



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Listeria monocytogenes* ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ
ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ**



Αγνή Β. Χατζηλούκα

Διδακτορική Διατριβή

Σχολή Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών

Αθήνα, 2017



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

**Μοριακός χαρακτηρισμός στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού
Listeria monocytogenes απομονωθέντων από φυτικά προϊόντα**

Αγνή Β. Χατζηλούκα

Διδακτορική Διατριβή

Ελευθέριος Χ. Δροσινός

Επιβλέπων Καθηγητής

Σχολή Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών

Αθήνα 2017

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, αρ. 202, παρ. 2).

Η πνευματική ιδιοκτησία αποκτάται χωρίς καμία διατύπωση και χωρίς την ανάγκη ρήτρας απαγορευτικής των προσβολών της. Πάντως κατά το ν. 2121/1993, όπως μεταγενέστερα τροποποιήθηκε ιδίως με το αρ. 81, ν. 3057/2002 καθώς και με τα αρ. 1, 2 και 4, ν. 3524/2007 και τη διεθνή σύμβαση της Βέρνης (που έχει κυρωθεί με το ν. 100/1975), απαγορεύεται η αναδημοσίευση και γενικά η αναπαραγωγή του παρόντος έργου, με οποιονδήποτε τρόπο, (ηλεκτρονικό, μηχανικό, φωτοτυπικό, ηχογράφησης ή άλλο) τμηματικά ή περιληπτικά, στο πρωτότυπο ή σε μετάφραση ή άλλη διασκευή, χωρίς γραπτή άδεια του συγγραφέα.

Το μη-αποκλειστικό δικαίωμα αναπαραγωγής, αντιγραφής (για λόγους ασφάλειας και συντήρησης) και διάθεσης της παρούσας διδακτορικής διατριβής υπό ηλεκτρονική μορφή, για εκπαιδευτική, ερευνητική και ιδιωτική χρήση και όχι για χρήση που αποσκοπεί σε εμπορική εκμετάλλευση, παραχωρείται στη Βιβλιοθήκη και Κέντρο Πληροφόρησης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μοριακός χαρακτηρισμός στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* απομονωθέντων από φυτικά προϊόντα.

Αγνή Β. Χατζηλούκα

Επιβλέπων καθηγητής

Ελευθέριος Χ. Δροσινός, Καθηγητής
Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

Τριμελής επιτροπή παρακολούθησης

Ελευθέριος Χ. Δροσινός, Καθηγητής
Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

Γεώργιος-Ιωάννης Ε. Νυχάς, Καθηγητής
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Αναπληρωτής Καθηγητής
Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Ελευθέριος Χ. Δροσινός, Καθηγητής
Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

Γεώργιος-Ιωάννης Ε. Νυχάς, Καθηγητής
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Αναπληρωτής Καθηγητής
Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

Μάριος Α. Ματαράγκας, Επίκουρος Καθηγητής
Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

Ιωάννης Σ. Μποζιάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος
Σχολή Γεωπονικών Επιστημών
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Ελλάδα

Δημήτρης Τσάλτας, Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων
Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος

Κίμων-Αντρέας Καρατζάς, Associate Professor
Department of Food and Nutritional Sciences
University of Reading, United Kingdom

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, έπειτα από χρηματοδότηση του έβδομου προγράμματος-πλαisiού (7^ο ΠΠ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την έρευνα και την τεχνολογική ανάπτυξη, υπό την συμφωνία επιχορήγησης Νο 289719 (Project QUAFETY: www.quafety.eu).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή αυτής της έρευνας, Καθηγητή Ελευθέριο Χ. Δροσινό, για τη εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος της διατριβής και κυρίως για την εξαιρετική συνεργασία και καθοδήγηση που μου παρείχε πάντοτε απλόχερα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Δρ. Σπυρίδωνα Παραμυθιώτη, για την ανεκτίμητη συνεισφορά του στη διεκπεραίωση αυτής της μελέτης, αλλά και για την επιμονή και υπομονή που με μοναδικό τρόπο έδειχνε στις επιστημονικές ή όχι ανησυχίες μου.

Επίσης, επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον Καθηγητή κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παναγιώτη Σκανδάμη, οι οποίοι υπήρξαν μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής κατά τη διάρκεια του διδακτορικού, καθώς και στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Επίκουρο Καθηγητή κ. Μάριο Ματαράγκα, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτρη Τσάλτα και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κίμωνα-Αντρέα Καρατζά, που αφιέρωσαν χρόνο στη αξιολόγηση της συγκεκριμένης διατριβής.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Μάριο Ματαράγκα, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κα Παναγιώτα Τουλούμη και τη Βιοστατιστικό και Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του Εργαστηρίου Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κα Γεωργία Βουρλή, για την πολύτιμη συμβολή τους στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Ακόμη, επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή Γαστρεντερολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Κωνσταντίνο Τριανταφύλλου, και στον Υποψήφιου Διδάκτορα Γαστρεντερολογίας, κ. Παρασκευά Γκολφάκη, των οποίων η συμβολή υπήρξε καθοριστικής σημασίας για τη συλλογή δειγμάτων από ασθενείς του Αττικού Νοσοκομείου Αθηνών. Τέλος, ευχαριστώ θερμά τον Λέκτορα του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Αθανάσιο Μαλλούχο, για τη βοήθειά του στη διεκπεραίωση χημικών αναλύσεων.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης, είχα την τύχη να δουλέψω με τις προπτυχιακές και μεταπτυχιακές φοιτήτριες κα Αναστασία Κατσαρού, κα Κυριακή-Σοφία Μαντζουράνη, κα Βάλια Κούμπου, κα Θεοδώρα Τσέλιγκα, κα Χριστίνα Μολφέτα, κα Όλγα Παναγιωτοπούλου, κα Μελισσάνθη Πολυχρονοπούλου και κα Αποστολία Πατλάκα. Σας ευχαριστώ όλες για τη βοήθεια και την άψογη συνεργασία, οι οποίες υπήρξαν καθοριστικής σημασίας για την εκπλήρωση της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τους φίλους μου, τον Βασίλη και την οικογένειά μου για την αγάπη, τη στήριξη και για ό,τι έχω καταφέρει με την ενθάρρυνσή τους.

Αγνή Χατζηλούκα

Απρίλιος, 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	viii
Ευρετήριο Εικόνων	xii
Ευρετήριο Πινάκων.....	xiv
Ευρετήριο Σχημάτων.....	xviii
Περίληψη.....	1
Abstract	5
1 Κεφάλαιο 1- Εισαγωγή.....	9
1.1 Εισαγωγικές πληροφορίες	10
1.2 Φυλογενετική ταξινόμηση του γένους <i>Listeria</i>	10
1.3 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού.....	12
1.3.1 Μορφολογία.....	12
1.3.2 Απαιτήσεις μικροβιακής ανάπτυξης.....	13
1.3.3 Ανάπτυξη σε θρεπτικά υποστρώματα.....	16
1.3.4 Ορολογική τυποποίηση.....	18
2 Κεφάλαιο 2- Λιστερίωση	21
2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία	22
2.2 Παθογονικότητα	24
2.2.1 Είσοδος και διασπορά του παθογόνου στον ανθρώπινο οργανισμό.....	24
2.2.2 Γονίδια σχετιζόμενα με την παθογονικότητα.....	26
2.3 Χαρακτηριστικά νόσου στον άνθρωπο	32
2.4 Διάγνωση και θεραπεία	34
2.5 Πρόληψη.....	36
2.6 Επιδημικές εξάρσεις λιστερίωσης από φρέσκα φρούτα και λαχανικά.....	39
3 Κεφάλαιο 3- Επιπολασμός και ποσοτική εκτίμηση της <i>Listeria monocytogenes</i> σε φυσικώς μiasμενα δείγματα ρόκας και αγγουριών – Απόδοση των θρεπτικών μέσωσ καλλιέργειας και μελέτη της βιοποικιλότητας των απομονωθέντων στελεχών του παθογόνου 45	
3.1 Εισαγωγή.....	46
3.2 Στόχος.....	49
3.3 Πειραματική διαδικασία.....	50
3.3.1 Συλλογή δειγμάτων.....	50
3.3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις	51
3.3.3 Ταυτοποίηση <i>L. monocytogenes</i>	52
3.3.4 Μελέτη χαρακτηριστικών επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων και υπολογισμός επιπολασμού του μικροοργανισμού <i>L. monocytogenes</i>	64
3.3.5 Μελέτη βιοποικιλότητας.....	74
3.4 Αποτελέσματα	80

3.4.1	Ανάκτηση του μικροοργανισμού <i>L. monocytogenes</i> από δείγματα ρόκας και αγγουριών	80
3.4.2	Υπολογισμός χαρακτηριστικών επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων μέσω αιτιοκρατικής προσέγγισης.....	83
3.4.3	Υπολογισμός χαρακτηριστικών επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων μέσω στοχαστικής προσέγγισης.....	85
3.4.4	Επιπολασμός της <i>L. monocytogenes</i> στα δείγματα ρόκας και αγγουριών – Μπαγεσιανή συμπερασματολογία.....	87
3.4.5	Υπολογισμός συνδυασμένης ευαισθησίας και συνδυασμένης εξειδίκευσης	88
3.4.6	Πληθυσμιακά επίπεδα της <i>L. monocytogenes</i> στα δείγματα ρόκας και αγγουριών – Μπαγεσιανή συμπερασματολογία.....	89
3.4.7	Ορολογική τυποποίηση και μελέτη γενοτυπικής ποικιλομορφίας.....	91
3.5	Συζήτηση.....	93
4	Κεφάλαιο 4- Εκφραση γονιδίων της <i>Listeria monocytogenes</i> που σχετίζονται με την παθογονικότητα κατά τη διάρκεια ανάπτυξής σε υγρό θρεπτικό μέσο και δείγματα ρόκας και πεπονιού στους 4, 10 και 30 °C	97
4.1	Εισαγωγή.....	98
4.2	Στόχος.....	101
4.3	Υλικά και Μέθοδοι.....	101
4.3.1	Παρασκευή ενοφθαλμίσματος και προετοιμασία δειγμάτων.....	101
4.3.2	Μικροβιολογικές αναλύσεις	102
4.3.3	<i>In vitro</i> και <i>in situ</i> γονιδιακή έκφραση	103
4.4	Αποτελέσματα	123
4.4.1	Πληθυσμιακή καταμέτρηση του μικροοργανισμού <i>L. monocytogenes</i>	123
4.4.2	Αποδοτικότητα της μεθόδου και επιλογή καταλληλότερου γονιδίου αναφοράς.....	124
4.4.3	Επίδραση της θερμοκρασίας, του χρόνου και του υποστρώματος στη γονιδιακή έκφραση	126
5	Κεφάλαιο 5- Επίδραση αιθέριου ελαίου λεμονόχορτου (<i>Cymbopogon citratus</i>) στον μικροβιακό πληθυσμό και στη <i>Listeria monocytogenes</i> σε δείγματα ρόκας και πεπονιού αποθηκευμένα κάτω από διαφορετικές συνθήκες συσκευασίας και θερμοκρασίας.	135
5.1	Εισαγωγή.....	136
5.2	Στόχος.....	142
5.3	Υλικά και μέθοδοι.....	143
5.3.1	Παρασκευή ενοφθαλμίσματος και προετοιμασία δειγμάτων.....	143
5.3.2	Μικροβιολογικές αναλύσεις	144
5.3.3	Ποιοτική αξιολόγηση.....	145
5.3.4	Στατιστική ανάλυση.....	146
5.3.5	Ανάλυση αιθέριου ελαίου	146
5.4	Αποτελέσματα	149
5.5	Συζήτηση.....	162

6	Κεφάλαιο 6- Γενετική ανάλυση του συμπλέγματος γονιδίων <i>Listeria Pathogenicity Island 1 (LPI-1)</i> σε στελέχη <i>Listeria monocytogenes</i> που ανήκουν στους ορότυπους 1/2a και 4b.	167
6.1	Εισαγωγή.....	168
6.2	Στόχος.....	169
6.3	Υλικά και Μέθοδοι.....	170
6.3.1	Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες καλλιέργειας	170
6.3.2	Συνθήκες PCR και συναρμολόγηση των αλληλεπικαλυπτόμενων κλώνων.....	170
6.3.3	Περιγραφική ανάλυση	172
6.3.4	Φυλογενετική ανάλυση.....	172
6.3.5	Ανάλυση γενετικής επιλογής.....	173
6.3.6	Ανάλυση ανασυνδυασμού	173
6.4	Αποτελέσματα και Συζήτηση	175
6.4.1	Περιγραφική ανάλυση	175
6.4.2	Φυλογενετική ανάλυση.....	181
6.4.3	Ανάλυση γενετικής επιλογής	183
6.5	Συμπεράσματα.....	184
7	Κεφάλαιο 7- Εκφραση γονιδίων παθογονικότητας της <i>Listeria monocytogenes</i> σε συνθήκες προσομοίωσης εσωτερικού περιβάλλοντος του πεπτικού σωλήνα	185
7.1	Εισαγωγή.....	186
7.2	Στόχος.....	190
7.3	Υλικά και Μέθοδοι.....	190
7.3.1	Παραλαβή δειγμάτων	190
7.3.2	Παρασκευή ενοφθαλμίσματος και προετοιμασία δειγμάτων.....	191
7.3.3	Μικροβιολογικές και μοριακές αναλύσεις	191
7.3.4	Στατιστική επεξεργασία	193
7.4	Αποτελέσματα	194
7.5	Συζήτηση.....	228
8	Συμπεράσματα.....	237
	Παράρτημα.....	241
	Βιβλιογραφία.....	249
	Δημοσιευμένες Εργασίες.....	295

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Φυλογενετική θέση των ειδών του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria</i> βάσει της μεθόδου ανάλυσης αποστάσεων (Neighbor-Joining distance analysis) των αλληλουχιών του γονιδίου 16S-rRNA.....	12
Εικόνα 2. Χρώση κατά Gram του βακτηρίου <i>L. monocytogenes</i>	13
Εικόνα 3. Επιλεκτικά υποστρώματα PALCAM και OXFORD για ανίχνευση και απομόνωση των <i>Listeria</i> spp. και ALOA και Rapid'L. mono για ανίχνευση και απομόνωση της <i>Listeria monocytogenes</i>	17
Εικόνα 4 Είσοδος του βακτηρίου <i>L. monocytogenes</i> μέσω τροφής στον ανθρώπινο οργανισμό και διασπορά του στα διάφορα όργανα.	25
Εικόνα 5 Ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής της <i>L. monocytogenes</i>	26
Εικόνα 6 Φυσική οργάνωση του συμπλέγματος γονιδίων παθογονικότητας LIPI-1 στους μικροοργανισμούς <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. ivanovii</i> και <i>L. seeligeri</i>	29
Εικόνα 7 Μεταγραφική οργάνωση της νησίδας LIPI-1 στον <i>L. monocytogenes</i>	30
Εικόνα 8 Εξαρτώμενη από το PrfA ρύθμιση μεταγραφής των γονιδίων <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>inlC</i> και <i>hpt</i>	30
Εικόνα 9 Ζύμωση σακχάρων.	54
Εικόνα 10 Δοκιμή κινητικότητας.	55
Εικόνα 11 Δοκιμή αιμόλυσης.....	57
Εικόνα 12 Στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	62
Εικόνα 13 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.....	108
Εικόνα 14 Καμπύλη αναφοράς (standard curve).....	109
Εικόνα 15 Καμπύλες ενίσχυσης γονιδίων στόχων και γονιδίων αναφοράς	110
Εικόνα 16 Ιχνηλάτες ειδικών συστημάτων ανίχνευσης.....	112
Εικόνα 17 Μη ειδικό σύστημα ανίχνευσης, μέσω χρήσης της φθορίζουσας χρωστικής SYBR green I.....	113
Εικόνα 18 Καμπύλες αποδιάταξης στις οποίες φαίνεται: α) ύπαρξη μη επιθυμητών προϊόντων (πολλαπλές κορυφές Α και Β) και β) ενίσχυση μόνο του επιθυμητού προϊόντος (μοναδική κορυφή Γ).	114
Εικόνα 19 Πρότυπη καμπύλη πέντε διαφορετικών γονιδίων.	116
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.	119
Εικόνα 21 Μέθοδος εφαρμογής αιθέριου ελαίου από λεμονόχορτο σε συσκευασμένη ρόκα.	144
Εικόνα 22 Κλίμακα ποιοτικής αξιολόγησης και εμπορευσιμότητας ρόκας και πεπονιού. ..	146
Εικόνα 23 Φυλογενετική θέση των υπό μελέτη στελεχών βάσει της περιοχής του γονιδιακού συμπλέγματος και το μοντέλο αντικατάστασης, το οποίο σημειώνεται στην πάνω-δεξιά γωνία του κάθε δενδρογράμματος (HKY: Hasegawa-Kishino-Yano T3P: Tamura 3 parameter)..	182

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Πίνακας των τριών εξελικτικών καταγωγών (lineages) και οροτύπων (serovars) του μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> βάσει του συνδυασμού των σωματικών αντιγόνων (O antigen) και των αντιγόνων μαστιγίου (H antigens) (Gorski, 2008· Hyden και συν., 2016).	19
Πίνακας 2 Βιοχημικός διαχωρισμός των ειδών του γένους <i>Listeria</i> spp. (ISO, 2014).	54
Πίνακας 3 Βιοχημικός διαχωρισμός των πιο γνωστών ειδών <i>Listeria</i> spp, ως προς την ικανότητα αιμόλυσης προσαρμογή από Prentice και Neaves, 1992).	56
Πίνακας 4 Αλληλουχίες των μορίων εκκινητών και μέγεθος της περιοχής-στόχου του γονιδιώματος που επιλεχθήκαν για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> (D' Agostino και συν., 2004).	61
Πίνακας 5 Μπαγερσιανή ανάλυση παραμέτρων της κατανομής Dirichlet με χρήση ομοιόμορφης προγενέστερης κατανομής, για τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μικροβιολογικές αναλύσεις στα δείγματα ρόκας.	70
Πίνακας 6 Μπαγερσιανή ανάλυση παραμέτρων της κατανομής Dirichlet με χρήση ομοιόμορφης προγενέστερης κατανομής, για τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μικροβιολογικές αναλύσεις στα δείγματα αγγουριών.	71
Πίνακας 7 Αλληλουχίες μορίων εκκινητών για τη μελέτη της ορολογικής τυποποίησης και περαιτέρω βιοποικιλότητας στελεχών της <i>L. monocytogenes</i> σε δείγματα ρόκας και αγγουριών.	79
Πίνακας 8 Αποτελέσματα βιοχημικών και μοριακών μεθόδων στα ύποπτα στελέχη της <i>Listeria monocytogenes</i> που απομονώθηκαν από δείγματα ρόκας.	80
Πίνακας 9 Αποτελέσματα βιοχημικών και μοριακών μεθόδων στα ύποπτα στελέχη της <i>Listeria monocytogenes</i> που απομονώθηκαν από δείγματα αγγουριών.	82
Πίνακας 10 Κατηγοριοποίηση των δειγμάτων της ρόκας και των αγγουριών έπειτα από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων των μικροβιολογικών, βιοχημικών και μοριακών δοκιμών.	84
Πίνακας 11 Χαρακτηριστικά επίδοσης των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανίχνευση της <i>Listeria monocytogenes</i> στα δείγματα ρόκας και αγγουριών ακολουθώντας αιτιοκρατική προσέγγιση.	84
Πίνακας 12 Χαρακτηριστικά επίδοσης των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανίχνευση της <i>L. monocytogenes</i> στα δείγματα ρόκας και αγγουριών ακολουθώντας στοχαστική προσέγγιση.	87
Πίνακας 13 Εκτιμώμενος επιπολασμός της <i>L. monocytogenes</i> στα δείγματα ρόκας και αγγουριών, χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν από κάθε υπόστρωμα ξεχωριστά (M1) ή σε συνδυασμό (M2).	90
Πίνακας 14 Εκτιμώμενος πληθυσμός της <i>L. monocytogenes</i> στα δείγματα ρόκας και αγγουριών με χρήση των δεδομένων που λήφθηκαν από κάθε θρεπτικό υπόστρωμα ξεχωριστά ή σε συνδυασμό.	91
Πίνακας 15 Διακριτική ικανότητα των μεθόδων τυποποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμό των απομονωθέντων στελεχών της <i>L. monocytogenes</i> , μεμονωμένων και σε συνδυασμό.	92
Πίνακας 16 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.	105

Πίνακας 17 Δυναμική του πληθυσμού του μικροοργανισμού <i>L. monocytogenes</i> (log CFU mL ⁻¹ ή g ⁻¹) σε ζυμό BHI, ρόκα και πεπόνι κατά την επώασή του στους 4, 10 και 30 °C.....	124
Πίνακας 18 Αποδοτικότητα της μεθόδου για τα γονίδια-στόχους και τα γονίδια-αναφοράς.....	125
Πίνακας 19 Όριο εμπορευσιμότητας (ημέρες) και δυναμική του μικροβιακού πληθυσμού (log CFU g ⁻¹) κατά τη διάρκεια συντήρησης συσκευασμένης ρόκας στους 0, 5, 10 και 15 °C υπό συνθήκες αέρα και MAMA, με ή χωρίς προσθήκη αιθέριου ελαίου από λεμονόχορτο και με ή χωρίς ενοφθαλμισμό με <i>L. monocytogenes</i>	153
Πίνακας 20 Όριο εμπορευσιμότητας (ημέρες) και δυναμική του μικροβιακού πληθυσμού (log CFU g ⁻¹) κατά τη διάρκεια συντήρησης συσκευασμένου πεπονιού στους 0, 5, 10 και 15 °C υπό συνθήκες αέρα και MAMA, με ή χωρίς προσθήκη αιθέριου ελαίου από λεμονόχορτο και με ή χωρίς ενοφθαλμισμό με <i>L. monocytogenes</i>	157
Πίνακας 21 Χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου του λεμονόχορτου.....	161
Πίνακας 22 Αλληλουχίες των μορίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων του συμπλέγματος <i>Listeria Pathogenicity Island 1</i>	171
Πίνακας 23 Περιγραφική ανάλυση του συμπλέγματος γονιδίων LIPI-1 των υπό μελέτη στελεχών.....	178
Πίνακας 24 Αποκλίσεις από την κοινή παλινδρομική αλληλουχία του PrfA-box.....	181
Πίνακας 25 Αλληλουχίες των μορίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό του γονιδίου <i>prfA</i> και μέγεθος του αμπλικονίου που σχηματίζει το ζεύγος των εκκινητών. 193	
Πίνακας 26 Βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών όπως καταγράφηκαν από την ενδοσκόπηση.	195
Πίνακας 27 Τιμές pH σύμφωνα με τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών.	196
Πίνακας 28 Αξιολόγηση της συσχέτισης του γαστρικού pH με την ηλικία, τον Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) και το δωδεκαδακτυλικό pH, μέσω του συντελεστή συσχέτισης Spearman.	196
Πίνακας 29 Αξιολόγηση της συσχέτισης του δωδεκαδακτυλικού pH με την ηλικία και τον Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ), μέσω του συντελεστή συσχέτισης Spearman.....	197
Πίνακας 30 Έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων ανά στάδιο δειγματοληψίας, για το σύνολο των ασθενών.....	209
Πίνακας 31 Συντελεστές συσχέτισης (rho) και τιμές σημαντικότητας (p values), για την αξιολόγηση της συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης σε όλα τα στάδια δειγματοληψίας. .	212
Πίνακας 32 Συντελεστές συσχέτισης (rho) και τιμές σημαντικότητας (p values), για την αξιολόγηση της συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης κατά το 1 ^ο Στάδιο δειγματοληψίας. 214	
Πίνακας 33 Συντελεστές συσχέτισης (rho) και τιμές σημαντικότητας (p values), για την αξιολόγηση της συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης κατά το 2 ^ο Στάδιο δειγματοληψίας. 216	
Πίνακας 34 Συντελεστές συσχέτισης (rho) και τιμές σημαντικότητας (p values), για την αξιολόγηση της συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης κατά το 3 ^ο Στάδιο δειγματοληψίας. 218	
Πίνακας 35 Συντελεστές συσχέτισης (rho) και τιμές σημαντικότητας (p values), για την αξιολόγηση της συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης κατά το 4 ^ο Στάδιο δειγματοληψίας. 220	
Πίνακας 36 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου <i>plcA</i> μέσω μονοπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.....	223
Πίνακας 37 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου <i>plcB</i> μέσω μονοπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.....	223

- Σχήμα 1** Χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας (ROC) για τα υλικά ALOA (συνεχής γραμμή) και RAPID[®]L.moно (διακεκομμένη γραμμή), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* σε δείγματα α) ρόκας και β) αγγουριών. Η καμπύλη ισοδυναμίας που υποδεικνύει μηδενική διακριτική ικανότητα συμβολίζεται με τη στικτή γραμμή. 85
- Σχήμα 2** Σύνθετο δενδρόγραμμα ανάλυσης των στελεχών της *L. monocytogenes* από τις μεθόδους τυποποίησης RAPD-PCR και rep-PCR. Η απόσταση υποδεικνύεται από τον συντελεστή μέσης συσχέτισης (r%), ενώ η ομαδοποίηση έγινε με ανάλυση UPGMA. Η προέλευση του στελέχους κωδικοποιήθηκε ως εξής: r: ρόκα, C: αγγούρι, 1-100: αριθμός του δείγματος, i-v: αριθμός απομόνωσης. 92
- Σχήμα 3** Δυναμική του πληθυσμού της *L. monocytogenes* (\log CFU mL⁻¹ ή g⁻¹) σε ζωμό BHI, ρόκα και πεπόνι κατά την επώασή του στους 4, 10 και 30 °C, έπειτα από δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό (0 h) και 0.5 h, 6 h και 24 h μετά από αυτόν..... 124
- Σχήμα 4** Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη σχετική έκφραση των γονιδίων *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *lmo2470*, *lmo2672*, *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inlJ* κατά την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* LQC 15257 σε ζωμό BHI, ρόκα και πεπόνι στους 4, 10 και 30 °C. Οι λευκές ράβδοι αναφέρονται στην ώρα 0, οι ράβδοι χρώματος ανοιχτού γκρι στη δειγματοληψία της 0.5 h, οι ράβδοι χρώματος σκούρου γκρι στη δειγματοληψία των 6h και οι μαύρες ράβδοι στη δειγματοληψία των 24 h. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής. Ο αστερίσκος σημαίνει ότι η έκφραση είναι σημαντικά (P <0.01) διαφορετική από την αντίστοιχη του χρόνου 0 (0h)..... 132
- Σχήμα 5** Επίδραση του τύπου του υποστρώματος ανάπτυξης στη σχετική έκφραση των γονιδίων *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *lmo2470*, *lmo2672*, *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inlJ* κατά την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* LQC 15257 σε ζωμό BHI, ρόκα και πεπόνι στους 4, 10 και 30 °C. Οι λευκές ράβδοι αναφέρονται στην ώρα 0, οι ράβδοι χρώματος ανοιχτού γκρι στη δειγματοληψία της 0.5 h, οι ράβδοι χρώματος σκούρου γκρι στη δειγματοληψία των 6h και οι μαύρες ράβδοι στη δειγματοληψία των 24 h. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής. Ο αστερίσκος σημαίνει ότι η έκφραση είναι σημαντικά (P <0.01) διαφορετική από την αντίστοιχη του χρόνου 0 (0h). 133
- Σχήμα 6** Πληθυσμιακή εξέλιξη της *L. monocytogenes* στα τέσσερα στάδια της πειραματικής μελέτης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών μεθόδων. 198
- Σχήμα 7** Πληθυσμιακή εξέλιξη της *L. monocytogenes* στα τέσσερα στάδια της πειραματικής μελέτης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μοριακών μεθόδων. 198
- Σχήμα 8** Έκφραση του γονιδίου *sigB* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές log₂..... 200
- Σχήμα 9** Έκφραση του γονιδίου *inlA* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές log₂..... 201
- Σχήμα 10** Έκφραση του γονιδίου *inlB* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές log₂..... 201

- Σχήμα 11** Έκφραση του γονιδίου *prfA* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 202
- Σχήμα 12** Έκφραση του γονιδίου *plcA* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 203
- Σχήμα 13** Έκφραση του γονιδίου *plcB* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 203
- Σχήμα 14** Έκφραση του γονιδίου *inlJ* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 204
- Σχήμα 15** Έκφραση του γονιδίου *lmo2470* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 205
- Σχήμα 16** Έκφραση του γονιδίου *lmo2672* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 205
- Σχήμα 17** Έκφραση του γονιδίου *inlC* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 206
- Σχήμα 18** Έκφραση του γονιδίου *hly* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 207
- Σχήμα 19** Έκφραση των γονιδίων στο σύνολο των ασθενών κατά τη διάρκεια των τεσσάρων σταδίων δειγματοληψίας. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη διάμεση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου για το σύνολο των ασθενών και δίνεται σε τιμές \log_2 . Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. 208
- Σχήμα 20** Γονιδιακή έκφραση στα διαφορετικά στάδια δειγματοληψίας, για τα δείγματα στα οποία παρατηρήθηκε υπερέκφραση των υπό μελέτη γονιδίων. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη διάμεση τιμή της υπερέκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 . Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στο πρώτο (25%) και τρίτο (75%) τεταρτημόριο. 208
- Σχήμα 21** Γονιδιακή έκφραση στα διαφορετικά στάδια δειγματοληψίας, για τα δείγματα στα οποία παρατηρήθηκε υποέκφραση των υπό μελέτη γονιδίων. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη διάμεση τιμή της υποέκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 . Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στο πρώτο (25%) και τρίτο (75%) τεταρτημόριο. 209
- Σχήμα 22** Διάγραμμα διασποράς συσχέτισης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων σε όλα τα στάδια δειγματοληψίας. 213

Σχήμα 23 Διάγραμμα διασποράς συσχέτισης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κατά το 1 ^ο Στάδιο δειγματοληψίας.	215
Σχήμα 24 Διάγραμμα διασποράς συσχέτισης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κατά το 2 ^ο Στάδιο δειγματοληψίας.	217
Σχήμα 25 Διάγραμμα διασποράς συσχέτισης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κατά το 3 ^ο Στάδιο δειγματοληψίας.	219
Σχήμα 26 Διάγραμμα διασποράς συσχέτισης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κατά το 4 ^ο Στάδιο δειγματοληψίας.	221

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* έχει αναδειχθεί ως ένα από τα σημαντικότερα τροφιμογενή παθογόνα παγκοσμίως. Αποτελεί αιτία της τροφιμογενούς λοίμωξης «λίστερίας» και παρόλο που η ασθένεια έχει χαμηλή συχνότητα εμφάνισης, χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά νοσηλείας και θνητότητας (20-30%). Ο σαπροφυτικός αυτός μικροοργανισμός είναι ευρέως διαδεδομένος στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να καθίσταται ικανός να επιμολύνει μία μεγάλη ποικιλία τροφίμων σε διάφορα στάδια της παραγωγικής τους διαδικασίας. Επιπλέον, παρουσιάζει μία αξιοσημείωτη ικανότητα να αντέχει σε μία ευρεία ποικιλία αντίξωων συνθηκών, γεγονός που του επιτρέπει να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται τόσο σε υποστρώματα που θεωρούνται κατάλληλα για την ανθρώπινη διατροφή, όσο και στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα. Ως εκ τούτου, ο συγκεκριμένος παθογόνος μικροοργανισμός βρίσκεται στο επίκεντρο εντατικής μελέτης.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε απομόνωση της *Listeria monocytogenes* από φυτικά προϊόντα, με στόχο (i) τη μελέτη της συμπεριφοράς του παθογόνου μικροοργανισμού έπειτα από έκθεσή του σε διάφορες συνθήκες και υποστρώματα αύξησης, καθώς και (ii) τον μοριακό χαρακτηρισμό των απομονωθέντων στελεχών.

Στο κεφάλαιο 3 πραγματοποιήθηκε μελέτη του επιπολασμού και ποσοτική εκτίμηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε δείγματα ρόκας και αγγουριών, καθώς και προσδιορισμός των χαρακτηριστικών επίδοσης των χρωμογόνων θρεπτικών υποστρωμάτων ALOA και Rapid'L.mono, που χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση του παθογόνου. Για τη διεκπεραίωση των παραπάνω χρησιμοποιήθηκε αιτιοκρατική και στοχαστική προσέγγιση, καθώς και χρήση παράλληλου ελέγχου και Μπαγεσιανής ανάλυσης. Τέλος, μελετήθηκε η βιοποικιλότητα των στελεχών του παθογόνου μέσω τεχνικών PCR. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μελέτη κατέδειξαν την ατελή φύση των υποστρωμάτων ανίχνευσης ALOA και RAPID'L.mono, καθώς και τη διαφοροποίηση των χαρακτηριστικών επίδοσης των υποστρωμάτων ανάλογα με το υπό μελέτη προϊόν και ανάλογα με το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του τροφιμογενούς παθογόνου στο προϊόν αυτό. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η ανάγκη παράλληλου ελέγχου πολλαπλών δοκιμών με χρήση τουλάχιστον δύο θρεπτικών υποστρωμάτων για την ορθή εκτίμηση της παρουσίας ενός μικροοργανισμού. Τέλος, όσον αφορά στη μελέτη βιοποικιλότητας, κρίθηκε απαραίτητη η χρήση τουλάχιστον τριών μορίων εκκινητών σε περίπτωση εφαρμογής RAPD-PCR ή ο συνδυασμός *ger*-PCR και RAPD-PCR, για τη μέγιστη διαφοροποίηση των στελεχών.

Στο κεφάλαιο 4 αξιολογήθηκε η έκφραση δέκα γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του

παθογόνου σε υγρό θρεπτικό μέσο, ρόκα και πεπόνι τα οποία διατηρήθηκαν στους 4, 10 και 30 °C. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε ρύθμιση της έκφρασης όλων των υπό μελέτη γονιδίων και ότι η ρύθμιση αυτή ήταν εξαρτώμενη σε όλες τις περιπτώσεις από τον τύπο του υποστρώματος ανάπτυξης. Παρ' όλ' αυτά, δεν προσδιορίστηκε καμία συγκεκριμένη τάση σχετικά με την επίδραση του χρόνου επώασης, της θερμοκρασίας επώασης και του τύπου υποστρώματος ανάπτυξης στη γονιδιακή έκφραση. Ενδιαφέρον ωστόσο προκάλεσε το γεγονός ότι η μελέτη κατέδειξε ότι ο συνολικός χρόνος προετοιμασίας μέχρι τη σταθεροποίηση του RNA από το RNA later, αποτελεί χρονικό διάστημα το οποίο φαίνεται να είναι αρκετό για τη μεταγραφή των γονιδίων που μελετήθηκαν.

Στο κεφάλαιο 5 εξετάστηκε η επίδραση των ατμών αιθέριου ελαίου από λεμονόχορτο στην ανάπτυξη της επιφανειακής μικροχλωρίδας και της *L. monocytogenes*, σε δείγματα ρόκας και πεπονιού, έπειτα από συσκευασία σε συνθήκες αέρα και σε μικροδιάτρητη δραστική τροποποιημένη ατμόσφαιρα και συντήρηση σε θερμοκρασία 0, 5, 10 και 15 °C. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι δύο συνθήκες συσκευασίας παρουσίασαν συγκρίσιμη διάρκεια εμπορίας των προϊόντων σε όλες τις υπό μελέτη θερμοκρασίες. Ωστόσο, η αρχική μεταβολή στην ατμόσφαιρα επηρέασε σημαντικά την κυρίαρχη μικροχλωρίδα επιφάνειας, καθώς και την επίδραση του αιθέριου ελαίου του λεμονόχορτου στους υπό μελέτη μικροοργανισμούς. Επιπλέον, η αντιμικροβιακή δράση του ελαίου φάνηκε να επηρεάζεται από τις συνολικές συνθήκες συντήρησης, καθώς και από το υπόστρωμα ανάπτυξης.

Στο κεφάλαιο 6 πραγματοποιήθηκε περιγραφική και φυλογενετική ανάλυση, καθώς και ανάλυση ανασυνδυασμού και γενετικής επιλογής του συμπλέγματος γονιδίων *Listeria Pathogenicity Island 1 (LPI-1)*, σε στελέχη της *L. monocytogenes* τα οποία είχαν διαφορετική προέλευση και ανήκαν στους ορότυπους 1/2a και 4b. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν σημαντική ποικιλομορφία σε όλο το γονιδιακό σύμπλεγμα, ενώ διαφορές παρατηρήθηκαν σε όλα τα γονίδια και τις διαγονιδιακές περιοχές μεταξύ των 1/2a και 4b στελεχών. Επιπλέον, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των ορότυπων, αλλά και διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών 4b ανάλογα με την πηγή απομόνωσης. Τέλος, η ανάλυση γενετικής επιλογής έναντι της ανάλυσης ανασυνδυασμού φάνηκε να κατέχει σημαντικό ρόλο στη μελέτη της εξέλιξης αυτού του γονιδιωματικού συμπλέγματος, αλλά μόνο στην περίπτωση του γονιδίου *prfA* των απομονώσεων 1/2a και του γονιδίου *actA* των απομονώσεων 4b από κρέας, για τα οποία υποδείχθηκε αμιγής επιλογή ή επέκταση του πληθυσμού.

Στο κεφάλαιο 7 πραγματοποιήθηκε μελέτη της πληθυσμιακής μεταβολής καθώς και έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, έπειτα από *in vitro* έκθεσή του σε ανθρώπινο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι ο παθογόνος κατάφερε να επιβιώσει, παρόλο που σημειώθηκε μείωση του αρχικού του πληθυσμού. Η μείωση αυτή παρατηρήθηκε κατά κύριο λόγο έπειτα από την έκθεση του παθογόνου στο γαστρικό υγρό, ενώ αντιθέτως η έκθεσή

του στο δωδεκαδακτυλικό υγρό δεν φάνηκε να έχει αντίκτυπο στα πληθυσμιακά του επίπεδα. Επιπλέον, η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης κατέδειξε μικτή απόκριση των εξεταζόμενων γονιδίων, με μεγαλύτερη τάση υπερέκφρασης απ' ότι υποέκφρασης. Παράλληλα, τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των ιντερναλινών, καθώς και μεταξύ αυτών και του γονιδίου *plcB*, ενώ σημαντική φάνηκε η συσχέτιση μεταξύ της άυξης των τιμών του pH και της πιθανότητας υπερέκφρασης των γονιδίων *hly* και *plcA*. Τέλος, η υπερέκφραση των υπό μελέτη γονιδίων δεν φάνηκε να σχετίζεται με παράγοντες που δυνητικά επηρεάζουν το γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό περιβάλλον, όπως η λήψη αναστολέων αντλίας πρωτονίων και η γαστρική ατροφία.

Συνολικά, στη συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε απομόνωση της *L. monocytogenes* από φρέσκα προϊόντα και εκτίμηση των πληθυσμιακών μεταβολών και της γονιδιακής απόκρισής της, έπειτα από έκθεση του μικροοργανισμού σε διάφορες συνθήκες ανάπτυξης. Στόχο αποτέλεσε η μελέτη της συμπεριφοράς του παθογόνου μικροοργανισμού από τη στιγμή της απομόνωσής του από τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα έως και την παραμονή του σε γαστρικά και δωδεκαδακτυλικά υγρά ανθρώπων. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση των γονιδίων, ακόμα και στις ίδιες μελέτες, κατέδειξαν την ύπαρξη σημαντικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών και του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται. Επιπλέον, φάνηκε η ύπαρξη επιπρόσθετων ρυθμιστικών μηχανισμών, οι οποίοι μελλοντικά θα μπορούσαν ενδεχομένως σε συνδυασμό με αυτούς που μελετήθηκαν να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση του τρόπου συμπεριφοράς του μικροοργανισμού στα διάφορα περιβάλλοντα.

Επιστημονική περιοχή εργασίας: Μικροβιολογία και Ασφάλεια Τροφίμων

Λέξεις ευρετηρίασης: *Listeria monocytogenes*, ασφάλεια λαχανικών, γονιδιακή έκφραση, γαστρικά και δωδεκαδακτυλικά υγρά.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes has emerged as one of the major foodborne pathogens worldwide. It is the causative agent of the foodborne disease “listeriosis” and although it has an overall low incidence, it is characterized by high hospitalization and fatality rates (20-30%). This saprophytic microorganism has a ubiquitous distribution in the environment and therefore it is able to contaminate a wide variety of foodstuff in different stages of food processing. In addition, *Listeria monocytogenes* has the remarkable ability to withstand a wide variety of stresses. This ability enables it to survive and proliferate both on substrates that are considered for human nutrition as well as in the human gastrointestinal tract. Hence, this pathogenic microorganism has been in the epicenter of intensive study.

In the present thesis isolation of *Listeria monocytogenes* from plant products was conducted, in order to (i) study the pathogen behavior after its exposure to various conditions and growth substrates, and (ii) to assess the molecular characterization of the pathogenic isolates.

In chapter 3, the prevalence and levels of *Listeria monocytogenes* in rocket and cucumber samples was determined. In addition, the performance indices of the chromogenic media used for the recovery of the pathogen, ALOA and Rapid' L.mono were evaluated . Calculation of the above parameters was assessed through deterministic and stochastic approaches, parallel testing and Bayesian inference. Finally, biodiversity of *L. monocytogenes* isolates was assessed through PCR. The results obtained in this study revealed the imperfect nature of the substrates ALOA and RAPID'L.mono, as well as the diversification of the substrates' performance indices, depending on the food matrix and the substrate used to detect the foodborne pathogen in question. Moreover, the necessity of using parallel testing with at least two substrates was confirmed. Finally, regarding the biodiversity assay, results showed that at least three primers should be used when RAPD-PCR is being performed and that rep-PCR should be combined with RAPD-PCR for the optimum discrimination of the isolates.

In chapter 4, the expression of key virulence genes during growth of *L. monocytogenes* in liquid medium and on rocket and melon surface stored at 4, 10 and 30 °C was assessed. The results of this study showed that increase of the incubation temperature resulted in the regulation of the expression of all genes under study and that this regulation was in all cases dependent upon the type of substrate. Nevertheless, no particular trend could be identified regarding the effect of incubation temperature, time or type of substrate on gene expression. It is however noteworthy that the study indicated that total preparation time until stabilization of RNA seemed to be enough for the transcription of the genes under study.

In chapter 5, the effect of lemongrass oil vapors on surface microbiota and *L. monocytogenes* growth on rocket salad and melon, packaged in air and microperforated active

modified atmosphere (MAMA) conditions and stored at 0, 5, 10, and 15 °C was examined. The results indicated that both packaging conditions resulted in comparable shelf life of the products at all temperatures assessed. However, the initial displacement in the atmosphere affected significantly the dominating surface microbiota as well as the effect of the lemongrass essential oil on the microorganisms under study. In addition, the antimicrobial activity of the essential oil seemed to be affected by the storage conditions and the food matrix.

In chapter 6 descriptive, phylogenetic, recombination and selection analyses on alignments of the Listeria Pathogenicity Island 1 (LIPI-1) of 1/2a and 4b *L. monocytogenes* isolates of different origin were applied. The results indicated a significant diversity throughout the whole genomic island, while differences between 1/2a and 4b strains were observed in all genes and intergenic regions. In addition, discrimination between serotypes was observed and, furthermore, 4b isolates were also differentiated according to their source of isolation as well. Finally, selection, rather than recombination, seemed to play a role in the evolution of this genomic island but only in the case of *prfA* gene of 1/2a isolates and *actA* gene of 4b meat isolates for which purifying selection or population expansion was indicated.

In chapter 7 examination of *L. monocytogenes* population changes and assessment of the expression of its virulence-associated genes, after *in vitro* exposure to human gastric and duodenal aspirate took place. Results indicated that pathogen survived in these conditions, although the initial population was decreased. This decrease was mainly observed after pathogen's exposure to gastric aspirate, whereas exposure to duodenal aspirate seemed to have no impact on its population levels. Moreover, gene expression assay indicated mixed response of the examined genes, with a greater tendency towards overexpression rather than underexpression. Furthermore, results showed significant correlation between internalins and between internalins and *plcB* regulation, while significant correlation was indicated between the increase of pH levels and the odds of *hly* and *plcA* overexpression. Finally, genes' overexpression did not seem to be correlated with factors that potentially affect the gastric and duodenal environment, such as PPIs intake and gastric atrophy.

In this research isolation of *Listeria monocytogenes* from fresh produce was performed and population changes and key virulence associated genes expression were assessed after pathogen's exposure to various conditions. Aim of the study was to determine pathogen's behavior from fresh produce isolation to residence time in human gastric and duodenal aspirates. The results indicated significant interaction between microorganisms' response and growth conditions. Moreover, results indicated significant differences in gene expression, suggesting additional regulatory mechanisms which in combination with the studied mechanisms could possibly provide important information for pathogen's behavior in different environments.

Scientific field: Food Microbiology and Safety

Keywords: *Listeria monocytogenes*, fresh produce safety, gene expression, human gastric and duodenal aspirates, pathogenicity genes.

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγικές πληροφορίες

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* (Λιστέρια μονοκυτταρογόνος), αιτία για την ανθρώπινη και ζωική λιστερίωση, είναι ένας από τους πιο μελετημένους μικροοργανισμούς των τελευταίων 30 ετών. Αν και είχε γίνει αναφορά στον μικροοργανισμό από το 1891, περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τους Murray και συν., 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 Κέιμπριτζ, κρούσματα που αυξήθηκαν κατά πολύ τους επόμενους 15 μήνες. Τα συμπτώματα που παρουσίαζε η νόσος σε συνδυασμό με την αυξημένη θνητότητα 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 και συν., 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* 1, προς τιμήν του Άγγλου χειρουργού λόρδου Joseph Lister (1827-1912) (Pirie, 1927).

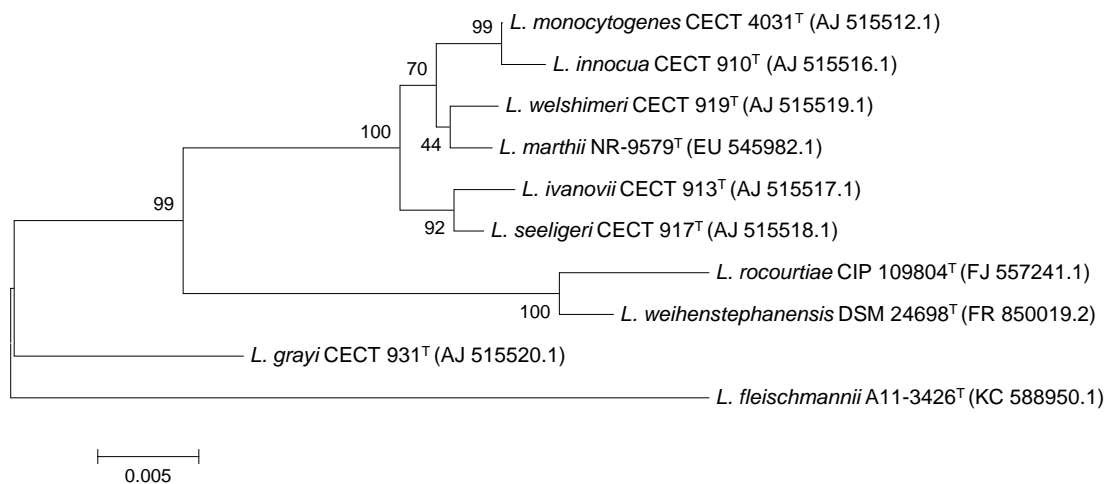
Οι ερευνητές Murray και Pirie έστειλαν τα στελέχη που απομόνωσαν στην Εθνική Συλλογή Καλλιιεργειών (National Collection of Type Cultures, NCTC) του Ινστιτούτου Lister στο Λονδίνο. Εκεί παρατηρήθηκε η ομοιότητα των δύο μικροοργανισμών και κατέστη σαφές ότι τα στελέχη ανήκαν στο ίδιο είδος βακτηρίου. Αποτέλεσμα 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 και Buchrieser, 2007). Τελικά, το 1940 η ονομασία του γένους *Listerella* άλλαξε για λόγους ταξινόμησης και ο μικροοργανισμός έλαβε το όνομα *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940).

1.2 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 και 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 και Jones, 1988· Hartford και Sneath, 1993· Glaser και συν., 2001· Rocourt και 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 και συν., 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 και 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 και συν., 2010· Lang Halter και συν., 2013· Graves και συν., 2010· den Bakker και συν., 2013). Παλαιότερα υφίστατο ξεχωριστά ως είδος και το *L. murrayi* το οποίο όμως πλέον έχει ενσωματωθεί στο *L. grayi* (Rocourt και συν., 1992). 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 και συν., 2014).



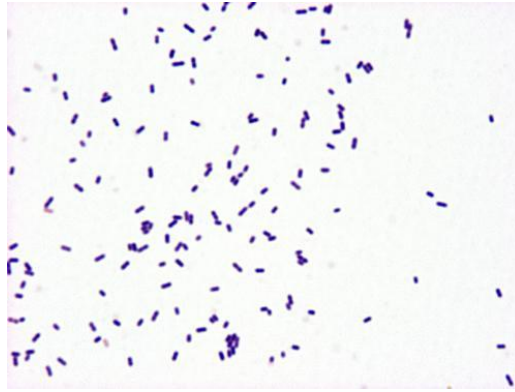
Εικόνα 1. Φυλογενετική θέση των ειδών της *Listeria* βάσει της μεθόδου ανάλυσης αποστάσεων (Neighbor-Joining distance analysis) των αλληλουχιών του γονιδίου *16S-rRNA*.

Οι τιμές Bootstrap στον κόμβο υπολογίστηκαν από 1000 δειγματοληψίες. Οι αριθμοί πρόσβασης GenBank / EMBL / DDBJ δίνονται στην παρένθεση (Paramithiotis και συν., 2014).

1.3 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού

1.3.1 Μορφολογία

Όλα τα είδη του γένους *Listeria* σχηματίζουν συμμετρικές, βραχείες ράβδους διαστάσεων από 0.4-0.5 έως 1-2 μm , 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). Σε παλαιότερες, τραχείες καλλιέργειες και έπειτα από οσμωτικό σοκ είναι δυνατό να αναπτυχθούν μακριά, λεπτά και νηματοειδή κύτταρα μήκους 6 μm (Gutekunst και συν., 1992; Jorgensen και συν., 1995). Τα βακτήρια του γένους είναι θετικά κατά Gram αλλά μερικά κύτταρα, κυρίως των παλαιότερων καλλιεργειών, χάνουν την ικανότητά τους να διατηρήσουν τη χρώση Gram και περιστασιακά μπορεί να θεωρηθούν λανθασμένα ως *Hemophilus* (Rocourt και Buchrieser, 2007; Wagner και 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 και Bockemühl, 1968). Εμφανίζει κινητικότητα χάρη στα περίτριχα μαστίγια όταν καλλιεργείται μεταξύ των θερμοκρασιών 20 και 25°C, ενώ στους 37°C παρουσιάζει μειωμένη ή και καθόλου κινητικότητα (Galsworthy και συν., 1990).

1.3.2 Απαιτήσεις μικροβιακής ανάπτυξης

1.3.2.1 Οξυγόνο (O₂)

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

1.3.2.2 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 και Jonesy, 1986· Junttila και συν., 1988). Είναι επομένως ένα ψυχρόφιλο βακτήριο καθώς αναπτύσσεται και στις χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης. Η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται σε αυτές τις θερμοκρασίες χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Gray και συν. (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 h και 100-186 h στους 3 και 0 °C, αντίστοιχα (Swaminathan, 2001).

1.3.2.3 pH

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

1.3.2.4 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 και Zrttola, 1989· Farber και Addison, 1994). Γενικά, η ανάπτυξη του 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 και συν., 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 και Jonesy, 1986). Τέλος, η επιβίωσή του σε χαμηλές τιμές pH και υψηλές συγκεντρώσεις άλατος εξαρτάται σημαντικά από την θερμοκρασία (Cole και συν., 1990).

1.3.2.5 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 και 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 και συν., 1991).

Το βακτήριο αναπτύσσεται παρουσία γλυκόζης και υπό αερόβιες συνθήκες σχηματίζει γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και ακετοΐνη ως κύρια τελικά προϊόντα (Pine και συν., 1989· Romick και συν., 1996). Υπό 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 και συν., 1989). Τέλος, ο καταβολισμός της γλυκόζης πραγματοποιείται μέσω του βιοχημικού μονοπατιού των Embden-Meyerhof, τόσο αερόβια όσο και αναερόβια (Seeliger και Jonesy, 1986), ενώ ο καταβολισμός άλλων σακχάρων οδηγεί σε παραγωγή οξέων αλλά όχι αερίων (Wagner και McLauchlin, 2008).

1.3.2.6 Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Τα κύτταρα της μεμβράνης των μικροοργανισμών του γένους *Listeria* αποτελούνται κυρίως από πεπτιδογλυκάνη (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). 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 και McLauchlin, 2008).

Τα είδη του γένους *Listeria* χρησιμοποιούν μαστίγια που τους παρέχουν *in vitro* κινητικότητα, ιδιότητα που ενισχύει την πρόσφυση και την διείσδυση 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 και 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 και 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 και 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) (παράγραφος 2.6.2).

1.3.3 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 και Jonesy, 1986· Siddiqi και Khan, 1989· Premaratne και συν., 1991). Η αύξηση διεγείρεται επιπλέον και από την ύπαρξη τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) και φαινυλαλανίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα (Siddiqi και Khan, 1989· Premaratne και συν., 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 επιλεκτικά 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 h (Wagner και McLauchlin, 2008).

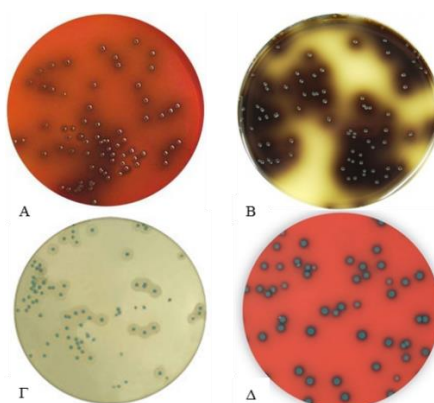
Υπάρχει μία σειρά από στερεά και υγρά επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση των ειδών του γένους *Listeria* spp. από μη αποστειρωμένα δείγματα τροφίμων, περιβάλλοντος και περιττωμάτων. Αρχικά, τα επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα άγαρ Polymyxin Acriflavine Lithium chloride Ceftazidime Aesculin 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 εσκουλίνη. 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* άγαρ όπως περιγράφηκε από τους Ottaviani και Agosti (ALOA) (Ottaviani και συν., 1997) ήταν το πρώτο χρωμογόνο υλικό που προτάθηκε στις τροπολογίες 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 της *L. monocytogenes* που εμφανίζονται με μπλε-τιρκουάζ απόχρωση περιβαλλόμενες από μία αδιαφανή άλω (Εικόνα 3). Σχεδόν όλοι οι κορυφαίοι κατασκευαστές μικροβιολογικών θρεπτικών επιστρωμάτων προσφέρουν μέσα επίστρωσης βασισμένα στην αρχική σύνθεση του ALOA, όπως οι: Biolife (ALOA®), AES (ALOA® 1 day), Oxoid (OCLA), CHROMagar (CHROMagar™), Merck (Chromoplate®), 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 παραγωγοί αυτού του τύπου άγαρ είναι οι: Biosynth (BCM® LMPM), Biorad (Rapid'L.mono) και Heiřha (LIMONO-Ident). Η χρήση επιλεκτικών χρωμογόνων θρεπτικών μέσων καλλιέργειας οδηγεί στην ανίχνευση υποθετικών στελεχών *L. monocytogenes* εντός 24 ή 48 h επώασης στους 37 °C. Ωστόσο, περαιτέρω δοκιμές για την επιβεβαίωση της ταυτότητας των απομονώσεων είναι υποχρεωτικές (Wagner και McLauchlin, 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 της *Listeria monocytogenes*.

1.3.4 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 και συν., 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 και συν., 2016). Κάθε εξελικτική καταγωγή χαρακτηρίζεται από γονίδια τα οποία αποτελούν συγκεκριμένους δείκτες για τα στελέχη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που ανήκουν σε αυτές (Doumith και συν., 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 και συν., 2016).

Εξελικτική καταγωγή	Ορότυπος	O-αντιγόνα	H-αντιγόνα
I	1/2b	I, II	A, B, C
	3b	II, IV	A, B, C
	4b	V, VI	A, B, C
	4d	(V) ^a , 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
	1/2a	I, II	A, B
IV	4a	(V), VII, IX	A, B, C
	4c	V, VII	A, B, C

^a 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 και συν., 1994· Guillet και συν., 2010), *L. seeligeri* (Rocourt και συν., 1986) και *L. grayi* (Todeschini και συν., 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 με παθογονικότητα. 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 και συν., 1989· Tabouret και συν., 1991). Συγκεκριμένα, από τους 13 οροτύπους 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 από κλινικές περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης. 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 ζωικής λιστερίωσης και σποραδικά από κλινικές περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης. Ωστόσο, τα περισσότερα κρούσματα λιστερίωσης στον άνθρωπο σχετίζονται με στελέχη της εξελικτικής καταγωγής I (Orsi και συν., 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 και συν., 2008; Orsi και συν., 2011).

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2- ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ

2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

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 και 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 και Seeliger, 1985).

Εξαιτίας του ότι τα είδη του γένους *Listeria* spp. είναι τόσο ευρέως διαδεδομένα, η μίανση (contamination) 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 σηψαιμίας στα πρόβατα έχει αποδοθεί στο βακτήριο *L. ivanovii* (Low και Donachie, 1997). Όπως και όλα τα είδη *Listeria*, είναι ευρέως διαδεδομένος στην επιφάνεια του εδάφους, στα αποσυντιθέμενα υπολείμματα της βλάστησης, 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 και 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 τροφικής 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 και 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 (παρ. 2.6). 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 θνητότητας 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 ανθρώπινης λιστερίωσης με ποσοστό θνητότητας 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 και Donachie, 1997). Στη χώρα μας, την περίοδο 2004-2013 αναφέρθηκαν 74 επιβεβαιωμένα κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης. 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 και συν., 1985· Ho και συν., 1986· Bille, 1990· Linnan και συν., 1988· Goulet και συν., 1995). Πλέον είναι γνωστό ότι σχεδόν όλες οι περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης είναι τροφιμογενείς (Schuchat και συν., 1992· Adak και συν., 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 (cross-contamination) 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 και Low, 1994· McLauchlin, 1996).

Η ανθρώπινη λιστερίωση είναι σχετικά σπάνια αλλά σοβαρή νόσος, με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας, νοσηλείας και θνητότητας στους ευάλωτους πληθυσμούς. Κατά το έτος 2013, από το σύνολο των ασθενειών που βρίσκονται υπό μελέτη και επιτήρηση στην επικράτεια της Ευρωπαϊκής Ένωσης, προκάλεσε την πιο σοβαρή λοίμωξη στους ανθρώπους, με το 99.1% των περιπτώσεων να νοσηλεύεται και με 191 περιπτώσεις θανάτου (θνητότητα, 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.

2.2 Παθογονικότητα

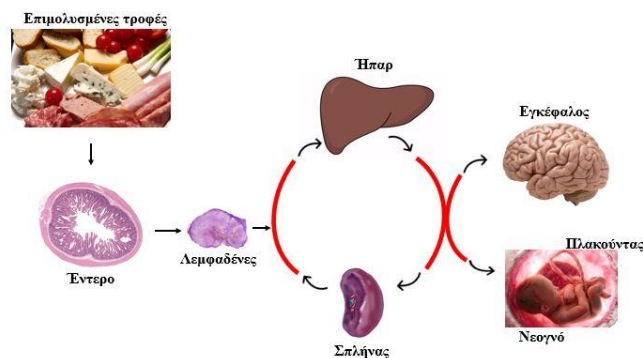
2.2.1 Είσοδος και διασπορά του παθογόνου στον ανθρώπινο οργανισμό

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 διηθείται μέσα από τα εντερικά, αιματο-εγκεφαλικά και εμβρυοπλακουντιακά εμπόδια (Farber και Peterkin, 1991· Cossart και 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 ανυπέβλητο για πολλά συνήθη παθογόνα. Ωστόσο, ο *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να αντιμετωπίζει ποικίλες συνθήκες καταπόνησης, συμπεριλαμβανομένης και της όξινης. 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-Mauger και συν., 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 άλλα κύτταρα και ιστούς, με αποτέλεσμα μια ποικιλία συμπτωμάτων ανάλογα με τους ιστούς και τα όργανα που προσβάλλονται (Swaminathan, 2001).

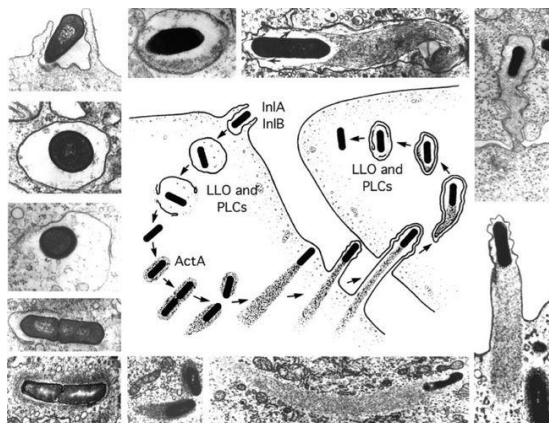


Εικόνα 4. Είσοδος του βακτηρίου *L. monocytogenes* μέσω τροφής στον ανθρώπινο οργανισμό και διασπορά του στα διάφορα όργανα.

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 'λισταριοπόδια' 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 και Goebel, 2007).



Εικόνα 5. Ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής της *L. monocytogenes* (Tilney και Portnoy, 1989).

2.2.2 Γονίδια σχετιζόμενα με την παθογονικότητα

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 παθογονικότητα. 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 παθογονικότητα, 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 δυνητικότητας του μικροοργανισμού και τον διαχωρισμό παθογόνων από μη παθογόνα στελέχη, με βάση την παρουσία ή την απουσία των παραπάνω γονιδίων (Hadjilouka και συν., 2015).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ενεργητική διείσδυση 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 και συν., 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 διείσδυση του παθογόνου στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή (Roche και συν., 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 ενδοκύττωση της *L. monocytogenes* σε ηπατοκύτταρα, ινοβλάστες και επιθηλιοειδή κύτταρα (Braun και συν., 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 από 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 και συν., 1995· Sheehan και συν., 1995· Dramsi και συν., 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 και συν., 1995· Lecuit και συν., 1997· Lecuit και συν., 2004), ενώ η InlB προωθεί την διείσδυση του μικροοργανισμού σε ένα ευρύτερο φάσμα κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ηπατοκυττάρων και των επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων (Dramsi και συν., 1995· Gregory και συν., 1997· Greiffenberg και συν., 1998· Parida και συν., 1998). Οι διαφορές αυτές οφείλονται πιθανότατα στην διαφορετική παρουσία των αντίστοιχων υποδοχέων των διαφορετικών κυτταρικών τύπων (Kuhn και συν., 2008).

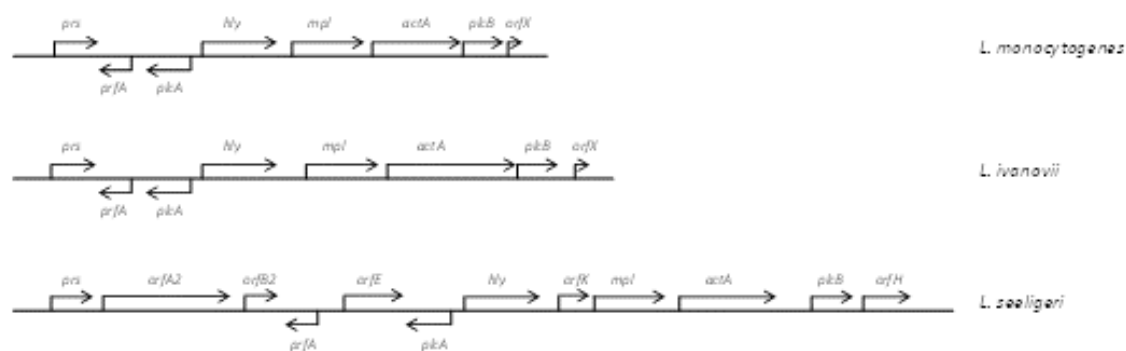
Εκτός από τις πολύ καλά μελετημένες InlA και InlB, στον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* κωδικοποιείται ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που σχετίζονται με τις

ιντερναλίνες (Cabanes, 2002). Από αυτές, οι ιντερναλίνες InlC και InlJ (ή lmo2821) φέρονται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στην παθογονικότητα, καθώς πραγματοποιούν την διείσδυση του παθογόνου σε κύτταρα κατά τα τελευταία στάδια της λοίμωξης (μεταεντερικά) (Roche και συν., 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 και συν., 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 και συν., 2013).

Εκτός από τις παραπάνω ιντερναλίνες, οι ιντερναλίνες InlC2, InlD, InlE, InlF και InlH φέρονται να συμμετέχουν στη μολυσματικότητα (infectivity) του παθογόνου, χωρίς όμως να έχει κατανοηθεί καλά ο ρόλος τους (Orsi και συν., 2011). Οι InlC2, InlD, InlE, και InlF θεωρούνται χρήσιμες στην παθογονικότητα (pathogenicity) σε στάδιο διαφορετικό από αυτό της διείσδυσης (invasion) (Dramsi και συν., 1997), ενώ κύτταρα με μεταλλαγμένα γονίδια *inlG*, *inlH* και *inlE*, έχουν παρουσιάσει μειωμένη *in vivo* λοιμοτοξικότητα (virulence), χωρίς όμως καμία επίδραση στη διείσδυση του παθογόνου στα επιθηλιακά κύτταρα ή στον ενδοκυτταρικό του πολλαπλασιασμό (Rafflesbauer και συν., 1998). Επιπλέον, οι InlC, InlD, InlE, InlF, InlG, InlH και InlJ έχουν αναφερθεί ως μη ικανές να πραγματοποιήσουν μόνες τους φαγοκυττάρωση σε κύτταρα θηλαστικών (Engelbrecht και συν., 1996; Dramsi και συν., 1997, Sabet και συν., 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 διείσδυση του παθογόνου στο κύτταρο-ξενιστή (Bergmann και συν., 2002).

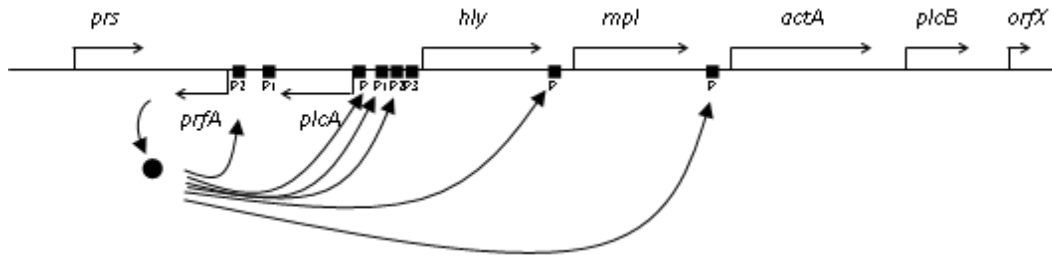
Προκειμένου να προσδιοριστεί η παθογονικότητα στελεχών του βακτηρίου *L. monocytogenes*, οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι λοιμογόνοι παράγοντες, μαζί με τις ιντερναλίνες, είναι τα γονίδια που ανήκουν στη νησίδα γονιδίων παθογονικότητας LIPI-1, καθώς εκεί βρίσκονται τα σημαντικότερα γονίδια της λοιμογόνου 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 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 της νησίδας που υπάρχει στο είδος *L. ivanovii*, ενώ η εκδοχή της που είναι παρούσα στον μικροοργανισμό *L. seeligeri* είναι διαφοροποιημένη και επιπλέον, μη-λειτουργική (Εικόνα 6) (Paramithiotis και συν., 2014).

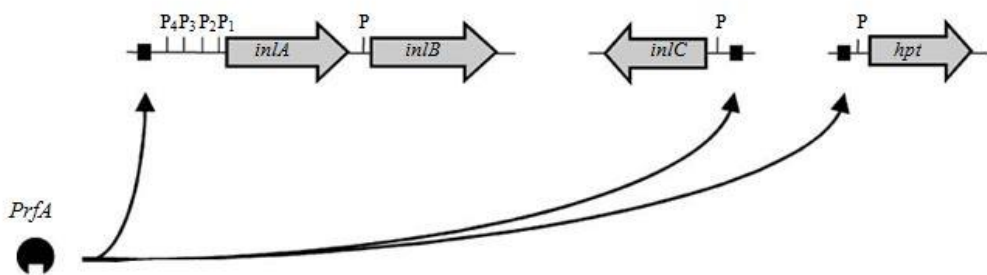


Εικόνα 6 Φυσική οργάνωση του συμπλέγματος γονιδίων παθογονικότητας LIPI-1 στους μικροοργανισμούς *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* και *L. seeligeri*. Η κατεύθυνση της μεταγραφής υποδεικνύεται από τα αντίστοιχα βέλη (Patamithiotis και συν., 2014).

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 ομοιοστάση της *L. monocytogenes* (Paramithiotis και συν., 2014) (Εικόνα 8).



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



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

Το γονίδιο *hly* κωδικοποιεί μια τοξίνη δέσμευσης 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 και συν., 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 και συν., 2012). Ως εκ τούτου, η ύπαρξή της θεωρείται αναγκαία για την αποτελεσματική έκφραση της παθογονικότητας 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 και συν., 1986; Portnoy και συν., 1988; Cossart και συν., 1989).

Για τη λύση των κενοτοπίων 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* (Auroga και συν., 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 φωσφατιδυλινωσιτόλη (Kuhn και συν., 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 και συν., 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 και συν., 1991· Raveneau και συν., 1992). Η Mpl είναι μια θερμολυσίνη μεγέθους 35 kDa, η οποία είναι ενεργή σε πολύ μεγάλο εύρος pH και θερμοκρασιών (Coffey και συν., 2000) και κωδικοποιείται από το γονίδιο *mpl* (Mengaud και συν., 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 A₁. Η βαφιλομυκίνη A₁ (bafilomycin A₁) είναι ένας αναστολέας της ΑΤΡάσης των κενотоπίων, ο οποίος παράλληλα αναστέλλει και την αυτοφαγία, εμποδίζοντας έτσι την κενотоπική οξίνιση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση του προενζύμου εξαρτάται από την οξίνιση των κενотоπίων και ως εκ τούτου ελέγχεται από ένα συνδυασμό παραγόντων τόσο του βακτηρίου όσο και του ξενιστή (Marquis και συν., 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 διακυτταρική κινητικότητα η οποία βασίζεται στην ακτίνη. Παράλληλα όμως, φέρεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στη διείσδυση του παθογόνου εντός των επιθηλιακών κυττάρων (Suarez και συν., 2001). Ανάλυση της διεισδυτικότητας (invasiveness) στελεχών τα οποία είτε δεν έφεραν το γονίδιο είτε παρουσίαζαν υπερέκφρασή του, κατέδειξαν ότι η ActA μπορεί να λειτουργήσει ως πρωτεΐνη-μεσολαβητής της διείσδυσης, τουλάχιστον όταν υπερεκφράζεται (Suarez και συν., 2001). Τέλος, έχει αναγνωρισθεί 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 και συν., 2007).

Την τελευταία δεκαετία, οι μελέτες που διεξάγονται για τον προσδιορισμό της παθογονικότητας των 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 και συν., 1989· Bubert και συν., 1992) και είναι παρούσα στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων (Wood και συν., 1993). Έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διεκπεραίωση της διείσδυσης 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 και συν., 1992· Haase και συν., 1995).

2.3 Χαρακτηριστικά νόσου στον άνθρωπο

Στους ανθρώπους η λοίμωξη εμφανίζεται συνήθως σε ευπαθείς ομάδες, μεταξύ των οποίων οι έγκυες, τα νεογνά και οι ηλικιωμένοι. 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 και συν., 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 και 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 μiasμένων τροφίμων) και κλινικής αναγνώρισης της νόσου ποικίλλει ευρέως μεταξύ των ατόμων, από 1 έως 90 ημέρες με ένα μέσο για την ενδομήτρια μόλυνση περίπου στις 30 ημέρες (McLauchlin και συν., 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 και McLauchlin, 2008). Ως εκ τούτου, ο Κανονισμός (ΕΚ) 2073/2005 της επιτροπής της 15^{ης} 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 και συν., 2006). Το επίπεδο μίανσης στα τρόφιμα που έχουν συσχετιστεί με την λοίμωξη έχει καταδείξει στην πλειονότητα των περιπτώσεων ένα μέσο όρο επιπέδου μίανσης 10^2 - 10^6 CFUs/mL/g. Γενικά, δεδομένα από περιστατικά λοίμωξης και εξέτασης των επιπέδων μίανσης των υπαίτιων τροφίμων, έχουν υποδείξει ότι το επίπεδο μόλυνσης για την πρόκληση σοβαρής ασθένειας είναι χαμηλό (Wagner και 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 και συν., 2012) και η θνητότητά της κυμαίνεται σε πολύ υψηλά επίπεδα (20-40%) (Farber και Peterkin, 1991). Σπάνιες επιπλοκές είναι η ενδοκαρδίτιδα σε άτομα με καρδιακά προβλήματα και διάφορες τοπικές μολύνσεις, όπως ενδοφθαλμίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα και περιτονίτιδα (Slutsker και Schuchat, 1999). Η λοίμωξη προκαλεί πολυμορφοπύρνη λευκοκυττάρωση που εξελίσσεται σε μονοπύρνη 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 και συν., 1991· Lorber, 1996· Vázquez-Boland, 2001). Η πρώτη μορφή προκύπτει από τον αποικισμό του παθογόνου στο αίμα, το οποίο καταλήγοντας στον πλακούντα οδηγεί σε διείσδυση 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 και Slutsker, 2007· Kuhn και συν., 2008· Jackson και συν., 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 θνητότητα είναι γενικά χαμηλότερη (Farber και Peterkin, 1991· Farber και συν., 1991· Slutsker και Schuchat, 1999· Vázquez-Boland και συν., 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 θνητότητα 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 και συν., 1992· Gallaguer και Watakunakorn, 1998· Slutsker και 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 και συν., 1991· Brouwer και συν., 2006), ενώ στα ανοσοκατεσταλμένα άτομα μπορεί να εμφανίσει οξεία εμπύρετη γαστρεντερίτιδα αλλά ή και καθόλου συμπτώματα (Riedo και συν., 1994· Dalton και συν., 1997).

2.4 Διάγνωση και θεραπεία

Η διάγνωση της λιστερίωσης καθορίζεται από την ορθή απομόνωση της *L. monocytogenes* από φυσιολογικά άσηπτο σημείο, όπως το αίμα ή το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Επιπλέον, εξαιτίας του ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να θεωρηθεί εσφαλμένα ως διφθεροειδής

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 επιστρέφονται απευθείας σε άγαρ τρυπτικής σόγιας (tryptic soy agar) που περιέχει 5% αίμα προβάτου, αλόγου ή κουνελιού και ο μικροοργανισμός ταυτοποιείται εντός 36 h. 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 ενοφθαλιστούν σε στερεό επιλεκτικό μέσο (Painter και 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 και συν., 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 και συν., 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 αμπικιλίνης (ampicillin) σε συνδυασμό με μικρή ποσότητα γενταμικίνης (gentamicin) (Safdar και Armstrong, 2003). Η αντιμετώπιση της όμως πλέον στηρίζεται στη χορήγηση υψηλών δόσεων αμοξικιλίνης (amoxicillin) (2-3 g./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 θανατώνοντας 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 και Purich, 1996). Η μικρή ανταπόκριση των βακτηριοστατικών φαρμάκων και η αργή ανταπόκριση στην πενικιλίνη οφείλονται πιθανώς στην ικανότητα της *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 και συν., 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 και Fung, 1993). Ωστόσο, υποτροπές έχουν αναφερθεί σε ανοσοκατεσταλμένους έπειτα από 2 εβδομάδες θεραπείας με πενικιλίνη (Watson και συν., 1978).

2.5 Πρόληψη

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 και Slutsker, 2007).

Τα εν λόγω σχέδια αναφέρονταν σε πολλαπλά σημεία δράσης, συμπεριλαμβανομένης της κανονιστικής οδηγίας για την παραγωγή 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 των προϊόντων κρέατος και πουλερικών (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 συντάχθηκαν τόσο για το γενικό πληθυσμό όσο και για τις ομάδες αυξημένου κινδύνου (π.χ. ανοσοκατεσταλμένα άτομα, έγκυες, ηλικιωμένοι) (Wagner και 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 rôté.
- ✓ 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 νόσου, άμεση διερεύνηση των περιπτώσεων λιστερίωσης και επιβολή των ισχυόντων κανονισμών που αποσκοπούν στην ελαχιστοποίηση της παρουσίας της *L. monocytogenes* σε τρόφιμα που καταναλώνονται χωρίς περαιτέρω μαγείρεμα. Παράλληλα, είναι επιτακτικό οι βιομηχανίες τροφίμων να μελετούν προσεχτικά τους παράγοντες μίανσης

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 και Slutsker, 2007).

2.6 Επιδημικές εξάρσεις λιστερίωσης από φρέσκα φρούτα και λαχανικά

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 και Szatalowicz ανέφεραν ότι 731 περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης είχαν καταγραφεί μεταξύ 1933 και 1966, επισημαίνοντας ότι φυτικά προϊόντα όπως το μαρούλι ή άλλα φρέσκα λαχανικά μiasμένα με *L. monocytogenes*, ίσως να ήταν υπεύθυνα για μερικές από αυτές τις περιπτώσεις (Hadjilouka και συν., 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 (παρ. 3.1). 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 μια έξαρση οφειλόμενη σε *L. monocytogenes*, η οποία 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 υποτεθεί ότι η κατανάλωση αυτών των λαχανικών είχε πιθανότητα προκαλέσει τα κρούσματα 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 επιδημίας είχαν καταγραφεί συνολικά πέντε θάνατοι ασθενών.

ο Καναδάς 1981

Το πρώτο επιδημικό επεισόδιο (outbreak) λιστερίωσης που μπορούσε αδιαμφισβήτητα να συνδεθεί με την κατανάλωση τροφίμων, προκλήθηκε από εμπορικά παρασκευασμένη λαχανοσαλάτα το 1981, στις επαρχίες Prince Edward Island, Nova Scotia και New Brunswick

του Καναδά (Schlech και συν., 1983). 41 περιπτώσεις (7 ενήλικες και 34 περιγεννητικές) έλαβαν χώρα μεταξύ 1^{ης} Μαρτίου και 1^{ης} Σεπτεμβρίου 1981 (Beuchat, 1996). Από τις 34 περιγεννητικές περιπτώσεις, υπήρξαν 9 περιπτώσεις θνησιγένειας, 23 περιπτώσεις γέννησης άρρωστου βρέφους με επακόλουθο ποσοστό θνητότητας 27% και 2 περιπτώσεις γέννησης υγιούς βρέφους. Το ποσοστό θνητότητας των ενηλίκων ήταν 28,6% (Farber και 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 πρόταση αυτή επιβεβαιώθηκε έπειτα από την απομόνωση του στελέχους 4b από τα εμπλεκόμενα τρόφιμα (Beuchat, 1996).

ο Τέξας 2010

Το 2012, οι Gaul και συν., ερεύνησαν ένα επιδημικό επεισόδιο 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 της *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 σοβαρότερο επιδημικό επεισόδιο λιστερίωσης στην ιστορία των Ηνωμένων Πολιτειών, δεδομένου ότι το CDC άρχισε να παρακολουθεί τα επιδημικά επεισόδια στη δεκαετία του 1970, συνδέθηκε με την κατανάλωση ολόκληρων πεπονιών που προέρχονταν από ένα αγρόκτημα στο Κολοράντο. Η επιδημική έξαρση 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 κατέληξαν 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

Τον Σεπτέμβριο του 2015, μια έξαρση 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 τον Σεπτέμβριο του 2015,

η πηγή της μόλυνσης παρέμενε άγνωστη έως τον Ιανουάριο του 2016, όταν τα εργαστηριακά αποτελέσματα από συσκευασμένες σαλάτες, συνέδεσαν την έξαρση 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 κατέληξε 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 της 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 της *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).

ο 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 μια επιδημική έξαρση λιστερίωσης, η οποία εμφανίστηκε το Σεπτέμβριο του 2013.

Από τις 13 Σεπτεμβρίου 2013, το στέλεχος του συγκεκριμένου κρούσματος επιμόλυσε 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 την έξαρση 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 και 75% των πασχόντων ήταν γυναίκες. Και οι οχτώ ασθενείς εισήχθησαν στο νοσοκομείο, ενώ οι δύο ασθενείς από το Μέριλαντ και την Ουάσιγκτον κατέληξαν, 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 το όνομα 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 της

συγκεκριμένης έξαρσης 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 monocytogenes*. 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^η Μαΐου του 2014 κι έπειτα (CDC, 2016b).

**3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3- ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ
ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΣΕ ΦΥΣΙΚΩΣ ΜΙΑΣΜΕΝΑ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΡΟΚΑΣ ΚΑΙ ΑΓΓΟΥΡΙΩΝ – ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΩΝ
ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ**

3.1 Εισαγωγή¹

Η ανθρώπινη τροφιμογενής λιστερίωση έχει συνδεθεί κυρίως με την κατανάλωση πουλερικών, βόειου κρέατος και γαλακτοκομικών προϊόντων. Ωστόσο, ο αριθμός των μελετών που αναφέρουν παρουσία της *L. monocytogenes* σε έτοιμα προς κατανάλωση φρούτα και λαχανικά έχει αυξηθεί δραματικά την τελευταία δεκαετία. Με βάση αυτές τις μελέτες, η παρουσία του παθογόνου έχει επιβεβαιωθεί σε πληθώρα δειγμάτων από διάφορα λαχανικά και φρούτα όπως τεύτλα, καρότα, λάχανο, κουνουπίδι, σέλινο, τομάτες, σπανάκι, μπρόκολο, μαρούλι, αντίδια, ραπανάκια, μανιτάρια, πράσα, πιπεριές κ.ά. Παράλληλα, ο παθογόνος έχει απομονωθεί από χυμούς φρούτων και από σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση αλλά και κατεψυγμένες (Hadjilouka και συν., 2014b). Ο επιπολασμός του παθογόνου που έχει καταγραφεί σε αυτές τις μελέτες, εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία και άλλοτε είναι μικρός της τάξεως του 0.3, 0.7 και 1.6%, ενώ άλλες φορές είναι πολύ υψηλός και φτάνει έως 25.4 και 33.7% (U.S. FDA, 2013· Abadias και συν., 2008· Lin συν., 1996· Cordano και Jacquet, 2009· Kramarenko και συν., 2013).

