακολούθησε ήπια ανάδευση και στη συνέχεια τα δείγματα αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
8. Έκπλυση και ξήρανση της μεμβράνης πυριτίου: Με το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε προσθήκη 200μL διαλύματος Buffer RA2, το οποίο αδρανοποιεί την rDNAάση που βρίσκεται στη στήλη. Εν συνεχεία έγινε φυγοκέντρωση στις 11000

στροφές για 30 sec. Ακολούθησε τοποθέτηση της στήλης σε νέο erpendorf τελικού όγκου 2mL και προστέθηκαν 600μL διαλύματος RA3 σε κάθε στήλη. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11000 στροφές για 30 sec και αφού έγινε απόρριψη του διηθήματος προστέθηκαν ακόμα 250 μL διαλύματος RA3 σε κάθε στήλη. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 11000 στροφές για 2 min και η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf των 1.5 mL.

9. Έκλυση του RNA: Για την έκλυση του RNA προστέθηκαν 60μL νερού ελεύθερου από RNAάσες (rRNAase free) και ακολούθησε φυγοκέντρωση των δειγμάτων στις 11000 στροφές για 1 min.

### III. Ποσοτικοποίηση και ποιοτικός έλεγχος του RNA

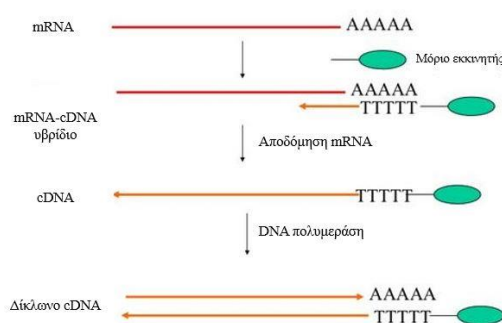
Μετά από την απομόνωση του RNA ακολούθησε ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του νουκλεϊκού οξέος που είχε απομονωθεί από κάθε δείγμα. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε με χρήση νανοφωτόμετρου, μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας (OD) του κάθε διαλύματος. Η ποιοτική αξιολόγηση έγινε μέσω του λόγου που προέκυψε από τη μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 260 και 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), ενώ η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε αυτόματα από το νανοφωτόμετρο, μέσω του νόμου των Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \times C \times d$$

όπου A: η απορρόφηση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος,  $\epsilon$ : ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης ή απορρόφησης της ουσίας για ορισμένο μήκος κύματος [για το RNA είναι  $0.025 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ], C: η συγκέντρωση του νουκλεϊκού οξέος και d: το μήκος της κυψελίδας του φωτόμετρου (1 cm). Ο νόμος αυτός αποτελεί την αρχή της φασματοφωτομετρίας και ορίζει ότι η απορρόφηση για σταθερό πάχος στιβάδας και ορισμένο μήκος κύματος φωτός, είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος της ουσίας που απορροφά. Χρησιμοποιώντας την παραπάνω εξίσωση, απορρόφηση στα 260 nm ίση με 1 ισοδυναμεί με περίπου 40 μg/mL μονόκλωνου RNA. Όσον αφορά στην αξιολόγηση της καθαρότητας του απομονωθέντος RNA, το δείγμα θεωρήθηκε υψηλής καθαρότητας εφόσον οι τιμές του λόγου  $A_{260}/A_{280}$  κυμαίνονταν από 1.8 έως 2.1 (Thermo Fisher Scientific, 2015).

#### IV. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA

Η διαδικασία σύνθεσης μίας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (complimentary DNA, *cDNA*) με εκμαγείο ένα μόριο ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA), ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο ‘αντίστροφη μεταγραφάση’ (reverse transcriptase), γνωστή και ως αντίστροφη τρανσκριπτάση (reverse transcriptase). Στη φύση, το ένζυμο αυτό βρίσκεται σε ρετροϊούς (RNA ιούς) και έχει την ικανότητα να μετατρέπει ένα μονόκλωνο μόριο RNA σε δίκλωνο μόριο DNA, ώστε να το καθιστά ικανό να ενσωματώνεται στα κύτταρα ξενιστές. Εργαστηριακά, στις μελέτες γονιδιακής έκφρασης το ένζυμο χρησιμοποιεί ως εκμαγείο το mRNA των κυττάρων και δημιουργεί συμπληρωματικές ως προς αυτό αλυσίδες DNA, παράγοντας έτσι υβριδικά μόρια cDNA-mRNA. Εν συνεχεία, οι κλώνοι του RNA καταστρέφονται και απομένουν στο διάλυμα τα μονόκλιωνα μόρια cDNA. Με την έναρξη του πρώτου κύκλου της αντίδρασης της Real-time PCR, οι cDNA αλυσίδες ανιχνεύονται από τα μόρια εκκινητές και μέσω της DNA πολυμεράσης δημιουργούνται οι συμπληρωματικοί τους κλώνοι, για να συνεχίσει η αντίδραση κανονικά (**Εικόνα 20**).



**Εικόνα 20.** Σύνθεση cDNA από mRNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής και δημιουργία δίκλωνου μορίου cDNA κατά τον πρώτο κύκλο της Real-time PCR.

Για τη σύνθεση του cDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρία διαφορετικά είδη μορίων εκκινητών:

- i. *Μίγμα τυχαίων εξαμερών ολιγονουκλεοτιδίων*: Οι εκκινητές αυτοί απαρτίζονται από ένα μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων, που έχουν τυχαία νουκλεοτιδική σύσταση. Αποτελεί μη εξειδικευμένη μέθοδο υβριδοποίησης, με την οποία όλα τα μόρια RNA αποτελούν καλούπια σύνθεσης cDNA, ενώ η εξειδίκευση επέρχεται στη

συνέχεια κατά τη διάρκεια της PCR μέσω των μορίων εκκινητών που είναι ειδικά σχεδιασμένα για τα τμήματα-στόχους.

- ii. *Oligo-dT*: Οι εκκινητές αυτοί είναι ολιγονουκλεοτίδια που υβριδίζονται στην 3' πολυ-A ουρά, η οποία βρίσκεται στην πλειοψηφία των ευκαριωτικών mRNAs. Βάσει του ότι η πολυ-(A)<sup>+</sup> ουρά αποτελεί περίπου το 1 με 2% του ολικού RNA, η ποσότητα του παραγόμενου cDNA είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτήν που προκύπτει από τα τυχαία εξαμερή ολιγονουκλεοτίδια.
- iii. *Εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο στόχο*: Η χρήση εκκινητών ειδικών για το υπό μελέτη γονίδιο είναι η πιο εξειδικευμένη μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τη διαδικασία δημιουργίας cDNA. Για τη χρήση των συγκεκριμένων εκκινητών πρέπει να δημιουργούνται κατάλληλα μόρια, τα οποία να υβριδίζονται όσο πιο κοντά το 3' του mRNA γίνεται. Παρ' όλ' αυτά κάποιοι εκκινητές αποτυγχάνουν να υβριδίζονται κατά τη διαδικασία σύνθεσης του cDNA στο RNA, ακόμα και αν ο υβριδισμός τους πραγματοποιείται με επιτυχία υπό συνθήκες PCR όπου χρησιμοποιείται DNA.

Στην παρούσα μελέτη, η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με χρήση του σκευάσματος SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για σύνθεση με τυχαία εξαμερή ολιγονουκλεοτίδια:

1. Παρασκευή αρχικού μείγματος αντίδρασης (M1), το οποίο περιέχει μίγμα dNTP's 10 mM, τυχαία εξαμερή ολιγονουκλεοτίδια (50 ng/μL), RNA και νερό επεξεργασμένο με πυροανθρακικό διαιθύλιο (DEPC-treated).
2. Επώαση των δειγμάτων στους 65°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για 1 min.
3. Παρασκευή δεύτερου μείγματος (M2) σε καινούργιους σωλήνες Eppendorf, το οποίο περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα RT 1×, MgCl<sub>2</sub> 5mM, διθειοθρεϊτόλη (DDT) (0.1M) και RNaseOUT™ (40 U/μL).
4. Προσθήκη 9 μL από το M2 σε κάθε μίγμα M1 και ήπια ανάδευση.
5. Επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου (~25°C) για 2 min.
6. Προσθήκη 1μL SuperScript™ II RT (50 U/μL) (για τη δημιουργία δείγματος-ελέγχου, αντί για αντίστροφη μεταγραφή προστίθεται 1 μL νερό DEPC).
7. Επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου (~25°C) για 10 min.
8. Επώαση των δειγμάτων στους 42°C για 50 min.



9. Τερματισμός αντίδρασης στους 70°C για 15 min και τοποθέτηση των δειγμάτων σε πάγο για 1-2 min.

10. Προσθήκη 1 μL RNaseH (2 U/μL) σε κάθε δείγμα και επώαση στους 37°C για 20 min.

Με το πέρας της σύνθεσης του cDNA πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος των υπό μελέτη δειγμάτων, ώστε να εκτιμηθεί η επιτυχία της διαδικασίας σύνθεσης του συμπληρωματικού DNA. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε με χρήση νανοφωτόμετρου, όπως έχει ήδη περιγραφεί προηγουμένως (παρ. 4.3.3.3.1) και αφού ολοκληρώθηκε τοποθετήθηκαν τα δείγματα στους -20°C έως τη διεξαγωγή της RT-qPCR.

#### V. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Το διάλυμα της αντίδρασης της Real-time PCR αποτελείται από τα ίδια αντιδραστήρια με αυτά της συμβατικής PCR, έκτος από τους μηχανισμούς ανίχνευσης DNA που αφορούν την προσθήκη συγκεκριμένων χρωστικών (Houghton και Cockerill, 2006). Στη συγκεκριμένη μελέτη, για την πραγματοποίηση της RT-qPCR χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα αντίδρασης KAPA SYBR qPCR Kit Master Mix (2×) for ABI Prism (KAPABiosystems, Boston, M.A, U.S.A.). Το διάλυμα αυτό περιέχει όλα τα συστατικά που είναι απαραίτητα για την αντίδραση, εκτός από τους εκκινητές. Συγκεκριμένα, παρέχεται ως ρυθμιστικό διάλυμα 2× στο οποίο εμπεριέχονται φθορίζουσα χρωστική SYBR<sup>®</sup> Green I, χρωστική αναφοράς ROX, MgCl<sub>2</sub>, dNTP's και σταθεροποιητές.

Για την διεξαγωγή της RT-qPCR, το μείγμα αντίδρασης κάθε δείγματος δημιουργήθηκε έπειτα από προσθήκη συγκεκριμένων μορίων εκκινητών και δείγματος στο έτοιμο διάλυμα της αντίδρασης. Το ζεύγος των μορίων εκκινητών προστέθηκε σε συγκέντρωση 1.2 μM για τα γονίδια *hly*, *plcA*, *sigB* και *IGs*, ενώ για όλα τα υπόλοιπα γονίδια η συγκέντρωση των μορίων εκκινητών ήταν 0.9 μM. Η συγκέντρωση του DNA σε κάθε δείγμα ήταν περίπου 200 ng και ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν 10 μL. Τέλος, το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή της αντίδρασης ήταν το ακόλουθο:

1. 95°C για 20 sec
  2. 95°C για 10 sec
  3. 60°C για 30 sec
  4. 72°C για 30 sec
  5. 95°C για 15 sec
  6. 60°C για 1 min
  7. αύξηση στους 95°C με ρυθμό 0.3°C/sec
- } ×40 φορές
- } Ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης

Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις RT-qPCR και ως σημείο μέτρησης του φθορισμού ορίστηκε το στάδιο των 72°C, ώστε να πραγματοποιείται μέτρηση του σήματος με το τέλος του κάθε κύκλου. Επιπλέον, μαζί με τα υπό μελέτη δείγματα εξετάστηκαν και δείγματα αρνητικών μαρτύρων. Στα αρνητικά αυτά δείγματα περιέχονταν όλα τα απαραίτητα για τη σωστή διεξαγωγή της αντίδρασης συστατικά, εκτός από DNA δείγματος. Στη θέση του αντίστοιχου όγκου DNA χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχη ποσότητα νερού, με στόχο την εξέταση της περίπτωσης επιμόλυνσης του διαλύματος της αντίδρασης από άλλο DNA, η οποία θα οδηγούσε σε λανθασμένα αποτελέσματα.

#### VI. Υπολογισμός της γονιδιακής έκφρασης και στατιστική ανάλυση

Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της έκφρασης γονιδίων (Livak & Schmittgen, 2001, Meijerink et al., 2001, Pfaffl, 2001, Liu & Saint, 2002). Ένα από τα πιο αξιόπιστα είναι αυτό του Pfaffl, με το οποίο η έκφραση ενός γονιδίου-στόχου σε ένα υπό μελέτη δείγμα προσδιορίζεται έναντι ενός δείγματος ελέγχου και συγκριτικά με ένα γονίδιο-αναφοράς (Pfaffl, 2001, Pfaffl et al., 2002, Pfaffl, 2004). Σύμφωνα με το συγκεκριμένο μοντέλο, ο σχετικός λόγος έκφρασης (ratio,  $R$ ) ενός γονιδίου υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$R = (E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{ttarget}}(\text{control-sample})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{tref}}(\text{control-sample})}$$

όπου  $E_{\text{target}}$ : η αποδοτικότητα της μεθόδου για το γονίδιο-στόχος,  $E_{\text{ref}}$ : η αποδοτικότητα της μεθόδου για το γονίδιο-αναφοράς,  $\Delta C_{\text{ttarget}}$ : η διαφορά των Ct μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου και άγνωστων δειγμάτων για το γονίδιο-στόχος,  $\Delta C_{\text{tref}}$ : η διαφορά των Ct μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου και άγνωστων δειγμάτων για το γονίδιο-αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς πρέπει να είναι σταθερό και μη ρυθμιζόμενο βάσει των αλλαγών στις διάφορες

μεταβαλλόμενες συνθήκες. Για τον υπολογισμό του  $R$  πρέπει να γίνονται αρχικά ανεξάρτητες PCR, ώστε να υπολογίζονται οι αποδοτικότητες των γονιδίων που χρησιμοποιούνται στη μελέτη, μέσω του τύπου  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ . Εν συνεχεία, με το πέρας των αντιδράσεων της RT-qPCR, υπολογίζονται οι διαφορές μεταξύ των κύκλων ποσοτικοποίησης ( $Ct$ ) για το εκάστοτε γονίδιο στα δείγματα ελέγχου και αναφοράς. Με το πέρας των παραπάνω διαδικασιών, τα δεδομένα που χρειάζονται για τον υπολογισμό του λόγου της σχετικής έκφρασης ενός γονιδίου είναι διαθέσιμα (Pfaffl, 2001).

Τα δεδομένα που προκύπτουν από τις μελέτες της γονιδιακής έκφρασης δε βρίσκονται συνήθως σε κανονική κατανομή όταν εκφράζονται μέσω σχετικών ποσοτήτων. Ωστόσο, για την περαιτέρω ανάλυσή τους μέσω διαφόρων δοκιμών, όπως τα t-test και η ανάλυση διασποράς (ANOVA), πρέπει να εντάσσονται σε κανονικές κατανομές. Αυτό διορθώνεται μέσω λογαριθμικής μετατροπής των δεδομένων, η οποία οδηγεί σε αποτελέσματα επί των φερών αλλαγής (fold change,  $FD$ ) που προκύπτουν κατά τη έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων. Ο λογάριθμος που εΐθισται να χρησιμοποιείται είναι αυτός με βάση το 2 ( $\log_2$ ) και ως εκ τούτου (Kubista et al., 2007):

$$FD = \log_2(R)$$

Στην παρούσα μελέτη, ο υπολογισμός των διαφορών που παρουσιάστηκαν στην έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το μαθηματικό μοντέλο του Pfaffl. Έπειτα από την ολοκλήρωση των αντιδράσεων της RT-qPCR, οι κύκλοι ποσοτικοποίησης ( $Ct$ ) των γονιδίων στόχων και των γονιδίων αναφοράς που είχαν ληφθεί κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων, μεταφέρθηκαν στο πρόγραμμα Excel για τη διεξαγωγή της σχετικής ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης. Ακολούθησε μία προεπεξεργασία των δεδομένων κατά την οποία εξετάστηκαν όλες οι  $Ct$  για ακραίες τιμές, μέσω της ανάλυσης Grubbs κι επιπλέον πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση δεδομένων που έλειπαν (π.χ. λόγω ακραίων τιμών), με τη μέση τιμή των τεχνικών επαναλήψεων που είχαν πραγματοποιηθεί για το συγκεκριμένο δείγμα. Μετά την προεπεξεργασία των δειγμάτων, ακολούθησε μελέτη της σταθερότητας των γονιδίων-αναφοράς μέσω της εφαρμογής του Excel, NormFinder (Andersen et al., 2004) και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν ο υπολογισμός των μέσων όρων των τεχνικών επαναλήψεων και η ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων με το επιλεγμένο γονίδιο αναφοράς και τα δείγματα-ελέγχου. Από τα δεδομένα που προέκυψαν υπολογίστηκαν οι λόγοι της σχετικής έκφρασης του κάθε γονιδίου και οι τιμές αυτές μετατράπηκαν σε τιμές  $\log_2$  (fold change). Ακολούθησαν ανάλυση διασποράς με ένα παράγοντα (one-way ANOVA),

για να εξεταστεί η επίδραση του χρόνου στην γονιδιακή έκφραση σε κάθε θερμοκρασιακή συνθήκη που μελετήθηκε και ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες (two-way ANOVA), για την αξιολόγηση της συνδυασμένης επίδρασης της θερμοκρασίας και του υποστρώματος ανάπτυξης στην γονιδιακή έκφραση. Επιπρόσθετα εφαρμόστηκε και πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (MANCOVA) για τον ίδιο σκοπό. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος SPSS v15.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA).

Καθότι χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες αντίδρασης για την αντίστροφη μεταγραφή και τα δείγματα περιείχαν την ίδια συνολική ποσότητα RNA, θεωρήθηκε ότι όλες οι μετρήσεις της γονιδιακής έκφρασης που προέκυψαν από τις αντιδράσεις της RT-qPCR, ήταν συγκρίσιμες (Duquenne et al., 2010).

### 3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Μικροβιολογικές αναλύσεις

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης του πειράματος. Οι πληθυσμοί που καταγράφονται είναι οι μέσοι όροι και εντός παρενθέσεως η τυπική απόκλιση. Οι τιμές αυτές μετρήθηκαν ύστερα από εμβολιασμό με 7-7.5 log CFU/mL ή g του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε τεμάχια αγγουριού, τομάτας, καρότου και σε θρεπτικό μέσο BHI broth και επώαση στις συγκεκριμένες συνθήκες (4, 10 και 30 °C).

Συγκεκριμένα, μετά την επώαση ακολούθησε η καταμέτρηση των αποικιών (colony count), που αναπτύσσονται στο ενοφθαλμισμένο στερεό θρεπτικό μέσο. 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.

**Πίνακας 3.** Μεταβολές του πληθυσμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε ζωμό BHI, και σε επιφάνειες λαχανικών (αγγούρι, καρότο και ντομάτα) κατά την επώαση στους 4, 10 και 30 °C.

Temperature (°C)	Time (h)	Growth substrate			
		BHI broth	Cucumber	Carrot	tomato
4	0	7.23 (0.20) <sup>a</sup>	7.15 (0.22)	7.23 (0.25)	7.11 (0.24)
	0.5	7.35 (0.37)	7.31 (0.31)	7.33 (0.37)	7.17 (0.47)
	6.0	7.34 (0.40)	7.26 (0.33)	6.56 (0.42)	7.23 (0.52)
	24.0	7.42 (0.33)	6.79 (0.20)	6.60 (0.24)	6.94 (0.59)
10	0	7.20 (0.10)	7.22 (0.31)	7.34 (0.21)	7.13 (0.19)
	0.5	7.36 (0.11)	7.09 (0.38)	7.19 (0.37)	7.36 (0.14)
	6.0	7.69 (0.13)	6.92 (0.14)	6.60 (0.41)	7.36 (0.51)
	24.0	8.12 (0.22)	6.99 (0.15)	6.39 (0.51)	7.21 (0.38)
30	0	7.20 (0.13)	7.52 (0.35)	7.38 (0.27)	7.34 (0.21)
	0.5	7.65 (0.10)	7.77 (0.12)	7.51 (0.33)	7.44 (0.27)
	6.0	8.19 (0.27)	8.28 (0.30)	6.73 (0.39)	7.20 (0.37)
	24.0	9.00 (0.12)	8.25 (0.32)	6.86 (0.40)	7.20 (0.40)

<sup>a</sup>: (log CFU mL<sup>-1</sup> ή g<sup>-1</sup>).

- *Μελέτη γονιδιακής έκφρασης*

Προσδιορισμός αποδοτικότητας της μεθόδου (Efficiency)

Έπειτα από την διαδικασία που περιγράφηκε στο αντίστοιχο κεφάλαιο (βλ σελ 59) 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.

ΓΟΝΙΔΙΑ	Efficiency
<i>IGS</i>	2.03
<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>prfA</i>	2.09

**Πίνακας 4.** Γονίδια που μελετήθηκαν και αποδοτικότητα μεθόδου

- 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  $R = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta C_t \text{ target (control-sample)}}}{E_{\text{ref}}^{\Delta C_t \text{ ref (control-sample)}}$  (Pfaffl, 2001, Pfaffl et al., 2002). Ύστερα από στατιστική ανάλυση των δεδομένων της Real Time PCR (τιμές Ct των δειγμάτων), το γονίδιο αναφοράς με την καλύτερη τιμή σταθερότητας έκφρασης υπολογίστηκε το *IGS*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις συγκρίσεις των αποτελεσμάτων του πειράματος. Οι τιμές σταθερότητας έκφρασης (Stability value) για τα γονίδια αναφοράς *IGS*, *16S* και *rpoB* υπολογίστηκαν ότι είναι 0,023, 0,261 και 0,056, αντίστοιχα.

### Αποτελέσματα βάσει του μαθηματικού τύπου κατά Pfaffl

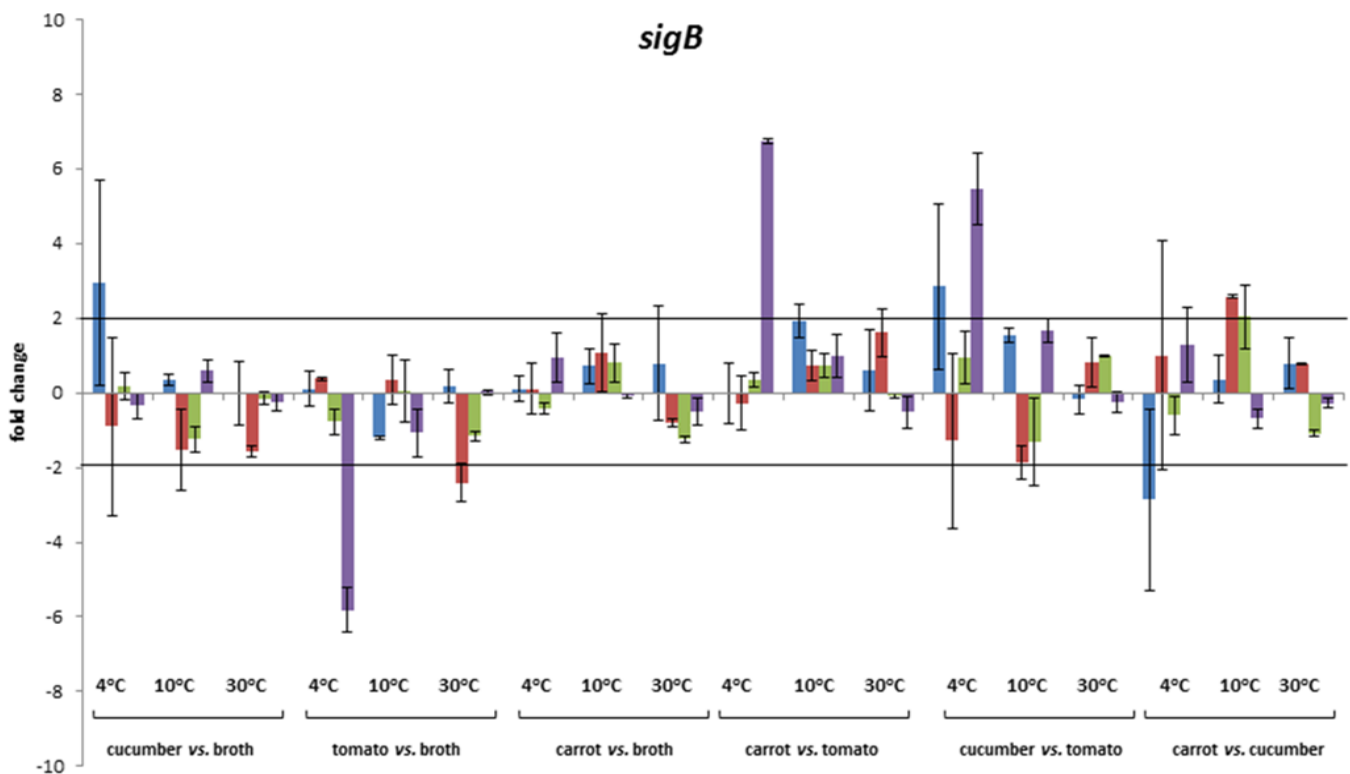
Ύστερα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεθόδου Real Time PCR παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων παθογένειας σε σχέση με την αντίστοιχη έκφρασή τους στο θρεπτικό ζωμό και στις φυτικές επιφάνειες και σε σχέση με τη θερμοκρασία και χρόνο επώασης. Η έκφραση επηρεάστηκε σε όλα τα υπό μελέτη γονίδια.

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα της μεταβολής της έκφρασης των γονιδίων με τη χρήση RT-PCR εκφρασμένη σε λογάριθμο του δύο ( $\log_2$ ) και δείχνουν πόσες φορές περισσότερο ή λιγότερο εκφράζεται ένα γονίδιο ανάλογα με την θερμοκρασία και το χρόνο επώασης για κάθε θρεπτικό υπόστρωμα (BHI, αγγούρι, τομάτα, καρότο). Σύμφωνα με τη μέθοδο 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 υποεκφράζεται.

#### **3.2.1 Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική έκφραση των γονιδίων (*prfA*, *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inlJ*).**

Στα διαγράμματα 1 έως 9 φαίνεται η επίδραση της θερμοκρασίας στη σχετική έκφραση των *prfA*, *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inJ* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4, 10 και 30 °C. Οι μπλε ράβδοι αντιπροσωπεύουν το χρόνο επώασης στη 0 h, οι κόκκινες ράβδοι στη 0,5 h, οι πράσινες ράβδοι σε χρόνο 6 h και οι μωβ ράβδοι σε χρόνο 24 h. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής. Πραγματοποιήθηκαν έξι συγκρίσεις (sample vs control) για κάθε γονίδιο παθογένειας και για τις τρεις θερμοκρασίες (4, 10 και 30 °C) στους χρόνους επώασης που μελετήθηκαν.

Στο διάγραμμα 1 παρατηρείται υπερέκφραση του *sigB* στους 4°C για το αγγούρι (sample) σε σχέση με τη τομάτα (control) στη 0 h χρόνο επώασης και μεγαλύτερη υπερέκφραση (6 φορές περισσότερο) στις 24 h, για το αγγούρι σε σχέση με το broth στη 0 h και για καρότο σε σχέση με τη τομάτα στις 24 h, ενώ υποέκφραση στους 4°C για τη τομάτα σε σχέση με το broth στις 24 h και για το καρότο σε σχέση με το αγγούρι στη 0 h καθώς και μικρή μεταβολή μείωσης έκφρασης στους 30°C για τη τομάτα σε σχέση με το broth στη 0,5 h.

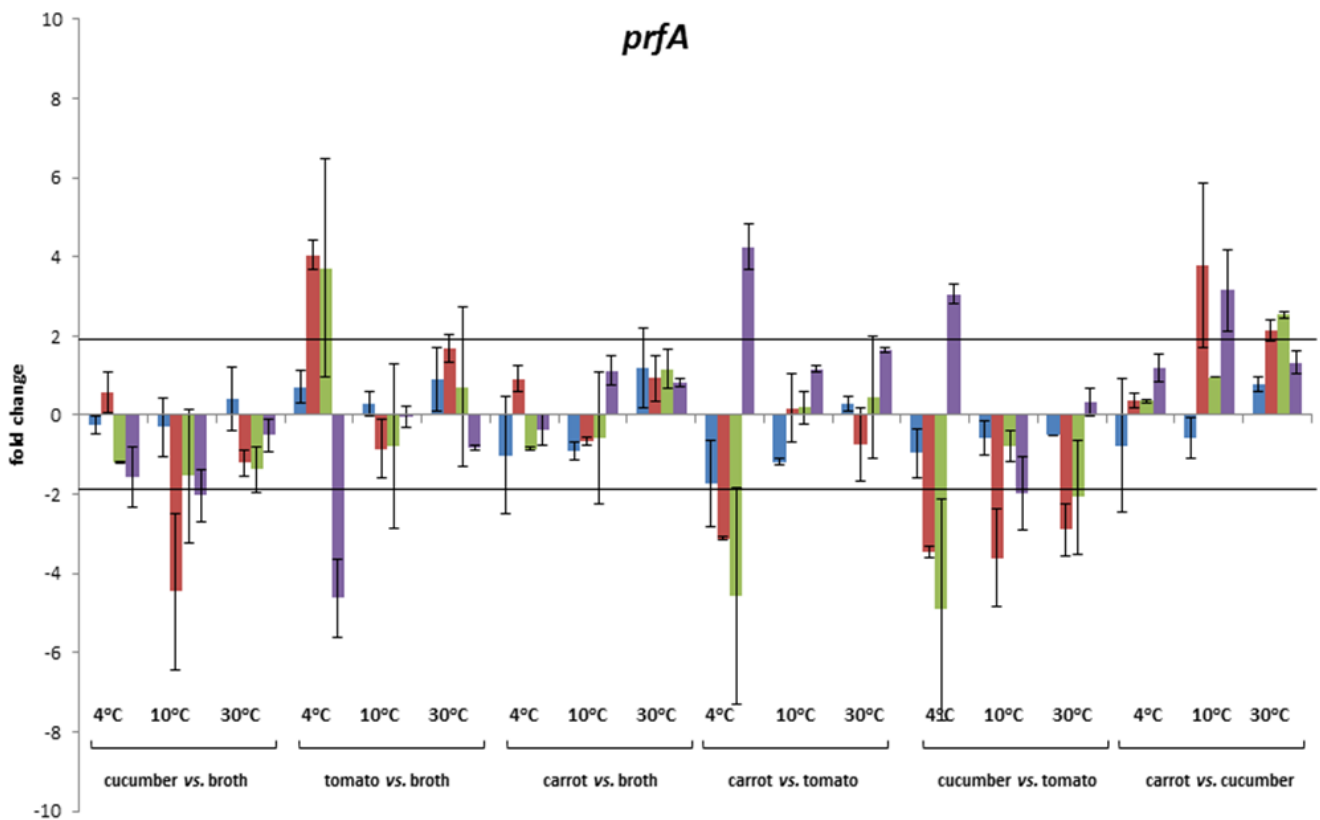


Διάγραμμα 1: Επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση του γονιδίου *sigB*

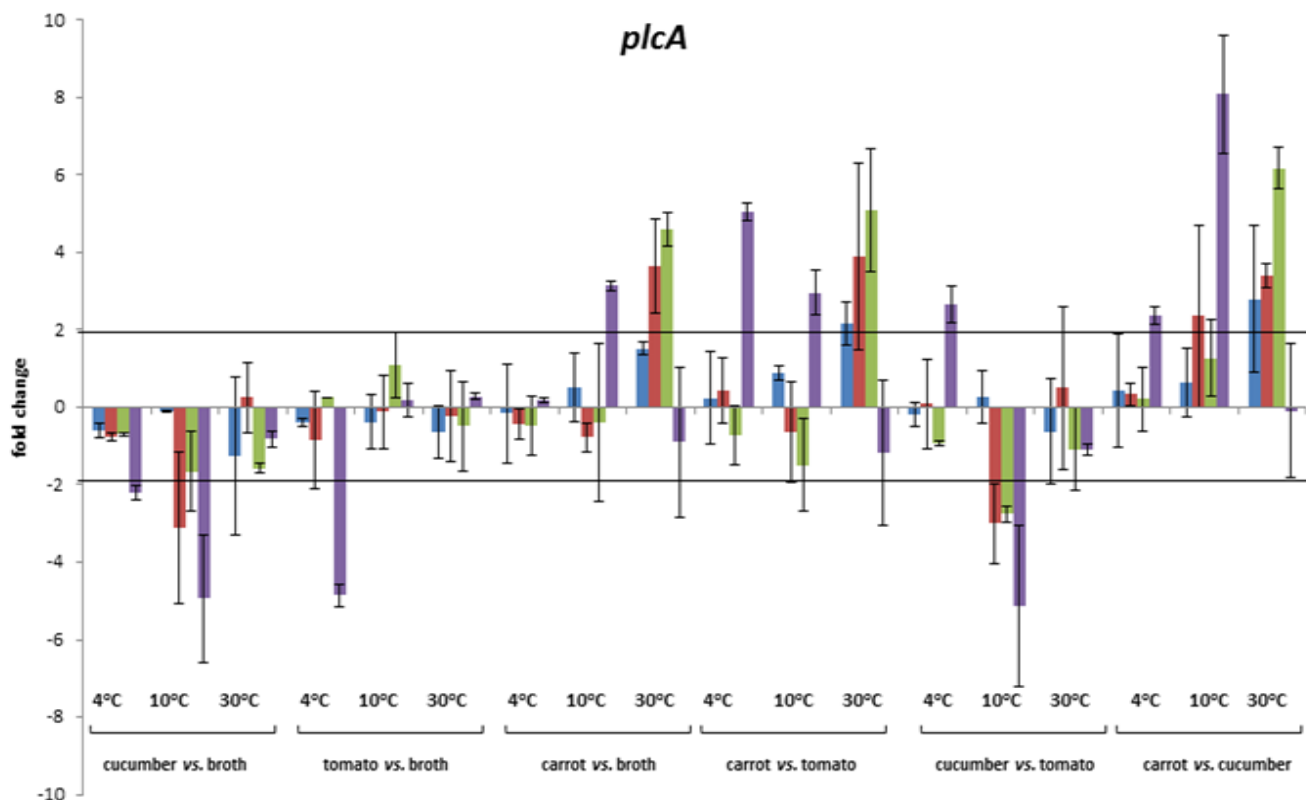
Στο διάγραμμα 2 παρατηρείται υπερέκφραση του *prfA* στους 4°C για τη τομάτα σε σχέση με το broth στη 0,5 h, για το καρότο σε σχέση με τη τομάτα στις 24 h, για το αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα στις 24 h και στους 10°C για το καρότο σε σχέση με το αγγούρι στη 0,5 h. Αντίθετα έχουμε υποέκφραση στους 4°C για τη τομάτα σε σχέση με το broth στις 24 h, για το καρότο σε σχέση με τη τομάτα στους χρόνους επώασης 0 h, 0.5, και 6 h και για το αγγούρι σε σχέση με τη



τομάτα για τους ίδιους χρόνους επώασης καθώς και στους 30°C και 10°C για το αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα και στους 10°C για το αγγούρι σε σχέση με το broth σε χρόνος επώασης 0,5 h.