Ένας από τους σημαντικότερους λόγους για τους οποίους έχει αυξηθεί γενικά η παρουσία των παθογόνων στα φρέσκα φρούτα και λαχανικά, είναι η πρόοδος στις αγρονομικές πρακτικές, την επεξεργασία, τη συντήρηση, τη διανομή και την εμπορία. Η πρόοδος αυτή οδηγεί στην παγκοσμιοποίηση της προσφοράς των τροφίμων, η οποία όμως παράλληλα εγκυμονεί κινδύνους λόγω της διασποράς των παθογόνων σε ευρείες γεωγραφικές περιοχές. Επιπρόσθετα, χάρη στην αύξηση της δημοτικότητας των φρέσκων φρούτων και λαχανικών - λόγω της τάσης των καταναλωτών να τρώνε υγιεινότερα- τα προϊόντα αυτά έχουν γίνει σημαντικοί φορείς των τροφιμογενών ασθενειών όσον αφορά στο στατιστικό τομέα (Beuchat και WHO, 2002). Από την άλλη πλευρά, ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένος στο περιβάλλον και μπορεί να επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε αυτό (παρ. 2.1.), ενώ είναι ικανός να αναπτύσσεται και σε θερμοκρασίες ψύξης (Berrang και Brackett, 1989· Brackett, 1999· Beuchat και Brackett, 1990). Ως εκ τούτου, τα φρούτα και τα λαχανικά μπορούν εύκολα να επιμολυνθούν από τον μικροοργανισμό στο χωράφι, στο θερμοκήπιο αλλά και κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και των μετασυλλεκτικών χειρισμών (Nguyen-the και Carlin, 1994). Τα χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού, σε συνδυασμό με την αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες των καταναλωτών και την παγκοσμιοποίηση της

¹ Το παρόν κεφάλαιο έχει δημοσιευτεί υπό τη μορφή πρωτότυπου ερευνητικού άρθρου (original research article) με τα ακόλουθα στοιχεία: Estimation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence and levels in naturally contaminated rocket and cucumber samples by deterministic and stochastic approaches. 2015. Hadjilouka, A., Mantzourani, K.S., Katsarou, A., Cavaiuolo, M., Ferrante, A., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Drosinos, E.H. Journal of Food Protection, 78:311-322, doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-261.

προσφοράς τροφίμων, εξηγούν το λόγο για τον οποίο η συχνότητα των επιδημιών που συνδέονται με φρέσκα φρούτα και λαχανικά έχει αυξηθεί.

Τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν την ανάγκη ύπαρξης αξιόπιστων μεθόδων ανίχνευσης του παθογόνου στα τρόφιμα. Αυτές οι μέθοδοι πρέπει να είναι ακριβείς και ικανές να διαχωρίζουν το είδος *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα είδη του γένους *Listeria* spp., ώστε να διασφαλίζεται η τήρηση των μικροβιολογικών κριτηρίων ασφάλειας τροφίμων (παρ. 2.3). Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο στερεό χρωμογόνο θρεπτικό υπόστρωμα που επιτρέπει την άμεση διαφοροποίηση του βακτηρίου *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα είδη του γένους, είναι το *Listeria* agar όπως περιεγράφηκε από τους Ottaviani και Agosti (ALOA) (Ottaviani και συν., 1997) (παρ. 1.3.3). Είναι γνωστό όμως ότι η απόδοση των μέσων που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια μικροβιολογικών αναλύσεων δεν είναι άριστη, δηλαδή η ευαισθησία και η εξειδίκευσή τους είναι μικρότερες από 100% (Habib και συν., 2008). Επομένως, δημιουργείται μία ποικιλομορφία αποτελεσμάτων βάσει του μέσου που χρησιμοποιείται και ο επιπολασμός των παθογόνων είτε υποτιμάται είτε υπερεκτιμάται, ακόμα και κατά την ανάλυση του ίδιου δείγματος. Διαφορές μεταξύ των μέσων έχουν αναφερθεί από τους Vlaemynck και συν., (2000), σε έρευνα όπου χρησιμοποιήθηκαν ALOA, PALCAM και Oxford για την ανίχνευση της *L. monocytogenes*, σε φυσικώς μiasμένα γαλακτοκομικά προϊόντα και κρέας. Παράλληλα, διεθνείς δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για να συγκρίνουν την απόδοση χρωμογόνων υλικών ανίχνευσης *L. monocytogenes*, κατέδειξαν ότι τα χρωμογόνα υποστρώματα ALOA και RAPID' L.mono απέδωσαν καλύτερα ή τουλάχιστον στο ίδιο επίπεδο με τα μη χρωμογόνα PALCAM και Oxford (Reissbrodt, 2004). Συνεπώς, για να καθορίζεται η πραγματική τιμή του επιπολασμού του εκάστοτε παθογόνου, πρέπει να χρησιμοποιούνται περισσότερα του ενός θρεπτικά υποστρώματα (έλεγχος πολλαπλών δοκιμών-multiple testing).

Στα περισσότερα δημοσιευμένα μοντέλα χρησιμοποιείται η αιτιοκρατική προσέγγιση για την πρόβλεψη της μικροβιακής συμπεριφοράς, χωρίς όμως να εκτιμώνται η μεταβλητότητα και η αβεβαιότητα των δεδομένων που προκύπτουν από τις μικροβιολογικές μελέτες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι συνήθεις μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών μέσω θρεπτικών υποστρωμάτων αποτελούν ατελείς διαγνωστικές μεθόδους, καθώς, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η απόδοσή τους δεν είναι άριστη και οι τιμές ευαισθησίας και εξειδίκευσης είναι μικρότερες από την ιδανική (<100%). Παράλληλα, όταν χρησιμοποιούνται οι συγκεκριμένες μέθοδοι, οι τιμές της ευαισθησίας και της εξειδίκευσης των υποστρωμάτων είναι άγνωστες, καθώς τα πειραματικά δεδομένα που προκύπτουν από τη χρήση των μεθόδων αυτών παρέχουν πληροφορίες μόνο για τη φαινομενική τιμή επιπολασμού του εκάστοτε παθογόνου. Καταδεικνύουν δηλαδή το ποσοστό των θετικών δειγμάτων επί του συνόλου των δειγμάτων που εξετάστηκαν, βάσει της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε. Οι τιμές της απόδοσης των υποστρωμάτων προκύπτουν από περαιτέρω πειραματικά δεδομένα, άλλες μελέτες ή ακόμη και από χρήση ειδικών τύπων κατανομών όταν καμία προγενέστερη (prior) γνώση δεν είναι

διαθέσιμη (Lesaffre και συν., 2007· Vose, 2000). Συνέπεια αυτού, είναι η σημαντική πιθανότητα διεξαγωγής εσφαλμένων συμπερασμάτων και για τον λόγο αυτό τα συγκεκριμένα μοντέλα θεωρούνται αρκετά ανεπαρκή όσον αφορά στην αξιολόγηση κινδύνου (Nauta, 2002· Rouillot και Lubran, 2011). Ως εκ τούτου, αναγκαία κρίνεται μια περισσότερο στοχαστική προσέγγιση. Ωστόσο, η πραγματική τιμή του επιπολασμού των παθογόνων μπορεί εύκολα να υπολογιστεί, εφόσον η ευαισθησία και η εξειδίκευση των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων είναι γνωστές (Thrusfield, 2007).

Στο πλαίσιο της ορθότερης εκτίμησης της αβεβαιότητας και του υπολογισμού της μέσης τιμής των παραπάνω παραμέτρων, καθώς και της βελτίωσης της ακρίβειας των στοχαστικών μοντέλων που κατασκευάζονται, χρησιμοποιούνται πλέον οι Μπαγεσιανές μέθοδοι (Delignette-Muller και συν., 2006· Crépet και συν., 2009· Jaloustre, και συν., 2011). Η Μπαγεσιανή ανάλυση (Bayesian analysis) συνδυάζει τις προγενέστερες γνώσεις που περιγράφονται ως κατανομές πιθανοτήτων, με τα πειραματικά δεδομένα που συλλέγονται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία επικαιροποιημένων μεταγενέστερων (posterior) κατανομών πιθανοτήτων (Lesaffre και συν., 2007). Η διαφορά μεταξύ αιτιοκρατικής (deterministic) και Μπαγεσιανής προσέγγισης εντοπίζεται στο ότι ενώ στην αιτιοκρατική προσέγγιση οι τιμές ευαισθησίας και εξειδίκευσης είναι προκαθορισμένες παράμετροι με μόνη μεταβλητή τον επιπολασμό, στη Μπαγεσιανή προσέγγιση είναι μεταβλητές (Berkvens και συν., 2006· Lesaffre και συν., 2007). Επομένως, το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της Μπαγεσιανής έναντι της αιτιοκρατικής προσέγγισης, είναι ότι μέσω του συνδυασμού των αποτελεσμάτων των ατελών διαγνωστικών μεθόδων, προκύπτουν ορθότερες εκτιμήσεις της πραγματικής τιμής του επιπολασμού και των χαρακτηριστικών των χρησιμοποιούμενων θεραπευτικών υποστρωμάτων (Rouillot και συν., 2002).

Επιπρόσθετα, ορθότερα αποτελέσματα προκύπτουν όταν η Μπαγεσιανή συμπερασματολογία (Bayesian inference) συνδυάζεται με τον έλεγχο πολλαπλών δοκιμών. Ο έλεγχος πολλαπλών δοκιμών (multiple testing) πραγματοποιείται όταν για τον εντοπισμό ενός μικροοργανισμού σε ένα δείγμα χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερα θεραπευτικά υποστρώματα. Διακρίνεται σε παράλληλο (parallel) και σε σειρά (serial). Κατά τον παράλληλο έλεγχο, χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα δύο ή περισσότερα θεραπευτικά υποστρώματα για τη μελέτη του κάθε δείγματος. Το δείγμα χαρακτηρίζεται θετικό ως προς την παρουσία του μικροοργανισμού όταν τουλάχιστον ένα υπόστρωμα είναι θετικό. Αντίθετα, στον έλεγχο σε σειρά τα δείγματα ελέγχονται αρχικά με ένα υπόστρωμα υψηλής ευαισθησίας. Εν συνεχεία, τα θετικά δείγματα ελέγχονται εκ νέου με ένα υπόστρωμα υψηλής εξειδίκευσης για την επιβεβαίωση των τελικώς θετικών δειγμάτων. Επομένως, η Μπαγεσιανή συμπερασματολογία (Bayesian inference) σε συνδυασμό με τον έλεγχο πολλαπλών δοκιμών οδηγούν σε ορθότερη εκτίμηση της πραγματικής τιμής του επιπολασμού του παθογόνου, αλλά και των χαρακτηριστικών επίδοσης

των εν χρήσει μεθόδων, καθώς ο έλεγχος πολλαπλών δοκιμών εισάγει επιπλέον μεταβλητές. Με αυτόν τον τρόπο, ανεπιθύμητες υπό και υπερεκτιμήσεις του επιπολασμού μπορούν να αποφευχθούν.

Πέραν της μελέτης των παραπάνω μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του παθογόνου στα τρόφιμα, η βιοποικιλότητα των στελεχών του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που απομονώνονται από αυτά, υπήρξε το επίκεντρο εντατικής μελέτης κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Οι μελέτες βιοποικιλότητας, δηλαδή οι μελέτες με σκοπό την διαφοροποίηση των απομονώσεων του παθογόνου, απαιτούν υψηλό βαθμό επαναληψιμότητας ο οποίος επιτυγχάνεται μέσω της προσεκτικής τυποποίησης σε κάθε πειραματική βαθμίδα (Tyler και συν., 1997). Σήμερα για τη διεξαγωγή των μελετών αυτών υπάρχει ένα ευρύ φάσμα τεχνικών η επιλογή των οποίων εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων, με τη φύση της μελέτης να αποτελεί τον πιο καθοριστικό από όλους. Όπως έχει ήδη αναφερθεί (παρ. 1.3.4), μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 13 ορότυποι *L. monocytogenes*. Ωστόσο, μόλις τέσσερις από αυτούς (1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b) αποτελούν πάνω από το 95% των απομονώσεων από τα τρόφιμα και τους ασθενείς των καταγεγραμμένων κρουσμάτων ανθρώπινης λιστερίωσης (Jacquet και συν., 2002· Kathariou, 2002). Επομένως, η ορολογική τυποποίηση στελεχών που ανήκουν στο είδος *L. monocytogenes* είναι περιορισμένης αξίας όταν πρόκειται για επιδημιολογικούς σκοπούς, καθώς με αυτόν τον τρόπο δεν αποκαλύπτεται η υπάρχουσα γενετική ετερογένεια (Nadon και συν., 2001).

Η γενετική ποικιλομορφία αναδεικνύεται με τη χρήση μοριακών μεθόδων αποτύπωσης του DNA υψηλής διακριτικής ικανότητας (π.χ. τεχνικές με βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης [PCR] και ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου [PFGE]), οι οποίες διαφοροποιούν επιτυχώς τα στελέχη του παθογόνου. Από αυτές τις μεθόδους, τεχνικές με βάση την PCR όπως οι πολυμορφισμοί τυχαίως ενισχυμένου DNA (RAPD) (Vogel και συν., 2001), ο πολυμορφισμός ενισχυμένου μήκους θραύσματος (AFLP) (Aarts και συν., 1999· Κετο-Timonen και συν., 2003), η ανάλυση περιοριστικών ενζύμων (Gioannacci και συν., 1999) και η PCR επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR) (Zunabovic και συν., 2012· Hadjilouka και συν., 2014a), έχουν υπάρξει αποτελεσματικές για την ομαδοποίηση και τη διαφοροποίηση των διαφόρων στελεχών, παρά τις ενδογενείς δυσκολίες της επαναληψιμότητας και της τυποποίησης που μπορεί να προκύψουν μεταξύ των εργαστηρίων (Giraffa και Carminati, 2008).

3.2 Στόχος

Αντικείμενο της παρούσας πειραματικής ενότητας αποτέλεσε ο καθορισμός του επιπολασμού και η ποσοτική εκτίμηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε δείγματα

ρόκας και αγγουριών, καθώς και ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών επίδοσης των χρωμογόνων θρεπτικών υποστρωμάτων ALOA και Rapid' L.mono, που χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση του παθογόνου. Η πραγματοποίηση των παραπάνω έγινε με χρήση αιτιοκρατικής και στοχαστικής προσέγγισης, καθώς και με χρήση παράλληλου ελέγχου και Μπαγεσιανής ανάλυσης, ώστε να εκτιμηθούν όσο το δυνατόν καλύτερα η πραγματική τιμή του επιπολασμού και να αξιολογηθούν ορθότερα οι χρησιμοποιούμενες διαγνωστικές μέθοδοι. Τέλος, τέθηκε υπό μελέτη η βιοποικιλότητα των απομονωθέντων στελεχών του παθογόνου, μέσω τεχνικών PCR.

3.3 Πειραματική διαδικασία

Για την διεξαγωγή της μελέτης πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων ρόκας και αγγουριών. Τα δείγματα αρχικά εξετάστηκαν ως προς την παρουσία της *L. monocytogenes* μέσω παράλληλου ελέγχου σε δύο επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (ALOA και RAPID'L.mono) και η επιβεβαίωση της παρουσίας του παθογόνου έγινε με διεξαγωγή βιοχημικών δοκιμών και PCR. Μέσω των αποτελεσμάτων επιβεβαίωσης της παρουσίας του μικροοργανισμού στα δείγματα, εκτιμήθηκε η πραγματική τιμή του επιπολασμού και υπολογίστηκαν τα χαρακτηριστικά επίδοσης των χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υποστρωμάτων. Στη συνέχεια, μέσω στοχαστικής προσέγγισης και με τη βοήθεια της Μπαγεσιανής ανάλυσης υπολογίστηκαν τα μέτρα διαγνωστικής ακρίβειας των υποστρωμάτων για το χειρισμό της αβεβαιότητάς τους, ενώ αναπτύχθηκαν και δύο μοντέλα πρόβλεψης τιμών για τον επιπολασμό της *L. monocytogenes* και ένα μοντέλο ποσοτικής εκτίμησης του βακτηρίου στα υπό μελέτη δείγματα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ορολογική τυποποίηση των ταυτοποιημένων στελεχών της *L. monocytogenes* με τη βοήθεια συνδυαστικής PCR, ενώ για περαιτέρω διερεύνηση της βιοποικιλότητας του παθογόνου διενεργήθηκε μελέτη της γενοτυπικής ποικιλομορφίας των απομονωθέντων στελεχών, μέσω των μοριακών αναλύσεων RAPD και rep-PCR.

3.3.1 Συλλογή δειγμάτων

Εκατό δείγματα ρόκας και εκατό δείγματα αγγουριών συλλέχθηκαν από λαϊκές αγορές, υπεραγορές και οπωροπωλεία της ευρύτερης περιοχής της Αθήνας, κατά τη διάρκεια του Οκτωβρίου (ρόκα) και του Μαΐου (αγγούρια) του 2011. Τα δείγματα διατηρούνταν υπό ψύξη και μεταφέρονταν στο εργαστήριο εντός της ίδιας ημέρας για τη διεκπεραίωση των μικροβιολογικών αναλύσεων.

3.3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Η ανίχνευση και η αρίθμηση της *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκαν βάσει των ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 και ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004, αντιστοίχως (ISO, 2004a; 2004b).

Για την ανίχνευση του μικροοργανισμού, δείγμα 25 g μεταφερόταν ασηπτικά εντός σακούλας stomacher, όπου και προστίθεντο 225 mL εμπλουτιστικού διαλύματος Half Fraser Broth Plus (LABM, Bury, United Kingdom). Το περιεχόμενο ομογενοποιούνταν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) και τα δείγματα τοποθετούνταν για επώαση σε θερμοκρασία 30°C για 24 h. Μετά το πέρας των 24 h, 0.1 mL από το Half Fraser αναμειγνύονταν με 10 mL Fraser Broth Plus (LABM) και τα δείγματα επανατοποθετούνταν για επώαση στους 37°C για 48 h. Εν συνεχεία, πραγματοποιούνταν επίστρωση 0.1 mL από κάθε δείγμα στα θρεπτικά υποστρώματα ALOA (Biolife, Milano, Italy) και RAPID'L.mono (Bio-Rad, Paris, France) και τα τρυβλία επωάζονταν στους 37°C για 24 h ή 48 h (εάν κρινόταν απαραίτητο). Για τη μελέτη του κάθε δείγματος, χρησιμοποιούνταν τρυβλία με διπλές επαναλήψεις.

Για την αρίθμηση του παθογόνου, δείγμα 10 g μεταφερόταν ασηπτικά εντός σακιδίου stomacher και ομογενοποιούνταν σε θερμοκρασία δωματίου με 90 mL υδατικού διαλύματος MRD (maximum recovery diluent, LABM). Ακολουθούσε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων κι έπειτα 1 mL από κάθε αραιώση εξαπλωνόταν επιφανειακά σε τρία τρυβλία ALOA και RAPID'L.mono (0.33 mL σε κάθε τρυβλίο), σε διπλή επανάληψη. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετούνταν για επώαση στους 37°C για 48 h.

3.3.2.1 Υπολογισμός μικροβιακού πληθυσμού

Για τον υπολογισμό του πληθυσμού της *L. monocytogenes*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της απαρίθμησης των αποικιών που σχηματίζονται σε ενοφθαλμισμένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη θεωρία ότι ένα βακτηριακό κύτταρο ή μία ομάδα κυττάρων δημιουργούν μία αποικία, κι επομένως ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσονται στο υλικό, αντιπροσωπεύει τον πραγματικό μικροβιακό πληθυσμό. Ως εκ τούτου, η απαρίθμηση των αποικιών εκφράζεται ως μονάδα σχηματιζόμενων αποικιών (Colony Forming Units, CFU).

Με βάση τη μέθοδο αυτή, για αξιόπιστα αποτελέσματα, χρησιμοποιούνται τα τρυβλία των οποίων οι αποικίες κυμαίνονται από 30 έως 300. Σε περίπτωση ανάπτυξης μεγάλου αριθμού αποικιών στα τρυβλία, η αρίθμηση πραγματοποιείται έπειτα από διαίρεση του τρυβλίου σε ίσα τμήματα, ώστε ο υπολογισμός να προσεγγίζει όσο το δυνατόν περισσότερο τον πραγματικό πληθυσμό. Τέλος, για τον υπολογισμό των μικροβιακών πληθυσμών, χρησιμοποιείται ο μέσος όρος των αριθμήσεων των δύο επαναλήψεων, ο οποίος

πολλαπλασιάζεται με την αραιώση και τον όγκο του ενοφθαλμίσματος από το κάθε δείγμα κι έτσι προκύπτει ο μικροβιακός πληθυσμός ανά γραμμάριο εξεταζόμενου προϊόντος (CFU/g).

3.3.3 Ταυτοποίηση *L. monocytogenes*

Βάσει των αποτελεσμάτων που παρατηρήθηκαν από τις καλλιέργειες στα θρεπτικά υποστρώματα (μικροβιολογικές αναλύσεις), κάθε δείγμα χαρακτηρίστηκε ως αρνητικό ή πιθανώς θετικό ως προς την παρουσία της *L. monocytogenes*. Η παρουσία του παθογόνου στα πιθανώς θετικά δείγματα, επιβεβαιώθηκε βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις βιοχημικές και μοριακές αναλύσεις που ακολούθησαν. Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των βιοχημικών και μοριακών αναλύσεων οδήγησε στον ορισμό ενός προτύπου σύγκρισης (gold standard). Η συσχέτιση του προτύπου με τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων καθόρισε τα τελικώς θετικά δείγματα, ενώ χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια και για τον υπολογισμό των χαρακτηριστικών επίδοσης των θρεπτικών υποστρωμάτων (παρ. 3.3.4). Αυτή η προσέγγιση διπλής επιβεβαίωσης πραγματοποιήθηκε για να καθορίσει ορθότερα την παρουσία ή απουσία του παθογόνου στα υπό εξέταση δείγματα.

Οι βιοχημικές δοκιμές (δοκιμή κινητικότητας, δοκιμή αιμόλυσης, ζύμωση ραμνόζης και ξυλόζης) πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το ISO 11290-1:1996/ Amd.1:2004 (ISO, 2004a) (παρ. 3.3.3.2), ενώ για την μοριακή ανάλυση διεξήχθη PCR με βάση το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε από τους D'Agostino και συν. (2004) (παρ. 3.3.3.3.1).

3.3.3.1 Απομόνωση χαρακτηριστικών αποικιών του μικροοργανισμού

Για τη διεξαγωγή των παραπάνω αναλύσεων, από το κάθε ύποπτο ως προς την παρουσία της *L. monocytogenes* δείγμα, απομονώνονταν τουλάχιστον πέντε χαρακτηριστικές μεμονωμένες αποικίες από τα χρησιμοποιούμενα επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (**Κεφάλαιο 1- Εικόνα 3**). Σε περίπτωση όπου ο αριθμός των αποικιών και των δυο επαναλήψεων του ίδιου υποστρώματος και δείγματος ήταν μικρότερος του πέντε, απομονώνονταν όλες οι αποικίες από τα τρυβλία. Έπειτα, ακολουθούσε καθαρισμός των απομονώσεων με διαδοχικές γραμμικές εξαπλώσεις σε άγαρ μη επιλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος έγχυσης καρδιακού ιστού (Brain Heart Infusion, BHI, LABM). Στη συνέχεια, οι απομονώσεις αυτές κωδικοποιούνταν και διατηρούνταν στους -20°C σε ζωμό (broth) BHI (LABM) που περιείχε 20% γλυκερόλη, έως τη διεξαγωγή των αναλύσεων. Πριν από τη διεξαγωγή οποιονδήποτε αναλύσεων προηγούνταν ανανέωση των απομονώσεων, κατά την οποία οι απομονώσεις αποψύχονταν και ανακαλλιεργούνταν δύο φορές σε ζωμό BHI στους 37 °C για 24 h.

3.3.3.2 Βιοχημικές δοκιμές

3.3.3.2.1 Ζύμωση σακχάρων

Όλα τα είδη του γένους *Listeria* spp. ζυμώνουν συγκεκριμένα σάκχαρα παράγοντας διάφορα οξέα, μεταξύ των οποίων το γαλακτικό και το οξικό οξύ. Η βιοχημική ταυτοποίηση των *Listeria* spp. μέσω της ζύμωσης σακχάρων στηρίζεται στην παραγωγή των οξέων που προκύπτουν από αυτή, όταν ο μικροοργανισμός τοποθετηθεί για ανάπτυξη σε συγκεκριμένη πηγή άνθρακα παρουσία δείκτη. Η παραγωγή των οξέων οδηγεί σε μείωση του pH και αυτό με τη σειρά του σε αλλαγή του χρώματος του δείκτη, επιβεβαιώνοντας εν τέλει την ύπαρξη και ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Δοκιμή ζύμωσης σακχάρων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανανέωση των απομονώσεων του παθογόνου που διατηρούνταν στους -20 °C. Ακολούθησε η παρασκευή της βάσης του θρεπτικού υλικού, με διάλυση πρωτεΐνης πεπτόνης, εκχυλίσματος κρέατος και χλωριούχου νατρίου σε νερό. Ρυθμίστηκε το pH στο 6.8 ± 0.2 και, τέλος, προστέθηκε ο δείκτης ιώδες της βρωμοκρεζόλης. Η βάση του θρεπτικού υλικού διαμοιράστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου και αργότερα πραγματοποιήθηκε η δοκιμή, και ακολούθησε αποστείρωσή της σε θερμοκρασία 121°C για 15 min.

Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα των σακχάρων D-ξυλόζης και L-ραμνόζης συγκέντρωσης 5%, αποστειρώθηκε με φίλτρο και έπειτα τα διαλύματα αυτά προστέθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν τη βάση, με τελική συγκέντρωση του σακχάρου 0.5%. Σκοπός ήταν για κάθε δείγμα να πραγματοποιηθεί η δοκιμή και για τα δύο σάκχαρα, επομένως παρασκευάστηκε ίσος αριθμός δοκιμαστικών σωλήνων που περιείχαν L-ραμνόζη και D-ξυλόζη.

Τέλος, προστέθηκε σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα δείγμα και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 24-48 h. Παράλληλα, προετοιμάστηκαν επιβεβαιωμένα θετικά και αρνητικά δείγματα, με ενοφθαλμισμό γνωστού στελέχους αναφοράς της *L. monocytogenes* στην πρώτη περίπτωση και χωρίς ενοφθαλμισμό στη δεύτερη περίπτωση. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα εξετάστηκαν για αλλαγή χρώματος από ιώδες σε κίτρινο, ώστε να καταγραφούν τα θετικά και τα αρνητικά ως προς την παραγωγή οξέος δείγματα (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9 Ζύμωση σακχάρων, αρνητική αντίδραση (A), θετική αντίδραση (B)

Η βιοχημική ταυτοποίηση των πιο γνωστών ειδών του γένους *Listeria* βάσει των πηγών άνθρακα, φαίνεται στον **Πίνακα 2**, από τον οποίο καθορίζεται ότι το είδος *Listeria monocytogenes* παρουσιάζει θετική αντίδραση στη ζύμωση του σακχάρου L-ραμνόζη, και αρνητική αντίδραση στη ζύμωση του σακχάρου D-ξυλόζη.

Πίνακας 2 Βιοχημικός διαχωρισμός των ειδών του γένους *Listeria* spp. (ISO, 2014).

Είδη	Σάκχαρα		
	L-ραμνόζη	D-ξυλόζη	Μαννιτόλη
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-
<i>L. innocua</i>	V	-	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+	-
<i>L. seeligeri</i>	-	+	-
<i>L. welshimeri</i>	V	+	-
<i>L. grayi</i>	V	-	+
<i>L. fleischmannii</i>	+	+	+
<i>L. marthii</i>	-	-	+
<i>L. rocourtiae</i>	+	+	+
<i>L. weihenstephanensis</i>	+	+	-

+ περισσότερες από 90% θετικές αντιδράσεις

- αρνητική αντίδραση

V μεταβλητή αντίδραση εξαρτώμενη από το στέλεχος

3.3.3.2.2 Κινητικότητα

Η *Listeria monocytogenes*, όπως και όλα τα είδη του γένους *Listeria* spp., παρουσιάζει ικανότητα κίνησης μεταξύ των θερμοκρασιών 20 και 25 °C λόγω των περίτριχων μαστιγίων που διαθέτει (παρ. 1.3.1). Οι περίτριχες βλεφαρίδες του μικροοργανισμού οδηγούν σε γρήγορη και στροβιλώδη κίνησή του με ακαθόριστες περιστροφές προς όλες τις κατευθύνσεις. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, κατά τη δοκιμή η βακτηριακή κινητικότητα να παρατηρείται μακροσκοπικά μέσω της εξάπλωσης της ζώνης ανάπτυξης σε σχέση με τη γραμμή του

ενοφθαλμισμού. Παράλληλα, σημαντικό ρόλο παίζει και η ηλικία των καλλιεργειών του μικροοργανισμού, καθώς καλλιέργειες διάρκειας πολλών ημερών εμφανίζουν μικρότερη κινητικότητα σε σχέση με πρόσφατες καλλιέργειες διάρκειας λίγων ημερών (Prentice και Neaves, 1992).

Δοκιμή κινητικότητας

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανανέωση των απομονώσεων του παθογόνου που διατηρούνταν στους -20 °C. Τα στελέχη έπειτα ενοφθαλμίστηκαν σε ζωμό μη επιλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος TSBYE (Tryptic Soy Broth Yeast Extract, yeast extract 0,6%, LABM) και επωάστηκαν στους 25°C για 24 h. Παράλληλα, παρασκευάστηκε το θρεπτικό υπόστρωμα δοκιμής της κινητικότητας και ακολούθησε διαμοιρασμός του σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

Μετά το πέρας των 24 h, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός των στελεχών κατά μήκος του κέντρου των δοκιμαστικών σωλήνων, με χρήση εργαστηριακής βελόνας. Παράλληλα, προετοιμάστηκαν επιβεβαιωμένα θετικά δείγματα με ενοφθαλμισμό γνωστού στελέχους αναφοράς *L. monocytogenes*. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν για επώαση στους 25 °C για 48 h κι έπειτα εξετάστηκαν για εμφάνιση της χαρακτηριστικής αύξησης μορφής ‘ομπρέλας’ ή ‘ανεστραμμένου έλατου’ (Εικόνα 10).



Εικόνα 10 Δοκιμή κινητικότητας, θετική αντίδραση (+), αρνητική αντίδραση (-).

3.3.3.2.3 Αιμόλυση

Η αιμόλυση αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό ταξινόμησης ενός στελέχους *Listeria* όσον αφορά στο επίπεδο του είδους. Όπως έχει ήδη αναφερθεί (παρ.2.2.2), η λοιμογόνος δράση της *Listeria monocytogenes* οφείλεται στην παραγωγή της αιμολυσίνης LLO. Η αιμολυσίνη αυτή είναι υπεύθυνη για την πλήρη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων του αίματος (β-αιμόλυση). Από το γένος *Listeria*, οι μικροοργανισμοί *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* και *L. seeligeri* διαθέτουν ικανότητα παραγωγής LLO και επομένως έχουν αιμολυτική δράση

(Πίνακας 3) (Gouin και συν, 1994). Ως εκ τούτου, από μόνη της η εμφάνιση της αιμολυτικής ικανότητας ενός στελέχους δεν είναι αρκετή να επιβεβαιώσει το είδος του μικροοργανισμού, ενώ έχουν παρατηρηθεί και ελάχιστες απομονώσεις του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* χωρίς αιμολυτική ικανότητα.

Πίνακας 3 Βιοχημικός διαχωρισμός των πιο γνωστών ειδών *Listeria* spp, ως προς την ικανότητα αιμόλυσης προσαρμογή από Prentice και Neaves, 1992).

<i>Είδος</i>	<i>B- αιμόλυση</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+
<i>L. seeligeri</i>	(+) ^α
<i>L. ivanovii</i>	++ ^β
<i>L. innocua</i>	-
<i>L. welshimeri</i>	-
<i>L. grayi</i>	-
<i>L. murrayi</i>	-

^α (+): ασθενής αντίδραση

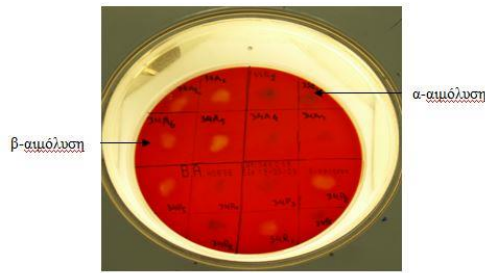
^β ++ : έντονη θετική αντίδραση

Γενικά, παρατηρούνται τρεις τύποι αιμόλυσης (**Εικόνα 11**):

β-αιμόλυση: Η β-αιμόλυση παρατηρείται μακροσκοπικά μέσω εμφάνισης κίτρινης και διαφανούς περιοχής στο ενοφθαλμισμένο αιματούχο άγαρ. Μία καθαρή ζώνη η οποία πλησιάζει το χρώμα και τη διαφάνεια της βάσης περιβάλλει την αποικία.

α-αιμόλυση: Η α-αιμόλυση είναι η μετατροπή της αιμογλοβίνης των ερυθρών κυττάρων σε μεθαιμογλοβίνη. Αυτό προκαλεί πράσινο ή καφέ αποχρωματισμό της βάσης. Περαιτέρω μελέτη της α-αιμόλυσης δείχνει ότι η κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι άθικτη, επομένως η α-αιμόλυση δεν είναι επί της ουσίας λύση.

γ-αιμόλυση: Η γ-αιμόλυση υποδεικνύει την απουσία αιμόλυσης. Μακροσκοπικά, δεν εμφανίζεται καμία αντίδραση στο τρυβλίο.



Εικόνα 11 Δοκιμή αιμόλυσης

Δοκιμή αιμόλυσης

Η δοκιμή πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία αιματούχου άγαρ από αίμα αλόγου. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανανέωση των στελεχών που διατηρούνταν στους -20°C . Ακολούθησε ενοφθαλμισμός με νύξη του υποστρώματος και εναπόθεση της βακτηριακής αποικίας. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται στο ίδιο τρυβλίο ενοφθαλμισμός πολλών ύποπτων αποικιών, συνήθως υπό μορφή πλέγματος (**Εικόνα 11**). Παράλληλα με τα υπό μελέτη δείγματα πραγματοποιήθηκε και ενοφθαλμισμός στελεχών αναφοράς *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* και *L. innocua*, καθώς το είδος *L. ivanovii* εμφανίζει έντονη αιμόλυση και το είδος *L. innocua* δεν εμφανίζει καθόλου. Στη συνέχεια, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 24 h και με το πέρας εξετάστηκαν για την εμφάνιση των χαρακτηριστικών περιοχών β-αιμόλυσης.

3.3.3.3 Μοριακές αναλύσεις

3.3.3.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία *in vitro* μέθοδος, η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένων αλληλουχιών DNA σε πολλά αντίγραφα και σύντομο χρονικό διάστημα, με χρήση κάποιων από τους μηχανισμούς αντιγραφής του ζωντανού κυττάρου. Η μέθοδος αυτή ανακοινώθηκε για πρώτη φορά το 1983 από τον δρ. Kary Banks Mullis, ο οποίος και τιμήθηκε γι' αυτήν του την εφεύρεση με βραβείο Νόμπελ, το 1993 (Shampo και Kyle, 2002). Αποτελεί την πρώτη μέθοδο που αναπτύχθηκε για το σκοπό αυτό και βασίζεται στην επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται και στην ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, προσφέροντας μεγάλη ευαισθησία, αξιοπιστία και ταχύτητα κατά την επιβεβαίωση της παρουσίας των παθογόνων στα δείγματα.

Βασισόμενες στην ιδέα της συμβατικής PCR, αναπτύχθηκαν στη πορεία και άλλες μέθοδοι οι οποίες αποτελούν παραλλαγές της αρχικής μεθόδου, όπως είναι η συνδυαστική PCR

(multiplex PCR), η PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), η PCR επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-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 θερμής εκκίνησης (Hot Start-PCR) και η PCR ηλεκτροφόρησης πηκτής με βαθμίδωση αποδιατακτικού παράγοντα (PCR-DGGE).

Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

I. Προετοιμασία δειγμάτων για μοριακή ταυτοποίηση

Για τη διεξαγωγή των μοριακών αναλύσεων ακολουθήθηκαν αρχικά οι εξής ενέργειες στα ύποπτα ως προς την παρουσία του παθογόνου δείγματα:

- Απόψυξη
- Ενοφθαλμισμός σε ζωμό γενικού θρεπτικού υποστρώματος BHI
- Επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 24 h
- Φυγοκέντρηση 10 min στις 3500 rpm
- Έκπλυση της βιομάζας με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaPBS)
- Επαναίωση της βιομάζας με χρήση vortex
- Φυγοκέντρηση 10 min στις 3500 στροφές
- Έκπλυση της βιομάζας με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaPBS)
- Επαναίωση της βιομάζας με χρήση vortex
- Φυγοκέντρηση 10 min στις 3500 rpm
- Απόρριψη του υπερκειμένου και μεταφορά του ιζήματος σε σωλήνες eppendorf

II. Απομόνωση του DNA

Μετά από την προετοιμασία των υπό μελέτη δειγμάτων, ακολούθησε απομόνωση του DNA του μικροοργανισμού, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τους Querol και συν. (1992), με τροποποιήσεις:

- Αιώρηση της βιομάζας σε 1 mL διαλύματος σορβιτόλης (Sorbitol 1M)-αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA 0.1 M), τελικού pH 7.5
- Λύση κυττάρων με χρήση υπερήχων (50W, 7 min, συνεχόμενα)
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min
- Διάλυση του ιζήματος με προσθήκη 0.5 mL διαλύματος τρι-υδροξυμεθυλ-αμινομεθανίου με συμπυκνωμένο υδροχλώριο (Tris-HCl 50 mM)- EDTA 20 mM, τελικού pH 7.4
- Προσθήκη 50 µL δωδεκyl-θεικού νατρίου (10% SDS) και επώαση στους 65°C, για 30 min
- Προσθήκη 0.2 mL οξικού καλίου 5 M και μεταφορά σε πάγο για 30 min
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min
- Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό Eppendorf

- Προσθήκη 1 mL καθαρής ισοπροπανόλης (99%) και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 0.5 mL αιθανόλης 70%
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min
- Απόρριψη του υπερκείμενου και παραμονή στους 50 °C έως την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης
- Αιώρηση του ιζήματος σε 50 μL δις απεσταγμένο νερό

III. Ποσοτικοποίηση DNA

Μετά από την απομόνωση του DNA των στελεχών του παθογόνου ακολούθησε ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του γενετικού υλικού που απομονώθηκε, ώστε να εκτιμηθεί η επιτυχία της απομόνωσης του DNA σε κάθε δείγμα. Ο προσδιορισμός αυτός επιτεύχθηκε με χρήση νανοφωτόμετρου (P 300, Implen, Munich, Germany), με το οποίο έγινε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) του κάθε διαλύματος. Η απομόνωση κρινόταν ως επαρκής, όταν η ποσότητα του DNA κυμαινόταν από 5-800 ng/μL.

Η πιο συνηθισμένη τεχνική ποσοτικοποίησης και ποιοτικού ελέγχου του DNA, περιλαμβάνει μέτρηση απορρόφησης στα 260 και 280 nm. Τα 260nm είναι το μήκος κύματος που απορροφά το DNA και τιμή απορρόφησης στα συγκεκριμένο μήκος κύματος που ισούται με 1, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 μg/mL. Επιπρόσθετα, ο λόγος των μηκών κύματος A_{260}/A_{280} καθορίζει την καθαρότητα των δειγμάτων. Ως εκ τούτου, για την διεξαγωγή συμπεράσματος χρησιμοποιήθηκε η απορρόφηση στο μήκος κύματος 260 nm (εκτίμηση ποσότητας) και ο λόγος των απορροφήσεων στα 260 και 280 nm (εκτίμηση ποιότητας).

Γενικά, η απορρόφηση στα 260 nm πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0.1 και 1.2, με βέλτιστες τιμές 0.5 και 0.6. Σε περίπτωση που οι τιμές ήταν μεγαλύτερες του 1.2 θεωρούνταν ότι υπήρχε μεγάλη ποσότητα DNA στο δείγμα, η οποία ήταν πιθανό να δημιουργήσει μετέπειτα προβλήματα στην ομαλή διεξαγωγή της PCR. Για τον λόγο αυτό, ακολουθούσε αραίωση του δείγματος με δις απεσταγμένο νερό μέχρι η τιμή της απορρόφησης να είναι εντός των επιθυμητών ορίων. Αντιθέτως, σε περίπτωση που οι τιμές ήταν μικρότερες του 0.1 θεωρούνταν ότι δεν είχε απομονωθεί επαρκής ποσότητα γενετικού υλικού και ακολουθούσε επανάληψη της διαδικασίας απομόνωσης του DNA για τα συγκεκριμένα δείγματα.

Το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικώς καθαρό και κατάλληλο για να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση, όταν ο λόγος A_{260}/A_{280} κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1.8 και 2. Όταν ο λόγος είναι μικρότερος από 1.8, πιθανολογείται ύπαρξη πρωτεϊνών ή άλλων ενώσεων που απορροφούν στα 280 nm, ενώ όταν ο λόγος είναι μεγαλύτερος του 2 πιθανολογείται ύπαρξη υπολειμμάτων χλωροφορμίου ή φαινόλης, αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται σε ορισμένα

πρωτόκολλα απομόνωσης DNA. Επειδή στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο δεν χρησιμοποιήθηκε κανένα από τα παραπάνω αντιδραστήρια, λόγος μεγαλύτερος από 2 θεωρούνταν ένδειξη καθαρότητας του δείγματος.

IV. Προετοιμασία μείγματος (master mix) για την διεξαγωγή της PCR

Έπειτα από την απομόνωση και ποσοτικοποίηση του DNA των υπό μελέτη στελεχών, ακολούθησε η παρασκευή μείγματος αντιδραστηρίων (master mix), εντός του οποίου θα πραγματοποιούνταν η διεξαγωγή της PCR. Στόχος ήταν η προετοιμασία των δειγμάτων για τον εντοπισμό τμήματος χαρακτηριστικής αλληλουχίας του γονιδιώματος της *Listeria monocytogenes*. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του μείγματος είναι τα ακόλουθα:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα 1×** (10× Reaction Buffer MgCl₂ free, Biotools, Madrid, Spain). Το ρυθμιστικό διάλυμα παρέχει τις βέλτιστες συνθήκες υβριδισμού και πολυμερισμού.
- **dNTP mix** (μείγμα τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων) **0.2 mM** (Peqlab, Erlangen, Germany). Τα τέσσερα 5'-τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP και dTTP) αποτελούν τις δομικές μονάδες των νουκλεϊκών οξέων και είναι απαραίτητα, καθώς χωρίς αυτά δε θα ήταν δυνατή η επιμήκυνση των νέων συμπληρωματικών κλώνων DNA. Συνήθως, η συγκέντρωση του καθενός κυμαίνεται μεταξύ 20-200 μM, ενώ σε περίπτωση συγκέντρωσης μεγαλύτερης από τη βέλτιστη αυξάνεται η πιθανότητα εσφαλμένου υβριδισμού.
- **Μόρια εκκινητές** (primers) **0.3 μM**. Τα μόρια εκκινητές είναι μικρά μόρια DNA σχεδιασμένα κατάλληλα ώστε με τον υβριδισμό τους να εντοπίζουν, να συνδέονται και να οριοθετούν το τμήμα-στόχο του DNA. Για την πραγματοποίηση της πλειοψηφίας των αντιδράσεων είναι συνήθως απαραίτητη η ύπαρξη ενός ζεύγους μορίων εκκινητών. Το μήκος των μορίων εκκινητών ενός ζεύγους πρέπει να είναι περίπου το ίδιο και να κυμαίνεται από 17 μέχρι 30 νουκλεοτίδια. Επιπλέον, τα δύο μόρια εκκινητές πρέπει να έχουν διαφορετική αλληλουχία, η οποία να είναι συμπληρωματική ως προς εκείνη που βρίσκεται στο 3' άκρο της μίας εκ των δύο αντιπαράλληλων αλυσίδων του μητρικού DNA, ώστε το κάθε μόριο να υβριδίζεται σε διαφορετικό κλώνο. Τα μόρια εκκινητές δεν πρέπει να περιέχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες, ώστε να αποφεύγεται η πιθανότητα υβριδισμού μεταξύ τους, ενώ η θερμοκρασίες υβριδισμού τους πρέπει να είναι πρακτικά οι ίδιες. Η παρουσία τους είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή της PCR, καθώς είναι αυτοί που οριοθετούν το τμήμα εκείνο στο οποίο θα ξεκινήσει η διαδικασία σύνθεσης αντιγράφων εφόσον η DNA πολυμεράση δεν είναι ικανή να συνθέσει εκ νέου καινούρια αλυσίδα DNA.
- **Taq πολυμεράση** (DNA polymerase, Biotools) **1 Unit**. Η Taq πολυμεράση αποτελεί το ένζυμο που πραγματοποιεί την αντιγραφή του DNA *in vivo* και *in vitro*. Για να δράσει, απαιτεί την παρουσία μονόκλωνου μητρικού DNA, καθώς και την παρουσία 5'-

τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων. Πραγματοποιεί την προσθήκη μονονουκλεοτιδίων στο ελεύθερο 3' άκρο των μορίων εκκινητών και συνεχίζει την προσθήκη των τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων με κατεύθυνση 5'-3', με αποτέλεσμα να επιμηκύνονται τα μόρια εκκινητές και να συντίθενται δύο νέες αλυσίδες DNA, συμπληρωματικές ως προς τις μητρικές. Τα τελευταία χρόνια, ως ένζυμο χρησιμοποιείται η θερμοανθεκτική DNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση (*Taq*) που απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Taq*).

- **MgCl₂ 2.5 mM** (Biotools). Τα ιόντα μαγνησίου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, καθώς είναι συμπαράγοντες των θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών. Η βέλτιστη συγκέντρωσή τους επηρεάζεται από τη συγκέντρωση των dNTP's, καθώς υπάρχει ισομοριακή αντίδραση μεταξύ τους. Ωστόσο, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου τόσο αυξάνεται και ο ρυθμός σφάλματος της πολυμεράσης. Η βέλτιστη ενεργότητα της *Taq* πολυμεράσης, παρατηρείται σε συγκέντρωση ελεύθερων ιόντων μαγνησίου μεταξύ 1.2 και 1.3 mM.
- **Δις απεσταγμένο νερό (dd H₂O)**. Το απεσταγμένο νερό χρησιμοποιείται ώστε να συμπληρώνεται ο επιθυμητός όγκος της αντίδρασης.

Η παρασκευή του μείγματος ήταν κοινή για όλα τα δείγματα και έγινε με βάση τον αριθμό των δειγμάτων που προορίζονταν για PCR. Για κάθε δείγμα υπολογίστηκε όγκος αντίδρασης 20 μL εκ των οποίων 18 μL ήταν μείγμα (master mix) και 2 μL ήταν δείγμα.

Ως εκκινητές, χρησιμοποιήθηκαν τα μόρια LIP 1 και LIP 2 (**Πίνακας 4**), τα οποία στόχευαν τμήμα του γονιδίου *prfA* (παρ. 2.2.2). Οι εκκινητές LIP 1 και LIP 2 κατευθύνονταν με αντίθετη φορά, υβριδίζοντας την αλληλουχία DNA του γονιδίου *prfA* από το νουκλεοτίδιο 634 έως το 654 και από το 886 έως το 908 αντίστοιχα. Επομένως, σε περίπτωση παρουσίας της *Listeria monocytogenes* αναμενόμενη ήταν η πραγματοποίηση αντιγραφής της αλληλουχίας του συγκεκριμένου τμήματος, μεγέθους 274 ζευγών βάσεων (base pairs, bp).

Πίνακας 4 Αλληλουχίες των μορίων εκκινητών και μέγεθος της περιοχής-στόχου του γονιδιώματος που επιλεχθήκαν για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* (D' Agostino και συν., 2004).

Μικροοργανισμός	Γονίδιο	Μόρια εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Μέγεθος
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>prfA</i>	LIP 1	GATACAGAAACATCGGTTGGC	274 bp
		LIP 2	GTGTAACCTTGATGCCATCAGG	

Διεξαγωγή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

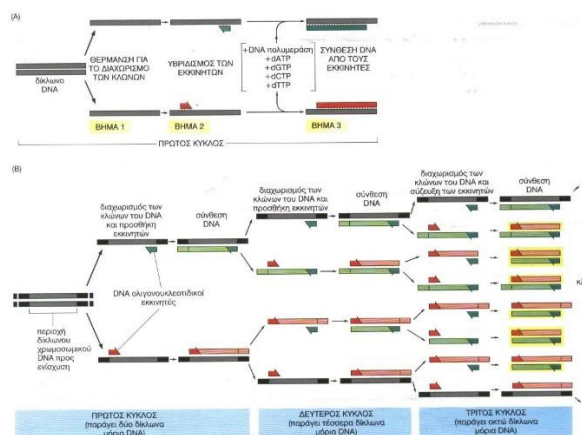
Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η τεχνική της PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών απλών αντιδράσεων, οι οποίες διαφέρουν στη θερμοκρασία και στο χρόνο (Mullis και συν., 1994). Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια (**Εικόνα 12**):

1) **Στάδιο αποδιάταξης του δίκλωνου DNA** (denaturation). Κατά το πρώτο στάδιο το DNA υποβάλλεται σε θερμοκρασία περίπου 94° C, προκειμένου να επιτευχθεί αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA.

2) **Στάδιο υβριδισμού εκκινητών** (primer annealing). Κατά το δεύτερο στάδιο, η θερμοκρασία μειώνεται και τα μόρια εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μητρικό μόριο DNA. Η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα ο υβριδισμός μπορεί να κυμαίνεται από 45 έως 60 °C, ανάλογα με το μήκος και την αλληλουχία των μορίων εκκινητών καθώς και το επιθυμητό επίπεδο εξειδίκευσης της αντίδρασης.

3) **Στάδιο επιμήκυνσης εκκινητών** (extension). Κατά το τελευταίο στάδιο, λαμβάνει χώρα η επιμήκυνση του μορίου εκκινητή και ως εκ τούτου και η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου του μητρικού DNA. Η θερμοκρασία κατά το στάδιο αυτό ρυθμίζεται στους 72 °C, όπου παρατηρείται και η μέγιστη δραστηριότητα της DNA-εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης *Taq*.

Η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται έπειτα από την επανάληψη του παραπάνω κύκλου 30-40 φορές, που έχει ως αποτέλεσμα την εκθετική παραγωγή αντιγράφων του DNA-στόχου.



Εικόνα 12 Στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης: περιγραφή του πρώτου κύκλου αντίδρασης (A) και περιγραφή των βημάτων αντιγραφής των δίκλωνων μορίων κατά τη διάρκεια των τριών πρώτων κύκλων (B).

Έπειτα από την προετοιμασία μείγματος, τα 20 μ L αντίδρασης κάθε δείγματος μεταφέρθηκαν εντός PCR tubes σε μηχανήμα θερμοκυκλοποιητή (PTC-200 Thermo Cycler,

MJ Research, Waltham, Massachusetts, U.S.A). Ο θερμοκυκλοποιητής είναι ένα μηχάνημα, το οποίο έχει την ικανότητα να αυξομειώνει τη θερμοκρασία με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια. Αποτέλεσμα αυτού, είναι να ρυθμίζονται οι θερμοκρασίες των περιεκτών που τοποθετούνται στο μηχάνημα, ανάλογα με το πρόγραμμα που εισάγεται σε αυτό κάθε φορά. Η καθορισμένη αυξομείωση της θερμοκρασίας οδηγεί στην επανάληψη των τριών θερμοκρασιακών σταδίων, με αποτέλεσμα την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή της PCR ήταν το εξής:

1. 94°C για 2 min
 2. 94°C για 30 sec
 3. 55°C για 30 sec
 4. 72°C για 1 min
 5. 74°C για 5 min
- } ×40 φορές

3.3.3.3.2 Ηλεκτροφόρηση

Η αξιολόγηση των προϊόντων της PCR γίνεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση είναι μία ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων. Κατά την ηλεκτροφόρηση, διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε ένα μέσο στο οποίο έχει τοποθετηθεί το προς ανάλυση δείγμα. Αποτέλεσμα αυτού, είναι τα φορτισμένα σωματίδια να κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με ταχύτητες διαφορετικές, ανάλογες με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογες με το μέγεθός τους. Έτσι, τα μικρότερα και τα περισσότερο φορτισμένα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και τα λιγότερο φορτισμένα μόρια απομακρύνονται λιγότερο από αυτό, με αποτέλεσμα να επέρχεται διαχωρισμός τους.

Το DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που αποτελούν βασική δομική του μονάδα. Επομένως, σε έκθεσή του σε ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς τον θετικό πόλο. Η ταχύτητα με την οποία κινείται προς αυτόν εξαρτάται από την αντίσταση την οποία συναντά, και επομένως από την σύσταση της πηκτής, αλλά και από το μέγεθός του, καθώς όσο μεγαλύτερο είναι το τμήμα του DNA τόσο μεγαλύτερο είναι και το φορτίο του.

Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Μετά την διεξαγωγή της PCR, παρασκευάστηκε πηκτή αгарόζης 1.5%, με βοήθεια για την τοποθέτηση των δειγμάτων. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 3 μL χρωστικής (6x loading dye buffer), για να γίνεται ορατά αντιληπτή η κίνηση των δειγμάτων εντός της

πηκτής κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Έπειτα, αφού τοποθετήθηκαν 3 μL μάρτυρα μοριακών βαρών (ladder) (Peqlab, Erlangen, Germany) στο πρώτο βοθρίο και 15 μL από κάθε δείγμα εντός των υπολοίπων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση με σταθερή παροχή ρεύματος 100V για μιάμιση ώρα. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών χρησιμοποιείται ως δείκτης μεγέθους των τμημάτων που προκύπτουν από την PCR και είναι απαραίτητος για την διεξαγωγή των τελικών συμπερασμάτων, καθώς περιέχει τμήματα αλληλουχιών γνωστού μήκους βάσεων. Μετά την ηλεκτροφόρηση, ακολούθησε χρώση με εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα 10 mg/mL βρωμιούχου αιθιδίου, για 20-30 min. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ένα μόριο το οποίο έχει τη δυνατότητα να εισέρχεται και να παγιδευεται μεταξύ των ζευγών της διπλής έλικας του DNA και φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (260-300nm). Τέλος, η ηλεκτροφορημένη πηκτή τοποθετήθηκε εντός του μηχανήματος Molecular Imager® GelDoc™ XR system (Bio-Rad Hercules, California, U.S.A) και μέσω του λογισμικού Image Lab™ (Bio-Rad) ακολούθησε φωτογράφησή της υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, κατά την οποία τα τμήματα του DNA που είχαν αντιγραφεί ήταν πλέον ορατά λόγω φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου.

3.3.4 Μελέτη χαρακτηριστικών επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων και υπολογισμός επιπολασμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*

3.3.4.1 Χαρακτηριστικά επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων (αιτιοκρατική προσέγγιση)

Γενικά, υπάρχουν πολλά χαρακτηριστικά που μπορούν να περιγράψουν την ποιότητα και τη χρησιμότητα ενός διαγνωστικού τεστ. Η διαγνωστική ακρίβεια αποτελεί ένα τέτοιο χαρακτηριστικό και η μελέτη αυτής πραγματοποιείται έπειτα από τον υπολογισμό συγκεκριμένων παραμέτρων όπως η ευαισθησία, η εξειδίκευση, οι τιμές πρόβλεψης θετικού και αρνητικού αποτελέσματος, οι λόγοι πιθανοφάνειας θετικού και αρνητικού αποτελέσματος, η χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας και η περιοχή κάτω από την καμπύλη λειτουργίας (Eusebi, 2013), όπου:

- **Ευαισθησία** (Sensitivity, *Se*). Εκφράζει την πιθανότητα η μέθοδος/υπόστρωμα να παράγει ένα αληθώς θετικό αποτέλεσμα, όταν χρησιμοποιείται σε θετικό δείγμα (ποσοστό θετικών δειγμάτων).
- **Εξειδίκευση** (Specificity, *Sp*). Εκφράζει την πιθανότητα η μέθοδος/υπόστρωμα να παράγει ένα αληθώς αρνητικό αποτέλεσμα, όταν χρησιμοποιείται σε αρνητικό δείγμα (ποσοστό αρνητικών δειγμάτων).

- **Τιμή πρόβλεψης θετικού αποτελέσματος** (Positive Predictive Value, *PPV*). Εκφράζει την πιθανότητα ένα θετικό δείγμα σύμφωνα με τη μέθοδο/υπόστρωμα, να είναι πράγματι θετικό.
- **Τιμή πρόβλεψης αρνητικού αποτελέσματος** (Negative Predictive Value, *NPV*). Εκφράζει την πιθανότητα ένα αρνητικό δείγμα σύμφωνα με τη μέθοδο/υπόστρωμα, να είναι πράγματι αρνητικό.
- **Λόγος πιθανοφάνειας θετικού αποτελέσματος** (Positive Likelihood Ratio, *PLR*). Εκφράζει την αναλογία πιθανοτήτων ένα θετικό αποτέλεσμα να παρατηρηθεί σε θετικό δείγμα, σε σύγκριση με τη πιθανότητα το ίδιο αποτέλεσμα να παρατηρηθεί σε αρνητικό δείγμα. Εκφράζει δηλαδή την πιθανότητα το αποτέλεσμα να προέρχεται από θετικό ως προς την παρουσία του μικροοργανισμού δείγμα.
- **Λόγος πιθανοφάνειας αρνητικού αποτελέσματος** (Negative Likelihood Ratio, *NLR*). Εκφράζει την αναλογία πιθανοτήτων ένα αρνητικό αποτέλεσμα να παρατηρηθεί σε θετικό δείγμα, σε σύγκριση με τη πιθανότητα το ίδιο αποτέλεσμα να παρατηρηθεί σε αρνητικό δείγμα. Εκφράζει δηλαδή την πιθανότητα το αποτέλεσμα να προέρχεται από αρνητικό ως προς την παρουσία του μικροοργανισμού δείγμα.
- **Χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας** (Receiving Operating Characteristic curve, *ROC* curve). Καταδεικνύει τη σχέση μεταξύ αληθώς και ψευδώς θετικών δειγμάτων, κι επομένως τη διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου/ υποστρώματος.
- **Περιοχή κάτω από τη χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας** (Area Under Curve, *AUC*). Αποτελεί παγκόσμιο μέτρο έκφρασης της ακρίβειας της μεθόδου/υποστρώματος.

Όπως προαναφέρθηκε, η τιμή *Se* εκφράζει την πιθανότητα ένα δείγμα να ανιχνευθεί ως θετικό, δεδομένης της παρουσίας του μικροοργανισμού-στόχου σε αυτό, ενώ η *S_p* αντιστοιχεί στην πιθανότητα ένα δείγμα να ανιχνευθεί ως αρνητικό, δεδομένης της απουσίας του μικροοργανισμού από αυτό. Ο δείκτης *Se* ενός θρεπτικού υποστρώματος ή μίας μεθόδου οφείλει να είναι υψηλός, αν το προς ανίχνευση τροφιμογενές παθογόνο αποτελεί σοβαρό παράγοντα κινδύνου για τον άνθρωπο. Οι δείκτες *Se* και *S_p* είναι ανεξάρτητοι από τον επιπολασμό του μικροοργανισμού-στόχου και επομένως αρκετά σταθεροί και ικανοί να χαρακτηρίζουν μια μέθοδο ανίχνευσης, δίνοντας μια γενική εκτίμηση της ποιότητας των αποτελεσμάτων της (Thrusfield, 2007).

Αντίθετα με την ευαισθησία και την εξειδίκευση, οι δείκτες *PPV* και *NPV*, οι οποίοι εκφράζουν αντίστοιχα την πιθανότητα παρουσίας και απουσίας του παθογόνου μετά τον έλεγχο με κάποιο θρεπτικό υπόστρωμα, εξαρτώνται από τον επιπολασμό του μικροοργανισμού-στόχου. Ως εκ τούτου, οι τιμές πρόβλεψης μίας μελέτης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται σε άλλες μελέτες όπου ο επιπολασμός και τα δεδομένα είναι διαφορετικά.

Γενικά, με την αύξηση του επιπολασμού του μικροοργανισμού-στόχου στα υπό μελέτη δείγματα, η τιμή *PPV* αυξάνεται ενώ η τιμή *NPV* μειώνεται (Eusebi, 2013).

Ο λόγος πιθανότητας εκφράζει την πιθανότητα το αποτέλεσμα της μεθόδου να προέρχεται από θετικό (*PLR*) ή αρνητικό (*NLR*), ως προς την παρουσία του μικροοργανισμού, δείγμα. Η μέθοδος με τη μεγαλύτερη τιμή *PLR* συνηγορεί περισσότερο υπέρ της παρουσίας του μικροοργανισμού στην περίπτωση εμφάνισης θετικού αποτελέσματος. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη του 1 είναι η τιμή *PLR*, τόσο πιο βέβαια είναι η παρουσία του μικροοργανισμού-στόχου στα δείγματα, ενώ σε περίπτωση που η τιμή είναι ίση με 1, η μέθοδος δεν είναι ικανή να διαχωρίσει τα θετικά από τα αρνητικά δείγματα. Αντίθετα, η καλύτερη μέθοδος για τον αποκλεισμό της παρουσίας του μικροοργανισμού σε περίπτωση εμφάνισης αρνητικού αποτελέσματος, είναι εκείνη με τη χαμηλότερη τιμή *NLR* (<1). Επιπλέον, το μεγάλο πλεονέκτημα των δεικτών αυτών, είναι ότι δεδομένου ότι υπολογίζονται μέσω των τιμών της ευαισθησίας και της εξειδίκευσης (3.5 & 3.6), δεν εξαρτώνται από τον επιπολασμό του μικροοργανισμού-στόχου (Eusebi, 2013).

Το σχήμα της χαρακτηριστικής καμπύλης λειτουργίας *ROC* και η περιοχή κάτω από την καμπύλη *AUC*, βοηθούν στο να εκτιμηθεί η διακριτική ικανότητα μιας μεθόδου. Όσο πιο κοντά βρίσκεται η καμπύλη στην επάνω αριστερή γωνία των αξόνων και όσο μεγαλύτερη είναι η περιοχή κάτω από την καμπύλη, τόσο καλύτερη είναι μέθοδος στο να διακρίνει τα θετικά από τα αρνητικά δείγματα. Η *AUC* κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0 και 1 και αποτελεί δείκτη αξιοπιστίας της δοκιμής. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της *AUC*, τόσο καλύτερη είναι η μέθοδος/ υπόστρωμα στο να διαχωρίζει τα θετικά από τα αρνητικά δείγματα. Επομένως, μία τέλεια διαγνωστική εξέταση έχει *AUC* ίση με 1, ενώ τιμή ίση ή μικρότερη από 0.5 υποδηλώνει μηδενική διακριτική ικανότητα της μεθόδου/υποστρώματος (Eusebi, 2013).

Μελέτη χαρακτηριστικών επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων (αιτιοκρατική προσέγγιση)

Κάθε εξεταζόμενο δείγμα χαρακτηρίστηκε ως αρνητικό ή πιθανώς θετικό ως προς την παρουσία της *L. monocytogenes*, βάσει των αποτελεσμάτων των θρεπτικών υποστρωμάτων (παρ. 3.3.3). Η επιβεβαίωση της παρουσίας ή απουσίας του παθογόνου στα πιθανώς θετικά δείγματα προέκυψε έπειτα από τη σύγκριση των παραπάνω αποτελεσμάτων με το πρότυπο σύγκρισης (αποτελέσματα βιοχημικών και μοριακών αναλύσεων). Η σύγκριση αυτή οδήγησε στην ταξινόμηση των δειγμάτων σε τέσσερις κατηγορίες: i) αληθώς θετικά (true positive, *TP*), ii) ψευδώς θετικά (false positive, *FP*), iii) αληθώς αρνητικά (true negative, *TN*) και iv) ψευδώς αρνητικά (false negative, *FN*) δείγματα. Στα αληθώς θετικά ταξινομήθηκαν τα επιβεβαιωμένα θετικά δείγματα, στα ψευδώς θετικά τα μη επιβεβαιωμένα θετικά δείγματα, στα αληθώς αρνητικά τα επιβεβαιωμένα αρνητικά δείγματα και στα ψευδώς αρνητικά τα μη επιβεβαιωμένα αρνητικά δείγματα. Η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων στις παραπάνω ομάδες επέτρεψε τον

υπολογισμό των χαρακτηριστικών επίδοσης των δύο χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υποστρωμάτων (ALOA και RAPID[®]L.mono), με τη χρήση των παρακάτω εξισώσεων (Thrusfield και συν., 2001· Glas και συν., 2003· Stevenson, 2005· Thrusfield, 2007):

$$Se = TP / (TP + FN) \quad (3.1)$$

$$Sp = TN / (TN + FP) \quad (3.2)$$

$$PPV = TP / (TP + FP) \quad (3.3)$$

$$NPV = TN / (TN + FN) \quad (3.4)$$

$$PLR = TP (TP+FN) / FP (FP+TN) \quad \acute{\eta} = Se / (1 - Sp) \quad (3.5)$$

$$NLR = FN (TP+FN) / TN (FP+TN) \quad \acute{\eta} = (1-Se) / Sp \quad (3.6)$$

Όλοι οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με χρήση των λογισμικών Win Episcople 2.0 (Thrusfield και συν., 2001· Thrusfield, 2007) και Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, Washington, U.S.A). Επιπλέον, οι τιμές *AUC* των δύο υπό μελέτη υποστρωμάτων συγκρίθηκαν μεταξύ τους με χρήση της ανά ζεύγη δοκιμής t-test, ώστε να καταδειχθεί ενδεχόμενη σημαντική διαφορά μεταξύ τους στο επίπεδο σημαντικότητας 0.05. Για τον καθορισμό της σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ των δύο υποστρωμάτων, χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμή χ^2 του McNemar (McNemar's chi-square test statistic) (Spiegel, 1956). Με βάση τη συγκεκριμένη μέθοδο, η υπολογιζόμενη τιμή χ^2 συγκρίνεται με την οριακή τιμή χ^2 στο επίπεδο σημαντικότητας 0.05 και η σύγκριση καταδεικνύει αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο τιμών. Υπολογιζόμενη τιμή μεγαλύτερη της οριακής δηλώνει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων. Παρόλα αυτά, η δοκιμή αυτή δεν είναι ικανή να κρίνει αν οι συγκρινόμενες μέθοδοι είναι ισοδύναμες ή όχι. Για την παραπάνω στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά SPSS 15.0 (SPSS, Inc. IBM, Armonk, New York) και Microsoft Excel 2007.

3.3.4.2 Μελέτη φαινομενικής και πραγματικής τιμής επιπολασμού (αιτιοκρατική προσέγγιση)

Ο φαινομενικός επιπολασμός (apparent prevalence, *ApP*) εκφράζει το ποσοστό των δειγμάτων που ανιχνεύονται θετικά ως προς την παρουσία του μικροοργανισμού-στόχου, σύμφωνα με το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε. Αντιθέτως, η πραγματική τιμή επιπολασμού (true prevalence, *TrP*) εκφράζει το ποσοστό των επιβεβαιωμένων θετικών (*TP*) και μη επιβεβαιωμένων αρνητικών (*FN*) δειγμάτων ως προς την παρουσία του μικροοργανισμού-στόχου, έπειτα από τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε και του προτύπου σύγκρισης. Συνεπώς, για κάθε μία από τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους ανίχνευσης προκύπτει ξεχωριστά μία τιμή *ApP*, σε αντίθεση με

την τιμή TrP , η οποία είναι μοναδική και προκύπτει από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων όλων των μεθόδων ανίχνευσης. Σε περίπτωση που δεν έχει υπάρξει επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από κάθε μέθοδο, η τιμή TrP μπορεί να υπολογιστεί από την τιμή ApP , δεδομένου ότι οι τιμές Se και Sp της κάθε μεθόδου είναι γνωστές, μέσω της εξίσωσης (Thrusfield, 2007· Stevenson, 2011):

$$TrP = (ApP + Sp - 1) / (Se + Sp - 1) \quad (3.7)$$

Υπολογισμός φαινομενικής και πραγματικής τιμής επιπολασμού της *L. monocytogenes* (αιτιοκρατική προσέγγιση)

Ο υπολογισμός του φαινομενικού επιπολασμού και της πραγματικής τιμής επιπολασμού του παθογόνου στα δείγματα ρόκας και αγγουριών, πραγματοποιήθηκε με χρήση των λογισμικών Win Episcope 2.0 (Thrusfield και συν., 2001· Thrusfield, 2007) και Microsoft Excel 2007.

3.3.4.3 *Μελέτη χαρακτηριστικών επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων μέσω Μπαγεσιανής ανάλυσης (στοχαστική προσέγγιση)*

Αρχικά, κάθε δείγμα ταξινομήθηκε σε μία από τις τέσσερις κατηγορίες (x_i) που περιεγράφηκαν παραπάνω (TP , FP , TN , FN). Κάθε κατηγορία χαρακτηριζόταν από την αντίστοιχη πιθανότητα (p_i). Ένεκα της πολυωνυμικής φύσης των δεδομένων λόγω της ταξινόμησής τους σε τέσσερις κατηγορίες, η περιγραφή της αβεβαιότητας των πιθανοτήτων των δεδομένων πραγματοποιήθηκε μέσω της κατανομής Dirichlet, η οποία χρησιμοποιείται συχνά για την περιγραφή πιθανοτήτων πολυωνυμικής μορφής (Vose, 2000). Η κατανομή αυτή αποτελεί μία γενικευμένη μορφή της κατανομής Βήτα, με παραμέτρους αντίστοιχες σε αριθμό με τις κατηγορίες της πολυωνυμικής κατανομής (Briggs και συν., 2003):

$$\{p_1, p_2, \dots, p_n\} = \text{Dirichlet} (\{x_1, x_2, \dots, x_n\}) \quad (3.8)$$

όπου x_1, x_2, \dots, x_n ο αριθμός των δειγμάτων που κατατάσσονται σε κάθε κατηγορία και p_1, p_2, \dots, p_n οι αντίστοιχες πιθανότητες.

Η Μπαγεσιανή ανάλυση κατασκευάζει τη μεταγενέστερη κατανομή Dirichlet (posterior), επικαιροποιώντας την προγενέστερη καθορισμένη κατανομή Dirichlet (prior) με βάση τα πολυωνυμικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, τα πειραματικά δεδομένα (observed data) προστίθενται στις προγενέστερες παραμέτρους και έτσι καθορίζονται τα χαρακτηριστικά της μεταγενέστερης κατανομής και οι μεταγενέστερες παράμετροι (Broemeling, 2007). Εν προκειμένω, χρησιμοποιήθηκε μία ομοιόμορφη (uniform) προγενέστερη κατανομή, η οποία υποδείκνυε ότι κάθε αποτέλεσμα ήταν εξ' ίσου πιθανό να συμβεί (Vose, 2000):

$$\{p_1, p_2, \dots, p_n\} = \text{Dirichlet} (\{1, 1, \dots, 1\}) \quad (3.9)$$

Η κατανομή Dirichlet κατασκευάστηκε μέσω δημιουργίας ξεχωριστών κατανομών Γάμμα για κάθε κατηγορία i , στην οποία είχε παρατηρηθεί ένας αριθμός δειγμάτων x_i , με μία κοινή κλιμακωτή παράμετρο β . Ως εκ τούτου, προέκυψε για κάθε κατηγορία η μεταγενέστερη κατανομή Γάμμα(x_i+1 , β) και στη συνέχεια, κάθε μία τέτοια κατανομή διαιρέθηκε με το άθροισμα των κατανομών Γάμμα όλων των κατηγοριών (**Πίνακας 5 και 6**) (Broemeling, 2007). Τέλος, μέσω των πιθανοτήτων p_i και μίας σειράς εξισώσεων που προτείνονται από τον Broemeling (2007) υπολογίστηκαν τα χαρακτηριστικά επίδοσης των χρησιμοποιούμενων μεθόδων. Η επικαιροποίηση των παραμέτρων της μεταγενέστερης κατανομής Dirichlet από την ομοιόμορφη προγενέστερη κατανομή, πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό WinBUGS v.1.4 (Spiegelhalter και συν., 2003) πραγματοποιώντας 100.000 επαναλήψεις (iterations).

Πίνακας 5 Μπαγεσιανή ανάλυση παραμέτρων της κατανομής Dirichlet με χρήση ομοιόμορφης προγενέστερης κατανομής, για τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μικροβιολογικές αναλύσεις στα δείγματα ρόκας.

<i>Παράμετροι</i>	<i>ALOA</i>	<i>RAPID'L mono</i>
<i>Προγενέστερη (prior) κατανομή</i>		
x_{TP}^p	1	1
x_{TN}^p	1	1
x_{FP}^p	1	1
x_{FN}^p	1	1
<i>Πειραματικά δεδομένα (observed data)</i>		
x_{TP}^o	7	3
x_{TN}^o	90	93
x_{FP}^o	3	0
x_{FN}^o	0	4
<i>Μεταγενέστερη (posterior) κατανομή</i>		
x_{TP}^{ps}	Γάμμα($x_{TP}^o + x_{TP}^p$, 1)	
x_{TN}^{ps}	Γάμμα($x_{TN}^o + x_{TN}^p$, 1)	
x_{FP}^{ps}	Γάμμα($x_{FP}^o + x_{FP}^p$, 1)	
x_{FN}^{ps}	Γάμμα($x_{FN}^o + x_{FN}^p$, 1)	
<i>Σύνολο</i>	Γάμμα($x_{TP}^o + x_{TP}^p$, 1) + Γάμμα($x_{TN}^o + x_{TN}^p$, 1) + Γάμμα($x_{FP}^o + x_{FP}^p$, 1) + Γάμμα($x_{FN}^o + x_{FN}^p$, 1)	
<i>Πιθανότητα</i>		
p_{TP}	$X_{TP}^{ps} / \text{Σύνολο}$	
p_{TN}	$X_{TN}^{ps} / \text{Σύνολο}$	
p_{FP}	$X_{FP}^{ps} / \text{Σύνολο}$	
p_{FN}	$X_{FN}^{ps} / \text{Σύνολο}$	

Πίνακας 6 Μπαγεσιανή ανάλυση παραμέτρων της κατανομής Dirichlet με χρήση ομοιόμορφης προγενέστερης κατανομής, για τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μικροβιολογικές αναλύσεις στα δείγματα αγγουριών.

<i>Παράμετροι</i>	<i>ALOA</i>	<i>RAPID'L. mono</i>
<i>Προγενέστερη (prior) κατανομή</i>		
x_{TP}^p	1	1
x_{TN}^p	1	1
x_{FP}^p	1	1
x_{FN}^p	1	1
<i>Πειραματικά δεδομένα (observed data)</i>		
x_{TP}^o	3	5
x_{TN}^o	94	93
x_{FP}^o	0	1
x_{FN}^o	3	1
<i>Μεταγενέστερη (posterior) κατανομή</i>		
x_{TP}^{ps}	Γάμμα($x_{TP}^o + x_{TP}^p$, 1)	
x_{TN}^{ps}	Γάμμα($x_{TN}^o + x_{TN}^p$, 1)	
x_{FP}^{ps}	Γάμμα($x_{FP}^o + x_{FP}^p$, 1)	
x_{FN}^{ps}	Γάμμα($x_{FN}^o + x_{FN}^p$, 1)	
<i>Σύνολο</i>	Γάμμα($x_{TP}^o + x_{TP}^p$, 1) + Γάμμα($x_{TN}^o + x_{TN}^p$, 1) + Γάμμα($x_{FP}^o + x_{FP}^p$, 1) + Γάμμα($x_{FN}^o + x_{FN}^p$, 1)	
<i>Πιθανότητα</i>		
p_{TP}	$X_{TP}^{ps} / \text{Σύνολο}$	
p_{TN}	$X_{TN}^{ps} / \text{Σύνολο}$	
p_{FP}	$X_{FP}^{ps} / \text{Σύνολο}$	
p_{FN}	$X_{FN}^{ps} / \text{Σύνολο}$	

3.3.4.4 Μπαγεσιανή μοντελοποίηση

Ο επιπολασμός του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών, τα χαρακτηριστικά επίδοσης Se και Sr που προκύπτουν από το συνδυασμό χρήσης των θρεπτικών υποστρωμάτων, καθώς και η ακριβής ποσοτική εκτίμηση του πληθυσμού του παθογόνου στα υπό μελέτη δείγματα, υπολογίστηκαν τελικώς μέσω Μπαγεσιανής ανάλυσης κατά την οποία αναπτύχθηκαν μοντέλα πρόβλεψης.

3.3.4.4.1 Μελέτη του επιπολασμού

Για την πραγματοποίηση της μελέτης αναπτύχθηκαν δύο Μπαγεσιανά μοντέλα πρόβλεψης σύμφωνα με τον Vose (2008). Το πρώτο μοντέλο πρόβλεψης (*M1*) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της πραγματικής τιμής επιπολασμού (*TrP*) βασιζόμενο στην φαινομενική τιμή επιπολασμού (*ApP*), στην ευαισθησία (*Se*) και στην εξειδίκευση (*Sr*)

κάθε μεθόδου ανίχνευσης. Η πιθανότητα ανίχνευσης του παθογόνου δόθηκε από τη διωνυμική κατανομή:

$$\text{BINOMIAL}(ApP, n) \quad (3.10)$$

όπου n είναι ο συνολικός αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν (100). Για την περιγραφή της TrP , χρησιμοποιήθηκε κατανομή Βήτα χωρίς προγενέστερη γνώση για τις παραμέτρους, δηλαδή Βήτα(1,1), με την παραδοχή ότι δεν υπήρχε καμία προηγούμενη γνώση σχετικά με την τιμή της. Όμοια, οι τιμές Se και Sp περιεγράφηκαν μέσω κατανομής Βήτα, με ενσωμάτωση όμως της προγενέστερης γνώσης που είχε ληφθεί από τις μικροβιολογικές αναλύσεις και την εφαρμογή της στοχαστικής προσέγγισης:

$$Se = \text{Βήτα}(\text{επιβεβαιωμένα θετικά δείγματα} + 1, \text{ αναμενόμενα θετικά δείγματα} - \text{επιβεβαιωμένα θετικά δείγματα} + 1) \quad (3.11)$$

$$Sp = \text{Βήτα}(\text{επιβεβαιωμένα αρνητικά δείγματα} + 1, \text{ αναμενόμενα αρνητικά δείγματα} - \text{επιβεβαιωμένα αρνητικά δείγματα} + 1) \quad (3.12)$$

όπου τα *επιβεβαιωμένα θετικά/αρνητικά δείγματα* ήταν τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά/αρνητικά με βάση το ALOA ή το RAPID'L.mono μετά τη διεξαγωγή των μεθόδων επιβεβαίωσης, ενώ τα *αναμενόμενα θετικά/αρνητικά δείγματα* ήταν ο συνολικός αριθμός δειγμάτων που επιβεβαιώθηκαν ως θετικά/αρνητικά από τις βιοχημικές δοκιμές και τη μοριακή μέθοδο ταυτοποίησης της *L. monocytogenes* (δηλ. η συνολική πραγματική τιμή επιπολασμού).

Οι κατανομές αβεβαιότητας των TrP , Se και Sp , συσχετίστηκαν με τη φαινομενική τιμή επιπολασμού ApP , σύμφωνα με την εξίσωση (Lesaffre και συν., 2007):

$$ApP = TrP \times Se + (1 - TrP) \times (1 - Sp) \quad (3.13)$$

Το δεύτερο μοντέλο ($M2$) χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί ξανά η TrP της *L. monocytogenes*, συνδυάζοντας όμως αυτή τη φορά τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παράλληλη χρήση των θρεπτικών υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L. mono. Σκοπός της δημιουργίας του δεύτερου μοντέλου ήταν η διερεύνηση της πιθανότητας πρόβλεψης του επιπολασμού του παθογόνου, με χρήση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τις μικροβιολογικές αναλύσεις, χωρίς περαιτέρω ανάγκη για επιβεβαίωση της παρουσίας του μέσω βιοχημικών δοκιμών και μοριακών αναλύσεων. Ο έλεγχος πολλαπλών δοκιμών που πραγματοποιήθηκε μέσω της παράλληλης χρήσης των υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L. mono επέτρεψε την ταξινόμηση του κάθε δείγματος σε τέσσερις νέες κατηγορίες, ως προς τα αποτελέσματα της παρουσίας της *L. monocytogenes*: αρνητικό-αρνητικό (όταν και στα δύο υποστρώματα δεν αναπτύσσονταν τυπικές αποικίες, nn), αρνητικό-θετικό (όταν αναπτύσσονταν μόνο στο δεύτερο υπόστρωμα τυπικές αποικίες, np), θετικό-αρνητικό (όταν αναπτύσσονταν μόνο στο πρώτο υπόστρωμα τυπικές αποικίες, pn) και θετικό-θετικό (όταν και στα δύο υποστρώματα αναπτύσσονταν τυπικές αποικίες, pp). Σε αυτό το μοντέλο, η πιθανότητα ανίχνευσης του παθογόνου δόθηκε από την πολυωνυμική κατανομή:

$$\text{MULTINOMIAL}(c_{1-4}, n) \quad (3.14)$$

όπου c_{1-4} αντιπροσώπευε τον αριθμό των δειγμάτων που αντιστοιχούσαν σε κάθε μία από τις παραπάνω κατηγορίες. Κάθε κατηγορία συσχετίστηκε με τις κατανομές αβεβαιότητας των TrP , Se και Sp σύμφωνα με το ακόλουθο σύνολο εξισώσεων:

$$c_1 = TrP \times (1 - Se_1) \times (1 - Se_2) + (1 - TrP) \times Sp_1 \times Sp_2 \quad (3.15)$$

$$c_2 = TrP \times (1 - Se_1) \times Se_2 + (1 - TrP) \times Sp_1 \times (1 - Sp_2) \quad (3.16)$$

$$c_3 = TrP \times Se_1 \times (1 - Se_2) + (1 - TrP) \times (1 - Sp_1) \times Sp_2 \quad (3.17)$$

$$c_4 = TrP \times Se_1 \times Se_2 + (1 - TrP) \times (1 - Sp_1) \times (1 - Sp_2) \quad (3.18)$$

Οι κατανομές αβεβαιότητας των TrP , Se_1 , Sp_1 , Se_2 και Sp_2 που χρησιμοποιήθηκαν στο M2 ήταν οι ίδιες με αυτές του M1, ενώ οι τιμές Se_1 , Sp_1 και Se_2 , Sp_2 αναφέρονται στο ALOA και RAPID[®]L.mono, αντίστοιχα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό WinBUGS v.1.4 (Spiegelhalter και συν., 2003), πραγματοποιώντας 100.000 επαναλήψεις (iterations) και η σύγκλιση των δύο μοντέλων ελέγχθηκε με αναφορά στα διαγνωστικά γραφήματα σύγκλισης των Gelman-Rubin.