Διάγραμμα 2: Επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση του γονιδίου *prfA*.

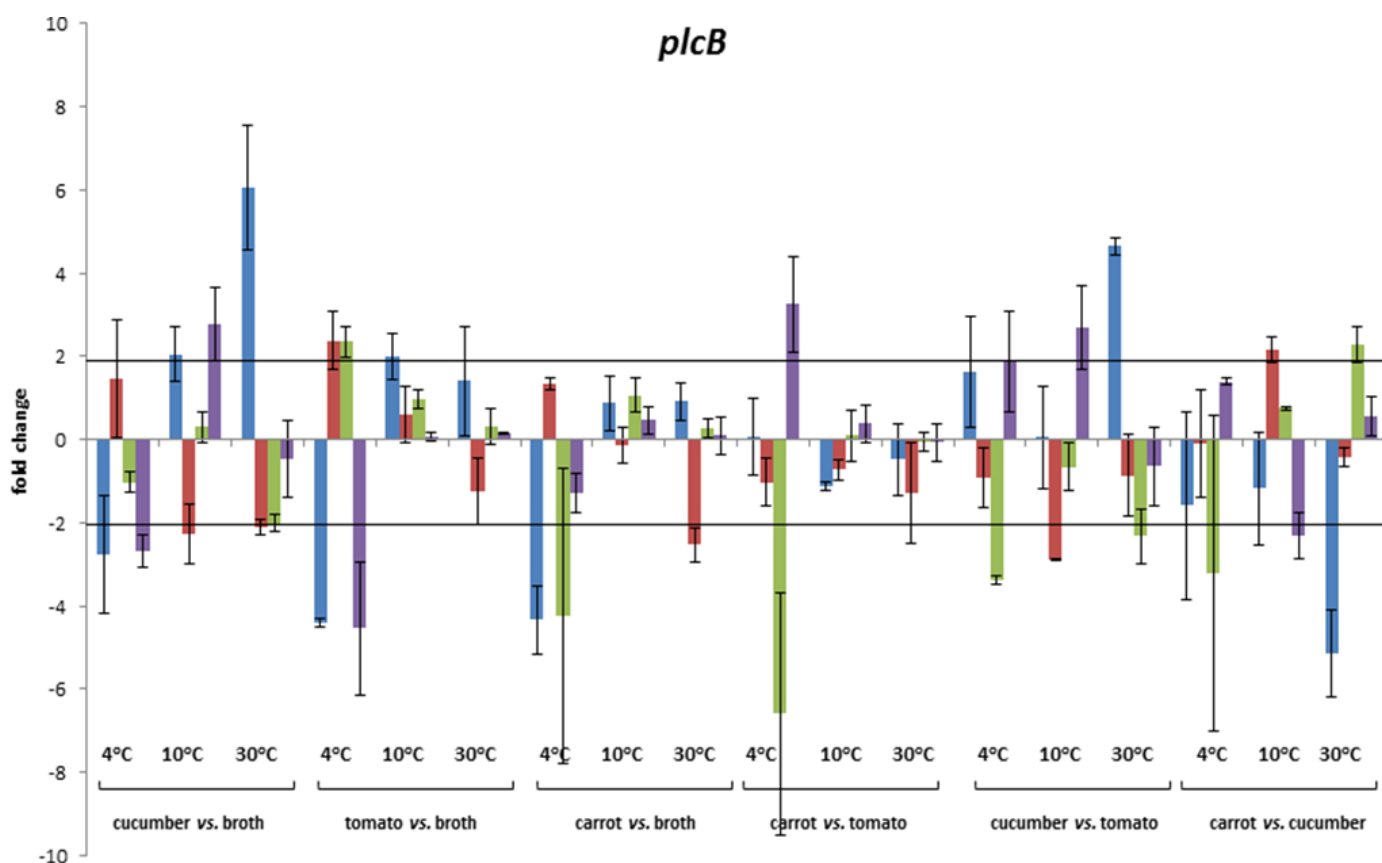


Διάγραμμα 3: Επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση του γονιδίου *plcA*

Στο διάγραμμα 3 παρατηρείται υπερέκφραση του *plcA* για το καρότο σε σχέση με το broth στους 30°C σε χρόνο επώασης 0,5 και 6 h και στους 10°C στις 24 h, για το καρότο σε σχέση με τη τομάτα στους 4°C στις 24 h, στους 10°C επίσης σε χρόνο επώασης 24 h και στους 30°C στο χρόνο επώασης 0,5 και 6 h. Παρουσιάστηκε, επίσης, υπερέκφραση στους 4°C για το αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα στις 24 h. Σημαντική υπερέκφραση παρατηρείται στους 10°C και 30°C για το καρότο σε σχέση με το αγγούρι στις 24 h και 6 h αντίστοιχα. Υποέκφραση παρατηρείται για το αγγούρι σε σχέση με το broth στους 10°C και για τη τομάτα σε σχέση με το broth στους 4°C για το χρόνο επώασης 24 h. Όπως και στους 10°C για το αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα κατά τους χρόνους επώασης 24 και 0,5 h.

Στο διάγραμμα 4 παρατηρείται υπερέκφραση του *plcB* στους 4°C για το καρότο σε σχέση με τη τομάτα στις 24 h και για τη τομάτα σε σχέση με το broth στη 0,5 h και στις 6 h, στους 10°C στη 0 h και στις 24 h στο αγγούρι σε σχέση με το broth και στους 30°C για το αγγούρι σε σχέση με το broth στο χρόνο επώασης 0 h. Υπερέκφραση, παρατηρείται επίσης, στους 10°C για το αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα στις 24 h και στους 30°C για το αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα στη 0 h. Υποέκφραση παρατηρείται στους 4°C για το αγγούρι σε σχέση

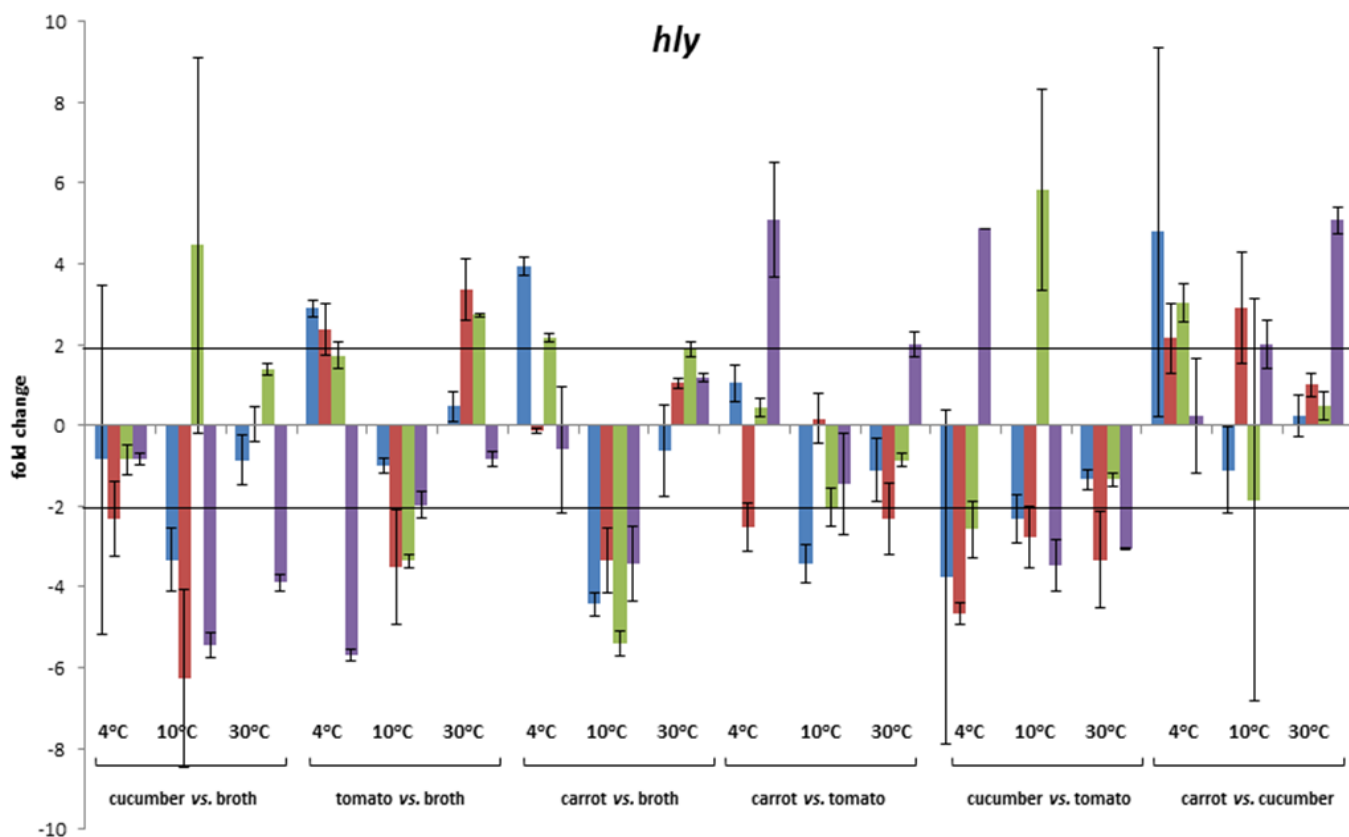
με το broth στους χρόνους επώασης 0 h και 24 h. Ομοίως στους 4°C για το καρότο σε σχέση με το broth στις 0h και 6 h, για το αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα στις 6 h, για το καρότο σε σχέση με το αγγούρι στους 4°C και 30°C σε χρόνους επώασης 6 h και 0 h αντίστοιχα. Υποέκφραση του γονιδίου παρατηρείται επίσης στους 4°C για τη τομάτα σε σχέση με το broth στις 0 και 24 h καθώς και για το καρότο σε σχέση με τη τομάτα στις 6 h. Τέλος, μικρή μείωση έκφρασης παρουσιάστηκε στους 10°C για το αγγούρι σε σχέση με το broth στη 0,5 h και για το αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα στον ίδιο χρόνο επώασης.



Διάγραμμα 4: Επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση του γονιδίου *plcB*.

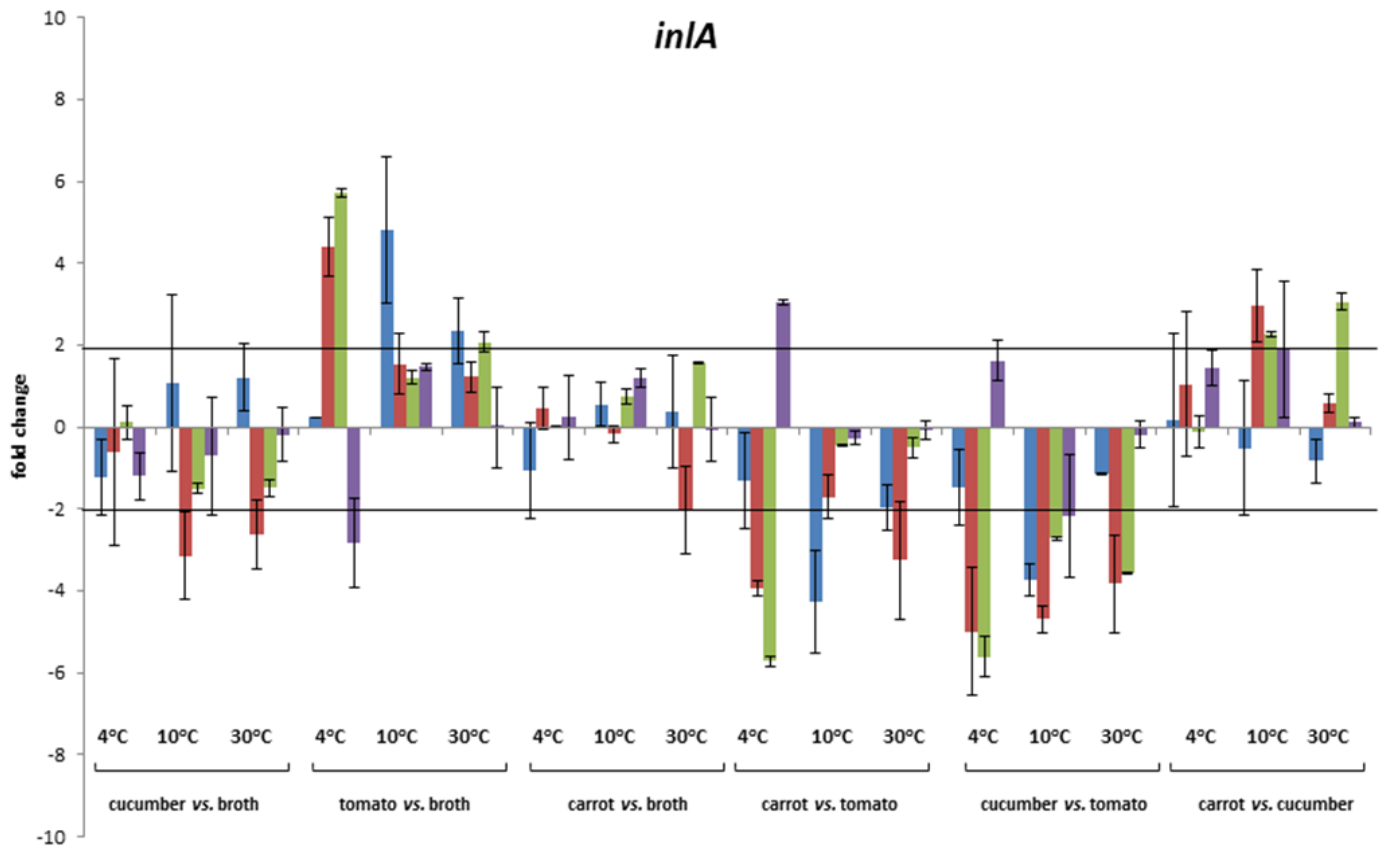
Στο διάγραμμα 5 παρατηρείται υποέκφραση του *hly* σχεδόν σε κάθε σύγκριση εκτός από: τους 10°C για το αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα και για το αγγούρι σε σχέση με το broth στις 6 h, τους 4°C για το καρότο σε σχέση με το broth στη 0 h, για το καρότο σε σχέση με τη τομάτα στις 24 h, για το αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα στις 24 h και για τη τομάτα σε σχέση με το broth στους χρόνους επώασης 0 h, 0,5h και 6 h, όπου παρατηρείται υπερέκφραση. Τέλος, ρύθμιση αύξησης παρατηρείται στους 30°C για τη τομάτα σε σχέση με

το broth στις 0,5 h και 6 h και για το καρότο σε σχέση με το αγγούρι σε όλες τις θερμοκρασίες με σημαντική μεταβολή στους 4°C στη 0 h και στους 30°C στις 24 h.

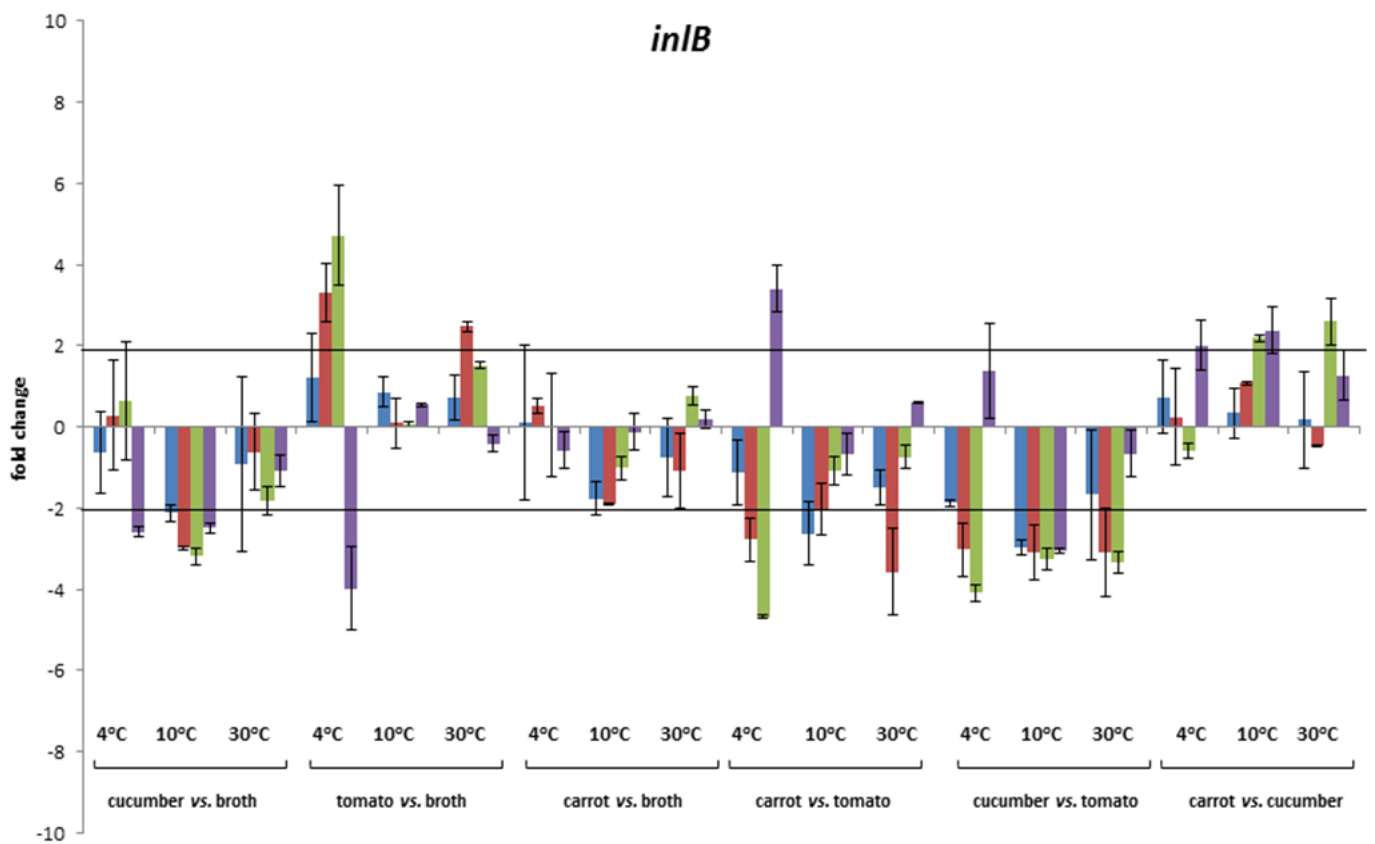


Διάγραμμα 5: Επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση του γονιδίου *hly*.

Στο διάγραμμα 6 παρατηρείται υποέκφραση του *inlA* σχεδόν σε κάθε σύγκριση εκτός από τη τομάτα σε σχέση με το broth στους 4°C στις 0,5 h, 6 h και στους 10°C στη 0 h όπου παρατηρείται σημαντική υπερέκφραση του γονιδίου. Σημαντική μεταβολή ρύθμισης μείωσης παρατηρείται στο καρότο σε σχέση με την τομάτα στους 4°C στις 0,5 h και 6 h, στους 10°C στη 0 h, στο αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα στους 4°C στις 0,5 h και 6 h, στους 10°C σε χρόνος επώασης 0,5 h και 0 h και στους 30°C στις 0,5 h και 6 h.



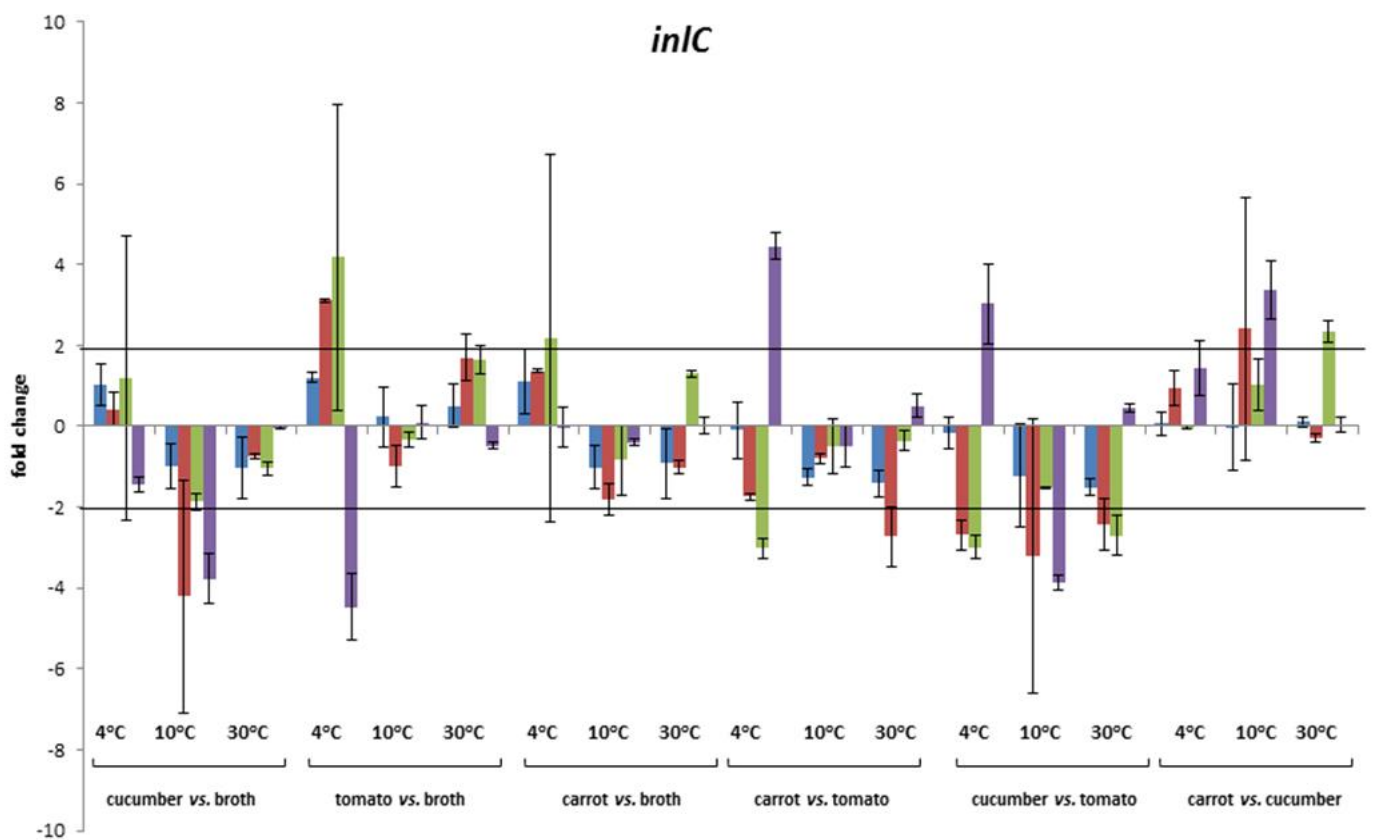
Διάγραμμα 6: Επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση του γονιδίου *inlA*.



Διάγραμμα 7: Επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση του γονιδίου *inlB*.

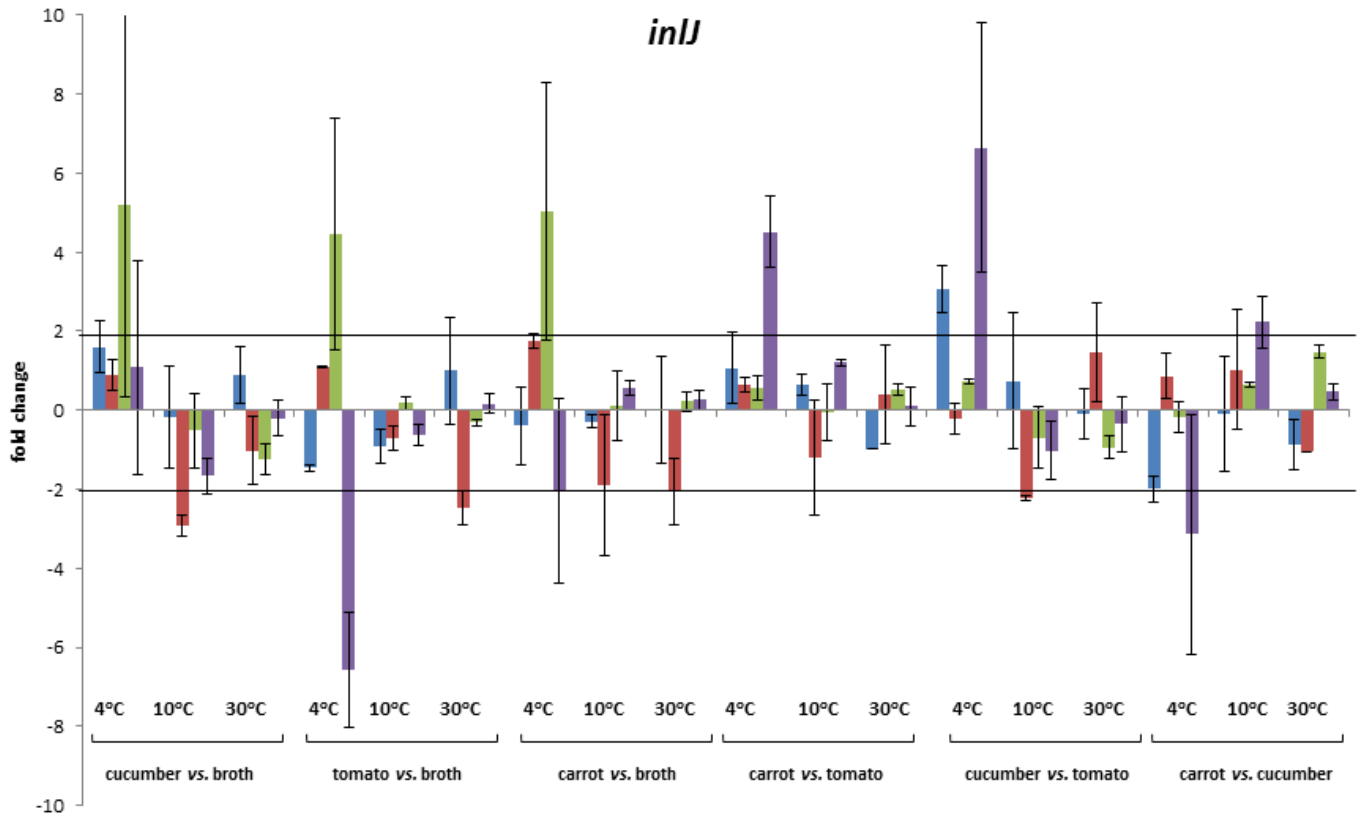
Στο διάγραμμα 7 παρατηρείται υποέκφραση του *inlB* σχεδόν σε κάθε σύγκριση με μεγαλύτερη μεταβολή στους 4°C στη τομάτα σε σχέση με το broth στις 24 h και στους 4°C για το καρότο σε σχέση με την τομάτα στις 6 h. Σημαντική υπερέκφραση παρατηρείται στη τομάτα σε σχέση με το broth στους 4°C στις 6 h και στο καρότο σε σχέση με την τομάτα στους 4°C στις 24 h.

Στο διάγραμμα 8 παρατηρείται υπερέκφραση του *inlC* στους 4°C για το καρότο σε σχέση με τη τομάτα και για το αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα στις 24 h, για τη τομάτα σε σχέση με το broth στις 0,5 h και 6 h και στους 10°C στις 24 h στο καρότο σε σχέση με το αγγούρι. Υποέκφραση παρατηρείται στους 10°C στο αγγούρι σε σχέση με τη τομάτα στις 0,5 h και 6 h, στους 4°C στη τομάτα σε σχέση με το broth στις 24 h. Όπως και στους 10°C στο αγγούρι σε σχέση με το broth στις 0,5 h και 24 h.



Διάγραμμα 8: Επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση του γονιδίου *inlC*.

Στο διάγραμμα 9 παρατηρείται υπερέκφραση του *inlJ* στους 4°C στο αγγούρι σε σχέση με το broth στις 6 h, στο αγγούρι σε σχέση με την τομάτα στις 24 h, στο καρότο σε σχέση με την τομάτα στις 24 h, στο καρότο σε σχέση με το broth στις 6 h επώασης και στη τομάτα σε σχέση με το broth επίσης στις 6 h. Υποέκφραση παρατηρείται στους 4°C στη τομάτα σε σχέση με το broth στις 24 h επώασης και στο καρότο σε σχέση με το αγγούρι.στις 24 h.



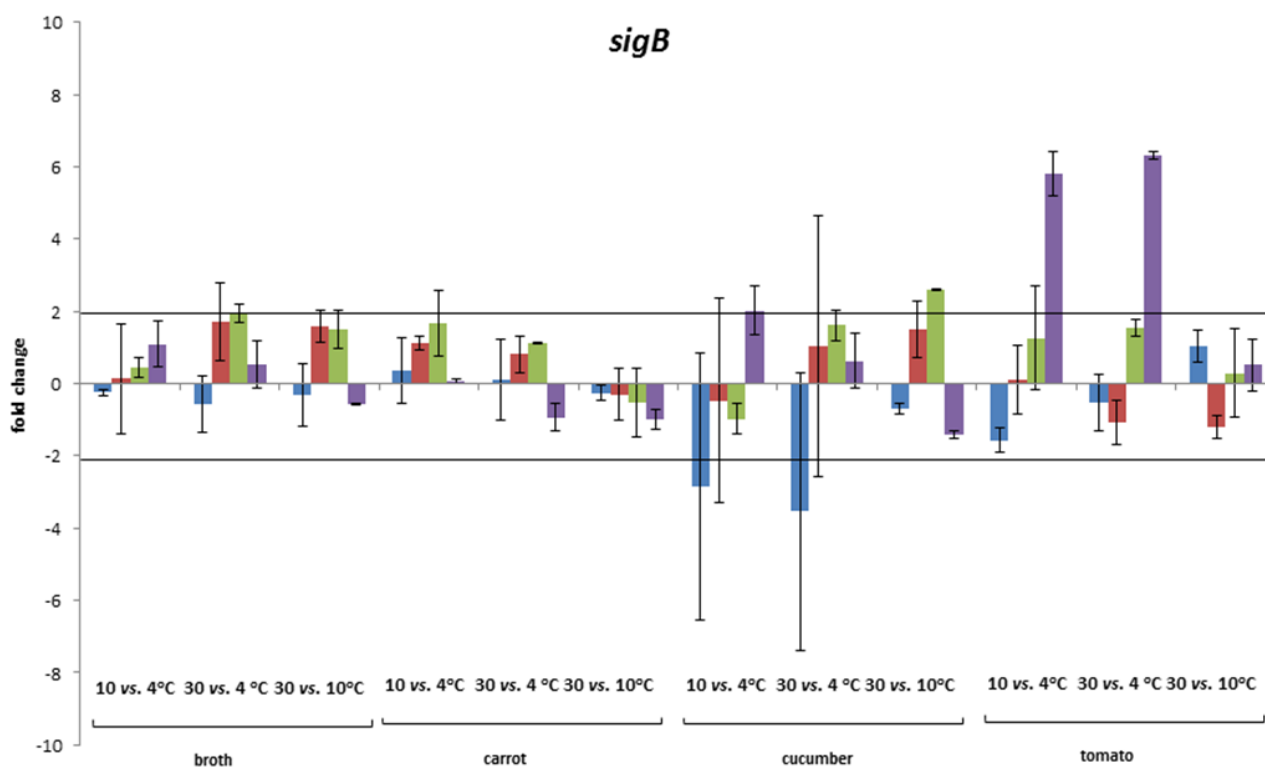
Διάγραμμα 9: Επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση του γονιδίου *inlJ*.

### 3.2.2 Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στη σχετική έκφραση των γονιδίων (*prfA*, *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inlJ*).

Στα διαγράμματα 10 έως 18 φαίνεται η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στη σχετική έκφραση των *prfA*, *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inJ* κατά την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε BHI, αγγούρι, καρότο και ντομάτα στους 4 °C, 10°C και 30°C. Οι μπλε ράβδοι αντιπροσωπεύουν το χρόνο επώασης στη 0 h οι κόκκινες ράβδοι στη 0,5 h, οι πράσινες ράβδοι σε χρόνο 6 h και οι μωβ ράβδοι σε χρόνο 24 h. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής. Ομοίως με την επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση των γονιδίων, πραγματοποιήθηκαν τρεις συγκρίσεις μεταξύ των θερμοκρασιών για κάθε υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

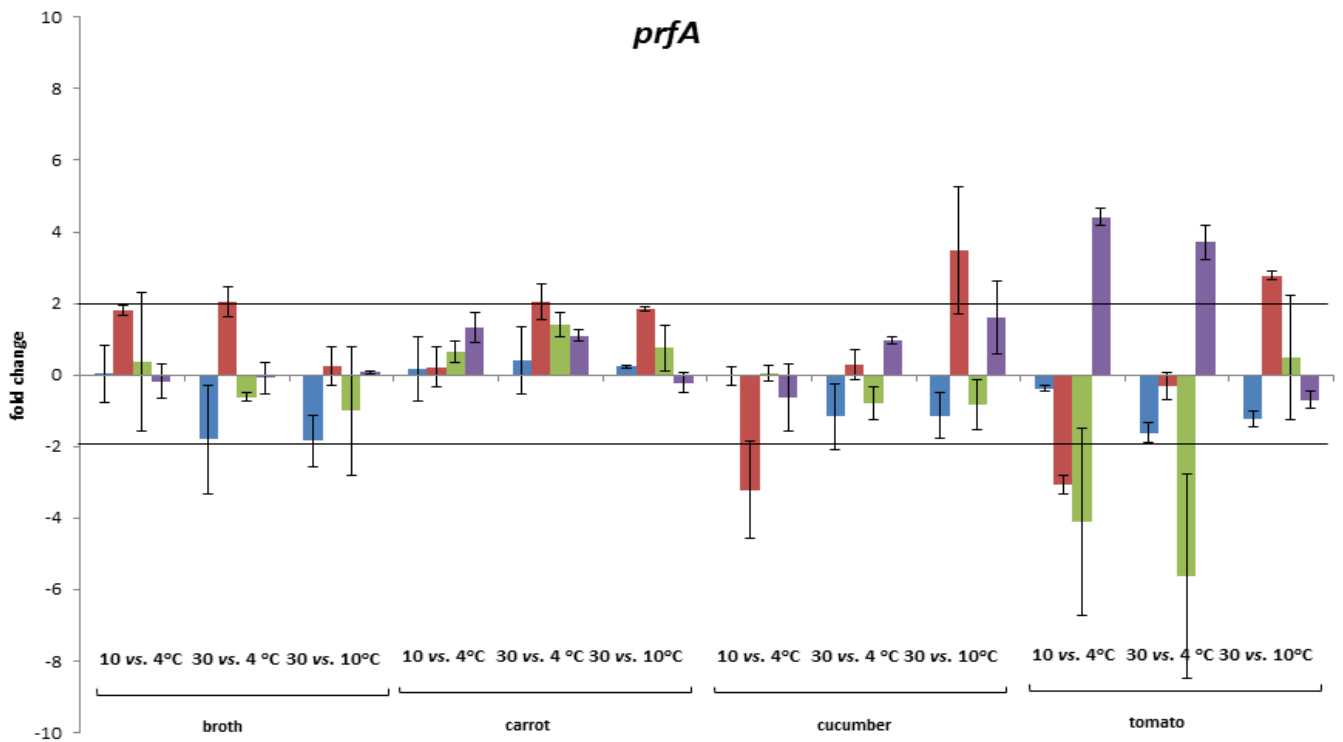
Στο διάγραμμα 10 δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου *sigB*. Εμφανής υπερέκφραση παρατηρείται στη τομάτα στους 10°C σε σχέση με τους 4°C και στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στις 24 h. Υπόεκφραση παρουσιάζεται στο αγγούρι στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στη 0 h.