3.3.4.4.2 Υπολογισμός συνδυασμένης ευαισθησίας και συνδυασμένης εξειδίκευσης

Σε συνέχεια του δεύτερου μοντέλου πρόβλεψης, εκτιμήθηκαν η συνδυασμένη ευαισθησία ($Se_{combined}$) και η συνδυασμένη εξειδίκευση ($Sp_{combined}$) των δύο θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, μέσω των εξισώσεων:

$$Se_{combined} = 1 - (1 - Se_1) \times (1 - Se_2) \quad (3.19)$$

$$Sp_{combined} = Sp_1 \times Sp_2 \quad (3.20)$$

Τέλος, υπολογίστηκαν δύο πιθανότητες σχετιζόμενες με τον παράλληλο έλεγχο δοκιμών (Thrusfield, 2007): i) η πιθανότητα να είναι ένα δείγμα θετικό, όταν το αποτέλεσμα της μεθόδου είναι αρνητικό (p)

$$p = [TrP \times (1 - Se_{combined})] / \{[TrP \times (1 - Se_{combined}) + [(1 - Trp) \times Sp_{combined}]]\} \quad (3.21)$$

και ii) η πιθανότητα αποτυχίας εντοπισμού τουλάχιστον ενός θετικού δείγματος, σε ένα πληθυσμό θετικό (p_f)

$$p_f = (1 - Se_{combined})^{TrP \times 100} \quad (3.22)$$

3.3.4.4.3 Μελέτη του πληθυσμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*

Η εκτίμηση των επιπέδων του παθογόνου στα δείγματα ρόκας και αγγουριών, πραγματοποιήθηκε μέσω κατασκευής ενός Μπαγεσιανού μοντέλου σύμφωνα με τον Vose (2008). Το μοντέλο δημιουργήθηκε στο Microsoft Excel 2007 και προσομοιώθηκε με το λογισμικό @Risk 4.5 (Palisades Corp., Ithaca, New York) για την κατασκευή των μεταγενέστερων κατανομών.

Συνολικά δημιουργήθηκαν τέσσερις στήλες δεδομένων. Η πρώτη στήλη περιλάμβανε τον πληθυσμό του παθογόνου (CFU ανά 25 g) από 0.05 έως 50.00, με εμφάνιση τιμών ανά 0.05. Η δεύτερη στήλη περιλάμβανε την ομοιόμορφη προγενέστερη κατανομή, η οποία ισούταν με 1 καθώς δεν υπήρχε καμία γνώση αναφορικά με τον πληθυσμό της *L. monocytogenes*. Η τρίτη στήλη περιλάμβανε την παράμετρο της πιθανοφάνειας, μια διωνυμική κατανομή που υποθέτει ότι κάθε δείγμα είναι ανεξάρτητο και έχει την ίδια πιθανότητα να είναι μολυσμένο από τον παθογόνο. Η σύνταξη της κατανομής αυτής στο Excel ήταν ή εξής:

$$\text{BINOMDIST}(s, n, p, c) \quad (3.23)$$

όπου s ήταν ο αριθμός θετικών δοκιμών ($s = \text{TP} + \text{FP}$, για τα υποστρώματα που εξετάζονταν ξεχωριστά και $s = np + pn + pp$, για τα υποστρώματα που εξετάζονταν σε συνδυασμό), n ο αριθμός των ανεξάρτητων δοκιμών ($n = 100$), p η πιθανότητα επιτυχίας σε κάθε δοκιμή και c η τιμή που καθόριζε τη μορφή της παραμέτρου της πιθανοφάνειας. Σε περίπτωση που $c = 1$, η κατανομή της εξίσωσης (3.23) δίνει τη συγκεντρωτική κατανομή για την παράμετρο, ενώ σε περίπτωση που $c = 0$, η κατανομή της εξίσωσης δίνει τη μαζική πιθανότητα της παραμέτρου. Στην περίπτωση μας, η τιμή c ήταν ίση με 0, οπότε η εξίσωση παρείχε την πιθανότητα να υπάρχουν s μiasμένα δείγματα σε ένα σύνολο n . Η τέταρτη στήλη περιλάμβανε τη μεταγενέστερη κατανομή:

$$\text{μεταγενέστερη} = \text{RiskMean} (\text{προγενέστερη} \times \text{πιθανοφάνεια}) \quad (3.24)$$

Με την υπόθεση ότι ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* ακολουθεί κατανομή Poisson ($\lambda \times q$), όπου λ είναι η μέση τιμή της συγκέντρωσης του παθογόνου στο δείγμα (CFU ανά 25 g) και q είναι η ποσότητα του δείγματος που αναλύθηκε (25 g), η πιθανότητα να βρίσκεται στο δείγμα των 25g τουλάχιστον ένα κύτταρο της *L. monocytogenes* ήταν $1 - \text{EXP}(-\lambda)$ (Vose, 2008). Ως εκ τούτου, η πιθανότητα p της διωνυμικής κατανομής (3.24) ήταν ίση με:

$$p = 1 - \text{EXP}(-\lambda \times q \times Se) \quad (3.25)$$

όπου λ ήταν ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* ίση κάθε φορά με τη την αντίστοιχη τιμή που αναφέρεται στο κελί της πρώτης στήλης και Se η ευαισθησία της κάθε μεθόδου ή η συνδυασμένη ευαισθησία που περιγράφεται από την κατανομή Βήτα, ενσωματώνοντας την προγενέστερη γνώση που προήλθε από τις μικροβιολογικές αναλύσεις (3.11).

3.3.5 Μελέτη βιοποικιλότητας

Αφού ολοκληρώθηκε η εξέταση των δειγμάτων για την παρουσία της *L. monocytogenes* μέσω των μικροβιολογικών (παρ. 3.3.2), βιοχημικών (παρ. 3.3.3.2) και μοριακών (3.3.3.3) αναλύσεων και ταυτοποιήθηκαν τα θετικά ως προς την παρουσία του παθογόνου δείγματα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της βιοποικιλότητας των απομονωθέντων στελεχών των θετικών δειγμάτων. Η μελέτη αυτή διεξήχθη μέσω ορολογικής τυποποίησης των

στελεχών και μελέτης της γενοτυπικής τους ποικιλομορφίας. Στόχος ήταν η διερεύνηση της γενοτυπικής παραλλακτικότητας των απομονωθέντων στελεχών.

3.3.5.1 Ορολογική τυποποίηση

Η ορολογική τυποποίηση των στελεχών της *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια συνδυαστικής PCR (multiplex PCR, mPCR). Η συνδυαστική PCR αποτελεί μια τεχνική με την οποία διαφορετικές αλληλουχίες του γονιδιώματος μπορούν να πολλαπλασιαστούν ταυτόχρονα σε μια αντίδραση, με χρήση τόσων ζευγών μορίων εκκινητών όσες και οι αλληλουχίες-στόχοι.

Το 2004, οι Doumith και συν. πρότειναν ένα πρωτόκολλο συνδυαστικής PCR στο οποίο οι αλληλουχίες-στόχοι ήταν τμήματα των γονιδίων *lmo0737*, ORF2819, *lmo1118* και ORF2110. Η ενίσχυση των τεσσάρων αυτών τμημάτων επιτρέπει το διαχωρισμό των στελεχών *L. monocytogenes* σε τέσσερις ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τους οροτύπους 1/2a και 3a (ανίχνευση μόνο του *lmo0737*), η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τους οροτύπους 1/2c και 3c (ταυτόχρονη ανίχνευση των *lmo0737* και *lmo1118*), η τρίτη ομάδα αποτελείται από τους οροτύπους 1/2b, 3b και 7 (ανίχνευση μόνο του ORF2819) και η τέταρτη ομάδα αποτελείται από τους οροτύπους 4b, 4d και 4e (ταυτόχρονη ανίχνευση των ORF2819 και ORF2110). Τα προφίλ που προκύπτουν από τη συγκεκριμένη συνδυαστική PCR δεν είναι ικανά να κάνουν διαχωρισμό των οροτύπων εντός της κάθε ομάδας, ωστόσο, οι ορότυποι 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4c, 4d, 4e και 7 εμφανίζονται πολύ σπάνια σε τρόφιμα και αναφέρονται ακόμα σπανιότερα ως εμπλεκόμενα σε κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης. Δεδομένα που συλλέχτηκαν από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς στη Γαλλία (National Reference Center in France) αναφέρουν ότι το 98% των απομονώσεων του παθογόνου από τρόφιμα και ασθενείς ερευνών που διήρκησαν 3 χρόνια, κατατάχθηκαν στις κατηγορίες οροτύπων 1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b, των οποίων η διαφοροποίηση προκύπτει από τη μέθοδο ανίχνευσης των παραπάνω αλληλουχιών-στόχων. Οι παραπάνω παρατηρήσεις συνηγορούν στο ότι η πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ικανή να οδηγήσει σε ορολογική τυποποίηση των υπό μελέτη στελεχών της *L. monocytogenes*.

Ορολογική τυποποίηση

Για τη διεξαγωγή της συνδυαστικής PCR πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των δειγμάτων, απομόνωση του DNA και ποσοτικοποίηση του γενετικού υλικού που απομονώθηκε, βάσει του πρωτοκόλλου που είχε χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του παθογόνου (παρ. 3.3.3.3.1). Εν συνεχεία, διεξήχθη προετοιμασία μείγματος (master mix) εντός του οποίου θα πραγματοποιούταν η αντίδραση, με μικρές τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου που περιγράφηκε από τους Doumith και συν. (2004). Συγκεκριμένα, η mPCR πραγματοποιήθηκε

σε τελικό όγκο 20 μL , εκ των οποίων 2 μL ήταν δείγμα και 18 μL ήταν ρυθμιστικό διάλυμα 1 \times , μείγμα τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων 0.2 mM, MgCl_2 2mM, *Taq* DNA πολυμεράση 2 U, ζεύγη εκκινητών των γονιδίων *lmo0737* και ORF2819 0.3 μM και ORF2110 και *lmo1118* 0.29 μM . Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η mPCR, για την οποία ορίστηκαν οι ακόλουθες συνθήκες εντός του θερμοκυκλοποιητή:

1. 94°C για 3 min
 2. 94°C για 0,4 min
 3. 53°C για 1,15 min
 4. 72°C για 1,15 min
 5. 72°C για 7 min
- } $\times 35$ φορές

Μετά την ολοκλήρωση της mPCR ακολούθησαν ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1.5% (100 V, 1.5 ώρα), εμφάπτιση της πηκτής για 20 min σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/mL) και φωτογράφησή της (παρ. 3.3.3.3.2).

Το μέγεθος των μορίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ορολογική τυποποίηση φαίνεται στον **Πίνακα 7** και τα τμήματα των γονιδίων που αναμένονταν να προκύψουν είχαν τα ακόλουθα μεγέθη:

- ✓ *lmo0737* - 691 bp
- ✓ *lmo1118* - 906 bp
- ✓ ORF2819 - 471 bp
- ✓ ORF2110 - 597 bp

3.3.5.2 Γενοτυπική ποικιλομορφία

Η μελέτη της γενοτυπικής ποικιλομορφίας των απομονωθέντων στελεχών *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των τεχνικών πολυμορφισμού τυχαίως ενισχυμένου DNA (RAPD) και της PCR επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR).

Ο πολυμορφισμός τυχαίως ενισχυμένου DNA (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) αποτελεί ένα είδος PCR κατά το οποίο πραγματοποιείται τυχαίως πολλαπλασιασμός τμημάτων του γονιδιώματος. Για την διεκπεραίωση της τεχνικής αυτής χρησιμοποιούνται εκκινητές μικρού μήκους (8-12 βάσεις) και όχι ζεύγη εκκινητών. Αποτέλεσμα αυτής της τυχαίας ενίσχυσης τμημάτων του DNA είναι η δημιουργία διαφορετικών προφίλ για κάθε διαφορετικό στέλεχος. Ως εκ τούτου, η ποικιλομορφία μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου μικροοργανισμού προσδιορίζεται με μεγάλη ακρίβεια (Farber και Addison, 1994· Cocolin και συν., 2005).

Η PCR επαναλαμβανόμενων στοιχείων (repetitive element PCR) αποτελεί μία τεχνική κατά την οποία πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός πολλαπλών τμημάτων του γονιδιώματος

που βρίσκονται μεταξύ καλά διατηρημένων, επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, διασκορπισμένων εντός του χρωμοσώματος του μικροοργανισμού (Georghίου και συν., 1994). Στα βακτήρια έχουν περιγραφεί τρεις οικογένειες μικρών διεσπαρμένων επαναλαμβανόμενων στοιχείων: η παλινδρομική εξωγονιδιακή αλληλουχία (repetitive extragenic palindrome), η ενδογονιδιακή αλληλουχία (enterobacterial repetitive intergenic consensus) και η αλληλουχία BOX (Hulton και συν., 1991· Martin και συν., 1992) καθώς και οι αντίστοιχες τεχνικές ενίσχυσής τους μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης: rep-PCR, Eric-PCR και BOX-PCR. Από την ενίσχυση των τμημάτων DNA δημιουργούνται διαφορετικά προφίλ μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του ίδιου μικροοργανισμού, διαχωρίζοντάς τα τελικώς μεταξύ τους.

Μελέτη γενοτυπικής ποικιλομορφίας

Η προετοιμασία των δειγμάτων, η απομόνωση του DNA και η ποσοτικοποίηση του γενετικού υλικού που απομονώθηκε έγιναν βάσει του πρωτοκόλλου που είχε χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του παθογόνου (παρ. 3.3.3.3.1). Στη συνέχεια, για την πραγματοποίηση της RAPD-PCR διεξήχθη προετοιμασία μείγματος (master mix) διαδοχικά για κάθε εκκινητή με τελικό όγκο 20 μL , εκ των οποίων 2 μL ήταν δείγμα και 18 μL ήταν ρυθμιστικό διάλυμα 1 \times , dNTP's 0.2 mM, MgCl_2 2.5 mM, *Taq* DNA πολυμεράση 1 U και μόριο εκκινητή UBC155 1.5 μM ή HLWL85 4 μM ή M13 4 μM . Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η RAPD-PCR για κάθε εκκινητή, για την οποία ορίστηκαν οι ακόλουθες συνθήκες εντός του θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τους Fonnesbech Vogel και συν. (2001) (UBC155 και HLWL85) και Andrigetto και συν. (2001) (M13):

UBC155

1. 95 °C για 2 min
 2. 95 °C για 1 min
 3. 45 °C για 1 min (μείωση 1 °C ανά κύκλο έως τους 36 °C)
 4. 72 °C για 2 min
 5. 95 °C για 1 min
 6. 35 °C για 1 min
 7. 72 °C για 2 min
 8. 72 °C για 10 min
- } ×10 φορές
- } ×30 φορές

HLWL85

1. 95 °C για 2 min
 2. 95 °C για 1 min
 3. 35 °C για 2 min
 4. 72 °C για 1 min
 5. 72 °C για 10 min
- } ×45 φορές

M13

1. 95 °C για 2 min
 2. 95 °C για 1 min
 3. 38 °C για 1 min (αναπήδηση στους 72 °C με ρυθμό 0,6 °C/sec)
 4. 72 °C για 2 min
 5. 72 °C για 10 min
- } ×35 φορές

Η rep-PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Gevers και συν., 2001. Συγκεκριμένα, το μείγμα της αντίδρασης είχε τελικό όγκο 20 μL , εκ των οποίων 2 μL ήταν δείγμα και 18 μL ήταν ρυθμιστικό διάλυμα 1 \times , dNTP's 0.2 mM, MgCl_2 3 mM, *Taq* DNA πολυμεράση 2 U και μόριο εκκινητή (GTG)₅ 2 μM . Οι συνθήκες που ορίστηκαν στο θερμοκυκλοποιητή ήταν οι ακόλουθες:

1. 95 °C για 5 min
 2. 95 °C για 30 sec
 3. 40 °C για 1 min
 4. 72 °C για 8 min
 5. 72 °C για 16 min
- } ×40 φορές

Μετά τη διεξαγωγή των RAPD-PCR και rep-PCR ακολούθησαν ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 1.5% (100 V, 1.5 ώρα), εμφάπτιση της πηκτής για 20 min σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/mL) και φωτογράφησή της. Μετατροπή, κανονικοποίηση και περαιτέρω ανάλυση των κατανομών έγιναν με χρήση του συντελεστή Dice και του αλγόριθμου ομαδοποίησης UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average clustering algorithm) (Vauterin και Vauterin, 1992) μέσω του λογισμικού BioNumerics v6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), όπου πραγματοποιήθηκε η κατασκευή των αντίστοιχων δενδρογραμμάτων για κάθε χρησιμοποιούμενο εκκινητή. Τα στελέχη υποβλήθηκαν σε κάθε ανάλυση δύο φορές.

Πίνακας 7 Αλληλουχίες μορίων εκκινητών για τη μελέτη της ορολογικής τυποποίησης και περαιτέρω βιοποικιλότητας στελεχών της *L. monocytogenes* σε δείγματα ρόκας και αγγουριών.

Μόρια Εκινητές	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Τεχνική PCR	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>lmo0737</i>	AGGGCTTCAAGGACTTACCC ^α ACGATTTCTGCTTGCCATTC ^β	mPCR	Doumith και συν., 2004
<i>lmo1118</i>	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA ^α CGGCTTGTTCGGCATACTTA ^β	mPCR	Doumith και συν., 2004
ORF2819	AGCAAAATGCCAAAACCTCGT ^α CATCACTAAAGCCTCCCATTG ^β	mPCR	Doumith και συν., 2004
ORF2110	AGTGGACAATTGATTGGTGAA ^α CATCCATCCCCTTACTTTGGAC ^β	mPCR	Doumith και συν., 2004
HLWL85	ACAACCTGCTC	RAPD	Wernars και συν., 1996
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	RAPD	Andrighetto και συν., 2001
UBC155	CTGGCGGCTG	RAPD	Farber και Addison, 1994
(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	rep-PCR	Versalovic και συν., 1994

^α Επέκταση της συντιθέμενης αλυσίδας προς τα εμπρός

^β Επέκταση της συντιθέμενης αλυσίδας προς τα πίσω

3.3.5.2.1 Δείκτης διάκρισης

Ο δείκτης διάκρισης περιγράφει την ικανότητα μίας μεθόδου τυποποίησης να δημιουργεί ξεχωριστές και διακριτές ομάδες μεταξύ μη σχετιζόμενων απομονώσεων (Struelens, 1996). Η διερεύνηση ενός επιδημικού επεισοδίου που οφείλεται σε παθογόνο μικροοργανισμό απαιτεί υψηλό δείκτη διάκρισης της μεθόδου που χρησιμοποιείται, ώστε να είναι εφικτός ο διαχωρισμός μεταξύ σχετιζόμενων και μη σχετιζόμενων με το επιδημικό επεισόδιο απομονώσεων. Ως εκ τούτου, η διακριτική ικανότητα είναι ένα από τα πιο σημαντικά κριτήρια αποτελεσματικότητας των μεθόδων μοριακής τυποποίησης. Εν προκειμένω, η διακριτική ικανότητα των μεθόδων τυποποίησης που χρησιμοποιήθηκαν καθορίστηκε με τον υπολογισμό του δείκτη διάκρισης *D* (discrimination index), μέσω της εξίσωσης που περιγράφηκε από τους Hunter και Gaston (1988):

$$D = 1 - \sum_{j=1}^s n_j \times (n_j - 1) / N \times (N - 1) \quad (4.26)$$

όπου *N* ο συνολικός αριθμός στελεχών, *s* το πλήθος των τύπων που προσδιορίστηκαν μέσω της μεθόδου PCR και *n_j* ο αριθμός των στελεχών που ανήκουν στον αντίστοιχο τύπο *j*.

3.4 Αποτελέσματα

3.4.1 Ανάκτηση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* από δείγματα ρόκας και αγγουριών

Ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 10 CFU/g στα υπό μελέτη δείγματα ρόκας και αγγουριών. Ωστόσο, μετά από τον επιλεκτικό εμπλουτισμό ο παθογόνος εντοπίστηκε τόσο σε δείγματα ρόκας όσο και σε δείγματα αγγουριών.

Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για τα δείγματα ρόκας μέσω της καλλιέργειας των θρεπτικών υποστρωμάτων, εντοπίστηκαν αρχικά 10 ύποπτα ως προς την παρουσία του μικροοργανισμού δείγματα (δείγμα 22, 25, 30, 32, 33, 67, 71, 72, 97 και 99). Το ALOA κατέδειξε και τα 10 δείγματα ως ύποπτα για την παρουσία του παθογόνου, ενώ το RAPID[®]L.mono εντόπισε μόνο τα 3 εξ' αυτών (22, 30 και 33) (Πίνακας 8). Για τα υπόλοιπα 90 δείγματα δεν παρουσιάστηκαν οι χαρακτηριστικές αποικίες του μικροοργανισμού και ως εκ τούτου θεωρήθηκαν αρνητικά ως προς την παρουσία του. Από τα 10 ύποπτα δείγματα απομονώθηκαν συνολικά 33 αποικίες, οι οποίες υποβλήθηκαν μετέπειτα σε βιοχημικές δοκιμές και μοριακές αναλύσεις. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των βιοχημικών δοκιμών και των μοριακών αναλύσεων οδήγησε στην ταυτοποίηση 12 απομονώσεων ως *L. monocytogenes*, οι οποίες προέρχονταν από 7 διαφορετικά δείγματα (22, 25, 30, 33, 67, 72 και 99). Συγκεκριμένα, από τα 10 ύποπτα με βάση το ALOA δείγματα, 7 επιβεβαιώθηκαν ως θετικά για την παρουσία του παθογόνου, ενώ ως θετικά επιβεβαιώθηκαν και τα 3 ύποπτα δείγματα βάσει του RAPID[®]L.mono. Ως εκ τούτου, ο πραγματικός επιπολασμός (*TrP*) του παθογόνου στα δείγματα ρόκας ήταν 7%.

Πίνακας 8 Αποτελέσματα βιοχημικών και μοριακών μεθόδων στα ύποπτα στελέχη της *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκαν από δείγματα ρόκας.

Στελέχη	Βιοχημικές μέθοδοι			Μοριακή μέθοδος	
	Δοκιμή ραμνόςζης	Δοκιμή ξυλόζης	Δοκιμή κινητικότητας	Τύπος αμόλυσης	PCR
1.22.1 ^a	-	+	-	α	-
1.22.2	+	+	+	β	+
1.22.3	-	-	-	α	-
1.22.4	-	-	-	γ	-
1.25.1	+	+	+	β	+
1.25.2	-	-	-	γ	-

Πίνακας 8 (συνέχεια)

Στελέχη	Βιοχημικές μέθοδοι			Μοριακή μέθοδος	
	Δοκιμή ραμνόζης	Δοκιμή ξυλόζης	Δοκιμή κινητικότητας	Τύπος αμόλυσης	PCR
1.25.3	+	-	-	β	+
1.25.4	-	+	-	γ	-
1.25.5	-	-	-	γ	-
1.30.4	+	+	+	β	+
1.32.1	-	-	-	α	-
1.32.2	-	-	-	α	-
1.32.3	-	+	-	γ	-
1.33.1	+	-	+	β	+
1.33.2	-	+	-	α	-
1.33.3	-	-	-	γ	-
1.33.4	+	-	+	β	+
1.67.1	-	-	-	α	-
1.67.2	+	-	+	β	+
1.71.1	-	-	-	α	-
1.72.1	+	-	+	β	+
1.72.2	-	-	-	α	-
1.72.3	-	+	-	α	-
1.72.4	-	+	-	α	-
1.97.1	-	+	-	α	-
1.97.2	-	-	-	γ	-
1.97.3	-	+	-	α	-
1.99.1	-	+	-	α	-
1.99.2	+	-	+	β	+
1.99.5	-	+	-	α	-
2.22.1	+	-	+	β	+
2.30.1	+	-	+	β	+
2.33.1	+	-	+	β	+

^a ο πρώτος αριθμός αντιστοιχεί στο θρεπτικό υλικό απομόνωσης (1:ALOA, 2:RAPID'L.mono), ο δεύτερος αντιστοιχεί στον αριθμό του δείγματος και ο τρίτος στην αριθμό της αποικίας

Στα αγγούρια, με βάση την καλλιέργεια στα θρεπτικά υποστρώματα εντοπίστηκαν αρχικά 7 ύποπτα ως προς την παρουσία του μικροοργανισμού δείγματα (23, 33, 51, 54, 55, 56 και 60). Το ALOA εντόπισε 3 δείγματα ως ύποπτα για την παρουσία του παθογόνου (23, 51 και 54), ενώ το RAPID'L.mono εντόπισε 6 δείγματα (33, 51, 54, 55, 56 και 60), με συμφωνία των δύο υποστρωμάτων σε 2 ύποπτα δείγματα (51 και 54) (Πίνακας 9). Αρνητικά ως προς την παρουσία του παθογόνου θεωρήθηκαν τα υπόλοιπα 93 δείγματα, για τα οποία δεν

παρουσιάστηκαν οι χαρακτηριστικές αποικίες του μικροοργανισμού στα μέσα καλλιέργειας. Από τα 7 ύποπτα δείγματα απομονώθηκαν συνολικά 16 αποικίες, οι οποίες υποβλήθηκαν μετέπειτα σε βιοχημικές δοκιμές και μοριακές αναλύσεις. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των βιοχημικών δοκιμών και των μοριακών αναλύσεων οδήγησε στην ταυτοποίηση 8 απομονώσεων ως *L. monocytogenes*, οι οποίες προέρχονταν από 6 δείγματα (23, 33, 51, 54, 55 και 60). Συγκεκριμένα, από τα 3 ύποπτα με βάση το ALOA δείγματα, 2 επιβεβαιώθηκαν ως θετικά για την παρουσία του παθογόνου (23 και 51), ενώ από τα 6 ύποπτα δείγματα με βάση το RAPID'L.mono, ως θετικά επιβεβαιώθηκαν τα 5 (33, 51, 54, 55 και 60). Ως εκ τούτου, ο πραγματικός επιπολασμός (*TrP*) του παθογόνου στα δείγματα αγγουριών ήταν 6%.

Πίνακας 9 Αποτελέσματα βιοχημικών και μοριακών μεθόδων στα ύποπτα στελέχη της *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκαν από δείγματα αγγουριών.

Στελέχη	Βιοχημικές Δοκιμές			Μοριακή μέθοδος	
	Δοκιμή ραμνόζης	Δοκιμή ξυλόζης	Δοκιμή κινητικότητας	Τύπος αιμόλυσης	PCR
A.23.1 ^a	-	+	-	α	-
A.23.2	+	+	+	β	+
A.23.3	-	-	-	α	-
A.51.1	-	-	-	γ	-
A.51.2	+	-	+	β	+
A.51.3	-	-	-	γ	-
A.54.1	-	+	-	γ	-
A.54.2	-	+	-	γ	-
B.33.1	+	-	-	β	+
B.51.1	+	+	+	β	+
B.54.1	+	-	+	β	+
B.54.2	+	-	+	β	+
B.54.3	-	-	-	α	-
B.55.1	+	-	+	β	+
B.56.1	-	+	-	α	-
B.60.1	+	-	+	β	+

^a το γράμμα αντιστοιχεί στο θρεπτικό υλικό απομόνωσης (A:ALOA, B:RAPID'L.mono), ο πρώτος αριθμός αντιστοιχεί στο δείγμα και ο δεύτερος αριθμός στην αποικία.

3.4.2 Υπολογισμός χαρακτηριστικών επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων μέσω αιτιοκρατικής προσέγγισης

Ο συνδυασμός των μικροβιολογικών, βιοχημικών και μοριακών μεθόδων κατέδειξαν ότι στα αποτελέσματα που προέρχονταν από τα χρησιμοποιούμενα θρεπτικά υποστρώματα υπήρχαν ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Πίνακας 10). Η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σε αληθώς θετικά, ψευδώς θετικά, αληθώς αρνητικά και ψευδώς αρνητικά, επέτρεψε τον υπολογισμό των χαρακτηριστικών επίδοσης του ALOA και του RAPID'L.mono (Πίνακας 11).

Στα δείγματα ρόκας, ο παθογόνος εντοπίστηκε σε 10 από τα 100 δείγματα βάσει του ALOA (φαινομενικός επιπολασμός, ApP 10%) και σε 3 από τα 100 δείγματα βάσει του RAPID'L.mono (φαινομενικός επιπολασμός, ApP 3%). Το ALOA παρουσίασε την υψηλότερη ευαισθησία (Se) και δεν έδωσε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, ενώ το RAPID'L.mono είχε την υψηλότερη εξειδίκευση (Sp) και δεν έδωσε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ακολούθως, το RAPID'L.mono είχε την υψηλότερη τιμή πρόβλεψης θετικού αποτελέσματος (PPV) και το ALOA είχε την υψηλότερη τιμή πρόβλεψης αρνητικού αποτελέσματος (NPV). Το ALOA παρουσίασε υψηλό λόγο πιθανοφάνειας θετικού και αρνητικού αποτελέσματος (PLR και NLR) εξαιτίας την μεγάλης ευαισθησίας και εξειδίκευσής του. Αντιθέτως, ο λόγος πιθανοφάνειας θετικού αποτελέσματος δεν μπορούσε να προσδιοριστεί για το RAPID'L.mono, καθώς δεν παρήγαγε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Τέλος, η χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας (ROC) (Σχήμα 1α) καθώς και η τιμή της περιοχής κάτω από την χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας (AUC), η οποία ήταν σημαντικά υψηλότερη από την καμπύλη ισοδυναμίας του 0.5 που δείχνει μηδενική διακριτική ικανότητα, κατέδειξαν ότι και τα δύο θρεπτικά υποστρώματα ήταν ικανά να διακρίνουν τα θετικά από τα αρνητικά δείγματα.

Στα δείγματα αγγουριών, το ALOA ανίχνευσε τον παθογόνο σε 3 από τα 100 δείγματα (ApP 3%), ενώ το RAPID'L.mono σε 6 από τα 100 δείγματα (ApP 6%). Τα χαρακτηριστικά επίδοσης των δύο μέσων στα δείγματα των αγγουριών ήταν αντίθετα ως προς εκείνα των δειγμάτων ρόκας. Πιο συγκεκριμένα, το RAPID'L.mono ήταν πιο ευαίσθητο από το ALOA, ενώ το ALOA παρουσίασε την υψηλότερη εξειδίκευση και καθόλου ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Το ALOA είχε υψηλότερη τιμή πρόβλεψης θετικού αποτελέσματος (PPV) και χαμηλότερη τιμή πρόβλεψης αρνητικού αποτελέσματος (NPV) από το RAPID'L.mono. Αντιθέτως, οι λόγοι πιθανοφάνειας θετικού και αρνητικού αποτελέσματος (PLR και NLR) ήταν σχετικά υψηλοί για το RAPID'L.mono, ενώ λόγω της απουσίας ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων από το ALOA, ο λόγος πιθανοφάνειας θετικού αποτελέσματος δεν προσδιορίστηκε γι' αυτό. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με την καμπύλη ROC (Σχήμα 1β) και τις τιμές AUC , και τα δύο υλικά ήταν ικανά να διαχωρίσουν τα θετικά από τα αρνητικά δείγματα.

Πίνακας 10 Κατηγοριοποίηση των δειγμάτων της ρόκας και των αγγουριών έπειτα από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων των μικροβιολογικών, βιοχημικών και μοριακών δοκιμών.

Δείγμα/ Θρεπτικό μέσο	Κατηγορία ^α			
	TP	TN	FP	FN
<i>Ρόκα</i>				
ALOA	7	90	3	0
RAPID'L.mono	3	93	0	4
<i>Αγγούρια</i>				
ALOA	3	94	0	3
RAPID'L.mono	5	93	1	1

^αTP: αληθώς θετικά δείγματα (true positive) TN: αληθώς αρνητικά δείγματα (true negative),

FP: ψευδώς θετικά δείγματα (false Positive), FN: ψευδώς αρνητικά δείγματα (false negative)

Πίνακας 11 Χαρακτηριστικά επίδοσης των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών ακολουθώντας αιτιοκρατική προσέγγιση.

Παράμετροι	ALOA			RAPID'L.mono		
	M ^α	LL ^α	UL ^α	M	LL	UL
<i>Ρόκα</i>						
<i>Se</i> (%)	100	100	100	42.9	6.2	79.5
<i>Sp</i> (%)	96.8	93.2	100	100	100	100
<i>ApP</i> (%)	10.0	4.1	15.9	3.0	0.0	6.3
<i>PPV</i> (%)	70.0	41.6	98.4	100	100	100
<i>NPV</i> (%)	100	100	100	95.9	91.9	99.8
<i>PLR</i>	30.96	10.18	94.37	_{-β}	_{-β}	_{-β}
<i>NLR</i>	0.00 ^γ	0.00	1.07	0.57	0.30	1.09
<i>AUC</i> ^δ	0.98	0.94	1.00	0.71	0.62	0.80
<i>Αγγούρια</i>						
<i>Se</i> (%)	50.0	10.0	90.0	83.3	53.5	100
<i>Sp</i> (%)	100	100	100	98.9	96.9	100
<i>ApP</i> (%)	3.0	0.0	6.3	6.0	1.3	10.7
<i>PPV</i> (%)	100	100	100	83.3	53.5	100
<i>NPV</i> (%)	96.9	93.5	100	98.9	96.9	100
<i>PLR</i>	_{-β}	_{-β}	_{-β}	78.61	10.79	568.55
<i>NLR</i>	0.50	0.23	1.11	0.17	0.03	1.01
<i>AUC</i> ^ε	0.75	0.65	0.83	0.91	0.84	0.96

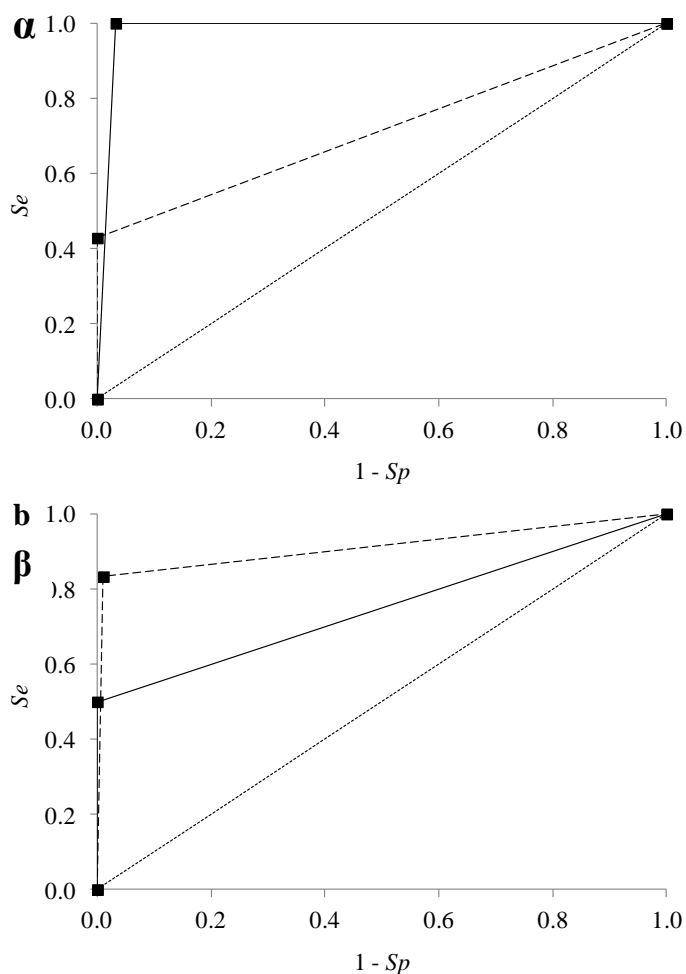
^α M: μέση τιμή, LL και UL: 95% κατώτερο και υψηλότερο διάστημα εμπιστοσύνης, αντίστοιχα

^β Απροσδιόριστες τιμές, γιατί ο παρονομαστής της εξίσωσης είναι ίσος με μηδέν (1- *Sp*)

^γ Μέση τιμή ίση με μηδέν, γιατί ο αριθμητής της εξίσωσης είναι ίσος με μηδέν (1- *Se*)

^δ Η τιμή P-value ήταν <0,001 για το ALOA και <0,034 για το RAPID'L.mono

^ε Η τιμή P-value ήταν 0,025 για το ALOA και <0,001 για το RAPID'L.mono



Σχήμα 1 Χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας (ROC) για τα υλικά ALOA (συνεχής γραμμή) και RAPID'L.mono (διακεκομμένη γραμμή), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* σε δείγματα α) ρόκας και β) αγγουριών. Η καμπύλη ισοδυναμίας που υποδεικνύει μηδενική διακριτική ικανότητα συμβολίζεται με τη στικτή γραμμή.

3.4.3 Υπολογισμός χαρακτηριστικών επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων μέσω στοχαστικής προσέγγισης

Οι μεταγενέστερες κατανομές για όλα τα χαρακτηριστικά επίδοσης των μέσων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 12**. Συγκρίνοντας τις τιμές και τα διαστήματα εμπιστοσύνης που προέκυψαν μέσω της στοχαστικής προσέγγισης με τις αντίστοιχες τιμές που προέκυψαν μέσω της αιτιοκρατικής προσέγγισης, παρατηρήθηκε αρχικά ότι οι μέσες τιμές ήταν πιο ουσιαστικές με τη στοχαστική προσέγγιση, καθότι με την αιτιοκρατική προσέγγιση ήταν αδύνατος ο προσδιορισμός ορισμένων δεικτών (π.χ. *PLR*), οι δείκτες της ευαισθησίας και της εξειδίκευσης πλησίασαν την άριστη τιμή (100%) και ο λόγος πιθανοφάνειας αρνητικού αποτελέσματος (*NLR*) ήταν ίσος με μηδέν. Παράλληλα, από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι με

τη στοχαστική προσέγγιση τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% των χαρακτηριστικών επίδοσης ήταν λιγότερο αβέβαια (στενότερα) από τα διαστήματα εκείνα που λήφθηκαν μέσα από την αιτιοκρατική προσέγγιση. Μέσω της αιτιοκρατικής προσέγγισης ορισμένοι δείκτες όπως ο λόγος πιθανοφάνειας θετικού αποτελέσματος (*PLR*) είχαν εξαιρετικά αβέβαιες τιμές (*RAPID'L.mono* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών και *ALOA* στα δείγματα αγγουριών), κάτι το οποίο φάνηκε και από το ευρύ διάστημα εμπιστοσύνης 95% που παρουσίασαν. Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στη μηδενική τιμή που παρατηρήθηκε στην κατηγορία των ψευδώς θετικών δειγμάτων, οδηγώντας σε εξειδίκευση 100%, γεγονός το οποίο κατέστησε αδύνατη τη λήψη εκτίμησης για την τιμή του δείκτη *PLR* μέσω της συγκεκριμένης προσέγγισης. Αντιθέτως, το πρόβλημα αυτό δεν παρουσιάστηκε όταν χρησιμοποιήθηκε η στοχαστική προσέγγιση.

Όσον αφορά στα δείγματα ρόκας, το *ALOA* ήταν πιο ευαίσθητο από το *RAPID'L.mono*, αλλά το αντίθετο παρατηρήθηκε όταν τα μέσα καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα αγγουριού. Αποτέλεσμα δηλαδή όμοιο με αυτό που προέκυψε και μέσω της αιτιοκρατικής προσέγγισης. Και τα δύο υποστρώματα επέδειξαν σχετικά υψηλή τιμή πρόβλεψης αρνητικού αποτελέσματος (*NPV*), ενώ ικανοποιητικές ήταν και οι τιμές πρόβλεψης θετικού αποτελέσματος (*PPV*) καθώς και ο λόγος πιθανοφάνειας αρνητικού αποτελέσματος (*NLR*). Τέλος, για τις τιμές *AUC* το πιο σημαντικό εύρημα ήταν ότι η τιμή 0.5 δεν συμπεριλήφθη σε κανένα από τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95%, κάτι το οποίο κατέδειξε τη σημαντική διακριτική ικανότητα των υπό μελέτη υποστρωμάτων.

Πίνακας 12 Χαρακτηριστικά επίδοσης των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανίχνευση της *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών ακολουθώντας στοχαστική προσέγγιση.

Παράμετροι	ALOA			RAPID'L.mono		
	M ^a	LL ^a	UL ^a	M	LL	UL
<i>Ρόκα</i>						
<i>Se</i> (%)	93.8	78.0	99.8	43.8	21.4	67.6
<i>Sp</i> (%)	96.3	93.1	98.5	99.5	98	100
<i>PPV</i> (%)	68.2	47.7	85.5	87.5	59	99.6
<i>NPV</i> (%)	99.5	98.0	100	95.4	92.1	97.9
<i>PLR</i>	29.22	13.39	62.09	67.54 ^β	8.15	676.11
<i>NLR</i>	0.06	0.00	0.23	0.57	0.33	0.79
<i>AUC</i> ^γ	0.89	0.75	0.97	0.66	0.53	0.80
<i>Αγγούρια</i>						
<i>Se</i> (%)	50.1	25.3	74.8	78.6	54.7	95.0
<i>Sp</i> (%)	99.5	98.1	100	98.4	96.3	99.7
<i>PPV</i> (%)	87.5	59.1	99.6	78.6	54.5	94.9
<i>NPV</i> (%)	96.4	93.4	98.5	98.4	96.3	99.7
<i>PLR</i>	75.30 ^β	10.10	827.61	42.07 ^β	13.94	202.20
<i>NLR</i>	0.50	0.25	0.75	0.22	0.05	0.46
<i>AUC</i> ^γ	0.69	0.54	0.84	0.82	0.66	0.94

^a M: μέση τιμή, LL και UL: 95% κατώτερο και υψηλότερο διάστημα εμπιστοσύνης, αντίστοιχα.

^β Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε η διάμεση τιμή αντί η μέση, γιατί η κατανομή ήταν λοξή προς τα δεξιά ή προς τα αριστερά κάνοντας τη μέση τιμή ανακριβές μέτρο της τοποθεσίας της κατανομής. Οι αντίστοιχες μέσες τιμές είχαν ως εξής: *PLR* για ALOA στα δείγματα αγγουριών: 219.53, *PLR* για RAPID'L.mono στα δείγματα ρόκας: 180.75, *PLR* για RAPID'L.mono στα δείγματα αγγουριών: 71.04

^γ Οι τιμές *AUC* ήταν σημαντικές P-value= 0.05

3.4.4 Επιπολασμός της *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών –

Μπαγεσιανή συμπερασματολογία

Για την εκτίμηση του επιπολασμού της *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών δημιουργήθηκαν δύο μοντέλα (*M1* και *M2*) στο λογισμικό WinBUGS. Για τη δημιουργία του πρώτου μοντέλου πραγματοποιήθηκε χρήση των εξισώσεων 3.10 και 3.13, ενώ για το δεύτερο μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις 3.14 έως 3.22. Στόχος ήταν η εκτίμηση του επιπολασμού του παθογόνου στα υπό μελέτη δείγματα, βάσει των αποτελεσμάτων που είχαν δώσει τα θρεπτικά υποστρώματα ξεχωριστά (*M1*) ή σε συνδυασμό (*M2*).

Στο πρώτο μοντέλο (*M1*), η παράμετρος της πραγματικής τιμής του επιπολασμού (*TrP*) περιεγράφηκε από μία κατανομή αβεβαιότητας Βήτα(1,1) με την παραδοχή μη προγενέστερης γνώσης, καθώς η τιμή του επιπολασμού ήταν η παράμετρος που έπρεπε να εκτιμηθεί. Για τις

παραμέτρους Se και Sp χρησιμοποιήθηκαν επίσης κατανομές αβεβαιότητας, ενσωματώνοντας τις πληροφορίες που είχαν ληφθεί γι' αυτές από τα μικροβιολογικά τεστ και την εφαρμογή της στοχαστικής προσέγγισης (Πίνακας 12). Επομένως πραγματοποιήθηκε αντιστοιχία των κατανομών αβεβαιότητας με τις τιμές που είχαν προκύψει από τη στοχαστική προσέγγιση. Για παράδειγμα, η ευαισθησία του ALOA που χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα ρόκας διαμορφώθηκε από την προγενέστερη κατανομή, όπου το διάστημα εμπιστοσύνης 95% ήταν (0.780, 0.998) με προγενέστερη καλύτερη εικασία την τιμή 0.938. Η πιθανότητα αυτή αντιστοιχούσε στην κατανομή Βήτα(15,1), η οποία και χρησιμοποιήθηκε. Κατά τον ίδιο τρόπο υπολογίστηκαν οι Βήτα κατανομές για την ευαισθησία και εξειδίκευση των θρεπτικών υποστρωμάτων στα υπό μελέτη προϊόντα (Πίνακας 13). Στον Πίνακα 13 φαίνονται τα στατιστικά δεδομένα της κατανομής της παραμέτρου TrP_e , μετά την εκτέλεση του $M1$ στο WinBUGS. Παρουσιάζονται επίσης και τα συσχετιζόμενα σφάλματα ($Error$) μεταξύ των υπολογιζόμενων και παρατηρούμενων δεδομένων, τα οποία υπολογίστηκαν μέσω της εξίσωσης: $[(TrP_e \text{ ή } TrP_{e-combined} - TrP_o) / TrP_o] \times 100$. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ALOA και το RAPID'L.mono έδωσαν σχετικά ακριβή αποτελέσματα ($Error < 20\%$) όσον αφορά στην παρουσία της *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών.

Το δεύτερο μοντέλο ($M2$) δημιουργήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανότητας μίας καλύτερης εκτίμησης του επιπολασμού του παθογόνου και βασίστηκε σε πολυωνυμική κατανομή. Σύμφωνα με κάθε υπόστρωμα, το κάθε δείγμα ήταν είτε θετικό είτε αρνητικό. Ο συνδυασμός των δύο συμπερασμάτων που αφορούσαν το κάθε δείγμα οδήγησε στην ταξινόμηση των δειγμάτων στις τέσσερις κατηγορίες: αρνητικό-αρνητικό (nn), αρνητικό-θετικό (np), θετικό-αρνητικό (pn) και θετικό-θετικό (pp). Ως εκ τούτου, από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων του ALOA και του RAPID'L.mono καταγράφηκαν στα δείγματα ρόκας 90 nn , 0 np , 7 pn και 3 pp αποτελέσματα. Αντίστοιχα, στα δείγματα αγγουριών καταγράφηκαν 93 nn , 4 np , 1 pn και 2 pp αποτελέσματα. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 13, παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμένος πραγματικός επιπολασμός ($TrP_{e-combined}$) παρουσίασε μικρότερο σφάλμα ($Error_c$) έπειτα από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων του ALOA και RAPID'L.mono στην περίπτωση των δειγμάτων ρόκας, όμως στην περίπτωση των αγγουριών το $Error_c$ ήταν μικρότερο μόνο σε σύγκριση με το σφάλμα που προέκυπτε από τη χρήση του ALOA και όχι από τη χρήση του RAPID'L.mono. Παρόλα αυτά, οι διαφορές των εκτιμήσεων που λήφθηκαν για την παράμετρο της πραγματικής τιμής επιπολασμού (TrP) έπειτα από την εκτέλεση των δύο μοντέλων ($M1$ και $M2$), ήταν γενικά πολύ μικρές.

3.4.5 Υπολογισμός συνδυασμένης ευαισθησίας και συνδυασμένης εξειδίκευσης

Σε συνέχεια του δεύτερου μοντέλου πρόβλεψης, εκτιμήθηκαν η συνδυασμένη ευαισθησία ($Se_{combined}$) και η συνδυασμένη εξειδίκευση ($Sp_{combined}$), οι οποίες προέκυψαν από το

συνδυασμό των αποτελεσμάτων των δύο θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν με χρήση των εξισώσεων 3.19 και 3.20. Επιπρόσθετα, υπολογίστηκαν και οι αντίστοιχες πιθανότητες τους p και p_f , με χρήση των εξισώσεων 3.21 και 3.22. Στα δείγματα ρόκας, η $Se_{combined}$ ήταν 96.5% (87.3 έως 99.9%) και η $Sp_{combined}$ ήταν 95.8% (92.5 έως 98.2%), από 93.8% (Se) και 96.3% (Sp) για το ALOA και 43.8% (Se) και 99.5% (Sp) για το RAPID'L.mono. Η πιθανότητα p (3.21) να είναι θετικό ένα δείγμα το οποίο με βάση το συνδυασμό των αποτελεσμάτων των μεθόδων ήταν αρνητικό, ήταν μόνο 0.3% (0.5% για το ALOA και 4.1% για το RAPID'L.mono), ενώ η πιθανότητα αποτυχίας εντοπισμού τουλάχιστον ενός θετικού δείγματος σε ένα πληθυσμό θετικό p_f (3.22) ήταν αμελητέα, με τιμή $6.2 \times 10^{-9}\%$ ($3.6 \times 10^{-7}\%$ για το ALOA και 1.8% για το RAPID'L.mono). Αντίστοιχα, στα δείγματα αγγουριών η $Se_{combined}$ και $Sp_{combined}$ ήταν 89.3% (74.3 – 97.8%) και 97.9% (95.4 – 99.4%), αντίστοιχα, από 50.1% (Se) και 99.5% (Sp) για το ALOA και 78.6% (Se) και 98.4% (Sp) για το RAPID'L.mono. Τέλος, οι αντίστοιχες πιθανότητες τους ήταν p : 0.7% (3.1% για το ALOA και 1.4% για το RAPID'L.mono) και p_f : $1.5 \times 10^{-4}\%$ (1.6% για το ALOA και $9.6 \times 10^{-3}\%$ για το RAPID'L.mono).

3.4.6 Πληθυσμιακά επίπεδα της *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών – Μπαγεσιανή συμπερασματολογία

Τα πληθυσμιακά επίπεδα της *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών εκτιμήθηκαν από τα δεδομένα παρουσίας-απουσίας. Το Μπαγεσιανό μοντέλο δημιουργήθηκε στο Excel, με χρήση των εξισώσεων 3.23 έως 3.25. Για τον υπολογισμό της παραμέτρου Se των δύο υποστρωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν οι κατανομές Βήτα της παραμέτρου του Πίνακα 13. Επιπλέον, οι κατανομές Βήτα για το συνδυασμό των υποστρωμάτων διαμορφώθηκαν ως εξής: στα δείγματα ρόκας οι κατανομές ήταν Βήτα(28,1) για το ALOA και Βήτα(17,1) για το RAPID'L.mono και στα δείγματα αγγουριών ήταν Βήτα(25,3) και Βήτα(19,1) για το ALOA και για το RAPID'L.mono, αντίστοιχα. Με βάση αυτά τα δεδομένα, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του παθογόνου στα υπό μελέτη δείγματα (Πίνακας 14).

Πίνακας 13 Εκτιμώμενος επιπολασμός της *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών, χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν από κάθε υπόστρωμα ξεχωριστά (M1) ή σε συνδυασμό (M2).

Παράμετροι ^α	ALOA			RAPID'L.mono		
	M ^β	LL ^β	UL ^β	M	LL	UL
<i>Ρόκα</i>						
<i>Se</i>	(15, 1) ^γ			(7, 9) ^γ		
<i>Sp</i>	(180, 7) ^γ			(200, 1) ^γ		
<i>TrP_e</i> (%)	7.9	1.6	16.0	8.2 ^δ	1.4	27.8
<i>TrP_o</i> (%)	7.0	2.0	12.0	7.0	2.0	12.0
<i>Error</i> (%)	13.5			16.6		
<i>TrP_{e-combined}</i> (%)	7.9	2.6	15.0			
<i>Error_c</i> (%)	12.3					
<i>Αγγούρια</i>						
<i>Se</i>	(7, 7)			(11, 3)		
<i>Sp</i>	(200, 1)			(188, 3)		
<i>TrP_e</i> (%)	7.1 ^δ	1.2	23.5	6.8	1.4	16.1
<i>TrP_o</i> (%)	6.0	1.3	10.7	6.0	1.3	10.7
<i>Error</i> (%)	18.6			12.8		
<i>TrP_{e-combined}</i> (%)	6.9	1.9	14.0			
<i>Error_c</i> (%)	14.4					

^α *TrP_e*: ο πραγματικός επιπολασμός που υπολογίστηκε από τα αποτελέσματα κάθε υποστρώματος ξεχωριστά, σύμφωνα με το M1, *TrP_o*: ο παρατηρούμενος πραγματικός επιπολασμός, *TrP_{e-combined}*: ο πραγματικός επιπολασμός που υπολογίστηκε έπειτα από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων που προήλθαν από το ALOA και το RAPID'L.mono, σύμφωνα με το M2, *Error*: το σφάλμα μεταξύ των *TrP_e* και *TrP_o*, *Error_c*: το σφάλμα μεταξύ των *TrP_{e-combined}* και *TrP_o*

^β M: μέση τιμή, LL και UL: 95% κατώτερο και υψηλότερο διάστημα εμπιστοσύνης, αντίστοιχα.

^γ Παρουσιάζονται οι παράμετροι των Βήτα κατανομών που χρησιμοποιήθηκαν. Οι μέσες τιμές και το διάστημα εμπιστοσύνης 95% των *Se* και *Sp* φαίνονται στον πίνακα 12

^δ Η μέση τιμή της παραμέτρου *TrP_e* για τα υποστρώματα ήταν: 9.8 για το RAPID'L.mono στα δείγματα ρόκας και 8.4 για το ALOA στα δείγματα αγγουριών

Πίνακας 14 Εκτιμώμενος πληθυσμός της *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών με χρήση των δεδομένων που λήφθηκαν από κάθε θρεπτικό υπόστρωμα ξεχωριστά ή σε συνδυασμό.

Θρεπτικό υπόστρωμα	Πληθυσμός παθογόνου (CFU/25g)		
	M ^a	LL ^a	UL ^a
<i>Ρόκα</i>			
ALOA	0.12	0.06	0.21
RAPID'L.mono	0.09	0.02	0.20
ALOA/RAPID'L.mono	0.12	0.06	0.20
<i>Αγγούρια</i>			
ALOA	0.08	0.02	0.17
RAPID'L.mono	0.09	0.04	0.17
ALOA/RAPID'L.mono	0.09	0.04	0.17

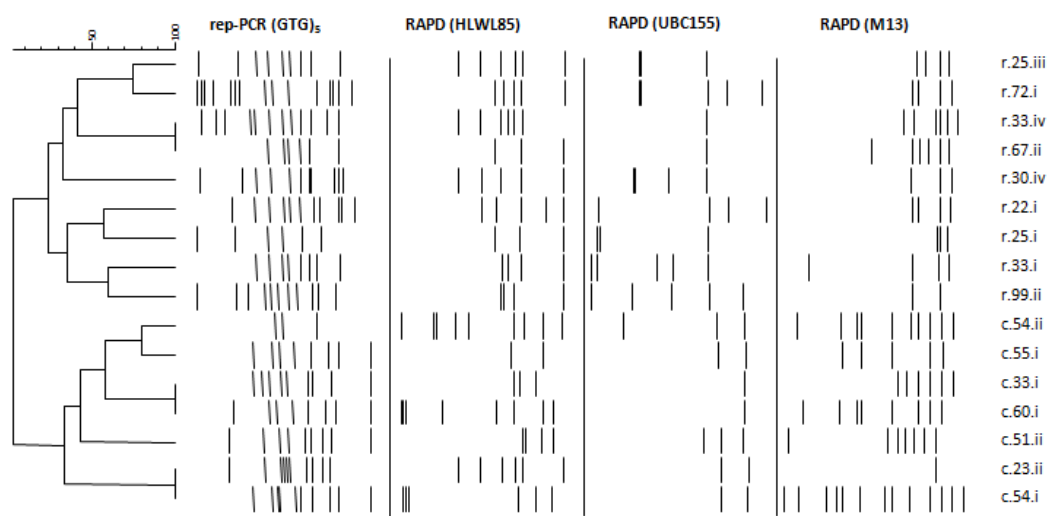
^aM: μέση τιμή, LL και UL: 95% κατώτερο και υψηλότερο διάστημα εμπιστοσύνης, αντίστοιχα.

3.4.7 Ορολογική τυποποίηση και μελέτη γενοτυπικής ποικιλομορφίας

Η ορολογική τυποποίηση των απομονωθέντων στελεχών *L. monocytogenes* που πραγματοποιήθηκε μέσω mPCR, κατέδειξε ότι όλα τα στελέχη του παθογόνου που απομονώθηκαν από τα δείγματα ρόκας και αγγουριών ανήκαν στον ορότυπο 4b. Επιπλέον, η περαιτέρω έρευνα της βιοποικιλότητας η οποία πραγματοποιήθηκε μέσω μελέτης της γενοτυπικής ποικιλομορφίας των απομονωθέντων στελεχών με τη βοήθεια των τεχνικών της RAPD-PCR και *ger*-PCR, οδήγησε σε πλήρη διαχωρισμό των απομονωθέντων στελεχών της *L. monocytogenes*. Στο σύνθετο δενδρόγραμμα που παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2** φαίνεται ο διαχωρισμός των στελεχών όπως πραγματοποιήθηκε από κάθε μέθοδο και στον **Πίνακα 15** παρουσιάζονται οι αποδόσεις των μεθόδων τυποποίησης, μόνες τους και σε συνδυασμό.

Ο δείκτης διάκρισης (*D*) έδειξε ότι κανένας εκκινητής από μόνος του δεν ήταν ικανός να οδηγήσει σε πλήρη διαχωρισμό των στελεχών του παθογόνου, τόσο στα δείγματα ρόκας όσο και στα δείγματα αγγουριών. Μόνη εξαίρεση στο συγκεκριμένο γεγονός (*D*=1) ήταν η τεχνική RAPD-PCR που πραγματοποιήθηκε από τον εκκινητή HLWL85 στα δείγματα αγγουριών. Αντιθέτως, ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων κάθε μεθόδου τυποποίησης οδήγησε στο μέγιστο διαχωρισμό των απομονωθέντων στελεχών. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματικός καθώς κατάφερε να διαφοροποιήσει όλα τα στελέχη του παθογόνου, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που προέρχονταν από το ίδιο δείγμα. Στα δείγματα ρόκας η μέγιστη διαφοροποίηση επιτεύχθηκε όταν η RAPD-PCR με εκκινητή τον UBC155 συνδυάστηκε με την RAPD-PCR με εκκινητή τον M13 ή τον HLWL85 αλλά και όταν η RAPD-PCR με εκκινητή τον M13 συνδυάστηκε με την RAPD-PCR με εκκινητή τον HLWL85 ή με την *ger*-PCR. Στα δείγματα αγγουριών η μέγιστη διαφοροποίηση

επιτεύχθηκε με κάθε συνδυασμό των μεθόδων τυποποίησης, εκτός από την περίπτωση κατά την οποία συνδυάστηκαν οι μέθοδοι RAPD-PCR με εκκινητή τον UBC155 με τη rep-PCR.



Σχήμα 2 Σύνθετο δενδρόγραμμα ανάλυσης των στελεχών της *L. monocytogenes* από τις μεθόδους τυποποίησης RAPD-PCR και rep-PCR. Η απόσταση υποδεικνύεται από τον συντελεστή μέσης συσχέτισης ($r\%$), ενώ η ομαδοποίηση έγινε με ανάλυση UPGMA. Η προέλευση του στελέχους κωδικοποιήθηκε ως εξής: r: ρόκα, C: αγγούρι, 1-100: αριθμός του δείγματος, i-v: αριθμός απομόνωσης.

Πίνακας 15 Διακριτική ικανότητα των μεθόδων τυποποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμό των απομονωθέντων στελεχών της *L. monocytogenes*, μεμονωμένων και σε συνδυασμό.

Μέθοδος τυποποίησης	Σύνολο τύπων	Μοναδικοί τύποι	Δείκτης D
<i>Ρόκα</i>			
RAPD-PCR (UBC155)	6	4	0.889
RAPD-PCR (M13)	8	7	0.972
RAPD-PCR (HLWL85)	7	5	0.944
Rep-PCR (GTG) ₅	6	5	0.833

Πίνακας 15 (συνέχεια)

Μέθοδος τυποποίησης	Σύνολο τύπων	Μοναδικοί τύποι	Δείκτης <i>D</i>
<i>Αγγούρια</i>			
RAPD-PCR (UBC155)	5	4	0.857
RAPD-PCR (M13)	6	5	0.952
RAPD-PCR (HLWL85)	7	7	1
Rep-PCR (GTG) ₅	5	3	0.905
<i>Ρόκα</i>			
RAPD-PCR (UBC155 και M13)	9	9	1
RAPD-PCR (UBC155 και HLWL85)	9	9	1
RAPD-PCR (UBC155) και rep-PCR (GTG) ₅	8	7	0.926
RAPD-PCR (M13 και HLWL85)	9	9	1
RAPD-PCR (M13) και rep-PCR (GTG) ₅	9	9	1
RAPD-PCR (HLWL85) και rep-PCR (GTG) ₅	8	7	0.926
<i>Αγγούρια</i>			
RAPD-PCR (UBC155 και M13)	7	7	1
RAPD-PCR (UBC155 και HLWL85)	7	7	1
RAPD-PCR (UBC155) και rep-PCR (GTG) ₅	6	5	0.952
RAPD-PCR (M13 και HLWL85)	7	7	1
RAPD-PCR (M13) και rep-PCR (GTG) ₅	7	7	1
RAPD-PCR (HLWL85) και rep-PCR (GTG) ₅	7	7	1

3.5 Συζήτηση

Στον τομέα της μικροβιολογίας τροφίμων, τα διαγνωστικά μέσα θα πρέπει να είναι σε θέση να ανιχνεύουν το υπό μελέτη τροφιμογενές παθογόνο, ακόμα και όταν το επίπεδο μόλυνσης είναι χαμηλό. Παρόλα αυτά, υπάρχουν περιορισμοί στην επίδοση των διαγνωστικών μέσων και, ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να επικυρώνεται η επίδοση του κάθε μέσου στο υπό μελέτη τρόφιμο, κυρίως μέσω χρήσης φυσικώς επιμολυσμένων δειγμάτων προκειμένου να καθορίζεται η ευαισθησία και η εξειδίκευσή του (Jarvis, 2007). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη κατέδειξαν την ατελή φύση των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της *L. monocytogenes* σε δείγματα ρόκας και αγγουριών, καθώς κανένα δεν ήταν ικανό να ανιχνεύσει ορθά την παρουσία του παθογόνου και στα δύο προϊόντα. Παρόλο που το ALOA ήταν σε θέση να ανιχνεύσει τον παθογόνο σχετικά καλά στα

δείγματα ρόκας (πολύ υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση), δεν μπόρεσε να κάνει το ίδιο και στα δείγματα αγγουριών, καθώς το μέσο επέδειξε διαφορετική επίδοση μεταξύ των δύο προϊόντων παρά το γεγονός ότι και τα δύο ανήκουν στην ίδια κατηγορία τροφίμων (λαχανικά). Παράλληλα, επιβεβαιώθηκε ότι τα χαρακτηριστικά επίδοσης, όπως η ευαισθησία και η εξειδίκευση, μπορεί να ποικίλουν αρκετά ανάλογα με το εκάστοτε προϊόν που υπόκειται σε μελέτη, καθώς και ανάλογα με το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του τροφιμογενούς παθογόνου στο προϊόν αυτό. Το παραπάνω συμπέρασμα υποστηρίζεται και από μελέτες κατά τις οποίες αναφέρθηκαν μεταβλητές επιδόσεις όσον αφορά στην ευαισθησία και την εξειδίκευση των θρεπτικών μέσων, για έξι θρεπτικά μέσα τύπου ALOA, το PALCAM, το RAPID[®]L.mono και το CHROMagar που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της *L. monocytogenes* σε διάφορα προϊόντα (Aragon-Alegro και συν., 2008· Stessl και συν., 2009· Andritsos και συν., 2012). Γενικά, οι μέθοδοι με υψηλή ευαισθησία και τιμή πρόβλεψης αρνητικού αποτελέσματος (NPV) θεωρούνται καταλληλότερες όταν απαιτείται ανίχνευση ενός τροφιμογενούς παθογόνου μικροοργανισμού (Thrusfield, 2007). Η επίτευξη των υψηλών τιμών όσον αφορά στις παραμέτρους αυτές μπορεί να πραγματοποιείται μέσω πολλαπλών και παράλληλων δοκιμών, δηλαδή μέσω ταυτόχρονης χρήσης δύο ή περισσότερων θρεπτικών υποστρωμάτων για τη μελέτη του ίδιου δείγματος. Έπειτα από αυτή την παράλληλη χρήση υποστρωμάτων, κάθε δείγμα θεωρείται θετικό ως προς την παρουσία του παθογόνου όταν τουλάχιστον ένα υπόστρωμα παράγει θετικό αποτέλεσμα (Thrusfield, 2007). Στην περίπτωση μας και τα δύο χρησιμοποιούμενα θρεπτικά υποστρώματα εμφάνισαν υψηλή ευαισθησία και τιμή πρόβλεψης αρνητικού αποτελέσματος, τόσο στα δείγματα ρόκας (ALOA) όσο και στα δείγματα αγγουριών (RAPID[®]L.mono). Ωστόσο, η συνδυασμένη ευαισθησία ήταν ακόμα υψηλότερη, μειώνοντας έτσι την πιθανότητα μη ανίχνευσης θετικού δείγματος. Λαμβάνοντας επομένως υπ' όψιν τη μεταβολή της επίδοσης των υποστρωμάτων βάσει του προϊόντος, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η διεξαγωγή παράλληλων δοκιμών με χρήση τουλάχιστον δύο θρεπτικών μέσων αυξάνει την εμπιστοσύνη στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται για την ανίχνευση και τον επιπολασμό της *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών. Σε συμφωνία με το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μελέτης, οι Andritsos και συν. (2012) ανέφεραν ότι το ALOA και το RAPID[®]L.mono είχαν καλή επίδοση όσον αφορά στην ανίχνευση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε φυσικώς επιμολυσμένο χοίρειο κιμά και κατέληξαν στο ότι η παράλληλη χρήση περισσότερων του ενός θρεπτικών μέσων είναι απαραίτητη για να τη διεξαγωγή ενός ορθού συμπεράσματος.

Η τιμή πρόβλεψης θετικού αποτελέσματος (PPV) και η τιμή πρόβλεψης αρνητικού αποτελέσματος (NPV) υποδεικνύουν την πιθανότητα να είναι ένα δείγμα θετικό ή αρνητικό, αντίστοιχα, όταν το αποτέλεσμα της μεθόδου είναι θετικό ή αρνητικό, αντίστοιχα. Όσον αφορά στις συγκεκριμένες παραμέτρους, οι αποδόσεις των ALOA και RAPID[®]L.mono ήταν επαρκείς για την ανίχνευση της *L. monocytogenes*. Επειδή όμως και οι δύο αυτές παράμετροι εξαρτώνται

από τον επιπολασμό του παθογόνου, σημαντικός ήταν και ο προσδιορισμός των τιμών των λόγων πιθανοφάνειας. Οι λόγοι πιθανοφάνειας υποδεικνύουν την πιθανότητα να έχει ληφθεί ένα αποτέλεσμα από ένα θετικό δείγμα και δεν εξαρτώνται από την τιμή επιπολασμού του παθογόνου. Ως εκ τούτου, μεγαλύτεροι λόγοι πιθανοφάνειας θετικού αποτελέσματος (*PLR*) και μικρότεροι λόγοι πιθανοφάνειας αρνητικού αποτελέσματος (*NLR*) καταδεικνύουν πιο ακριβή απόδοση. Στην περίπτωση μας, αντίστοιχα με τους δείκτες *PPV* και *NPV*, οι αποδόσεις των λόγων πιθανοφάνειας των *ALOA* και *RAPID'L.mono* ήταν επαρκείς. Το *ALOA* και το *RAPID'L.mono* κρίθηκαν ως ικανά να ανιχνεύσουν την *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών και αυτό υποστηρίχθηκε και από τις υψηλές τιμές *AUC* που παρουσίασαν τα δύο υποστρώματα. Παρόλο που η αυξημένη ευαισθησία και τιμή πρόβλεψης αρνητικού αποτελέσματος αναφέρθηκαν ως οι επιθυμητές ιδιότητες για ένα θεραπευτικό μέσο, η χαμηλή τιμή πρόβλεψης θετικού αποτελέσματος ή οι μη επαρκείς τιμές των λόγων πιθανοφάνειας αυξάνουν σημαντικά το κόστος της ανάλυσης συγκριτικά με άλλες αναλύσεις, κατά τις οποίες το θεραπευτικό μέσο που χρησιμοποιείται παράγει λιγότερα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Αυτό, οφείλεται στο γεγονός ότι σε τέτοιες περιπτώσεις απαιτείται απομόνωση μεγαλύτερου αριθμού αποικιών που πρέπει να υποβληθούν σε βιοχημικές και μοριακές αναλύσεις για την επιβεβαίωση της παρουσίας του παθογόνου, ενώ μπορεί να προκύψουν υπερεκτίμηση του επιπολασμού και διεξαγωγή εσφαλμένων συμπερασμάτων όταν χρησιμοποιούνται ως δεδομένα των Μπαγεσιανών μοντέλων μόνο τα θετικά και αρνητικά αποτελέσματα των υποστρωμάτων, χωρίς περαιτέρω επιβεβαίωση.

Η χρήση της Μπαγεσιανής συμπερασματολογίας μπορεί να παρέχει καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων της έρευνας που αφορούν τροφιμογενή παθογόνα, καθώς λαμβάνεται υπ' όψιν η ατελής φύση των διαγνωστικών δοκιμών (Habib και συν., 2008). Εκτός αυτού, προσφέρει αρκετή βοήθεια στο να ξεπεραστεί το πρόβλημα παρατήρησης μηδενικού αποτελέσματος στις παραμέτρους και μειώνει την αβεβαιότητα που σχετίζεται με αυτές. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης κατέδειξαν ότι η Μπαγεσιανή μοντελοποίηση ήταν ικανή να προβλέψει με μεγάλη ακρίβεια την πραγματική τιμή του επιπολασμού (*TrP*) του παθογόνου, συνδυάζοντας μόνο τα θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τα δύο μέσα (εκτίμηση του επιπολασμού της *L. monocytogenes* στα δείγματα ρόκας και αγγουριών μέσω του *M2*). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και από τους Andritsos και συν. (2012), οι οποίοι ανέφεραν ικανότητα παροχής αξιόπιστων προβλέψεων της *TrP* της *L. monocytogenes* σε δείγματα χοίρειου κιμά, χρησιμοποιώντας μόνο τα θετικά και αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν από την παράλληλη χρήση των μέσων *ALOA* και *RAPID'L.mono*, χωρίς περαιτέρω επιβεβαίωση των ύποπτων ως *L. monocytogenes* αποικιών. Μέσω της Μπαγεσιανής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε και εκτίμηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes*, με βάση τα αποτελέσματα παρουσίας-απουσίας που δόθηκαν από τις μικροβιολογικές αναλύσεις. Τα αποτελέσματα της τρέχουσας μελέτης έδειξαν ότι ο παθογόνος ήταν παρών σε πολύ χαμηλά

επίπεδα και στα δύο λαχανικά, αλλά αυτό δεν αποκλείει το γεγονός ότι θα μπορούσε να προκαλέσει τροφική ασθένεια σε περίπτωση αύξησης των επιπέδων του κατά την αποθήκευση των προϊόντων αυτών. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να εφαρμόζονται προληπτικά μέτρα κατά τη διάρκεια των μετασυλλεκτικών χειρισμών, ώστε να εξαλείφεται η *L. monocytogenes* ή να διατηρείται όσο το δυνατόν χαμηλότερο το επίπεδο μόλυνσης των προϊόντων από το συγκεκριμένο παθογόνο.

Η παρουσία της *L. monocytogenes* έχει αναφερθεί σε πολλά φρούτα και λαχανικά και αρκετά από αυτά έχουν εμπλακεί σε κρούσματα τροφιμογενούς λιστερίωσης (Hadjiouka και συν., 2014b). Από τους 13 ορότυπους του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, οι ορότυποι 1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b είναι υπεύθυνοι για το 96-98% των λοιμώξεων που εκδηλώνονται σε ανθρώπους και ζώα παγκοσμίως. Από αυτούς, ο ορότυπος 1/2a εντοπίζεται στη μειοψηφία των κλινικών απομονώσεων (2-4%), αλλά επικρατεί μεταξύ των απομονώσεων που προέρχονται από τροφές. Αντιθέτως, ο ορότυπος 4b επικρατεί μεταξύ των κλινικών απομονώσεων (>50% των περιπτώσεων λιστερίωσης), ενώ εντοπίζεται λιγότερο συχνά μεταξύ των απομονώσεων που προέρχονται από τροφές σε σχέση με τα στελέχη του ορότυπου 1/2 (1/2a, 1/2b και 1/2c) (Kuhn και συν., 2008). Η πλειοψηφία των επιδημικών επεισοδίων ανθρώπινης λιστερίωσης συνδέεται με έναν από τους παραπάνω ορότυπους, ειδικότερα όμως με τον ορότυπο 4b (Swaminathan και Gerner-Smidt, 2007). Ως εκ τούτου ήταν πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη όλα τα απομονωθέντα στελέχη *L. monocytogenes* ανήκαν στον ορότυπο αυτό. Αρκετές τεχνικές έχουν αξιολογηθεί για την ικανότητά τους να διαφοροποιούν τα απομονωθέντα στελέχη τροφιμογενών παθογόνων. Η τεχνική που ακολουθείται κάθε φορά θα πρέπει να επιλέγεται ανάλογα με τον τύπο της μελέτης και τα διάφορα κριτήρια επίδοσής της, όπως η επαναληψιμότητα, η σταθερότητα και η διακριτική ικανότητα. Δεδομένου ότι ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν διαγνωστικός και όχι επιδημιολογικός, οι τεχνικές RAPD-PCR και *ger*-PCR επιλέχθηκαν ως καταλληλότερες. Η RAPD-PCR έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μέθοδος τυποποίησης, ενώ η *ger*-PCR με εκκινητή τον (GTG)₅ είναι γνωστή για τη διακριτική της ακρίβεια, ιδιαίτερα σε στελέχη του μικροοργανισμού *Lactobacillus* sp. (Gevers και συν., 2001) και έχει μόλις πρόσφατα εφαρμοστεί αποτελεσματικά σε τυποποίηση στελεχών της *L. monocytogenes* (Zunabovic και συν., 2012). Σε περίπτωση που η RAPD-PCR είναι η μόνη τεχνική τυποποίησης που εφαρμόζεται σε μία έρευνα, έχει προταθεί να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις εκκινητές για τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων (Kerf και συν., 1995). Ωστόσο, έως σήμερα δεν έχει προταθεί κανένας συνδυασμός τεχνικών όσον αφορά στην τυποποίηση των στελεχών. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η μέγιστη διαφοροποίηση των στελεχών της *L. monocytogenes* επιτεύχθηκε είτε με το συνδυασμό των τριών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην RAPD-PCR, είτε με το συνδυασμό των εκκινητών M13 και HLWL85 της RAPD-PCR με τη *ger*-PCR.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4- ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΥΓΡΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΡΟΚΑΣ ΚΑΙ ΠΕΠΟΝΙΟΥ ΣΤΟΥΣ 4, 10 ΚΑΙ 30 °C

4.1 Εισαγωγή²

Τα βασικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν την *L. monocytogenes* και τον καθιστούν ικανό να επιβιώνει και να εξαπλώνεται εντός ενός ξενιστή, είναι η δυνατότητά του να εισέρχεται στα κύτταρα-ξενιστές και να κινείται μεταξύ αυτών. Αυτός ο ενδοκυτταρικός παρασιτισμός απαιτεί την έκφραση μίας σειράς γονιδίων, πολλά εκ των οποίων βρίσκονται συγκεντρωμένα σε ένα γονιδιακό σύμπλεγμα μεγέθους 9-kb, γνωστό ως Listeria Pathogenicity Island (LPI-1). Το σύμπλεγμα αυτό βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων *prfA* και *orfX* και αποτελείται από τα έξι γονίδια *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* και *plcB* (Dussurget, 2008). Το γονίδιο *hly* κωδικοποιεί τη λιστεριολυσίνη O (LLO), μία τοξίνη δέσμησης χοληστερίνης και σχηματισμού πόρου απαραίτητη για τη βακτηριακή διαφυγή του παθογόνου από τα φαγосώματα και τα κύτταρα-ξενιστές (Kathariou και συν., 1987· Cossart και συν., 1989· Hamon και συν., 2012). Τα γονίδια *plcA* και *plcB* κωδικοποιούν τη φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη φωσφολιπάση C (PI-PLC) και τη φωσφατιδυλο-χολίνη φωσφολιπάση C (PC-PLC), αντίστοιχα. Και οι δύο φωσφολιπάσες συνεργάζονται με την LLO, για την αποτελεσματική απόδραση του παθογόνου από το φαγοκυτταρικά κενοτόπια και τη διαφυγή του στο κυτταρόπλασμα (Schlüter και συν., 1998· Grundling και συν., 2003). Το γονίδιο *mpl* κωδικοποιεί μία θερμολυσίνη μεταλλοπρωτεάση που εμπλέκεται στην ωρίμανση του προενζύμου pro-PlcB (Domann και συν., 1991· Raveneau και συν., 1992) και, τέλος, το γονίδιο *actA* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Acta, μία πρωτεΐνη επιφάνειας η οποία φαίνεται να αποτελεί έναν πολυλειτουργικό παράγοντα παθογονικότητας (Suarez και συν., 2001· Birmingham και συν., 2007· Travier και συν., 2013) (παρ. 2.2.2). Η μεταγραφή των παραπάνω γονιδίων ελέγχεται κυρίως από τον μεταγραφικό παράγοντα PrfA, ο οποίος κωδικοποιείται από το γονίδιο *prfA* (Bohne και συν., 1994· Renzoni και συν., 1999· Nadon και συν., 2002). Το γονίδιο αυτό με τη σειρά του έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζεται από έναν παράγοντα γνωστό ως σ^B. Ο παράγοντας αυτός κωδικοποιείται από το γονίδιο *sigB* και ρυθμίζει ένα μεγάλο και διαφορετικό σύνολο γονιδίων, τα οποία ενεργοποιούνται σε περιπτώσεις καταπόνησης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και συμμετέχουν στις διαδικασίες μεταφοράς, ενδοκύττωσης και παθογονικότητας του μικροοργανισμού. Μεταγραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο έλεγχος στην έκφραση του *prfA* όταν ο παθογόνος βρίσκεται εντός του ξενιστή, οδηγεί σε αποφυγή υπερέκφρασης των γονιδίων παθογονικότητας, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπερβολική βλάβη του κυττάρου-ξενιστή και σε μη επιτυχή βακτηριακή μόλυνση (Ollinger και συν., 2009). Η διαπίστωση αυτή αναδεικνύει την επικάλυψη που υπάρχει μεταξύ ελέγχου της

² Το παρόν κεφάλαιο έχει δημοσιευτεί υπό τη μορφή πρωτότυπου ερευνητικού άρθρου (original research article) με τα ακόλουθα στοιχεία: Expression of *Listeria monocytogenes* key virulence genes during growth in liquid medium, on rocket and melon at 4, 10 and 30 °C. 2016. Agni Hadjilouka, Christina Molfeta, Olga Panagiotopoulou, Spiros Paramithiotis, Marios Mataragas, Eleftherios H. Drosinos. Food Microbiology, 55:7-15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.008>.

γενικής απόκρισης σε συνθήκες καταπόνησης και ελέγχου των λειτουργιών που σχετίζονται με την παθογονικότητα.

Για την αποτελεσματική έκφραση της παθογονικότητας του μικροοργανισμού είναι αναγκαία και η έκφραση των ιντερναλινών, μίας οικογένειας πρωτεϊνών πλούσιων σε περιοχές λευκίνης (LLR πρωτεΐνες), οι οποίες εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση του παθογόνου με τον ξενιστή (Bierne και συν., 2007). Όσον αφορά στον ρόλο τους στην παθογονικότητα, μόνο η InlA και η InlB έχουν συνδεθεί με την εσωτερίκευση του παθογόνου σε μη φαγοκυτταρικά κύτταρα. Αντιθέτως, η ακριβής λειτουργία των υπόλοιπων ιντερναλινών παραμένει αδιευκρίνιστη, παρόλο που έχει τονιστεί η σημαντικότητα ορισμένων από αυτών, όπως οι InlC, InlJ και Lmo2470, στην λοιμοτοξικότητα του μικροοργανισμού (Liu και συν., 2007). Παράλληλα, κάποια γονίδια ιντερναλινών (π.χ. *inlJ*, *lmo2470* και *lmo2672*) ανήκουν σε μία ομάδα νέων γονιδίων παθογονικότητας, η οποία έχει εντοπιστεί μέσω συγκρίσεων μεταξύ παθογόνων και μη παθογόνων στελεχών και φέρεται να κωδικοποιεί μεταγραφικούς ρυθμιστές (π.χ. *lmo2672*) και ιντερναλίνες (π.χ. *InlJ* και *lmo2470*) που συμμετέχουν στην έκφραση παθογονικότητας (Roche και συν., 2008) (παρ. 2.2.2).

Η βελτιωμένη μελέτη των μοτίβων της γονιδιακής έκφρασης θα μπορούσε να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών βάσεων στις οποίες στηρίζεται η προσαρμογή του παθογόνου στις ποικίλες συνθήκες καταπόνησης. Η εφαρμογή των τεχνικών ποσοτικής ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR), έχει συμβάλει πάρα πολύ στην κατανόηση των πολύπλοκων βιολογικών διεργασιών της προσαρμογής του παθογόνου στις συνθήκες αυτές. Ως εκ τούτου, αυτές οι μοριακές τεχνικές εφαρμόζονται πλέον όλο και περισσότερο με σκοπό την ταχεία και ακριβή ποσοτικοποίηση του επιθυμητού mRNA των υπό μελέτη κυττάρων (Bustin, 2000· Bustin και συν., 2005). Ωστόσο εξακολουθούν να υπάρχουν διάφορες προκλήσεις, λόγω των παραλλαγών που συνδέονται με την απομόνωση του RNA, την ενζυματική αποδοτικότητα και την τυποποίηση των αποτελεσμάτων ποσοτικού προσδιορισμού (Bustin, 2000· Vandesompele και συν., 2002· Bustin και συν., 2005). Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος τυποποίησης περιλαμβάνει την ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης βάσει ενός εσωτερικού γονιδίου αναφοράς. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει τον έλεγχο όλων των διαφορετικών μεταβλητών που σχετίζονται με τη μέθοδο της qRT-PCR. Κατά συνέπεια, τα συμπεράσματα που προκύπτουν έπειτα από τη διεξαγωγή των αναλύσεων αυτών εξαρτώνται επίσης από την επιλογή του χρησιμοποιούμενου γονιδίου αναφοράς. Μέχρι στιγμής δεν έχει καθοριστεί ένα καθολικό εσωτερικό γονίδιο αναφοράς για τα ευκαρυωτικά ή προκαρυωτικά κύτταρα (Thellin και συν., 1999· Vandecasteele και συν., 2001· Vandesompele και συν., 2002· Gilsbach και συν., 2006). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται συχνά εσωτερικά γονίδια αναφοράς που βασίζονται είτε σε γονίδια τα οποία απαιτούνται για τη συντήρηση των βασικών κυτταρικών λειτουργιών

(housekeeping genes) είτε είναι rRNA γονίδια. Αν και αρχικά θεωρείτο ότι αυτού του είδους τα γονίδια εκφράζονται ομοιόμορφα, έχει αναφερθεί ότι έχουν παρουσιάσει και έκφραση που ποικίλει ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες (Thellin και συν., 1999· Vandecasteele και συν., 2001· Vandesompele και συν., 2002). Ως εκ τούτου, η ισχύς της επιλογής του γονιδίου αναφοράς σε συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες πρέπει να καθορίζεται πριν από την εφαρμογή των ποσοτικών μελετών έκφρασης mRNA.