Στο διάγραμμα 11 δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου *prfA*. Υπερέκφραση φαίνεται να έχει κυρίως στη τομάτα στους 10°C σε σχέση με τους 4°C και στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στις 24 h. Σημαντική υπόεκφραση παρατηρείται στη τομάτα στους 30°C σε σχέση με τους 4°C σε χρόνο επώασης 6 h.



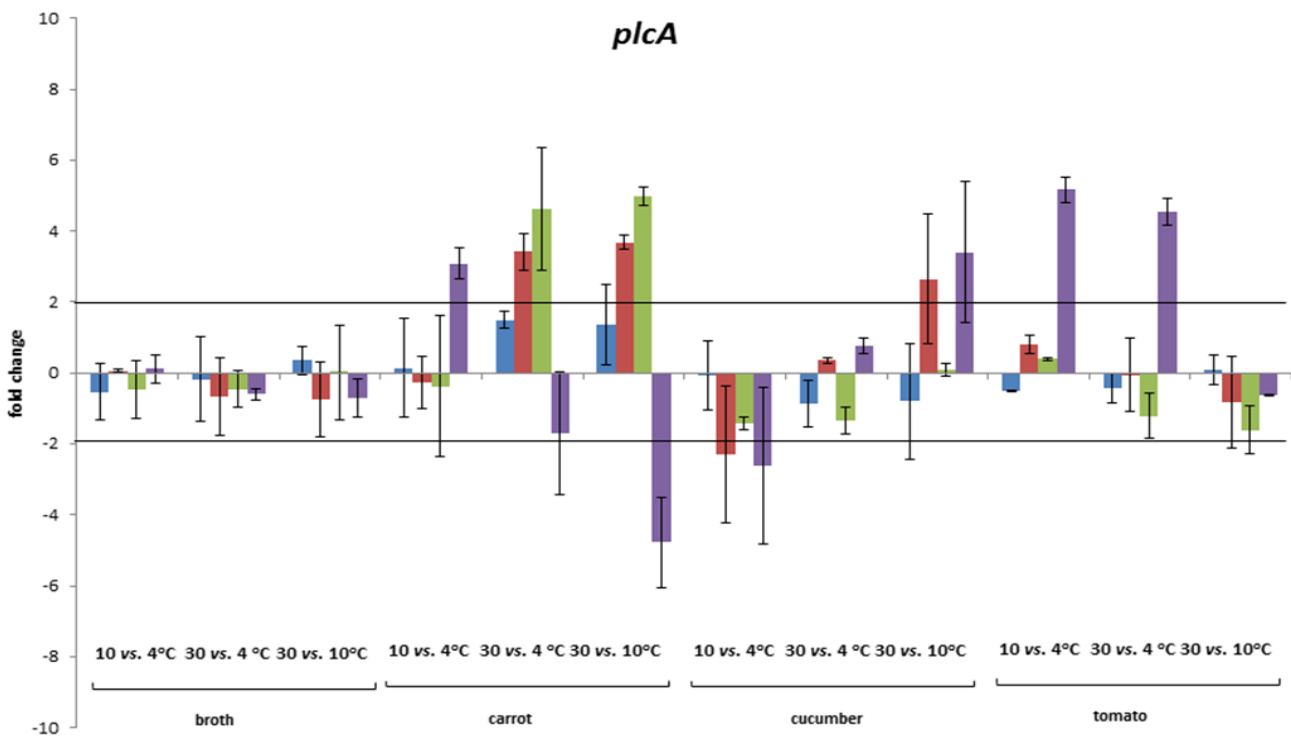
Διάγραμμα 10: Επίδραση του τύπου του υποστρώματος στην έκφραση του γονιδίου *sigB*.



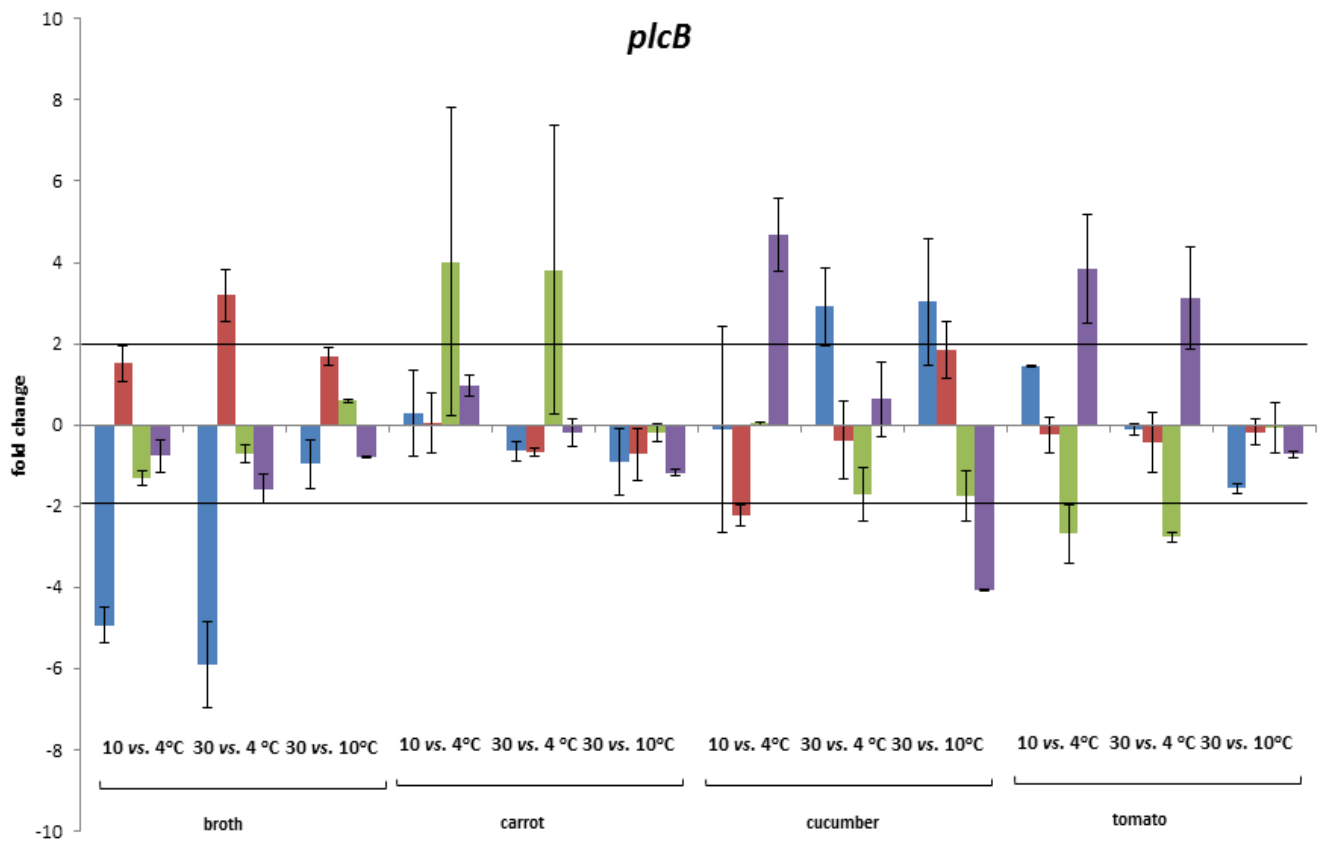


Διάγραμμα 11: Επίδραση του τύπου του υποστρώματος στην έκφραση του γονιδίου *prfA*.

Στο διάγραμμα 12 παρατηρείται υπερέκφραση του *plcA* στο καρότο στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στις 0,5 h και 6 h και στους 30°C σε σχέση με τους 10°C στις 0,5 h και 6 h. Ρύθμιση αύξησης παρατηρείται στη τομάτα στους 10°C σε σχέση με τους 4°C και στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στις 24 h. Υπόεκφραση παρατηρείται στο καρότο στους 30°C σε σχέση με τους 10°C στις 24 h.

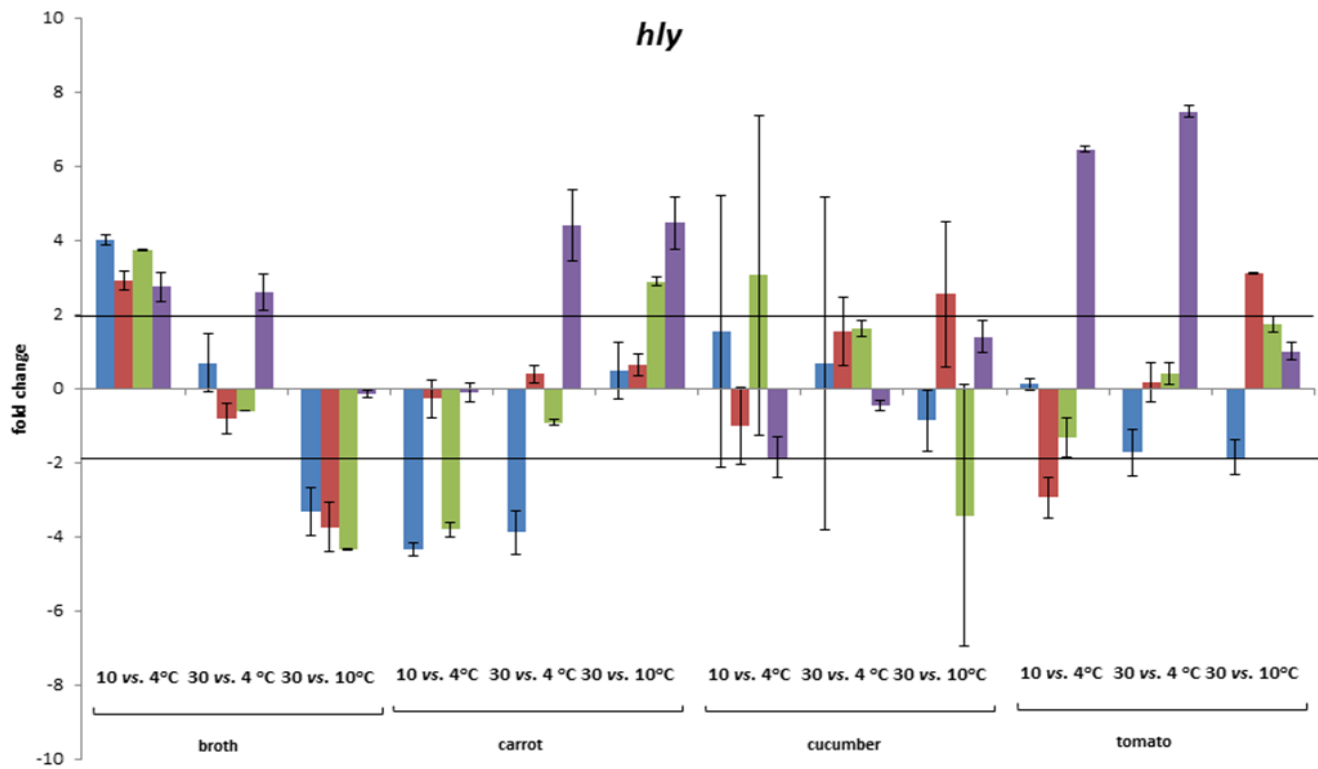


Διάγραμμα 12: Επίδραση του τύπου του υποστρώματος στην έκφραση του γονιδίου *plcA*



Διάγραμμα 13: Επίδραση του τύπου του υποστρώματος στην έκφραση του γονιδίου *plcB*.

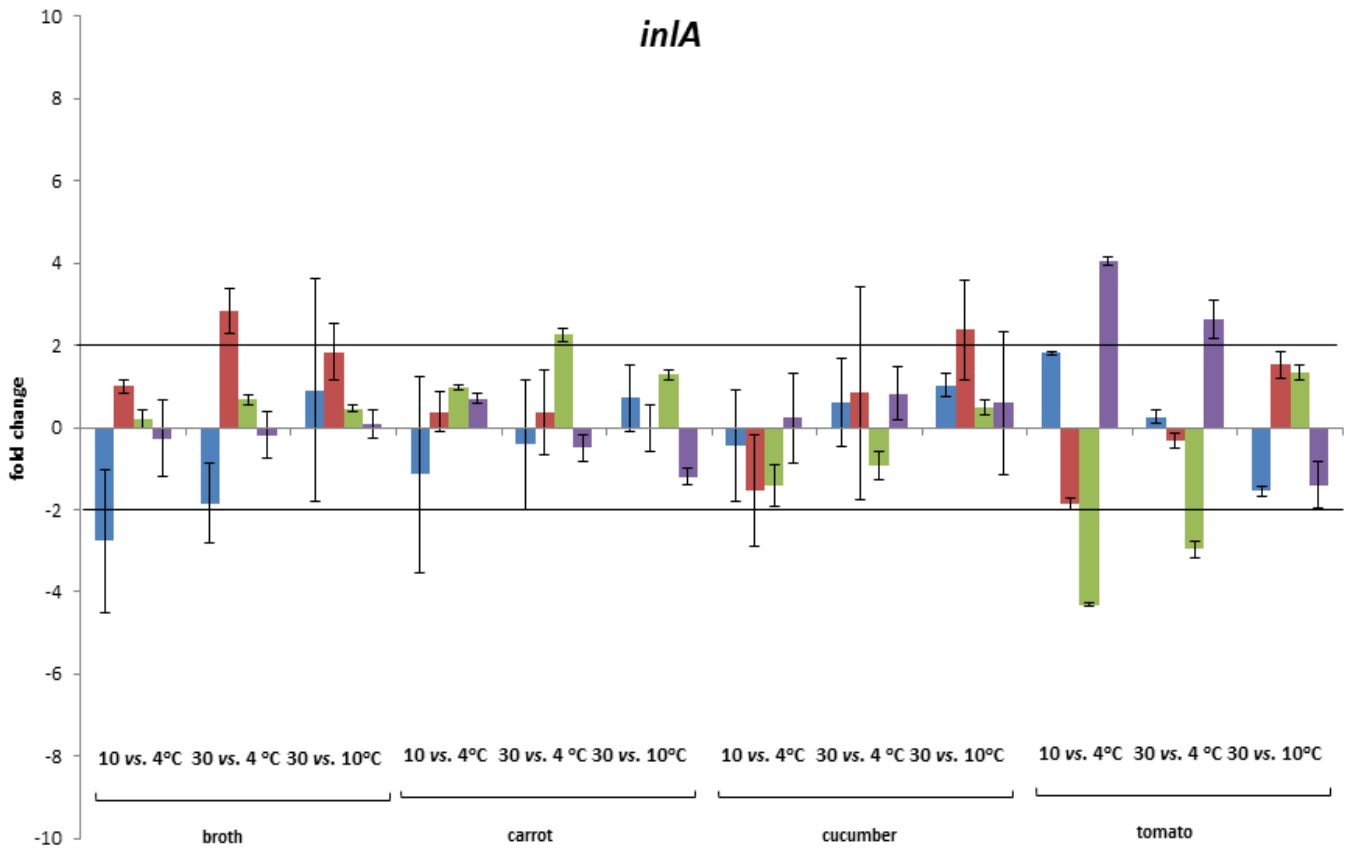
Στο διάγραμμα 13 παρατηρείται μεγαλύτερη υπερέκφραση του *plcB* στο καρότο στους 10°C σε σχέση με τους 4°C και στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στις 6 h. Ομοίως στο καρότο και στη τομάτα στους 10°C σε σχέση με τους 4°C στις 24 h. Υπόεκφραση παρατηρείται στο broth στους 10°C σε σχέση με τους 4°C και στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στη 0 h και στο αγγούρι στους 30°C σε σχέση με τους 10°C στις 24 h.



Διάγραμμα 14: Επίδραση του τύπου του υποστρώματος στην έκφραση του γονιδίου *hly*.

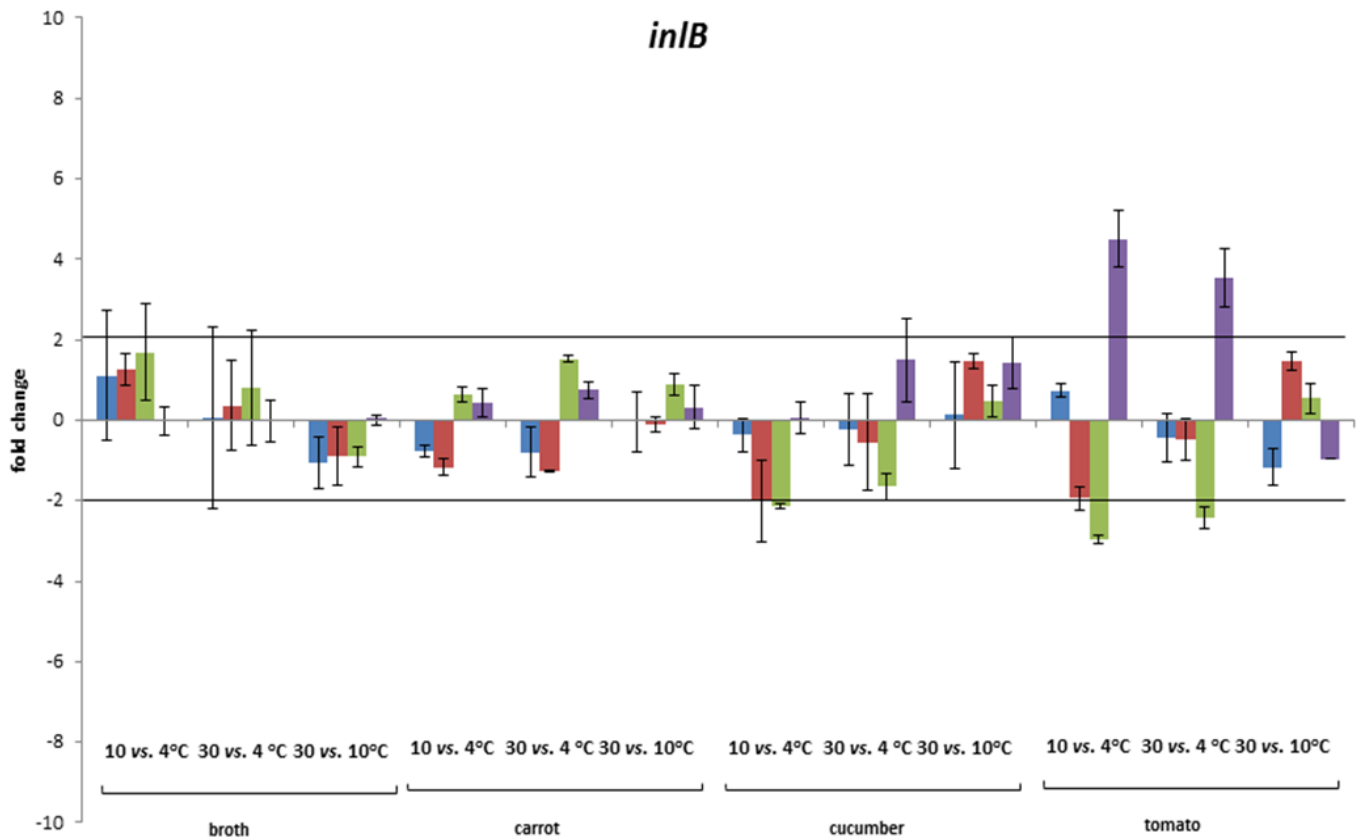
Στο διάγραμμα 14 δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή της έκφρασης. Υπερέκφραση του *hly* παρατηρείται κυρίως στη τομάτα στους 10°C σε σχέση με τους 4°C στις 24 h και στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στις 24 h. Ρύθμιση μείωσης παρατηρείται στο broth στους 30°C σε σχέση με τους 10°C για όλους τους χρόνους επώασης εκτός από τις 24 h, στο καρότο στους 10°C σε σχέση με τους 4°C στις 0 h και 6 h και στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στη 0 h, στο αγγούρι στους 30°C σε σχέση με τους 10°C στις 6 h.

Στο διάγραμμα 15 παρατηρείται υπερέκφραση του *inlA* στη τομάτα στους 10°C σε σχέση με τους 4°C στις 24 h. Αντίθετα, έχουμε υποέκφραση στους 10°C σε σχέση με τους 4°C στη τομάτα σε χρόνο επώασης 6 h.



Διάγραμμα 15: Επίδραση του τύπου του υποστρώματος στην έκφραση του γονιδίου *inlA*.

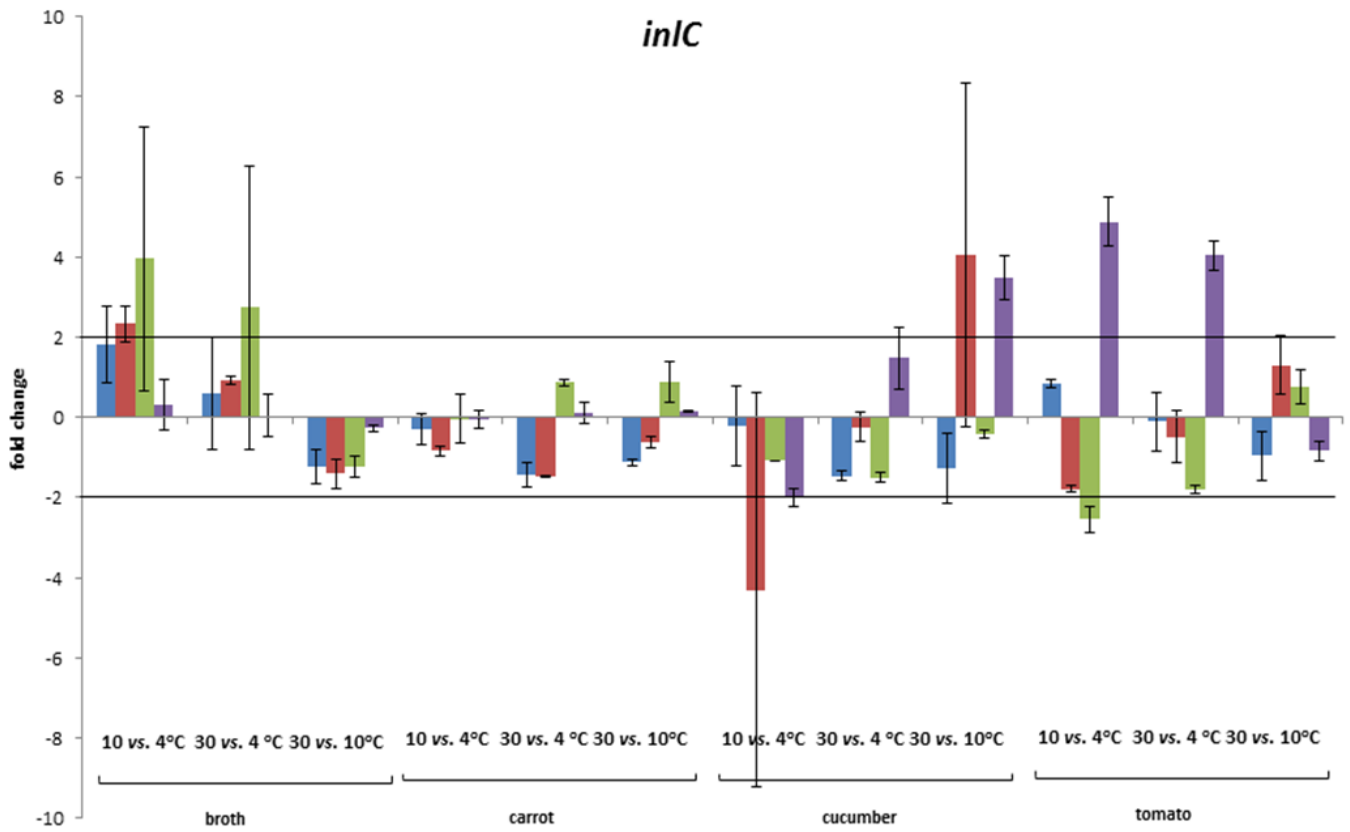
Στο διάγραμμα 16 παρατηρείται υπερέκφραση του *inlB* στη τομάτα στους 10°C σε σχέση με τους 4°C και στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στις 24 h. Αντίθετα, έχουμε υποέκφραση στους 10°C σε σχέση με τους 4°C στη τομάτα στις 6 h επώασης.



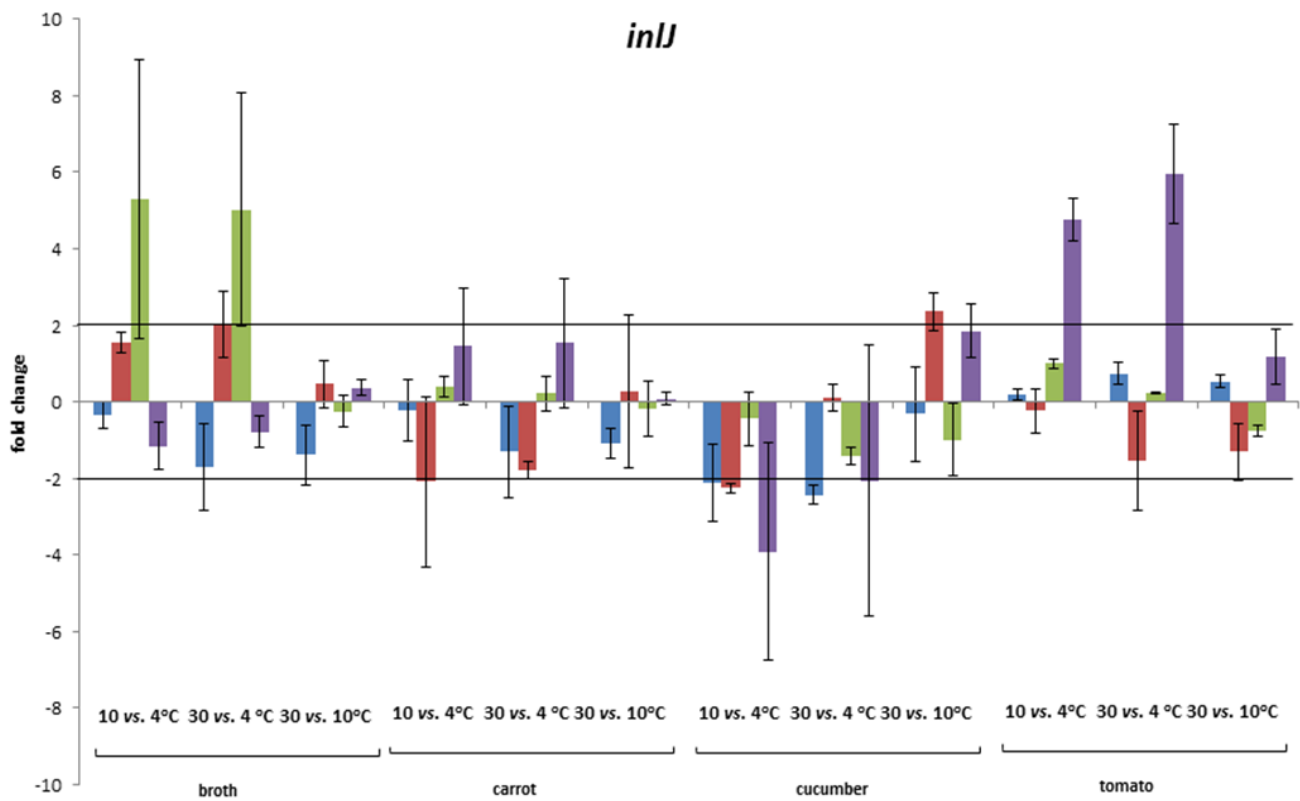
Διάγραμμα 16: Επίδραση του τύπου του υποστρώματος στην έκφραση του γονιδίου *inlB*.

Στο διάγραμμα 17 παρατηρείται υπερέκφραση του *inlC* στο αγγούρι στους 30°C σε σχέση με τους 10°C στις 0,5 h και 24 h, στη τομάτα στους 10°C σε σχέση με τους 4°C στις 24 h και στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στις 24 h καθώς και στους 10°C σε σχέση με τους 4°C και 30°C σε σχέση με τους 4°C στο broth σε χρόνο επώασης 6 h. Αντίθετα έχουμε υποέκφραση στους 10°C σε σχέση με τους 4°C στο αγγούρι σε χρόνος επώασης 0,5 h.

Στο διάγραμμα 18 παρατηρείται υπερέκφραση του *inlJ* στο αγγούρι στους 30°C σε σχέση με τους 10°C στη 0,5 h, στη τομάτα στους 10°C σε σχέση με τους 4°C και στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στις 24 h. Ρύθμιση αύξησης έχουμε επίσης στους 10°C σε σχέση με τους 4°C και στους 30°C σε σχέση με τους 4°C στο broth στις 6 h. Αντίθετα, έχουμε υποέκφραση στους 10°C σε σχέση με τους 4°C στο αγγούρι στις 24 h.



Διάγραμμα 17: Επίδραση του τύπου του υποστρώματος στην έκφραση του γονιδίου *inlC*.



Διάγραμμα 18: Επίδραση του τύπου του υποστρώματος στην έκφραση του γονιδίου *inlJ*.

### 3.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η έκφραση γονιδίων παθογένειας του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια ανάπτυξής του σε υγρό θρεπτικό μέσο καθώς και στην επιφάνεια τομάτας, καρότου και αγγουριού, σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Για το σκοπό αυτό, το παθογόνο *L. monocytogenes* στέλεχος LQC 15257 ορότυπος 4b απομονωμένο από φράουλα, ενοφθαλμίστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό BHI ( $10^8$  CFU/mL) καθώς και στην επιφάνεια τεμαχίων τομάτας, καρότου και αγγουριού ( $10^8$  CFU/g). Ακολούθησε επώαση σε τρεις θερμοκρασίες 4, 10 και 30 °C κατά τη διάρκεια της οποίας πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό (0 h) καθώς και μετά από 0.5, 6 και 24 h. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την συγκριτική μελέτη της έκφρασης των γονιδίων παθογένειας *prfA*, *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ* με εφαρμογή της μεθόδου RT-qPCR, χρησιμοποιώντας ως γονίδια αναφοράς τα *16S*, *rpoB* και *IGS*. Ύστερα από στατιστική ανάλυση των δεδομένων της Real Time PCR (τιμές Ct των δειγμάτων), το γονίδιο αναφοράς με την καλύτερη τιμή σταθερότητας έκφρασης υπολογίστηκε το *IGS*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις συγκρίσεις των αποτελεσμάτων του πειράματος. Οι τιμές σταθερότητας έκφρασης (Stability value) για τα γονίδια αναφοράς *IGS*, *16S* και *rpoB* υπολογίστηκαν ότι είναι 0,023, 0,261 και 0,056 αντίστοιχα.

Για την ανίχνευση και παρακολούθηση της παραγωγής των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR<sup>®</sup> 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). Οι κορυφές που εμφανίζονται στην καμπύλη τήξης αντιστοιχούν στα προϊόντα που έχουν ενισχυθεί με την αντίδραση και είναι ανάλογες των ζωνών στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Συνεπώς, αυτή η ανάλυση στο τέλος του πειράματος είναι σημαντική, γιατί επιτρέπει τον ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων.

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,  $R = E_{\text{target}}^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control-sample})} / E_{\text{ref}}^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control-sample})}$  (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 στην γονιδιακή έκφραση, παρατηρήθηκε μεταβολή σε όλα τα υπό μελέτη γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεια του στελέχους LQC 15257 (ορότυπος 4b) του παθογόνου *L. monocytogenes* όταν εκτέθηκε στην επιφάνεια τεμαχίων τομάτας, καρότου και αγγουριού ( $10^8$  CFU/g), καθώς και σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας BHI ( $10^8$  CFU/mL). Την έκφραση, επιπροσθέτως, επηρέασαν οι χρόνοι (0, 0,5, 6 και 24 ώρες) και οι θερμοκρασίες (4, 10 και 30 °C) επώασης που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα. Παρατηρήθηκε ιδιαίτερη συμπεριφορά έκφρασης των γονιδίων στα τρόφιμα σε σχέση με την θερμοκρασία κάτι που έρχεται σε αντίθεση με παλαιότερες μελέτες (de las Heras, et al., 2011), οι οποίες υποστηρίζουν την επιρροή της θερμοκρασίας στην μολυσματικότητα της *L. monocytogenes* μόνο εντός του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα μόνο τα *inlC* και *inlJ* παρουσίασαν το ίδιο μοτίβο έκφρασης και συγκεκριμένα εμφάνισαν ρύθμιση μείωσης (downregulation) όταν το παθογόνο αναπτύχθηκε σε αγγούρι και τομάτα στους 10 και 4 °C, αντίστοιχα. Η μεταγραφή του γονιδίου *hly* επηρεάστηκε περισσότερο από τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν εμφανίζοντας ρύθμιση μείωσης κατά την ανάπτυξη σε αγγούρι στους 10 και 30 °C, σε τομάτα στους 4 και 10 °C και σε καρότο στους 10 °C, ενώ εμφάνισε ρύθμιση αύξησης (upregulation) κατά την ανάπτυξη σε τομάτα στους 30 °C και σε καρότο στους 4 °C. Σε προηγούμενες μελέτες με σκοπό την μελέτη έκφρασης γονιδίων της *L. monocytogenes* βλέπουμε πως το γονίδιο *hly* είναι πάλι αυτό που επηρεάζεται περισσότερο από τις περιβαλλοντικές συνθήκες με χαρακτηριστικό παράδειγμα την μελέτη της Rantsiou et. al., 2011, κατά την οποία το γονίδιο αυτό έχει υπερέκφραση σε όλα τα υπό μελέτη προϊόντα με τη μέγιστη σε ζυμούμενα αλλαντικά.