Η ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με τη παθογονικότητα καθώς και η εκτίμηση της επίδρασης αρκετών συστατικών των τροφίμων στην έκφρασή τους, έχει υπάρξει επίσης αντικείμενο εντατικής μελέτης. Η ταυτοποίηση ωστόσο αρκετών γονιδίων, ειδικά αυτών που βρίσκονται συγκεντρωμένα στην νησίδα LIPI-1 καθώς και των ιντερναλινών, έχει αποτύχει στο να δημιουργήσει σύνδεση μεταξύ της παρουσίας των γονιδίων και της παθογονικότητας αν και η εμφάνιση συγκεκριμένων μεταλλάξεων έχει συνδεθεί με τη μη ικανότητα επιμόλυνσης ορισμένων απομονώσεων (Shetron-Rama και συν., 2003· Wong και Freitag, 2004· Roche και συν., 2005· Temoïn και συν., 2008· Miner και συν., 2008). Παράλληλα, η εκτενής μελέτη της μεταγραφικής ανταπόκρισης των προαναφερθέντων γονιδίων παθογονικότητας υπό την επίδραση διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η εξωκυτταρική τιμή του pH (Behari και Youngman, 1998), η θερμοκρασία (Leimeister-Wachter και συν., 1992· Chaturongakul και συν., 2008), οι υδατάνθρακες (Renzoni και συν., 1997· Milenbachs και συν., 1997· Milenbachs Lukowiak και συν., 2004), η νισίνη (Shi και συν., 2013), η θερμική επεξεργασία (Sheikh-Zeinoddin και συν., 2000), η υψηλή υδροστατική πίεση επεξεργασίας (Bowman και συν., 2008), τα διάφορα απολυμαντικά (Kastbjerg και συν., 2010) και το γαλακτικό και διοξικό οξύ (Stasiwicz και συν., 2011), έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η γονιδιακή έκφραση επηρεάζεται από το συνδυασμό διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων και μηχανισμών.

Παρόλο που η γονιδιακή έκφραση επηρεάζεται από το συνδυασμό των περιβαλλοντικών παραγόντων με τους μηχανισμούς του μικροοργανισμού και το υπόστρωμα ανάπτυξής του, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μελετών έχει ασχοληθεί με την έκφραση των γονιδίων παθογονικότητας σε πραγματικά τρόφιμα. Συγκεκριμένα, έχει αξιολογηθεί η συγκριτική έκφραση των σημαντικών γονιδίων παθογονικότητας κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του παθογόνου σε σολομό, ζυμούμενα λουκάνικα, μαλακό τυρί, γάλα επεξεργασμένο σε υπερυψηλή θερμοκρασία (UHT), κιμά και πατέ συκωτιού (Alessandria και συν., 2013· Olesen και συν., 2010· Rantsiou και συν., 2012a, 2012b· Duodu και συν., 2010), αλλά δεν έχει πραγματοποιηθεί μελέτη που να αφορά στην ανάπτυξή του σε επιφάνεια φρούτων ή λαχανικών. Το πεπόνι και η ρόκα βρίσκονται μεταξύ των φρούτων και των λαχανικών, αντίστοιχα, με μεγάλη κατανάλωση και ως εκ τούτου η μετασυλλεκτική τους φυσιολογία, η περιεκτικότητά τους σε θρεπτικά συστατικά, η μικροβιολογική τους ποιότητα και η διάρκεια ζωής τους έχουν μελετηθεί εκτενώς (Barillari και συν., 2005· Kourkoutas και συν., 2006·

Koukounaras και συν., 2006, 2007, 2009· Lester, 2008· Melchini και συν., 2009· Amodio και συν., 2015· Cavaiuolo και συν., 2015· Saladie και συν., 2015). Επιπλέον, το πεπόνι είναι πολύ ενδιαφέρον και από επιδημιολογική άποψη, καθώς έχει συνδεθεί με αρκετά τροφιμογενή κρούσματα (Walsh και συν., 2014), ένα εκ των οποίων αποτελεί και την έξαρση λιστερίωσης που εκδηλώθηκε στο Κολοράντο το 2011, συνδέθηκε με την κατανάλωση πεπονιών και αποτελεί το σοβαρότερο καταγεγραμμένο τροφιμογενές επιδημικό επεισόδιο λιστερίωσης (CDC, 2012) (παρ. 2.6).

4.2 Στόχος

Αντικείμενο της παρούσας πειραματικής ενότητας αποτέλεσε η μελέτη της έκφρασης δέκα γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα της *L. monocytogenes*, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του παθογόνου σε υγρό θρεπτικό μέσο, ρόκα και πεπόνι τα οποία διατηρήθηκαν στους 4, 10 και 30 °C. Υπό μελέτη τέθηκαν τα γονίδια *hly*, *plcA*, *plcB*, *sigB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *lmo2672* και *lmo2470*.

4.3 Υλικά και Μέθοδοι

4.3.1 Παρασκευή ενοφθαλμίσματος 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) (παρ. 3.3.3.2) και για τη μοριακή ταυτοποίηση του παθογόνου διεξήχθη PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε από τους D' Agostino και συν. (2004) (παρ. 3.3.3.3.1). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ορολογική τυποποίηση του στελέχους σύμφωνα με τους Doumith και συν. (2004) η οποία ενέταξε τον παθογόνο στον ορότυπο 4b (παρ. 3.3.5.1). 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 την παρασκευή του ενοφθαλμίσματος, αρχικά μελετήθηκε ο πληθυσμός του στελέχους έπειτα από ανάπτυξή του σε ζωμό BHI, στους 37 °C για 18 h. Η μελέτη αυτή κατέδειξε ότι έπειτα από 18 h στους 37 °C, η *L. monocytogenes* ανέπτυξε πληθυσμό της τάξεως των 9 log CFU/mL. Ως εκ τούτου, με την έναρξη της κάθε πειραματικής μελέτης

πραγματοποιούνταν η παρασκευή του ενοφθαλμίσματος, με ανανέωση αρχικά του στελέχους από τους -20 °C, η οποία ακολουθείτο 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 min και εκπλένονταν δύο φορές με ισοτονικό διάλυμα Ringer (LABM). Τέλος, ακολουθούσε επαναδιάλυσή τους στον ίδιο διαλύτη, σε όγκο ίδιο με τον αρχικό στον οποίο και είχαν αναπτυχθεί (5 mL).

Ο ενοφθαλμισμός σε ζωμό BHI, ρόκα και πεπόνι πραγματοποιούνταν με πληθυσμό της τάξεως των 7 με 7.5 log CFU/mL, μέσω διαδοχικών αραιώσεων. Συγκεκριμένα, φύλλα ρόκας και κύβοι πεπονιού (διαστάσεων περίπου 3 × 3 × 4 cm) τοποθετούνταν σε αποστειρωμένους περιέκτες (χωρητικότητας περίπου 500 mL) και ψεκάζονταν με περίπου 0.5 mL από την 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 ρόκας και του πεπονιού, 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, ρόκα, πεπόνι) τοποθετούνταν στους αντίστοιχους θαλάμους επώασης πριν τον ενοφθαλμισμό τους, ώστε να έχει πραγματοποιηθεί εξισορρόπηση της θερμοκρασίας.

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

4.3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Σε κάθε στάδιο δειγματοληψίας πραγματοποιούνταν πληθυσμιακή καταμέτρηση της *L. monocytogenes*. Για την αρίθμηση του παθογόνου στην περίπτωση της ρόκας και του πεπονιού, μεταφέρονταν ασηπτικά 10 g δείγματος εντός σακιδίου stomacher και ομογενοποιούνταν σε θερμοκρασία δωματίου με 90 mL ισοτονικού διαλύματος Ringer. Ακολουθούσε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων κι έπειτα επιστρωνόταν 0.1 mL από τις επιθυμητές αραιώσεις σε τρυβλία PALCAM (LABM). Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37 °C για 48 h και με το πέρας των 48 h καταμετρούνταν οι αποικίες που είχαν αναπτυχθεί στα τρυβλία (παρ. 3.3.2.1). 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.

4.3.3 *In vitro* και *in situ* γονιδιακή έκφραση

4.3.3.1 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 (παρ. 3.3.3.3.1), στην οποία στόχοι ήταν τα γονίδια μελέτης *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *lmo2470* και *lmo2672*. Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα *16S*, *IGS* και *rpoB*.

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 υπερμεταβαλλόμενες περιοχές. Οι μεταβαλλόμενες περιοχές είναι στις περισσότερες περιπτώσεις συγκεκριμένες εντός των ίδιων ειδών ή και μερικές φορές υποειδών (Deperrois-Lafarge και Meheut, 2012). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις τα είδη που ανήκουν σε διαφορετικά ή ταυτόσημα γένη δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν μέσω του *16S* rRNA (Ogier και συν., 2004). Επιπλέον, σε ορισμένα βακτηριακά είδη το γονίδιο χαρακτηρίζεται από δύο ή περισσότερα αντίγραφα, λόγω της ετερογένειας του οπερονίου *16S* rDNA (Nubel και συν., 1996; Crosby και 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 και συν. έκαναν μία υπόθεση λέγοντας ότι οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των διαγονιδιακών περιοχών (intergenic spacer, *IGs*) στο ριβοσωμικό RNA 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 rRNA *IGs* έχουν γίνει τμήματα ενδιαφέροντος τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και διαφοροποίηση πολύ στενά σχετιζόμενων βακτηριακών ειδών (Barry και συν., 1991; Ji και συν., 1994; Drebot και συν., 1996; Gurtler και συν., 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 (Dahlhöf και συν., 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 και συν., 2004; Da Mota και συν., 2004; Drancourt και συν., 2004; Κι και συν., 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 της *L. monocytogenes* που βρίσκονται στη βάση δεδομένων Genbank, 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 16**.

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

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

- Ρυθμιστικό διάλυμα (1×)
- MgCl₂ (2 mM)
- dNTP mix (0.2 mM)
- *Taq* πολυμεράση (1 U)
- Primer f (0.9 μM)
- Primer r (0.9 μM)
- Δις απεσταγμένο νερό

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

- Ρυθμιστικό διάλυμα (1×)
- MgCl₂ (2 mM)
- dNTP mix (0.2 mM)
- *Taq* πολυμεράση (1 U)
- Primer f (1.2 μM)
- Primer r (1.2 μM)
- 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
- } ×40 φορές

4. 72 °C για 30 sec
5. 72 °C για 5 min

Πίνακας 16 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.

<i>Γονίδια</i>	<i>Εκκινητές</i>	<i>Αλληλουχία</i>	<i>Αμπλικόνιο(bp)</i>	<i>Αναφορά</i>
<i>αναφοράς</i>				
<i>IGS</i>	IGS f	GGCCTATAGCTCAGCTGGTTA	135	Rantsiou και συν., 2012a
	IGS r	GCTGAGCTAAGGCCCCGTAAA		Rantsiou και συν., 2012a
<i>rpob</i>	Rpob f	CCGCGATGCGAAAACAAT	69	Olesen και συν., 2009
	Rpob r	CCWACAGAGATACGGTTATCRAATGC		Olesen και συν., 2009
<i>16S</i>	16S f	GATGCATAGCCGACCTGAGA	114	Van der Veen καιAbee, 2010
	16S r	CTCCGTCAGACTTTCGTCCA		Hadjilouka και συν., 2014
<i>παθογονικότητας</i>				
<i>hly</i>	Hly f	TACATTAGTGGAAGATGG	153	Rantsiou και συν., 2012a
	Hly r	ACATTCAAGCTATTATTTACA		Rantsiou και συν., 2012a
<i>plcA</i>	PlcA f	CTAGAAGCAGGAATACGGTACA	115	Rantsiou και συν., 2012a
	plcA r	ATTGAGTAATCGTTTCTAAT		Rantsiou και συν., 2012a
<i>plcB</i>	PlcB f	CAGGCTACCACTGTGCATATGAA	72	Olesen και συν., 2009
	PlcB r	CCATGTCTTCYGTTGCTTGATAATTG		Olesen και συν., 2009
<i>sigB</i>	SigB f	CCAAGAAAATGGCGATCAAGAC	166	Rantsiou και συν., 2012a
	SigB r	CGTTGCATCATATCTTCTAATAGCT		Rantsiou και συν., 2012a
<i>inlA</i>	InlA f	AATGCTCAGGCAGCTACAMTTACA	114	Olesen και συν., 2009
	InlA r	CGTGTCTGTTACRTTCGTTTTTCC		Olesen και συν., 2009
<i>inlB</i>	inlB f	AAGCAMGATTTTCATGGGAGAGT	78	Olesen και συν., 2009

Πίνακας 16 (συνέχεια)

<i>Γονίδια</i>	<i>Εκκινητές</i>	<i>Αλληλουχία</i>	<i>Αμπλικόνιο(bp)</i>	<i>Αναφορά</i>
παθογονικότητας				
	inlB r	TTACCGTTCCATCAACATCATAACTT		Olesen και συν., 2009
<i>inlC</i>	InlC f	ACTGGTCAGAAATGTGTGAATGA	80	Hadjilouka και συν., 2014
	InlC r	CCATCTGGGTCTTTGACAGT		Hadjilouka και συν., 2014
<i>inlJ</i>	InlJ f	TGCGTAAATGCTCACATCCAAG	81	Hadjilouka και συν., 2014
	InlJ r	TTGCCCTTCAGCATCCAAGT		Hadjilouka και συν., 2014
<i>Lmo2672</i>	Lmo2672 f	CGGCACACTTGGATTCTCAT	90	Liu και συν., 2003
	Lmo2672 r	AAACACATGGGACTTGCACC		Hadjilouka και συν., 2014
<i>Lmo2470</i>	Lmo2470 f	TGATTCCATGCAATTACTAGAACG	86	Liu και συν., 2003
	Lmo2470 r	ACTCCGTTAGTTTAGCCCCA		Hadjilouka και συν., 2014

4.3.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Σε κάθε στάδιο δειγματοληψίας, παράλληλα με την πληθυσμιακή καταμέτρηση της *L. monocytogenes* πραγματοποιούνταν λήψη και προετοιμασία δειγμάτων για τη μετέπειτα μελέτη της έκφρασης των γονιδίων παθογένειάς του. Στην περίπτωση των δειγμάτων ρόκας και πεπονιού, από το εκάστοτε ομογενοποιημένο μείγμα που χρησιμοποιούνταν για την πληθυσμιακή καταμέτρηση (10 g δείγματος & 90 mL ισοτονικό διάλυμα), μεταφέρονταν περίπου 9 mL εντός σωλήνων falcon. Απευθείας, τα falcons φυγοκεντρούνταν 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 200 μL διαλύματος RNAlater (Ambion, Whaltham, 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 τριπλούν.

4.3.3.3 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Αρχή λειτουργίας

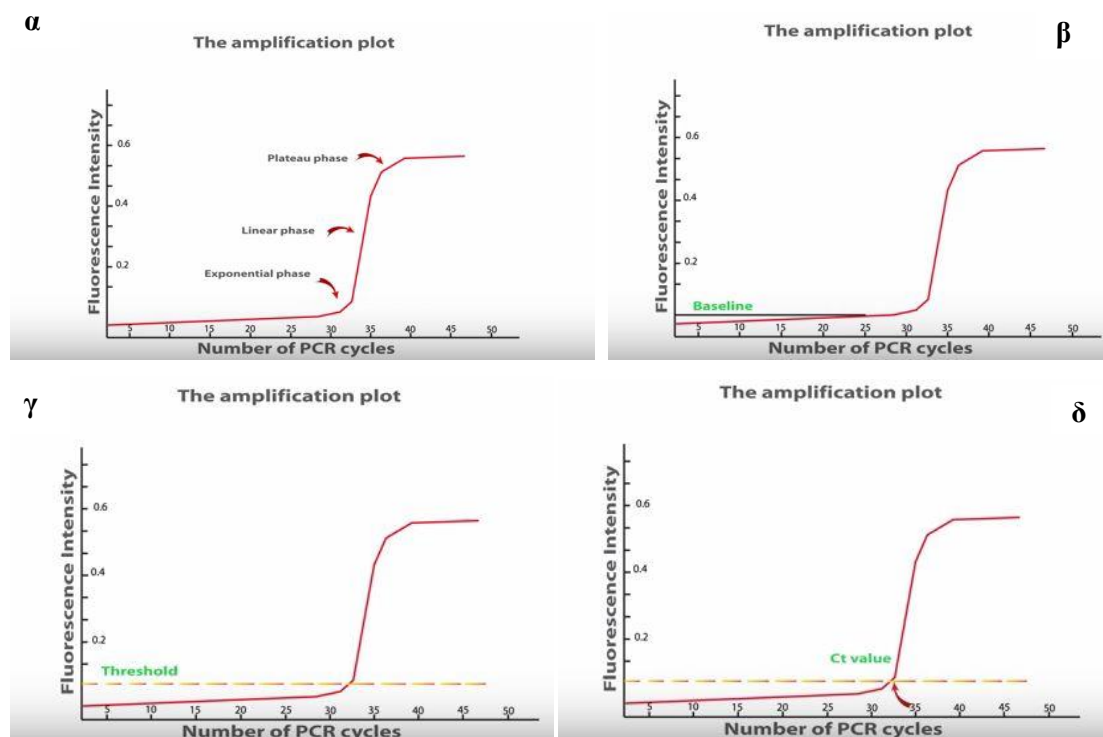
Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε με χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Η Real-Time PCR αποτελεί μία παραλλαγή της συμβατικής PCR, κατά την οποία πραγματοποιείται 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 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 φθορίζοντων 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 και 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 13α**). 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). Όταν άρχεται η εξάντληση των αντιδραστηρίων και αρχίζουν 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 13δ**) 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 13γ**), πάνω από το οποίο παρατηρείται σημαντική αύξηση του σήματος, με αποτέλεσμα να ξεχωρίσει έντονα από το επίπεδο ‘θορύβου’ (baseline) (**Εικόνα 13β**). 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 και συν., 2005· Kubista και συν., 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*.

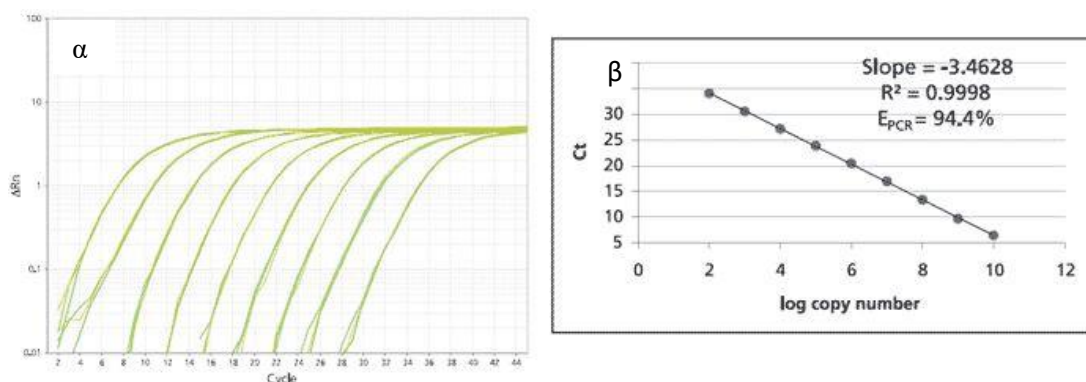


Εικόνα 13. Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, στην οποία διακρίνονται α) η εκθετική φάση (exponential), η γραμμική φάση (linear) και η φάση κορεσμού (plateau), β) το επίπεδο ‘θορύβου’ (baseline), γ) το όριο ανίχνευσης σήματος (threshold) και δ) η τιμή Ct.

– 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 και συν., 2001).

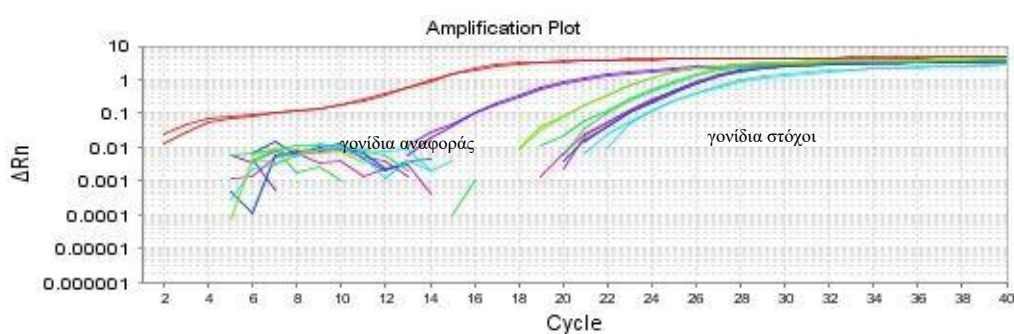
Η απόλυτη ποσοτικοποίηση μέσω Real-time PCR, παρέχει τη μεγαλύτερη ακρίβεια ποσοτικοποίησης δειγμάτων και χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητη η μέτρηση της ακριβούς ποσότητας της αλληλουχίας-στόχου στο δείγμα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη δημιουργία καμπύλης αναφοράς (standard curve) (Εικόνα 14), 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 (C_t) 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 C_t 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 απωλέσει τη γραμμικότητά της σε χαμηλές συγκεντρώσεις, προσεγγίζει πιθανότατα το όριο ανίχνευσης (Stratagene, 2006).



Εικόνα 14 Καμπύλη αναφοράς (standard curve) (β) που σχηματίστηκε από 9 σημεία, δηλαδή από 9 αραιώσεις του αρχικού μάρτυρα (α) (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 15). Χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη προσέγγιση, οι διαφορές των τιμών C_t 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).



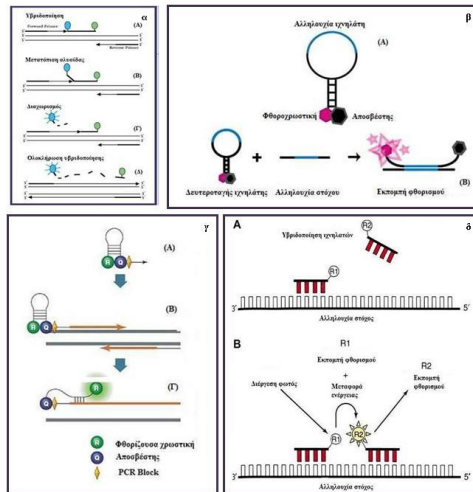
Εικόνα 15 Καμπύλες ενίσχυσης γονιδίων στόχων και γονιδίων αναφοράς

– Συστήματα σήμανσης αλληλουχιών-στόχων

Στην ποσοτική Real-time PCR για τη σήμανση των ενισχυόμενων αλληλουχιών υπάρχει δυνατότητα χρήσης δύο διαφορετικών συστημάτων ανίχνευσης των παραγόμενων

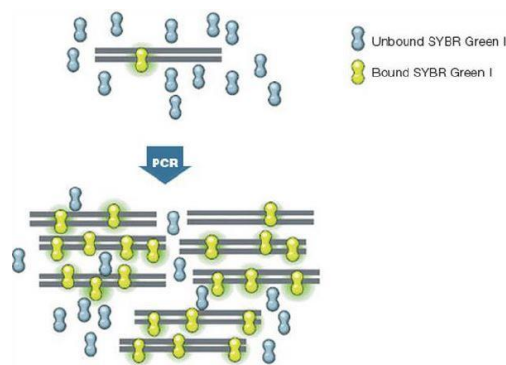
προϊόντων. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης, μέσω των οποίων ανιχνεύονται όλα τα δίκλιωνα μόρια που ενισχύονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, ενώ στη δεύτερη κατηγορία εντάσσονται τα ειδικά συστήματα ανίχνευσης, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται στοχευμένος διαχωρισμός της επιθυμητής αλληλουχίας από μη ειδικά προϊόντα που έχουν τυχόν ενισχυθεί, αλλά και από πιθανά διμερή των μορίων εκκινητών (Bustin, 2000· Guilietti και συν., 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 μηχανήμα 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 16**). 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 16 Ιχνηλάτες ειδικών συστημάτων ανίχνευσης: α) γραμμικοί ιχνηλάτες (Gloffke, 2003), β) ιχνηλάτες με δευτεροταγή δομή (Arga και συν., 2005), γ) ιχνηλάτες τύπου Σκορπιού (Bio-Rad, 2010) και δ) ιχνηλάτες τύπου FRET (Houghton και Cockerill, 2006).

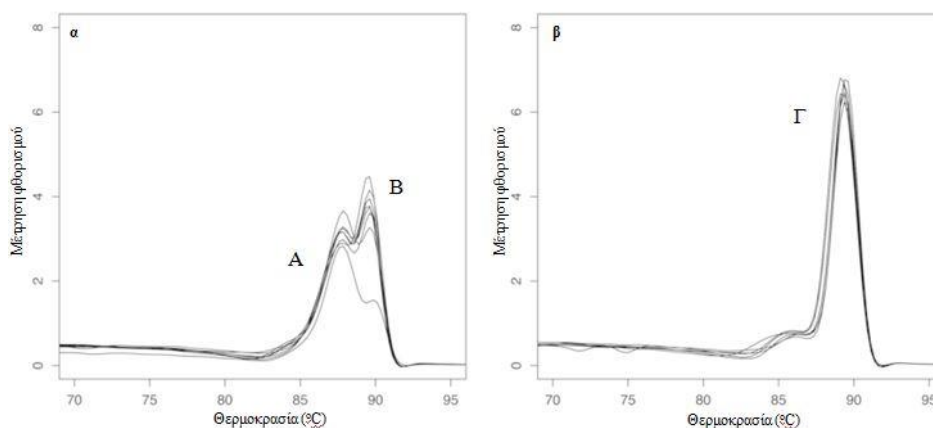
Στα μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης χρησιμοποιούνται φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες ενσωματώνονται σε δίκλινα μόρια DNA (dsDNA). Μία τέτοια ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι η SYBR green I, η οποία έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται σε οποιοδήποτε δίκλινο μόριο DNA. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη εντός του διαλύματος της αντίδρασης, παρουσιάζει έναν πολύ αχνό 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 μετريέται άμεσα η αυξανόμενη συγκέντρωση των δίκλωνων μορίων DNA (**Εικόνα 17**). 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 και Medrano, 2005· Stratagene, 2006).



Εικόνα 17 Μη ειδικό σύστημα ανίχνευσης, μέσω χρήσης της φθορίζουσας χρωστικής SYBR green I (Bio-Rad, 2010).

– Καμπύλη αποδιάταξης

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 και 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 18**).



Εικόνα 18 Καμπύλες αποδιάταξης στις οποίες φαίνεται: α) ύπαρξη μη επιθυμητών προϊόντων (πολλαπλές κορυφές Α και Β) και β) ενίσχυση μόνο του επιθυμητού προϊόντος (μοναδική κορυφή Γ) (Stüken και συν., 2015).

Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

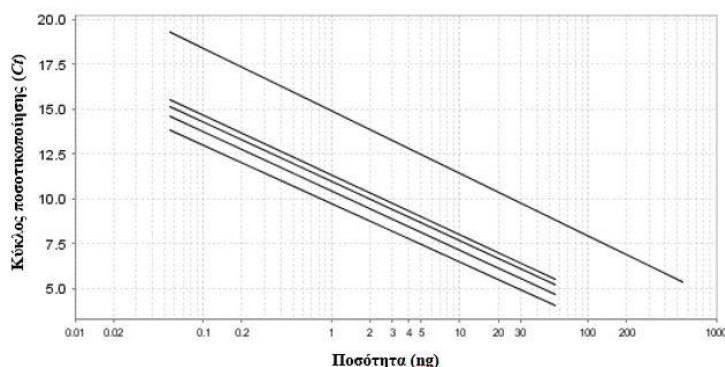
I. Εύρεση αποδοτικότητας

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 αναμειχθηκαν, 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 C_t [$C_t = f(\text{DNA})$] της κάθε αραιώσης (Εικόνα 19). Τέλος, από την κλίση της κάθε πρότυπης καμπύλης και με τη βοήθεια του μαθηματικού τύπου $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ (όπου slope είναι η κλίση της ευθείας $y=ax+b$) (Stratagene, 2006), υπολογίστηκε η αποδοτικότητα της μεθόδου για κάθε γονίδιο ξεχωριστά.

Γενικώς, οι διαδοχικές αραιώσεις πρέπει να συμπεριλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό συγκεντρώσεων, ώστε να διαβεβαιώνεται ότι η αντίδραση είναι ικανή να πραγματοποιείται εξ' ίσου τόσο σε υψηλές, όσο και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. 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 και συν., 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 και συν., 1996· Heid και συν., 1996· Valasek και 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 και συν., 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 και συν., 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 και συν., 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 και συν., 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 και Nolan, 2004).

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

1. Ομογενοποίηση δειγμάτων: Αφού πραγματοποιήθηκε απόψυξη των δειγμάτων που βρίσκονταν στους -20 °C, έγινε φυγοκέντρωσή τους στις 13000 στροφές, στους 4 °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 350 μL Buffer RA1 και 3.5 μL β-μερκαπταιθανόλης. Ακολούθησε ήπια ανάδευση σε vortex για 3-4 sec και στα ομογενοποιημένα δείγματα ασκήθηκαν υπέρηχοι (25 W/2.5 min) για να επέλθει λύση των κυττάρων.

3. Φιλτράρισμα του κυτταρολύματος: Για τη μείωση του ιξώδους 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 φυγοκέντρηση μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο τύπου erpendorf για κάθε δείγμα, ακολούθησε προσθήκη 350 μ L 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 350 μ L διαλύματος MDB (Membrane Desalting Buffer) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11000 στροφές για 1 min. Ακολούθησε απόρριψη του διηθήματος και επανάληψη της φυγοκέντρησης στις 11000 στροφές για 30 sec.
7. Πέψη του DNA: Για την πέψη του DNA προστέθηκαν 95 μ L διαλύματος DNAάσης [10 μ L reconstituted DNAase (rDNase) + 90 μ L 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 200 μ L διαλύματος Buffer RA2, το οποίο αδρανοποιεί την rDNAάση που βρίσκεται στη στήλη. Εν συνεχεία έγινε φυγοκέντρηση στις 11000 στροφές για 30 sec. Ακολούθησε τοποθέτηση της στήλης σε νέο erpendorf τελικού όγκου 2 mL και προστέθηκαν 600 μ L διαλύματος RA3 σε κάθε στήλη. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11000 στροφές για 30 sec και αφού έγινε απόρριψη του διηθήματος προστέθηκαν ακόμα 250 μ L διαλύματος RA3 σε κάθε στήλη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 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 60 μ L νερού ελεύθερου από RNAάσες (rRNAase free) και ακολούθησε φυγοκέντρηση 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

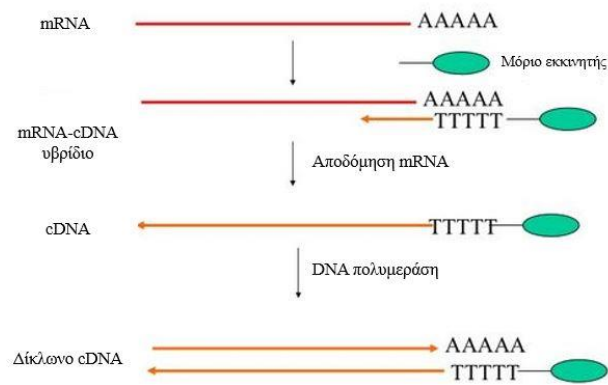
μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 260 και 280 nm (A_{260}/A_{280}), ενώ η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε αυτόματα από το νανοφωτόμετρο, μέσω του νόμου των Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon \times C \times d$$

όπου A: η απορρόφηση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, ε : 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 (συνήθως 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 (complementary 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 πολύ-(A)⁺ 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 ολιγονουκλειτίδια (50 ng/μL), RNA και νερό επεξεργασμένο με πυροανθρακικό διαιθύλιο (DEPC-treated).
2. Επώαση των δειγμάτων στους 65 °C για 5 min και στη συνέχεια τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για 1 min.
3. Παρασκευή δεύτερου μείγματος (M2) σε σωλήνες eppendorf, το οποίο περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα RT 1×, MgCl₂ 5 mM, διθειοθρεϊτόλη (DDT) (0.1 M) 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 1 μL SuperScript™ II RT (50 U/μL) (για τη δημιουργία δείγματος-ελέγχου, αντί για αντίστροφη μεταγραφάση 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 και αφού ολοκληρώθηκε τοποθετήθηκαν τα δείγματα στους -20 °C έως τη διεξαγωγή της RT-qPCR.

V. Αλυσιδωτή αντίδρασης 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® Green I, χρωστική αναφοράς ROX, MgCl₂, dNTP's και σταθεροποιητές.

Για την διεξαγωγή της RT-qPCR, το μίγμα 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 και Schmittgen, 2001· Meijerink και συν., 2001· Pfaffl, 2001· Liu και 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 και συν., 2002· Pfaffl, 2004). Σύμφωνα με το συγκεκριμένο μοντέλο, ο σχετικός λόγος έκφρασης (ratio, R) ενός γονιδίου υπολογίζεται από την εξίσωση:

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

όπου E_{target} : η αποδοτικότητα της μεθόδου για το γονίδιο-στόχος, E_{ref} : η αποδοτικότητα της μεθόδου για το γονίδιο-αναφοράς, $\Delta C_{\text{t target}}$: η διαφορά των Ct μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου και άγνωστων δειγμάτων για το γονίδιο-στόχος, $\Delta C_{\text{t ref}}$: 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 φορών 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 και συν., 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 προ-επεξεργασία 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 προ-επεξεργασία των δειγμάτων, ακολούθησε μελέτη της σταθερότητας των γονιδίων-αναφοράς μέσω της εφαρμογής του Excel, NormFinder (Andersen και συν., 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 και συν., 2010).

4.4 Αποτελέσματα

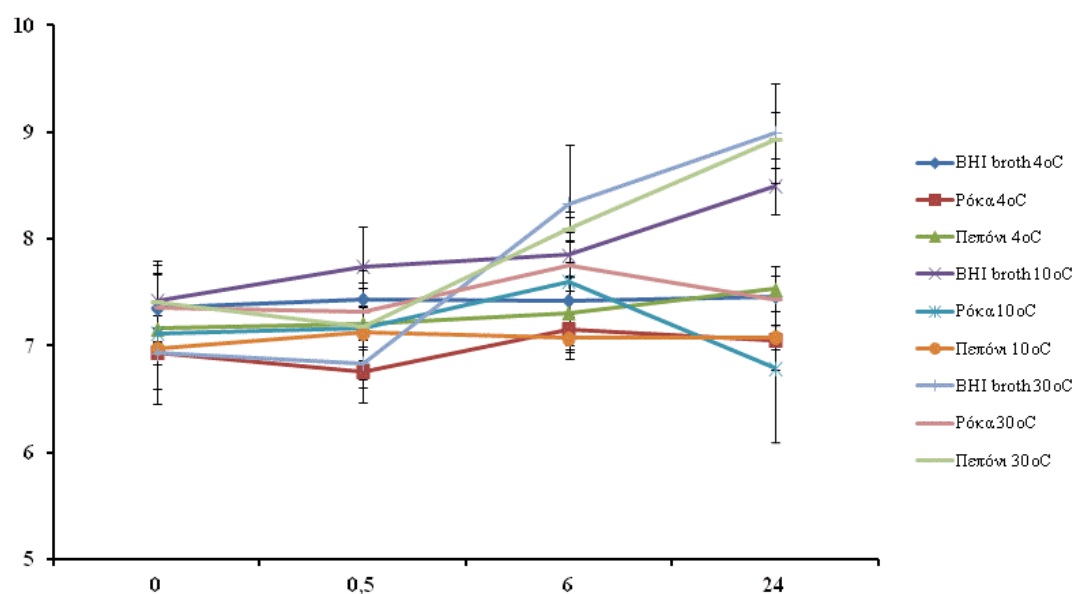
4.4.1 Πληθυσμιακή καταμέτρηση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*

Η αρίθμηση της *L. monocytogenes* έπειτα από ανάπτυξή του στους 4, 10 και 30 °C σε ζωμό BHI και δείγματα ρόκας και πεπονιού, έδειξε ότι ο παθογόνος παρέμεινε σταθερός πληθυσμιακά σε ορισμένες περιπτώσεις και στις υπόλοιπες εμφάνισε αύξηση. Συγκεκριμένα παρέμεινε σταθερός στα πληθυσμιακά επίπεδα του ενοφθαλμίσματος, έπειτα από την ανάπτυξή του σε ζωμό BHI στους 4 °C, σε δείγματα πεπονιού στους 4 και 10 °C και σε όλα τα δείγματα ρόκας και στις τρεις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού στην περίπτωση ανάπτυξής του σε ζωμό BHI στους 10 °C και σε ζωμό BHI και σε δείγματα πεπονιού στους 30 °C (Πίνακας 17, Σχήμα 3).

Πίνακας 17 Δυναμική του πληθυσμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (log CFU mL⁻¹ ή g⁻¹) σε ζωμό BHI, ρόκα και πεπόνι κατά την επώασή του στους 4, 10 και 30 °C.

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (h)	Υπόστρωμα ανάπτυξης		
		Ζωμός BHI	Ρόκα	Πεπόνι
4	0	7.35 (0.19) ^a	6.94 (0.35)	7.16 (0.27)
	0.5	7.43 (0.19)	6.76 (0.29)	7.20 (0.34)
	6.0	7.42 (0.09)	7.15 (0.15)	7.31 (0.34)
	24.0	7.46 (0.40)	7.05 (0.27)	7.53 (0.21)
10	0	7.42 (0.25)	7.11 (0.65)	6.97 (0.04)
	0.5	7.74 (0.38)	7.16 (0.55)	7.12 (0.31)
	6.0	7.85 (0.21)	7.60 (0.66)	7.07 (0.20)
	24.0	8.49 (0.26)	6.79 (0.69)	7.08 (0.12)
30	0	6.93 (0.10)	7.36 (0.32)	7.41 (0.39)
	0.5	6.83 (0.14)	7.32 (0.27)	7.18 (0.19)
	6.0	8.33 (0.55)	7.75 (0.24)	8.09 (0.12)
	24.0	8.99 (0.47)	7.43 (0.23)	8.93 (0.26)

^a Η τυπική απόκλιση δίνεται εντός παρενθέσεως



Σχήμα 3 Δυναμική του πληθυσμού της *L. monocytogenes* (log CFU mL⁻¹ ή g⁻¹) σε ζωμό BHI, ρόκα και πεπόνι κατά την επώασή του στους 4, 10 και 30 °C, έπειτα από δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό (0 h) και 0.5 h, 6 h και 24 h μετά από αυτόν.

4.4.2 Αποδοτικότητα της μεθόδου και επιλογή καταλληλότερου γονιδίου αναφοράς

Ο Πίνακας 18 παρουσιάζει τις τιμές αποδοτικότητας των μορίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της RT-qPCR και τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων-στόχων και γονιδίων-αναφοράς. Ο υπολογισμός της αποδοτικότητας των εκκινητών για τη συγκεκριμένη μέθοδο, πραγματοποιήθηκε από την κλίση της κάθε πρότυπης καμπύλης και με

τη βοήθεια του μαθηματικού τύπου $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. Συνήθως η αποδοτικότητα της RT-PCR ποικίλει διατηρώντας υψηλή γραμμικότητα ($r^2 > 0.989$) με τιμές που κυμαίνονται από 1.60 έως 2.10, ενώ όπως έχει ήδη αναφερθεί, ως καταλληλότερες τιμές θεωρούνται αυτές που κυμαίνονται από 1.90 έως 2.10. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος τρόπος υπολογισμού αποδοτικότητας δίνει σε μερικές περιπτώσεις αποτελέσματα με τιμές μεγαλύτερες από 2.10, το οποίο πρακτικά είναι αδύνατο βάσει της θεωρίας ενίσχυσης τμημάτων κατά τη διεξαγωγή μίας PCR. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι ίσως η συγκεκριμένη μέθοδος υπολογισμού της αποδοτικότητας δεν είναι ιδανική και ότι υπερεκτιμά την «πραγματική αποδοτικότητα» (Pfaffl, 2004). Έρευνες όμως έχουν δείξει ότι τέτοια αποτελέσματα έχουν υψηλή επαναληψιμότητα και σταθερότητα (Pfaffl, 2001, Pfaffl και συν., 2001). Για το λόγο αυτό οι αποδοτικότητες των μορίων εκκινητών που προέκυψαν στη συγκεκριμένη περίπτωση με τιμές μεγαλύτερες από 2.10, δεν απορρίφθηκαν.

Πίνακας 18 Αποδοτικότητα της μεθόδου για τα γονίδια-στόχους και τα γονίδια-αναφοράς

Γονίδια	Αποδοτικότητα (E)
<i>Αναφοράς</i>	
<i>16S</i>	2.05
<i>rpoB</i>	2.04
<i>IGs</i>	2.09
<i>Μελέτης</i>	
<i>hly</i>	1.98
<i>sigB</i>	2.13
<i>plcA</i>	1.94
<i>plcB</i>	2.00
<i>inlA</i>	2.12
<i>inlB</i>	2.04
<i>inlC</i>	2.06
<i>inlJ</i>	2.03
<i>lmo2470</i>	2.10
<i>lmo 2672</i>	2.10

Όσον αφορά στην επιλογή του γονιδίου αναφοράς που θα χρησιμοποιείτο για την περαιτέρω ανάλυση, τα αποτελέσματα κατέδειξαν ως καταλληλότερο για την ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων το γονίδιο *IGs*. Σε σχέση με τα άλλα δύο γονίδια αναφοράς (*16S* και *rpoB*), το *IGs* παρουσίασε τη μικρότερη μεταβλητότητα (τυπικό σφάλμα = 0.5978) και ως εκ τούτου χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων και τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

4.4.3 Επίδραση της θερμοκρασίας, του χρόνου και του υποστρώματος στη γονιδιακή έκφραση

Η επίδραση που είχε ο χρόνος, η θερμοκρασία και ο τύπος υποστρώματος επώασης στη σχετική έκφραση των γονιδίων *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *lmo2470*, *lmo2672*, *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inlJ*, εξετάστηκε έπειτα από την ανάπτυξη του στελέχους *L. monocytogenes* LQC 15257 σε ζωμό BHI, ρόκα και πεπόνι στους 4, 10 και 30 °C. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής παρουσιάζονται στα **Σχήματα 4** και **5**.

4.4.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης και του τύπου υποστρώματος ανάπτυξης στη γονιδιακή έκφραση

Τα αποτελέσματα της μελέτης όσον αφορά στη θερμοκρασία επώασης έδειξαν ότι αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε ρύθμιση της έκφρασης όλων των υπό μελέτη γονιδίων. Η ρύθμιση αυτή ήταν εξαρτώμενη σε όλες τις περιπτώσεις από τον τύπο του υποστρώματος ανάπτυξης, γεγονός που επαληθεύτηκε μέσω ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (two-way ANOVA) σε τουλάχιστον ένα χρονικό σημείο δειγματοληψίας, για κάθε γονίδιο. Συγκεκριμένα, στο ζωμό BHI 7 γονίδια (*sigB*, *plcB*, *lmo2470*, *lmo2672*, *inlA*, *inlB*, *inlJ*) παρουσίασαν υπερέκφραση με την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης, 1 γονίδιο (*plcA*) υποεκφράστηκε και 2 γονίδια (*hly*, *inlC*) παρουσίασαν μικτή απόκριση (υπέρ- ή υπό- έκφραση σε διαφορετικές χρονικές στιγμές δειγματοληψίας). Αντιθέτως, στα δείγματα πεπονιού 6 γονίδια (*hly*, *plcB*, *lmo2470*, *lmo2672*, *inlA*, *inlC*) υποεκφράστηκαν στους 30°C, 1 γονίδιο (*sigB*) υπερεκφράστηκε, 1 γονίδιο (*inlJ*) εμφάνισε μικτή απόκριση και 2 γονίδια (*plcA*, *inlB*) δεν επηρεάστηκαν καθόλου. Στην περίπτωση των δειγμάτων ρόκας η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης οδήγησε σε μικτή απόκριση 4 γονιδίων (*sigB*, *lmo2470*, *lmo2672*, *inlJ*), σε υπερέκφραση 2 γονιδίων (*plcB*, *inlB*), σε υπό-έκφραση 2 γονιδίων (*hly*, *plcA*) και δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση των άλλων δύο γονιδίων (*inlA*, *inlC*). Όμοια, η αλληλεπίδραση μεταξύ της θερμοκρασίας επώασης και του τύπου του υποστρώματος ανάπτυξης ήταν επίσης εμφανής, όταν σε κάθε θερμοκρασία επώασης αξιολογήθηκε η επίδραση του τύπου υποστρώματος ανάπτυξης στη γονιδιακή έκφραση.

Μελετώντας την έκφραση των γονιδίων στα δείγματα ρόκας σε σύγκριση με αυτήν στο ζωμό BHI, παρατηρήθηκε υπερέκφραση των γονιδίων *plcB*, *inlC* και *inlJ*, σε τουλάχιστον μία από τις θερμοκρασίες επώασης, ενώ τα γονίδια *sigB*, *hly*, *plcA*, *lmo2470*, *lmo2672*, *inlA* και *inlB* παρουσίασαν μικτή απόκριση μεταξύ των υπό μελέτη θερμοκρασιών επώασης. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με την αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων στο πεπόνι σε σύγκριση με αυτήν στο ζωμό BHI. Τα γονίδια *sigB*, *hly*, *plcA*, *lmo2470* και *inlA* εμφάνισαν υπερέκφραση σε τουλάχιστον μία από τις θερμοκρασίες επώασης, ενώ τα γονίδια *plcB*, *lmo2672*, *inlB*, *inlC* και *inlJ* παρουσίασαν μικτή απόκριση μεταξύ των υπό μελέτη θερμοκρασιών. Τέλος, συγκρίνοντας την έκφραση στη ρόκα σε σχέση με το πεπόνι, τα

αποτελέσματα έδειξαν υποέκφραση για τα γονίδια *hly*, *plcB*, *lmo2672*, *inlA* και *inlC* και υπερέκφραση για τα γονίδια *plcA* και *inlB*, σε τουλάχιστον μία από τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες επώασης. Για τα γονίδια *sigB*, *lmo2470* και *inlJ* παρατηρήθηκε μικτή απόκριση.

Το γονίδιο *sigB* κωδικοποιεί τον μεταγραφικό ρυθμιστή σ^B . Ο μεταγραφικός αυτός ρυθμιστής αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα για το κύτταρο, κυρίως στις περιπτώσεις συνθηκών καταπόνησης. Μελέτες έχουν δείξει ότι λειτουργικά γονίδια *sigB* συμβάλλουν στην αντίσταση του κυττάρου σε οσμωτική, οξειδωτική, θερμική καταπόνηση, σε καταπόνηση οξέος, σε έλλειψη άνθρακα καθώς και σε εφαρμογή απολυμαντικών ουσιών (Becker και συν., 1998· Wiedmann και συν., 1998· Ferreira και συν., 2001, 2003· Chan και συν., 2007· Van der Veen και Abee, 2010). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του παθογόνου στο ζωμό BHI στους 30 °C συγκριτικά με τους 4 και 10 °C, ενώ το γονίδιο παρουσίασε μικτή απόκριση κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του παθογόνου στα δείγματα ρόκας και πεπονιού. Διαφορετική απόκριση στην έκφραση του *sigB* έχει αναφερθεί επίσης σε προηγούμενη μελέτη, έπειτα από ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε κιμά και ζυμούμενα λουκάνικα (Rantsiou και συν., 2012b). Αντιθέτως όμως με τα παραπάνω αποτελέσματα, οι Rantsiou και συν. (2012a) ανέφεραν σε άλλη μελέτη μία γενική τάση υπερέκφρασης του γονιδίου, κυρίως σε δείγματα κιμά.

Η μεταγραφική οργάνωση της συστάδας LIPI-1 έχει υπάρξει το επίκεντρο εντατικής έρευνας. Η μεταγραφή των γονιδίων που βρίσκονται σε αυτή τη νησίδα ρυθμίζεται σε ένα μεγάλο βαθμό από το PrfA. Η σύνθεση του μονοκιστρονικού mRNA του γονιδίου *prfA* ξεκινάει από δύο σημεία υποκινητών, το P1_{*prfA*} και το P2_{*prfA*}. Και τα δύο αυτά σημεία αναγνωρίζονται από τον υποκινητή σ^A , ενώ το σημείο P2_{*prfA*} αναγνωρίζεται και από τον υποκινητή σ^B (Mengaud και συν., 1991· Nadon και συν., 2002· Rauch και συν., 2005· Schwab και συν., 2005· Ollinger και συν., 2009). Επιπλέον, η σύνθεση του δικιστρονικού (bicistronic) mRNA *plcA-prfA* ξεκινάει από τον υποκινητή *plcA*. Ωστόσο, η έκφραση του *prfA* είναι εξαρτώμενη και από τη θερμοκρασία. Έχει αναφερθεί ότι σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 37 °C η συνολική ποσότητα του παραγόμενου PrfA μειώνεται λόγω απουσίας του δικιστρονικού mRNA *plcA-prfA* (Leimeister-Wachter και συν., 1992), ενώ η μεταγραφή του *prfA* συνεχίζεται από το σημείο P2_{*prfA*}, το οποίο δεν εμφανίζει θερμοκρασιακή εξάρτηση. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε αύξηση στη μεταγραφή του γονιδίου *plcA* κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε ζωμό BHI και ρόκα στους 4 και 10 °C, συγκριτικά με τους 30 °C. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν για το *plcB* στα δείγματα πεπονιού. Αντιθέτως, η υπερέκφραση του *plcB* στο ζωμό BHI, ήταν εμφανής στους 30 °C συγκριτικά με τους 4 και 10 °C. Τα τελευταία αποτελέσματα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Τα προηγούμενα ωστόσο θα μπορούσαν να εξηγηθούν από την υπερέκφραση του *sigB*, η οποία έχει αναφερθεί να εμφανίζεται σε έκθεση καταπόνησης κρύου (Chan και συν., 2007) κάτι το οποίο όμως ήταν

εμφανές μόνο κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του παθογόνου στη ρόκα και όχι στο ζωμό BHI και στο πεπόνι. Όλα τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν την παρουσία επιπρόσθετων μεταγραφικών μηχανισμών που πρέπει να διερευνηθούν, συμφωνώντας έτσι με τις μελέτες των Williams και συν. (2000) και Kazmierczak και συν. (2006) σχετικά με τα γονίδια αυτά.

Όσον αφορά στο *hly*, παρατηρήθηκε υπερέκφραση κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του παθογόνου σε ζωμό BHI στους 30 °C σε σύγκριση με τους 4 και 10 °C, ενώ πραγματοποιήθηκε το ακριβώς αντίθετο κατά τη διάρκεια ανάπτυξής του στη ρόκα και στο πεπόνι. Η μεταγραφή του *hly* ξεκινάει από τρεις περιοχές υποκινητών, γνωστές ως P1_{*hly*}, P2_{*hly*} και P3_{*hly*}. Οι δύο πρώτες περιοχές είναι εξαρτώμενες από το PrfA, ενώ η τρίτη όχι (Domann και συν., 1991). Συνεπώς, η υπερέκφραση που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του παθογόνου στους 30 °C στο ζωμό BHI μπορεί να οφείλεται στην εξαρτώμενη από την αύξηση της θερμοκρασία μεταγραφή του *prfA*. Από την άλλη, τα αντίθετα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν στα δείγματα ρόκας και πεπονιού, μπορεί να οφείλονται στην πιθανή συμβολή της τρίτης περιοχής του υποκινητή. Ωστόσο, οι Behari και Youngman (1998) ανέφεραν ότι εκτός από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως η θερμοκρασία), διάφοροι άλλοι παράγοντες μπορεί να είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων μολυσματικότητας. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν ληφθεί σχετικά με τα γονίδια *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inlJ*. Σε όλες τις περιπτώσεις η υπερέκφραση που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του παθογόνου σε ζωμό BHI στους 30°C συγκριτικά με τους 4 και 10 °C, θα μπορούσε να εξηγηθεί με τη μερική εξάρτηση της έκφρασής τους από το PrfA (McGann και συν., 2008). Επιπλέον, οι McGann και συν. (2007) ανέφεραν ότι τα υψηλότερα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *inlA*, *inlB* και *inlC* παρατηρήθηκαν στους 37 και 42 °C (30 ή/και 37 °C για το γονίδιο *inlJ*) και τα χαμηλότερα επίπεδα στους 16 °C. Παρόλα αυτά, η υποέκφραση του γονιδίου *inlC* κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του παθογόνου στα δείγματα πεπονιού και του γονιδίου *inlJ* κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του παθογόνου στα δείγματα πεπονιού και ρόκας στους 30 °C, σε σχέση με τους 4 και 10 °C, μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη μίας μη εξαρτώμενης από το PrfA θέσης υποκινητή. Όσον αφορά στο γονίδιο *lmo2470*, η μεταγραφή που παρατηρήθηκε ήταν αρκετά παρόμοια με αυτή του γονιδίου *inlC* γεγονός αρκετά λογικό δεδομένου ότι και τα δύο γονίδια ανήκουν στην οικογένεια των ιντερναλινών (Bierne και συν., 2007). Τέλος, ο *Lmo2672* είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής που ανήκει στην οικογένεια Agac, για τον οποίο παρατηρήθηκε υπερέκφραση κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του παθογόνου σε ζωμό BHI στους 30 °C σε σύγκριση με τους 4 και 10 °C. Το ακριβώς αντίθετο παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του παθογόνου στα δείγματα ρόκας και πεπονιού. Δεδομένου ότι καμία περαιτέρω πληροφορία δεν είναι γνωστή έως σήμερα, δεν είναι δυνατό να γίνει καμία υπόθεση για τη συγκεκριμένη μεταγραφική του συμπεριφορά.

Όσον αφορά στην επίδραση του υποστρώματος ανάπτυξης στη γονιδιακή έκφραση, η μικτή απόκριση που παρατηρήθηκε είχε ως αποτέλεσμα τη μη ικανότητα διεξαγωγής

συμπερασμάτων που να αφορούν μία συγκεκριμένη τάση των γονιδίων. Παρόμοια συμπεράσματα έχουν καταγραφεί από τους Rantsiou και συν. (2012b) σε μελέτη γονιδιακής έκφρασης που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα κιμά και χυμούς από ζυμούμενα λουκάνικα, από την οποία δεν προσδιορίστηκε καμία συγκεκριμένη τάση για τα 54 γονίδια που μελετήθηκαν.

4.4.3.2 Επίδραση του χρόνου επώασης στη γονιδιακή έκφραση

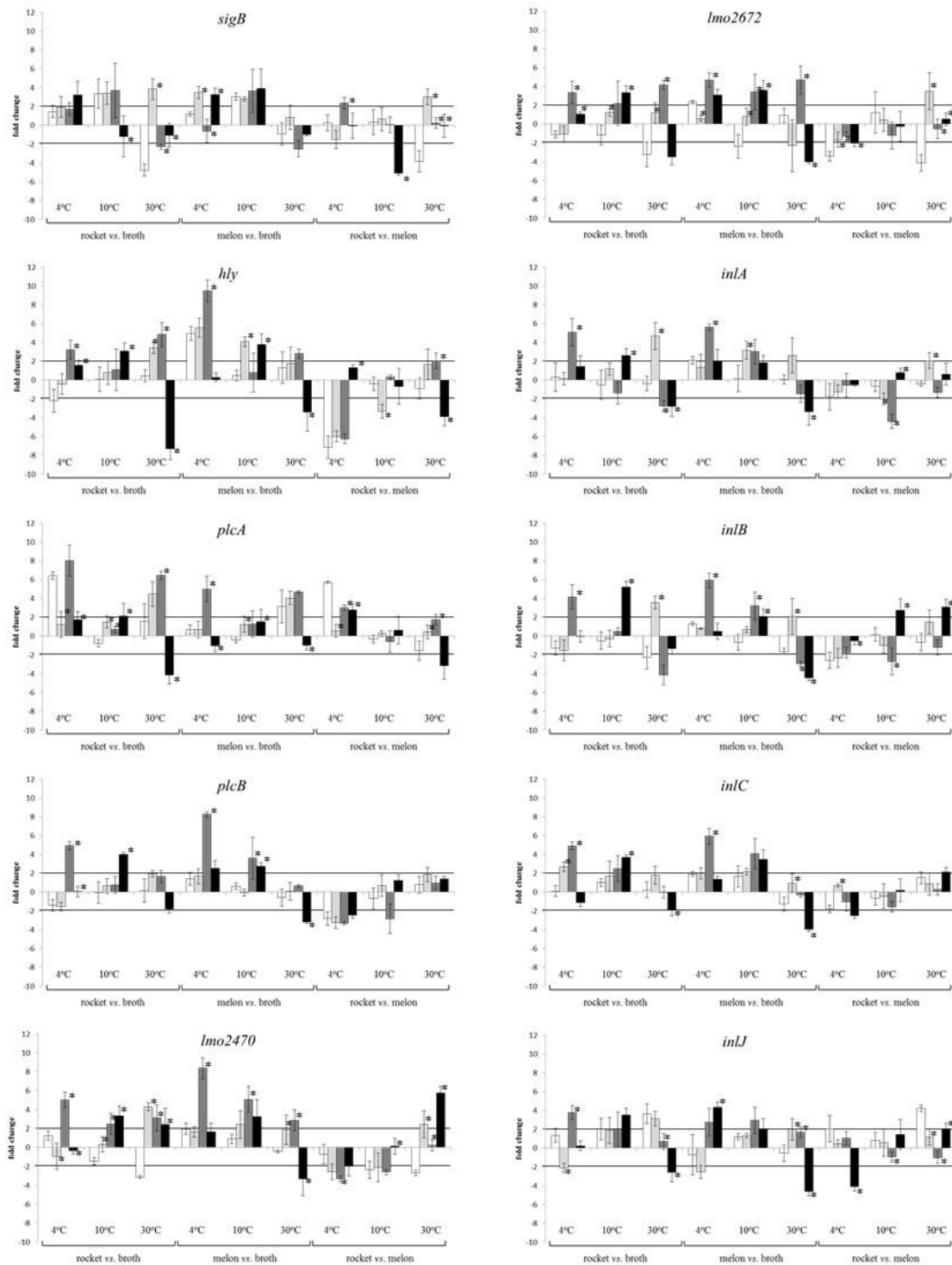
Όλα τα γονίδια εκτός από τις *inlA*, *inlB* και *inlC* παρουσίασαν μεταβολή στην έκφρασή τους κατά τη χρονική στιγμή του ενοφθαλμισμού (χρόνος δειγματοληψίας 0 h). Συγκεκριμένα, το *sigB* υπερεκφράστηκε σε ζωμό BHI στους 30 °C συγκριτικά με τους 4 και 10 °C, αλλά υποεκφράστηκε στη ρόκα στις αντίστοιχες θερμοκρασίες. Επιπλέον, στους 30 °C παρατηρήθηκε υποέκφραση στα δείγματα ρόκας συγκριτικά με το ζωμό BHI και τα δείγματα πεπονιού, ενώ στους 10 °C η υπερέκφραση ήταν εμφανής για τα δείγματα πεπονιού σε σύγκριση με το ζωμό BHI. Για το γονίδιο *hly* παρατηρήθηκε υποέκφραση στο πεπόνι στους 10 και 30 °C, συγκριτικά με τους 4 °C. Επιπλέον, στους 4 °C το γονίδιο υπερεκφράστηκε στο πεπόνι συγκριτικά με το ζωμό BHI και υποεκφράστηκε στη ρόκα συγκριτικά με το πεπόνι. Όσον αφορά στο *plcA*, καταγράφηκαν υποέκφραση του γονιδίου στη ρόκα στους 10 και 30 °C συγκριτικά με τους 4 °C, καθώς επίσης και υπερέκφρασή του στους 4 °C στη ρόκα συγκριτικά με το ζωμό BHI και το πεπόνι. Το γονίδιο *plcB* εμφάνισε υποέκφραση μόνο στους 4 °C στη ρόκα συγκριτικά με το πεπόνι. Υποέκφραση του *lmo2470* σημειώθηκε στη ρόκα στους 30 °C συγκριτικά με τους 4 και 10 °C, και στο πεπόνι στους 30 °C σε σχέση με τους 10 °C. Παράλληλα, υποέκφραση του γονιδίου ήταν επίσης εμφανής στη ρόκα στους 30 °C συγκριτικά με το ζωμό BHI και το πεπόνι. Για το γονίδιο *lmo2672* καταγράφηκε υπερέκφραση στη ρόκα στους 10 °C σε σχέση με τους 4 °C και υποέκφραση στους 30 °C σε σχέση με τους 10 °C. Επιπλέον, σημειώθηκε υπερέκφραση στους 4 °C στο πεπόνι συγκριτικά με το ζωμό BHI και υποέκφραση στους 4 και 30 °C στη ρόκα συγκριτικά με το πεπόνι. Τέλος, το γονίδιο *inlJ* υπερεκφράστηκε στη ρόκα στους 30 °C σε σχέση με τους 4 και τους 10 °C και στους 30 °C στη ρόκα σε σχέση με το ζωμό BHI και το πεπόνι. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στις χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (0h, 0.5h, 6h, 24h), χαρακτηρίστηκε από έλλειψη ομοιομορφίας αποτελεσμάτων. Μόνο η περίπτωση της υποέκφρασης του γονιδίου *plcB* στους 4 °C στη ρόκα σε σύγκριση με το πεπόνι ήταν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η μεταβολή της ρύθμισης της έκφρασης ήταν εμφανής μόνο σε ένα ή δύο σημεία δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια της επώασης. Είναι ενδιαφέρον ωστόσο ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η υπερέκφραση σε ένα στάδιο δειγματοληψίας ακολουθείτο από υποέκφραση στο αμέσως επόμενο στάδιο, ή και το ακριβώς αντίθετο (π.χ. *sigB*, *hly*, *plcA* κατά τη διάρκεια επώασης τους 30 °C στη ρόκα συγκριτικά με το ζωμό BHI).

Η ποσότητα των μελετών που έχουν διεξαχθεί για την αξιολόγηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα της *L. monocytogenes* κατά την ανάπτυξη του σε τρόφιμα περιορίζεται σε ένα μικρό αριθμό. Σε ορισμένες από αυτές, εξετάστηκε και το αποτέλεσμα της επίδρασης του χρόνου στην έκφραση των γονιδίων. Ακριβέστερα, οι Duodu και συν. (2010) μελέτησαν την έκφραση των *hly*, *inlA*, *actA* και *prfA* κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης δύο στελεχών του παθογόνου σε δείγματα σολομού στους 4 και 20 °C για 24 και 48 h. Όσον αφορά στα *hly* και *inlA*, φάνηκε να μην υπάρχει καμία διαφορά μεταξύ των 24 και 48 h στην ίδια θερμοκρασία. Οι Alessandria και συν. (2013) μελέτησαν την έκφραση των *plcA*, *hly*, *sigB* και *iap* επτά στελεχών *L. monocytogenes* που αναπτύχθηκαν σε μαλακό τυρί σε δύο θερμοκρασίες (4 και 12 °C) για 24 και 48 h. Τα *hly* και *plcA* δεν παρουσίασαν καμία διαφορά μεταξύ των 24 και 48 h στην ίδια θερμοκρασία, αντιθέτως όμως, το *sigB* εκφράστηκε διαφορετικά σε κάποια στελέχη, υπογραμμίζοντας έτσι τη σπουδαιότητα της διαφορετικότητας του στελέχους. Το τελευταίο ήταν και το συμπέρασμα της έρευνας που πραγματοποιήθηκε από τους Rantsiou και συν. (2012b), κατά την οποία μελετήθηκε μέσω μικροσυστοιχιών η έκφραση 54 γονιδίων από τρία στελέχη *L. monocytogenes*, που ενοφθαλμίστηκαν σε κιμά και χυμούς ζυμούμενων λουκάνικων και επωάστηκαν στους 4 °C για 30 min και 48 h. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας έδειξαν ότι τα γονίδια *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB* και *inlC* εκφράστηκαν διαφορετικά μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών δειγματοληψίας, ανάλογα με το στέλεχος και το τρόφιμο στο οποίο αναπτύχθηκε ο παθογόνος. Ωστόσο, σε καμία από τις παραπάνω έρευνες δεν αναφέρθηκε μελέτη της γονιδιακής έκφρασης τη χρονική στιγμή του ενοφθαλισμού. Στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων τη χρονική αυτή στιγμή και για την αιτιολόγηση αυτού του αποτελέσματος διεξήχθη μία λεπτομερής αξιολόγηση της πειραματικής διαδικασίας. Ο συνολικός χρόνος προετοιμασίας μέχρι τη σταθεροποίηση του RNA από το RNAlater δεν υπερέβη τα δύο min, χρονικό διάστημα το οποίο φαίνεται να είναι αρκετό για τη μεταγραφή των γονιδίων που μελετήθηκαν (Dennis και Bremer, 1974· Baracchini και Bremer, 1987· Liang και συν., 2000· Yang και συν., 2007· Elgart και συν., 2010).

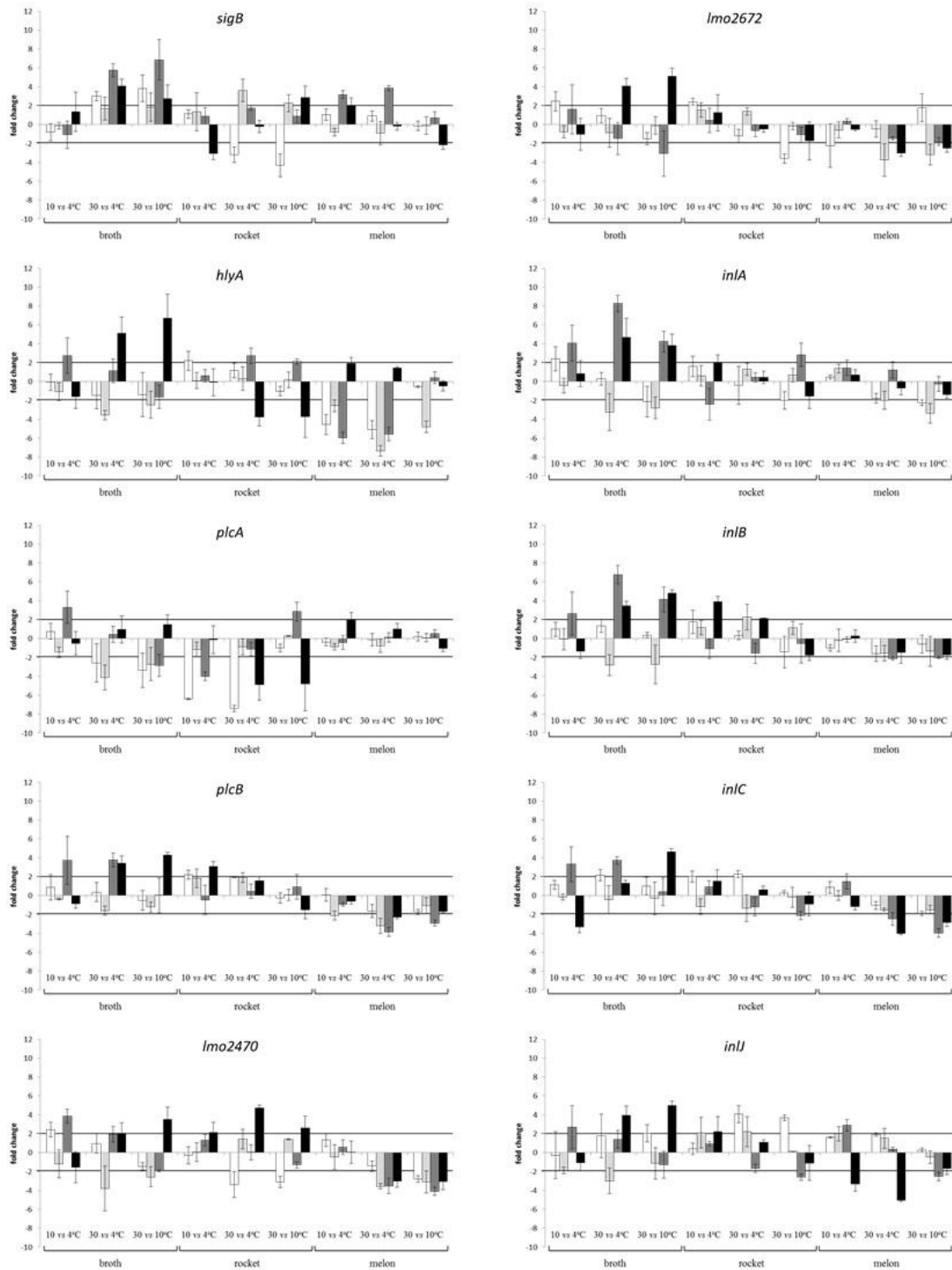
Η πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (MANCOVA) δεν έδωσε σημαντικά αποτελέσματα σε σύγκριση με την ανάλυση διασποράς (ANOVA). Αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού μετά από μία σημαντική πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση), το SPSS παρέχει από προεπιλογή μονοπαραγοντική ANOVA ως συνέχεια της ανάλυσης. Η διαφορά είναι ότι η αρχική συνολική πολυπαραγοντική ανάλυση προστατεύει τα 'διογκωμένα' ποσοστά σφάλματος τύπου I, καθώς εάν η αρχική δοκιμή είναι μη σημαντική αγνοούνται τυχόν μεταγενέστερες δοκιμές. Η έννοια της προστασίας ωστόσο είναι απατηλή, καθώς μία σημαντική πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης αντικατοπτρίζει μία σημαντική διαφορά για μία εξαρτημένη μεταβλητή και όχι για το σύνολό τους. Στη συνέχεια διεξάγονται μεταγενέστερες ANOVA για όλες τις εξαρτημένες μεταβλητές, αλλά η πολυμεταβλητή

ανάλυση διακύμανσης προστατεύει μόνο την εξαρτημένη μεταβλητή για την οποία υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Ως εκ τούτου, πρέπει να εφαρμόζεται στις μεταγενέστερες ANOVA διόρθωση Bonferroni. Αυτή ήταν και η περίπτωση (εφαρμόστηκε μία διορθωμένη p-value) όλης της στατιστικής ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, λόγω της παρουσίας πολλαπλών γονιδίων.

Εν κατακλείδι, για πρώτη φορά αξιολογήθηκε η έκφραση των συγκεκριμένων δέκα γονιδίων που σχετίζονται με τη μολυσματικότητα του παθογόνου, έπειτα από ανάπτυξη αυτού σε ρόκα και πεπόνι. Παρόλα αυτά, δεν προσδιορίστηκε καμία συγκεκριμένη τάση σχετικά με την επίδραση του χρόνου επώασης, της θερμοκρασίας επώασης και του τύπου υποστρώματος ανάπτυξης στη γονιδιακή έκφραση. Ως εκ τούτου, οι διαφορές στην έκφραση που παρατηρήθηκαν υποδεικνύουν ενδεχομένως επιπρόσθετους ρυθμιστικούς μηχανισμούς.



Σχήμα 4 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη σχετική έκφραση των γονιδίων *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *lmo2470*, *lmo2672*, *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inlJ* κατά την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* LQC 15257 σε ζωμό ΒΗΙ, ρόκα και πεπόνι στους 4, 10 και 30 °C. Οι λευκές ράβδοι αναφέρονται στην ώρα 0, οι ράβδοι χρώματος ανοιχτού γκρι στη δειγματοληψία της 0.5 h, οι ράβδοι χρώματος σκούρου γκρι στη δειγματοληψία των 6h και οι μαύρες ράβδοι στη δειγματοληψία των 24 h. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής. Ο αστερίσκος σημαίνει ότι η έκφραση είναι σημαντικά ($P < 0.01$) διαφορετική από την αντίστοιχη του χρόνου 0 (0h).



Σχήμα 5 Επίδραση του τύπου του υποστρώματος ανάπτυξης στη σχετική έκφραση των γονιδίων *sigB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *lmo2470*, *lmo2672*, *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inlJ* κατά την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* LQC 15257 σε ζωμό BHI, ρόκα και πεπόνι στους 4, 10 και 30 °C. Οι λευκές ράβδοι αναφέρονται στην ώρα 0, οι ράβδοι χρώματος ανοιχτού γκρι στη δειγματοληψία της 0.5 h, οι ράβδοι χρώματος σκούρου γκρι στη δειγματοληψία των 6h και οι μαύρες ράβδοι στη δειγματοληψία των 24 h. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής. Ο αστερίσκος σημαίνει ότι η έκφραση είναι σημαντικά ($P < 0.01$) διαφορετική από την αντίστοιχη του χρόνου 0 (0h).

**5 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5- ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ
ΛΕΜΟΝΟΧΟΡΤΟΥ (*CYMBOROGRON CITRATUS*) ΣΤΟΝ
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΗ *LISTERIA*
MONOCYTOGENES ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΡΟΚΑΣ ΚΑΙ ΠΕΠΟΝΙΟΥ
ΑΠΟΘΗΚΕΥΜΕΝΑ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ.**

5.1 Εισαγωγή³

Η προστασία των φρέσκων προϊόντων από τους παθογόνους μικροοργανισμούς οφείλει να πραγματοποιείται μέσω διεργασιών που διατηρούν το χαρακτηρισμό "φρέσκο", ο οποίος υποδηλώνει ή υπονοεί ότι τα τρόφιμα είναι μη επεξεργασμένα, σε ακατέργαστη μορφή και δεν έχουν καταψυχθεί ή υποβληθεί σε οποιαδήποτε μορφή θερμικής επεξεργασίας ή άλλη μορφή συντήρησης (CFR, 2015a). Ως εκ τούτου, η βελτίωση των τεχνικών ήπιας συντήρησης και η χρήση φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών έχουν μελετηθεί ευρέως κατά τις τελευταίες δεκαετίες (Goni και συν., 2009). Μεταξύ των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων συμπεριλαμβάνονται και τα αιθέρια έλαια, τα οποία αποτελούν πτητικά ελαιώδη υγρά που λαμβάνονται από διάφορα μέρη φυτών και φρούτων και είναι γνωστά εδώ και αιώνες για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως επιπρόσθετες γεύσεις, ενώ πολυάριθμες μελέτες έχουν περιγράψει τις αντιμικροβιακές επιδράσεις τους, καθώς και τη σημαντικότητά τους σε διάφορους άλλους τομείς όπως η φαρμακολογία και φαρμακευτική (Burt, 2004· Cristani και συν., 2007· Viuda-Martos και συν., 2008).

Το εγγενές άρωμα και η αντιμικροβιακή δράση των αιθέρια ελαίων σχετίζονται συνήθως με τη συγκέντρωση και χημική δομή των συστατικών τους, καθώς και με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών που επηρεάζουν τη βιοδραστικότητα των ουσιών (Avila-Sosa και συν., 2012). Το κύριο τους πλεονέκτημα είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε οποιοδήποτε τρόφιμο και ότι ο Αμερικάνικος Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (U.S Food and Drug Administration) τα έχει κατατάξει στις ουσίες που αναγνωρίζει ως γενικά ασφαλείς (Generally Recognized As Safe, *GRAS*) ή ως εγκεκριμένα πρόσθετα τροφίμων (Nedorostova και συν., 2009· CFR, 2015b). Επιπλέον, τα έλαια χρησιμοποιούνται ευρέως στη μαγειρική γεγονός που τα καθιστά εύκολα αποδεκτά από τους καταναλωτές. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των αιθέρια ελαίων επιτυγχάνεται συνήθως σε συγκεντρώσεις που προκαλούν αλλοίωση στη φυσική γεύση και οσμή των τροφίμων (Nazer και συν., 2005). Για να μειωθεί αυτή η επίδραση έχει προταθεί η χρήση των ατμών που προέρχονται από αυτά έναντι της άμεσης εφαρμογής τους (Velazquez-Nunez και συν., 2013). Μελέτες που έχουν εφαρμόσει ατμούς αιθέρια ελαίων σε τρόφιμα, έχουν καταδείξει παρεμπόδιση κατά τροφιμογενών παθογόνων και μικροοργανισμών αλλοίωσης. Η παρεμπόδιση σε αυτές τις περιπτώσεις επιτεύχθηκε σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με την εφαρμογή της

³Το παρόν κεφάλαιο έχει δημοσιευτεί υπό τη μορφή πρωτότυπου ερευνητικού άρθρου (original research article) με τα ακόλουθα στοιχεία: Effect of lemongrass essential oil vapors on microbial dynamics and *Listeria monocytogenes* survival on rocket and melon stored under different packaging conditions and temperatures. 2015. Agni Hadjilouka, Melissanthi Polychronopoulou, Spiros Paramithiotis, Periklis Tzamalidis, Eleftherios H. Drosinos. *Microorganisms*, 3:535-550; doi:10.3390/microorganisms3030535.

υγρής φάσης των ελαίων και, ως εκ τούτου, η επίδραση στα χαρακτηριστικά των τροφίμων ήταν μειωμένη (Tyagi και Malik, 2011· Avila-Sosa και συν., 2012).

Το λεμονόχορτο (*Cymbopogon citratus*) είναι ένα πολυετές αγρωστώδες φυτό, το οποίο καλλιεργείται ευρέως σε ζεστές, τροπικές και υποτροπικές περιοχές (Naik και συν., 2010). Περιέχει 1-2% αιθέριο έλαιο σε ξηρή βάση και η χημική του σύνθεση μεταβάλλεται ως συνάρτηση της γενετικής ποικιλομορφίας, του περιβάλλοντος και των γεωπονικών χειρισμών της εκάστοτε καλλιέργειας (Carlson και συν., 2001). Το πτητικό έλαιο που λαμβάνεται από τα φρέσκα φύλλα χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες αρωμάτων και καλλυντικών. Αποτελείται ως επί το πλείστον από ενώσεις μονοτερπενίων. Η κιτράλη (3,7-διμεθυλο-2,6-οκταδιενάλη) η οποία είναι ένα από τα κύρια συστατικά αποτελεί ένα φυσικό μίγμα των ισομερών άκυκλων μονοτερπενικών αλδευδών γερανιάλη και νεράλη. Εκτός από την κιτράλη το έλαιο αποτελείται επίσης από μυρκένιο, γερανιόλη και οξικό γερανύλιο (Bonada de Silva και συν., 2008). Πιθανολογείται ότι τα αιθέρια έλαια χωρίς φαινολικές ομάδες, όπως το έλαιο του λεμονόχορτου, προκαλούν διάσπαση της μεμβράνης λόγω των λιπόφιλων ενώσεών τους (Mendoza και συν., 1997). Ωστόσο, το έλαιο του λεμονόχορτου όχι μόνο βλάπτει την δομή της μεμβράνης μέσω της διάχυσης μονοτερπενίων, αλλά διευκολύνει και την διαλυτότητα των κυτταρικών μεμβρανών όταν εφαρμόζεται σε αέρια μορφή (Amit και Malik, 2010· Sivakumar και Bautista-Banos, 2014). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το αιθέριο έλαιο του λεμονόχορτου έχει αντικαταθλιπτική, αντιοξειδωτική, αντισηπτική, στυπτική, κατευναστική, ηρεμιστική καθώς και βακτηριοκτόνο, μυκητοκτόνο και γενικά αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων, των ζυμών και των Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων (Baratta και συν., 1998· Hammer και συν., 1999· Cimanga και συν., 2002· Daferera και συν., 2003· Naik και συν., 2010). Παρ' όλ' αυτά, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μελετών έχει διεξαχθεί σχετικά με την εφαρμογή του συγκεκριμένου αιθέριου ελαίου σε φρέσκα προϊόντα, με πολύ ελπιδοφόρα ωστόσο αποτελέσματα (Raybaudi-Massilis και συν., 2006· Arrebola και συν., 2010· Azarakhsh και συν., 2014).

Τα φρεσκοκομμένα λαχανικά και τα πεπόνια έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε νερό και θρεπτικά συστατικά (ενεργότητα νερού, $a_w > 0.90$), ενώ οι τιμές του pH τους είναι υψηλότερες από 4.5. Τα χαρακτηριστικά αυτά τα καθιστούν κατάλληλους ξενιστές για τους περισσότερους μικροοργανισμούς. Παράλληλα, οι συνθήκες ψύξης και η υψηλή διαπερατότητα οξυγόνου στις συσκευασίες μεμβράνης, εντός των οποίων η περιεκτικότητα σε O_2 και CO_2 είναι μεγαλύτερη και μικρότερη από 5%, αντίστοιχα, (Lund, 1982) επιτρέπουν στα βακτήρια να ανταγωνίζονται με μεγάλη επιτυχία τους μύκητες που αναπτύσσονται στα τρόφιμα. Ως εκ τούτου, τα βακτήρια είναι πιο συχνά υπεύθυνα για τη μετασυλλεκτική αλλοίωση των υπό ψύξη φρεσκοκομμένων λαχανικών και των πεπονιών από ότι οι μύκητες, με την πλειοψηφία των βακτηρίων αυτών να είναι ψυχρότροφα και Gram-αρνητικά (Barth και συν., 2009). Οι μικροοργανισμοί που

βρίσκονται πιο συχνά στις έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες είναι οι *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Chromobacterium* spp., ζύμες και τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Membre και συν., 1995), ενώ τα *Pseudomonas* spp., έχουν αναφερθεί ως οι πιο συνήθεις αλλοιογόνοι πληθυσμοί σε κομμένα πεπόνια (Ukuku και Sapers, 2005).

Ο σημαντικότερος μικροοργανισμός αλλοίωσης των υπό ψύξη φρεσκοκομμένων λαχανικών είναι τα φθορίζοντα είδη του γένους *Pseudomonas*. Οι ψευδομονάδες είναι ραβδοειδή, Gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιούν μία ευρεία ποικιλία οργανικών ενώσεων για να παράγουν οξειδωτικά γλυκόζη και/ή μαλτόζη. Ως εκ τούτου, είναι αυστηρώς αερόβια βακτήρια. Τα είδη αυτά μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις ομάδες βάσει της ομολογίας του RNA και σε εννέα ομάδες βάσει την σύνθεσης των κυτταρικών λιπαρών οξέων. Οι ψευδομονάδες βρίσκονται ευρέως στη φύση, τόσο σε ζωικά όσο και σε φυτικά προϊόντα. Μερικά είδη ψευδομονάδων παράγουν υδατοδιαλυτές, φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες μπορεί να παρατηρηθούν σε αλλοιωμένα τρόφιμα με ένα υπεριώδες φως. Αυτές είναι συνήθως κίτρινο-πράσινες αλλά μπορεί να εμφανιστούν και ως μπλε ή πορτοκαλί, ανάλογα με το είδος και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Παράγουν καταλάση, οξειδάση (τα περισσότερα) και ένζυμα που καταλύουν πρωτεολυτικές και λιπολυτικές αντιδράσεις, οι οποίες συμβάλλουν στην αλλοίωση των υπό ψύξη νωπών προϊόντων ζωικής προέλευσης, καθώς και πηκτινολυτικά ένζυμα που μπορούν να προκαλέσουν μαλακή σήψη των σαρκωδών λαχανικών. Οι ψευδομονάδες είναι ευαίσθητες στη θερμότητα και δεν εντοπίζονται σε τρόφιμα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, εκτός και αν υπάρξει διασταυρούμενη επιμόλυνση έπειτα από αυτήν. Είναι επίσης ευαίσθητες στην ξήρανση και την ακτινοβολία γάμμα. Ωστόσο, είναι σε θέση να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ψύξης (με ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 4 °C) και για το λόγο αυτό έχουν απομονωθεί από ποικιλία κατεψυγμένων τροφίμων και τροφίμων υπό ψύξη, συμπεριλαμβανομένων και φρεσκοκομμένων προϊόντων (Barth και συν., 2009).

Τα βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* είναι μη σποριογόνα ραβδοειδή Gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία είτε κινούνται με περίτριχα μαστίγια είτε δεν έχουν ικανότητα κίνησης. Τα εντεροβακτήρια είναι προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά στην οξειδάση, θετικά στην καταλάση και ζυμώνουν τη γλυκόζη προς οξύ, χωρίς να έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά. Το μυρμηγκικό οξύ που παράγεται κατά τη ζύμωση των εντεροβακτηρίων προσδίδει δυσάρεστη οσμή και γεύση στα τρόφιμα, υποβαθμίζοντας την ποιότητά τους. Η συγκεκριμένη οικογένεια περιλαμβάνει τα γένη:

Arsenophonus, *Biostraticola*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Calymmatobacterium*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Cosenzaea*, *Cronobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Gibbsiella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Levinea*, *Lonsdalea*, *Mangrovibacter*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phaseolibacter*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*,

Pragia, Proteus, Providencia, Rahnella, Raoultella, Saccharobacter, Salmonella, Samsonia, Serratia, Shigella, Shimwellia, Sodalis, Tatumella, Thorsellia, Trabulsiella, Wigglesworthia, Xenorhabdus, Yersinia και *Yokenella* (LPSN bacterio.net).

Πολλά Gram-θετικά βακτήρια, και κυρίως τα οξυγαλακτικά βακτήρια, έχουν συνδεθεί με την αλλοίωση φρεσκοκομμένων φρούτων και λαχανικών που συσκευάζονται υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα με $O_2 < 2\%$ και $CO_2 > 10\%$ και αποθηκεύονται στους $7\text{ }^\circ\text{C}$ ή και παραπάνω, ανεξάρτητα από το εκάστοτε προϊόν. Τα οξυγαλακτικά είναι ραβδοειδή ή κοκκοειδή βακτήρια, τα οποία δεν παράγουν σπόρια και δεν εμφανίζουν κινητικότητα συνήθως. Παράγουν ATP μόνο με ζύμωση, συνήθως των σακχάρων. Καθ' ότι δε χρησιμοποιούν οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας αναπτύσσονται καλά υπό αναερόβιες συνθήκες, ενώ μπορούν να αναπτυχθούν και παρουσία οξυγόνου. Ταυτόχρονα, προστατεύονται από υπό-προϊόντα του οξυγόνου (υπεροξειδίου του υδρογόνου) μέσω των υπεροξειδασών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποκαλούνται συχνά αεροανθεκτικοί αναερόβιοι ή μικροαερόφιλοι. Διαφοροποιούνται από άλλα μικρόβια από την ικανότητά τους να ζυμώνουν τις εξόζες σε γαλακτικό οξύ, εξ' ου και το όνομά τους. Λόγω των χαμηλών ενεργειακών τους αποδόσεων, αναπτύσσονται συχνά πιο αργά από ό, τι τα μικρόβια ικανά αναπνοής και, ως εκ τούτου, παράγουν μικρότερες αποικίες. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν τα γένη *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* και *Enterococcus*. Το γαλακτικό οξύ που παράγεται κατά τη οξυγαλακτική ζύμωση μειώνει το pH στα τρόφιμα, ενώ η ακετυλομεθυλο-καρβινόλη και το διακετύλιο, προσδίδουν μια άσχημη γεύση σε αυτά, παρόμοια με βουτυρόγαλα (Barth και συν., 2009).

Η τελευταία ομάδα των κυριότερων μικροοργανισμών που μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση φρεσκοκομμένων φρούτων και λαχανικών που συντηρούνται υπό ψύξη και σε συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, είναι οι μύκητες και οι ζύμες. Το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών είναι πλησίον της τιμής pH: 7.0. Ωστόσο οι ζύμες και οι μύκητες παρουσιάζουν συνήθως ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές pH και, ως εκ τούτου, συνδέονται με την αλλοίωση των όξινων τροφών. Γενικά, οι ζύμες αναπτύσσονται σε ένα εύρος pH 3-10 και οι μύκητες σε pH 2-11. Ωστόσο οι μύκητες ευνοούνται από ένα όξινο pH. Όσον αφορά δε στο νερό, οι ζύμες έχουν απαιτήσεις που κυμαίνονται μεταξύ αυτών των βακτηρίων και των μυκήτων. Ζύμες του γένους *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, και *Hansenula* έχουν συνδεθεί με τη ζύμωση των καρπών. Επιπλέον, άλλες ζύμες που μπορεί να προκαλέσουν απώλεια ποιότητας των προϊόντων είναι τα είδη *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. glutinis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. bisporus*, και *Z. rouxii*, τα οποία έχουν απομονωθεί σε μεγάλο βαθμό από φρεσκοκομμένα φρούτα και λαχανικά καθώς και μείγματα σαλατών (Carlin και συν., 1989· O'Connor-Shaw και συν., 1994· Delaquis και συν., 1999· Ukuku και Fett, 2002· Jacxsens και συν., 2001). Οι ζύμες έχουν ελαφρώς υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης από τους μύκητες, ζυμώνουν τα σάκχαρα σε αλκοόλες και είναι υπεύθυνες για τις δυσάρεστες οσμές στα

τρόφιμα. Από την άλλη, η παρουσία των μυκήτων στις μετασυλλεκτικές ασθένειες είναι πολύ σημαντική. Η αλλοίωση των φρέσκων προϊόντων που προκαλείται από τους μύκητες, κυρίως στα φρέσκα φρούτα, προκαλούνται από τα γένη *Penicillium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Aureobasidium* και *Colletotrichum* (Barth και συν., 2009).

Η αλλοίωση που προκαλείται από την ανάπτυξη των μικροβιακών πληθυσμών γίνεται οργανοληπτικά αντιληπτή όταν οι πληθυσμοί φτάνουν περίπου στα 10^7 - 10^8 CFU/g (Guerzoni και συν., 1996). Ωστόσο, οι Jacxsens και συν. (2001) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η διάρκεια ζωής των φρέσκων φρούτων και λαχανικών δεν καθορίζεται από τη μικροβιακή ανάπτυξη, αλλά από την αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους η οποία και επηρεάζει πολύ πιο σύντομα το χρονικό όριο κατανάλωσής τους. Ως εκ τούτου, οι φυσιολογικές και βιοχημικές μεταβολές που πραγματοποιούνται στο εσωτερικό των φυτικών ιστών καθορίζουν την εμπορευσιμότητα των προϊόντων. Οι μεταβολές αυτές εξαρτώνται από τις συγκεντρώσεις των αερίων που βρίσκονται εντός των ιστών και επηρεάζονται από την κίνηση των αερίων εντός της συσκευασίας, η οποία με τη σειρά της καθορίζεται από τις εξωτερικές συγκεντρώσεις των αερίων, την ταχύτητα παραγωγής CO_2 και αιθυλενίου (C_2H_4), την ταχύτητα κατανάλωσης O_2 , τη φυτική επιφάνεια και την αντίσταση του επιδερμικού συστήματος στη διάχυση του O_2 , CO_2 και C_2H_4 . Η κίνηση του O_2 , CO_2 και C_2H_4 πραγματοποιείται με διάχυση των μορίων του εκάστοτε αερίου, όταν αυτά βρίσκονται πάνω από ένα όριο συγκέντρωσης. Σημαντικό παράγοντα στην αντίσταση διάχυσης των αερίων εντός των ιστών αποτελεί και η ηλικία των καρπών και των φύλλων.

Στα φρούτα, η αντίσταση στη διάχυση εντός της σάρκας αυξάνεται με την ωρίμαση λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης του κυτταρικού χυμού σε μερικούς από τους διακυτταρικούς χώρους. Στα δε φυλλώδη λαχανικά όπως η ρόκα, τα νεότερα φύλλα αναπνέουν πιο έντονα από τα γηραιότερα. Ωστόσο, υπό συνθήκες ελεγχόμενης ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Controlled Atmosphere, CA - Modified Atmosphere, MA) η μειωμένη ποσότητα αέρα οδηγεί σε αύξηση της αντίστασης διάχυσης, μείωση της ταχύτητας αναπνοής και παραγωγής αιθυλενίου και, ως εκ τούτου, μείωση της διάχυσης των αερίων εντός των ιστών. Οι παραπάνω διεργασίες καθυστερούν τη γήρανση των προϊόντων (συγκράτησης της χλωροφύλλης και διατήρησης του πράσινου χρώματος, μη μεταβολή της υφής, καλή οσμή και γεύση) και αυξάνουν τη διάρκεια εμπορευσιμότητάς τους. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια βρίσκεται υπό εκτενέστατη μελέτη η αποθήκευση σε συσκευασίες CA/MA.

Η αποθήκευση σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα αποτελεί τον εγκλεισμό ενός προϊόντος σε ένα χώρο στον οποίο η ατμόσφαιρα ελέγχεται συνεχώς, έτσι ώστε η σύνθεσή της να διατηρείται σταθερή και ανεξάρτητη από τις μεταβολές που λαμβάνουν χώρα. Όμοια, η συσκευασία σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα (Controlled Atmosphere Packaging, CAP) αποτελεί τον εγκλεισμό ενός προϊόντος σε μία συσκευασία εντός της οποίας ελέγχεται συνεχώς η σύνθεση των αερίων.

Αντιθέτως, κατά την αποθήκευση/συσκευασία ενός προϊόντος σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, πραγματοποιείται μία αρχική μεταβολή της σύνθεσης των αερίων, χωρίς συνεχή έλεγχο στην πορεία. Αυτό είναι και το είδος συσκευασίας (Modified Atmosphere Packaging, MAP) που χρησιμοποιείται εκτεταμένα για τη συσκευασία και συντήρηση των φρεσκοκομμένων προϊόντων. Γενικά, τόσο η ελεγχόμενη όσο και η τροποποιημένη ατμόσφαιρα έχουν ως στόχο την επιβράδυνση της αναπνοής, τη μείωση της μικροβιακής ανάπτυξης και την επιβράδυνση της ενζυμικής αλλοίωσης, ώστε να επιτυγχάνεται τελικώς η επιμήκυνση του χρόνου εμπορευσιμότητας των προϊόντων (Λάζος, 2010).

Καθ' ότι τα φρούτα και τα λαχανικά είναι προϊόντα που αναπνέουν, η αλληλεπίδραση μεταξύ του περιβάλλοντος συσκευασίας και του προϊόντος είναι έντονη. Για το λόγο αυτό, ο έλεγχος της αναλογίας των αερίων που χρησιμοποιούνται σε κάθε συσκευασία αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα για την ορθή συντήρηση του εκάστοτε προϊόντος. Στους παράγοντες που καθορίζουν τη σύνθεση του αερίου σε μία συσκευασία MAP συμπεριλαμβάνονται ο ρυθμός αναπνοής του προϊόντος, το οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα, η θερμοκρασία αποθήκευσης και η διαπερατότητα των υλικών συσκευασίας (Rojas-Grau και συν., 2008· Oliveira και συν., 2010· Horev και συν., 2012).

Τα τρία κύρια αέρια που χρησιμοποιούνται για τη συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα είναι το άζωτο, το οξυγόνο και ο διοξείδιο του άνθρακα. Από τον συνδυασμό αυτών των αερίων προκύπτουν τρεις διαφορετικοί τύποι μιγμάτων: i) N₂ (αδρανές), ii) CO₂/N₂ ή O₂/CO₂/N₂ (ημιδραστικό) και iii) CO₂ ή O₂/CO₂ (δραστικό). Το άζωτο θεωρείται ότι δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ωστόσο υπάρχει έμμεση επιρροή, χάρη στο αναερόβιο ή μικροαερόφιλο περιβάλλον που δημιουργεί, το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη των υποχρεωτικά ή προαιρετικά αερόβιων μικροοργανισμών. Από την άλλη, το διοξείδιο του άνθρακα μπορεί να θανατώσει, να παρεμποδίσει, να μην επιδράσει καθόλου, αλλά και να διεγείρει την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Στην περίπτωση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, ο παθογόνος αναπτύσσεται άριστα κάτω από μικροαερόφιλες συνθήκες. Γενικά, για να υπάρχει σημαντική επίδραση της CA/MA στην ωρίμανση των φρούτων πρέπει η συγκέντρωση του οξυγόνου να είναι μικρότερη του 8%, ενώ συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα μεγαλύτερη από 1% λειτουργεί προσθετικά στην επιβράδυνση της ωρίμανσης που οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (Λάζος, 2010). Ωστόσο, έκθεση σε κατώτερα ή ανώτερα επίπεδα αντοχής O₂ και CO₂, αντίστοιχα, μπορεί να οδηγήσουν σε καταπόνηση (stress) των φυτικών ιστών, αύξηση της αναερόβιας αναπνοής, συσσώρευση αιθανόλης και ακεταλδεϋδης (κακή οσμή και γεύση) και, ως εκ τούτου, σύντομη διάρκεια ζωής των προϊόντων (Kader και συν., 1989).

Η επίδραση που έχουν οι ελεγχόμενες ή τροποποιημένες ατμόσφαιρες στη διάρκεια ζωής των προϊόντων εξαρτώνται σημαντικά από τη θερμοκρασία και τη σχετική υγρασία

συντήρησης/αποθήκευσής τους. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες είναι μεγαλύτερη η επίδραση των CA/MA στην επιβράδυνση της ωρίμασης. Για το λόγο αυτό η χρήση τους μπορεί να εφαρμοστεί σε κλιμακηρικά φρούτα (ωριμάζουν μετά την συγκομιδή τους από το φυτό ή το δένδρο) σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τις άριστες, γεγονός πολύ σημαντικό για τα φρούτα που είναι ευαίσθητα στο ψύχος, όπως τα πεπόνια, οι τομάτες και οι μπανάνες (Λάζος, 2010). Παράλληλα, χαμηλές τιμές σχετικής υγρασίας οδηγούν σε ξήρανση του προϊόντος λόγω επιρροής στη διαπνοή, ενώ υψηλές τιμές σχετικής υγρασίας οδηγούν σε συμπύκνωση των υδρατμών στη μεμβράνη της συσκευασίας κατά τις εναλλαγές της θερμοκρασίας (Sandhya, 2010).

Η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες, τη δραστική (active) και την παθητική (passive). Στη δραστική MAP, η ατμόσφαιρα επιτυγχάνεται μέσω δημιουργίας ενός ελαφρού κενού και προσθήκης του επιθυμητού μείγματος αερίων. Στο μείγμα αυτό υπάρχει δυνατότητα προσθήκης απορροφητικών ή προσροφητικών ουσιών για τον "καθαρισμό" του O₂, CO₂ και C₂H₄. Αντιθέτως, στην παθητική MAP, το απαιτούμενο O₂ καταναλώνεται με την αναπνοή και το CO₂ παράγεται από το προϊόν (Zagory και Kader, 1988). Τα δύο μείζονα προβλήματα που συνδέονται με τις δύο αυτές κατηγορίες της MAP είναι ο χρόνος που απαιτείται για τη συσσώρευση της επιθυμητής ατμόσφαιρας, στην περίπτωση χρήσης παθητικής MAP, και η δυνατότητα εξάντλησης του οξυγόνου, στην περίπτωση χρήσης δραστικής MAP. Ωστόσο, τα προβλήματα αυτά μπορούν να αντιμετωπιστούν μέσω της προσέγγισης που ονομάζεται συσκευασία σε Μικροδιάτρητη Δραστική Τροποποιημένη Ατμόσφαιρα (Microperforated Active Modified Atmosphere, MAMA), στην οποία η συσκευασία πραγματοποιείται με χρήση δραστικής MAP σε συνδυασμό με μικροδιάτρητη μεμβράνη (Rodon και συν., 2007). Με αυτόν τον τρόπο επιλέγεται η κατάλληλη με βάση το προϊόν διαπερατότητα μεμβράνης, εισέρχεται το απαιτούμενο O₂ και εξέρχεται η περίσσεια του CO₂ και, ως εκ τούτου, η εντός συσκευασίας ατμόσφαιρα διατηρείται σε ικανοποιητικά επίπεδα. Παρ' όλ' αυτά, υπάρχει έλλειψη στη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση αυτού του τύπου συσκευασίας στη μικροχλωρίδα επιφάνειας και τα τροφιμογενή παθογόνα, ειδικά με ταυτόχρονη παρουσία αιθέριων ελαίων που έχουν αντιμικροβιακή δράση.

5.2 Στόχος

Αντικείμενο της παρούσας πειραματικής ενότητας αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης των ατμών αιθέριου ελαίου από λεμονόχορτο στην ανάπτυξη της επιφανειακής μικροχλωρίδας και της *L. monocytogenes*, σε δείγματα ρόκας και πεπονιού έπειτα από συσκευασία σε συνθήκες αέρα και MAMA και συντήρηση στους 0, 5, 10 και 15 °C.

5.3 Υλικά και μέθοδοι

5.3.1 Παρασκευή ενοφθαλμίσματος και προετοιμασία δειγμάτων

Για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *L. monocytogenes* LQC 15257, το οποίο ανήκε στον ορότυπο 4b και είχε απομονωθεί προηγουμένως από δείγμα φράουλας (παρ. 4.3.1). 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 διπλής ανακαλλιέργειας σε ζωμό BHI στους 37 °C για 24 h.

Πριν από την έναρξη της πειραματικής μελέτης προηγήθηκε πείραμα το οποίο υπέδειξε την *in vitro* ευαισθησία του συγκεκριμένου στελέχους στους ατμούς του αιθέριου ελαίου του λεμονόχορτου. Κατά τη διεξαγωγή αυτού του πειράματος, ποσότητα των 10, 50 και 100 μL αιθέριου ελαίου τοποθετήθηκε σε χαρτί Whatman στο εσωτερικό μέρος του καπακιού ενός τρυβλίου Petri. Μέσα στο τρυβλίο είχε επιστρωθεί άγαρ BHI με περίπου 300-400 CFU του υπό εξέταση στελέχους. Το χαρτί Whatman δεν ερχόταν σε επαφή με το άγαρ και για να δημιουργηθεί ένα αεροστεγές περιβάλλον εντός του τρυβλίου, χρησιμοποιήθηκε παραφίλμ. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C για 24 h, το πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με βάση την παρατήρηση.

Με την έναρξη της κάθε πειραματικής μελέτης πραγματοποιούνταν παρασκευή του ενοφθαλμίσματος με ανανέωση αρχικά του στελέχους από τους -20 °C, η οποία ακολουθείτο από ανάπτυξη του παθογόνου σε ζωμό BHI στους 37 °C για 18 h (9 log CFU/mL). Εν συνεχεία, οι καλλιέργειες των 18 h φυγοκεντρώνταν στους 4°C, στις 12000 rpm για 10 min και έπειτα έκπλυση δύο φορές με ισοτονικό διάλυμα Ringer (LABM). Τέλος, ακολουθούσε επαναδιάλυσή τους στον ίδιο διαλύτη, σε όγκο ίδιο με τον αρχικό στον οποίο και είχαν αναπτυχθεί (5 mL).

Ο ενοφθαλμισμός του στελέχους στα δείγματα ρόκας και πεπονιού πραγματοποιούνταν με πληθυσμό της τάξεως των 4.5 με 5 log CFU/mL, μέσω διαδοχικών αραιώσεων. Συγκεκριμένα, φύλλα ρόκας και κύβοι πεπονιού (διαστάσεων περίπου 3×3×4 cm) συσκευάζονταν ως εξής: 30 g. ρόκας ή 50 g. πεπονιού τοποθετούνταν σε δίσκους διογκωμένης πολυστερίνης (Expanded Polystyrene, EP) και ψεκάζονταν ή όχι, με περίπου 0.5 mL από την κατάλληλη αραιώση του ενοφθαλμίσματος, ώστε να επιτευχθεί πλήρης διάχυση του ενοφθαλμίσματος στην επιφάνεια των προϊόντων αυτών με τον επιθυμητό πληθυσμό του παθογόνου. Προηγείτο δημιουργία τρυπών στους δίσκους προκειμένου να επιτρέπεται σε όσο το δυνατόν περισσότερο πτητικό έλαιο να φθάνει στην επιφάνεια του προϊόντος. Εν συνεχεία, 100 μL αιθέριου ελαίου εφαρμόζονταν σε χαρτί Whatman το οποίο έπειτα τοποθετούνταν σε εξωτερικό σημείο του δίσκου, χωρίς να έρχεται σε επαφή με το προϊόν (Εικόνα 21). Τέλος, οι

δίσκοι συσκευάζονταν με μικροδιάτρητη προσανατολισμένη μεμβράνη πολυπροπυλενίου (Oriented Polypropylene, *OPP*) με διαπερατότητα οξυγόνου $8000 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h atm}$ είτε σε αέρα είτε σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (5% O_2 , 10% CO_2) και διατηρήθηκαν σε ψυκτικούς θαλάμους στους 0, 5, 10 και 15 °C.

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν κάθε 24 h από την ημέρα παραλαβής έως την ημέρα λήξης εμπορευσιμότητας των προϊόντων και κατά τη διάρκεια αυτών λάμβανε χώρα διεξαγωγή μικροβιολογικών αναλύσεων. Παράλληλα, πριν από κάθε δειγματοληψία πραγματοποιούνταν μέτρηση των αερίων εντός της συσκευασίας (% O_2 και CO_2) με χρήση του αναλυτή υπερκείμενης φάσης CheckMate 9900 O_2/CO_2 (PBI Dansensor A/S, Ringsted, Denmark). Η πορεία δειγματοληψίας που ακολουθήθηκε σε όλα τα είδη συσκευασιών και θερμοκρασιών ήταν η ίδια.



Εικόνα 21 Μέθοδος εφαρμογής αιθέριου ελαίου από λεμονόχορτο σε συσκευασμένη ρόκα.

5.3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Σε κάθε στάδιο δειγματοληψίας πραγματοποιούνταν πληθυσμιακή καταμέτρηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, των ζυμών και των μυκήτων, των εντεροβακτηρίων, των εντερόκοκκων, των γαλακτικών βακτηρίων, των ψευδομονάδων και της *L. monocytogenes*. Για την αρίθμηση των παραπάνω μικροοργανισμών μεταφέρονταν ασηπτικά 10 g δείγματος εντός σακιδίου stomacher και ομογενοποιούνταν σε θερμοκρασία δωματίου με 90 mL ισοτονικού διαλύματος Ringer. Ακολουθούσε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων κι επιστρώνονταν ή ενσωματώνονταν 0.1 mL ή 1 mL, αντίστοιχα, από τις επιθυμητές αραιώσεις στα τρυβλία. Τα

θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την πληθυσμιακή καταμέτρηση των παραπάνω μικροοργανισμών ήταν τα εξής:

VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar, LAB M): Επώαση στους 37 °C για 18-24 h για τον προσδιορισμό των Coliforms, *Enterobacteriaceae* και *E. coli*.

PCA (Plate Count Agar, LABM): Επώαση στους 30 °C για 48 h για τον προσδιορισμό της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας.

YGC (Tryptic Glucose Yeast Extract Agar, Biolife): Επώαση στους 25 °C για 5 μέρες για τον προσδιορισμό των ζυμών.

KAA (Kanamycin Aesculin Azide Agar, LABM): Επώαση στους 37 °C για 18-24 h για τον προσδιορισμό των εντερόκοκκων (*Enterococci*).

CFC (Cephalothin, Fucidin, Ceftrimide Agar, LABM): Επώαση στους 25-30 °C για 48 h για τον προσδιορισμό των ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.).

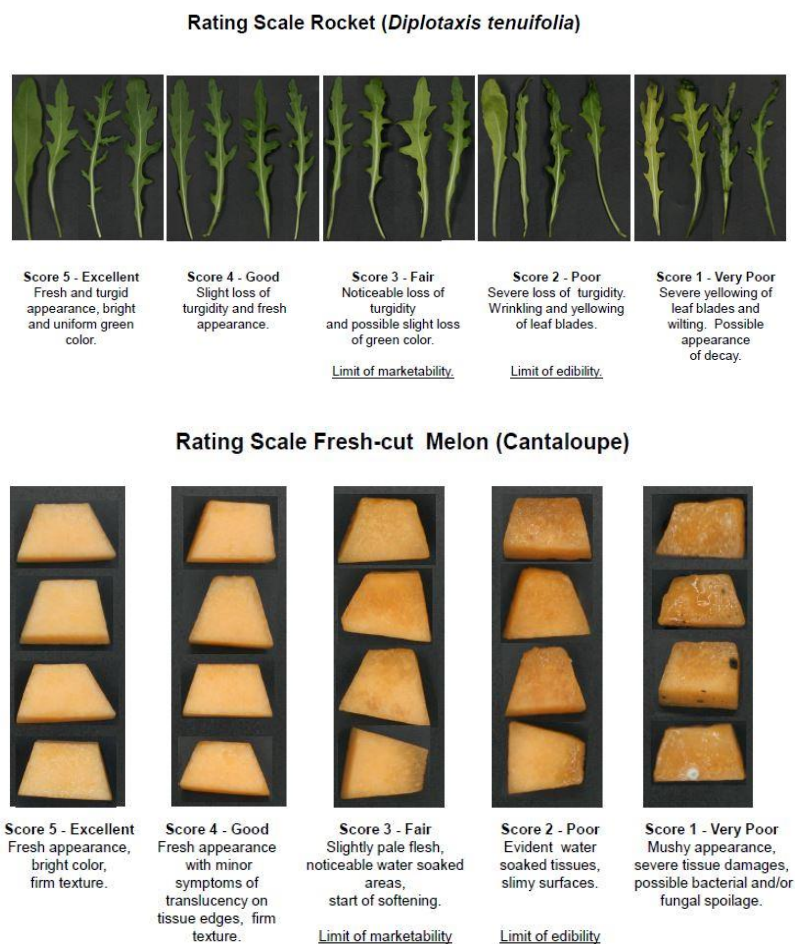
PALCAM (Polymyxin Acriflavine Lithium Chloride Ceftazidone Esculin Mannitol Agar, LABM): Επώαση στους 30 °C για 24-48 h για τον προσδιορισμό της *L. monocytogenes*.

MRS (de Man, Rogosa and Sharpe Agar, LABM): Επώαση στους 30 °C για 72 h για τον προσδιορισμό των γαλακτικών βακτηρίων (*Lactobacilli*).

5.3.3 Ποιοτική αξιολόγηση

Ένα φρεσκοκομμένο προϊόν θεωρείται αλλοιωμένο όταν δεν είναι πλέον αποδεκτό από τον καταναλωτή (Singh και Anderson, 2002). Το χρώμα, η οσμή, η υφή και η συνολική εμφάνιση των φρούτων και των λαχανικών αποτελούν τα πιο βασικά οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Αλλαγές σε κάποιο από αυτά τα χαρακτηριστικά, όπως το καφέτιασμα, ο σχηματισμός δυσάρεστων οσμών και η απώλεια υφής μπορούν να θεωρηθούν αλλοίωση όταν πραγματοποιούνται σε τέτοιο βαθμό που το τρόφιμο παύει να είναι αποδεκτό (Rico και συν., 2007). Το χρώμα των πράσινων λαχανικών είτε μετατρέπεται σε κίτρινο, λόγω της οξειδωσης των πράσινων χρωστικών (χλωροφύλλη) που επιφέρει στην επιφάνεια τα κίτρινα καροτενοειδή, είτε καφετιάζει στα σημεία κοπής των φύλλων λόγω ενζυματικής οξειδωσης των φαινολικών συστατικών (Toinoven και Brummell, 2008). Στα συσκευασμένα φρούτα και λαχανικά ο σχηματισμός δυσάρεστων οσμών (αιθανόλη, ακεταλδεϋδη) είναι ένας δείκτης αναερόβιας αναπνοής, η οποία οδηγεί σε ποιοτική υποβάθμιση (Jacxsens και συν., 2003). Τέλος όσον αφορά στην υφή, η ωρίμαση των φρούτων και των λαχανικών οδηγεί σε διαδικασίες κυτταρικής αποδόμησης και απελευθέρωσης νερού στους μεσοκυττάρους χώρους, τα οποία οδηγούν στο θάνατο των κυττάρων και τελικώς σε απώλεια της υφής (Toinoven και Brummell, 2008).

Για την αξιολόγηση της εμφάνισης, υφής, του αρώματος και γενικότερα της συνολικής ποιότητας των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ένα πάνελ από μη ειδικούς. Η φρεσκότητα των προϊόντων βαθμολογήθηκε σύμφωνα με μια κλίμακα αξιολόγησης από 1 έως 5, όπου το 3 θεωρήθηκε ως το όριο της εμπορευσιμότητας (Amodio και συν., 2007) (Εικόνα 22).



Εικόνα 22 Κλίμακα ποιοτικής αξιολόγησης και εμπορευσιμότητας ρόκας και πεπονιού (Amodio και συν., 2007).

5.3.4 Στατιστική ανάλυση

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. Για τη στατιστική αξιολόγηση της επίδρασης της συσκευασίας MAMA και της προσθήκης αιθέριου ελαίου από λεμονόχορτο στη διάρκεια εμπορευσιμότητας των προϊόντων και το μικροβιακό πληθυσμό, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διασποράς με ένα παράγοντα (one-way ANOVA).

5.3.5 Ανάλυση αιθέριου ελαίου

Αέρια Χρωματογραφία- Φασματοσκοπία Μαζών (GC-MS)

Ο όρος χρωματογραφία αναφέρεται σε ένα πλήθος τεχνικών διαχωρισμού, οι οποίες βασίζονται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινητής και μιας στατικής φάσης. Ανάλογα με την φύση της κινητής φάσης, η χρωματογραφία διακρίνεται σε αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, *GC*) και υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, *LC*), ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι είτε στερεή (αέρια στερεή χρωματογραφία, *GSC*, και υγρή στερεή χρωματογραφία, *LSC*), είτε υγρή (αέρια υγρή χρωματογραφία, *GLC*, και υγρή υγρή χρωματογραφία, *LLC*).

Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί μία από τις ισχυρότερες μεθόδους ενόργανης ανάλυσης, χάρη στην ικανότητά της να διαχωρίζει τα συστατικά πολυσύνθετων μιγμάτων. Η διεξαγωγή της αέριας χρωματογραφίας πραγματοποιείται μέσω ενός αεριοχρωματογράφου, ο οποίος αποτελείται από μία οβίδα ή φιάλη φέροντος αερίου (κινητή φάση), ένα ρυθμιστή πίεσης, ένα ροόμετρο, ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος, ένα θερμοστατούμενο κλίβανο, μία στήλη χρωματογραφίας, έναν ανιχνευτή, έναν ενισχυτή και έναν καταγραφέα ή ηλεκτρονικό υπολογιστή – εκτυπωτή. Το φέρον αέριο που χρησιμοποιείται αποτελεί την κινητή φάση, η οποία παρασύρει τα συστατικά του υπό εξέταση μίγματος. Τα αέρια που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το άζωτο (N_2), το ήλιο (He) και το αργό (Ar) και η επιλογή του αερίου που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε περίπτωση καθορίζεται από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις το αέριο πρέπει να είναι αδρανές και να μην αντιδρά με τη στατική φάση ή με τις ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν. Στη φιάλη, το φέρον αέριο βρίσκεται υπό πίεση 100-200atm, ενώ στην είσοδο της στήλης περιορίζεται σε 1-3atm. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του ρυθμιστή πίεσης, ενώ μέσω του ροόμετρου πραγματοποιείται η ακριβής μέτρηση της ταχύτητας του αερίου, η οποία είναι καθοριστική για το διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος, καθώς οι χρόνοι συγκράτησης των συστατικών εξαρτώνται από την ταχύτητα ροής του αερίου. Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος αποτελεί το σημείο στο οποίο εισάγεται το δείγμα και στο οποίο πραγματοποιείται και η εξαέρωσή του, εφ' όσον αυτό είναι υγρό. Η εισαγωγή του δείγματος στον χρωματογράφο γίνεται μέσω σύριγγας και η εγχυόμενη ποσότητα καθορίζεται από μία σειρά παραγόντων, όπως η διαθέσιμη ποσότητα, η χωρητικότητα της στήλης και η ευαισθησία του ανιχνευτή. Όσον αφορά στον θερμοστατούμενο κλίβανο, η λειτουργία του μπορεί να είναι είτε ισόθερμη είτε αυξομειούμενης θερμοκρασίας, με τη δεύτερη λειτουργία να εφαρμόζεται συνήθως όταν το υπό εξέταση δείγμα περιέχει συστατικά και χαμηλού και υψηλού σημείου ζέσεως. Στην αέρια χρωματογραφία η κινητή φάση διαβιβάζεται με πίεση ή ρέει λόγω βαρύτητας μέσα σε μία κυλινδρική στήλη εντός της οποίας συγκρατείται η στατική φάση. Η βασική αρχή του διαχωρισμού της αέριας χρωματογραφίας είναι η κατανομή των συστατικών του δείγματος μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης. Το κλάσμα του κάθε συστατικού που βρίσκεται στην κινητή φάση μετακινείται εντός της στήλης, έρχεται σε επαφή με τη στατική φάση και προκύπτει νέα κατανομή και ταχύτατη αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ των δύο φάσεων. Η

διαδικασία συνεχίζεται σε όλο το μήκος της στήλης και τελικώς η ουσία εκλύεται από τη στήλη. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται είναι είτε πληρωμένες είτε τριχοειδής. Στις πληρωμένες στήλες το υγρό της στατικής φάσης συγκρατείται πάνω σε αδρανές υλικό, ενώ στις τριχοειδείς στήλες είτε η υγρή στατική φάση συγκρατείται απευθείας στα τοιχώματα της στήλης (WCOT), είτε η υγρή στατική φάση είναι εμποτισμένη σε υπόστρωμα που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια του σωλήνα (SCOT), είτε η στερεή στατική φάση είναι ένα προσροφητικό υλικό στην εσωτερική επιφάνεια της στήλης (μικροστήλες PLOT). Ανάλογα με την πολικότητά τους, οι στατικές φάσεις είναι πολικές, σχετικά πολικές ή μη πολικές. Για κάθε δείγμα η καταλληλότερη στατική φάση είναι εκείνη η οποία είναι χημικά παρόμοια με αυτό (ίδιας πολικότητας). Οι ανιχνευτές αποτελούν το όργανο εκείνο που μετράει τις διαφορές στη σύσταση του υλικού που εκλύεται από τη στήλη. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι οι ανιχνευτές ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, *FID*), οι ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector, *TCD*) και οι ανιχνευτές συλλήψεως ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector, *ECD*). Ωστόσο, το σήμα που προέρχεται από τον ανιχνευτή είναι πολύ ασθενές και η ενίσχυσή του είναι απαραίτητη για την τελική του καταγραφή. Ως εκ τούτου, ένας ενισχυτής σήματος χρησιμοποιείται πριν από τον καταγραφέα, ο οποίος μετατρέπει το ηλεκτρικό σήμα σε μηχανική κίνηση. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν τα χρωματογραφήματα και δίνονται οι χρόνοι συγκράτησης, το εμβαδόν και η εκατοστιαία σύσταση των συστατικών του εξεταζόμενου δείγματος.

Η μέθοδος αυτή, όπως και όλες οι χρωματογραφικές μέθοδοι, δεν είναι ικανή να ταυτοποιήσει τα συστατικά ενός δείγματος καθώς ο χρόνος συγκράτησης (*retention time*) από μόνος του δεν μπορεί να ταυτοποιήσει ένα συστατικό. Ωστόσο, όταν η μέθοδος αυτή συνδυάζεται με τη φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, *MS*) μετατρέπεται σε ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης πολύπλοκων δειγμάτων (Πολυσίου και Ταραντίλης, 2008).

Ανάλυση αιθέριου ελαίου λεμονόχορτου

Το αιθέριο έλαιο λεμονόχορτου (*Cymbopogon citratus*) που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή της μελέτης αγοράστηκε από την εταιρία “Κοκκινάκης Essans E.Π.Ε.” (Αθήνα, Ελλάδα).

Η ανάλυση του αιθέριου ελαίου διεξήχθη μέσω της αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μαζών (GC-MS) με χρήση του οργάνου dual line Shimadzu QP-2010 Ultra GC-MS εξοπλισμένο με δύο αυτόματες σύριγγες έγχυσης δείγματος AOC-20i, έναν αυτόματο δειγματολήπτη AOC-20S, έναν ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (flame ionization detector, *FID*) και δύο στήλες MEGA-5 HT [εσωτερική διάμετρος (ID) 30 m x 0.25 mm, πάχος φιλμ 0.25 μm, Mega s.n.c., Italy]. Το έλαιο εγχύθηκε ταυτόχρονα στις δύο εισόδους που λειτουργούν στη διαδικασία χωρισμού ροής φέροντος αερίου σε δυο ρεύματα (αναλογία διαχωρισμού 1/20). Η θερμοκρασία του κλιβάνου προγραμματίστηκε να ξεκινήσει από τους 50 °C έως και να φτάσει

στους 260 °C με αύξηση 3 °C/λεπτό και διατήρηση για 5 min. Το φέρον αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ήλιο και η έγχυσή του πραγματοποιούνταν με σταθερή γραμμική ταχύτητα 34cm/s. Οι θερμοκρασίες των εισαγωγέων δείγματος, του περιβάλλοντος, της πηγής ιόντων και του ανιχνευτή φλόγας ιονισμού ορίστηκαν στους 250, 280, 200 και 280 °C, αντίστοιχα. Η φασματοσκοπία μαζών πραγματοποιήθηκε στη λειτουργία ιονισμού ηλεκτρονίων (electron ionization, *EI*) στα 70 eV και σε φάσμα μάζας 40-400 u (ταχύτητα σάρωσης 1666 u/s).

Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε μέσω σύγκρισης: i) των δεικτών γραμμικής συγκράτησης με βάση την ομόλογη σειρά των *n*-αλκανίων (C7-C24) με εκείνων των ενώσεων αναφοράς και εκείνων της βιβλιοθήκης FFNSC MS (Chromaleont Srl, Italy), ii) των δεδομένων της φασματοσκοπίας μαζών (mass spectrometry, *MS*) με αυτά των ενώσεων αναφοράς και τα δεδομένα φασματοσκοπίας μαζών που λήφθηκαν από τις βιβλιοθήκες NIST14 και FFNSCN. Κατά τη διαδικασία ταυτοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά GCMSsolution (Shimadzu) και Amdis (NIST), ενώ οι σχετικές ποσότητες των διαχωρισμένων συστατικών υπολογίστηκαν με βάση το εμβαδόν της κορυφής GC (απόκριση FID) χωρίς τη χρήση οποιουδήποτε συντελεστή διόρθωσης.

5.4 Αποτελέσματα

Στον **Πίνακα 19** παρουσιάζονται η μεταβολή του πληθυσμού της μικροχλωρίδας, καθώς και το όριο της εμπορευσιμότητας της συσκευασμένης ρόκας κατά την επώασή της στους 0, 5, 10 και 15°C, με και χωρίς εφαρμογή αιθέριου ελαίου από λεμονόχορτο και με ή χωρίς ενοφθαλμισμό με *L. monocytogenes*.

Κατά μέσο όρο, η σαλάτα ρόκας που αποθηκεύτηκε στον αέρα έφτασε στο όριο της εμπορευσιμότητάς της μετά από 2, 3, 10, και 10.5 ημέρες στους 15, 10, 5 και 0 °C, αντίστοιχα. Η αρχική ατμόσφαιρα μέσα στη συσκευασία αποτελούνταν από 20.8% O₂ και 0.0% CO₂. Μετά την πρώτη ημέρα αποθήκευσης πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση της ατμόσφαιρας και η περιεκτικότητά της εντός της συσκευασίας αποτελούνταν από 18-20% O₂ και 0.00-2.65% CO₂, παραμένοντας σταθερή καθ' όλη την υπόλοιπη διάρκεια της συντήρησης. Κατά την διάρκεια αποθήκευσης της σαλάτας στη MAMA, η ρόκα έφτασε στο όριο της εμπορευσιμότητας κατά μέσο όρο μετά από 2.5, 4, 9 και 12.5 ημέρες στους 15, 10, 5 και 0 °C, αντίστοιχα. Η αρχική ατμόσφαιρα εντός της συσκευασίας αποτελούνταν από 5% O₂ και 10% CO₂. Μετά την πρώτη ημέρα αποθήκευσης, έλαβε χώρα εξισορρόπηση της ατμόσφαιρας, η περιεκτικότητά της εντός της συσκευασίας ήταν 17.65-20.80% O₂ και 0.15-3.30% CO₂ και η σύσταση αυτή παρέμεινε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης. Ωστόσο, τόσο στον αέρα όσο και στη MAMA, η εφαρμογή του αιθέριου ελαίου του λεμονόχορτου φάνηκε να μην έχει καμία επίδραση στην διάρκεια ζωής του προϊόντος.

Η αρχική κυρίαρχη μικροχλωρίδα στη ρόκα ήταν οι ζύμες και οι μύκητες, ο πληθυσμός των οποίων κυμαινόταν μεταξύ 5.07 και 6.32 log CFU·g⁻¹. Ο πληθυσμός των εντερόκοκκων κυμαινόταν μεταξύ τιμών κατώτερων του ορίου καταμέτρησης και 3.20 log CFU·g⁻¹, ενώ τα εντεροβακτήρια και οι ψευδομονάδες καταμετρήθηκαν από 3.20 έως 4.40 και 3.90 έως 5.00 log CFU·g⁻¹, αντίστοιχα. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν κάτω του ορίου καταμέτρησης, ενώ επαληθεύτηκε και η απουσία της *L. monocytogenes*.

Στο τέλος της περιόδου εμπορευσιμότητας των προϊόντων, στις συσκευασίες όπου συντηρήθηκαν με αέρα είχαν επικρατήσει οι ψευδομονάδες, φτάνοντας πληθυσμούς των 7.97, 8.40, 8.28, και 8.98 log CFU·g⁻¹ στους 0, 5, 10 και 15 °C, αντίστοιχα. Αντιθέτως, κατά την αποθήκευση της σαλάτας σε συνθήκες MAMA συν-κυριάρχησαν οι ψευδομονάδες με τις ζύμες, κυρίως λόγω της μειωμένης αύξησης του πληθυσμού των ψευδομονάδων συγκριτικά με την αντίστοιχη ανάπτυξη που παρουσίασαν υπό συνθήκες αέρα. Συγκεκριμένα και στις 4 θερμοκρασίες στις συσκευασίες MAMA παρατηρήθηκε μειωμένη αύξηση του πληθυσμού των ψευδομονάδων κατά περίπου 1 log CFU·g⁻¹.

Στις συσκευασίες ρόκας με αέρα, η εφαρμογή του λεμονόχορτου φάνηκε να έχει βακτηριοκτόνο δράση έναντι των εντερόκοκκων. Ακριβέστερα, όταν εφαρμόστηκε το αιθέριο έλαιο οι πληθυσμοί των εντερόκοκκων ήταν κάτω από το όριο ανιχνευσιμότητας, ενώ χωρίς την εφαρμογή του ελαίου ο πληθυσμός κυμάνθηκε από 2-5 log CFU·g⁻¹. Το ίδιο αποτέλεσμα όσον αφορά στην ανάπτυξη των ζυμών και των μυκήτων παρατηρήθηκε στους 10 και 15°C. Χωρίς την εφαρμογή του αιθέριου ελαίου ο πληθυσμός έφτασε στους 7 log CFU·g⁻¹, ενώ παρουσία του αιθέριου ελαίου ο πληθυσμός δεν υπερέβη τους 5.5 log CFU·g⁻¹. Ωστόσο, τα παραπάνω αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν στην περίπτωση εφαρμογής του αιθέριου ελαίου στις συσκευασμένες σαλάτες ρόκας υπό συνθήκες MAMA, καθώς η ανάπτυξη των εντερόκοκκων, των ζυμών και των μυκήτων δεν παρουσίασε σημαντική διαφοροποίηση. Γενικά, στις συσκευασίες της ρόκας τόσο στον αέρα όσο και στη MAMA δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων και των ψευδομονάδων με την εφαρμογή του λεμονόχορτου. Τέλος, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* παρέμεινε σταθερός και στις τέσσερις θερμοκρασίες συντήρησης που μελετήθηκαν, καθ' όλη τη διάρκεια εμπορευσιμότητας του συγκεκριμένου προϊόντος.

Όσον αφορά στις συσκευασίες του πεπονιού, το προϊόν που συντηρήθηκε υπό συνθήκες αέρα έφτασε στο όριο της εμπορευσιμότητάς του κατά μέσο όρο μετά από 4, 7, 9 και 13 ημέρες στους 15, 10, 5, και 0 °C, αντίστοιχα (Πίνακας 20). Η αρχική ατμόσφαιρα μέσα στη συσκευασία αποτελούνταν από 20.8% O₂ και 0.0% CO₂. Μετά την πρώτη ημέρα αποθήκευσης, πραγματοποιήθηκε εξισορρόπησης της ατμόσφαιρας και η σύστασή της στο εσωτερικό αποτελούνταν από 18.40-19.90% O₂ και 1.15-2.60% CO₂ κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους 15 °C και 20.05-20.80% O₂ και 0.00-0.65% CO₂ στους 0, 5 και 10 °C, ενώ η σύσταση αυτή παρέμεινε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης. Κατά την αποθήκευση της

συσκευασίας του πεπονιού σε συνθήκες MAMA, το πεπόνι έφτασε στο όριο της εμπορευσιμότητάς του κατά μέσο όρο μετά από 4, 7, 9 και 15 ημέρες στους 15, 10, 5 και 0 °C, αντίστοιχα. Η αρχική ατμόσφαιρα μέσα στη συσκευασία αποτελούνταν από 5% O₂ και 10% CO₂. Μετά την πρώτη ημέρα αποθήκευσης πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση της ατμόσφαιρα και η σύσταση στο εσωτερικό της συσκευασίας αποτελούνταν από 18.45-19.80% O₂ και 1.10-2.75% CO₂ κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους 15 °C και 19.10-20.80% O₂ και 0.00-0.85% CO₂ κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους 0, 5 και 10 °C, παραμένοντας σταθερή καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης. Όπως και στην περίπτωση της ρόκας, η εφαρμογή του αιθέριου ελαίου φάνηκε να μην έχει καμία επίδραση στην διάρκεια ζωής του προϊόντος.

Οι αρχικές κυρίαρχες μικροχλωρίδες στο πεπόνι ήταν οι ζύμες-μύκητες και οι ψευδομονάδες, των οποίων οι πληθυσμοί κυμάνθηκαν μεταξύ 3.54-3.95 και 3.00-3.61 log CFU·g⁻¹, αντίστοιχα. Τα εντεροβακτήρια, οι εντερόκοκκοι και τα οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ επαληθεύτηκε και η απουσία της *L. monocytogenes*. Με το τέλος της περιόδου αποθήκευσης των συσκευασμένων πεπονιών στον αέρα, οι ψευδομονάδες επικράτησαν στο μικροοικονομικό σύστημα του προϊόντος φθάνοντας πληθυσμούς της τάξεως των 5.65, 7.50, 7.66, και 7.52 log CFU·g⁻¹ στους 0, 5, 10 και 15 °C, αντίστοιχα. Αντιθέτως, στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης των συσκευασιών που συντηρήθηκαν υπό συνθήκες MAMA, παρατηρήθηκε συγκυριαρχία μεταξύ των ψευδομονάδων και των ζυμών, κυρίως λόγω της μειωμένης αύξησης των ψευδομονάδων, συγκριτικά με την αντίστοιχη που παρουσίασαν υπό συνθήκες αέρα. Συγκεκριμένα, όπως και στην περίπτωση της ρόκας, και στις 4 θερμοκρασίες στις συσκευασίες MAMA παρατηρήθηκε μειωμένη αύξηση του πληθυσμού των ψευδομονάδων κατά περίπου 1 log CFU·g⁻¹. Όσον αφορά στον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, ο πληθυσμός του παρέμεινε σταθερός μεταξύ 3.6 και 4.3 log CFU·g⁻¹ κατά τη διάρκεια αποθήκευσης στους 0 °C. Ωστόσο, στους 5, 10 και 15 °C παρατηρήθηκε αύξηση και ο πληθυσμός του παθογόνου κυμάνθηκε μεταξύ 5.2 και 6.9 log CFU·g⁻¹. Τέλος, σε γενικές γραμμές, η εφαρμογή του αιθέριου ελαίου λεμονόχορτου φάνηκε να μην έχει καμία επίδραση στις κατηγορίες των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν.

Σε όλες τις περιπτώσεις ωστόσο, η εφαρμογή του αιθέριου ελαίου είχε σημαντική επίδραση στις οργανοληπτικές ιδιότητες τόσο της ρόκας, όσο και του πεπονιού. Η συγκεκριμένη επίδραση ήταν πιο έντονη κατά τη διάρκεια των πρώτων 4-5 ημερών της αποθήκευσης και μειωνόταν σταδιακά με το πέρασμα των ημερών, πιθανότατα λόγω εξάτμισης του ελαίου. Ως εκ τούτου, κατά τη διάρκεια των πρώτων 4-5 ημερών τα προϊόντα δεν ήταν αποδεκτά από όλους τους δοκιμαστές, λόγω της έντονης οσμής, αλλά μετά από το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα η υπολειπόμενη οσμή ήταν λιγότερο έντονη και τα προϊόντα περισσότερο αποδεκτά.

Η ανάλυση του αιθέριου ελαίου ταυτοποίησε ένα σύνολο 50 ενώσεων, που αντιπροσώπευαν το 98% του συνολικού ελαίου του λεμονόχορτου (**Πίνακας 21**). Το έλαιο

χαρακτηρίστηκε από την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων οξυγονωμένων μονοτερπενίων (81.4%) την οποία ακολουθούσαν υδρογονάνθρακες μονοτερπενίου (10.3%) και μικρότερες ποσότητες σεσκιτερπενίων (3.7%). Τα κύρια συστατικά του ελαίου ήταν η γερανιάλη, η νεράλη, το λιμονένιο, η γερανιόλη, ο οξικός γερανυλεστέρας, η 6-μεθυλ-5-επτεν-2-όνη, η λιναλοόλη και το καρυφυλλένιο, ενώ οι σχετικές ποσότητες όλων των υπόλοιπων συστατικών ήταν μικρότερες από 1%. Τέλος, η κιτράλη (μίγμα των γεωμετρικών ισομερών γερανιάλη και νεράλη) αντιπροσώπευε περίπου το 67% του συνολικού ελαίου.

Πίνακας 19 Όριο εμπορευσιμότητας (ημέρες) και δυναμική του μικροβιακού πληθυσμού (log CFU g⁻¹) κατά τη διάρκεια συντήρησης συσκευασμένης ρόκας στους 0, 5, 10 και 15 °C υπό συνθήκες αέρα και MAMA, με ή χωρίς προσθήκη αιθέριου ελαίου από λεμονόχορτο και με ή χωρίς ενοφθαλμισμό με *L. monocytogenes*.

Παράμετροι	Αέρας		Αέρας και Α.Ε ¹		Αέρας και <i>L.m</i> ²		Αέρας & Α.Ε & <i>L.m</i>		MAMA		MAMA & Α.Ε		MAMA & <i>L.m</i>		MAMA & Α.Ε & <i>L.m</i>	
	αρχικά ³	τελικά ⁴	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά
	0°C															
LoM ⁵	10		11		10		11		12		12		13		13	
Yeasts-molds	5.70 (0.44) ^a	6.50 (0.41) ^a	6.24 (0.37) ^a	6.69 (0.08) ^a	6.32 (0.11) ^a	6.70 (0.47) ^a	5.93 (0.02) ^a	6.01 (0.24) ^a	5.50 (0.30) ^a	6.05 (0.43) ^a	5.45 (0.63) ^a	6.02 (0.45) ^a	5.69 (0.36) ^a	6.58 (0.52) ^β	5.60 (0.36) ^a	6.30 (0.22) ^β
Enterococci	3.15 (0.15) ^a	3.31 (0.28) ^a	<2	<2	2.20 (0.10) ^a	2.68 (0.40) ^a	2.95 (0.54) ^a	<2 ^β	2.54 (0.15) ^a	3.54 (0.38) ^β	2.32 (0.10) ^a	2.42 (0.12) ^a	2.77 (0.25) ^a	3.20 (0.21) ^β	2.77 (0.24) ^a	3.58 (0.41) ^β
<i>Enterobacteriaceae</i>	3.59 (0.11) ^a	4.33 (0.30) ^β	3.80 (0.10) ^a	4.42 (0.38) ^a	3.30 (0.34) ^a	4.40 (0.20) ^β	3.39 (0.28) ^a	4.40 (0.25) ^β	3.20 (0.20) ^a	4.57 (0.32) ^β	4.40 (0.17) ^a	5.10 (0.25) ^β	4.30 (0.50) ^a	4.50 (0.30) ^a	3.80 (0.20) ^a	4.30 (0.27) ^β
<i>Pseudomonas spp.</i>	4.50 (0.30) ^a	7.90 (0.23) ^β	4.56 (0.32) ^a	7.97 (0.29) ^β	4.25 (0.21) ^a	7.40 (0.30) ^β	4.36 (0.66) ^a	7.32 (0.24) ^β	4.50 (0.20) ^a	6.80 (0.39) ^β	4.02 (0.53) ^a	6.40 (0.40) ^β	4.50 (0.24) ^a	6.60 (0.25) ^β	5.00 (0.63) ^a	6.80 (0.45) ^β
LAB ⁶	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>L. monocytogenes</i>	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	3.96 (0.33) ^a	3.68 (0.50) ^a	3.55 (0.49) ^a	3.20 (0.24) ^a	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	4.50 (0.39) ^a	4.21 (0.44) ^a	4.20 (0.11) ^a	3.80 (0.30) ^a
TAMC ⁷	6.46 (0.20) ^a	8.50 (0.27) ^β	6.30 (0.04) ^a	8.51 (0.60) ^β	6.69 (0.35) ^a	8.20 (0.25) ^β	5.98 (0.23) ^a	8.20 (0.23) ^β	5.52 (0.53) ^a	7.80 (0.20) ^β	5.66 (0.36) ^a	7.75 (0.32) ^β	6.30 (0.36) ^a	7.42 (0.42) ^β	6.39 (0.30) ^a	7.23 (0.23) ^β

Πίνακας 19 (συνέχεια)

Παράμετροι	Αέρας		Αέρας και Α.Ε		Αέρας και L.m		Αέρας & Α.Ε & L.m		MAMA		MAMA & Α.Ε		MAMA & L.m		MAMA & Α.Ε & L.m	
	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά
	5°C															
LoM	9		10		11		10		8		9		9		10	
Yeasts-molds	5.80 (0.04) ^α	6.50 (0.26) ^β	5.07 (0.07) ^α	6.66 (0.33) ^β	5.25 (0.31) ^α	6.10 (0.18) ^α	5.93 (0.12) ^α	6.39 (0.54) ^α	5.86 (0.32) ^α	6.32 (0.54) ^α	5.58 (0.36) ^α	6.00 (0.55) ^β	5.69 (0.52) ^α	6.86 (0.22) ^β	5.69 (0.33) ^α	6.50 (0.65) ^α
Enterococci	3.15 (0.15) ^α	2.30 (0.10) ^β	2.47 (0.12) ^α	<2 ^β	2.20 (0.12) ^α	2.60 (0.30) ^α	2.92 (0.32) ^α	<2 ^β	2.46 (0.15) ^α	3.68 (0.58) ^β	2.20 (0.15) ^α	2.40 (0.20) ^β	2.77 (0.24) ^α	2.40 (0.22) ^α	2.77 (0.36) ^α	2.30 (0.22) ^α
<i>Enterobacteriaceae</i>	3.59 (0.11) ^α	5.40 (0.68) ^β	3.80 (0.10) ^α	4.85 (0.15) ^α	3.30 (0.34) ^α	4.32 (0.14) ^β	3.39 (0.58) ^α	4.80 (0.54) ^α	3.20 (0.58) ^α	4.85 (0.54) ^β	4.20 (0.36) ^α	5.24 (0.44) ^β	4.30 (0.25) ^α	4.80 (0.42) ^α	3.30 (0.32) ^α	4.81 (0.32) ^β
<i>Pseudomonas spp.</i>	4.50 (0.25) ^α	8.40 (0.26) ^β	4.70 (0.41) ^α	8.20 (0.35) ^β	4.25 (0.41) ^α	8.35 (0.41) ^β	4.50 (0.65) ^α	8.25 (0.45) ^β	4.40 (0.36) ^α	6.80 (0.50) ^β	3.90 (0.32) ^α	7.15 (0.25) ^β	4.85 (0.20) ^α	7.30 (0.32) ^β	4.22 (0.20) ^α	7.05 (0.33) ^β
LAB	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>L. monocytogenes</i>	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	4.20 (0.30) ^α	4.37 (0.20) ^α	4.55 (0.49) ^α	3.87 (0.42) ^α	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	4.50 (0.21) ^α	4.12 (0.33) ^α	4.50 (0.32) ^α	4.00 (0.23) ^α
TAMC	6.40 (0.20) ^α	8.73 (0.24) ^β	5.38 (0.04) ^α	8.27 (0.11) ^β	6.69 (0.35) ^α	8.50 (0.21) ^β	6.81 (0.71) ^α	8.74 (0.36) ^β	5.85 (0.26) ^α	8.14 (0.36) ^β	6.10 (0.53) ^α	7.92 (0.36) ^β	6.39 (0.65) ^α	8.12 (0.58) ^β	6.39 (0.36) ^α	7.20 (0.25) ^β

Πίνακας 19 (συνέχεια)

Παράμετροι	Αέρας		Αέρας και Α.Ε		Αέρας και L.m		Αέρας & Α.Ε & L.m		MAMA		MAMA & Α.Ε		MAMA & L.m		MAMA & Α.Ε & L.m	
	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά
	10°C															
LoM	3		3		3		3		4		4		4		4	
Yeasts-molds	5.45 (0.08) ^α	7.54 (0.24) ^β	5.50 (0.17) ^α	4.47 (0.48) ^β	5.80 (0.08) ^α	7.13 (0.12) ^β	5.50 (0.15) ^α	4.60 (0.30) ^β	6.34 (0.52) ^α	7.35 (0.39) ^β	5.89 (0.65) ^α	7.46 (0.45) ^β	5.80 (0.25) ^α	7.20 (0.52) ^β	5.90 (0.56) ^α	7.40 (0.54) ^β
Enterococci	3.20 (0.17) ^α	4.46 (0.06) ^β	3.15 (0.15) ^α	<2 ^β	2.47 (0.08) ^α	3.34 (0.14) ^β	2.41 (0.10) ^α	<2 ^β	2.89 (0.11) ^α	3.52 (0.29) ^β	2.82 (0.15) ^α	3.32 (0.26) ^β	2.53 (0.32) ^α	2.80 (0.30) ^α	2.50 (0.32) ^α	2.52 (0.38) ^α
<i>Enterobacteriaceae</i>	3.60 (0.11) ^α	4.79 (0.08) ^β	3.39 (0.08) ^α	4.60 (0.10) ^β	3.80 (0.10) ^α	4.44 (0.39) ^β	3.41 (0.10) ^α	4.51 (0.03) ^α	3.56 (0.24) ^α	4.16 (0.07) ^β	3.31 (0.49) ^α	4.47 (0.40) ^β	3.80 (0.52) ^α	4.20 (0.32) ^α	3.60 (0.36) ^α	4.00 (0.32) ^α
<i>Pseudomonas spp.</i>	4.25 (0.06) ^α	8.28 (0.10) ^β	4.50 (0.47) ^α	8.25 (0.29) ^β	4.25 (0.58) ^α	8.05 (0.27) ^β	4.35 (0.47) ^α	8.17 (0.60) ^β	4.56 (0.12) ^α	7.32 (0.26) ^β	4.86 (0.41) ^α	7.36 (0.35) ^β	4.23 (0.25) ^α	7.13 (0.52) ^β	4.00 (0.25) ^α	7.53 (0.36) ^β
LAB	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>L. monocytogenes</i>	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	4.19 (0.11) ^α	4.20 (0.23) ^α	4.42 (0.05) ^α	4.31 (0.20) ^α	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	4.20 (0.23) ^α	4.63 (0.28) ^α	4.20 (0.42) ^α	4.62 (0.52) ^α
TAMC	5.80 (0.75) ^α	8.30 (0.15) ^β	6.17 (0.32) ^α	8.27 (0.21) ^β	5.89 (0.76) ^α	8.65 (0.06) ^β	5.89 (0.36) ^α	8.51 (0.07) ^β	6.68 (0.42) ^α	8.13 (0.39) ^β	5.85 (0.55) ^α	7.65 (0.46) ^β	5.86 (0.36) ^α	7.62 (0.52) ^β	6.20 (0.51) ^α	7.60 (0.48) ^β

Πίνακας 19 (συνέχεια)

Παράμετροι	Αέρας		Αέρας και Α.Ε		Αέρας και L.m		Αέρας & Α.Ε & L.m		MAMA		MAMA & Α.Ε		MAMA & L.m		MAMA & Α.Ε & L.m	
	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά
15°C																
LoM	2		2		2		2		2		3		2		3	
Yeasts-molds	5.44 (0.08) ^α	7.82 (0.27) ^β	5.46 (0.15) ^α	5.30 (0.20) ^α	5.68 (0.08) ^α	7.30 (0.30) ^β	5.46 (0.15) ^α	5.18 (0.27) ^α	5.36 (0.53) ^α	7.20 (0.37) ^β	5.71 (0.64) ^α	7.47 (0.37) ^β	5.90 (0.19) ^α	7.30 (0.08) ^β	5.52 (0.16) ^α	7.39 (0.14) ^β
Enterococci	3.15 (0.15) ^α	5.78 (0.18) ^β	3.15 (0.15) ^α	<2 ^β	2.47 (0.14) ^α	2.30 (0.20) ^α	2.41 (0.10) ^α	<2 ^β	2.67 (0.11) ^α	2.52 (0.21) ^α	2.57 (0.19) ^α	3.77 (0.14) ^β	2.52 (0.23) ^α	2.75 (0.68) ^α	2.52 (0.23) ^α	3.90 (0.41) ^β
<i>Enterobacteriaceae</i>	3.59 (0.11) ^α	4.91 (0.07) ^β	3.54 (0.10) ^α	4.86 (0.07) ^β	3.80 (0.10) ^α	4.55 (0.13) ^β	3.35 (0.10) ^α	4.80 (0.07) ^β	3.87 (0.43) ^α	4.68 (0.46) ^α	3.84 (0.44) ^α	4.80 (0.32) ^β	4.10 (0.23) ^α	4.89 (0.24) ^β	3.74 (0.59) ^α	4.38 (0.20) ^α
<i>Pseudomonas spp.</i>	4.50 (0.58) ^α	8.33 (0.18) ^β	4.23 (0.47) ^α	8.98 (0.05) ^β	4.25 (0.32) ^α	8.05 (0.58) ^β	4.32 (0.47) ^α	8.85 (0.09) ^β	4.24 (0.14) ^α	7.37 (0.19) ^β	4.21 (0.34) ^α	7.48 (0.42) ^β	4.24 (0.14) ^α	7.57 (0.07) ^β	4.55 (0.25) ^α	7.98 (0.45) ^β
LAB	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>L. monocytogenes</i>	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	4.19 (0.11) ^α	4.55 (0.49) ^α	4.39 (0.03) ^α	4.25 (0.12) ^α	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	4.62 (0.13) ^α	4.45 (0.14) ^α	4.66 (0.10) ^α	4.77 (0.35) ^α
TAMC	5.80 (0.75) ^α	8.41 (0.10) ^β	5.70 (0.32) ^α	8.87 (0.04) ^β	5.80 (0.76) ^α	8.30 (0.15) ^β	6.20 (0.32) ^α	8.69 (0.17) ^β	6.33 (0.46) ^α	8.08 (0.27) ^β	6.67 (0.66) ^α	8.63 (0.63) ^β	6.57 (0.21) ^α	8.12 (0.37) ^β	6.49 (0.38) ^α	8.26 (0.36) ^β

¹ Α.Ε: αιθέριο έλαιο, ² L.m: *Listeria monocytogenes*, ³ αρχικά: αρχική καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών στη στιγμή της συσκευασίας, ⁴ τελικά: τελική καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών την ημέρα που ορίστηκε ως όριο εμπορευσιμότητας, ⁵ LoM: όριο της εμπορευσιμότητας (limit of marketability), ⁶ LAB: οξυγαλακτικά βακτήρια (lactic acid bacteria), ⁷ TAMC: Ολική αερόφιλη μεσόφιλη χλωρίδα (total aerobic mesophilic count). Η τυπική απόκλιση δίνεται σε παρένθεση. Στην ίδια σειρά, διαφορετικά γράμματα (α ή β) υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές (α < 0.05) μεταξύ ενός αρχικού και ενός τελικού μικροβιακού πληθυσμού.

Πίνακας 20 Όριο εμπορευσιμότητας (ημέρες) και δυναμική του μικροβιακού πληθυσμού (log CFU g⁻¹) κατά τη διάρκεια συντήρησης συσκευασμένου πεποنيού στους 0, 5, 10 και 15 °C υπό συνθήκες αέρα και MAMA, με ή χωρίς προσθήκη αιθέριου ελαίου από λεμονόχορτο και με ή χωρίς ενοφθαλμισμό με *L. monocytogenes*.

Παράμετροι	Αέρας		Αέρας και A.E ¹		Αέρας και <i>L.m</i> ²		Αέρας & A.E & <i>L.m</i>		MAMA		MAMA & A.E		MAMA & <i>L.m</i>		MAMA & A.E & <i>L.m</i>	
	αρχικά ³	τελικά ⁴	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά
	0°C															
LoM ⁵	13		13		13		13		15		15		15		15	
Yeasts-molds	3.90 (0.25) ^a	3.60 (0.25) ^a	3.90 (0.25) ^a	3.80 (0.23) ^a	3.95 (0.35) ^a	3.66 (0.24) ^a	3.80 (0.15) ^a	4.05 (0.42) ^a	3.90 (0.25) ^a	4.26 (0.22) ^a	3.60 (0.45) ^a	4.10 (0.16) ^a	3.92 (0.56) ^a	4.06 (0.51) ^a	3.74 (0.12) ^a	4.20 (0.23) ^β
Enterococci	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<i>Pseudomonas spp.</i>	3.20 (0.32) ^a	5.20 (0.36) ^β	3.17 (0.12) ^a	5.20 (0.35) ^β	3.50 (0.14) ^a	5.60 (0.40) ^β	3.15 (0.39) ^a	5.65 (0.54) ^β	3.20 (0.32) ^a	4.60 (0.23) ^β	3.33 (0.12) ^a	4.66 (0.21) ^β	3.50 (0.30) ^a	5.00 (0.24) ^β	3.29 (0.15) ^a	4.45 (0.28) ^β
LAB ⁶	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>L. monocytogenes</i>	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	3.77 (0.20) ^a	4.30 (0.22) ^β	3.10 (0.20) ^a	4.20 (0.23) ^β	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	3.87 (0.21) ^a	3.69 (0.23) ^a	3.65 (0.20) ^a	3.88 (0.42) ^a
TAMC ⁷	4.77 (0.30) ^a	5.80 (0.36) ^β	4.77 (0.30) ^a	5.60 (0.32) ^β	4.77 (0.30) ^a	5.80 (0.36) ^β	5.00 (0.30) ^a	5.80 (0.21) ^β	4.60 (0.23) ^a	5.30 (0.34) ^β	4.40 (0.30) ^a	5.30 (0.32) ^β	4.82 (0.34) ^a	5.23 (0.43) ^a	4.34 (0.32) ^a	5.15 (0.22) ^β

Πίνακας 20 (συνέχεια)

Παράμετροι	Αέρας		Αέρας και Α.Ε		Αέρας και <i>L.m</i>		Αέρας & Α.Ε & <i>L.m</i>		MAMA		MAMA & Α.Ε		MAMA & <i>L.m</i>		MAMA & Α.Ε & <i>L.m</i>	
	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά
	5°C															
LoM	9		9		9		9		9		9		9		9	
Yeasts-molds	3.72 (0.05) ^α	5.20 (0.35) ^β	3.80 (0.20) ^α	5.50 (0.32) ^β	3.92 (0.12) ^α	5.40 (0.36) ^β	3.68 (0.25) ^α	5.60 (0.35) ^β	3.81 (0.15) ^α	5.20 (0.32) ^β	3.63 (0.45) ^α	5.50 (0.42) ^β	3.95 (0.05) ^α	5.40 (0.32) ^β	3.80 (0.07) ^α	5.20 (0.36) ^β
Enterococci	<2	3.30 (0.21)	<2	3.02 (0.21)	<2	3.33 (0.21)	<2	2.80 (0.32)	<2	3.40 (0.21)	<2	3.62 (0.23)	<2	3.35 (0.21)	<2	3.62 (0.23)
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1	4.30 (0.41)	<1	4.70 (0.42)	<1	4.22 (0.21)	<1	4.20 (0.32)	<1	4.30 (0.32)	<1	4.51 (0.32)	<1	4.20 (0.32)	<1	4.50 (0.33)
<i>Pseudomonas spp.</i>	3.02 (0.17) ^α	7.45 (0.23) ^β	3.17 (0.12) ^α	7.40 (0.36) ^β	3.20 (0.20) ^α	7.50 (0.24) ^β	3.10 (0.08) ^α	7.50 (0.32) ^β	3.41 (0.13) ^α	5.60 (0.35) ^β	3.32 (0.41) ^α	5.54 (0.22) ^β	3.16 (0.27) ^α	5.60 (0.24) ^β	3.10 (0.42) ^α	5.60 (0.44) ^β
LAB	<2	4.50 (0.22)	<2	4.60 (0.33)	<2	4.40 (0.35)	<2	4.38 (0.35)	<2	4.25 (0.33)	<2	4.37 (0.33)	<2	4.20 (0.36)	<2	4.52 (0.33)
<i>L. monocytogenes</i>	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	3.77 (0.05) ^α	5.30 (0.52) ^β	3.77 (0.05) ^α	5.40 (0.36) ^β	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	3.77 (0.05) ^α	5.60 (0.42) ^β	3.77 (0.05) ^α	5.20 (0.32) ^β
TAMC	4.77 (0.30) ^α	7.60 (0.36) ^β	4.77 (0.30) ^α	7.58 (0.47) ^α	4.77 (0.30) ^α	7.80 (0.35) ^β	4.77 (0.30) ^α	7.80 (0.24) ^β	4.77 (0.30) ^α	7.68 (0.35) ^β	4.77 (0.30) ^α	8.15 (0.32) ^β	4.77 (0.30) ^α	7.90 (0.35) ^β	4.77 (0.30) ^α	7.96 (0.35) ^β

Πίνακας 20 (συνέχεια)

Παράμετροι	Αέρας		Αέρας και Α.Ε		Αέρας και <i>L.m</i>		Αέρας & Α.Ε & <i>L.m</i>		MAMA		MAMA & Α.Ε		MAMA & <i>L.m</i>		MAMA & Α.Ε & <i>L.m</i>	
	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά
	10 °C															
LoM	7		7		7		7		7		7		7		7	
Yeasts-molds	3.92 (0.15) ^α	5.42 (0.35) ^β	3.58 (0.17) ^α	5.42 (0.36) ^β	3.72 (0.21) ^α	5.24 (0.36) ^β	3.73 (0.35) ^α	5.62 (0.32) ^β	3.60 (0.40) ^α	6.24 (0.45) ^β	3.73 (0.35) ^α	6.57 (0.33) ^β	3.68 (0.20) ^α	6.85 (0.42) ^β	3.90 (0.05) ^α	6.74 (0.33) ^β
Enterococci	<2	4.30 (0.25)	<2	3.40 (0.30)	<2	3.80 (0.33)	<2	4.06 (0.35)	<2	4.00 (0.30)	<2	3.40 (0.62)	<2	3.80 (0.30)	<2	4.30 (0.35)
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1	4.63 (0.52)	<1	4.50 (0.32)	<1	4.20 (0.36)	<1	5.10 (0.32)	<1	4.60 (0.33)	<1	4.60 (0.33)	<1	4.66 (0.36)	<1	4.63 (0.52)
<i>Pseudomonas spp.</i>	3.31 (0.30) ^α	7.39 (0.35) ^β	3.12 (0.10) ^α	7.66 (0.51) ^β	3.53 (0.27) ^α	7.63 (0.32) ^β	3.42 (0.12) ^α	7.56 (0.33) ^β	3.61 (0.23) ^α	6.08 (0.34) ^β	3.25 (0.17) ^α	6.22 (0.35) ^β	3.18 (0.22) ^α	6.38 (0.42) ^β	3.40 (0.32) ^α	6.33 (0.42) ^β
LAB	<2	4.20 (0.32)	<2	4.32 (0.41)	<2	4.30 (0.32)	<2	4.30 (0.33)	<2	4.20 (0.32)	<2	4.63 (0.32)	<2	4.20 (0.32)	<2	4.30 (0.32)
<i>L. monocytogenes</i>	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	3.77 (0.32) ^α	6.90 (0.32) ^β	3.77 (0.32) ^α	6.50 (0.24) ^β	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	3.77 (0.32) ^α	6.54 (0.32) ^β	3.77 (0.32) ^α	6.23 (0.32) ^β
TAMC	4.77 (0.30) ^α	7.50 (0.62) ^β	4.77 (0.30) ^α	7.80 (0.35) ^β	4.77 (0.30) ^α	8.12 (0.45) ^β	4.77 (0.30) ^α	8.12 (0.26) ^β	4.77 (0.30) ^α	7.24 (0.35) ^β	4.77 (0.30) ^α	7.12 (0.35) ^β	4.77 (0.30) ^α	6.86 (0.52) ^β	4.77 (0.30) ^α	6.90 (0.23) ^β

Πίνακας 20 (συνέχεια)

Παράμετροι	Αέρας		Αέρας και Α.Ε		Αέρας και L.m		Αέρας & Α.Ε & L.m		MAMA		MAMA & Α.Ε		MAMA & L.m		MAMA & Α.Ε & L.m		
	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	αρχικά	τελικά	
15°C																	
LoM	4		4		4		4		4		4		4		4		
Yeasts-molds	3.83 (0.19) ^α	6.33 (0.35) ^β	3.68 (0.17) ^α	6.68 (0.35) ^β	3.80 (0.14) ^α	6.36 (0.50) ^β	3.92 (0.14) ^α	6.20 (0.51) ^β	3.76 (0.23) ^α	6.50 (0.32) ^β	3.75 (0.17) ^α	6.56 (0.35) ^β	3.80 (0.36) ^α	6.50 (0.41) ^β	3.54 (0.22) ^α	6.30 (0.32) ^β	
Enterococci	<2	5.10 (0.52)	<2	4.88 (0.41)	<2	5.22 (0.67)	<2	4.85 (0.47)	<2	4.58 (0.62)	<2	4.89 (0.24)	<2	5.04 (0.26)	<2	5.33 (0.50)	
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1	5.25 (0.36)	<1	5.50 (0.25)	<1	5.68 (0.41)	<1	5.53 (0.25)	<1	5.68 (0.41)	<1	5.32 (0.24)	<1	5.40 (0.54)	<1	5.30 (0.54)	
<i>Pseudomonas spp.</i>	3.20 (0.32) ^α	7.32 (0.42) ^β	3.12 (0.36) ^α	7.52 (0.26) ^β	3.00 (0.23) ^α	7.52 (0.35) ^β	3.25 (0.14) ^α	6.90 (0.54) ^β	3.12 (0.12) ^α	6.32 (0.36) ^β	3.00 (0.23) ^α	6.20 (0.32) ^β	3.20 (0.20) ^α	6.20 (0.24) ^β	3.21 (0.12) ^α	6.00 (0.35) ^β	
LAB	<2	4.23 (0.42)	<2	4.12 (0.21)	<2	3.69 (0.14)	<2	4.10 (0.24)	<2	4.30 (0.36)	<2	3.98 (0.41)	<2	3.90 (0.24)	<2	3.90 (0.14)	
<i>L. monocytogenes</i>	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	3.77 (0.32) ^α	6.12 (0.21) ^β	3.84 (0.24) ^α	6.47 (0.32) ^β	απουσία	απουσία	απουσία	απουσία	3.77 (0.21) ^α	6.69 (0.24) ^β	3.77 (0.21) ^α	6.20 (0.25) ^β	
TAMC	4.27 (0.30) ^α	7.20 (0.30) ^β	4.18 (0.25) ^α	6.90 (0.52) ^β	4.25 (0.30) ^α	7.75 (0.07) ^β	4.57 (0.12) ^α	7.39 (0.52) ^β	4.25 (0.25) ^α	7.12 (0.35) ^β	4.35 (0.25) ^α	7.20 (0.24) ^β	4.27 (0.32) ^α	7.10 (0.50) ^β	4.40 (0.25) ^α	7.12 (0.22) ^β	

¹ Α.Ε: αιθέριο έλαιο, ² L.m: *Listeria monocytogenes*, ³ αρχικά: αρχική καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών στη στιγμή της συσκευασίας, ⁴ τελικά: τελική καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών την ημέρα που ορίστηκε ως όριο εμπορευσιμότητας, ⁵ LoM: όριο της εμπορευσιμότητας (limit of marketability), ⁶ LAB: οξυγαλακτικά βακτήρια (lactic acid bacteria), ⁷ TAMC: Ολική αερόφιλη μεσόφιλη χλωρίδα (total aerobic mesophilic count). Η τυπική απόκλιση δίνεται σε παρένθεση. Στην ίδια σειρά, διαφορετικά γράμματα (α ή β) υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές (α < 0.05) μεταξύ ενός αρχικού και ενός τελικού μικροβιακού πληθυσμού.

Πίνακας 21 Χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου του λεμονόχορτου

Όνομα	LRI^α	Περιεκτικότητα %^β	Ταυτοποίηση^γ
Γερανιάλη	1273	38.5	A
Νεράλη	1240	28.7	A
Λιμονένιο	1026	6.9	A
Γερανιόλη	1256	4.4	A
Οξικός γερανυλεστέρας	1386	4.3	A
6-μεθυλ-5-επτεν-2-όνη	986	1.8	A
Λιναλοόλη	1100	1.6	A
(E)-Καρυοφυλλένιο	1413	1.4	A
Καμφένιο	943	1.0	A
γ-Καδινένιο	1509	1.0	B
4-Ενανόνη	1072	0.9	B
Ισογερανιάλη	1183	0.7	B
α-Πινένιο	929	0.6	A
Κιτρονελλάλη	1152	0.6	B
Ευκαλυπτόλη	1028	0.6	A
Σαβινένιο	970	0.4	A
Ισονεράλη	1164	0.4	C
Οξείδιο του καρυοφυλλένιου	1576	0.4	A
Ισοευγενόλη	1447	0.4	B
β-Πινένιο	972	0.3	A
Μυρκένιο	990	0.3	A
(Z)-β-Οκιμένιο	1036	0.3	B
Χρυσανθεμάλιο	1147	0.2	C
α-Πινένιο εποξείδιο	1280	0.2	C
δ-Καδινένιο	1520	0.2	B
(E)-β-Οκιμένιο	1046	0.2	B
Ισοβορνεόλη	1162	0.2	B
α-Τερπινεόλη	1188	0.2	A
Δεκανάλη	1206	0.2	A
Γερανύλιο μυρμηκικό	1303	0.2	B
Γερανύλιο βουτυρικό	1562	0.2	B
Οξείδιο του φουρανίου	1175	0.1	C
<i>trans</i> -Πιπεριτόλη	1176	0.1	C
(E)-γ-δισαμπολένιο	1529	0.1	B
Τρικυκλένιο	919	0.1	B
Επιχροκίτράλιο A	1136	0.1	C
β-Ελεμένιο	1388	0.1	B
Γερμακρένιο D	1475	0.1	B

Πίνακας 21 (συνέχεια)

Όνομα	LRI^a	Περιεκτικότητα %^b	Ταυτοποίηση^γ
Οκτανάλη	1004	0.1	A
Κιτρονελλόνη	1230	0.1	A
Κυκλοσατιβένιο	1359	0.1	B
επι-Κουμπεμπόλη	1490	0.1	B
Τερπινολένιο	1086	0.1	A
Τερπινεν-4-όλη	1174	0.1	B
Φουράνιο	1095	0.1	C
α-Υλανγένιο	1361	0.1	C
cis-Καρβεόλη	1204	0.1	C
Νερόλη	1229	0.1	B
α- Καδινένιο	1532	0.1	B
α- ελεμόλη	1546	0.1	B
<i>Ταξική σύνθεση</i>			
Υδρογονάνθρακες μονοτερπενίων		10.3	
Οξυγονωμένα μονοτερπένια		81.4	
Υδρογονάνθρακες σεσκιτερπενίου		3.2	
Οξυγονωμένα σεσκιτερπένια		0.5	
Άλλα		3.4	
Συνολικώς εντοπισμένα (%)		98.8	

^aΔείκτης γραμμικής συγκράτησης (Linear Retention Indices, *LRI*) στη στήλη MEGA-5 HT

^bΣυστατικά με συγκέντρωση % $\leq 0,05$ θεωρήθηκαν ως ίχνη

^γΑξιοπιστία ταυτοποίησης. A: συμφωνία των δεδομένων της MS και του δείκτη συγκράτησης με αυτές των αυθεντικών συστατικών, B: συμφωνία των δεδομένων της MS και του δείκτη συγκράτησης με αυτές της βιβλιογραφίας και της βιβλιοθήκης FFNSC MS, C: ενδεικτική ταυτοποίηση

5.5 Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει ένα αξιοσημείωτο ενδιαφέρον στα εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια που προέρχονται από αρωματικά φυτά και παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα εναντίον τροφιμογενών παθογόνων και μικροοργανισμών που παράγουν τοξίνες (Tzortzakis και Economakis, 2007). Το ενδιαφέρον αυτό υποστηρίχθηκε έντονα από το γεγονός ότι τα αιθέρια έλαια είναι φυσικά προϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά πρόσθετα σε πολλά τρόφιμα λόγω των αντιβακτηριακών, αντιμυκητιακών, αντιοξειδωτικών και αντικαρκινογόνων τους ιδιοτήτων (Teissedre και Waterhouse, 2000). Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες μιας εκτεταμένης ποικιλίας φυτικών ελαίων ή εκχυλισμάτων έχουν μελετηθεί εκτενώς κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Ως εκ τούτου, υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες για τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας των διαφόρων ουσιών κατά των τροφιμογενών παθογόνων, ταυτόχρονα όμως αναφέρεται και μεταβλητότητα των συμπερασμάτων που έχει παρατηρηθεί, ακόμα και για τα ίδια αιθέρια έλαια. Αυτό μπορεί να

αποδοθεί σε μια σειρά παραγόντων, οι οποίοι έχουν μεταβαλλόμενη σύνθεση ανάλογα με τις τοπικές κλιματικές και περιβαλλοντικές συνθήκες των περιοχών απ' όπου προέρχονται τα φυτά (Janssen και συν., 1987· Σίνγορουλου και συν., 1995), με την ποικιλία της προέλευσης να αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα διαφοροποίησης της δράσης των ουσιών αυτών (Windholz και συν., 1983· Reynolds, 1996). Για τον λόγο αυτό, ο συγκεκριμένος παράγοντας θα πρέπει να υπολογίζεται πάντα κατά την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων.

Στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκε η επίδραση των ατμών του αιθέριου ελαίου από λεμονόχορτο, όσον αφορά στην ανάπτυξη της μικροχλωρίδας και της *L. monocytogenes* σε συσκευασμένη σαλάτα ρόκας και σε πεπόνι, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των συσκευασιών αυτών σε συνθήκες αέρα και MAMA στους 0, 5, 10 και 15 °C.

Επί του παρόντος, υπάρχει μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μελετών σχετικά με την επίδραση των συσκευασιών MAMA στο χρόνο ζωής των προϊόντων, τη μικροχλωρίδα, καθώς και την επιβίωση των τροφιμογενών παθογόνων στα κομμένα φρούτα και λαχανικά. Οι Lokke και συν. (2012) μελέτησαν την επίδραση στην φρεσκότητα και οργανοληπτική ποιότητα άγριας ρόκας σε συσκευασίες υψηλού ($48400 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \text{ 24 h} \cdot \text{atm}$) και χαμηλού ($1900 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \text{ 24 h} \cdot \text{atm}$) ρυθμού μετάδοσης οξυγόνου (oxygen transmission rate, *OTR*), οι οποίες περιείχαν αέρα. Το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξαν ήταν ότι η μεμβράνη υψηλής *OTR* θα πρέπει να επιλέγεται όταν η θερμοκρασία αποθήκευσης δεν μπορεί να ελέγχεται, καθώς επιτρέπει επαρκή αερόβια αναπνοή και αποτρέπει την απώλεια της υφής των φύλλων. Στην παρούσα μελέτη η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν μέσης *OTR*. Αμφότερες οι συνθήκες συσκευασίας αέρα και τροποποιημένης ατμόσφαιρα (5% O_2 , 10% CO_2) παρουσίασαν συγκρίσιμη διάρκεια εμπορευσιμότητας των προϊόντων, πιθανότατα λόγω εξισορρόπησης της ατμόσφαιρας που πραγματοποιήθηκε από την πρώτη κιόλας ημέρα αποθήκευσης σε όλες τις υπό μελέτη θερμοκρασίες. Ωστόσο, η αρχική μεταβολή στην ατμόσφαιρα επηρέασε σημαντικά την κυρίαρχη μικροχλωρίδα επιφάνειας, καθώς και την επίδραση του αιθέριου ελαίου του λεμονόχορτου. Στην πρώτη περίπτωση στην οποία χρησιμοποιήθηκε ο αέρας, οι ψευδομονάδες κυριάρχησαν στη μικροχλωρίδα και στη ρόκα και στο πεπόνι. Αντιθέτως, η τροποποιημένη ατμόσφαιρα είχε σαν αποτέλεσμα την συν-κυριαρχία των ψευδομονάδων με τις ζύμες και τους μύκητες. Αυτή η συγκυριαρχία προέκυψε από τη μειωμένη ανάπτυξη των ψευδομονάδων κατά $1-2 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ συγκριτικά με την αντίστοιχη ανάπτυξή τους στον αέρα. Η μείωση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην αρχική απομάκρυνση του αέρα και την αυξημένη συγκέντρωση του CO_2 , καθώς είναι γνωστό ότι οι ψευδομονάδες συγκαταλέγονται μεταξύ των πιο ευαίσθητων μικροοργανισμών στο CO_2 (Jay και συν., 2005).

Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει αντιμικροβιακή δράση του λεμονόχορτου κατά μυκήτων και βακτηρίων όπως τα: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Aspergillus*

niger, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes*, *Corynebacterium equii*, *Cladosporium herbarum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Fusarium verticillioides*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Rhizopus stolonifer*, *Salmonella Typhimurium*, *Serratia marcescens*, και *Staphylococcus aureus*, είτε μέσω μεθόδου διάχυσης σε άγαρ ή/και μέσω μεθόδου αραιώσης σε ζωμό (Mishra και Dubey, 1994· Baratta και συν., 1998, Hammer και συν., 1999· Cimanga και συν., 2002· Daferera και συν., 2003· Plotto και συν., 2003· Pereira και συν., 2004· Serrano και συν., 2005· Naik και συν., 2010). Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο του *C. Citratus* αναφέρθηκε ως πιο αποτελεσματικό από συνθετικά μυκητοκτόνα όπως το Agrosan GN, Dithane M-43 και τον οξυχλωριούχο χαλκό (Mishra και Dubey, 1994· Adegoke και Odesola, 1996). Σε αντίθεση με τα παραπάνω αποτελέσματα ωστόσο, οι Adegoke και Odesola (1996) ανέφεραν ότι η αύξηση του μικροοργανισμού *Fusarium verticillioides* δεν επηρεάστηκε όταν το αιθέριο έλαιο από λεμονόχορτο προστέθηκε στο μέσο καλλιέργειας.

Αν και έχουν υπάρξει πολλές αναφορές της αντιμυκητιακής και αντιβακτηριακής δράση των αιθέριων ελαίων, υπάρχουν πολύ λιγότερες αναφορές για τη δράση των ατμών των αιθέριων ελαίων και ιδιαίτερα αυτών που προέρχονται από λεμονόχορτο. *In vitro* μελέτες σε καρπούς τομάτας έδειξαν πλήρη αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών *Bacillus cinerea* και *Alternaria arborescens* από ατμούς λεμονόχορτου. Επιπλέον, ο μικροοργανισμός *Geotrichum candidum* αναφέρθηκε ως πιο ευαίσθητος στην κιτράλη και στους ατμούς ελαίων που περιέχουν κιτράλη από τα έλαια του θυμαριού και της ρίγανης. Από την άλλη πλευρά, δεν αναφέρθηκε επίδραση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Rhizopus stolonifer* (Plotto και συν., 2003).

Η κύρια ανησυχία σχετικά με τη χρήση αιθέριων ελαίων είναι η επίδρασή τους στις οργανοληπτικές ιδιότητες των επεξεργασμένων προϊόντων. Παρά το γεγονός ότι οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (minimum inhibitory concentrations, MICs) των πιο ενεργών αιθέριων ελαίων είναι πολύ χαμηλές, μπορούν να μεταβάλλουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες των επεξεργασμένων τροφίμων (Nedorostova και συν., 2009). Επιπλέον, *in vitro* μελέτες δεν αποτελούν απαραίτητα ένδειξη για το πόσο αποτελεσματικό θα είναι ένα αιθέριο έλαιο όταν εφαρμοστεί σε συστήματα τροφίμων (Phillips και συν., 2012). Πράγματι, όταν τα έλαια εφαρμόζονται σε συστήματα τροφίμων απαιτούνται συνήθως υψηλότερες συγκεντρώσεις προκειμένου να ληφθεί μία παρόμοια αντιμικροβιακή επίδραση με αυτή των *in vitro* μελετών (Burt, 2004). Αυτό οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και των τροφίμων (Nychas και Tassou, 2000), γεγονός το οποίο θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη στις εμπορικές εφαρμογές. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαίο να δοκιμάζονται τα αιθέρια έλαια επί των τροφίμων προκειμένου να αξιολογείται η επίπτωσή τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων προϊόντων. Στη συγκεκριμένη μελέτη οι ατμοί του λεμονόχορτου είχαν

σημαντική επίδραση στις οργανοληπτικές ιδιότητες των υπό μελέτη προϊόντων, ιδιαίτερα κατά τις 4-5 πρώτες ημέρες αποθήκευσής τους, λόγω της έντονης οσμής του ελαίου. Οι Arrebola και συν. (2010) κατόρθωσαν να μειώσουν την έντονη οσμή του ελαίου του λεμονόχορτου και να διατηρήσουν την ποιότητα των ροδάκινων κατά την αποθήκευσή τους, καταδεικνύοντας τη δυνατότητα χρήσης του μικροοργανισμού *Bacillus amyloliquefaciens* σε συνδυασμό με το έλαιο του λεμονόχορτου. Ο συνδυασμός του μικροοργανισμού αυτού με το έλαιο του λεμονόχορτου οδήγησε σε μείωση της ποσότητας του ελαίου στο σύστημα, μειώνοντας έτσι και τη δυσάρεστη οσμή και γεύση που προκύπτει από αυτό.

Το έλαιο του λεμονόχορτου έχει αναφερθεί επίσης ως αποτελεσματικό ενάντια στους μικροοργανισμούς *Listeria innocua*, *Escherichia coli* και *Salmonella Enteritidis* σε χυμούς μήλου, αχλαδιού και πεπονιού που συντηρήθηκαν στους 35 °C (Raybaudi-Massilis και συν., 2006). Στην τελευταία μελέτη πλήρης αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξη επιτεύχθηκε με 2 $\mu\text{L ml}^{-1}$ στους χυμούς μήλου και αχλαδιού και με 5 $\mu\text{L ml}^{-1}$ στο πεπόνι και σε TSB (tryptone soy broth), τονίζοντας την επίδραση των τροφίμων στην αποτελεσματικότητα των ελαίων. Οι Azarakhsh και συν. (2014) μελέτησαν τις επιδράσεις του λεμονόχορτου ενσωματώνοντάς το σε βρώσιμη μεμβράνη αλγινικού για φρεσκοκομμένο ανανά και ανέφεραν σημαντική μείωση της συνολικής μικροχλωρίδας καθώς και των ζυμών και μυκήτων των επικαλυμμένων δειγμάτων κατά τη διάρκεια αποθήκευσης σε χαμηλή θερμοκρασία, η οποία συνοδευόταν και από μια ταυτόχρονη αύξηση της διάρκειας ζωής του προϊόντος.

Στην παρούσα μελέτη η εφαρμογή των ατμών του λεμονόχορτου στις συσκευασίες της ρόκας υπό συνθήκες αέρα φάνηκε να έχει ένα σημαντική βακτηριοκτόνο δράση επί της ανάπτυξης των ζυμών και των μυκήτων στους 10-15 °C και στους πληθυσμούς των εντερόκοκκων σε όλες οι θερμοκρασίες. Επιπλέον, η εφαρμογή του αιθέριου ελαίου του λεμονόχορτου φάνηκε να μην έχει κάποια επίδραση στις μικροβιακές κατηγορίες που μελετήθηκαν στη ρόκα που συσκευάστηκε σε συνθήκες MAMA και στο πεπόνι που συσκευάστηκε τόσο σε αέρα όσο και στις συνθήκες MAMA. Ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* παρέμεινε σταθερός κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στον αέρα των συσκευασμένων σαλατών στους 0, 5, 10 και 15 °C και των συσκευασμένων σαλατών ρόκας σε MAMA στους 0°C. Ωστόσο παρατηρήθηκε ανάπτυξη του παθογόνου, στους 5, 10 και 15 °C. Αυτό μπορεί να αποδοθεί κατά κύριο λόγο στη μικροδιάτρητη συσκευασία που επέτρεψε τη διαφυγή των ατμών του αιθέριου ελαίου, κάτι το οποίο όμως ήταν αναγκαίο προκειμένου να επιτρέπεται η επαρκής αναπνοή των φυτικών ιστών. Εν κατακλείδι, η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου του λεμονόχορτου φάνηκε να επηρεάζεται από τα τρόφιμα και τις συνθήκες αποθήκευσης, χωρίς να παρατηρείται καμία επίδραση στη διάρκεια ζωής των δύο υπό μελέτη προϊόντων.

**6 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6- ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ *LISTERIA PATHOGENICITY ISLAND 1 (LPI-1)* ΣΕ
ΣΤΕΛΕΧΗ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΠΟΥ ΑΝΗΚΟΥΝ
ΣΤΟΥΣ ΟΡΟΤΥΠΟΥΣ 1/2Α ΚΑΙ 4Β.**

6.1 Εισαγωγή⁴

Η *Listeria monocytogenes* χαρακτηρίζεται από μια αξιοσημείωτη ικανότητα προσαρμογής σε μία ευρεία ποικιλία συνθηκών καταπόνησης. Η ικανότητά του αυτή του δίνει τη δυνατότητα να επιβιώνει αλλά και να πολλαπλασιάζεται σε προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, καθώς και στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στα προηγούμενα κεφάλαια (2 και 4), η έκφραση της παθογονικότητας (pathogenicity) του μικροοργανισμού απαιτεί τη συντονισμένη έκφραση μίας σειράς γονιδίων, πολλά εκ των οποίων είναι συγκεντρωμένα στο σύμπλεγμα γονιδίων *Listeria Pathogenicity Island 1* (LIPI-1). Το σύμπλεγμα αυτό έχει μέγεθος 9-kb, βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων *prfA* και *orfX* και αποτελείται από τα έξι γονίδια *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* και *plcB* (Dussurget, 2008).

Το γονίδιο *prfA* κωδικοποιεί τον πολύ σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα PrfA, ο οποίος ενεργοποιεί άμεσα ή έμμεσα τη μεταγραφή περισσότερων από 140 γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που περιέχονται στο LIPI-1 (Paramithiotis και συν., 2014). Τα γονίδια *plcA* και *plcB* κωδικοποιούν τις φωσφολιπάσες PI-PLC και PC-PLC, αντίστοιχα, και συνεργάζονται με την LLO, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *hly*, για την αποτελεσματική διαφυγή του παθογόνου από τα φαγοσώματα στο κυτταρόπλασμα (Kathariou και συν., 1987· Cossart και συν., 1989· Schluter και συν., 1998· Grundling και συν., 2003, Hamon και συν., 2012). Το γονίδιο *mpl* κωδικοποιεί την μεταλλοπρωτεάση Mpl, η οποία είναι αναγκαία στην ωρίμανση του προενζύμου pro-PlcB (Domann και συν., 1991· Raveneau και συν., 1992) και το γονίδιο *actA* την πρωτεΐνη επιφάνειας Acta, η οποία διαθέτει πολυλειτουργικό χαρακτήρα (Suarez και συν., 2001· Birmingham και συν., 2007· Travier και συν., 2013).

Πολλά από τα γονίδια του LIPI-1, και ιδιαίτερα το *prfA* και το *hly*, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως στόχοι για την ανίχνευση του παθογόνου σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων (Hough και συν., 2002· Amagliani και συν., 2004· Wang και συν., 2004· Jofre και συν., 2005· Bilir Ormanci και συν., 2008· Germini και συν., 2009· Cobo-Molinos και συν., 2010· Tang και συν., 2011· Wang και συν., 2011· Shan και συν., 2012· Wan και συν., 2012· Sharma και Mutharasan, 2013). Επιπλέον, η ανίχνευσή τους έχει εφαρμοσθεί ως μέθοδος εκτίμησης του δυναμικού παθογονικότητας των στελεχών του μικροοργανισμού (Paziak-Domanska και συν., 1999· Jaradat και συν., 2002· Lomonaco και συν., 2012· Moreno και συν., 2014), ενώ

⁴ Το παρόν κεφάλαιο έχει υποβληθεί υπό τη μορφή πρωτότυπου ερευνητικού άρθρου (original research article) με τα ακόλουθα στοιχεία: Genetic analysis of *Listeria Pathogenicity Island 1* of *L. monocytogenes* 1/2a and 4b serotypes. Hadjilouka A., Paramithiotis S., Drosinos E.H. *Molecular Biology Reports*.

ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει προκαλέσει και η μεταγραφή τους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του παθογόνου σε τρόφιμα (Olesen και συν., 2010· Duodu και συν., 2010· Rantsiou και συν., 2012a, 2012b· Alessandria και συν., 2013· Hadjilouka και συν. 2016).

Παρά την αυξημένη σημασία του συμπλέγματος αυτού στη λοιμοτοξικότητα (virulence) του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μελετών έχει ασχοληθεί με την ποικιλομορφία της αλληλουχίας του, καθώς και με τη συμβολή της γενετικής επιλογής και του ανασυνδυασμού των γονιδίων του στην εξέλιξη του παθογόνου. Οι Ward και συν. (2004) επικεντρώθηκαν στη φυλογενετική προοπτική, ενώ οι Orsi και συν. (2008a, 2008b) παρείχαν πληροφορίες σχετικά με τη γενετική επιλογή και τον ανασυνδυασμό. Ωστόσο, για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων και τη διευκόλυνση της κατανόησης της εξέλιξης αυτής της ομάδας των γονιδίων παθογονικότητας απαιτείται η μελέτη πολύ περισσότερων απομονώσεων.

Η πληθυσμιακή γενετική αποτελεί ένα κλάδο της εξελικτικής βιολογίας που έχει ως στόχο να προσδιορίσει το επίπεδο και τη διανομή του γενετικού πολυμορφισμού σε φυσικούς πληθυσμούς, καθώς επίσης και να ανιχνεύσει τις εξελικτικές δυνάμεις που θα μπορούσαν να καθορίσουν το μοτίβο της γενετικής ποικιλομορφίας που παρατηρείται στους πληθυσμούς αυτούς. Ιδανικά, ο καλύτερος τρόπος ποσοτικοποίησης της γενετικής παραλλαγής σε φυσικούς πληθυσμούς είναι μέσω σύγκρισης των αλληλουχιών DNA (Kreitman, 1983). Ωστόσο, αν και η μεθοδολογία για την ανάλυση αλληλουχιών DNA είναι διαθέσιμη από το 1977 (Maxam και Gilbert, 1977· Sanger και συν., 1977), η χρήση των δεδομένων από την αλληλούχιση DNA είχε μικρό αντίκτυπο στην πληθυσμιακή γενετική μέχρι το 1990. Αυτό οφείλεται στην χρηματική και χρονική αναγκαιότητα που απαιτούνται για τη λήψη των δεδομένων της αλληλούχισης του DNA. Γενικότερα, τα δεδομένα που αφορούν τις μελέτες αυτές άλλαξαν κυρίως έπειτα από την εμφάνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Saiki και συν., 1985· Saiki και συν., 1988), η οποία επιτρέπει την άμεση αλληλούχιση των προϊόντων που προκύπτουν από αυτήν. Η μέθοδος αυτή έχει δημιουργήσει αναμφίβολα μία επαναστατική αλλαγή στην πληθυσμιακή γενετική, παρά το γεγονός ότι προς το παρόν οι πληθυσμιακές μελέτες σε επίπεδο αλληλουχίας του DNA είναι ακόμη λιγιστές.

6.2 Στόχος

Αντικείμενο της παρούσας πειραματικής ενότητας αποτέλεσε η πραγματοποίηση περιγραφικής και φυλογενετικής ανάλυσης, καθώς και ανάλυσης ανασυνδυασμού και γενετικής επιλογής του συμπλέγματος γονιδίων *Listeria Pathogenicity Island 1 (LIPI-1)*, σε

στελέχη της *L. monocytogenes* τα οποία έχουν διαφορετική προέλευση και ανήκουν στους ορότυπους 1/2a και 4b.

6.3 Υλικά και Μέθοδοι

6.3.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες καλλιέργειας

Για τη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* LQC 15257, 15258, 15259, 15261 και 15262 τα οποία είχαν απομονωθεί από δείγμα φράουλας και ανήκαν στον ορότυπο 4b (Hadjilouka και συν., 2015b), τα στελέχη LQC 15186, 15187, 15188, 15189 και 15190 τα οποία είχαν απομονωθεί από δείγμα χοίρειου κιμά και ανήκαν στον ορότυπο 4b (Andritsos και συν., 2013) και τα στελέχη LQC 15143, 15150, 15157, 15167, 15178, 15191, 15202, 15217 και 15223 τα οποία ανήκαν στον ορότυπο 1/2a και είχαν απομονωθεί όλα από διαφορετικά δείγματα χοίρειου κιμά (Andritsos και συν., 2013). Τα στελέχη αυτά βρίσκονταν υπό ψύξη στους -20 °C σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI (LABM), παρουσία γλυκερόλης 50% και πριν από τη διεξαγωγή κάθε πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιούνταν ανανέωσή τους, μέσω απόψυξης και ανακαλλιέργειάς εις διπλούν σε ζωμό BHI στους 37 °C για 24 h.

6.3.2 Συνθήκες PCR και συναρμολόγηση των αλληλεπικαλυπτόμενων κλώνων

Η απομόνωση του DNA των στελεχών διεκπεραιώθηκε μέσω συμβατικής PCR (παρ. 3.3.3.3.1) στην οποία χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη μορίων εκκινητών που είτε προτείνονται από τη βιβλιογραφία είτε σχεδιάστηκαν για τη συγκεκριμένη μελέτη (παρ. 4.3.3.1) (Πίνακας 22). Οι εκκινητές αυτοί διαίρεσαν το LIPI-1 σε 18 αλληλοεπικαλυπτόμενες περιοχές, ενώ η ενίσχυση των περιοχών αυτών κατά την PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μL στον οποίο περιέχονταν:

- Ρυθμιστικό διάλυμα (1×)
- MgCl₂ (2 mM)
- dNTPs mix (200 μM)
- Q5™ High-Fidelity DNA polymerase (NEB, Ipswich, MA) (1U)
- Primer f (1 μM)
- Primer r (1 μM)
- Δις απεσταγμένο νερό

ενώ το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο:

6. 95 °C για 2 min
 7. 95 °C για 30 sec
 8. 48 °C για 30 sec
 9. 72 °C για 1.30 min
 10. 72 °C για 7 min
- } ×35 φορές

Τέλος, η αλληλούχιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από ιδιωτική εταιρεία και η συναρμολόγηση των αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων DNA (contig assembly) έγινε με χρήση του λογισμικού GeneStudio Professional Edition (διαθέσιμο στο www.genestudio.com).

Πίνακας 22 Αλληλουχίες των μορίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων του συμπλέγματος *Listeria* Pathogenicity Island 1.

Τμήμα	Όνομα	Αλληλουχία (5'-3')
<i>prs-prfA</i>	A1F1 ¹	CAGTTCCTTTCAGGTCCGGCT
	LIP1 ²	GATACAGAAACATCGGTTGGC
<i>prfA-plcA</i>	A2F1 ¹	GACCGCAAATAGAGCCAAGC
	A2R1 ¹	CGAGCAACCTCGGAACCATA
<i>plcA</i>	A4F1 ¹	GCAGCATACTGACGAGGTGT
	A4R1 ¹	TGGATGTCCGCTCTACCTGA
<i>plcA-hly</i>	A5F1 ¹	TCGATGTACCGTATTCTCTGCT
	A5R1 ¹	TGGTGGTGCCATGGATGAAA
<i>hly</i>	hlyintF ³	GCATATAATATTGCGTTTCACT
	hlyR2 ³	GATTCAGTGAAGCCATTTTCGTC
<i>hly</i>	A7F1 ¹	CTCAGCATTGATTTGCCAGGT
	A7R1 ¹	CGCTTACGGCAGCATCAAAA
<i>hly</i>	hlyseqF1 ³	CATTGATTTGCCAGGTATGACTAA
	hlyseqR1 ³	TTTCAAAAATATCGCGTAAAGTCTCC
<i>hly</i>	hlyF2 ³	CGTAAAGCGGAAAATCTGTCTC
	hlyintR ³	CGTGTGTGTTAAGCGGTTTTT
<i>hly</i>	A8F1 ¹	TGTTCAACATAAAAACTGGAGCGA
	A8R1 ¹	TCCCCGACAGAATCTGCTTT
<i>mpl</i>	A9F1 ¹	AGGAGCGGTGAAATGAAAAGT
	A9R1 ¹	AATGAGCATCCACTGCGGAA
<i>mpl</i>	mplPCR2 ³	TGCTCCAGAGGCCACTACAT
	mplseqR4 ³	GCCCCAGTCGCCTTCC
<i>mpl-actA</i>	mplseqF4 ³	GTTCGCCGATGTTTTTGGT
	mplPCR2 ³	CATCATCGCACGCATAAAATC
<i>actA</i>	actAseq1F ³	TTAACGGAACAAATTAAGTAAAA
	actA2R ³	TGGATGACGACGCTCCACTTG
<i>actA</i>	actA3F ³	AAAGCAGACCTAATAGCAATGTTG
	actA4R ³	TTCTCAAACCTAGCTAAATC(C/T)CC
<i>actA</i>	actA5F ³	GAAGAGGTAATGCTTC(G/A)GACT
	actAseq6R ³	CTTATTTTCGATACCTTTGGACTTA
<i>actA-plcB</i>	actAseq6R ³	GCTGATTTAAGAGATAGAGGAACA
	actAseq6R ³	TTTATGTGGTAATTTGCTGTC
<i>plcB</i>	plcBPCR2 ³	AAAAAGCGAAGGAAGAACCAG
	plcBseqR ³	TTCCCTTCTCGGTAATCAGTCA
<i>plcB-orfX</i>	plcB-seq-F ³	TTGCCGGTTTTGCTAATG
	plcB-PCR-R ³	AACGCGATTACTAACAACACTACAAAAG

¹συγκεκριμένη μελέτη, ²D' Agostino και συν., 2004, ³Orsi και συν., 2008b

6.3.3 Περιγραφική ανάλυση

Η περιγραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε όλα τα στελέχη τόσο ομαδικά όσο και μεμονωμένα, ανάλογα με τον ορότυπο και την προέλευσή τους. Και στις δύο περιπτώσεις προσδιορίστηκαν ο αριθμός των διαφοροποιημένων περιοχών (number of segregating sites, S), ο αριθμός των αλληλομόρφων (number of alleles, Na), η ποικιλομορφία των απλότυπων (haplotype diversity, HD), η ποικιλομορφία των νουκλεοτιδίων (nucleotide diversity, π), ο αριθμός των σιωπηλών μεταλλάξεων (number of silent mutations, Sm), ο αριθμός των μη συνώνυμων μεταλλάξεων (number of non-synonymous mutations, NSm), ο αριθμός των προσθηκών ή ελλείψεων βάσεων (number of indels, Ti), το μέσο μήκος προσθηκών/ελλείψεων ανά περίπτωση (average indel length per event, Tl) και το ποσοστό των βάσεων γουανίνης και κυτοσίνης ($GC\%$).

Ο υπολογισμός των παραπάνω παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος DnaSP v.5.10.1 (Librado και Rozas, 2009). Το DnaSP (DNA Sequence Polymorphism) είναι ένα λογισμικό που απευθύνεται σε γενετιστές μοριακών πληθυσμών, παρέχοντάς τους τη δυνατότητα υπολογισμού διαφόρων παραμέτρων διαφοροποίησης των αλληλουχιών DNA. Οι παράμετροι αυτές υπολογίζονται εντός και μεταξύ πληθυσμών και αναφέρονται σε μη κωδικοποιητικά, συνώνυμα και μη συνώνυμα τμήματα του DNA, καθώς και σε γονιδιακές ροές, μεταστροφές γονιδίων (Betrán και συν., 1997), ανασυνδυασμό και διαταραχή ισορροπίας σύνδεσης των γόνων. Επιπλέον, το DnaSP πραγματοποιεί και τα τεστ ουδετερότητας Hudson, Kreitman και Aguadé (1987), Tajima (1989), McDonald και Kreitman (1991) και Fu και Li (1993). Το λογισμικό αυτό εκμεταλλεύεται τις δυνατότητες των Microsoft Windows, ώστε να μπορεί να χειριστεί ένα μεγάλο αριθμό αλληλουχιών χιλιάδων νουκλεοτιδίων σε υπολογιστή, ενώ ανταλλάσσει εύκολα δεδομένα και με άλλα προγράμματα, για πολλαπλές ευθυγραμμίσεις αλληλουχιών, ανάλυση φυλογενετικών δέντρων και στατιστική ανάλυση.

6.3.4 Φυλογενετική ανάλυση

Βάσει των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης των δειγμάτων επιλέχθηκε το μοντέλο αντικατάστασης DNA που περιέγραφε καλύτερα το σύνολο των δεδομένων. Το μοντέλο αυτό ταυτοποιήθηκε για κάθε γονίδιο καθώς και για το σύνολο των γονιδίων του συμπλέγματος, μέσω της μεθόδου μέγιστης πιθανοφάνειας του προγράμματος MEGA v.5.2.1 (Tamura και συν., 2011). Εν συνεχεία, κατασκευάστηκαν τα φυλογενετικά δέντρα μέγιστης πιθανοφάνειας χωρίς ρίζα. Τέλος, για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας των δεδομένων εφαρμόστηκε η μέθοδος Bootstrapping (Felsenstein, 1985) με 1000 επαναλήψεις.

Το MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή της φυλογενετικής μελέτης, αποτελεί ένα λογισμικό το οποίο αναπτύχθηκε για τη διεκπεραίωση στατιστικών αναλύσεων εξελικτικού ενδιαφέροντος των DNA και πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Το πρόγραμμα αυτό περιλαμβάνει μία σειρά ολοκληρωμένων εργαλείων για την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών, την κατασκευή και οπτικοποίηση φυλογενετικών δέντρων, τη δοκιμή εξελικτικών υποθέσεων, την εκτίμηση διαφοροποίησης αλληλουχιών, την ανάκτηση δεδομένων αλληλουχίας μέσω διαδικτύου και τη δημιουργία μίας φυσικής γλώσσας περιγραφής των μεθόδων ανάλυσης και των δεδομένων που επιλέγονται από τον εκάστοτε χρήστη (Kumar και συν., 1994, 2008· Kumar και Dudley, 2007). Με την πέμπτη έκδοση του λογισμικού, η συλλογή εργαλείων ανάλυσης του διευρύνθηκε, συμπεριλαμβάνοντας τις μεθόδους μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood, *ML*) για τις αναλύσεις μοριακής εξέλιξης.

6.3.5 Ανάλυση γενετικής επιλογής

Η ανάλυση γενετικής επιλογής στις περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, καθώς και στα τμήματα μεταξύ αυτών, πραγματοποιήθηκε μέσω των τεστ Tajima's *D* και Fu and Li's *D** and *F** με χρήση του λογισμικού DnaSP v.5.10.1.

Όσον αφορά στο τεστ Tajima, η εντολή αυτή υπολογίζει το στατιστικό αποτέλεσμα της δοκιμής *D* που έχει προταθεί από τον Tajima (1989), με σκοπό την αξιολόγηση της υπόθεσης ότι όλες οι μεταλλάξεις είναι επιλεκτικά ουδέτερες (Kimura, 1983). Η δοκιμή *D* βασίζεται στις διαφορές μεταξύ του αριθμού των διαφοροποιημένων περιοχών (segregating sites) και του μέσου αριθμού των διαφορών των νουκλεοτιδίων.

Παρομοίως, οι στατιστικές δοκιμές *D** και *F** που έχουν προταθεί από τους Fu και Li (1993) πραγματοποιούνται με στόχο την αξιολόγηση της επιλεκτικής ουδετερότητας των μεταλλάξεων (Kimura 1983). Η στατιστική δοκιμή *D** βασίζεται στις διαφορές μεταξύ των μεταλλάξεων που εμφανίζονται μόνο μία φορά μεταξύ των αλληλουχιών (singletons) και του συνολικού αριθμού μεταλλάξεων (Fu και Li, 1993), ενώ η στατιστική δοκιμή *F** βασίζεται στις διαφορές μεταξύ των μεταλλάξεων που εμφανίζονται μόνο μία φορά μεταξύ των αλληλουχιών (singletons) και του μέσου αριθμού των νουκλεοτιδικών διαφορών μεταξύ των ζευγών των αλληλουχιών (Fu και Li, 1993).

6.3.6 Ανάλυση ανασυνδυασμού

Ο ανασυνδυασμός του γενετικού υλικού αποτελεί μία θεμελιώδη βιολογική διαδικασία η οποία διαφέρει μεταξύ των οργανισμών, αλλά σε γενικές γραμμές έχει ως αποτέλεσμα τη

δημιουργία ενός μωσαϊκού αλληλουχιών των οποίων η εξελικτική ιστορία μπορεί να είναι διαφορετική (Bruen και συν., 2006).

Ένας μεγάλος αριθμός γενικών μεθόδων ανίχνευσης ανασυνδυασμού έχει αξιολογηθεί εμπειρικά και μέσω προσομοίωσης (Crandall και Templeton 1999· Brown και συν., 2001· Posada και Crandall, 2001· Wiuf και συν. 2001· Posada, 2002), καταδεικνύοντας ότι μέθοδοι όπως οι Geneconv (Sawyer, 1989), Max χ^2 (Maynard Smith, 1992), RDP (Martin και Rybicki, 2000), Phypro (Weiller, 1998), RecPars (Hein, 1990· 1993) και NSS (neighbor similarity score) (Jakobsen και Easteal, 1996) ανιχνεύουν αποτελεσματικά τον ανασυνδυασμό σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών (Brown και συν., 2001· Posada και Crandall, 2001· Wiuf και συν., 2001· Posada, 2002).

Η ανάλυση ανασυνδυασμού στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε στις περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και στα τμήματα μεταξύ αυτών, μέσω του Phi-test (Bruen και συν., 2006) με χρήση του προγράμματος SplitsTree 4 (Huson και Bryant, 2006).

Το Phi-test αποτελεί μία απλή και ισχυρή στην ανίχνευση του ανασυνδυασμού δοκιμή, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανεξάρτητα από το ιστορικό του δείγματος. Η προσέγγισή του είναι πολύ γενική και έχει ως στόχο τον απλό καθορισμό της ύπαρξης ανασυνδυασμού εντός των αλληλουχιών. Σε αντίθεση με τις άλλες γενικές δοκιμές Max χ^2 και NSS το τεστ αυτό δεν καταλήγει σε ψευδή παρουσία ανασυνδυασμού, ενώ εκτελείται και πολύ καλά ακόμη και παρουσία αύξησης του πληθυσμού. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μόνη της, είτε επικυρώνοντας την οπτική παρουσία ανασυνδυασμού μέσω προσέγγισης φυλογενετικού δικτύου, είτε ελέγχοντας ανεξάρτητα την παρουσία του ανασυνδυασμού εφόσον λαμβάνεται θετική εκτίμηση του ρυθμού ανασυνδυασμού. Τέλος, η δοκιμή αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα όταν υπάρχουν πολλές αλληλουχίες και περιοχές υπό εξέταση, λόγω της υπολογιστικής απόδοσής της, όντας μάλιστα πιο ισχυρή σε τέτοιες περιστάσεις (Bruen συν., 2006).

Το SplitsTree μέσω του οποίου εκτελέστηκε το Phi-test, είναι ένα πρόγραμμα το οποίο δημιουργεί φυλογενετικά δέντρα ή γενικότερα φυλογενετικά δίκτυα χωρίς ρίζα, από διάφορους τύπους δεδομένων όπως ευθυγραμμισμένες αλληλουχίες, μήτρες εξ' αποστάσεως ή και ένα σύνολο δέντρων. Το SplitsTree 4 αποτελεί μία βελτίωση του SplitsTree (Huson, 1998), το οποίο ήταν αρχικά μία εφαρμογή της μεθόδου διαχωρισμού αποσύνθεσης (split decomposition) (Bandelt και Dress, 1992). Η βελτίωση αυτή ενσωματώνει ένα ευρύ φάσμα μεθόδων που αφορούν τα φυλογενετικά δέντρα και δίκτυα, τα εργαλεία συμπερασματολογίας, τα βοηθητικά προγράμματα διαχείρισης δεδομένων και την επικύρωση των μεθόδων. Τέλος, ο κώδικας του προγράμματος είναι γραμμένος σε Java και ως εκ τούτου εκτελείται σε Linux, MacOS, και

Windows, γεγονός που το καθιστά εύχρηστο ανεξαρτήτως λειτουργικού συστήματος που χρησιμοποιεί ο εκάστοτε χρήστης.

6.4 Αποτελέσματα και Συζήτηση

6.4.1 Περιγραφική ανάλυση

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την περιγραφική ανάλυση του κάθε γονιδίου και των διαγονιδιακών περιοχών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 23**. Σε γενικές γραμμές παρατηρήθηκε σημαντική ποικιλομορφία σε όλο το σύμπλεγμα.

Όσον αφορά στον αριθμό των απλότυπων, τα γονίδια *hly* και *plcB* παρουσίασαν συνολικά τον υψηλότερο βαθμό διαφοροποίησης. Για τα συγκεκριμένα γονίδια, κάθε στελέχος του ορότυπου 4b παρουσίασε ένα διακριτό απλότυπο, ενώ τα στελέχη του οροτύπου 1/2a παρουσίασαν συνολικά 5 απλότυπους. Τα στελέχη 4b παρουσίασαν επίσης πλήρη διαχωρισμό απλότυπων μεταξύ των δειγμάτων φράουλας στο γονίδιο *mpl*, ενώ η μεγαλύτερη ποικιλομορφία των απομονώσεων 1/2a σημειώθηκε στα γονίδια *mpl* και *actA*, με παρουσία 6 απλότυπων για κάθε γονίδιο. Αντιθέτως, η χαμηλότερη συνολική ποικιλομορφία παρατηρήθηκε στις διαγονιδιακές περιχές *mpl-actA* και *actA-plcB* με παρουσία 2 απλότυπων, καθώς και στο γονίδιο *prfA* με 3 απλότυπους. Οι παραπάνω διαγονιδιακές περιοχές ήταν οι μόνες στις οποίες παρατηρήθηκε μόνο ένας απλότυπος για τα στελέχη 1/2a. Στην περίπτωση των στελεχών 4b, οι απομονώσεις του κρέατος εμφάνισαν ομοιογένεια στα γονίδια *prfA*, *plcA* *mpl* και στις διαγονιδιακές περιοχές *hly-mpl*, *mpl-actA* και *actA-plcB*, ενώ οι απομονώσεις από τις φράουλες παρουσίασαν ομοιομορφία στα γονίδια *prfA* και *plcA* και στις διαγονιδιακές περιοχές *plcA-prfA*, *plcA-hly*, *mpl-actA* και *actA-plcB*. Ενδιαφέρον προκαλεί ωστόσο το ότι μεταξύ των 1/2a και 4b στελεχών παρατηρήθηκαν διαφορές σε όλα γονίδια και τις διαγονιδιακές περιοχές, γεγονός που απεικονίστηκε και μέσω της παραμέτρου της ποικιλομορφίας των απλότυπων.

Όσον αφορά στον αριθμό των διαφοροποιημένων περιοχών, το γονίδιο *actA* και η διαγονιδιακή περιοχή *actA-plcB* παρουσίασαν την υψηλότερη και χαμηλότερη τιμή, αντίστοιχα. Οι υψηλότερες τιμές ήταν εμφανείς στις απομονώσεις του κρέατος 4b και 1/2a, ενώ στην περίπτωση των στελεχών φράουλας ο μεγαλύτερος αριθμός διαφοροποιημένων περιοχών παρατηρήθηκε στο γονίδιο *hly*. Όσον αφορά στα τμήματα του συμπλέγματος με τον μικρότερο αριθμό διαφοροποιημένων περιοχών, εκτός από τις διαγονιδιακές περιοχές *actA-plcB* και *mpl-actA* στις οποίες ο αριθμός αναφέρεται στο σύνολο των στελεχών, δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιημένα τμήματα στα γονίδια *prfA* και *plcA* όλων των στελεχών 4b,

στα γονίδια *mpl* και στην περιοχή *hly-mpl* των στελεχών κρέατος 4b, καθώς και στις περιοχές *plcA-prfA* και *plcA-hly* των στελεχών φράουλας 4b.

Σε ό,τι αφορά στην ποικιλομορφία νουκλεοτιδίων, όταν όλες οι απομονώσεις συμπεριληφθήκαν στην ανάλυση οι διαγονιδιακές περιοχές *plcA-prfA* και *actA-plcB* παρουσίασαν της χαμηλότερες και υψηλότερες τιμές, αντίστοιχα. Ωστόσο, σε καμία από αυτές τις περιοχές δεν παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα όταν αναλύθηκαν ξεχωριστά οι απομονώσεις. Ακριβέστερα, τα στελέχη 1/2a παρουσίασαν την υψηλότερη ποικιλομορφία στο γονίδιο *actA* και τη χαμηλότερη στις διαγονιδιακές περιοχές *mpl-actA* και *actA-plcB*. Όλες οι απομονώσεις 4b παρουσίασαν μηδενική ποικιλομορφία στα γονίδια *prfA* και *plcA*, καθώς και στις διαγονιδιακές περιοχές *mpl-actA* και *actA-plcB*. Επιπλέον, τα γονίδια *mpl* και η περιοχή *hly-mpl* των στελεχών κρέατος 4b, καθώς και οι διαγονιδιακές περιοχές *plcA-prfA* και *plcA-hly* των στελεχών φράουλας 4b παρουσίασαν μηδενική νουκλεοτιδική ποικιλομορφία. Αντίθετα, οι υψηλότερες τιμές των στελεχών 4b κρέατος και φράουλας σημειώθηκαν στο γονίδιο *actA*.

Οι συνώνυμες και μη συνώνυμες αντικαταστάσεις αξιολογήθηκαν μόνο στις περιοχές κωδικοποίησης σύμφωνα με τους Nei και Gojobori (1986). Γενικά, όταν η αναλογία των διαφορών είναι ίση ή μεγαλύτερη του 0.75, η διόρθωση Jukes και Cantor δεν μπορεί να υπολογιστεί και ως εκ τούτου ο αριθμός των μεταλλάξεων είναι μη υπολογίσιμος. Αυτό έγινε στην περίπτωση των γονιδίων *plcB*, *hly* και *actA*, δεδομένου ότι ο αριθμός των μεταλλάξεων στα στελέχη 1/2a, 4b από φράουλες και 1/2a και 4b από κρέας δεν μπορούσε να υπολογιστεί, αντίστοιχα για κάθε γονίδιο. Όσον αφορά στα γονίδια *prfA*, *plcA* και *mpl* δεν παρατηρήθηκε καμία μετάλλαξη στα στελέχη 4b, με εξαίρεση την περίπτωση των στελεχών φράουλας στο γονίδιο *mpl*. Αντίθετα από τις απομονώσεις του ορότυπου 4b, οι απομονώσεις του ορότυπου 1/2a παρουσίασαν μη συνώνυμες μεταλλάξεις στο *prfA* και σιωπηλές και μη σιωπηλές μεταλλάξεις στα γονίδια *plcA* και *mpl*.

Προσθήκη ή έλλειψη βάσεων ανιχνεύθηκε σε όλες τις υπό μελέτη περιοχές, εκτός από τη διαγονιδιακή περιοχή *actA-plcB*. Σε γενικές γραμμές, στις απομονώσεις 4b παρατηρήθηκαν λιγότερα γεγονότα προσθήκων-ελλείψεων συγκριτικά με αυτά που πραγματοποιήθηκαν στα στελέχη 1/2a. Επιπλέον, τα στελέχη 4b που είχαν απομονωθεί από φράουλες παρουσίασαν λιγότερες προσθήκες-ελλείψεις από τα στελέχη 4b που προέρχονταν από κρέας. Το μέσο μήκος των γεγονότων αυτών ανά περίπτωση κυμάνθηκε μεταξύ 1 και 2.33, με εξαίρεση τις διαγονιδιακές περιοχές *hly-mpl* των στελεχών φράουλας και του γονιδίου *actA* των στελεχών κρέατος 4b. Είναι ενδιαφέρον ωστόσο το γεγονός ότι στην πρώτη περίπτωση οι προσθήκες-ελλείψεις διανεμήθηκαν μεταξύ των απομονώσεων, ενώ στη δεύτερη περίπτωση παρουσιάστηκαν ως επί το πλείστον σε μια απομόνωση.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν σε αυτή τη μελέτη επαλήθευσαν μερικώς αυτά που παρουσιάστηκαν από τους Orsi και συν. (2008b). Στη μελέτη των Orsi και συν., στην οποία μόνο οι κωδικοποιούσες περιοχές συμπεριλήφθηκαν στην περιγραφική ανάλυση, τα γονίδια *actA* και *prfA* ήταν τα περισσότερο και λιγότερο ποικιλόμορφα γονίδια, αντίστοιχα, όταν οι απομονώσεις αξιολογήθηκαν ως ομάδα. Όταν οι απομονώσεις αξιολογήθηκαν σύμφωνα με ορότυπό τους, το *actA* ήταν το γονίδιο με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία και στους δύο οροτύπους, ενώ τη μικρότερη ποικιλομορφία παρουσίασαν τα *plcB* και *hly* στις απομονώσεις 4b και το *prfA* στις απομονώσεις 1/2a.

Στην παρούσα μελέτη, λαμβάνοντας υπόψη μόνο τις κωδικοποιούσες περιοχές, το *actA* ήταν το πιο ποικιλόμορφο γονίδιο σε όλες τις περιπτώσεις, με εξαίρεση τα στελέχη 4b της φράουλας στα οποία τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία την παρουσίασε το γονίδιο *hly*, βάσει των διαφοροποιημένων περιοχών (segregating sites). Επιπλέον, το *prfA* ήταν μεταξύ των γονιδίων με τη μικρότερη ποικιλομορφία, καθώς τα γονίδια *prfA*, *plcA* και *mpl* στα στελέχη 4b από κρέας και τα γονίδια *prfA* και *plcA* στα στελέχη 4b από φράουλα ήταν τα λιγότερο ποικιλόμορφα, με μόνη εξαίρεση τα στελέχη 1/2a, στα οποία η μικρότερη ποικιλομορφία παρουσιάστηκε στο γονίδιο *mpl*. Αντίθετα από τα παραπάνω αποτελέσματα, οι den Bakker και συν. (2008) ανέφεραν ότι μεταξύ των γονιδίων *actA*, *gap*, *inlA*, *prs*, *purM*, *ribC* και *sigB*, το γονίδιο *actA* δεν ήταν το πιο ποικιλόμορφο γονίδιο σε σχέση με τον μέσο όρο νουκλεοτιδικών διαφορών μεταξύ ζευγών ανά περιοχή και αλληλουχία. Επιπλέον, οι Nelson και συν. (2004) ανέφεραν ότι η ακολουθία του γονιδίου *prfA* ήταν πλήρως διατηρημένη μεταξύ των τριών στελεχών που μελετήθηκαν, ενώ σε MLVST μελέτη του ίδιου γονιδίου μαζί με διάφορα άλλα γονίδια όπως τα *inlB*, *dal*, *lisR*, *inlC* και *clpP* (Zhang και συν., 2004), το *prfA* δεν ήταν αυτό που παρουσίασε τη μικρότερη ποικιλομορφία (Haley και συν., 2015; Miya και συν., 2015).

Όσον αφορά στο 'PrfA-box' (παρ. 2.2.2), οι αλληλουχίες εξετάστηκαν για αποκλίσεις από την κοινή παλινδρομική αλληλουχία TTAACANNTGTTAA (Marr και συν., 2006) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 24**. Όλες οι αλληλουχίες ήταν ταυτόσημες σε αυτή την περιοχή και σε ορισμένες περιπτώσεις οι αποκλίσεις από την κοινή αλληλουχία ταυτοποιήθηκαν. Ακριβέστερα, οι διαφορές σε 3, 1 και 1 νουκλεοτίδια ανιχνεύθηκαν στα P2*prfA*, P*mpl* και P*actA*, αντίστοιχα. Αυτές οι αποκλίσεις έχουν επίσης αναφερθεί από τους Freitag και συν. (1993), Megnaud και συν. (1989) και Vazquez-Boland και συν. (1992), αντίστοιχα.

Πίνακας 23 Περιγραφική ανάλυση του συμπλέγματος γονιδίων LIP1-1 των υπό μελέτη στελεχών

	Αριθμός στελεχών	Μήκος αλληλουχιών (bp)	Na	S	Hd	π	Sm	NSm	Ti	Tl	GC%
<i>prfA</i>											
Σύνολο στελεχών	19	716	3	18	0.573	0.01316	0	18	5	1.66	33.30
1/2a κρέας	9	716	2	10	0.222	0.00313	0	10	5	1.66	33.41
4b κρέας	5	711	1	0	0	0	0	0	0	0	33.19
4b φράουλα	5	711	1	0	0	0	0	0	0	0	33.19
διαγονιδιακή περιοχή <i>plcA-prfA</i>											
Σύνολο στελεχών	19	273	4	5	0.626	0.00663	n.a.	n.a.	2	1	29.43
1/2a κρέας	9	270	2	1	0.222	0.00082	n.a.	n.a.	0	0	29.67
4b κρέας	5	272	2	1	0.4	0.00147	n.a.	n.a.	0	0	28.97
4b φράουλα	5	272	1	0	0	0	n.a.	n.a.	0	0	29.04
<i>plcA</i>											
Σύνολο στελεχών	19	955	7	41	0.842	0.01706	23	18	2	1	35.65
1/2a κρέας	9	955	5	22	0.806	0.0102	11	11	2	1	35.51
4b κρέας	5	954	1	0	0	0	0	0	0	0	35.85
4b φράουλα	5	954	1	0	0	0	0	0	0	0	35.85
διαγονιδιακή περιοχή <i>plcA-hly</i>											
Σύνολο στελεχών	19	248	7	12	0.842	0.01737	n.a.	n.a.	7	2.33	35.20
1/2a κρέας	9	248	4	7	0.694	0.00761	n.a.	n.a.	7	2.33	35.32
4b κρέας	5	242	2	1	0.4	0.00165	n.a.	n.a.	0	0	35.21
4b φράουλα	5	242	1	0	0	0	n.a.	n.a.	0	0	34.71

Πίνακας 23 (συνέχεια)

	Αριθμός στελεχών	Μήκος αλληλουχιών (bp)	Na	S	Hd	π	Sm	NSm	Ti	Tl	GC%
<i>hly</i>											
Σύνολο στελεχών	19	1600	15	83	0.959	0.01421	n.c.	n.c.	17	1.23	35.93
1/2a κρέας	9	1597	5	18	0.806	0.00409	2	16	8	1.12	35.89
4b κρέας	5	1593	5	34	1	0.01058	16	16	6	1.16	35.83
4b φράουλα	5	1591	5	68	1	0.01918	n.c.	n.c.	4	1.50	35.90
<i>διαγονιδιακή περιοχή hly-mpl</i>											
Σύνολο στελεχών	19	341	6	19	0.713	0.02371	n.a	n.a.	12	3	28.49
1/2a κρέας	9	330	1	1	0.222	0.00067	n.a.	n.a.	0	0	28.82
4b κρέας	5	334	1	0	0	0	n.a.	n.a.	0	0	28.14
4b φράουλα	5	341	4	18	0.9	0.02703	n.a.	n.a.	8	4.66	28.35
<i>mpl</i>											
Σύνολο στελεχών	19	1540	12	82	0.918	0.02541	6	73	8	1.25	38.32
1/2a κρέας	9	1534	6	6	0.889	0.00163	2	4	1	1	38.47
4b κρέας	5	1536	1	0	0	0	0	0	3	1	38.10
4b φράουλα	5	1538	5	12	1	0.00313	2	9	3	1.66	38.19
<i>διαγονιδιακή περιοχή mpl-actA</i>											
Σύνολο στελεχών	19	199	2	7	0.526	0.01861	n.a.	n.a.	1	1	27.27
1/2a κρέας	9	198	1	0	0	0	n.a.	n.a.	0	0	27.27
4b κρέας	5	199	1	0	0	0	n.a.	n.a.	0	0	27.14
4b φράουλα	5	199	1	0	0	0	n.a.	n.a.	0	0	27.14

Πίνακας 23 (συνέχεια)

	Αριθμός στελεχών	Μήκος αλληλουχιών (bp)	Na	S	Hd	π	Sm	NSm	Ti	Tl	GC%
<i>actA</i>											
Σύνολο στελεχών	19	1927	12	145	0.947	0.03465	n.c.	n.c.	5	1	40.25
1/2a κρέας	9	1927	6	62	0.889	0.01269	n.c.	n.c.	3	1	40.09
4b κρέας	5	1921	3	110	0.7	0.02347	n.c.	n.c.	12	3.83	40.76
4b φράουλα	5	1920	4	20	0.9	0.0427	11	9	1	1	40.46
διαγονιδιακή περιοχή <i>actA-plcB</i>											
Σύνολο στελεχών	19	35	2	4	0.526	0.06015	n.a.	n.a.	0	0	37.29
1/2a κρέας	9	35	1	0	0	0	n.a.	n.a.	0	0	34.29
4b κρέας	5	35	1	0	0	0	n.a.	n.a.	0	0	40.00
4b φράουλα	5	35	1	0	0	0	n.a.	n.a.	0	0	40.00
<i>plcB</i>											
Σύνολο στελεχών	19	881	15	50	0.959	0.02415	n.c.	n.c.	8	1.87	35.65
1/2a κρέας	9	877	5	9	0.806	0.003	n.c.	n.c.	5	2.2	35.58
4b κρέας	5	874	5	29	1	0.01494	11	17	3	1.33	36.02
4b φράουλα	5	873	5	11	1	0.00552	6	5	3	1	36.14

Na: αριθμός αλληληλόμορφων γονιδίων S: αριθμός διαφοροποιημένων περιοχών Hd: ποικιλομορφία αποτύπων π: ποικιλομορφία νουκλεοτιδίων (ανά περιοχή) Sm: αριθμός συνώνυμων μεταλλάξεων NSm: αριθμός μη συνώνυμων μεταλλάξεων Ti: συνολικός αριθμός προσθηκών ή ελλείψεων βάσεων Tl: μέσο μήκος προσθηκών ή ελλείψεων ανά περίπτωση
n.a.: μη εφαρμόσιμο (στην περίπτωση των διαγονιδιακών περιοχών)
n.c.: μη υπολογίσιμο. Όταν η αναλογία των διαφορών είναι ίση ή μεγαλύτερη του 0.75, η διόρθωση Jukes και Cantor δεν μπορεί να υπολογιστεί

Πίνακας 24 Αποκλίσεις από την κοινή παλινδρομική αλληλουχία του PrfA-box.

Εκκινητής	PrfA-box ^a	Μήκος τμήματος (bp)	-10 box
P2prfA	<u>CTAACAATTGTTGT</u>	21	TATTTT
PplcA	<u>TTAACAAATGTTAA</u>	22	TAAGAT
P1hly	<u>TTAACATTTGTTAA</u>	23	TAGAAT
Pmpl	<u>TTAACAAATGTAAA</u>	22	TATAAT
PactA	<u>TTAACAAATGTTAG</u>	21	GATATT

^a Τα υπογραμμισμένα νουκλεοτίδια είναι τα στοιχεία της κοινής αλληλουχίας TTAACANNTGTTAA

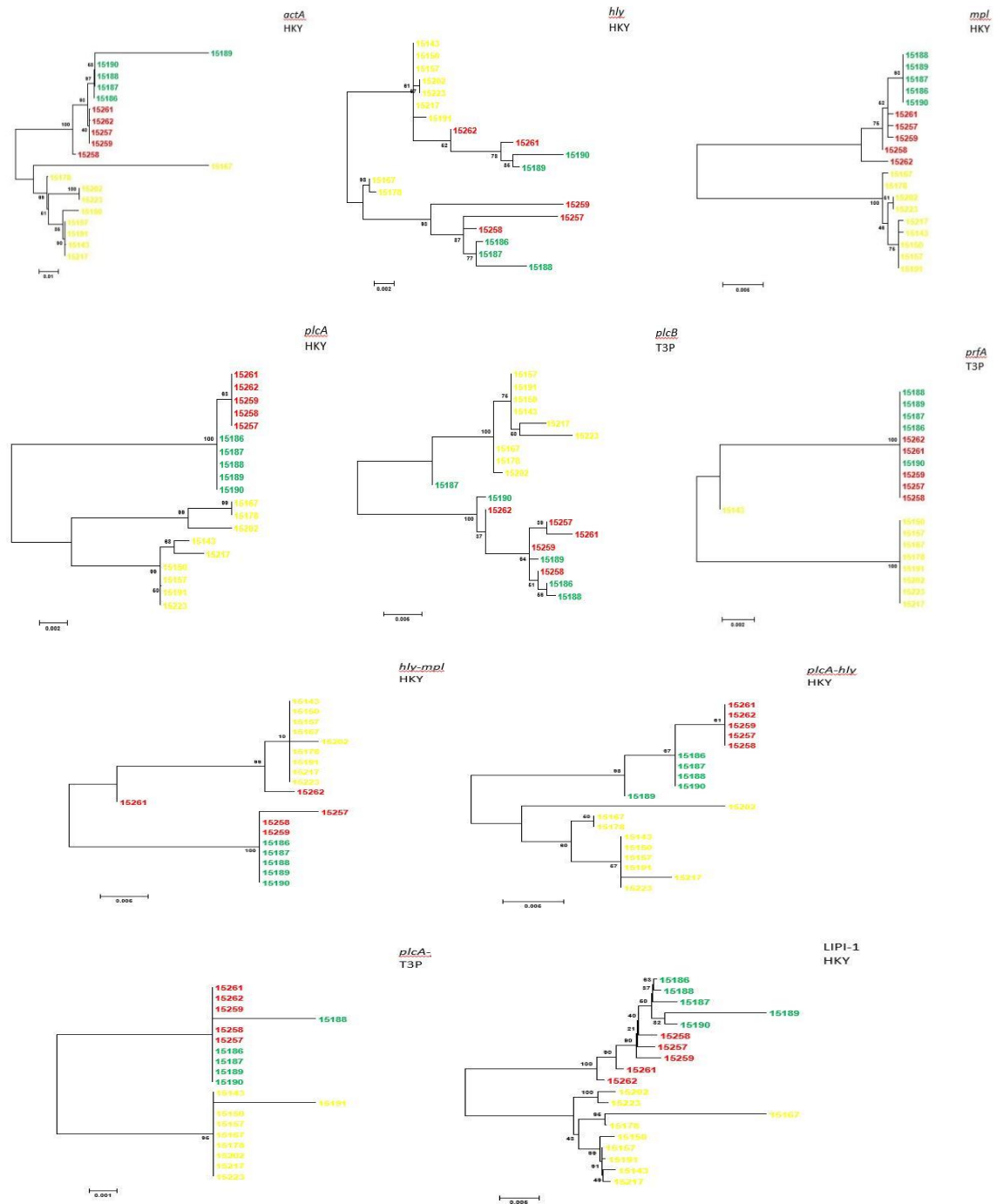
6.4.2 Φυλογενετική ανάλυση

Το μοντέλο αντικατάστασης που περιέγραψε καλύτερα τα γονίδια του LIPI-1 ως σύνολο, αλλά και τα γονίδια *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* και τις διαγονιδιακές περιοχές *hly-mpl* και *plcA-hly* ήταν μοντέλο το Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (Hasegawa και συν., 1985). Αντιθέτως, το μοντέλο Tamura τριών παραμέτρων (Tamura και συν., 2011) περιέγραψε καλύτερα τα γονίδια *prfA*, *plcB* και τη διαγονιδιακή περιοχή *plcA-prfA*.

Στην **Εικόνα 23** παρουσιάζεται η φυλογενετική θέση των υπό μελέτη στελεχών σύμφωνα με το σύμπλεγμα των γονιδίων και το μοντέλο υποκατάστασης. Οι διαγονιδιακές περιοχές *mpl-actA* και *actA-plcB* δεν παρουσίασαν ποικιλομορφία και ως εκ τούτου δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση. Αποτελεσματική ωστόσο ήταν η διαφοροποίηση μεταξύ των οροτύπων που παρατηρήθηκε από ολόκληρο το LIPI-1, τα γονίδια *plcA*, *plcB*, *mpl*, *actA* και τις διαγονιδιακές περιοχές *plcA-prfA* και *plcA-hly*. Επιπλέον σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από τα *plcB* και *plcA-hly*, τα στελέχη του ορότυπου 4b διαφοροποιήθηκαν και ανάλογα με την πηγή απομόνωσής τους. Αντιθέτως, τα γονίδια *prfA*, *hly* και η διαγονιδιακή περιοχή *hly-mpl* απέτυχαν στο να διαφοροποιήσουν τους ορότυπους. Στην περίπτωση του *hly* πολλά στελέχη απέτυχαν να ομαδοποιηθούν και στους αντίστοιχούς τους οροτύπους, ενώ στις άλλες δύο περιπτώσεις η πλήρης διαφοροποίηση δεν επιτεύχθηκε λόγω του στελέχους 15143 για το *prfA* και των στελεχών 15261 και 15262 για την περιοχή *hly-mpl*.

Τα γονίδια *prfA* και *hly* έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως γονίδια στόχοι για την αποτελεσματική ανίχνευση του παθογόνου (Jofre και συν., 2005· Germini και συν., 2009· Wang και συν., 2004). Επιπλέον, το *hly* έχει χρησιμοποιηθεί μαζί με το γονίδιο 16S-rRNA για την ακριβή καταχώρηση ειδών (Soni και Dubey, 2014). Αντίθετα από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης σχετικά με τα γονίδια *prfA* και *hly*, οι Ward και συν. (2004) ανέφεραν ότι τα δένδρογράμματα που προέκυψαν από κάθε ένα από τα γονίδια που υπάρχουν στο LIPI-1 μπόρεσαν να διαχωρίσουν τα υπό μελέτη στελέχη σύμφωνα με την προέλευσή τους. Επιπλέον, τα γονίδια *prfA*, *plcA*, *mpl*, *actA* και *plcB* απεικόνισαν την εγγύτητα των εξελικτικών καταγωγών (lineages) I και III, καθώς και την απόστασή τους από την εξελικτική καταγωγή II.

Αποτελεσματική ομαδοποίηση που αντιστοιχούσε με την καταγωγή και την ταξινόμηση των οροτύπων των υπό μελέτη απομονώσεων αναφέρθηκε επίσης και από τους Orsi και συν. (2008b), έπειτα από μελέτη του συμπλέγματος γονιδίων ως σύνολο.



Εικόνα 23 Φυλογενετική θέση των υπό μελέτη στελεχών (4b φράουλα, κόκκινο· 4b κρέας, πράσινο· 1/2a κρέας, κίτρινο βάσει της περιοχής του γονδιακού συμπλέγματος και το μοντέλο αντικατάστασης, το οποίο σημειώνεται στην πάνω-δεξιά γωνία του κάθε δενδρογράμματος (HKY: Hasegawa-Kishino-Yano· T3P: Tamura 3 parameter).

Το Phi-test που πραγματοποιήθηκε δεν απέδωσε καμία στατιστικώς σημαντική ένδειξη ανασυνδυασμού. Το αποτέλεσμα αυτό αντιτίθεται σε ό,τι αναφέρθηκε από τους Orsi και συν. (2008b) και den Bakker και συν (2008). Στην πρώτη μελέτη ανιχνεύθηκαν γεγονότα ανασυνδυασμού στις περιοχές κωδικοποίησης των γονιδίων *actA* και *plcA*, καθώς και στη διαγονιδιακή περιοχή *hly-plcA*, ενώ στη δεύτερη μελέτη αναφέρθηκε ο αρκετά συχνός ανασυνδυασμός του γονιδίου *actA*. Αυτές οι διαφορές μπορεί πιθανώς να βασίζονται στο αλγόριθμο που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των γεγονότων ανασυνδυασμού και στην υποκείμενη αρχή. Το Phi-test που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη βασίζεται στην αρχή της ασυμβατότητας (principle of incompatibility) και έτσι τείνει να είναι πιο ισχυρό από αυτά που βασίζονται στην ομαδοποίηση πολυμορφισμών, όπως στην περίπτωση της δοκιμής του Sawyer (Wiuf και συν., 2001). Αυτό τονίστηκε επίσης από τους Orsi και συν. (2008a), στη μελέτη κατά την οποία οι διαφορετικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση ανασυνδυασμού τεσσάρων στελεχών *L. monocytogenes* και ενός στελέχους *L. innocua* κατέληξαν σε διαφορετικά αποτελέσματα, τουλάχιστον όσον αφορά στον αριθμό των ορθόλογων γονιδίων στον οποίο υποδεικνύονταν σημαντικές ενδείξεις ανασυνδυασμού.

6.4.3 Ανάλυση γενετικής επιλογής

Η ανάλυση γενετικής επιλογής διεξήχθη με τις στατιστικές δοκιμές Tajima's D και Fu & Li's D* και F*. Οι δοκιμές αυτές βασίζονται στο φάσμα συχνοτήτων των μεταλλάξεων και η χρήση τους συνιστάται όταν τα επίπεδα ανασυνδυασμού είναι άγνωστα (Ramirez-Soriano και συν., 2008), όπως στην περίπτωση της παρούσας μελέτης, κυρίως λόγω των προαναφερθέντων διαφορών με την αντίστοιχη βιβλιογραφία. Οι δοκιμές Fu & Li's D* και F* είναι πιο ευαίσθητες στις μεταλλάξεις που εμφανίζονται μόνο μία φορά μεταξύ των αλληλουχιών (singletons) και, ως εκ τούτου, μπορεί να αποτελούν καλύτερη ένδειξη της επιλεκτικής σάρωσης συγκριτικά με το Tajima's D τεστ.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω τεστ κατέδειξαν ότι το γονιδιωματικό σύμπλεγμα αποτελούνταν από τυχαία εξελισσόμενο DNA, με εξαίρεση το *prfA* των απομονώσεων 1/2a και το *actA* των απομονώσεων 4b από κρέας. Σε αυτές τις περιπτώσεις λήφθηκαν στατιστικώς σημαντικά δεδομένα που υποδείκνυαν την αμιγή επιλογή ή επέκταση πληθυσμού. Ακριβέστερα, οι δείκτες Fu & Li's D*, F* και Tajima's D που υπολογίστηκαν ήταν -2.087 (P<0.02), -2.266 (P<0.05) και -1.843 (P<0.05) για το *prfA* των στελεχών 1/2a και -1.267 (P<0.02), -1.378 (P<0.02) και -1.267 (P<0.1) για το *actA* των στελεχών 4b από κρέας, αντίστοιχα. Οι Orsi και συν. (2008b) ανέφεραν ενδείξεις για θετική επιλογή στα γονίδια *actA* and *plcA* εντός της εξελικτικής καταγωγής II και στο γονίδιο *mpl* εντός της εξελικτικής

καταγωγής I. Επιπλέον, η ποικιλομορφία των νουκλεοτιδίων μεταξύ μη συνώνυμων και συνώνυμων περιοχών ήταν υψηλότερη για τα γονίδια *actA* και *plcA*, γεγονός από το οποίο προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα γονίδια αυτά μπορεί να έχουν εξελιχθεί πιο γρήγορα από ότι άλλα γονίδια παθογονικότητας εντός της εξελικτικής καταγωγής II. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Τα γονίδια για τα οποία υποδείχθηκε αμιγής επιλογή ή επέκταση πληθυσμού, δεν παρουσίασαν τη μεγαλύτερη νουκλεοτιδική ποικιλομορφία (Πίνακας 23).

6.5 Συμπεράσματα

Η μελέτη παρουσιάζει μια εικόνα για την ποικιλομορφία και την εξέλιξη του γονιδιωματικού συμπλέγματος LIPI-1. Το γονίδιο *actA* των απομονώσεων 1/2a και 4b από φράουλες εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία. Αντιθέτως, η χαμηλότερη ποικιλομορφία παρατηρήθηκε στα γονίδια *prfA* και *plcA* των στελεχών 4b και στο γονίδιο *mpl* των στελεχών 1/2a. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα γονίδια *plcA*, *plcB*, *mpl*, *actA* και οι διαγονιδιακές περιοχές *plcA-prfA* και *plcA-hly* θα μπορούσαν να προσφέρουν αποτελεσματική διάκριση μεταξύ των οροτύπων. Η ανάλυση γενετικής επιλογής έναντι της ανάλυσης ανασυνδυασμού φάνηκε να παίζει σημαντικό ρόλο στη μελέτη της εξέλιξης αυτού του γονιδιωματικού συμπλέγματος, αλλά μόνο στην περίπτωση του γονιδίου *prfA* των απομονώσεων 1/2a και του γονιδίου *actA* των απομονώσεων 4b από κρέας, για τα οποία υποδείχθηκε αμιγής επιλογή ή επέκταση του πληθυσμού. Ωστόσο, ειδικά όσον αφορά στο τελευταίο, περαιτέρω μελέτη εξακολουθεί να είναι αναγκαία προκειμένου να αποσαφηνιστεί η συμβολή αυτών των μηχανισμών στην εξέλιξη της *L. monocytogenes*.

**7 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7- ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ
ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ**

7.1 Εισαγωγή

Η πέψη αποτελεί το σύνολο των μηχανικών και χημικών διεργασιών που υφίστανται οι θρεπτικές ύλες μέσα στο πεπτικό σύστημα, ώστε να μετατρέπονται σε ουσίες που να μπορούν να αξιοποιηθούν από τον οργανισμό. Το πεπτικό σύστημα του ανθρώπου περιλαμβάνει το στόμα, το φάρυγγα, τον οισοφάγο, το στομάχι, το λεπτό έντερο, το παχύ έντερο και τον πρωκτό, ενώ το πάγκρεας, οι σιελογόνοι αδένες και το χολυδοφόρο σύστημα (ήπαρ και χολυδόχος κύστη) αποτελούν όργανα εκτός του πεπτικού σωλήνα απαραίτητα για την πέψη.

Το στομάχι αποτελεί μία διαπλάτυνση του γαστρεντερικού σωλήνα η οποία έχει την ικανότητα να κάνει δραστικές περισταλτικές κινήσεις καθώς και να αυξάνει τη χωρητικότητά της, λόγω των στρωματοποιημένων μυϊκών ινών της που προσανατολίζονται σε διαφορετικές κατευθύνσεις. Με βάση τις ανατομικές, ιστολογικές και λειτουργικές διαφορές των περιοχών του, ο στόμαχος χωρίζεται σε τρία τμήματα: τον πυθμένα, το σώμα και το άντρο. Στο εσωτερικό του, πέραν των κυττάρων που εκκρίνουν βλέννα και καλύπτουν ολόκληρη την εσωτερική του επιφάνεια για προστασία του από τα πεπτικά υγρά, ο γαστρικός βλεννογόνος διαιρείται σε δύο χαρακτηριστικές περιοχές. Η πρώτη περιοχή είναι ο οξινογόνος βλεννογόνος, ο οποίος καλύπτει το σώμα και τον πυθμένα του στομάχου και περιέχει τους οξινογόνους ή οξινικούς ή γαστρικούς αδένες και η δεύτερη περιοχή είναι αυτή των πυλωρικών αδένων που βρίσκεται στο πυλωρικό άντρο του στομάχου. Οι οξινογόνοι αδένες αποτελούνται από τρεις διαφορετικούς τύπους εκκριτικών κυττάρων: τα λαγηνοειδή βλεννογόνια κύτταρα (mucus neck cells), τα πεπτικά ή κύρια ή θεμέλια κύτταρα (chief cells) και τα καλυπτήρια ή οξυντικά ή οξινογόνα κύτταρα (parietal cells). Τα καλυπτήρια κύτταρα εκκρίνουν υδροχλωρικό οξύ (HCl) και ενδογενή παράγοντα, ο οποίος είναι απαραίτητος για την απορρόφηση της βιταμίνης B₁₂. Τα πεπτικά κύτταρα εκκρίνουν το πρόδρομο ενζυμικό μόριο πεψινογόνο, το οποίο μετατρέπόμενο στην ενεργή μορφή του (πεψίνη) είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση (πέψη) των πρωτεϊνών. Τέλος, τα λαγηνοειδή βλεννογόνια κύτταρα εκκρίνουν λίγο πεψινογόνο και κυρίως υδαρή βλέννα, η οποία δρα σαν ένας προστατευτικός φραγμός ενάντια στις διάφορες μορφές πιθανών βλαβών στο γαστρικό βλεννογόνο. Σε αντίθεση με τον οξινογόνο βλεννογόνο, στην πυλωρική περιοχή εκκρίνεται βλέννα και μία μικρή ποσότητα πεψινογόνου χωρίς όμως παραγωγή οξέος. Ωστόσο η περιοχή αυτή είναι πολύ σημαντική για τη πέψη, καθώς πέραν της βλέννας εκκρίνεται η ορμόνη γαστρίνη στο αίμα. Με την ελευθέρωση της ορμόνης αυτής στο αίμα, προκαλείται έκκριση του γαστρικού υγρού. Το γαστρικό υγρό είναι άχρωμο, διαυγές με pH που κυμαίνεται από 1-3 και εκτός από υδροχλωρικό οξύ, ενδογενή παράγοντα, βλέννα και

πεψίνες, περιέχει και νερό, χλωριούχα (Na, K, Ca) και φωσφορικά (Ca, Mg, Fe) άλατα, καθώς και μία πληθώρα ενζύμων όπως η ρεννίνη και η πεψίνη B₅.

Ο στόμαχος λειτουργεί ως εναποθηκευτικό όργανο τροφής, η οποία έπειτα από το πέρασμά της από αυτόν απελευθερώνεται αργά μέσω του σφιγκτήρα του πυλωρού στο δωδεκαδάκτυλο του λεπτού εντέρου. Εκεί, το γαστρικό περιεχόμενο αναμιγνύεται όχι μόνο με τα υγρά που εκκρίνονται από το βλεννογόνο του, αλλά επίσης και με τις εκκρίσεις του εξωκρινούς παγκρέατος και του ήπατος οι οποίες κενώνονται στον αυλό του δωδεκαδακτύλου. Η εξωκρινής έκκριση του παγκρέατος στο δωδεκαδάκτυλο περιέχει διατανθρακικά ιόντα (HCO₃⁻) τα οποία εξουδετερώνουν το γαστρικό οξύ, καθώς και ένα εύρος διαφόρων πεπτικών ενζύμων που σχεδόν ολοκληρώνουν την πέψη. Τα τρία κύρια πρωτεολυτικά ένζυμα που εκκρίνονται από το πάγκρεας είναι το θρυψινογόνο, το χυμοθρυψινογόνο και η προκαρβοξυπεπτιδάση (ανενεργός μορφή), τα οποία στην ενεργό τους μορφή (θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και καρβοξυπεπτιδάση) παράγουν ελεύθερα αμινοξέα ή διπεπτίδια υδρολύοντας τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών της τροφής. Παράλληλα, το ήπαρ εκκρίνει τη χολή η οποία αποθηκεύεται και συμπυκνώνεται στη χοληδόχο κύστη, το όργανο μέσω του οποίου η συμπυκνωμένη χολή καταλήγει στο δωδεκαδάκτυλο. Παρόλο που η χολή δεν περιέχει πεπτικά ένζυμα, είναι σημαντική για την πέψη και την απορρόφηση των λιπών, κυρίως λόγω της ενεργότητας των χολικών αλάτων.

Το λεπτό έντερο αποτελεί το επιμηκότερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα και είναι το σημείο στο οποίο διεξάγεται το μεγαλύτερο μέρος της πέψης και της απορρόφησης. Χωρίζεται στο δωδεκαδάκτυλο (20cm), τη νηστίδα (2.5m) και τον ειλέο (3.6m) και η εσωτερική του επιφάνεια καλύπτεται από επιθηλιακά κύτταρα που αποτελούν το βλεννογόνο του εντέρου (intestinal mucosa). Τα επιθηλιακά αυτά κύτταρα σχηματίζουν πτυχώσεις με ένα τεράστιο αριθμό νηματοειδών προεξοχών, τις λάχνες (villi). Οι εξωκρινείς αδένες που βρίσκονται στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου εκκρίνουν το εντερικό υγρό (succus entericus), ένα υδατικό διάλυμα αλάτων και βλέννας στο οποίο δεν περιέχονται πεπτικά ένζυμα. Αν και το λεπτό έντερο συνθέτει πεπτικά ένζυμα, αυτά δεν εκκρίνονται αλλά εντοπίζονται ενδοκυττάρια και στις άκρες των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. Σε γενικές γραμμές η ρύθμιση των εκκρίσεων του λεπτού εντέρου δεν είναι πλήρως κατανοητή, ωστόσο το εντερικό υγρό βοηθάει στην ενζυμική πέψη των τροφικών συστατικών μέσω της υδρόλυσης των μακροθρεπτικών συστατικών σε απλούστερα απορροφήσιμα συστατικά, ενώ η βλέννα παρέχει προστασία και δρα ως λιπαντικό (Κωλέττας, 2010).

Κατά τη διέλευση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στη γαστρεντερική οδό, ο παθογόνος αντιμετωπίζει συνθήκες χαμηλού pH τόσο στο στομάχι, όσο και στο δωδεκαδάκτυλο. Στους ανθρώπους, το χαμηλό pH του στομάχου αποτελεί ένα σημαντικό

φραγμό κατά της λοίμωξης του βακτηρίου *L. monocytogenes* και για το λόγο αυτό ασθενείς που λαμβάνουν φαρμακευτική αγωγή που μειώνει το γαστρικό οξύ (συμπεριλαμβανομένων και των αναστολέων αντλίας πρωτονίων [proton pump inhibitors, PPIs]), διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να νοσήσουν με λιστερίωση (Bavishi και Dupont, 2011). Οι αναστολείς αντλίας πρωτονίων (PPIs) οδηγούν σε καταστολή της έκκρισης του HCL από τα γαστρικά κύτταρα και κατά συνέπεια σε αύξηση της τιμής του pH. Επιπλέον, καταστάσεις όπως αυτές της γαστρικής ατροφίας η οποία συνοδεύεται με μικρότερο αριθμό γαστρικών κυττάρων και πιθανώς με υψηλότερες τιμές pH, μπορεί να οδηγούν σε ευαισθησία του ανθρώπινου οργανισμού σε τροφικές λοιμώξεις. Ωστόσο ακόμα και υπό τις φυσιολογικές συνθήκες χαμηλού pH στον στόμαχο, ο παθογόνος έχει την ικανότητα να διατηρεί την ομοιόστασή του μέσω μίας σειράς συστημάτων που ρυθμίζουν το ενδοκυτταρικό του pH κατά την έκθεσή του σε όξινα περιβάλλοντα (Ryan και συν., 2008· Smith και συν., 2013).

Το πιο σημαντικό σύστημα που καθιστά τον παθογόνο ικανό να διατηρεί την ομοιόσταση του pH του όταν εκτίθεται σε όξινα περιβάλλοντα, είναι το σύστημα αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (glutamate decarboxylase system, GAD). Η έκφραση των γονιδίων του συστήματος αυτού αποτελεί ιδιαίτερης σημασίας για την επιβίωση του παθογόνου υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης και, ως εκ τούτου, το συγκεκριμένο σύστημα αποτελεί σημαντικό παράγοντα που επιτρέπει τη γαστρική διέλευση του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια της τροφιμογενούς μετάδοσής του (Cotter και συν., 2001· Gahan και Hill, 2014). Η δράση του συστήματος αυτού έγκειται στην αποκαρβοξυλίωση του γλουταμινικού οξέος σε γ-αμινοβουτυρικό οξύ [GABA] με την κατανάλωση ενός πρωτονίου, γεγονός το οποίο αυξάνει το ενδοκυτταρικό pH. Το σύστημα GAD του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* είναι πολύπλοκο και αποτελείται από δύο αντιμεταφορείς γλουταμινικού/GABA (GadT1, GadT2) και τρία ένζυμα αποκαρβοξυλασών του γλουταμινικού οξέος (GadD1, GadD2, GadD3), τα γονίδια των οποίων οργανώνονται στις τρεις διακριτές περιοχές GadD2/T2, GadD3 και GadD1/T1. Το GadD1/T1 είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του παθογόνου σε ήπια όξινα περιβάλλοντα (Cotter και συν., 2005) και το GadD2/T2 για την επιβίωσή του σε συνθήκες ισχυρά όξινης καταπόνησης (Cotter και συν., 2001). Ωστόσο, όλα τα στοιχεία που αποτελούν το σύστημα GAD υπερεκφράζονται κατά τη διάρκεια του αποικισμού του παθογόνου στο γαστρεντερικό σωλήνα (Archambaud και συν., 2012). Ένα άλλο σύστημα το οποίο συμμετέχει στην ανθεκτικότητα του παθογόνου στα όξινα περιβάλλοντα είναι αυτό της απαμινάσης της αργινίνης (arginine deiminase, ADI). Ο τρόπος δράσης του συστήματος ADI συνίσταται στην παραγωγή αμμωνίας (NH₃) που προκύπτει από τον καταβολισμό της αργινίνης σε ορθίνη. Η αμμωνία γίνεται δέκτης των ενδοκυτταρικών πρωτονίων και παράγονται με αυτόν τον τρόπο ιόντα αμμωνίου (NH₄⁺), τα οποία αυξάνουν το

ενδοκυτταρικό pH και διατηρούν έτσι την ομοιόστασή του (Gahan και Hill, 2014). Αν και το σύστημα ADI εμπλέκεται στην ανάπτυξη και επιβίωση του παθογόνου σε χαμηλό pH, δεν είναι εξίσου αποτελεσματικό όσο το σύστημα GAD. Ενδιαφέρον ωστόσο προκαλεί το γεγονός ότι η έκφραση των συστημάτων GAD και ADI ρυθμίζεται εν μέρει από τον παράγοντα σ^B (Kazmierczak και συν., 2003· Hain και συν., 2008).

Μετά από τη διέλευσή του από το στομάχι, το βακτήριο *L. monocytogenes* εντοπίζεται στο δωδεκαδάκτυλο του λεπτού εντέρου, όπου και εκκρίνεται η χολή μετά από κάθε γεύμα (Begley και συν., 2005a). Για να καθίστανται ικανά τα εντερικά παθογόνα να αποικίζουν τους ξενιστές, πρέπει να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στη χολή και τα χολικά οξέα. Τα χολικά οξέα, όντας ένα από τα πιο σημαντικά συστήματα άμυνας του οργανισμού ενάντια στα εντερικά παθογόνα, μπορούν να διαλυτοποιούν τις βακτηριακές μεμβράνες και να προκαλούν διάσπαση των πρωτεϊνών της μεμβράνης, βλάβη στο DNA και οξειδωτικό στρες στα βακτηριακά κύτταρα (Hofmann, 1999· Begley και συν., 2005a). Ο συγκεκριμένος τρόπος δράσης των χολικών αλάτων έχει επιβεβαιωθεί και για τον παθογόνο *L. monocytogenes*, έπειτα από έκθεσή του σε χολικά οξέα υπό αναερόβιες συνθήκες (Payne και συν., 2013). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η ίδια η χολή λειτουργεί ως ειδικό σήμα κατά τη διάρκεια της διέλευσης του παθογόνου στη γαστρεντερική οδό, ρυθμίζοντας την έκφραση πολλών παραγόντων παθογένειάς του. Συγκεκριμένα, έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη ενός ρυθμιστή (μεταγραφικός παράγοντας A, [BrtA]), ο οποίος ανιχνεύει τη χολή (κυρίως το χολικό οξύ) και ρυθμίζει την έκφραση δύο παραγόντων που μεσολαβούν στον αποικισμό του ήπατος και της χοληδόχου κύστης (MdrM και MdrT) (Quillin και συν., 2011). Το συγκεκριμένο εύρημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό, δεδομένου του ευρύτερου ρόλου των παραγόντων MdrM και MdrT στην επαγωγή της έκκρισης του δικυκλικού-AMP, το οποίο αποτελεί σηματοδοτικό μόριο για την παραγωγή της ιντερφερόνης-βήτα και σημαντικό παράγοντα για την επιβίωση του παθογόνου *in vivo* (Crimmins και συν., 2008· Woodward και συν., 2010· Schwartz και συν., 2012· Burdette και Vance, 2013).

Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη χολή από τα εντερικά παθογόνα είναι απαραίτητη για την ικανότητά τους να επιβιώνουν εντός της γαστρεντερικής οδού των ξενιστών. Όσον αφορά στην ανθεκτικότητα των στελεχών του είδους *Listeria monocytogenes* στα χολικά άλατα, αυτή πραγματοποιείται είτε μέσω μηχανισμών απομάκρυνσης της χολής από τα βακτήρια είτε μέσω μηχανισμών τροποποίησής της. Μελέτες έχουν δείξει ότι το σύστημα BilE που εκφράζεται στον παθογόνο επικεντρώνεται στη μεταφορά χολής εκτός του κυττάρου, καθώς στελέχη με αδρανοποιημένο το οπερόνιο που κωδικοποιεί τα γονίδια του συστήματος αυτού εμφάνισαν συσσωρευμένη χολή ενδοκυτταρικά (Sleator και συν., 2005). Ωστόσο, ο πιο σημαντικός μηχανισμός ανθεκτικότητας του παθογόνου στα χολικά άλατα είναι

αυτός της τροποποίησης της χολής, η οποία πραγματοποιείται από ένα ένζυμο υδρολάσης χολικών αλάτων (bile salt hydrolase, *BSH*) (Begley και συν., 2005b). Το *BSH* είναι ένα ένζυμο το οποίο εξειδικεύεται στα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας και σε ένα περιορισμένο αριθμό παθογόνων που προκαλούν λοιμώξεις μέσω της γαστρεντερικής οδού (Jones και συν., 2008). Η έκφραση του συγκεκριμένου ενζύμου ρυθμίζεται από τον παράγοντα σ^B και εξαρτάται πολύ από την αλληλεπίδραση του παθογόνου με τη μικροχλωρίδα του περιβάλλοντος (Archambaud και συν., 2012). Τέλος, σε γενικές γραμμές, όταν το pH της χολής είναι μειωμένο (όπως συμβαίνει στο δωδεκαδάκτυλο), η τοξικότητα των χολικών οξέων αυξάνεται (Begley και συν., 2005a) και το παθογόνο βακτήριο απαιτεί το ένζυμο *BSH*, το σύστημα *BilE* και άλλους δυνητικά σ^B -ρυθμιζόμενους μηχανισμούς, όπως το ένζυμο *PVA* που φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού στη χολή, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει την υδρόλυση των χολικών αλάτων (Dowd και συν., 2011).

7.2 Στόχος

Αντικείμενο της παρούσας πειραματικής ενότητας αποτέλεσε η μελέτη της πληθυσμιακής μεταβολής καθώς και έκφρασης των γονιδίων *prfA*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *sigB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *lmo2672* και *lmo2470* της *L. monocytogenes*, έπειτα από *in vitro* έκθεσή του σε ανθρώπινο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό. Από κλινικής πλευράς, στόχος ήταν η μελέτη ύπαρξης πιθανής συσχέτισης τόσο των πληθυσμιακών μεταβολών του παθογόνου όσο και των μεταβολών της γονιδιακής έκφρασης, με παράγοντες που δυνητικά επηρεάζουν το γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό pH.

7.3 Υλικά και Μέθοδοι

7.3.1 Παραλαβή δειγμάτων

Η *in vitro* έκθεση του παθογόνου μικροοργανισμού στις συνθήκες προσομοίωσης του πεπτικού σωλήνα, πραγματοποιήθηκε μέσω λήψης γαστρικών και δωδεκαδακτυλικών υγρών από 25 ασθενείς που προσήλθαν για ενδοσκοπικό έλεγχο του ανώτερου πεπτικού στην Ηπατογαστρεντερολογική Μονάδα της Β' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και Μονάδας Έρευνας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου 'ΑΤΤΙΚΟΝ'.

Η λήψη των δειγμάτων γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού υγρού γινόταν κατά τη διάρκεια προγραμματισμένης γαστροσκόπησης, έπειτα από την έγγραφη συγκατάθεση ασθενών που προσέρχονταν για ενδοσκόπηση στα πλαίσια διερεύνησης δυσπεπτικών ενοχλημάτων. Ασθενείς που είχαν λάβει αντιβίωση ή είχαν επεισόδιο αιμορραγίας πεπτικού το

τελευταίο δίμηνο εξαιρούνταν. Ακριβώς πριν την ενδοσκόπηση καταγράφονταν τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών και συγκεκριμένα το φύλο, η ηλικία, η ένδειξη ενδοσκόπησης, το ύψος, το βάρος, η λήψη αντιβιοτικών, η λήψη άλλων φαρμάκων, η ύπαρξη διαβήτη και η λήψη αναστολέων αντλίας πρωτονίων (PPIs). Κατά τη διάρκεια της διαγνωστικής ενδοσκόπησης αναρροφούνταν σε αποστειρωμένο δοχείο αρχικά ~2cc δωδεκαδακτυλικού υγρού και στη συνέχεια σε διαφορετικό αποστειρωμένο δοχείο ~8cc γαστρικού υγρού. Τέλος, με το πέρας της ενδοσκόπησης καταγράφονταν τα μακροσκοπικά ευρήματα (findings), η λήψη ή όχι βιοψιών (histo) και τα ιστολογικά ευρήματα (histo findings). Τα δοχεία στα οποία φυλάσσονταν τα υγρά διατηρούνταν υπό ψύξη (4°C) και μεταφέρονταν άμεσα στο εργαστήριο, για τη διεξαγωγή των περαιτέρω αναλύσεων.

7.3.2 Παρασκευή ενοφθαλμίσματος και προετοιμασία δειγμάτων

Έπειτα από τη μεταφορά των γαστρικών και δωδεκαδακτυλικών υγρών στο εργαστήριο, πραγματοποιούνταν μέτρηση του pH και στη συνέχεια ακολουθούσε ο ενοφθαλμισμός των δειγμάτων με τον παθογόνο μικροοργανισμό.

Για τη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *L. monocytogenes* LQC 15257, που ανήκε στον ορότυπο 4b και είχε απομονωθεί από δείγμα φράουλας. Το στέλεχος διατηρούνταν στους -20 °C σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI (LABM), παρουσία γλυκερόλης 50%. Με την έναρξη της κάθε πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιούνταν αρχικά ανανέωση του στελέχους από τους -20 °C και ακολουθούσε ανάπτυξη του παθογόνου σε ζωμό BHI στους 37 °C για 18 h (9 log CFU/mL) (παρ. 4.3.1).

Ο ενοφθαλμισμός του παθογόνου στα δείγματα πραγματοποιούνταν με τις καλλιέργειες επώασης των 18 h και η αρχική συγκέντρωση του μικροοργανισμού στο γαστρικό υγρό ήταν 9 log CFU/mL. Συγκεκριμένα, οι καλλιέργειες αρχικά φυγοκεντρώνταν και το δείγμα του γαστρικού υγρού προστίθεντο στο ιζήμα που παρέμενε έπειτα από την απόρριψη του υπερκείμενου διαλύτη. Ακολουθούσαν επώαση του δείγματος στους 37 °C για 100 min, φυγοκέντρωση, απόρριψη του γαστρικού υγρού, αιώρηση του ιζήματος σε δωδεκαδακτυλικό υγρό και επώαση στους 37 °C για 2 h.

7.3.3 Μικροβιολογικές και μοριακές αναλύσεις

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε κάθε μία από τις τέσσερις φάσεις του πειράματος: α) κατά τον ενοφθαλμισμό του γαστρικού υγρού με το στέλεχος του παθογόνου μικροοργανισμού (Στάδιο 1), β) μετά την επώαση του γαστρικού υγρού με το στέλεχος (Στάδιο 2), γ) κατά την επαναιώρηση του στελέχους στο υγρό του δωδεκαδακτύλου (Στάδιο 3) και δ)

μετά την επώαση του ενοφθαλμισμένου δωδεκαδακτυλικού υγρού (Στάδιο 4). Σε κάθε στάδιο δειγματοληψίας μελετήθηκε η πληθυσμιακή μεταβολή του παθογόνου, καθώς και η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα του μικροοργανισμού. Παράλληλα, ελέγχθηκε και η αντίστοιχη συμπεριφορά του μικροοργανισμού σε ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης (control), μετά από ενοφθαλμισμό του στελέχους σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI και πραγματοποίηση της ίδιας πειραματικής διαδικασίας.

Όσον αφορά στη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων παθογονικότητας, αυτή διεκπεραιώθηκε μέσω απομόνωσης του RNA του μικροοργανισμού, σύνθεσης cDNA και πραγματοποίησης RT-qPCR, με μόρια εκκινητές και συνθήκες διεξαγωγής της RT-qPCR ίδιες με αυτές που είχαν χρησιμοποιηθεί στην πειραματική ενότητα 4 (παρ. 4.3.3.3.1). Οι αλληλουχίες των μορίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο *prfA*, η μελέτη του οποίου προστέθηκε σε αυτήν την πειραματική ενότητα, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 25**, ενώ η συγκέντρωσή τους στο μείγμα αντιδραστηρίων ήταν 0.9μM. Εν συνεχεία υπολογίστηκαν οι λόγοι έκφρασης βάσει του μαθηματικού μοντέλου του Pfaffl (4.2), οι τιμές μετατράπηκαν σε τιμές \log_2 (fold change) και αξιολογήθηκε η έκφραση των γονιδίων [υπέρ-έκφραση (≥ 2), υπό-έκφραση (≤ -2), σταθερή έκφραση για τιμές μεταξύ -2 και 2] (4.3.3.3).

Όσον αφορά στη μελέτη της πληθυσμιακής μεταβολής του παθογόνου, αυτή πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων με επίστρωση σε τρυβλία PALCAM (LABM), αλλά και μέσω RT-qPCR από την οποία πραγματοποιήθηκε αντιστοίχιση των κύκλων ποσοτικοποίησης με τον πληθυσμό του μικροοργανισμού.

Για τον υπολογισμό του πληθυσμού του παθογόνου μέσω RT-qPCR, απαραίτητη ήταν η δημιουργία μίας πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη προέκυψε από τη μελέτη δειγμάτων των διαδοχικών αραιώσεων της υγρής καλλιέργειας του στελέχους LQC 15257. Συγκεκριμένα, το στέλεχος αυτό ενοφθαλμίστηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BHI και ακολούθησαν τα ίδια χρονικά διαστήματα επώασης και στάδια δειγματοληψίας του κανονικού πειράματος. Στη συνέχεια, αφού προσδιορίστηκε ο πληθυσμός του μικροοργανισμού μέσω τρυβλίων, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις της καλλιέργειας από τις οποίες προέκυψαν δείγματα με συγκέντρωση του μικροοργανισμού 10^{10} - 10^2 CFU/mL. Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκε το RNA, έγινε σύνθεση του CDNA και εν τέλει διεξήχθη RT-qPCR για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Η διεξαγωγή της RT-qPCR έγινε με στόχο ένα χαρακτηριστικό για τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* γονίδιο, του οποίου η έκφραση ήταν σταθερή και ανεξάρτητη από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Σύμφωνα με τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που είχε προηγηθεί, το γονίδιο αυτό ήταν το *inlB*. Το γονίδιο *inlB* δεν παρουσίασε μεταβολή στην έκφρασή του κατά τη διεξαγωγή του πειράματος (σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξή του στο συνθετικό υγρό θρεπτικό υπόστρωμα) και μέσω της

εφαρμογής του Excel NormFinder (Andersen και συν., 2004) επιλέχθηκε ως το σταθερότερο και ως, εκ τούτου, καταλληλότερο για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης γονίδιο.

Πίνακας 25 Αλληλουχίες των μορίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό του γονιδίου *prfA* και μέγεθος του αμπλικονίου που σχηματίζει το ζεύγος των εκκινητών.

<i>Γονίδιο</i>	<i>Εκκινητές</i>	<i>Αλληλουχία</i>	<i>Αμπλικόνιο(bp)</i>	<i>Αναφορά</i>
<i>prfA</i>	PrfA f	CTATTTGCGGTCAACTTTTAATCCT	100	Hadjilouka και συν., 2016a
	PrfA r	CCTAACTCCTGCATTGTTAAATTATCC		

7.3.4 Στατιστική επεξεργασία

Οι συνεχείς μεταβλητές συνοψίστηκαν ως διάμεσες τιμές (median) με διατεταρτημοριακά εύρη (IQRs), ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές συνοψίστηκαν ως μετρήσεις και αντίστοιχα ποσοστά. Δεδομένου του μικρού αριθμού ασθενών, όλες οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση μη παραμετρικών ελέγχων, ενώ η αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ των συνεχόμενων μεταβλητών [γαστρικό pH, δωδεκαδακτυλικό pH, ηλικία και Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ)] και μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω του συντελεστή συσχέτισης Spearman.

Καθ' ότι τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν σημαντική υπερέκφραση των γονιδίων αλλά μη σημαντική υποέκφρασή τους, η εν συνεχεία στατιστική επεξεργασία επικεντρώθηκε στη μελέτη της πρώτης περίπτωσης. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η συσχέτιση της υπερέκφρασης των γονιδίων με το pH του εκάστοτε ασθενή (γαστρικό pH για τα δύο πρώτα στάδια και δωδεκαδακτυλικό pH για τα δύο επόμενα στάδια), τη γαστρική ατροφία και τη λήψη των PPIs. Η σχέση της γονιδιακής υπερέκφρασης με τα παραπάνω χαρακτηριστικά μελετήθηκε με χρήση πληθυσμιακών μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης (generalized estimating equation, *GEE*), μονοπαραγοντικά και πολυπαραγοντικά, είτε επιτρέποντας την αλληλεπίδραση των επιπέδων του pH με το στάδιο μελέτης, είτε όχι. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο πίνακας συσχετίσεων θεωρήθηκε μη δομημένος.

Η διεξαγωγή των παραπάνω αναλύσεων έγινε μέσω του στατιστικού προγράμματος Stata 13.1, ένα πλήρως εξοπλισμένο πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας που εκτελείται σε Windows, MacOS, Linux, και Unix.

7.4 Αποτελέσματα

Το pH των γαστρικών υγρών κυμαινόταν μεταξύ των τιμών 1.14 και 7.99, με μέση τιμή 4 και διάμεση τιμή 2.3, ενώ το pH των δωδεκαδακτυλικών υγρών κυμαινόταν μεταξύ των τιμών 1.19 και 8.61, με μέση τιμή 5.6 και διάμεση τιμή 6.8 (**Πίνακας 26**). Από τους 25 ασθενείς, στους 3 το pH του γαστρικού και του δωδεκαδακτυλικού ήταν είτε πιο χαμηλό είτε πιο υψηλό από την αντίστοιχη διάμεση τιμή. Από τους υπόλοιπους ασθενείς, οι μισοί εμφάνισαν τιμές pH πιο υψηλές από τη διάμεση τιμή, τόσο στο γαστρικό όσο και στο δωδεκαδακτυλικό υγρό, και άλλοι μισοί εμφάνισαν τιμές πιο χαμηλές από αυτήν και στις δύο περιπτώσεις. Συνολικά, σε 13 από τις 25 περιπτώσεις ο παθογόνος μικροοργανισμός αντιμετώπισε τιμές γαστρικού pH μικρότερες από 2.3.

Εννέα από τους ασθενείς είχαν λάβει PPIs και 17 φαρμακευτική αγωγή, ενώ τα μακροσκοπικά ευρήματα κατέδειξαν ατροφία σε 9 συνολικά ασθενείς. Ηλικιακά οι ασθενείς κυμαίνονταν από 39 έως 84 χρονών, με διάμεση τιμή τα 65 έτη, ενώ 12 από αυτούς ήταν γυναίκες (**Πίνακας 26**).

Στον **Πίνακα 27** παρουσιάζονται τα επίπεδα του pH σύμφωνα με τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Όπως φαίνεται σε αυτόν, η λήψη ή όχι των PPIs και της φαρμακευτικής αγωγής διαφοροποίησαν σημαντικά το γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό pH, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η λήψη των PPIs διαφοροποίησε σημαντικά ($p = 0.089$) το γαστρικό pH από 2.01 σε 6.42 και η λήψη φαρμακευτικής αγωγής διαφοροποίησε σημαντικά ($p=0.044$) το δωδεκαδακτυλικό pH από 2.63 σε 7.04. Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση.

Πίνακας 26 Βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών όπως καταγράφηκαν από την ενδοσκόπηση.

Στοιχεία ασθενών	N (%)		
PPIs^a			
<i>Όχι</i>	16 (64.0)		
<i>Ναι</i>	9 (36.0)		
Φαρμακευτική Αγωγή			
<i>Όχι</i>	8 (32.0)		
<i>Ναι</i>	17 (68.0)		
Φύλο			
<i>Γυναίκα</i>	12 (48.0)		
<i>Αντρας</i>	13 (52.0)		
Ατροφία			
<i>Όχι</i>	16 (64.0)		
<i>Ναι</i>	9 (36.0)		
Ένδειξη			
<i>Πόνος</i>	10 (40.0)		
<i>Δυσπεψία</i>	2 (8.0)		
<i>Γαστροϕοφαγική παλινδρόμηση</i>	4 (16.0)		
<i>Πυλαία υπέρταση</i>	4 (16.0)		
<i>Άλλο</i>	5 (20.0)		
Διαβήτης			
<i>Όχι</i>	19 (76.0)		
<i>Ναι</i>	6 (24.0)		
	Διάμεση τιμή (IQR)^β	Μέση τιμή (SD)^γ	
Ηλικία (έτη)	65.0 (53.0, 73.0)	63.1 (13.2)	
pH (γαστρικό)	2.3 (1.6, 7.2)	4.0 (2.8)	
pH (δωδεκαδακτυλικό)	6.8 (3.3, 8.0)	5.6 (2.6)	

^aPPIs: αναστολείς αντλίας πρωτονίων (proton pump inhibitors)

^βIQR: διατεταρτημοριακό εύρος (interquartile range), 25^ο και 75^ο εκατοστημόριο

^γSD: Standard deviation (τυπική απόκλιση)

Πίνακας 27 Τιμές pH σύμφωνα με τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

	pH (γαστρικό) Διάμεση τιμή (IQR ^a)	pH (δωδ/κό) Διάμεση τιμή (IQR)	p-value ^{β*}	p-value ^{**}
PPIs			0.089	0.246
Όχι	2.01 (1.46, 6.63)	5.33 (2.42, 8.00)		
Ναι	6.42 (2.28, 7.20)	7.54 (5.07, 7.95)		
Ατροφία			0.257	0.295
Όχι	2.37 (1.81, 7.54)	6.92 (3.53, 8.07)		
Ναι	2.00 (1.20, 6.45)	5.90 (1.52, 7.88)		
Φαρμακευτική αγωγή			0.294	0.044
Όχι	2.16 (1.17, 4.91)	2.63 (1.51, 5.91)		
Ναι	2.82 (1.84, 7.20)	7.04 (5.07, 8.00)		
Φύλο			0.568	0.121
Γυναίκα	2.32 (1.45, 6.44)	4.15 (2.07, 7.71)		
Άντρας	2.28 (2.00, 7.36)	7.04 (5.07, 8.06)		
Ένδειξη			0.272	0.169
Πόνος	2.55 (1.54, 7.20)	6.81 (5.07, 8.15)		
Δυσπεψία	2.15 (1.84, 2.45)	3.25 (1.94, 4.56)		
Γαστροίσοφαγική παλινδρόμηση	2.16 (1.74, 4.32)	3.53 (2.75, 5.81)		
Πυλαία υπέρταση	1.37 (1.14, 4.76)	3.13 (1.35, 6.63)		
Άλλο	7.50 (6.42, 7.89)	7.95 (7.54, 8.00)		
Διαβήτης			0.899	0.135
Όχι	2.28 (1.60, 7.36)	5.07 (2.20, 7.95)		
Ναι	3.95 (1.54, 7.20)	7.47 (5.90, 8.50)		

^aIQR: διατεταρτημοριακό εύρος (interquartile range), 25^ο και 75^ο εκατοστημόριο

^βp-value: τιμή σημαντικότητας, p=0.05

*p-value: τιμή γαστρικού pH

**p-value: τιμή δωδεκαδακτυλικού pH

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ των συνεχόμενων μεταβλητών (γαστρικό pH, δωδεκαδακτυλικό pH, ηλικία και ΔΜΣ), έδειξαν ότι δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική συσχέτιση ούτε μεταξύ του γαστρικού pH και της ηλικίας, αλλά ούτε και μεταξύ του γαστρικού pH και του ΔΜΣ. Ωστόσο, φάνηκε η ύπαρξη σημαντικής συσχέτισης ($r_{ho}=0.789$) μεταξύ του γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού pH ($p<0.01$) (Πίνακας 28), καθώς και ύπαρξη μικρότερης συσχέτισης ($r_{ho}=0.452$) μεταξύ της ηλικίας των ασθενών και του του δωδεκαδακτυλικού pH ($p=0.023$) (Πίνακας 29).

Πίνακας 28 Αξιολόγηση της συσχέτισης του γαστρικού pH με την ηλικία, τον Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) και το δωδεκαδακτυλικό pH, μέσω του συντελεστή συσχέτισης Spearman.

Μεταβλητές	Spearman's rho	p-value ^a
Ηλικία (έτη)	0.329	0.108
ΔΜΣ	0.039	0.854
pH (δωδ/κό)	0.789	<0.001

^ap-value: τιμή σημαντικότητας, p=0.05

Πίνακας 29 Αξιολόγηση της συσχέτισης του δωδεκαδακτυλικού pH με την ηλικία και τον Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ), μέσω του συντελεστή συσχέτισης Spearman.

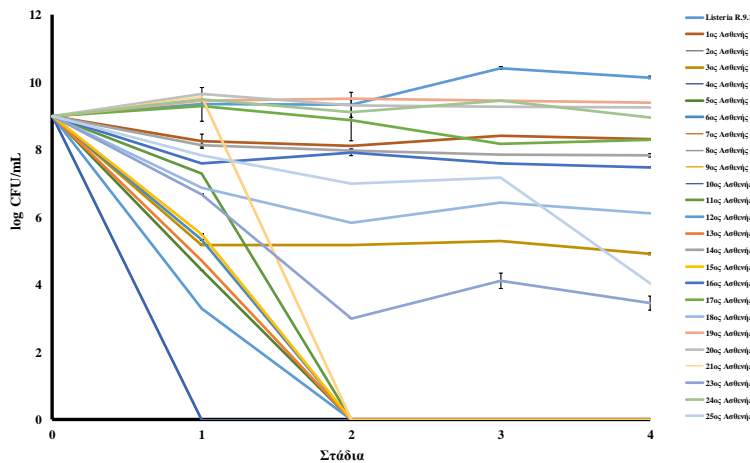
Μεταβλητές	Spearman's rho	p-value ^a
Ηλικία (έτη)	0.452	0.023
ΔΜΣ	0.303	0.140

^ap-value: τιμή σημαντικότητας, p=0.05

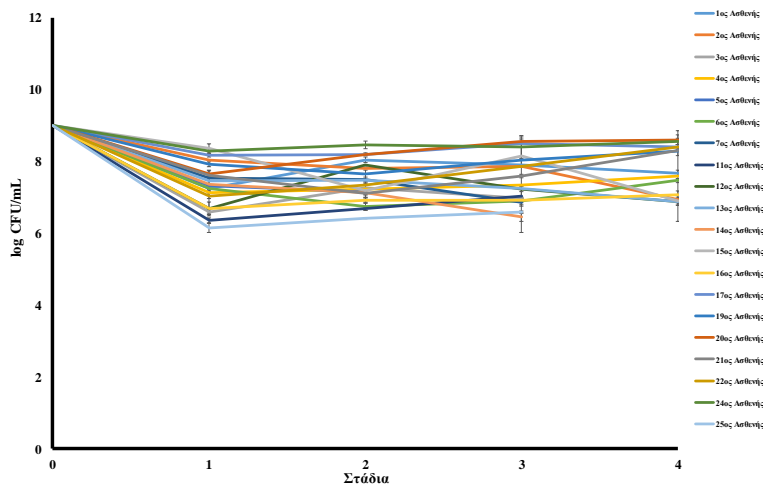
Στο **Σχήμα 6** φαίνονται οι μεταβολές του πληθυσμού του μικροοργανισμού στα 4 διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας του πειράματος, σύμφωνα με την ανάπτυξη του παθογόνου στο θρεπτικό υπόστρωμα PALCAM. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στα τρυβλία παρατηρήθηκε ότι ο παθογόνος παρουσίασε μείωση του πληθυσμού του, με εξαίρεση τις περιπτώσεις των ασθενών 19, 20, 22 και 24 όπου ο πληθυσμός διατηρήθηκε σταθερός. Επιπλέον, το στάδιο στο οποίο παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού ήταν εκείνο κατά το οποίο πραγματοποιούνταν ο ενοφθαλμισμός του παθογόνου στα δείγματα των γαστρικών υγρών (Στάδιο 1). Ωστόσο ο μικροοργανισμός δεν ήταν ανιχνεύσιμος με τις κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, δεν ήταν ανιχνεύσιμος μετά από το πρώτο στάδιο δειγματοληψίας στους 10 από τους 13 ασθενείς (77%) με γαστρικό pH<2.3 και στους 3 από τους 12 (25%) ασθενείς με γαστρικό pH>2.3. Αντιθέτως, παρουσίασε ανάπτυξη σε 3 από τους 13 ασθενείς (23%) με γαστρικό pH<2.3 και σε 9 από τους 12 ασθενείς (75%) με γαστρικό pH>2.3.

Το γεγονός της μη ανίχνευσης του μικροοργανισμού στα θρεπτικά υποστρώματα, η οποία όμως ακολουθήθηκε από απομόνωση RNA και έκφραση των γονιδίων του, οδήγησε στην ανάγκη περαιτέρω μελέτης της πληθυσμιακής του μεταβολής. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω διεξαγωγής RT-qPCR σε δείγματα διαδοχικών αραιώσεων της υγρής καλλιέργειας του στελέχους LQC 15257, με στόχο το γονίδιο *inlB*. Από την RT-qPCR προέκυψε μία πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης, της οποίας η ευθεία ελαχίστων τετραγώνων ($y=ax+\beta$) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του πληθυσμού του παθογόνου σε κάθε στάδιο της πειραματικής διαδικασίας. Καθ' ότι όμως η γραμμικότητα της συγκεκριμένης καμπύλης διατηρούνταν για τιμές που αντιστοιχούσαν σε πληθυσμό 10^6 - 10^{10} log CFU/mL, το κατώτερο όριο ανίχνευσης του πληθυσμού ήταν 10^6 log CFU/mL. Τα αποτελέσματα της πληθυσμιακής μεταβολής παρουσιάζονται στο **Σχήμα 7**. Σύμφωνα με αυτά, στους 20 ασθενείς ο πληθυσμός του παθογόνου κυμαινόταν μεταξύ των τιμών 10^6 - 10^{10} log CFU/mL, ενώ στους υπόλοιπους 5 (8, 9, 10, 18, 23) ήταν εκτός του ορίου ανίχνευσης από το πρώτο κιάλας στάδιο δειγματοληψίας. Από αυτούς τους πέντε ασθενείς οι δύο (8, 10) είχαν γαστρικό pH>2.3 και οι υπόλοιποι τρεις μικρότερο από αυτό, ενώ σε τρεις από αυτούς (8, 9, 10) ο μικροοργανισμός

δεν ήταν ανιχνεύσιμος ούτε με τις μικροβιολογικές μεθόδους. Παράλληλα, όπως και στις μικροβιολογικές μεθόδους, παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού στους ασθενείς όπου ήταν ανιχνεύσιμος. Η μείωση αυτή φαινόταν από το πρώτο στάδιο δειγματοληψίας και ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτές που ακολουθούσαν στα υπόλοιπα. Συνολικά, στους ασθενείς με γαστρικό pH>2.3 ο πληθυσμός μειώθηκε κατά μέσο όρο 1.2 log, ενώ στους ασθενείς με γαστρικό pH<2.3 μειώθηκε κατά μέσο όρο 1.7 log.



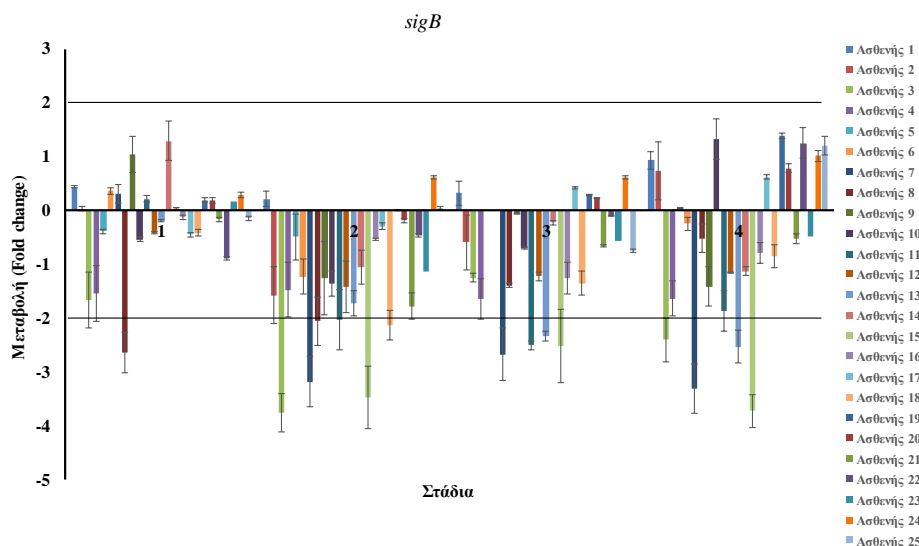
Σχήμα 6 Πληθυσμιακή εξέλιξη της *L. monocytogenes* στα τέσσερα στάδια της πειραματικής μελέτης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών μεθόδων.



Σχήμα 7 Πληθυσμιακή εξέλιξη της *L. monocytogenes* στα τέσσερα στάδια της πειραματικής μελέτης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μοριακών μεθόδων.

Τα αποτελέσματα της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, συγκριτικά με την αντίστοιχη έκφρασή τους στο γενικό θρεπτικό υπόστρωμα, παρουσιάζονται στα **Σχήματα 8-18**. Όσον αφορά στην επιλογή του γονιδίου αναφοράς, ως καταλληλότερο για την ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε το γονίδιο *rpoB*. Σε σχέση με τα άλλα δύο γονίδια αναφοράς (*I6S* και *IGs*) το *rpoB* παρουσίασε τη μικρότερη μεταβλητότητα και, ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα του μικροοργανισμού. Η μελέτη αυτή κατέδειξε ότι η έκθεση του παθογόνου στα γαστρικά και δωδεκαδακτυλικά υγρά είχε ως αποτέλεσμα άλλοτε την υπερέκφραση των γονιδίων, άλλοτε μη διαφοροποίηση στην έκφρασή τους, ενώ παρουσιάστηκαν και κάποιες περιπτώσεις υποέκφρασης.

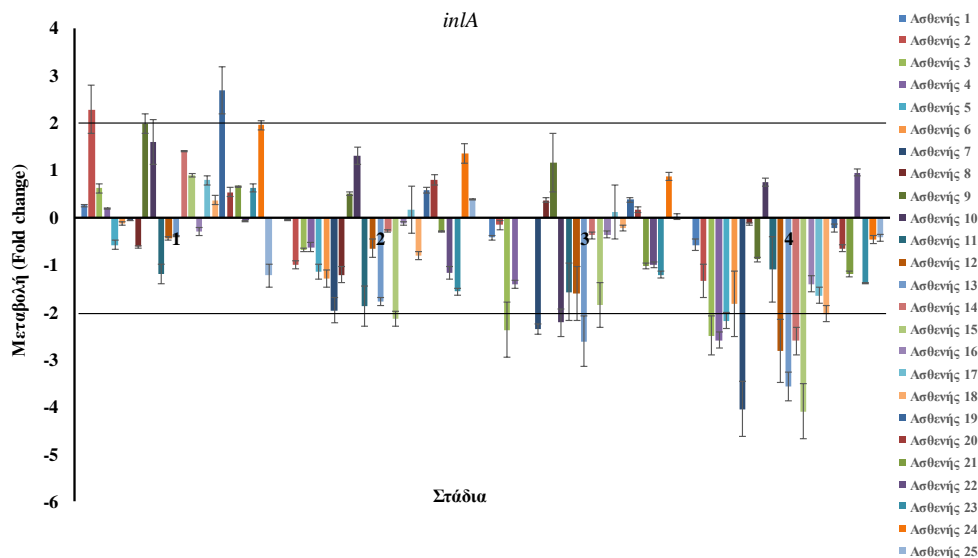
Στο **Σχήμα 8** παρουσιάζεται η έκφραση του γονιδίου *sigB* η οποία παρέμεινε ουσιαστικά σταθερή. Εξάιρεση αυτού αποτέλεσαν λίγες και τυχαίες περιπτώσεις υποέκφρασης, από τις οποίες μόνο στην περίπτωση 3 ασθενών (7, 13,15) παρατηρήθηκε η έκφραση αυτή σε περισσότερα του ενός στάδια. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του 7^{ου} ασθενή το γονίδιο υποεκφράστηκε 3.17±0.46, 2.67±0.48 και 3.30±0.46 φορές στο 2°, 3° και 4° Στάδιο, αντίστοιχα, ενώ στον 13° ασθενή το γονίδιο παρουσίασε υπό-έκφραση 2.33±0.08 φορές στο 3° Στάδιο και 2.52±0.30 στο 4° Στάδιο. Τέλος, στην περίπτωση του 15^{ου} ασθενή, το γονίδιο υποεκφράστηκε 3.47±0.57 και 3.72±0.30 φορές στο 2° και 4° Στάδιο, αντίστοιχα. Συνολικά, από τις 100 εξεταζόμενες περιπτώσεις έκφρασης του κάθε γονιδίου (25 ασθενείς, 4 Στάδια) το *sigB* υποεκφράστηκε σε 15 από αυτές και παρουσίασε σταθερή έκφραση σε 83 (**Πίνακας 30**).



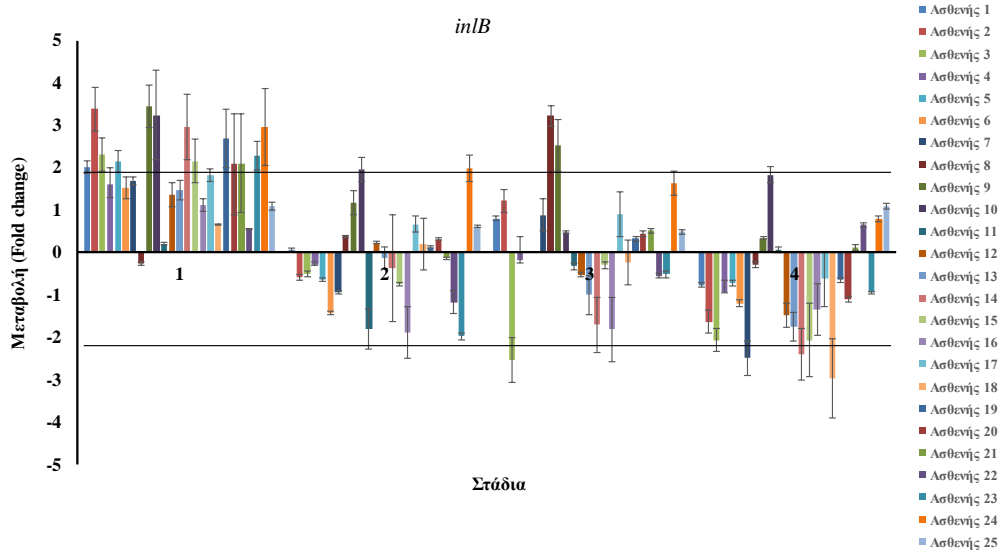
Σχήμα 8 Έκφραση του γονιδίου *sigB* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 .

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τα γονίδια *inlA* και *inlB*. Συγκεκριμένα, το γονίδιο *inlA* (**Σχήμα 9**) υποεκφράστηκε 14 φορές και παρέμεινε σταθερό 82 φορές, ενώ παρουσίασε και υπερέκφραση σε 2 περιπτώσεις. Από τις 14 περιπτώσεις υποέκφρασης μόνο στην περίπτωση 2 ασθενών (13, 15) παρατηρήθηκε επαναληψιμότητα της έκφρασης αυτής σε περισσότερα του ενός στάδια. Συγκεκριμένα, στον 13^ο ασθενή το γονίδιο υποεκφράστηκε 2.60 ± 0.53 και 3.55 ± 0.30 φορές στο 3^ο και 4^ο Στάδιο, αντίστοιχα, ενώ στον 15^ο ασθενή το γονίδιο υποεκφράστηκε 2.13 ± 0.15 και 4.08 ± 0.58 φορές στο 2^ο και 4^ο Στάδιο, αντίστοιχα. Από την άλλη, το γονίδιο *inlB* (**Σχήμα 10**) παρουσίασε υπερέκφραση 15 φορές, εκ των οποίων οι 12 παρατηρήθηκαν κατά το 1^ο Στάδιο δειγματοληψίας, με υπερέκφραση του γονιδίου σε δύο στάδια για τον 9^ο και 24^ο ασθενή. Επιπλέον το γονίδιο παρουσίασε υποέκφραση σε 6 περιπτώσεις, ενώ διατηρήθηκε σταθερό σε 12, 25, 20 και 20 ασθενείς στο 1^ο, 2^ο, 3^ο και 4^ο Στάδιο δειγματοληψίας, αντίστοιχα (**Πίνακας 30**).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δύο αυτά γονίδια παρουσίασαν τη μεγαλύτερη σταθερότητα ως προς την έκφραση, συγκριτικά με αυτήν που εμφάνισαν όταν ο παθογόνος μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε γενικό θρεπτικό υπόστρωμα.

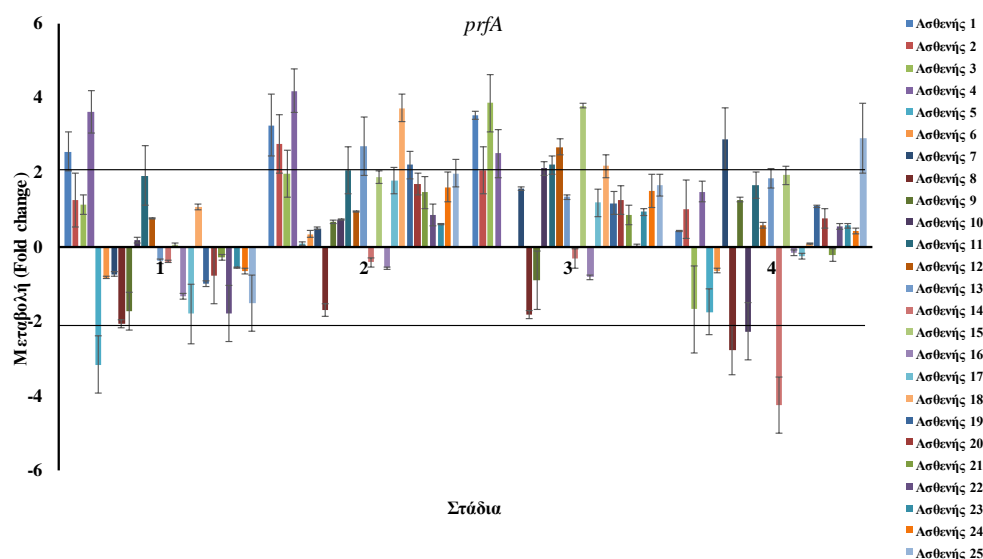


Σχήμα 9 Έκφραση του γονιδίου *inlA* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 .



Σχήμα 10 Έκφραση του γονιδίου *inlB* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 .

Η έκφραση του γονιδίου *prfA* παρέμεινε και αυτή σταθερή σε γενικές γραμμές (**Σχήμα 11**). Ωστόσο σε κάποιες σποραδικές περιπτώσεις εμφάνισε είτε υποέκφραση είτε υπερέκφραση, χωρίς όμως να ακολουθείται ένα συγκεκριμένο μοτίβο. Συνολικά, το γονίδιο υποεκφράστηκε 6 φορές, παρέμεινε σταθερό 68 και υπερεκφράστηκε 24 (**Πίνακας 30**).

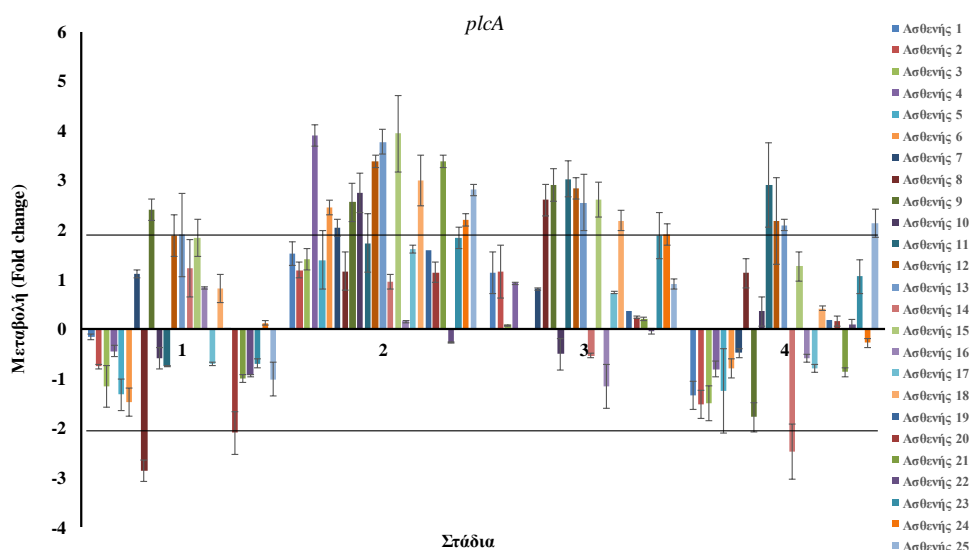


Σχήμα 11 Έκφραση του γονιδίου *prfA* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 .

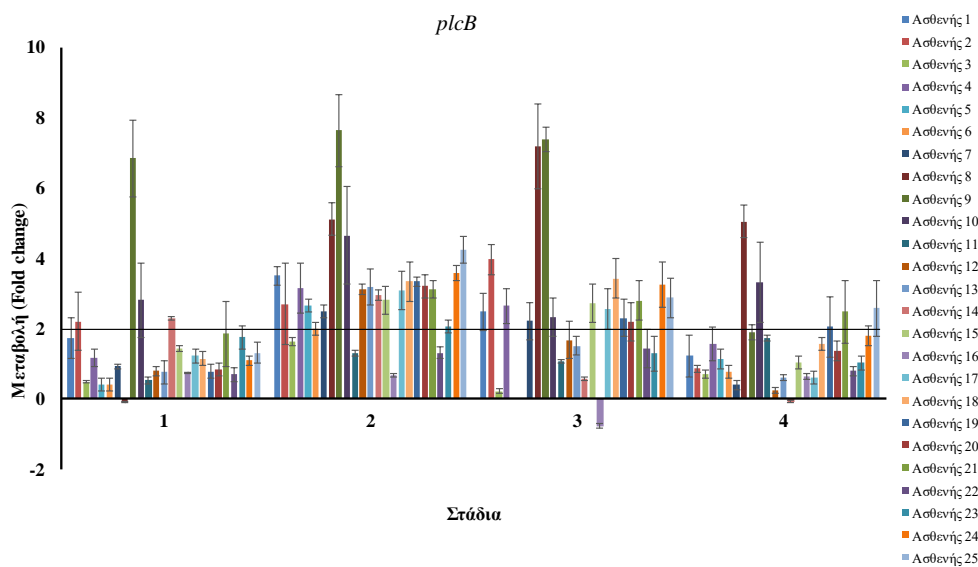
Το γονίδιο *plcA* παρουσίασε σταθερή έκφραση σε 9 ασθενείς για το σύνολο των σταδίων δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα η έκφρασή του παρέμεινε σταθερή στον 1^ο, 2^ο, 3^ο, 5^ο, 14^ο, 16^ο, 17^ο, 19^ο και 22^ο ασθενή, εκ των οποίων οι 6 (1, 14, 16, 17, 19, 22) είχαν γαστρικό pH>2.3 (**Σχήμα 12**). Συνολικά, παρουσίασε σταθερή έκφραση 71 φορές, υπερέκφραση 24 φορές και υποέκφραση μόλις 3 φορές (**Πίνακας 30**). Παράλληλα, η υπερέκφραση του γονιδίου κυμάνθηκε συνολικά από 2.10 ± 0.09 έως 3.94 ± 0.78 φορές και φάνηκε να πραγματοποιείται πιο έντονα στο 2^ο και 3^ο Στάδιο δειγματοληψίας.

Αντίστοιχα μικτή απόκριση παρατηρήθηκε και για το γονίδιο *plcB*, με υπερέκφραση σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών και σταθερή έκφραση στις υπόλοιπες περιπτώσεις (**Σχήμα 13**). Ωστόσο το συγκεκριμένο γονίδιο παρέμεινε σταθερό σε όλα τα στάδια δειγματοληψίας σε 5 ασθενείς (3, 6, 11, 16, 22), από τους οποίους οι 3 (11, 16, 22) είχαν γαστρικό pH>2.3. Στους υπόλοιπους 20 ασθενείς το γονίδιο παρουσίασε υπερέκφραση από 2.06 ± 0.05 έως 7.64 ± 0.34

φορές και ήταν εντονότερη στο 2^ο και 3^ο Στάδιο δειγματοληψίας. Συνολικά, το γονίδιο υπερεκφράστηκε σε 44 περιπτώσεις και παρέμεινε σταθερό σε 54 (Πίνακας 30).

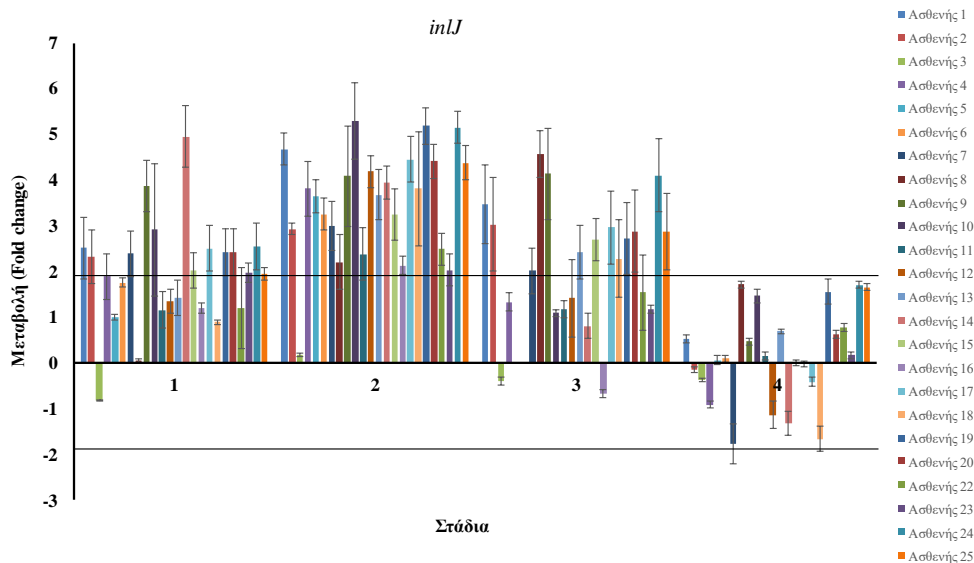


Σχήμα 12 Έκφραση του γονιδίου *plcA* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 .

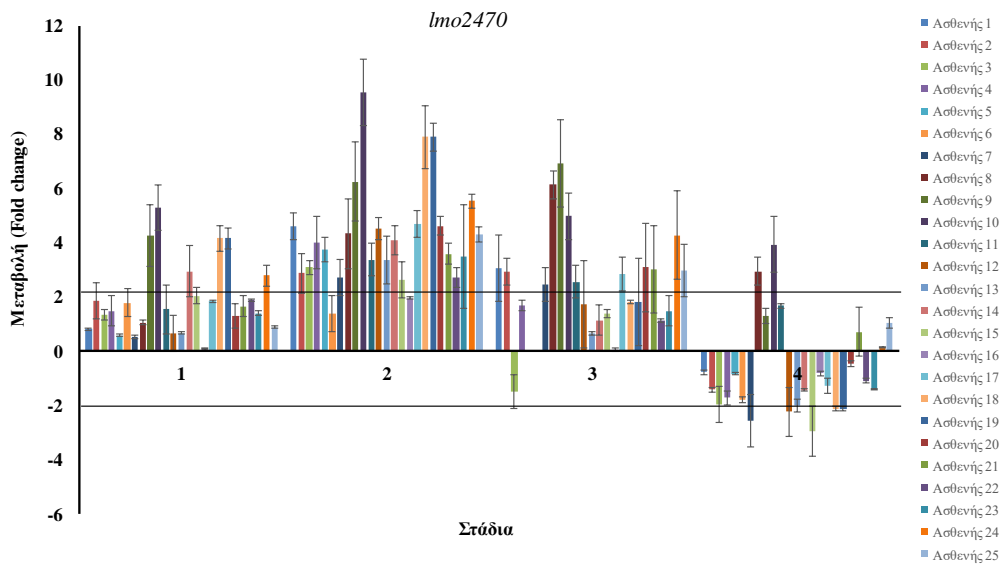


Σχήμα 13 Έκφραση του γονιδίου *plcB* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 .

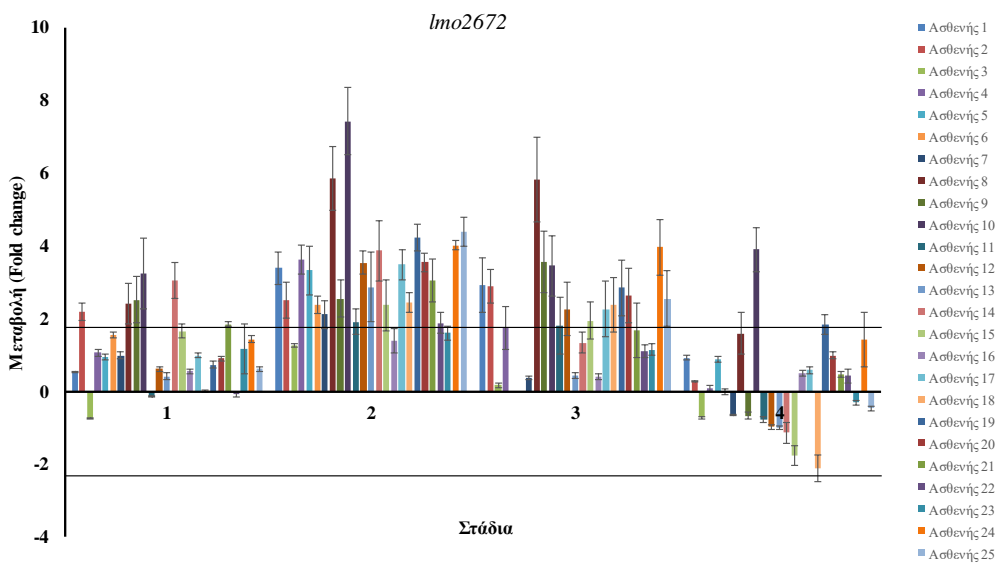
Τα γονίδια *inlJ*, *lmo2470* και *lmo2672* παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά ως προς την έκφρασή τους στα αντίστοιχα στάδια δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα παρουσίασαν υπερέκφραση κατά τα τρία πρώτα στάδια δειγματοληψίας και σταθερή έκφραση στο τελευταίο στάδιο. Το γονίδιο *inlJ* παρέμεινε σταθερό καθ' όλη την πειραματική διαδικασία στον 3^ο και 23^ο ασθενή, ενώ στους υπόλοιπους υπερεκφράστηκε σε ένα ή περισσότερα στάδια από 2.12±0.10 έως 5.30±0.83 φορές (**Σχήμα 14**). Συνολικά παρουσίασε σταθερή έκφραση 48 φορές και υπερέκφραση 50 (**Πίνακας 30**). Τα γονίδια *lmo2470* (**Σχήμα 15**) και *lmo2672* (**Σχήμα 16**) υπερεκφράστηκαν από 2.04±0.02 έως 9.56±1.21 φορές και από 2.11±0.02 έως 7.42±0.92 φορές σε 24 και 20 ασθενείς, αντίστοιχα. Η υπερέκφραση αυτή φάνηκε να είναι πιο έντονη στο 2^ο και 3^ο Στάδιο δειγματοληψίας, ενώ στο 4^ο Στάδιο παρατηρήθηκαν και ελάχιστες περιπτώσεις υποέκφρασης. Συνολικά, το γονίδιο *lmo2470* υποεκφράστηκε 5 φορές, παρέμεινε σταθερό 48 φορές και υπερεκφράστηκε 45 φορές. Όμοια, το γονίδιο *lmo2672* υποεκφράστηκε 1 φορά, παρέμεινε σταθερό 59 φορές και υπερεκφράστηκε 38 φορές (**Πίνακας 30**).



Σχήμα 14 Έκφραση του γονιδίου *inlJ* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές log₂.



Σχήμα 15 Έκφραση του γονιδίου *lmo2470* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 .

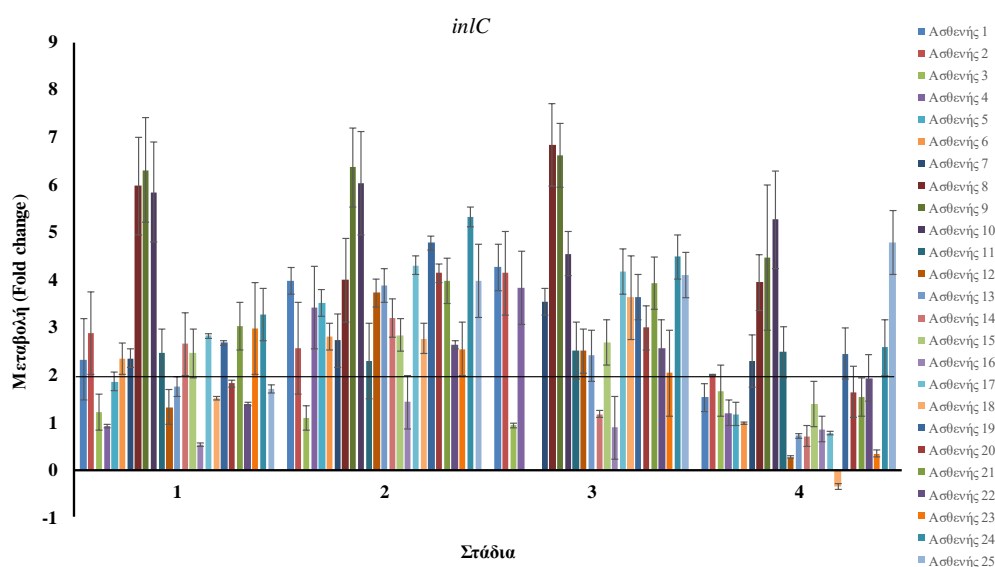


Σχήμα 16 Έκφραση του γονιδίου *lmo2672* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 .

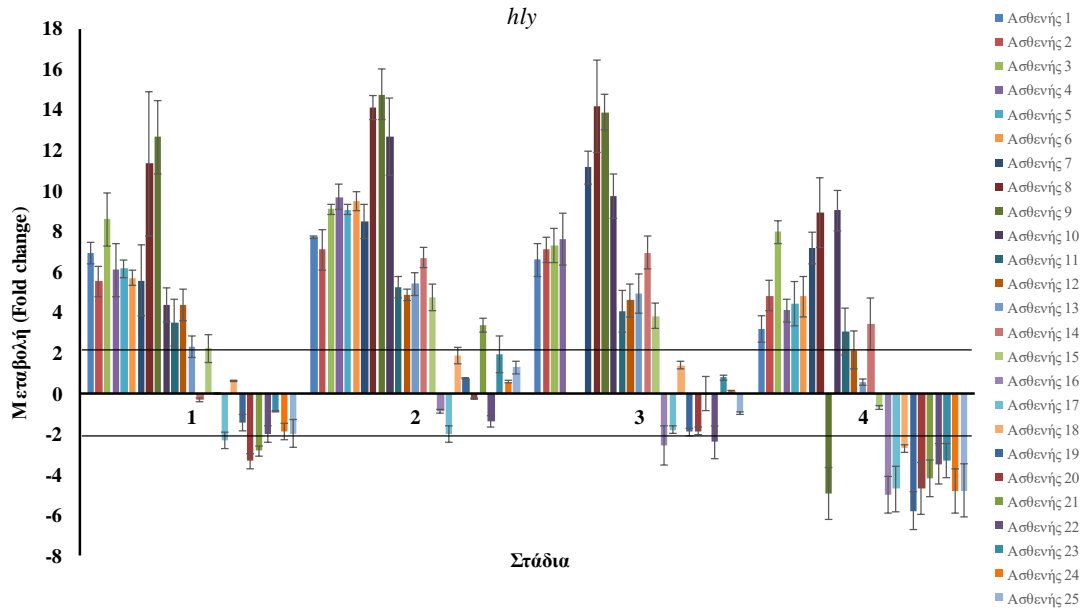
Τέλος, στα **Σχήματα 17** και **18** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της έκφρασης των γονιδίων *inlC* και *hly*.

Το γονίδιο *inlC* παρουσίασε σταθερότητα έκφρασης καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας σε δύο ασθενείς (3, 16), ενώ στους υπόλοιπους είτε υπερεκφράστηκε είτε παρέμεινε σταθερό. Σε γενικές γραμμές ωστόσο παρουσίασε έντονη τάση υπερέκφρασης σε όλα τα στάδια δειγματοληψίας, με τιμές που κυμάνθηκαν από 2.34 ± 0.20 έως 6.83 ± 0.87 φορές (**Σχήμα 17**). Συνολικά, το γονίδιο παρέμεινε σταθερό σε 32 περιπτώσεις και υπερεκφράστηκε σε 66 (**Πίνακας 30**).

Το γονίδιο *hly* δεν παρουσίασε συνεχόμενα σταθερή έκφραση σε κάποιον ασθενή. Αντιθέτως, παρουσίασε μικτή απόκριση χωρίς όμως την ύπαρξη κάποιου μοτίβου (**Σχήμα 18**). Συγκεκριμένα, υποεκφράστηκε από 2.29 ± 0.19 έως 5.78 ± 0.93 φορές και υπερεκφράστηκε από 2.25 ± 0.17 έως 14.77 ± 1.22 φορές, ενώ η υποέκφρασή του παρατηρήθηκε σε 16 περιπτώσεις και η υπερέκφρασή του σε 55 (**Πίνακας 30**).

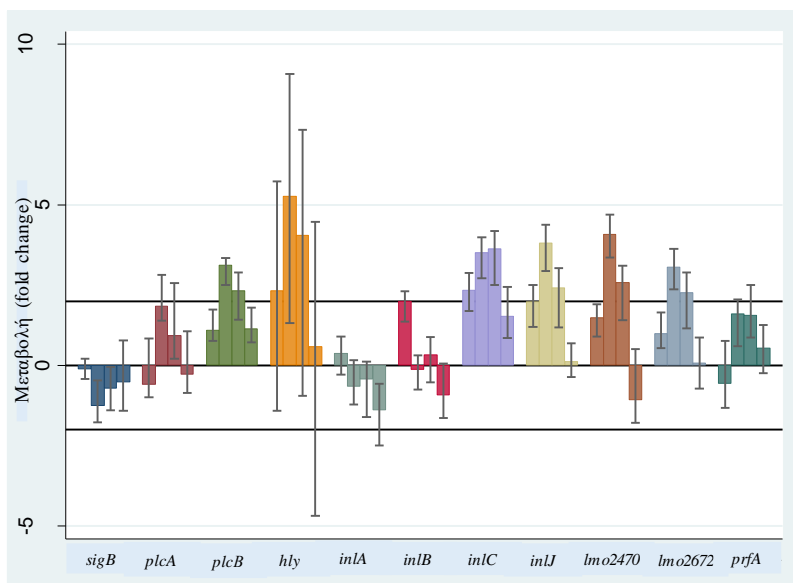


Σχήμα 17 Έκφραση του γονιδίου *inlC* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 .

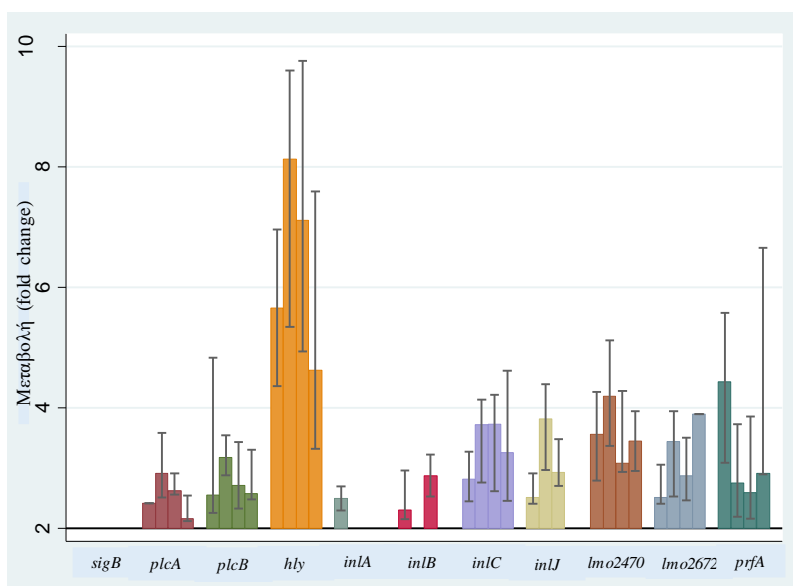


Σχήμα 18 Έκφραση του γονιδίου *hly* στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας, έπειτα από έκθεση της *L. monocytogenes* σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό είκοσι πέντε ασθενών. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 .

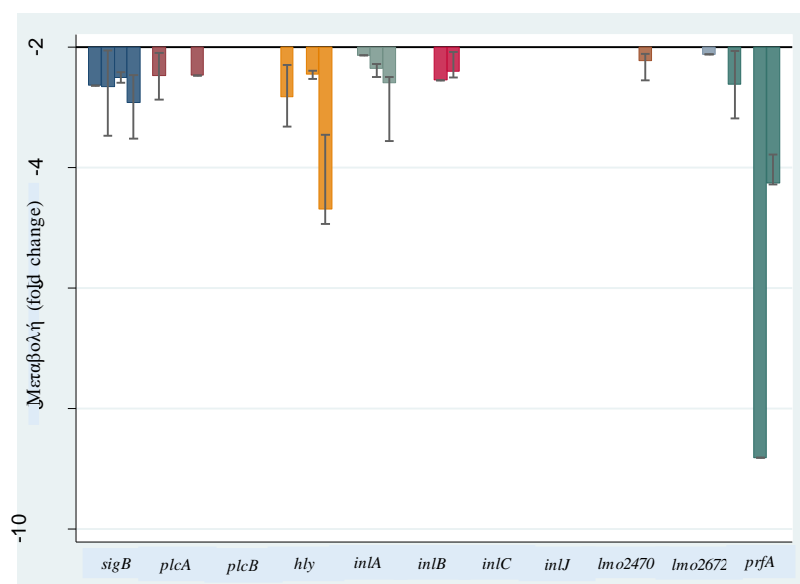
Στον **Πίνακα 30** παρουσιάζεται αναλυτικά η έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων στο σύνολο των ασθενών, για κάθε στάδιο δειγματοληψίας και για το σύνολό τους. Στην περίπτωση 2 ασθενών (5 και 6), η έλλειψη επαρκούς ποσότητας δείγματος δεν επέτρεψε τη μελέτη της έκφρασης κατά το 3^ο Στάδιο δειγματοληψίας για το σύνολο των γονιδίων. Ως εκ τούτου, η έκφραση των γονιδίων στους δύο αυτούς ασθενείς παρέμεινε άγνωστη για το στάδιο αυτό. Τα αποτελέσματα της ομαδοποίησης της έκφρασης των γονιδίων, κατέδειξαν ότι τα γονίδια *sigB*, *inlA* και *inlB* παρουσίασαν τη μεγαλύτερη σταθερότητα έκφρασης στο σύνολο των εξεταζόμενων σημείων δειγματοληψίας. Επιπλέον, φάνηκε ότι το *hly* είναι το γονίδιο που παρουσίασε την υψηλότερη υπερέκφραση, συμπέρασμα που προκύπτει και από το **Σχήμα 19**. Τέλος, από τη σύγκριση των **Σχημάτων 20** και **21** προέκυψε το συμπέρασμα ότι σε γενικές γραμμές τα γονίδια είχαν μεγαλύτερη τάση υπερέκφρασης απ' ότι υπό-έκφρασης κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης μελέτης.



Σχήμα 19 Έκφραση των γονιδίων στο σύνολο των ασθενών κατά τη διάρκεια των τεσσάρων σταδίων δειγματοληψίας. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη διάμεση τιμή της μεταβολής της έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου για το σύνολο των ασθενών και δίνεται σε τιμές \log_2 . Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.



Σχήμα 20 Γονιδιακή έκφραση στα διαφορετικά στάδια δειγματοληψίας, για τα δείγματα στα οποία παρατηρήθηκε υπερέκφραση των υπό μελέτη γονιδίων. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη διάμεση τιμή της υπερέκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 . Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στο πρώτο (25%) και τρίτο (75%) τεταρτημόριο.



Σχήμα 21 Γονιδιακή έκφραση στα διαφορετικά στάδια δειγματοληψίας, για τα δείγματα στα οποία παρατηρήθηκε υποέκφραση των υπό μελέτη γονιδίων. Η κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη διάμεση τιμή της υποέκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου και δίνεται σε τιμές \log_2 . Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στο πρώτο (25%) και τρίτο (75%) τεταρτημόριο.

Πίνακας 30 Έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων ανά στάδιο δειγματοληψίας, για το σύνολο των ασθενών.

	Στάδιο				Συνολικά N (%)
	1 N (%)	2 N (%)	3 N (%)	4 N (%)	
<i>sigB</i>					
≤-2	1 (4.0)	6 (24.0)	4 (16.0)	4 (16.0)	15 (15.0)
-1.9 to 1.9	24 (96.0)	19 (76.0)	19 (76.0)	21 (84.0)	83 (83.0)
άγνωστο ^a	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (2.0)
<i>plcA</i>					
≤-2	2 (8.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.0)	3 (3.0)
-1.9 to 1.9	22 (88.0)	13 (52.0)	16 (64.0)	20 (80.0)	71 (71.0)
≥2	1 (4.0)	12 (48.0)	7 (28.0)	4 (16.0)	24 (24.0)
άγνωστο	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (2.0)
<i>plcB</i>					
-1.9 to 1.9	21 (84.0)	5 (20.0)	8 (32.0)	20 (80.0)	54 (54.0)
≥2	4 (16.0)	20 (80.0)	15 (60.0)	5 (20.0)	44 (44.0)
άγνωστο	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (2.0)
<i>hly</i>					
≤-2	3 (12.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	11 (44.0)	16 (16.0)
-1.9 to 1.9	8 (32.0)	9 (36.0)	8 (32.0)	2 (8.0)	27 (27.0)
≥2	14 (56.0)	16 (64.0)	13 (52.0)	12 (48.0)	55 (55.0)
άγνωστο	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (2.0)
<i>inlA</i>					
≤-2	0 (0.0)	1 (4.0)	4 (16.0)	9 (36.0)	14 (14.0)
-1.9 to 1.9	23 (92.0)	24 (96.0)	19 (76.0)	16 (64.0)	82 (82.0)
≥2	2 (8.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.0)
άγνωστο	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (2.0)

Πίνακας 30 (συνέχεια)

	Στάδιο				Συνολικά N (%)
	1 N (%)	2 N (%)	3 N (%)	4 N (%)	
<i>inlB</i>					
≤-2	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.0)	5 (20.0)	6 (6.0)
-1.9 to 1.9	12 (48.0)	25 (100.0)	20 (80.0)	20 (80.0)	77 (77.0)
≥2	13 (52.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	15 (15.0)
άγνωστο	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (2.0)
<i>inlC</i>					
-1.9 to 1.9	10 (40.0)	2 (8.0)	3 (12.0)	17 (68.0)	32 (32.0)
≥2	15 (60.0)	23 (92.0)	20 (80.0)	8 (32.0)	66 (66.0)
άγνωστο	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (2.0)
<i>inlJ</i>					
-1.9 to 1.9	13 (52.0)	1 (4.0)	9 (36.0)	25 (100.0)	48 (48.0)
≥2	12 (48.0)	24 (96.0)	14 (56.0)	0 (0.0)	50 (50.0)
άγνωστο	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (2.0)
<i>lmo2470</i>					
≤-2	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (20.0)	5 (5.0)
-1.9 to 1.9	19 (76.0)	1 (4.0)	10 (40.0)	18 (72.0)	48 (48.0)
≥2	6 (24.0)	24 (96.0)	13 (52.0)	2 (8.0)	45 (45.0)
άγνωστο	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (2.0)
<i>lmo2672</i>					
≤-2	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.0)	1 (1.0)
-1.9 to 1.9	20 (80.0)	5 (20.0)	11 (44.0)	23 (92.0)	59 (59.0)
≥2	5 (20.0)	20 (80.0)	12 (48.0)	1 (4.0)	38 (38.0)
άγνωστο	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (2.0)
<i>prfA</i>					
≤-2	2 (8.0)	0 (0.0)	1 (4.0)	3 (12.0)	6 (6.0)
-1.9 to 1.9	19 (76.0)	18 (72.0)	12 (48.0)	19 (76.0)	68 (68.0)
≥2	4 (16.0)	7 (28.0)	10 (40.0)	3 (12.0)	24 (24.0)
άγνωστο	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (2.0)
	Median^b (IQR^c)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)
<i>sigB</i>	-0.1 (-0.4, 0.2)	-1.3 (-1.8, -0.5)	-0.7 (-1.4, -0.0)	-0.5 (-1.4, 0.8)	-0.5 (-1.4, 0.2)
<i>plcA</i>	-0.6 (-1.0, 0.8)	1.8 (1.4, 2.8)	0.9 (0.2, 2.6)	-0.3 (-0.9, 1.1)	0.9 (-0.6, 1.9)
<i>plcB</i>	1.1 (0.8, 1.7)	3.1 (2.5, 3.3)	2.3 (1.4, 2.9)	1.1 (0.7, 1.8)	1.8 (0.9, 2.8)
<i>hly</i>	2.3 (-1.4, 5.7)	5.3 (1.3, 9.1)	4.1 (-1.0, 7.3)	0.6 (-4.7, 4.5)	3.4 (-1.4, 7.0)
<i>inlA</i>	0.4 (-0.3, 0.9)	-0.6 (-1.2, 0.2)	-0.4 (-1.6, 0.1)	-1.4 (-2.5, -0.6)	-0.4 (-1.4, 0.4)
<i>inlB</i>	2.0 (1.4, 2.3)	-0.1 (-0.8, 0.3)	0.3 (-0.5, 0.9)	-0.9 (-1.6, 0.1)	0.2 (-0.8, 1.4)
<i>inlC</i>	2.3 (1.7, 2.9)	3.5 (2.7, 4.0)	3.6 (2.5, 4.2)	1.5 (0.9, 2.4)	2.6 (1.6, 3.9)
<i>inlJ</i>	2.0 (1.2, 2.5)	3.8 (2.9, 4.4)	2.4 (1.2, 3.0)	0.1 (-0.4, 0.7)	2.0 (0.8, 3.0)
<i>lmo2470</i>	1.5 (0.9, 1.9)	4.1 (3.4, 4.7)	2.6 (1.4, 3.1)	-1.1 (-1.8, 0.5)	1.8 (0.7, 3.5)
<i>lmo2672</i>	1.0 (0.5, 1.7)	3.1 (2.4, 3.6)	2.3 (1.1, 2.9)	0.1 (-0.7, 0.9)	1.6 (0.5, 2.6)
<i>prfA</i>	-0.6 (-1.3, 0.8)	1.6 (0.6, 2.1)	1.6 (0.9, 2.5)	0.5 (-0.2, 1.3)	0.8 (-0.4, 2.0)

^aάγνωστο:μη ικανότητα υπολογισμού έκφρασης λόγω έλλειψης δειγμάτων

^bmedian:η διάμεση τιμή της έκφρασης του κάθε γονιδίου για το σύνολο των ασθενών

^cIQR:διατεταρτημοριακό εύρος (interquartile range), 25^ο και 75^ο εκατοστημόριο

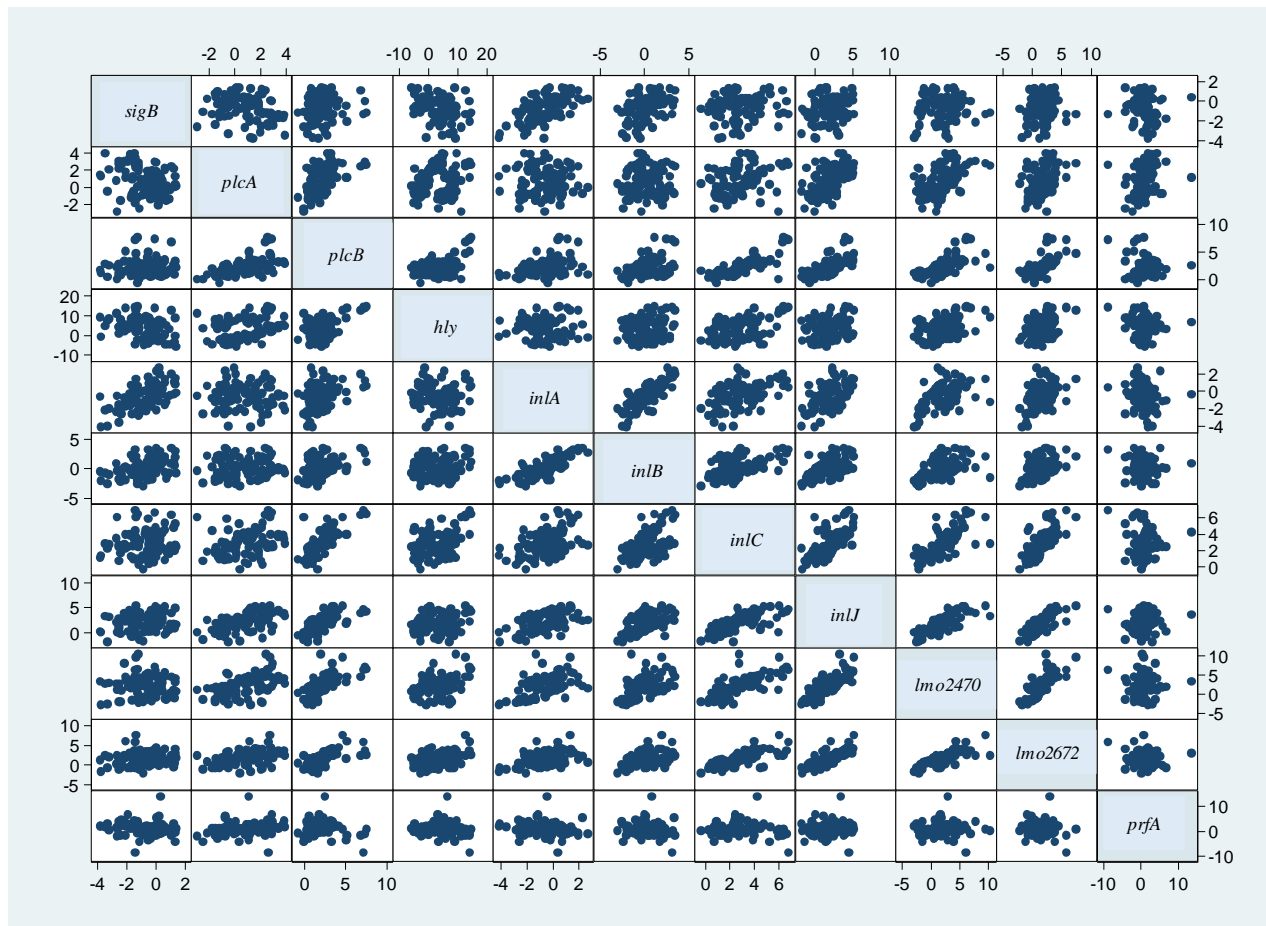
Ενδιαφέρον προκάλεσαν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αξιολόγηση της συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων στο σύνολο των σταδίων δειγματοληψίας, αλλά και σε κάθε στάδιο ξεχωριστά (Πίνακας 31, 32, 33, 34, 35· Σχήμα 22, 23, 24, 25, 26). Τα αποτελέσματα αυτά κατέδειξαν ότι στο σύνολο των σταδίων δειγματοληψίας υπήρξε μικρή συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *sigB* και των γονιδίων *plcA*, *hly*, *inlA*, *inlB* και *prfA*, καθώς και μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *plcA* και των γονιδίων *plcB*, *hly*, *inlC*, *inlJ*, *lmo2470*, *lmo2672* και *prfA*. Παρόμοια συσχέτιση παρατηρήθηκε και μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *hly* και των γονιδίων *inlC*, *lmo2470* και *lmo2672*. Ωστόσο, η μεμονωμένη μελέτη του

κάθε σταδίου δειγματοληψίας δεν έδειξε επαναληψιμότητα ως προς αυτές τις συσχετίσεις. Αντιθέτως, και στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας φάνηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *plcB* και των γονιδίων *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ* και *lmo2470*, ενώ σημαντική αποδείχθηκε και η συσχέτιση της έκφρασης των υπό μελέτη ιντερναλινών.

Πίνακας 31 Συντελεστές συσχέτισης (rho) και τιμές σημαντικότητας (p values), για την αξιολόγηση της συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης σε όλα τα στάδια δειγματοληψίας.

		<i>sigB</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>hly</i>	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>inlC</i>	<i>inlJ</i>	<i>lmo2470</i>	<i>lmo2672</i>	<i>prfA</i>
<i>sigB</i>		1										
<i>plcA</i>	rho	-0.2733^a	1									
	P	0.0065										
<i>plcB</i>	rho	0.0098	0.5835	1								
	P	0.924	0									
<i>hly</i>	rho	-0.382	0.2588	0.2542	1							
	P	0.0001	0.0101	0.0116								
<i>inlA</i>	rho	0.5538	0.0007	0.3297	-0.097	1						
	P	<0.001	0.9944	0.0009	0.3418							
<i>inlB</i>	rho	0.4154	0.0187	0.3246	0.0453	0.7834	1					
	P	<0.001	0.8551	0.0011	0.6577	<0.001						
<i>inlC</i>	rho	0.0918	0.3785	0.8003	0.2813	0.4536	0.4834	1				
	P	0.3684	0.0001	<0.001	0.005	<0.001	<0.001					
<i>inlJ</i>	rho	0.1385	0.5531	0.7657	0.1752	0.5266	0.4672	0.7345	1			
	P	0.1737	<0.001	<0.001	0.0845	<0.001	<0.001	<0.001				
<i>lmo2470</i>	rho	-0.0229	0.5166	0.7688	0.3469	0.4645	0.3993	0.7641	0.8131	1		
	P	0.8228	<0.001	<0.001	0.0005	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001			
<i>lmo2672</i>	rho	0.0998	0.4664	0.7744	0.3257	0.4423	0.3374	0.7704	0.8236	0.8412	1	
	P	0.3282	<0.001	<0.001	0.0011	<0.001	0.0007	<0.001	<0.001	<0.001		
<i>prfA</i>	rho	-0.2577	0.4059	0.238	0.0729	-0.2126	-0.1601	0.1334	0.1526	0.1439	0.0917	1
	P	0.0104	<0.001	0.0183	0.4755	0.0356	0.1154	0.1902	0.1337	0.1575	0.3694	

^aοι στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις έχουν επισημανθεί με έντονη γραμματοσειρά

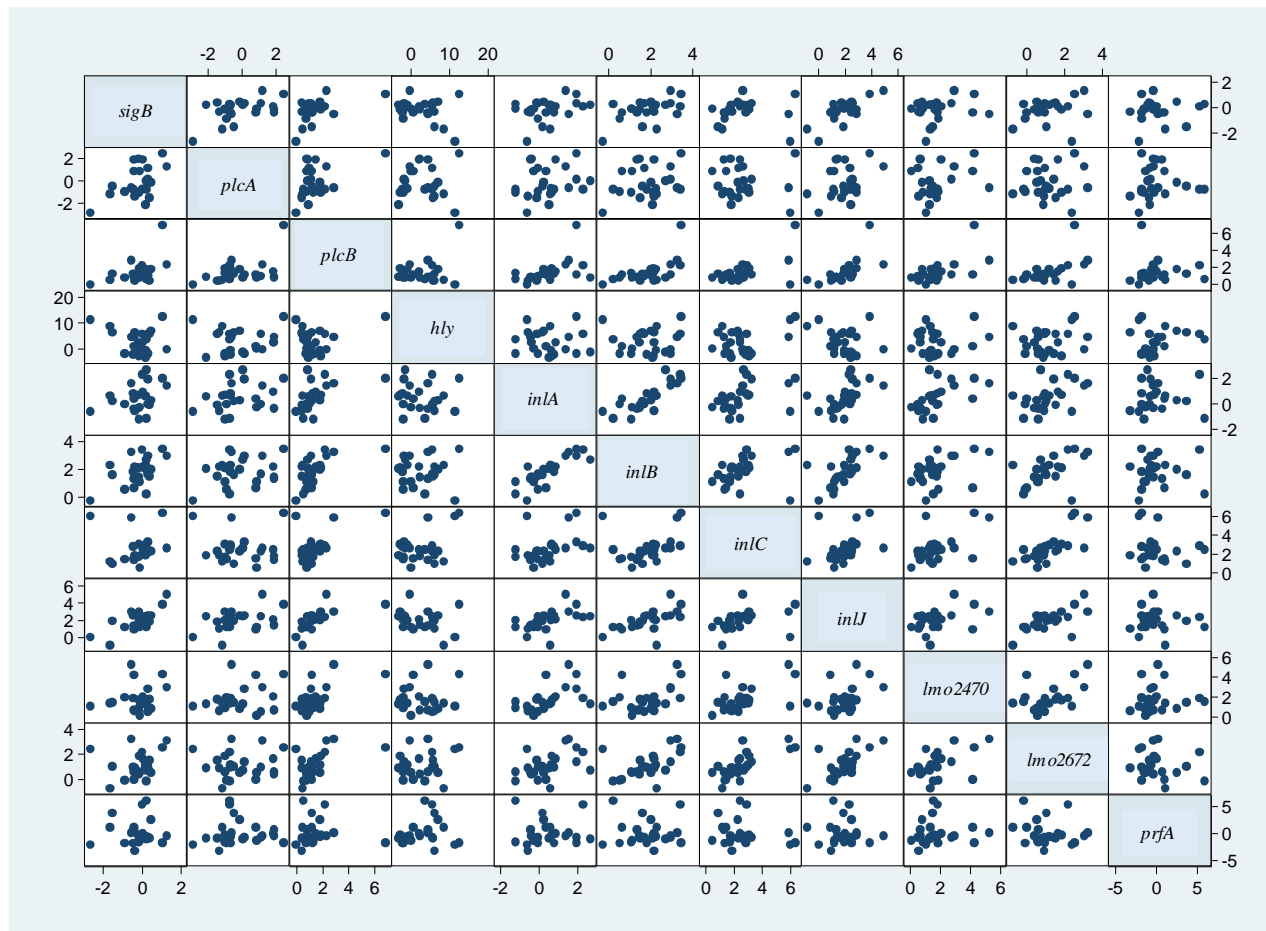


Σχήμα 22 Διάγραμμα διασποράς συσχέτισης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων σε όλα τα στάδια δειγματοληψίας.

Πίνακας 32 Συντελεστές συσχέτισης (rho) και τιμές σημαντικότητας (p values), για την αξιολόγηση της συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης κατά το 1^ο Στάδιο δειγματοληψίας.

		<i>sigB</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>hly</i>	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>inlC</i>	<i>inlJ</i>	<i>lmo2470</i>	<i>lmo2672</i>	<i>prfA</i>
<i>sigB</i>		1										
<i>plcA</i>	rho	0.3262	1									
	p	0.1116										
<i>plcB</i>	rho	0.3131	0.3992	1								
	p	0.1275	0.048									
<i>hly</i>	rho	-0.0485	0.0554	-0.1708	1							
	p	0.8181	0.7926	0.4144								
<i>inlA</i>	rho	0.2862	0.28	0.64	-0.1546	1						
	p	0.1655	0.1752	0.0006	0.4605							
<i>inlB</i>	rho	0.3531	0.2	0.5892	0.0715	0.8492	1					
	p	0.0834	0.3378	0.0019	0.734	<0.001						
<i>inlC</i>	rho	0.3062	-0.02	0.4331	0.0162	0.5254	0.5054	1				
	p	0.1366	0.9244	0.0306	0.9389	0.007	0.01					
<i>inlJ</i>	rho	0.5592^a	0.3215	0.7831	-0.2831	0.6938	0.6631	0.5746	1			
	p	0.0037	0.117	<0.001	0.1703	0.0001	0.0003	0.0027				
<i>lmo2470</i>	rho	0.0915	0.1146	0.5208	-0.1169	0.6315	0.4169	0.4708	0.3954	1		
	p	0.6634	0.5854	0.0076	0.5778	0.0007	0.0381	0.0175	0.0504			
<i>lmo2672</i>	rho	0.2146	0.05	0.5354	0.1223	0.4977	0.5531	0.7262	0.6008	0.4446	1	
	p	0.3029	0.8124	0.0058	0.5603	0.0114	0.0041	<0.001	0.0015	0.026		
<i>prfA</i>	rho	0.0277	0.2223	0.2846	0.1831	0.15	0.1146	-0.16	0.0031	0.1746	-0.1392	1
	p	0.8955	0.2855	0.1679	0.3811	0.4742	0.5854	0.4449	0.9884	0.4038	0.5068	

^aοι στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις έχουν επισημανθεί με έντονη γραμματοσειρά

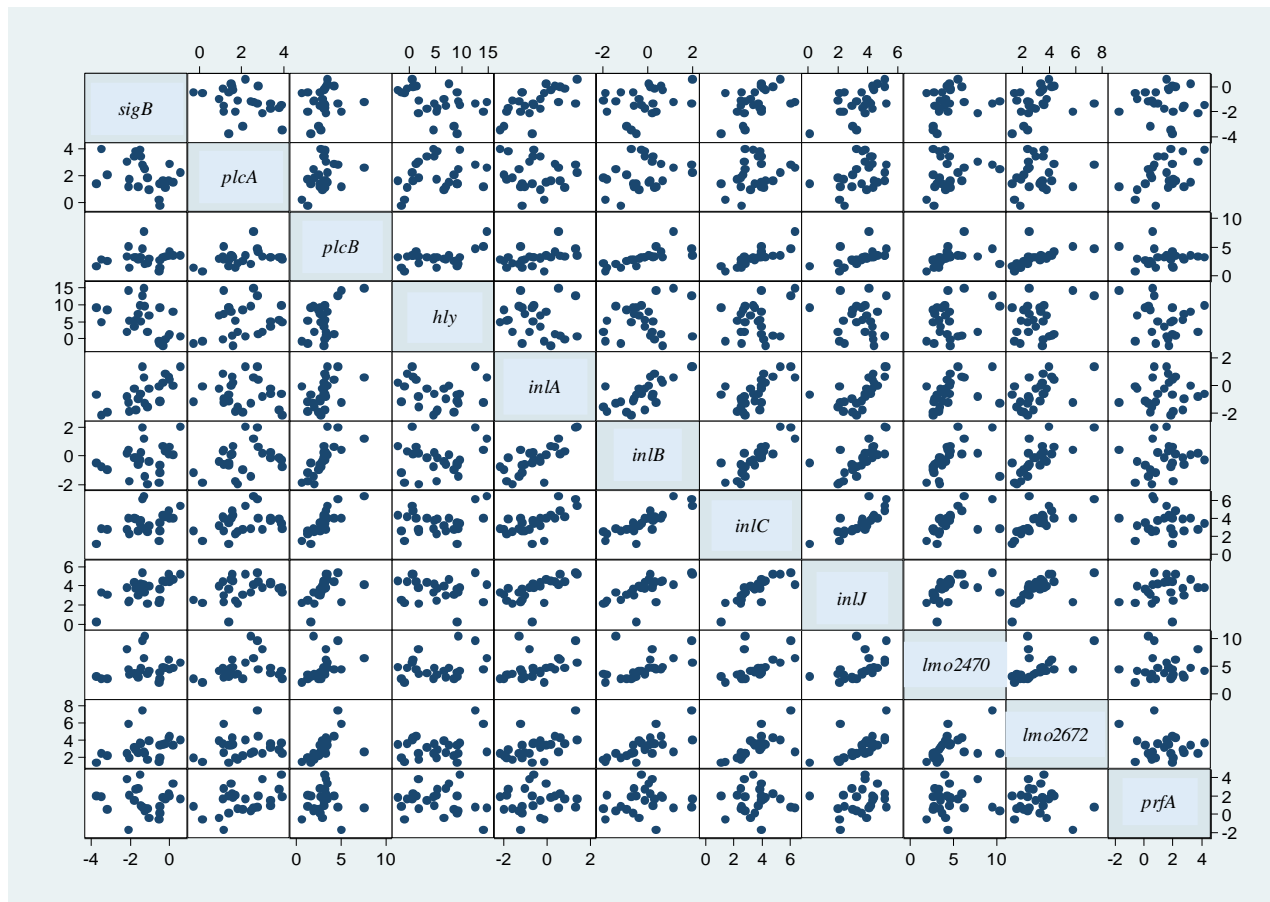


Σχήμα 23 Διάγραμμα διασποράς συσχέτισης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κατά το 1^ο Στάδιο δειγματοληψίας.

Πίνακας 33 Συντελεστές συσχέτισης (rho) και τιμές σημαντικότητας (p values), για την αξιολόγηση της συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης κατά το 2^ο Στάδιο δειγματοληψίας.

		<i>sigB</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>hly</i>	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>inlC</i>	<i>inlJ</i>	<i>lmo2470</i>	<i>lmo2672</i>	<i>prfA</i>
<i>sigB</i>		1										
<i>plcA</i>	rho	-0.3462	1									
	p	0.0901										
<i>plcB</i>	rho	0.2346	0.32	1								
	p	0.259	0.1189									
<i>hly</i>	rho	-0.4538	0.1862	0.2023	1							
	p	0.0227	0.373	0.3321								
<i>inlA</i>	rho	0.65^a	-0.1177	0.5769	-0.21	1						
	p	0.0004	0.5753	0.0025	0.3137							
<i>inlB</i>	rho	0.2854	0.2331	0.8869	0.03	0.7115	1					
	p	0.1667	0.2622	<0.001	0.8868	0.0001						
<i>inlC</i>	rho	0.4431	0.2169	0.8577	0.0615	0.6677	0.8608	1				
	p	0.0265	0.2976	<0.001	0.7701	0.0003	<0.001					
<i>inlJ</i>	rho	0.5546	0.28	0.6946	-0.1538	0.7577	0.7538	0.8385	1			
	p	0.004	0.1752	0.0001	0.4628	<0.001	<0.001	<0.001				
<i>lmo2470</i>	rho	0.3723	0.1815	0.6469	0.1385	0.5792	0.6738	0.6869	0.6823	1		
	p	0.0668	0.3851	0.0005	0.5092	0.0024	0.0002	0.0001	0.0002			
<i>lmo2672</i>	rho	0.4046	0.1246	0.7892	0.1069	0.6008	0.7708	0.7985	0.7485	0.5938	1	
	p	0.0448	0.5528	<0.001	0.611	0.0015	<0.001	<0.001	<0.001	0.0017		
<i>prfA</i>	rho	-0.0508	0.3869	0.1977	-0.15	0.0808	0.18	0.0146	0.2677	0.0492	0.0485	1
	p	0.8096	0.056	0.3435	0.4742	0.7011	0.3892	0.9447	0.1958	0.8152	0.8181	

^aοι στατιστικές σημαντικές συσχετίσεις έχουν επισημανθεί με έντονη γραμματοσειρά

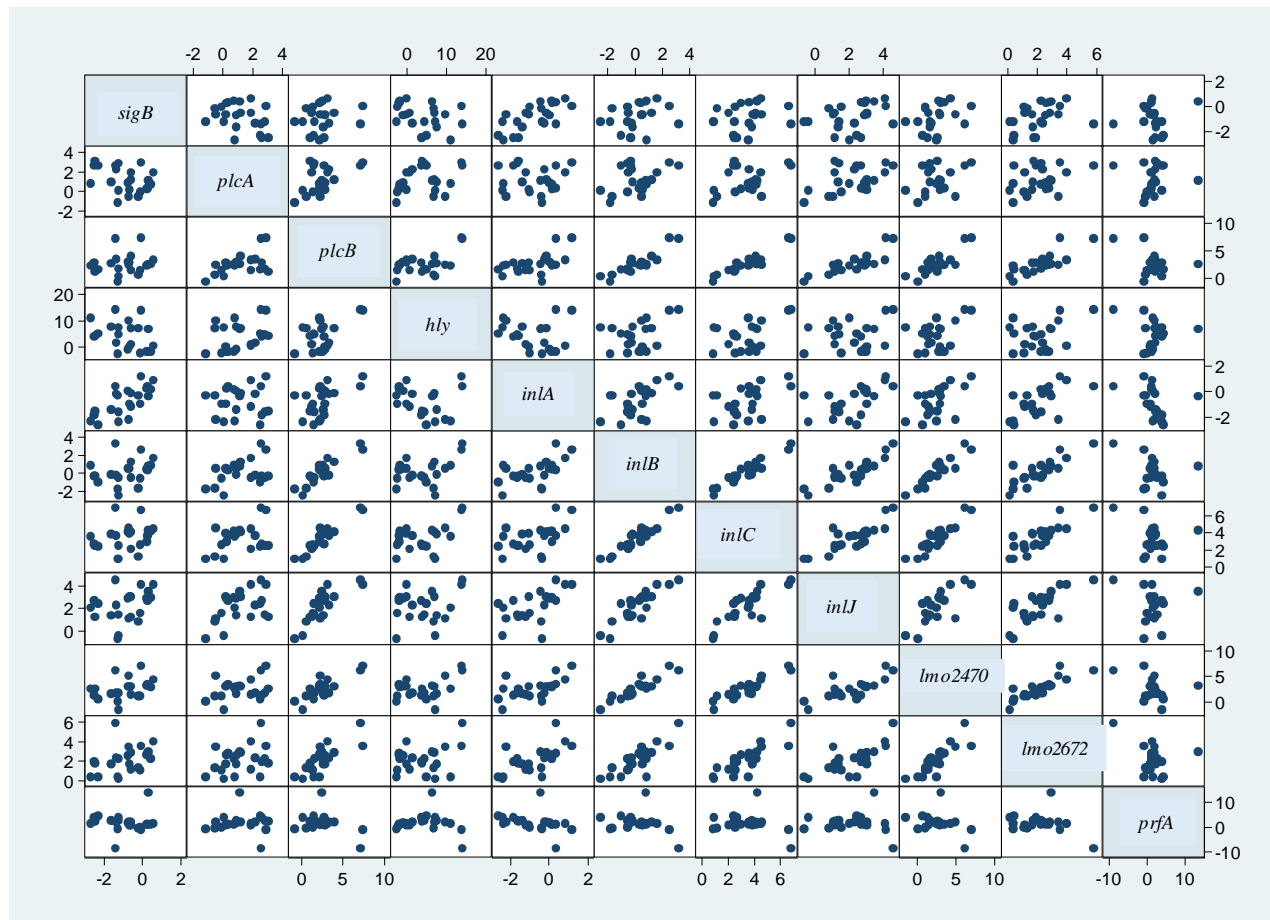


Σχήμα 24 Διάγραμμα διασποράς συσχέτισης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κατά το 2^ο Στάδιο δειγματοληψίας.

Πίνακας 34 Συντελεστές συσχέτισης (rho) και τιμές σημαντικότητας (p values), για την αξιολόγηση της συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης κατά το 3^ο Στάδιο δειγματοληψίας.

		<i>sigB</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>hly</i>	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>inlC</i>	<i>inlJ</i>	<i>lmo2470</i>	<i>lmo2672</i>	<i>prfA</i>
<i>sigB</i>		1										
<i>plcA</i>	rho	-0.2777	1									
	p	0.1996										
<i>plcB</i>	rho	0.1265	0.4289	1								
	p	0.5652	0.0412									
<i>hly</i>	rho	-0.3686	0.3261	0.2698	1							
	p	0.0835	0.1289	0.2132								
<i>inlA</i>	rho	0.6413^a	0.0425	0.5198	-0.2767	1						
	p	0.001	0.8474	0.011	0.2012							
<i>inlB</i>	rho	0.3083	0.2856	0.83	0.2826	0.5652	1					
	p	0.1524	0.1865	<0.001	0.1914	0.0049						
<i>inlC</i>	rho	0.3379	0.2243	0.8508	0.3063	0.5217	0.9209	1				
	p	0.1148	0.3035	<0.001	0.1551	0.0107	<0.001					
<i>inlJ</i>	rho	0.3874	0.4091	0.8063	0.0662	0.6265	0.8409	0.7698	1			
	p	0.0678	0.0526	<0.001	0.7641	0.0014	<0.001	<0.001				
<i>lmo2470</i>	rho	0.4249	0.2204	0.6828	0.1759	0.6097	0.8557	0.8765	0.7194	1		
	p	0.0433	0.3123	0.0003	0.4221	0.002	<0.001	<0.001	0.0001			
<i>lmo2672</i>	rho	0.4358	0.3557	0.7253	0.1808	0.6542	0.7312	0.8261	0.6947	0.8725	1	
	p	0.0377	0.0957	0.0001	0.409	0.0007	0.0001	<0.001	0.0002	<0.001		
<i>prfA</i>	rho	-0.335	0.2925	-0.0949	0.2036	-0.6067	-0.2372	-0.1453	-0.1611	-0.2648	-0.1077	1
	p	0.1182	0.1756	0.6668	0.3515	0.0021	0.2759	0.5084	0.4628	0.222	0.6247	

^aοι στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις έχουν επισημανθεί με έντονη γραμματοσειρά

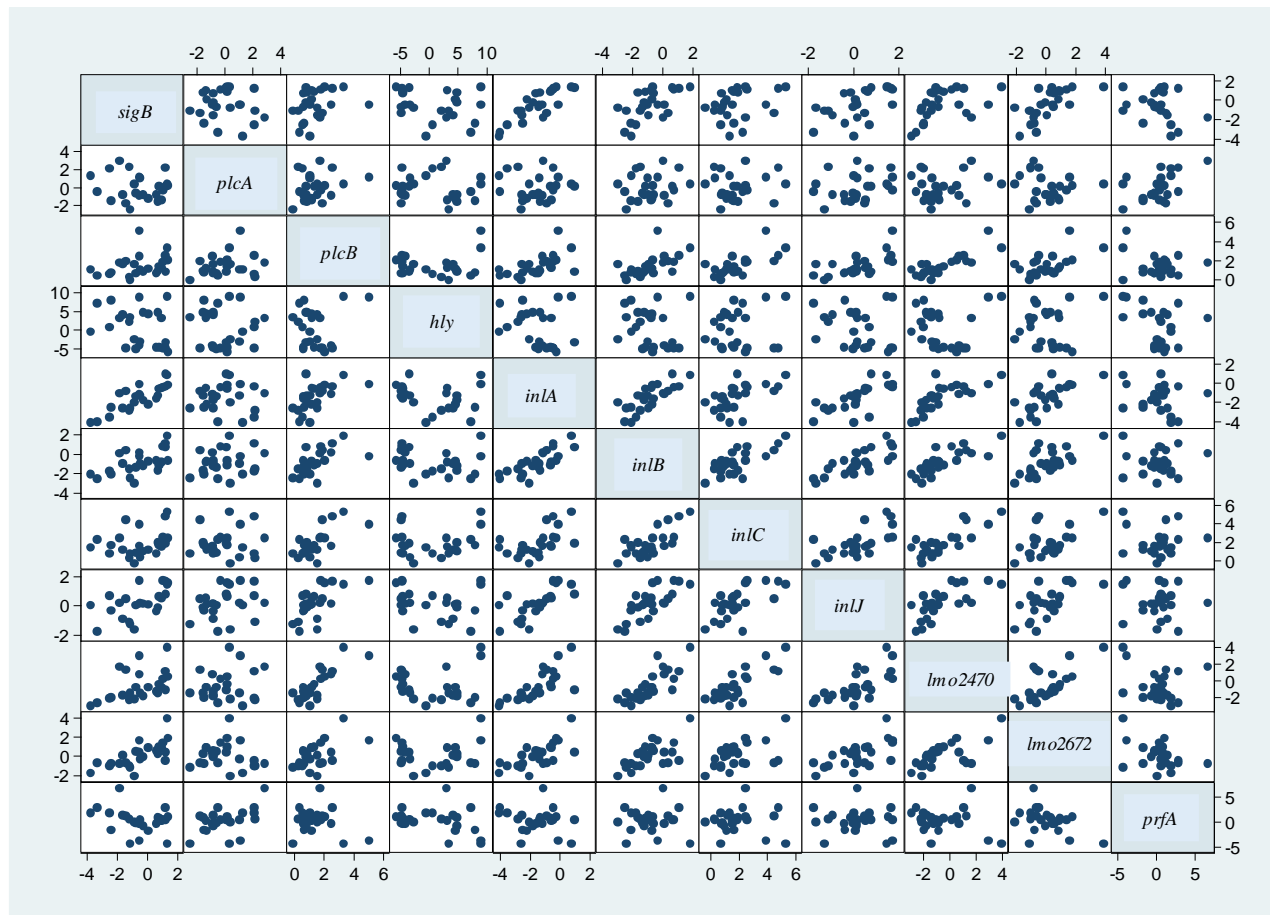


Σχήμα 25 Διάγραμμα διασποράς συσχέτισης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κατά το 3^ο Στάδιο δειγματοληψίας.

Πίνακας 35 Συντελεστές συσχέτισης (rho) και τιμές σημαντικότητας (p values), για την αξιολόγηση της συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης κατά το 4^ο Στάδιο δειγματοληψίας.

		<i>sigB</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>hly</i>	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>inlC</i>	<i>inlJ</i>	<i>lmo2470</i>	<i>lmo2672</i>	<i>prfA</i>
<i>sigB</i>		1										
<i>plcA</i>	rho	-0.04	1									
	p	0.8494										
<i>plcB</i>	rho	0.4108	0.1962	1								
	p	0.0414	0.3474									
<i>hly</i>	rho	-0.2508	-0.1208	-0.1423	1							
	p	0.2266	0.5653	0.4974								
<i>inlA</i>	rho	0.7954^a	0.0846	0.6962	-0.2538	1						
	p	<0.001	0.6876	0.0001	0.2208							
<i>inlB</i>	rho	0.6085	0.1169	0.6838	-0.2915	0.7985	1					
	p	0.0012	0.5778	0.0002	0.1574	<0.001						
<i>inlC</i>	rho	0.3315	0.0308	0.6577	0.0392	0.6554	0.6392	1				
	p	0.1054	0.8839	0.0004	0.8523	0.0004	0.0006					
<i>inlJ</i>	rho	0.5854	0.3262	0.6446	-0.2592	0.7885	0.7308	0.6092	1			
	p	0.0021	0.1116	0.0005	0.2108	<0.001	<0.001	0.0012				
<i>lmo2470</i>	rho	0.5554	0.03	0.7608	-0.2269	0.8485	0.8408	0.6808	0.7162	1		
	p	0.004	0.8868	<0.001	0.2753	<0.001	<0.001	0.0002	0.0001			
<i>lmo2672</i>	rho	0.7508	-0.1477	0.4631	-0.0723	0.6946	0.6	0.4438	0.5692	0.6415	1	
	p	<0.001	0.4811	0.0197	0.7312	0.0001	0.0015	0.0262	0.003	0.0005		
<i>prfA</i>	rho	-0.2862	0.4069	0.0277	-0.32	-0.1415	-0.0392	0.1885	0.0369	-0.1454	-0.3646	1
	p	0.1655	0.0435	0.8955	0.1189	0.4998	0.8523	0.367	0.8609	0.4881	0.0731	

^aοι στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις έχουν επισημανθεί με έντονη γραμματοσειρά



Σχήμα 26 Διάγραμμα διασποράς συσχέτισης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κατά το 4^ο Στάδιο δειγματοληψίας.

Τέλος, στους **Πίνακες 36-51** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική μελέτη της σχέσης της γονιδιακής υπερέκφρασης με το pH, τη γαστρική ατροφία, τη λήψη των PPIs και το στάδιο δειγματοληψίας.

Σύμφωνα με την μονοπαραγοντική ανάλυση, το γονίδιο *plcA* ήταν πιο πιθανό να υπερέκφραστεί στο 2^ο και 3^ο Στάδιο σε σύγκριση με το 1^ο Στάδιο δειγματοληψίας [O.R.=22.2, 95% C.I. (3.01, 162.90), p=0.002 για το 2^ο Στάδιο, O.R.=10.0, 95% C.I. (1.47, 67.94) p=0.018 για το 3^ο Στάδιο]. Επιπλέον, κάθε μονάδα αύξησης του pH μείωνε την πιθανότητα υπερέκφρασης του *plcA* κατά 24%, ενώ η λήψη των PPIs και η ατροφία δεν φάνηκε να επηρεάζουν σημαντικά την πιθανότητα υπερέκφρασης του γονιδίου αυτού (**Πίνακας 36**). Παρομοίως, το γονίδιο *plcB* ήταν πιο πιθανό να υπερέκφραστεί στο 2^ο και 3^ο Στάδιο συγκριτικά με το 1^ο Στάδιο δειγματοληψίας (O.R.=22.2, 95% C.I. (3.01, 162.90), p=0.002 για το 2^ο Στάδιο, O.R.=10.0, 95% C.I. (1.47, 67.94) p=0.018 για το 3^ο Στάδιο). Ωστόσο στη συγκεκριμένη περίπτωση, εκτός από τη λήψη των PPIs και την ατροφία, ούτε το pH φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την πιθανότητα υπερέκφρασης του γονιδίου (**Πίνακας 37**). Το ίδιο ίσχυσε και στην περίπτωση του γονιδίου *hly*, για το οποίο και η αλλαγή των σταδίων δε φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την πιθανότητα υπερέκφρασής του, ενώ επιπλέον τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κάθε μονάδα αύξησης του pH μείωνε την πιθανότητα υπερέκφρασής του κατά 13% (**Πίνακας 38**). Για το γονίδιο *inlB* φάνηκε ότι η λήψη των PPIs σχετίστηκε με 58% μικρότερη πιθανότητα υπερέκφρασής του (**Πίνακας 40**), ενώ όσον αφορά στο γονίδιο *inlA* η υπερέκφρασή του δεν φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά από το pH (**Πίνακας 39**). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το γονίδιο *inlC* είχε μεγαλύτερη πιθανότητα υπερέκφρασης στο 2^ο και 3^ο Στάδιο συγκριτικά με το 1^ο Στάδιο δειγματοληψίας [O.R.=7.67, 95% C.I. (1.91, 30.78), p=0.004 για το 2^ο Στάδιο, O.R.=4.62, 95% C.I. (1.27, 16.87) p=0.021 για το 3^ο Στάδιο], ενώ υπήρχε μικρότερη πιθανότητα υπερέκφρασής του στο 4^ο Στάδιο [O.R.=0.31, 95% C.I. (0.12, 0.79), p=0.014] (**Πίνακας 41**). Για το γονίδιο *inlJ* δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα (**Πίνακας 42**), όμως για τα γονίδια *lmo2470* (**Πίνακας 43**) και *lmo2672* (**Πίνακας 44**) φάνηκε ότι υπήρχε μεγαλύτερη πιθανότητα υπερέκφρασή τους στο 2^ο και 3^ο Στάδιο συγκριτικά με το 1^ο Στάδιο δειγματοληψίας. Επιπλέον, κάθε μονάδα αύξησης του pH μείωνε κατά 12% την πιθανότητα υπερέκφρασης του γονιδίου *lmo2672*. Τέλος, η μονοπαραγοντική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *prfA* έδειξε ότι υπήρχε μεγαλύτερη πιθανότητα υπερέκφρασής του στο 3^ο Στάδιο συγκριτικά με το 1^ο Στάδιο δειγματοληψίας [O.R.=3.83, 95% C.I. (1.46, 10.01), p<0.001] (**Πίνακας 45**). Για το γονίδιο *sigB*, η μη σύγκλιση των μοντέλων δεν επέτρεψε τη διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την υπερέκφρασή του.

Πίνακας 36 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *plcA* μέσω μονοπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	22.15	(3.01, 162.90)	0.002
3	10.00	(1.47, 67.94)	0.018
4	4.57	(0.44, 47.79)	0.204
pH			
ανά μονάδα	0.76	(0.62, 0.92)	0.006
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	1.71	(0.57, 5.12)	0.338
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	1.39	(0.46, 4.17)	0.556

Πίνακας 37 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *plcB* μέσω μονοπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	21.00	(5.78, 76.24)	<0.001
3	8.98	(2.46, 32.76)	0.001
4	1.31	(0.32, 5.39)	0.706
pH			
ανά μονάδα	0.94	(0.83, 1.07)	0.368
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	0.54	(0.23, 1.27)	0.158
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	0.88	(0.37, 2.11)	0.772

Πίνακας 38 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *hly* μέσω μονοπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	1.40	(0.85, 2.31)	0.192
3	1.19	(0.82, 1.73)	0.357
4	0.73	(0.38, 1.39)	0.334
pH			
ανά μονάδα	0.87	(0.78, 0.99)	0.029
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	0.50	(0.11, 2.21)	0.363
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	1.14	(0.26, 4.96)	0.863

^αOR: αναλογία πιθανοτήτων (odds ratio)

^βI.C.: διάστημα εμπιστοσύνης (interval confidence)

^γp-value: τιμή σημαντικότητας, p=0.05

*κατηγορία αναφοράς

Πίνακας 39 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *inlA* μέσω μονοπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας**	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
pH			
ανά μονάδα	1.00	(0.63, 1.59)	0.989

**Η μη σύγκλιση των μοντέλων δεν επέτρεψε την εκτίμηση της υπερέκφρασης σε σχέση με τους υπόλοιπους παράγοντες

Πίνακας 40 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *inlB* μέσω μονοπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
pH			
ανά μονάδα	0.97	(0.85, 1.10)	0.652
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	0.42	(0.19, 0.93)	0.033
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	0.93	(0.44, 1.96)	0.841

Πίνακας 41 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *inlC* μέσω μονοπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	7.67	(1.91, 30.78)	0.004
3	4.62	(1.27, 16.87)	0.021
4	0.31	(0.12, 0.79)	0.014
pH			
ανά μονάδα	0.90	(0.77, 1.05)	0.182
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	1.41	(0.52, 3.80)	0.502
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	1.94	(0.69, 5.49)	0.209

Πίνακας 42 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *inlJ* μέσω μονοπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
pH			
ανά μονάδα	0.99	(0.93, 1.06)	0.840
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	1.13	(0.79, 1.62)	0.512
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	1.12	(0.78, 1.62)	0.539

^αOR: αναλογία πιθανοτήτων (odds ratio)

^βI.C.: διάστημα εμπιστοσύνης (interval confidence)

^γp-value: τιμή σημαντικότητας, p=0.05

*κατηγορία αναφοράς

Πίνακας 43 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *lmo2470* μέσω μονοπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	76.00	(9.24, 625.08)	<0.001
3	4.15	(1.16, 14.88)	0.029
4	0.28	(0.06, 1.33)	0.108
pH			
ανά μονάδα	0.95	(0.85, 1.05)	0.308
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	0.92	(0.52, 1.63)	0.783
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	0.88	(0.50, 1.55)	0.648

Πίνακας 44 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *lmo2672* μέσω μονοπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	16.00	(4.78, 53.57)	<0.001
3	4.49	(1.53, 13.23)	0.006
4	0.17	(0.03, 1.06)	0.058
pH			
ανά μονάδα	0.88	(0.78, 1.00)	0.045
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	0.60	(0.28, 1.29)	0.192

Πίνακας 45 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *prfA* μέσω μονοπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	2.04	(0.91, 4.59)	0.084
3	3.83	(1.46, 10.01)	0.006
4	0.72	(0.16, 3.12)	0.656
pH			
ανά μονάδα	1.00	(0.84, 1.17)	0.964
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	1.86	(0.59, 5.80)	0.287
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	1.17	(0.36, 3.80)	0.800

^αOR: αναλογία πιθανοτήτων (odds ratio)

^βI.C.: διάστημα εμπιστοσύνης (interval confidence)

^γp-value: τιμή σημαντικότητας, p=0.05

*κατηγορία αναφοράς

Σύμφωνα με την πολυπαραγοντική ανάλυση, το γονίδιο *plcA* ήταν πιο πιθανό να υπερεκφραστεί στο 2^ο και 3^ο Στάδιο σε σύγκριση με το 1^ο Στάδιο δειγματοληψίας [O.R.=37.45, 95% C.I. (4.35, 322.60), p=0.001 για το 2^ο Στάδιο, O.R.=30.08, 95% C.I. (3.13, 289.49)

p=0.003 για το 3^ο Στάδιο]. Επιπλέον, κάθε μονάδα αύξησης του pH μείωνε την πιθανότητα υπερέκφρασης του γονιδίου κατά 36%, ενώ η λήψη των PPIs φάνηκε να αυξάνει την πιθανότητα υπερέκφρασης του 5.62 φορές [O.R.=5.62, 95% C.I. (1.34, 23.64), p=0.018]. Τέλος, η ατροφία δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την πιθανότητα υπερέκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου (**Πίνακας 46**). Παρομοίως, το γονίδιο *plcB* ήταν πιο πιθανό να υπερέκφραστεί στο 2^ο και 3^ο Στάδιο συγκριτικά με το 1^ο Στάδιο δειγματοληψίας [O.R.=23.79, 95% C.I. (6.08, 93.08), p<0.001 για το 2^ο Στάδιο, O.R.=9.31, 95% C.I. (2.36, 36.76) p=0.001 για το 3^ο Στάδιο] (**Πίνακας 47**). Όσον αφορά στο γονίδιο *hly*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κάθε μονάδα αύξησης του pH μείωνε την πιθανότητα υπερέκφρασης του κατά 18% (**Πίνακας 48**), ενώ από την ανάλυση φάνηκε ότι για τα γονίδια *lmo2470* (**Πίνακας 49**) και *lmo2672* (**Πίνακας 50**) υπήρχε μεγαλύτερη πιθανότητα υπερέκφρασή τους στο 2^ο και 3^ο Στάδιο συγκριτικά με το 1^ο Στάδιο δειγματοληψίας. Τέλος, η πολυπαραγοντική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *prfA* έδειξε ότι υπήρχε μεγαλύτερη πιθανότητα υπερέκφρασης του στο 3^ο Στάδιο συγκριτικά με το 1^ο Στάδιο δειγματοληψίας [O.R.=6.13, 95% C.I. (1.90, 19.74), p=0.002] (**Πίνακας 51**). Για τα γονίδια *sigB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* και *inlJ*, η μη σύγκλιση των μοντέλων δεν επέτρεψε τη διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την υπερέκφρασή τους.

Πίνακας 46 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *plcA* μέσω πολυπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	37.45	(4.35, 322.60)	0.001
3	30.08	(3.13, 289.49)	0.003
4	10.39	(0.84, 129.37)	0.069
pH			
ανά μονάδα	0.64	(0.49, 0.83)	0.001
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	5.62	(1.34, 23.64)	0.018
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	2.16	(0.62, 7.50)	0.223

^αOR: αναλογία πιθανοτήτων (odds ratio)

^βI.C.: διάστημα εμπιστοσύνης (interval confidence)

^γp-value: τιμή σημαντικότητας, p=0.05

*κατηγορία αναφοράς

Πίνακας 47 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *plcB* μέσω πολυπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR^α	95% I.C.^β	p-value^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	23.79	(6.08, 93.08)	<0.001
3	9.31	(2.36, 36.76)	0.001
4	1.33	(0.30, 5.92)	0.711
pH			
ανά μονάδα	1.04	(0.83, 1.29)	0.753
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	0.39	(0.09, 1.62)	0.196
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	0.67	(0.18, 2.59)	0.566

Πίνακας 48 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *hly* μέσω πολυπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR^α	95% I.C.^β	p-value^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	1.47	(0.75, 2.91)	0.263
3	1.69	(0.89, 3.18)	0.107
4	0.98	(0.45, 2.15)	0.959
pH			
ανά μονάδα	0.82	(0.68, 0.99)	0.040
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	0.65	(0.14, 2.99)	0.576
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	0.91	(0.20, 4.24)	0.907

Πίνακας 49 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *lmo2470* μέσω πολυπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR^α	95% I.C.^β	p-value^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	80.32	(9.53, 676.84)	<0.001
3	4.44	(1.13, 17.45)	0.033
4	0.28	(0.06, 1.38)	0.118
pH			
ανά μονάδα	0.97	(0.77, 1.21)	0.763
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	1.91	(0.53, 6.91)	0.324
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	1.10	(0.32, 3.87)	0.877

^αOR: αναλογία πιθανοτήτων (odds ratio)

^βI.C.: διάστημα εμπιστοσύνης (interval confidence)

^γp-value: τιμή σημαντικότητας, p=0.05

*κατηγορία αναφοράς

Πίνακας 50 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *lmo2672* μέσω πολυπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	18.22	(5.33, 62.32)	<0.001
3	5.12	(1.65, 15.87)	0.005
4	0.19	(0.03, 1.38)	0.101
pH			
ανά μονάδα	0.93	(0.74, 1.19)	0.580
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	1.93	(0.42, 8.83)	0.399
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	0.45	(0.10, 2.04)	0.302

Πίνακας 51 Εκτίμηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *hly* μέσω πολυπαραγοντικής ανάλυσης με χρήση μοντέλων γενικευμένων εξισώσεων-εκτίμησης.

Παράγοντας	OR ^α	95% I.C. ^β	p-value ^γ
Στάδιο			
1*	1		
2	2.16	(0.92, 5.10)	0.078
3	6.13	(1.90, 19.74)	0.002
4	1.11	(0.22, 5.65)	0.899
pH			
ανά μονάδα	0.82	(0.65, 1.03)	0.089
PPIs			
Όχι*	1		
Ναι	2.69	(0.72, 10.06)	0.140
Ατροφία			
Όχι*	1		
Ναι	1.13	(0.32, 4.07)	0.847

^αOR: αναλογία πιθανοτήτων (odds ratio)

^βI.C.: διάστημα εμπιστοσύνης (interval confidence)

^γp-value: τιμή σημαντικότητας, p=0.05

*κατηγορία αναφοράς

7.5 Συζήτηση

Στην παρούσα πειραματική ενότητα πραγματοποιήθηκε μελέτη της πληθυσμιακής μεταβολής του τροφιμογενούς παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* και προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένειά του, μετά από *in vitro* έκθεση του μικροοργανισμού σε ανθρώπινο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό.

Όσον αφορά στην πληθυσμιακή μεταβολή του παθογόνου έπειτα από την έκθεσή του στα γαστρικά και δωδεκαδακτυλικά υγρά, αρχικά η μελέτη πραγματοποιήθηκε μέσω διαδοχικών αραιώσεων και επίστρωσης των δειγμάτων σε τρυβλία PALCAM. Ωστόσο ο μικροοργανισμός ήταν μη ανιχνεύσιμος στους 13 από τους 25 ασθενείς με τις κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους. Συγκεκριμένα, ο παθογόνος ήταν μη ανιχνεύσιμος στους 10 από τους 13 ασθενείς με γαστρικό pH<2.3 και στους 3 από τους 12 ασθενείς με γαστρικό pH>2.3. Το γεγονός όμως ότι απομονώθηκε RNA από τον παθογόνο οδήγησε στην ανάγκη περαιτέρω μελέτης της πληθυσμιακής του μεταβολής κατά τα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας. Αυτή η

μελέτη διεκπεραιώθηκε μέσω μοριακών μεθόδων, με χρήση RT-qPCR. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι ο πληθυσμός του μικροοργανισμού ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης μόνο σε 5 από τους 25 ασθενείς, εκ των οποίων οι 3 είχαν γαστρικό pH<2.3. Σε 3 από αυτούς τους ασθενείς ο πληθυσμός ήταν μη ανιχνεύσιμος και με την εφαρμογή των μικροβιολογικών μεθόδων, ενώ και από τις δύο μεθόδους φάνηκε ότι ο πληθυσμός του παθογόνου μειώθηκε σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι η έκθεση του παθογόνου σε θανατηφόρα επίπεδα όξινης καταπόνησης κατάφερε να επηρεάσει την ανάπτυξή του, καθώς παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του μικροοργανισμού σε όλα τα στάδια της δειγματοληψίας και κυρίως κατά το στάδιο του ενοφθαλμισμού του στο γαστρικό υγρό. Επιπλέον, η μη ικανότητα ανάπτυξης του παθογόνου στα τρυβλία, η οποία όμως δεν οφειλόταν σε θανάτωση του μικροοργανισμού από τις συνθήκες καταπόνησης, υποδηλώνει ότι τα ζωντανά κύτταρά του δεν είχαν τη δυνατότητα ανάπτυξης και σχηματισμού αποικιών. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στις χαμηλές τιμές pH που αντιμετώπισε ο παθογόνος έπειτα από την έκθεσή του στο γαστρικό υγρό.

Στο εσωτερικό του γαστρεντερικού σωλήνα ο μικροοργανισμός αντιμετωπίζει μη ευνοϊκές συνθήκες περιβάλλοντος και, ως εκ τούτου, η επιβίωσή του στηρίζεται στην ικανότητά του να αντιλαμβάνεται και να ανταποκρίνεται στις διακυμάνσεις των διαφόρων συνθηκών. Για τον λόγο αυτό η ανθεκτικότητά του στην όξινη καταπόνηση έχει υπάρξει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης, με έρευνες να συσχετίζουν την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στην καταπόνηση με την παθογένειά του (O'Driscoll και συν., 1996· Gahan και Hill, 1999). Από τη συγκεκριμένη μελέτη είναι εμφανές ότι ο παθογόνος κατάφερε να ενεργοποιήσει τους διάφορους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση, να ανταπεξέλθει στις ακραία όξινες συνθήκες του περιβάλλοντος και να επιβιώσει διατηρώντας την ομοιοστάσή του. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι ο παθογόνος θεωρείται ως ένας σχετικά ανθεκτικός μικροοργανισμός, που έχει παρατηρηθεί να αναπτύσσεται σε τιμές pH 4.45-4.5 στους 15-30 °C (Parish και Higgins, 1989· Petran και Zottola, 1989· Tienungoon και συν., 2000· Koutsoumanis και συν., 2004), αν και έχουν καταγραφεί και ακόμα χαμηλότερες τιμές οι οποίες σχετίστηκαν με την αρχική συγκέντρωση του ενοφθαλμίσματος (Koutsoumanis και Sofos, 2005). Σε γενικές γραμμές, τιμές pH μικρότερες του 5.5 οδηγούν σε σημαντική μείωση του ρυθμού αύξησης του μικροοργανισμού (Adams και Moss, 2008), ενώ σε τιμές μικρότερες του 4.3 ο μικροοργανισμός επιβιώνει αλλά δεν πολλαπλασιάζεται (Swaminathan, 2001). Έχει επίσης αναφερθεί ότι το ενδοκυτταρικό pH του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* εξαρτάται από το είδος του οξέος στο οποίο εκτίθεται ο παθογόνος εξωκυτταρικά. Συγκεκριμένα, ακόμα και όταν το εξωκυτταρικό pH είναι το ίδιο, έκθεση του μικροοργανισμού σε οργανικά οξέα (π.χ. οξικό και γαλακτικό οξύ) οδηγεί σε

χαμηλότερο ενδοκυτταρικό pH, συγκριτικά με αυτό που προκύπτει έπειτα από έκθεση του παθογόνου σε ανόργανα οξέα (π.χ. υδροχλωρικό οξύ) (Phan-Thanh, 1998). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα ανόργανα οξέα είναι λιγότερο αποτελεσματικά στο να διαπερνούν τη κυτταρική μεμβράνη και να αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε σχέση με τα οργανικά (Young και Foegeding, 1993· Ferreira και συν., 2003). Επομένως, η φύση του οξέος στο οποίο εκτέθηκε ο παθογόνος στη συγκεκριμένη μελέτη μπορεί να συνέβαλε στην επιβίωσή του.

Στη συγκεκριμένη μελέτη ωστόσο, ο μικροοργανισμός κατάφερε να επιβιώσει κι έπειτα από την έκθεσή του στο δωδεκαδακτυλικό υγρό, διατηρώντας σχεδόν σταθερό τον πληθυσμό του και υποδεικνύοντας έτσι ότι η δράση του υγρού και ειδικότερα των χολικών αλάτων και των πρωτεολυτικών ενζύμων δεν είχε εν τέλει αντίκτυπο στα πληθυσμιακά του επίπεδα. Το γεγονός ότι ο παθογόνος δεν επηρεάστηκε από τις συνθήκες του δωδεκαδακτύλου, έρχεται σε συμφωνία με έρευνες που αναφέρουν ότι ο συγκεκριμένος παθογόνος μπορεί να αποτελεί μία σπάνια αιτία της χολοκυστίτιδας (φλεγμονή της χοληδόχου κύστης) (Allerberger και συν., 1989· Descy και συν., 2012· Bruminhent και συν., 2013) και, ως εκ τούτου, να αποτελεί ένα παράγοντα που όχι απλώς επιβιώνει υπό αυτές τις συνθήκες αλλά είναι και σε θέση να προκαλεί φλεγμονή. Επιπλέον φαίνεται ότι η χολή της χοληδόχου κύστης αποτελεί γόνιμο περιβάλλον για την ανάπτυξη ενός αριθμού από βακτηριακά είδη (συμπεριλαμβανομένων και μη παθογόνων), με τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* να αποτελεί έναν από αυτά (Dowd και συν., 2011). Συγκεκριμένα, η ικανότητά του να διασχίζει τον φραγμό του στομάχου είναι πιθανό να καθιστά την περιοχή του εντέρου ως δυνητική θέση για ανάπτυξη, η οποία επηρεάζεται επιπλέον και από τις συνθήκες που επικρατούν στον εκάστοτε ξενιστή (Dowd και συν., 2011· Bruminhent και συν., 2013).

Η έκφραση του γονιδίου *prfA* και η ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων του συμπλέγματος LIP1-1 έχει αποτελέσει το αντικείμενο εντατικής έρευνας τα τελευταία χρόνια, λόγω της εμφανούς σημασίας τους στη μολυσματικότητα (infectivity) του παθογόνου μικροοργανισμού. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *prfA*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *sigB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *lmo2672* και *lmo2470* έπειτα από την *in vitro* έκθεσή του μικροοργανισμού σε ανθρώπινο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό έδειξε μικτή απόκριση όλων των υπό μελέτη γονιδίων.

Σύμφωνα με μελέτες, θανατηφόρα ή υποθανατηφόρα επίπεδα καταπόνησης μπορούν να αυξήσουν τη σύνθεση παραγόντων παθογονικότητας σε ένα μεγάλο αριθμό τροφιμογενών παθογόνων (Mekalanos, 1992), μεταξύ των οποίων είναι και η *Listeria monocytogenes* (Brehm και συν., 1996). Στον μικροοργανισμό αυτό η αντιμετώπιση των συνθηκών όξινης καταπόνησης (acid tolerance response, ATR) πραγματοποιείται μέσω μίας προγραμματισμένης γονιδιακής απόκρισης, η οποία εξασφαλίζει την επιβίωση των κυττάρων κάτω από αυτές τις

συνθήκες. Παράλληλα, πολλά στοιχεία έχουν συνδέσει την απόκρισή του στην όξινη καταπόνηση με τη λοιμογόνο του δύναμη, αν και η συνδυασμένη λειτουργία των παραγόντων που εμπλέκονται στην αντιμετώπιση των χαμηλών τιμών pH και καθορίζουν την παθογόνο συμπεριφορά του μικροοργανισμού εντός των ξενιστών δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Ωστόσο μελέτες έχουν δείξει ότι η επαγωγή της ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση ενισχύει την επιβίωση του μικροοργανισμού τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (O'Driscoll και συν., 1996· Saklani-Jusforgues και συν., 2000), ενώ σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και η διάρκεια της έκθεσης του παθογόνου στις συνθήκες αυτές. Οι Neuhaus και συν. (2013) ανέφεραν ότι η συνεχής έκθεση του μικροοργανισμού σε χαμηλό pH φάνηκε να λειτουργεί ως σήμα έκθεσης του παθογόνου σε όξινο περιβάλλον εκτός ξενιστών, γεγονός το οποίο οδήγησε στην υπό-έκφραση των γονιδίων παθογονικότητας του και στην αύξηση απόκρισης στην όξινη καταπόνηση. Αντιθέτως, έκθεση του μικροοργανισμού σε παροδικά χαμηλό pH λειτούργησε ως σήμα για πιθανή είσοδό του σε ξενιστή, το οποίο και συνοδεύτηκε από αύξηση της διείσδυσης του παθογόνου στα κύτταρα των υπό μελέτη νηματοειδών και σε θανάτωσή τους.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, το γονίδιο *hly* ήταν αυτό που παρουσίασε την εντονότερη υπερέκφραση (έως και 14.77 ± 1.22 φορές). Συνολικά, υπερεκφράστηκε σε όλα τα στάδια στους 10 από τους 25 ασθενείς, εκ των οποίων οι 3 είχαν γαστρικό $pH > 2.3$. Ωστόσο παρουσίασε και υποέκφραση σε ορισμένες περιπτώσεις, κυρίως στο Στάδιο 4. Η μεταγραφή του *hly* πραγματοποιείται μέσω τριών περιοχών υποκινητών, γνωστές ως $P1_{hly}$, $P2_{hly}$ και $P3_{hly}$. Από αυτές, μόνο η τρίτη περιοχή δεν είναι εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη PrfA (Domann και συν., 1991). Από τη μελέτη αυτή φάνηκε ότι το *prfA* παρουσίασε σταθερή έκφραση στις περισσότερες περιπτώσεις και όχι υπερέκφραση, όπως το γονίδιο *hly*. Επομένως, η υπερέκφραση που παρατηρήθηκε από το *hly* μπορεί να οφείλεται στην τρίτη περιοχή υποκινητών που διαθέτει το γονίδιο και είναι ανεξάρτητη από την έκφραση του *prfA*.

Το γονίδιο *hly* κωδικοποιεί την τοξίνη δέσμευσης χοληστερίνης και σχηματισμού πόρου, τη λιστεριολυσίνη O (listeriolysin O, LLO). Έρευνες έχουν δείξει ότι το όξινο περιβάλλον που επικρατεί εντός των φαγοσωμάτων δημιουργεί ένα ιδανικό περιβάλλον για την *in vivo* δραστηριότητα της LLO (Beauregard και συν., 1997· Conte και συν., 2002). Για την αποδόμηση ωστόσο της μεμβράνης των φαγοσωμάτων και την απελευθέρωση του παθογόνου στο κυτταρόπλασμα, η LLO συνεργάζεται με τις δύο φωσφολιπάσες, φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη φωσφολιπάση C (PI-PLC) και φωσφατιδυλο-χολίνη φωσφολιπάση C (PC-PLC), που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *plcA* και *plcB*, αντίστοιχα (Grundling και συν., 2003). Τόσο η LLO όσο και η PlcA μεταγράφονται όταν ο παθογόνος βρίσκεται εντός φαγοσωμάτων, συμβάλλοντας στην κενωτοπική του διαφυγή. Ωστόσο οι τιμές pH για την ενζυμική τους δραστηριότητα είναι διαφορετικές, καθώς η LLO απαιτεί πιο όξινο περιβάλλον (4.5- 6.5) από

την *PlcA* (5.5-7.5). Για το λόγο αυτό, η μεταγραφή τους ρυθμίζεται διαφορετικά ανάλογα με το pH των φαγοσωμάτων, εξασφαλίζοντας έτσι ότι οι πρωτεΐνες αυτές θα παράγονται σε ευνοϊκά για τις δραστηριότητές τους περιβάλλοντα. Ως εκ τούτου, αμέσως μετά την διείσδυση του παθογόνου στα κύτταρα στο όξινο περιβάλλον του φαγοσώματος αποτρέπεται η έκφραση του *plcA* ενώ η έκφραση του *hly* πραγματοποιείται κανονικά, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της ενζυμικά ενεργού πρωτεΐνης LLO. Εν συνεχεία, μέσω του σχηματισμού πόρων, λόγω της δραστηριότητας της LLO, αυξάνεται το pH στο φαγόσωμα κι επομένως και η έκφραση της *PlcA* (Conte και συν., 2002). Αποτέλεσμα της αύξησης του pH είναι η σταδιακή απενεργοποίηση της LLO και η δραστηριοποίηση των PLCs (*PlcA* και *PlcB*), οι οποίες ολοκληρώνουν την κενωτική διαφυγή του παθογόνου (Dramsı και Cossart, 2002). Τα παραπάνω δεδομένα συμφωνούν εν μέρει με τα αποτελέσματα της μελέτης, καθώς η αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων με το pH έδειξε ότι κάθε μονάδα αύξησης του pH μείωνε την πιθανότητα υπερέκφρασης τόσο του γονιδίου *hly* όσο και του γονιδίου *plcA*. Ωστόσο, αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός της έκθεσης του παθογόνου σε υψηλότερες από τις ιδανικές για τα συγκεκριμένα γονίδια τιμές pH, σε αρκετές από τις περιπτώσεις ασθενών. Στη συγκεκριμένη μελέτη το *plcA* παρέμεινε σταθερό σε 9 από τους 25 ασθενείς, εκ των οποίων οι 6 είχαν γαστρικό pH>2.3, ενώ το *plcB* παρέμεινε σταθερό σε 5 από τους 25 ασθενείς, εκ των οποίων οι 3 είχαν γαστρικό pH>2.3. Τα δύο αυτά γονίδια παρέμειναν σταθερά σε 2 κοινούς ασθενείς, οι οποίοι είχαν γαστρικό pH>2.3. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις τα γονίδια παρουσίασαν υπερέκφραση, χωρίς ωστόσο αυτή να παρουσιάζει μία συγκεκριμένη ακολουθία.

Η μεταγραφή του γονιδίου *plcA* ξεκινάει από τον υποκινητή *plcA*, μέσω του οποίου πραγματοποιείται η σύνθεση του δικιστρονικού (bicistronic) mRNA *plcA-prfA*. Ωστόσο, η μεταγραφή του *prfA* πραγματοποιείται και ανεξάρτητα από τη σύνθεση ή όχι του *plcA-prfA* mRNA, καθώς μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω του μονοκιστρονικού *prfA* mRNA, η σύνθεση του οποίου ξεκινάει από τα δύο σημεία υποκινητών, P1_{*prfA*} και P2_{*prfA*}. Οι Conte και συν. (2002) ανέφεραν ότι η μεταγραφή του *plcA* μειώθηκε σημαντικά (8 φορές) σε pH 5.1, αν και η μεταγραφή του του γονιδίου *prfA* δεν μεταβλήθηκε. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στη μείωση του μεταγραφόμενου δικιστρονικού *plcA-prfA* mRNA και στα αυξημένα επίπεδα του μεταγραφόμενου μονοκιστρονικού *prfA* mRNA, υποδηλώνοντας ότι η έκθεση σε όξινα περιβάλλοντα μπορεί να επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται άμεσα, όπως το *prfA* και το *plcA*. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης, καθώς τα δύο γονίδια *prfA* και *plcA* δεν παρουσίασαν συμφωνία στην έκφραση μεταξύ των διαφορετικών περιπτώσεων. Αντιθέτως, οι Palmer και

συν. (2011) ανέφεραν ότι αύξηση στην έκφραση του *prfA* οδήγησε και σε αύξηση της έκφρασης δύο PrfA-εξαρτώμενων γονιδίων, μεταξύ των οποίων ήταν και το *plcA*.

Ένας από τους πιο σημαντικούς συνδετικούς κρίκους μεταξύ της επιβίωσης του παθογόνου σε συνθήκες καταπόνησης και της έκφρασης της παθογονικότητάς του, είναι ο παράγοντας σ^B (Ollinger και συν., 2009). Ο παράγοντας αυτός κωδικοποιείται από το γονίδιο *sigB* και είναι υπεύθυνος για τη σύνθεση ενός σημαντικού αριθμού πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την απόκρισή του σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, ενώ παράλληλα ρυθμίζει και την έκφραση γονιδίων παθογονικότητας του μικροοργανισμού. Σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη PrfA επηρεάζει τη συμπεριφορά του παθογόνου κατά τη διάρκεια των γαστρεντερικών (Garner και συν., 2006) και συστημικών σταδίων λοίμωξης (Camejo και συν., 2009). Επιπλέον ρυθμίζει άμεσα τη μεταγραφή του γονιδίου *prfA* μέσω του υποκινητή P2_{*prfA*} (Nadon και συν., 2002· Rauch και συν., 2005· Schwab και συν., 2005) και επηρεάζει έμμεσα την πρωτεΐνη PrfA, μέσω μείωσης της δραστηριότητάς της όταν ο παθογόνος βρίσκεται εντός κυττάρου-ξενιστή. Το γεγονός αυτό μειώνει και την έκφραση των PrfA-εξαρτώμενων γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα, ελαχιστοποιώντας έτσι τις βλάβες που προκαλούνται στα κύτταρα του ξενιστή (Ollinger και συν., 2009). Στη συγκεκριμένη μελέτη η έκφραση του γονιδίου *sigB* παρέμεινε σταθερή σε 18 ασθενείς, ενώ σε 11 από αυτούς παρατηρήθηκε σταθερότητα έκφρασης και για το γονίδιο *prfA*. Ο παράγοντας σ^B αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή των γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στην καταπόνηση. Ωστόσο, το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφρασή του και παρ' όλα' αυτά ο μικροοργανισμός κατάφερε να επιβιώσει έπειτα από την έκθεση στα γαστρικά και δωδεκαδακτυλικά υγρά, καταδεικνύει ότι είτε ενεργοποίησε άλλους μηχανισμούς που είναι σημαντικοί για την αντιμετώπιση τέτοιων συνθηκών και οι οποίοι δεν είναι εξαρτώμενοι από αυτόν τον παράγοντα, είτε ακόμα ενεργοποιήθηκαν μηχανισμοί που εξαρτώνται μερικώς από αυτόν. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της έρευνας των Ferreira και συν. (2001), οι οποίοι απέδειξαν ότι τα κύτταρα της *L. monocytogenes* στη στατική φάση διαθέτουν δύο μηχανισμούς απόκρισης στις όξινες συνθήκες: έναν εξαρτώμενο από τον σ^B παράγοντα και έναν ο οποίος είναι τουλάχιστον μερικώς ανεξάρτητος από αυτόν. Επιπλέον, σε επόμενη έρευνα μελέτησαν την εξάρτηση του συστήματος GAD από τη μεταγραφή του σ^B , συγκρίνοντας ένα φυσιολογικό με ένα μεταλλαγμένο για το *sigB* στέλεχος (*ΔsigB*), έπειτα από καταπόνηση σε όξινες συνθήκες (pH 2.5 για 60 min). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η δραστηριότητα του GAD δεν διέφερε μεταξύ των δύο στελεχών και, ως εκ τούτου, αποδείχθηκε ότι η δραστηριότητα του συστήματος αυτού δεν είναι απόλυτα εξαρτώμενη από τον παράγοντα σ^B κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες (Ferreira και συν., 2003).

Όσον αφορά στην έκφραση των γονιδίων που ανήκουν στην οικογένεια των ιντερναλινών, τα γονίδια *inlA* και *inlB* παρουσίασαν τη σταθερότερη έκφραση συγκριτικά με το σύνολο των γονιδίων που μελετήθηκαν, ενώ τα γονίδια *inlJ*, *inlC*, *lmo2470* και *lmo2672* παρουσίασαν υπερέκφραση στις περισσότερες περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, τα γονίδια *inlJ*, *lmo2470* και *lmo2672* παρουσίασαν υπερέκφραση κατά τα τρία πρώτα στάδια δειγματοληψίας και σταθερή έκφραση στο τελευταίο στάδιο, ενώ το γονίδιο *inlC* παρουσίασε υπερέκφραση σε όλα τα στάδια δειγματοληψίας.

Η λειτουργία των ιντερναλινών A και B έχει συνδεθεί με την εσωτερική του παθογόνου στα μη φαγοκυτταρικά κύτταρα των ξενιστών. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη InlA επιτρέπει την είσοδο του παθογόνου στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή (Roche και συν., 2008) και η InlB βοηθάει στην ενδοκύτωση του μικροοργανισμού σε ηπατοκύτταρα, ινοβλάστες και επιθηλιοειδή κύτταρα (Braun και συν., 1997). Όμοια, η δράση των ιντερναλινών C και J έχει συνδεθεί με την είσοδο του παθογόνου στα κύτταρα των ξενιστών, η οποία ωστόσο αφορά στα τελευταία στάδια της λοίμωξης (Roche και συν., 2008). Ειδικότερα, η InlC συμβάλλει στο σχηματισμό προεξοχών και στη λέπτυνση της εξωτερικής στιβάδας των επιθηλιακών κυττάρων στο βλεννογόνο του εντέρου (Leung και συν., 2013) και η InlJ συμμετέχει στην επιτυχή διέλευση του παθογόνου από τον εντερικό φραγμό (Sabet και συν., 2005). Ωστόσο η ακριβής λειτουργία της InlJ, καθώς και των *Lmo2672* και *Lmo2470* δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, αν και έχει φανεί ότι η δράση τους συμβάλλει στην παθογονικότητα του μικροοργανισμού (Roche και συν., 2008).

Από τις παραπάνω ιντερναλίνες, οι InlA και InlB ελέγχονται μερικώς από τον παράγοντα PrfA (Lingnau και συν., 1995), ενώ το γονίδιο *inlC* διαθέτει επικαλυπτόμενους PrfA-εξαρτούμενους και μη εξαρτούμενους υποκινητές (Luo και συν., 2004). Επιπλέον, και ο παράγοντας σ^B ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων *inlA* και *inlB* (Kazmierczak και συν., 2006· McGann και συν., 2007a). Στη συγκεκριμένη μελέτη, η έκθεση του παθογόνου σε γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό κατέδειξε σταθερή έκφραση των γονιδίων *inlA* και *inlB*. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ίδια έκφραση παρατηρήθηκε και για τα γονίδια *sigB* και *prfA*. Οι μελέτες αναφέρουν ότι η διπλή ρύθμιση του γονιδίου *inlA* από τους παράγοντες σ^B και PrfA μπορεί να είναι απαραίτητη για τη διπλή λειτουργία αυτής της ιντερναλίνης, η οποία αφορά στην διείσδυση του παθογόνου στα επιθηλιακά κύτταρα (με ενεργοποίηση της μεταγραφής της κατά τη διάρκεια του γαστρεντερικού σταδίου από τον παράγοντα σ^B) και στο πέρασμα του φραγμού της τροφοβλάστης (με ενεργοποίησης της μεταγραφής της κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου από τον παράγοντα PrfA) (McGann και συν., 2008). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση των γονιδίων παθογονικότητας όταν μικροοργανισμός φτάνει στον αυλό του εντέρου ρυθμίζεται από τον παράγοντα σ^B , σε αντίθεση με την περίπτωση στην οποία ο

παθογόνος εισέρχεται στο αίμα του ξενιστή, όπου και η ρύθμιση αυτή πραγματοποιείται μέσω του παράγοντα PrfA (Toledo-Arana και συν., 2009). Ως εκ τούτου, η σταθερότητα στην έκφραση των δύο αυτών ιντερναλινών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του παθογόνου στα γαστρικά και δωδεκαδακτυλικά υγρά θα μπορούσε να αποδοθεί στη μερική εξάρτηση της έκφρασής τους από το γονίδιο *sigB* (McGann και συν., 2008). Αντίθετα από τα παραπάνω, οι Neuhaus και συν. (2013) ανέφεραν επαγωγή της έκφρασης των σ^B-εξαρτώμενων γονιδίων κατά τη διάρκεια όξινης καταπόνησης, μεταξύ των οποίων και τα γονίδια *inlA* και *inlB*.

Ενδιαφέρον ωστόσο προκαλεί το γεγονός ότι αν και δεν υπήρξε διαφοροποίηση στην έκφραση των *InlA* και *InlB*, οι υπόλοιπες ιντερναλίνες που μελετήθηκαν παρουσίασαν υπερέκφραση, με ποιο σημαντική αυτή της *InlC*. Από τις έως τώρα μελετημένες ιντερναλίνες, έχει φανεί ότι καμία δεν είναι ικανή να επάγει φαγοκύττωση μόνη της (Engelbrecht και συν., 1996· Dramsi και συν., 1997· Sabet και συν., 2005). Παρ' όλ' αυτά η μελέτη μεταλλαγμένων ως προς αυτές κυττάρων, έχει υποδείξει συνεργασία μεταξύ πολλών ιντερναλινών κατά την είσοδο του παθογόνου στα κύτταρα των ξενιστών (Bergmann και συν., 2002). Τα παραπάνω έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, στην οποία φάνηκε η έντονη συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των ιντερναλινών. Επιπλέον, η σταθερή έκφραση των γονιδίων *inlA* και *inlB* σε συνδυασμό με την υπερέκφραση των ιντερναλινών *InlC*, *InlJ*, *Lmo2470* και *Lmo2672* που παρατηρήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, συμφωνεί με τα αποτελέσματα μελετών που υποστηρίζουν ότι κατά τη διάρκεια όξινης καταπόνησης ο μικροοργανισμός μειώνει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα και ότι το σήμα για την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων αυτών δίνεται αφού περάσει ο παθογόνος το εμπόδιο του στομάχου και αυξηθεί η τιμή του pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται (Lawhon και συν., 2002).

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας κατέδειξαν ότι η υπερέκφραση των υπό μελέτη γονιδίων δεν συσχετίστηκε καθόλου με τη λήψη των PPIs και τη γαστρική ατροφία των ασθενών. Ως εκ τούτου, οι δύο αυτοί παράγοντες που δυνητικά επηρεάζουν το γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό περιβάλλον, δεν φάνηκε να σχετίζονται με την έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων παθογονικότητας του μικροοργανισμού. Επιπλέον, η γονιδιακή έκφραση δεν φάνηκε να επηρεάζεται ούτε από το στάδιο δειγματοληψίας, εκτός από την περίπτωση των γονιδίων *plcA*, *plcB*, *lmo2470* και *lmo2672* (που εμφάνισαν αυξημένη πιθανότητα υπερέκφρασης κατά το 2^ο και 3^ο Στάδιο δειγματοληψίας), ενώ συσχέτιση μεταξύ της γονιδιακής έκφρασης και της τιμής του pH παρατηρήθηκε μόνο για τα γονίδια *hly* και *plcA*. Τέλος, από τη σύγκριση μεταξύ της μονοπαραγοντικής και πολυπαραγοντικής ανάλυσης της υπερέκφρασης των γονιδίων φάνηκε ότι pH, το στάδιο δειγματοληψίας, η λήψη των PPIs και η γαστρική ατροφία αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες.

Τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν την παρουσία επιπρόσθετων μεταγραφικών μηχανισμών που είναι ακόμα αδιευκρίνιστοι και συμβάλλουν τόσο στην απόκριση του μικροοργανισμού στις συνθήκες όξινης καταπόνησης, όσο και στην έκφραση της παθολογικότητάς του. Ως εκ τούτου, η πραγματοποίηση μελετών που αφορούν στη γονιδιακή έκφραση του παθογόνου σε συνθήκες όσο το δυνατόν πιο κοντινές σε αυτές που αντιμετωπίζει ο μικροοργανισμός κατά το πέρασμά του από τη γαστρεντερική οδό, μπορούν μελλοντικά να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες και να οδηγήσουν σε καλύτερη κατανόηση των στρατηγικών που χρησιμοποιεί ο μικροοργανισμός αυτός για την επιβίωση και απόκρισή του σε τέτοια περιβάλλοντα.

8 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο τη μελέτη της συμπεριφοράς της *Listeria monocytogenes* έπειτα από έκθεσή του σε διάφορες συνθήκες και υποστρώματα ανάπτυξης. Για τη διεκπεραίωση της έρευνας αυτής πραγματοποιήθηκε απομόνωση στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού από φρέσκα φρούτα και λαχανικά, η κατανάλωση των οποίων έχει συνδεθεί με αυξημένα επιδημικά επεισόδια τροφιμογενών λοιμώξεων τις τελευταίες δεκαετίες. Ως εκ τούτου, τα φρέσκα προϊόντα έχουν βρεθεί στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος, με μελέτες να αναφέρουν σημαντική αύξηση της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών σε αυτά. Επιπλέον, η παρουσία αυτή σε συνδυασμό με την έλλειψη επεξεργασίας και την ακατέργαστη μορφή στην οποία καταναλώνονται τα φρέσκα προϊόντα, τα καθιστούν αρκετά σημαντικούς φορείς σοβαρών τροφιμογενών ασθενειών, μία εκ των οποίων είναι και η λιστερίωση. Η νόσος αυτή είναι συχνά πολύ σοβαρή και προκαλεί υψηλά ποσοστά νοσηλείας και θνητότητα, ενώ η συχνότητα των κρουσμάτων που οφείλονται σε αυτήν και σχετίζονται επιδημιολογικά με τα φρέσκα προϊόντα έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Λόγω των παραπάνω δεδομένων υπήρξε ενδιαφέρον στη μελέτη των πληθυσμιακών μεταβολών του παθογόνου και της γονιδιακής του απόκρισης, σε ευνοϊκές και μη συνθήκες ανάπτυξης, από τη στιγμή της απομόνωσής του από έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα έως και την είσοδό του στον ανθρώπινο οργανισμό.

Συνολικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη του επιπολασμού και ποσοτική εκτίμηση του παθογόνου σε φυσικώς μiasμένα δείγματα ρόκας και αγγουριών, μελέτη της επίδρασης του αιθέριου ελαίου από λεμονόχορτο στην επιφανειακή μικροχλωρίδα και στον παθογόνο μικροοργανισμό σε δείγματα ρόκας και πεπονιού, καθώς και μελέτη της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια ανάπτυξής του σε υγρό θρεπτικό μέσο, δείγματα ρόκας και πεπονιού και συνθήκες προσομοίωσης εσωτερικού περιβάλλοντος του πεπτικού σωλήνα. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της βιοποικιλότητας των απομονωθέντων στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού, αξιολόγηση της απόδοσης των υποστρωμάτων καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευσή του και γενετική ανάλυση του συμπλέγματος γονιδίων παθογονικότητας σε στελέχη που ανήκαν στους ορότυπους 1/2a και 4b.

Τα αποτελέσματα των μελετών κατέδειξαν αρχικά την ατελή φύση των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* και ως εκ τούτου, τονίστηκε η σημαντικότητα της παράλληλης χρήσης τουλάχιστον δύο υποστρωμάτων συνδυαστικά με βιοχημικές και μοριακές μεθόδους για τη διεξαγωγή ορθών συμπερασμάτων. Επίσης, τονίστηκε η διαφοροποίηση των χαρακτηριστικών επίδοσης των

υποστρωμάτων ανάλογα με το υπό μελέτη προϊόν και ανάλογα με το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του τροφιμογενούς παθογόνου στο προϊόν αυτό. Η δράση των ελαίων φάνηκε να επηρεάζεται από τα τρόφιμα στα οποία εφαρμόζεται και τις συνθήκες συντήρησής τους, ενώ τα μικροβιολογικά αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η διάρκεια ζωής των φρέσκων προϊόντων καθορίζεται από τις φυσιολογικές και βιοχημικές μεταβολές που πραγματοποιούνται στο εσωτερικό των φυτικών ιστών και όχι από τη μικροβιακή ανάπτυξη. Όσον αφορά στη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων, η μικτή γονιδιακή απόκριση του στελέχους στο σύνολο των περιπτώσεων που εξετάστηκαν, κατέδειξε έντονη συσχέτιση της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων με τις συνθήκες ανάπτυξής του (υπόστρωμα, ατμόσφαιρα, θερμοκρασία, καταπόνηση), επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη σημαντικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών και του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται. Επιπλέον, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση των γονιδίων ακόμα και στις ίδιες μελέτες υποδεικνύουν επιπρόσθετους ρυθμιστικούς μηχανισμούς, οι οποίοι θα μπορούσαν ενδεχομένως σε συνδυασμό με αυτούς που μελετήθηκαν να παρέχουν μελλοντικά σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση του τρόπου συμπεριφοράς του μικροοργανισμού στα διάφορα περιβάλλοντα.

Τέλος, για πρώτη φορά έγινε προσπάθεια προσομοίωσης των πραγματικών συνθηκών έκθεσης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γαστρικών και δωδεκαδακτυλικών υγρών από ασθενείς που προσήλθαν για ενδοσκοπικό έλεγχο του ανώτερου πεπτικού, στην Ηπατογαστρεντερολογική Μονάδα της Β' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και Μονάδας Έρευνας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου 'ΑΤΤΙΚΟΝ'. Στόχος ήταν η μελέτη των μεταβολών του πληθυσμού του παθογόνου και της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητά του, καθώς και η μελέτη ύπαρξης συσχέτισης των μεταβολών αυτών με παράγοντες που δυνητικά επηρεάζουν το γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό pH. Αδυναμία της μελέτης υπήρξε ο μικρός αριθμός των ασθενών, καθώς εξαιρούνταν από τη δειγματοληψία ασθενείς με πρόσφατο ιστορικό λήψης αντιβιοτικών και επεισόδιο αιμορραγίας. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα κατέδειξαν διαφοροποίηση της απόκρισης του ίδιου στελέχους του παθογόνου μικροοργανισμού όταν εκτέθηκε σε περιβάλλον διαφορετικών ξενιστών, ενώ η σύγκριση των γαστρικών και δωδεκαδακτυλικών υγρών που λήφθηκαν από τους είκοσι πέντε διαφορετικούς ασθενείς, κατέδειξε την ύπαρξη έντονων διαφοροποιήσεων μεταξύ των υγρών αυτών (pH, χρώμα, ποσότητα, διαύγεια, σύσταση). Επιπλέον, η έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων δεν φάνηκε να σχετίζεται με παράγοντες που δυνητικά επηρεάζουν το γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό περιβάλλον, όπως η λήψη αναστολέων αντλίας πρωτονίων (PPIs) και η γαστρική ατροφία. Τέλος, τα αποτελέσματα της

μελέτης κατέδειξαν σημαντική συσχέτιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την διείσδυση του παθογόνου στα κύτταρα-ξενιστές και τη διέλευσή του από τον εντερικό φραγμό, ενώ σημαντική αποδείχθηκε και η σχέση μεταξύ των τιμών του pH και της υπερέκφρασης δύο απαραίτητων για την παθογονικότητα του μικροοργανισμού γονιδίων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Θρεπτικά υποστρώματα/υλικά και χημικά αντιδραστήρια

I. Θρεπτικά υποστρώματα/υλικά μικροβιολογικών αναλύσεων

<i>Θρεπτικά υλικά (Εταιρία)</i>	<i>Σύσταση (g/L), pH</i>	<i>Βιβλιογραφική αναφορά</i>	
▪ Half Fraser Broth Plus (LABM)			
α) βάση ζωμού	μείγμα πεπτόνης	15,00	Fraser και Sperber, 1988
	εκχύλισμα ζύμης	5,00	
	εσκουλίνη	1,00	
	όξινο φωσφορικό δινάτριο	9,60	
	δισόξινο φωσφορικό κάλιο	1,35	
	χλωριούχο νάτριο	20,00	
	χλωριούχο λίθιο	3,00	
	ακριφλαβίνη	0,0125	
	ναλιδιζικό οξύ	0,01	
	pH 7,2±0,2		
β) επιλεκτικός παράγοντας	κιτρικό αμμώνιο σιδήρου	0,50	Fraser και Sperber, 1988
▪ Fraser Broth Plus (LABM)			
α) βάση ζωμού	μείγμα πεπτόνης	15,00	Fraser και Sperber, 1988
	εκχύλισμα ζύμης	5,00	
	εσκουλίνη	1,00	
	όξινο φωσφορικό δινάτριο	9,60	
	δισόξινο φωσφορικό κάλιο	1,35	
	χλωριούχο νάτριο	20,00	
	χλωριούχο λίθιο	3,00	
	ακριφλαβίνη	0,025	
	ναλιδιζικό οξύ	0,02	
	pH 7,2±0,2		
β) επιλεκτικός παράγοντας	κιτρικό αμμώνιο σιδήρου	0,50	Fraser και Sperber, 1988

<i>Θρεπτικά υλικά (Εταιρία)</i>	<i>Σύσταση (g/L), pH</i>	<i>Βιβλιογραφική αναφορά</i>	
▪ ALOA (Biolife)	πεπτόνη κρέατος	18,00	Ottaviani και συν., 1997
	τρυπτόνη	6,00	
	εκχύλισμα ζύμης	10,00	
	πυροσταφυλικό νάτριο	2,00	
	γλυκόζη	2,00	
	γλυκεροφωσφορικό μαγνήσιο	1,00	
	θεικό μαγνήσιο	0,50	
	χλωριούχο νάτριο	5,00	
	χλωριούχο λίθιο	10,00	
	άνυδρο όξινο φωσφορικό δινάτριο	2,50	
	5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γλυκοπυρανοσίδιο	0,50	
	άγαρ	15,00	
	ναλιδικό οξύ	0,02	
	κεφταζιδίμη	0,02	
	κυκλοεξιμίδιο	0,05	
	πολυμυξίνη Β	76700IU	
	L-α-φωσφατιδυλινοσιτόλη	2,00	
	pH 7,2±0,2		
▪ RAPID'L.mono (Bio-Rad)	20 έτοιμα τρυβλία , 90 mm	Polivka, 2001	
▪ MRD (LABM)	πεπτόνη	1,00	Straka και Stokes, 1957
	χλωριούχο νάτριο	8,50	
		pH 7,0±0,2	
▪ BHI agar (LABM)	μείγμα έγχυσης καρδιακού ιστού	17,50	Roseburg και συν., 1944
	τρυπτόνη	10,00	
	γλυκόζη	2,00	
	χλωριούχο νάτριο	5,00	
	φωσφορικό δινάτριο	2,50	
	άγαρ	12,00	
		pH 7,4±0,2	
▪ BHI broth (LABM)	μείγμα έγχυσης καρδιακού ιστού	17,50	Rosenow, 1919
	τρυπτόνη	10,00	
	γλυκόζη	2,00	
	χλωριούχο νάτριο	5,00	
	φωσφορικό δινάτριο	2,50	
		pH 7,4±0,2	

<i>Θρεπτικά υλικά (Εταιρία)</i>	<i>Σύσταση (g/L), pH</i>	<i>Βιβλιογραφική αναφορά</i>
▪ Ringer (LABM)	χλωριούχο νάτριο	2,25
	χλωριούχο κάλιο	0,105
	χλωριούχο ασβέστιο	0,12
	διττανθρακικό νάτριο	0,05
▪ PALCAM (LABM)		
α) βάση άγαρ	μείγμα πεπτόνης Columbia	23,00
	χλωριούχο νάτριο	5,00
	άμυλο καλαμποκιού	1,00
	εκχύλισμα ζύμης	3,00
	γλυκόζη	0,50
	μαννιτόλη	10,00
	εσκουλίνη	0,80
	χλωριούχο λίθιο	15,00
	κιτρικό αμμώνιο	0,50
	σιδήρου	
	ερυθρό φαινόλης	0,08
	άγαρ No2	12,00
	pH 7,0±0,2	
β) επιλεκτικός παράγοντας	πολυμυξίνη	0,01
	ακριφλαβίνη	0,005
	κεφταζιδιμη	0,02
▪ VRBG agar (LABM)	εκχύλισμα ζύμης	3,00
	ισορροπημένη	7,00
	πεπτόνη	
	χλωριούχο νάτριο	5,00
	χολικά άλατα	1,50
	γλυκόζη	10,00
	ουδέτερο κόκκινο	0,03
	κρυσταλλικό ιώδες	0,002
	άγαρ No2	12,00
	pH 7,4±0,2	
▪ PCA agar (LABM)	τροπτόνη	5,00
	εκχύλισμα ζύμης	2,50
	γλυκόζη	1,00
	άγαρ No2	12,00
	pH 7,0±0,2	

<i>Θρεπτικά υλικά (Εταιρία)</i>	<i>Σύσταση (g/L), pH</i>	<i>Βιβλιογραφική αναφορά</i>	
▪ KAA agar (LABM)	τρυπτόνη	20,00	Mossel και συν., 1978
	εκχύλισμα ζύμης	5,00	
	χλωριούχο νάτριο	5,00	
	κιτρικό νάτριο	5,00	
	κιτρικό αμμώνιο	0,50	
	σιδήρου	0,15	
	αζίδιο του νατρίου	0,02	
	θειική καναμυκίνη	10,00	
	άγαρ Νο1		
		pH 7,0±0,2	
▪ CFC agar (LABM)			
α) βάση άγαρ	όξινη υδρολυμένη καζεΐνη	10,00	King και συν., 1954
	πεπτόνη ζελατίνης	16,00	
	θειικό κάλιο	10,00	
	χλωριούχο	1,40	
	μαγνήσιο	11,00	
	άγαρ Νο2		
		pH 7,1±0,2	
β) επιλεκτικός παράγοντας	κεφαλοθίνη	0,05	Mead και Adams, 1977
	φουδισίνη	0,01	
	κετριμίδη	0,01	
▪ YGC agar (Biolife)	τρυπτόνη	5,00	FDA, 1995
	εκχύλισμα ζύμης	2,50	
	γλυκόζη	1,00	
	άγαρ	15,00	

II. Θρεπτικά υποστρώματα/υλικά βιοχημικών αναλύσεων

<i>Θρεπτικά υλικά (Εταιρία)</i>	<i>Σύσταση (g/L), pH</i>	<i>Βιβλιογραφική αναφορά</i>	
▪ Ζωμός ελέγχου ζύμωσης σακχάρων	πρωτεΐνη πεπτόνης	10,00	ISO, 2014a
	εκχύλισμα κρέατος	1,00	
	χλωριούχο νάτριο	5,00	
	ιώδες της βρωμοκρεζόλης	0,02	
	L- ραμνόζη ή D-ξυλόζη	5	
	pH 6,8±0,2		
▪ TSB (LABM)	τροπτόνη καζεΐνης	17,00	ISO, 2014a
	πεπτόνη σόγιας	3,00	
	χλωριούχο νάτριο	5,00	
	φωσφορικό κάλιο	2,50	
	δεξτρόζη	2,50	
	pH 7,3±0,2		
▪ Ημιστερεό υλικό για έλεγχο κινητικότητας	πεπτόνη καζεΐνης	20,00	Prentice και Neaves, 1992
	πεπτόνη κρέατος	6,10	
	άγαρ	3,50	
▪ Αιματούχο άγαρ από αίμα αλόγου	10 έτοιμα τρυβλία, 90 mm		Ellner και συν., 1966

III. Χημικά αντιδραστήρια μοριακών αναλύσεων

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στις μοριακές αναλύσεις παρασκευάστηκαν με χημικά αντιδραστήρια της εταιρίας AppliChem, (Darmstadt, Germany).

<i>Χημικά αντιδραστήρια</i>	<i>Παρασκευή</i>
▪ NaPBS	<u>Τελικός όγκος 1 lt</u> 40,5 mL Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 0,2 M 9,5 mL NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 0,2 M 8,0 g NaCl H ₂ O έως τελικό όγκο pH 7,3
▪ EDTA 0,5M, pH 8,0	<u>Τελικός όγκος 1lt</u> 186,1g Na ₂ EDTA ~700 mL H ₂ O Ρύθμιση pH 8,0 H ₂ O έως τελικό όγκο
▪ Tris- HCl 1M, pH 7,5	<u>Τελικός όγκος 1lt</u> 157,6 g Tris-HCl ~800 mL H ₂ O Ρύθμιση pH 7,5 H ₂ O έως τελικό όγκο
▪ Σορβιτόλη 1 M – EDTA 0,1 M, pH 7,5	<u>Τελικός όγκος 500 mL</