Αντίθετα, τα γονίδια *sigB* και *prfA* επηρεάστηκαν πολύ λιγότερο εμφανίζοντας ρύθμιση μείωσης κατά την ανάπτυξη σε τομάτα στους 4 °C και σε



αγγούρι στους 10 °C, αντίστοιχα. Για το γονίδιο *sigB* ίσως ήταν αναμενόμενη η υποέκφραση καθώς είναι υπεύθυνο για τη κωδικοποίηση του παράγοντα  $\sigma^B$  ο οποίος σχετίζεται με την επιβίωση του βακτηρίου σε αρκετά όξινα περιβάλλοντα (Ferreira et al., 2001, Sue et al., 2004). Επίσης είναι γνωστό πως υπάρχει σύνδεση της έκφρασης των γονιδίων μολυσματικότητας. Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία πως η πρωτεΐνη PrfA η οποία συντονίζει την μεταγραφή του γονιδιακού συμπλέγματος του *prfA* που περιλαμβάνει και τα γονίδια *hlyA*, *actA* και *inlA* δυσλειτουργεί σε θερμοκρασίες υπό τους 30°C (Johansson et al., 2002). Γι' αυτό το λόγο πιθανώς στη περίπτωση της υποέκφρασης του γονιδίου *prfA* να επηρεάζεται αρνητικά και η έκφραση του γονιδίου *inlA*. Επίσης, παρόμοια συμπεριφορά (downregulation) στην έκφραση του γονιδίου *prfA* των στελεχών της *Listeria monocytogenes* CCUG 3998 και 442 παρουσιάστηκε σε πείραμα με θρεπτικό υπόστρωμα ωμό σολομό σε θερμοκρασία ανάπτυξης 4°C και χρόνο επώασης 24 ώρες (Samuel Duodu et. al., 2010)

Από τα παραπάνω βλέπουμε σημαντική διαφορά στην έκφραση των παθογόνων γονιδίων ανάμεσα στα τρόφιμα, με το αγγούρι να φαίνεται πως δεν ευνοεί στην ανάπτυξη του βακτηρίου, ενώ στη τομάτα και το καρότο να έχουμε μια ποικιλία αποτελεσμάτων και στη τομάτα συγκεκριμένα να επηρεάζεται ο βαθμός έκφρασης από την αλλαγή θερμοκρασίας.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι αβιοτικοί παράγοντες δύνανται να επηρεάζουν την έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων παθογένειας, επισημαίνουν την περιπλοκότητα του φαινομένου της ρύθμισης των γονιδίων και διευκολύνουν την κατανόηση της φυσιολογίας του εν λόγω παθογόνου κατά τη ανάπτυξή του σε τρόφιμο ως υπόστρωμα

Συμπερασματικά, η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη καθώς και η εργασία των Hadjilouka et al., 2015, αποτελούν τις μοναδικές έρευνες για την έκφραση γονιδίων παθογένειας του βακτηρίου *L. monocytogenes* στέλεχος LQC 15257 ορότυπος 4b σε υποστρώματα φρούτων και λαχανικών που προσφέρουν τη δυνατότητα για περαιτέρω έρευνα.

## **4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Adak, G. K., Long, S.M., O'Brien, S. J. 2002. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut*. 51(6):832-41.
- Adams, M.R., and Moss, M.O. 2008. *Food Microbiology*. 2nd Edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge: 123-127.
- Allcock, J. 1992. Cutaneous listeriosis. *Vet. Rec.* 130:18–19.
- Andersen, C.-L., Jensen, J.-L., Orntoft, T.-F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245-5250.
- Armstrong, D., 1995. *Listeria monocytogenes*, in: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4th ed. (G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dotin, eds.), pp. 1880-1885, Churchill Livingstone, New York.
- Armstrong, R. W., Fung, P. C. 1993. *Brainstem encephalitis (rhombencephalitis) due to Listeria monocytogenes: case report and review.* *Clin Infect Dis.* 16(5):689-702.
- Aurora R., Prakash A., Prakash S., D.B. Rawool, S.B. Barbuddhe. 2008. Comparison of PI-PLC based assays and PCR along with in vivo pathogenicity tests for rapid detection of pathogenic *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 641-647.
- Baracchini, E., Bremer, H., 1987. Determination of synthesis rate and lifetime of bacterial mRNAs. *Anal. Biochem.* 167, 245-260.
- Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. K. & Gannon, F. 1991. The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Meth Appl* 1: 51–56.
- Bergmann, B., Raffelsbauer, D., Kuhn, M., Goetz, M., Hom, S., Goebel, W. 2002. InlA- but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Mol Microbiol.* 43(3):557-70.
- Beuchat, L.-R., 1996. *Listeria monocytogenes: incidence on vegetables.* *Food Control* 7, 223-228.
- Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N., Cossart, P., 2007. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect.* 9, 1156-1166.

- Bille, J., 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In: Miller, A.J., Smith, J.L., Somkuti, G.A. (Eds.), Food-borne Listeriosis. Society for Industrial Microbiology, Amsterdam, pp. 71–74.
- Bio-rad, 2010. “Real Time PCR Chemistries”. Bio-Rad Laboratories, Inc. <http://www3.bio-rad.com/>.
- Birmingham, C.L., Canadien, V., Gouin, E., Troy, E.B., Yoshimori, T., Cossart, P., Higgins, D.E., Brumell, J.H., 2007. *Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells. *Autophagy* 3, 442-451.
- Bohne, J., Sokolovic, Z., Goebel, W., 1994. Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 11, 1141-1150.
- Bowman, J.-P., Bittencourt, C.-R., Ross, T., 2008. Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology* 154, 462-475.
- Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G. and Cossart, P. 1997. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol* 25: 285–294.
- Brouwer, M. C, van de Beek, D, Heckenberg, S. G, Spanjaard, L., de Gans, J. 2006. Community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. *Clin Infect Dis.* 43(10):1233-8.
- Bubert A, Köhler S, Goebel W. 1992. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 58(8):2625-32.
- Bubert A, Kuhn M, Goebel W, Köhler S. 1992. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J. Bacteriol.* 174(24):8166-71.
- Burchill, S. A., Lewis, I .J., and Selby, P. 1999. Improved methods using the reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect tumour cells. *Br. J. Cancer* 79: 971-977.
- Bustin SA, Nolan T. 2004. “Analysis of mRNA expression by Real-Time PCR”, Chapter 7. *Real-Time PCR, an essential guide.* Horizon Bioscience ed. 125- 184.
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25(2):169-93.
- Cabanes, D., et al., Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*, *Trends Microbiol.* 10 (5) (2002) 238-245.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of listeriosis linked to blue bell creameries products (final update). Available at: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/index.html> (2015).
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC), 2012. Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/082712/index.html>. Accessed September 2015. ECDC-2010, 2011, 2015.
- Chan, Y.-C., Boor, K.-J., Wiedmann, M., 2007. sB-dependent and sB-independent mechanisms contribute to transcription of *Listeria monocytogenes* cold stress genes during cold shock and cold growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6019-6029.
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., Boor, K.-J., 2008. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 16, 388-396.
- Coffey A, van den Burg B, Veltman R, Abee T. 2000. Characteristics of the biologically active 35-kDa metalloprotease virulence factor from *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 88(1):132-41.
- Cole, M. B., M. V. Jones, and C. Holyoak. 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 69:63-72.
- Conner, D. E., V. N. Scott, S. S. Summer, and D. T. Bernard. 1989. Pathogenicity of foodborne, environmental and clinical isolates of *Listeria monocytogenes* in mice. *J. Food Sci.* 54:1553-1556.
- Cossart, P. & Lecuit, M. 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 17: 3797–3806.DOI: 10.1093/emboj/17.14.3797.
- Cossart, P., Vicente, M.F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C., Berche, P., 1989. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* 57, 3629-3636.
- Cotoni, L. 1942. A propos des bacteries denommees *Listerella*-rappel d'une observation ancienne de meningite chez l'homme. *Ann. Inst. Pasteur* 68:92-95.
- Crosby, L.D. and Criddle, C.S., 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *BioTechniques* 34, 790–794, 796, 798.

- Cummins AJ, Fielding AK, McLauchlin J. 1994. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J Infect.* Jan; 28(1):89-91
- Dahllof, I., Baillie, H., Kjelleberg, S., 2000. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3376–3380.
- 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.
- Dawson, S. J., Evans, M. R., Willby, D., Bardwell, J., Chamberlain, N., Lewis, D. A. 2006. *Listeria* outbreak associated with sandwich consumption from a hospital retail shop, United Kingdom. *Euro Surveill.* 11(6):89-91.
- de las Heras,, A., Cain, R.J., Bielecka, M.K., Vazquez-Boland, J.A., 2011. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinions in Microbiology* 14, 118–127.
- 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.
- Deperrois-Lafarge, V., Meheut, T. 2012. Use of the rpoB gene as an alternative to the V3 gene for the identification of spoilage and pathogenic bacteria species in milk and milk products. *Lett Appl Microbiol.* 55(2):99-108.
- Doganay, M. 2003. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 35(3):173-5.
- Domann, E., Leimeister-Wachter, M., Goebel, W., Chakraborty, T., 1991. Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect. Immun.* 59, 65-72.
- Doumith, M., et al., 2004. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays, *Infect. Immun.* 72 (2)1072-1083.
- Dramsı, S. et al., 1997. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD, *Infect. Immun.* 65 (5) 1615-1625.

- Drancourt, M., Berger, P. & Raoult, D. 2004. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. *J Clin Microbiol* 42, 2197–2202.
- Duodu, S., Holst-Jensen, A., Skjerdal, T., Cappelletti, J.-M., Pilet, M.-F., Loncarevic, S., 2010. Influence of storage temperature on gene expression and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains grown in a salmon matrix. *Food Microbiol.* 27, 795-801.
- Duquenne, M., Fleurot, I., Aigle, M., Darrigo, C., Borezee-Durant, E., Derzelle, S., Bouix, M., Deperrois-Lafarge, V., Delacroix-Buchet, A., 2010. Tool for quantification of staphylococcal enterotoxin gene expression in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1367-1374.
- Dussurget, O., 2008. New insights into determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 270, 1-38.
- EFSA ECDC, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J* 11:3129.
- Elgart, V., Jia, T., Kulkarni, R., 2010. Quantifying mRNA synthesis and decay rates using small RNAs. *Biophys. J.* 98, 2780-2784.
- Engelbrecht, F., S.-K. Chun, C. Ochs, J. Hess, F. Lottspeich, W. Goebel, and Z. Sokolovic. 1996. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol. Microbiol.* 21:823–837.
- Farber, J. M., Peterkin, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol Rev* 55, 476–511.
- Farber, J.M. 1989. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 8, 285-291.
- Farber, J.M., Addison, C.J., 1994. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. *J Appl Bacteriol. Sep*; 77(3):242-50.
- 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.
- 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.

- Feresu, S.B., and Jones, D., 1988. Taxonomic studies on *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria* and atypical lactobacilli. J. Gen. Microbiol. 134:1165-1183.
- Ferreira, A., O'Byrne, C.P., Boor, K.J., 2001. Role of  $\sigma^B$  in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4454-4457.
- Ferreira, A., Sue, D., O'Byrne, C.-P., Boor, K.-J., 2003. Role of *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2692-2698.
- Fleming, D. W., M. D. Cochi, K. L. MacDonald, J. Brondum, P. S. Hayes, B. D. Plikaytis, M. B. Holmes, A. Audurier, C. V. Broome, and A. L. Reingold. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N. Engl. J. Med. 312:404-407.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (FAO/WHO) Microbiological risk assessment series 5: Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Technical report (2004) Available online: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/y5394e/y5394e.pdf>
- Fraga, D., Meulia, T. and Fenster, S., 2008. "Real Time PCR". John Wiley & Sons, Inc. Current Protocols Essential Laboratory Techniques. Unit 10.3., p.1.-34.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Sansonetti, P. 1986. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun., 52 pp. 50-55.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Fréhel, C., Gouin, E. & Cossart, P. 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. Cell 65: 1127-1141.
- Gallagher, P.G. and Watakunakorn, C. 1988. *Listeria monocytogenes* endocarditis: a review of the literature 1950-1986. Scand. J. Infect. Dis. 20:359-368.
- Galsworthy, S.B., S. Girdler and S.F. Koval. 1990. Chemotaxis in *Listeria monocytogenes*. ACTA Microbiol. Hung 37.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2. New York: Springer.
- Gauto, A. R., Cone, L. A., Woodard, D. R., Mahler, R. J., Lynch, R. D., Stoltzman, D. H. 1992. Arterial infections due to *Listeria monocytogenes*: report of four cases and review of world literature. Clin Infect Dis. 14:23-8.

- Geoffroy C, Gaillard J.L, Alouf J.E, Berche P. 1987. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* Jul;55(7):1641-6.
- George, S.M. and Lund, B.M. 1992. The effect of culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4,5. *Letters in Applied Microbiology* 1, 49-52.
- Gibson, N. J. 2006. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta.*363(1-2):32-47.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., Williams, P. M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6(10):995–1001.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 25(4):386-401.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., de, D.A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.D., Fsihi, H., Garcia-del, P.F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez- López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueño, E., Maitournam, A., Vicente, J.M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de, P.B., Pérez-Diaz, J.C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J.A., Voss, H., Wehland, J., Cossart, P., 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294, 849–852.
- Goulet, V., C. Jacquet, V. Vaillant. I. Rebiere, E. Mouret, C. Lorente, E. Maillot, F. Stainer, and J. Rocourt. 1995. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. *Lancet* 345:1581-1582.
- Graves, L. M, Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes E. D., Milillo, S. R., Den Bakker, H. C. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:1280–1288. 10.1099/ijs.0.014118-0.
- Gray, M.L., H.J. Stafseth, F. Thorp, L.B. Sholl, and W.F. Riley. 1948. A new technique for isolating *Listerellae* from the bovine brain. *J. Bacteriol.* 55:471-476.
- Gregory SH, Sagnimeni AJ, Wing EJ. 1997. Internalin B promotes the replication of *Listeria monocytogenes* in mouse hepatocytes. *Infect Immun.* 65(12):5137-41.



- Greiffenberg L, Goebel W, Kim KS, Weiglein I, Bubert A, Engelbrecht F, Stins M, Kuhn M. 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun.* 66(11):5260-7.
- Grundling, A., Gonzalez, M.D., Higgins, D.E., 2003. Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. *J. Bacteriol.* 185, 6295-6307.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Alban Le Monnier, Leclercq, A., Mechaï, F., Marie-France Mamzer-Bruneel, Bielecka, M.K., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O. and Lecuit, M. 2010. Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis.* Jan; 16(1): 136–138.
- Gurtler, V. and Stanisich, V. A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3–16
- Gutekunst, K.A., L. Pine, E. White, S. Kathariou, and G.M. Carlone. 1992. A filamentous-like mutant of *Listeria monocytogenes* with reduced expression of a 60- kilodalton extracellular protein invades and grows in 3T6 and Caco- 2 Cells. *Can. J. Microbiol.* 38:843-851.
- Haase, J. K., Didelot, X., Lecuit, M., Korkeala, H., Achtman, M. 2014. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study. *Environ. Microbiol.* 16:405-416.
- Hadjilouka, A., Molfeta, C., Panagiotopoulou, O., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Drosinos, E.-H., 2015. Expression of *Listeria monocytogenes* key virulence genes during growth in liquid medium, on rocket and melon at different temperatures. In: 24th International ICFMH Conference, Nantes, 1-4 September.
- Hadjilouka, A., Paramithiotis, S., Drosinos, E.-H., 2014. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and occurrence of listeriosis from ready to eat fresh fruits and vegetables. In: Hambrick, E.C. (Ed.), *Listeria monocytogenes: Food Sources, Prevalence and Management Strategies.* Nova Publishers, pp. 283-296.
- Hamon, M.A., Ribet, D., Stavru, F., Cossart, P., 2012. Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*. *Trends Microbiol.* 20, 360-368.
- Hartford, T., and P.H.A. Sneath. 1993. Optical DNA-DNA homology in the genus *Listeria*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:26-31.

- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10):986–994
- Ho JL. Shands KN. Friedland G. Eckind P. Fraser DW. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch Intern Med.* 146:520–524.
- Hof. H. 2003. Listeriosis: therapeutic options. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35:203-205.
- Hof. H. 2004. An update on the medical management of listeriosis. *Expert Opin. Pharmacother.* 5:1727-1735.
- Houghton, S. and Cockerill, F., 2006. “RealTime PCR: Overview and applications”. *Surgery*, Vol 139, No 1, p. 1-5.
- Hunt M., 2006. “Real Time PCR Tutorial”. University of South Carolina. <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>.
- Hyden, P., Pietzka, A., Allerberger, F., Springer, B., Sensen, C., and Ruppitsch, W. 2016. Draft Genome Sequence of a 94-Year-Old *Listeria monocytogenes* Isolate, SLCC208. *Genome Announc.* 4(1): e01572-15.
- Jackson KA, Iwamoto M, Swerdlow D. 2010. Pregnancy-associated listeriosis. *Epidemiol Infect.*138(10):1503-9.
- Johansson, J.,Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., Cossart, P., 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110, 551–561.
- Jorgensen, F., P.J. Stephens, and S. Knochel.1995. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 79:274-281.
- Juntilla, .R., S.I. Niemela, and J. Hirn. 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.* 65:321-327.
- 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.
- Kastbjerg, V.G., Larsen, M.-H., Gram, L., Ingmer, H., 2010. Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 303-309.

- 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.
- Kubista, M., Sindelka, R., Tichopad, A., Bergkvist, A., Lindh, D., Forootan, A., 2007. The Prime Technique. Real-time PCR Data Analysis. *G.I.T. Lab. J.* 9-10, 33-35. Access date: 8 October 2013. [http://www.tataa.com/wp-content/uploads/2012/09/GIT\\_Laboratory-Journal\\_33-35\\_2007.pdf](http://www.tataa.com/wp-content/uploads/2012/09/GIT_Laboratory-Journal_33-35_2007.pdf).
- Kuhn, M, Goebel, W. 2007. Molecular virulence determinants of *Listeria monocytogenes*. Ch 5 In: Ryser ET, Marth EH (eds) *Listeria, listeriosis and food safety*. 3rd ed, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, p. 111–155
- Kuhn, M. & Goebel, W. 1989. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun* 57: 55–61.
- Kuhn, M. Scotti, M. Vázquez-Boland, J.A. 2008. Pathogenesis. In Liu D (ed.) *Handbook of Listeria monocytogenes*, CRC Press, New York. pp. 99-102.
- Lang Halter, E., Neuhaus, K., and Scherer, S. 2013. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int. J. Syst Evol Microbiol.* 63: 641-647.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Le Fleche-Mateos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., Allerberger, F. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 2210-2214.
- Lecuit, M., Nelson, D. M., Smith, S. D., Khun, H., Huerre, M., Vacher-Lavenu, M. C., Gordon, J. I., Cossart, P. 2004. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(16):6152-7.
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J., Cossart, P. 1997. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun.* 65(12):5309-19.
- Leimeister-Wachter, M., Domann, E., Chakraborty, T., 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J. Bacteriol.* 174, 947-952.
- Leung, N., Gianfelice, A., Gray-Owen, S. D., Ireton, K. 2013. Impact of the *Listeria monocytogenes* protein InlC on infection in mice. *Infect Immun.* 81(4):1334-40.

- Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J., Chakraborty, T. 1995. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun.* 63(10):3896-903.
- Linnan MJ, Mascola L, Lou XD, Goulet V, May S, Salminen C, Hird DW, Yonekura ML, Hayes P, Weaver R, et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Engl J Med.* 1988 Sep 29;319(13):823–828.
- Liu, W. and D. A. Saint. 2002. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294:347-353.
- Liu, W. and D.A. Saint. 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal. Biochem.* 302:52-59
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lorber B. 1997. Listeriosis. *Clin Infect Dis.* 24(1):1-9.
- Low, JC; Donachie, W. Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet. J.*, 1997, 153, 9-29.
- Marquis, H., Goldfine, H., Portnoy, D. A. 1997. Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 137(6):1381-92.
- McDowell, D. G., Burns, N. A., and Parkes, H. C. 1998. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Res.* 26: 3340-3347.
- McLauchlin J, 1996. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control* 7:187-93.
- McLauchlin J, 1996. The role of the PHLS in the investigation of listeriosis during the 1980s and 1990s. *Food Control* 7:235-9.
- McLauchlin, J., Low J.C. 1994. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. *The Veterinary Record* 135, 615-617.
- Meijerink, J., Mandigers, C., van de Locht, L., Tonnissen, E., Goodsaid, F., Raemaekers, J. 2001. A novel method to compensate for different amplification

- efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn* 3(2): 55–61.
- Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vázquez-Boland, J.A., Milon, G., Cossart, P., 1991. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Molecular Microbiology* 5, 2273–2283.
- Murray E.G.D.; Webb R.E.; Swann M.B.R. 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29: 407–439.
- Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W, Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 178(19):5636-43.
- 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.
- Nyfeldt A. 1929. Etiologie de la mononucléose infectieuse. *C.R. Soc. Biol.* 101: 590-592.
- Ogier, J. C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J.-Y., Delacroix-Buchet, A., 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of Temporal Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5628-5643.
- Olesen, I., Thorsen, L., Jespersen, L., 2010. Relative transcription of *Listeria monocytogenes* virulence genes in liver pâtés with varying NaCl content. *Int. J. Food Microbiol.* 141, S60-S68.
- Olesen, I., Vogensen, K.-F., Jespersen, L., 2009. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. *Foodborne Pathog. Dis.* 6 (6), 669-680.
- Orsi, RH; den Bakker, HC; Wiedmann, M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 79–96.
- Ottaviani, F., Ottaviani, M., & Agosti, M. 1997. Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. *Ind Aliment* 36: 1-3.
- Painter J, Slutsker L. Listeriosis in humans. 2007. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. CRC Press; Boca Raton: pp. 85–109.

- Palmer, M. 2001. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* 39: 1681–1689.
- Paramithiotis Spiros , Hadjilouka Agni and Drosinos H. Eleftherios. 2014. *Listeria* Pathogenicity Island 1. Structure And Function. Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Athens, Greece
- Parida, S. K., Domann, E., Rohde ,M., Müller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J., Chakraborty, T.. 1998. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol.* Apr;28(1):81-93.
- Parish, M.E. and Higgins, D.P. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in Low pH Model Broth Systems. *Journal of Food Protection*: Vol. 52, No. 3, pp. 144-147.
- Patchett RA, Kelly AF, Kroll RG. 1991. Respiratory activity in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett.* Feb;62(1):95-8.
- Petran, R.L. and Zpttola, E.A. 1989. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* scott A. *Jounal of Food Science* 54: 458-460.
- Pfaffl M.W., 2002. “Chapter 3: A-Z of quantitative PCR”. S.A. Bustin. International University Line, La jolla, CA. p. 1-23.
- 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.
- Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in rea-ltime RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2002-2007.
- Pfaffl, M.W.,Horgan, G.W. and Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.*Nucleic Acids Res.* 30, 1–10.
- Pine, L., Malcolm, G. B, Brooks, J. B, Daneshvar, M. I. 1989. Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can J. Microbiol.* 35(2):245-54.
- Pirie, J. H. H. 1940. *Listeria*: Change of name for a genus of bacteria. *Nature* 145:264.
- Posfay-Barbe, K.M., Wald, E.R. 2009. Listeriosis. *Semin Fetal Neonat M* 14:228-33.
- Portnoy, D.A., Jacks, P.S., Hinrichs D.J. 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.*, 167 pp. 1459-1471.

- Premaratne RJ, Lin WJ, Johnson EA. 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 57(10):3046-8.
- Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinpflug, J., Simm, A., Hess, J, Kaufmann, S. H, Goebel, W. 1998. The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol Gen Genet.* 260(2-3):144-58.
- Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P., Cocolin, L., 2008. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 121, 99–105.
- Rantsiou, K., Greppi, A., Garosi, M., Acquadro, A., Mataragas, M., Cocolin, L., 2012. Strain dependent expression of stress response and virulence genes of *Listeria monocytogenes* in meat juices as determined by microarray. *Int. J. Food Microbiol.* 152, 116-122.
- Rantsiou, K., Mataragas, M., Alessandria, V., Cocolin, L., 2012. Expression of virulence genes of *Listeria monocytogenes* in food. *J. Food Saf.* 32, 161-168.
- Rasmussen, R. P. 2001. Quantification on the LightCycler, p. 21-34. In S. Meuer, C.T. Wittwer, and K. Nakagawara (Eds.), *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg.
- Raveneau, J., Geoffroy, C., Beretti, J. L., Gaillard, J. L., Alouf, J. E., Berche, P. Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect. Immun.*, 1992, 60, 916-921.
- Renzoni, A., Cossart, P., Dramsi, S., 1999. PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts. *Mol. Microbiol.* 34, 552-561.
- Renzoni, A., Klarsfeld, A., Dramsi, S., Cossart, P., 1997. Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect. Immun.* 65, 1515-1518.
- Riedo, F. X., Pinner, R. W. and Pinner. R. W. 1994. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *Journal of Infectious Diseases*, vol. 170, no. 3, pp. 693–696.
- Roche, S. M., Gracieux, P., Milohanic, E., Albert, I., Virlogeux-Payant, I., Temoin, S., Grepinet, O., Kerouanton, A., Jacquet, C., Cossart, P., Velge, P., 2005.

- Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6039-6048.
- Roche, S. M., Velge, P., Liu, D., 2008. Virulence determination. In: Liu, D. (Ed.), *Handbook of Listeria monocytogenes*. Taylor & Francis Group, LLC, New York, pp. 241-270.
- Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, Jacquet C, Piffaretti J-C. 1992. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int J Syst Bacteriol* 42:171-4.
- Rocourt, J. and Buchrieser, C. 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, 3rd edn, pp. 1–20. Edited by E. T. Ryser & E. H. Marth. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Rocourt, J. 1999. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: 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.
- Rocourt, J., Seeliger, H. P. 1985. Distribution des espèces du genre *Listeria*. *Zentralbl Bacteriol Mikrobiol Hyg* 259:317–30.
- Romick, T. L., Fleming, H. P., McFeeters, R. F. 1996. Aerobic and anaerobic metabolism of *Listeria monocytogenes* in defined glucose medium. *Appl Environ Microbiol.*62(1):304-7.
- Sabet, C., Lecuit, M., Cabanes, D., Cossart, P., Bierne, H. 2005. LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infect Immun.* 73(10):6912-22.
- Safdar, A., Armstrong, D., 2003. Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from a patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955-1997). *J Clin Microbiol* 41:483-48.
- Sauders, B. D., Durak, M. Z., Fortes, E., Windham, K., Schukken, Y., Lembo Jr. A. J. 2006. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from natural and urban environments. *J. Food Prot.* 69:93-105.
- Schluter, D., Domann, E., Buck, C., Hain, T., Hof, H., Chakraborty, T., Deckert-Schluter, M., 1998. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C from *Listeria*



- monocytogenes* is an important virulence factor in murine cerebral listeriosis. Infect. Immun. 66, 5930-5938.
- Schuchat A., Deaver KA., Wenger JD et al., 1992. Role of foods in sporadic listeriosis. 1. Case-Control study of dietary risk factors. JAMA 267: 2041-2045.
- Schuchat, A., Swaminathan, B., Broome, C., 1991. Epidemiology of human listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 4, 169-183.
- Seeliger, H. P., Bockemühl, J. 1968. Critical studies on the question of acapsular formation in *Listeria monocytogenes*. Zentralbl Bakteriolog Orig. 206(2):216-27.
- Seeliger, H.P. R., and Höhne, K. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In. Methods in Microbiology. (Eds. Bergan, T. and Norris, J. R.) London, UK, Academic Press Inc. Ch. 13, pp. 31-49.
- Seeliger, HH. P.R., and D. Jonesy. 1986. Genus *Listeria pirie* 1940. In Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Eds. P. H. A. Sneathy, N. S. Mair, N. E. Sharpe, and J. G. Holt.
- Shahamat, M., Seaman A. and Woodbine, M. 1980. Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentration. Zentbl. Bakteriolog. Hyg. Abt. 1 Orig. A 246, 506-511.
- Sheehan B, Klarsfeld A, Msadek T, Cossart P. 1995. Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. J. Bacteriol. 177(22):6469-76.
- Shen, A., Higgins, D. E. 2006. The MogR transcriptional repressor regulates nonhierarchical expression of flagellar motility genes and virulence in *Listeria monocytogenes*. PLoS Pathog. 2(4):e30.
- Shockman, G. D., Daneo-Moore, L., Kariyama, R., Massidda, O. 1996. Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. Microb Drug Resist. 2(1):95-8.
- Siddiqi, R., Khan, M. A. 1989. Amino acid requirement of six strains of *Listeria monocytogenes*. Zentralbl Bakteriolog. 271(2):146-52.
- Silk, B. J., Date, K. A., Jackson, K. A., Pouillot, R., Holt, K. G., Graves, L. M., Ong, K. L., Hurd, S., Meyer, R., Marcus, R., Shiferaw, B., Norton, D. M., Medus, C., Zansky, S. M., Cronquist, A. B., Henao, O. L., Jones, T. F., Vugia, D. J., Farley, M. M., Mahon, B. E. 2012. Invasive listeriosis in the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004-2009: further targeted prevention needed for higher-risk groups. Clin Infect Dis. 54 Suppl 5:S396-404.

- 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.
- Southwick, F. S., Purich, D. L. 1996. Intracellular pathogenesis of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 334(12):770-6.
- Stratagene, 2006. "Introduction to Quantitative PCR". Stratagene, La Jolla, CA. p. 3-8, 9-11,23-26.
- Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Vega, Y., Chico-Calero, I., Vazquez-Boland, J.A., 2001. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell. Microbiol.* 3, 853-864.
- Sue, D., Fink, D., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2004.  $\sigma^B$ -dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology* 150, 3843–3855.
- Sutherland, P. S. 1989. *Listeria monocytogenes*. In: Foodborne Microorganisms of Public Health Significance, 4th Edition AIFST (NSW Branch). Buckle, K.A., J.A. Davey. M.Y. Eyles, X.D. Hocking. K.G. Newton and E. J. Stuttard. Food Microbiol. Group: 289-311.
- 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.
- Tabouret, M., De Rycke, J., Audurier, A., Poutrel, B., 1991. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* isolates in immunocompromised mice in relation to listeriolysin production. *J. Med. Microbiol.* 34, 13-18.
- Thermo Fisher Scientific. 2015. <http://ir.thermofisher.com/investors/news-and-events/news-releases/news-release-details/2016/Thermo-Fisher-Scientific-Reports-Record-Fourth-Quarter-and-Full-Year-2015-Results/default.aspx>
- Tichopad, A., M. Dilger, G. Schwarz, and M. W. Pfaffl. 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* 31:e122.
- Todd, E.C.D., Notermans, S., 2011. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 22, 1484-1490.
- Todeschini G, Friso S, Lombardi S, Casaril M, Fontana R, Corrocher R. 1998. A case of *Listeria murray/grayi* bacteremia in a patient with advanced Hodgkin's disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 17:808-10.

- Travier, L., Guadagnini, S., Gouin, E., Dufour, A., Chenal-Francisque, V., Cossart, R., Olivo-Marin, J.-C., Ghigo, J.-M., Disson, O., Lecuit, M., 2013. Acta promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. PLoS Pathog. 9(1), e1003131.
- U.S. Food and Drug Administration, U.S. Food Safety and Inspection Service, Center for Disease Control and Prevention (FDA/USDA-USDA:FSIS/CDC). 1992, 2003. Quantitative Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM197330.pdf>
- USDA. CSREES Multistate Research Project S-294 Project Proposal. 1998. "Postharvest Quality and Safety in Fresh-cut Vegetables and Fruits." <http://research.ifas.ufl.edu/s294/index.html>. Florida Agricultural Experiment Station Journal Series No. R-09235.
- Valasek, M. A., Repa, J. J. 2005. The power of real-time PCR. Adv Physiol Educ., 29, 3, 151- 159.
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche B, Chakraborty, T.,Dominguez-Bernal, G., Goebel, W.,Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. and Kreft, J. 2001 *Listeria pathogenesis* and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 2001; 14:584–640.
- Vicente, M. F., J. Berenguer, M. A. de Pedro, J. C. Perez-Diaz, and F. Baquero. 1990. Penicillin binding proteins in *Listeria monocytogenes*. Acta Microbiol. Hung. 37:227-231.
- Wagner, M., & McLauchlin, J. 2008. In D. Liu (Ed.), Chapter 1: Biology in handbook of *Listeria monocytogenes* (pp. 3). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Ward TJ. Ducey TF. Usgaard T. Dunn KA. Bielawski JP. 2008. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. Appl Environ Microbiol. 74:7629–7642.
- Watson, G. W., T. J. Fuller, J. Elms, and R. M. Kluge. 1978. *Listeria cerebritis*: Relapse of infection in renal transplant patients. Arch. Intern. Med. 138:83-87.
- Welshimer, H.J. 1963. Vitamin requirements of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 85:1156-1159.
- Welshimer, H.J., 1960. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. J. Bacteriol. 80,316e320.

- Wesley, I.V., 2007. Listeriosis in Animals. In: *Listeria*, Listeriosis and Food Safety, Ryser, E. T. and E. H. Marth (Eds.). 3rd Edn. CRC Press, Boca Raton, FL., USA., pp: 55-84.
- Wiesner, R. J. 1992. Direct quantification of picomolar concentrations of mRNAs by mathematical analysis of a reverse transcription/exponential polymerase chain reaction assay. *Nucleic Acids Res.*, 20, 21, 5863-5864.
- Williams, J.-R., Thayyullathil, C., Freitag, N.-E., 2000. Sequence variations within PrfA DNA binding sites and effects on *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *J. Bacteriol.* 182, 837-841.
- Wong, K.K.-Y., Freitag, N.E.-A., 2004. Novel mutation within the central *Listeria monocytogenes* regulator PrfA that results in constitutive expression of virulence gene products. *J. Bacteriol.* 186, 6265-6276.
- Wong, M. L. and J. Medrano. 2005. RealTime PCR for mRNA quantification. *BioTechniques* 39:75-85.
- Wood, S., Maroushek, N., Czuprynski, C.J. 1993. Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line *Infect. Immun.*, 61, pp. 3068-3072
- Yilmaz, A., Onen, H. I., Alp, E., Menevse, S. 2012. Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. *Polymerase Chain Reaction*, Dr Patricia Hernandez-Rodriguez (Ed.), ISBN: 978-953-51-0612-8, [cit. 2014-07-10].
- Έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο: KAPA SYBR® FAST qPCR master mix (KAPA BIOSYSTEMS).
- Έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο: Nucleospin® RNA, DNA, RNA and protein purification Kit. Macherey-Nagel.
- Έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο: SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA).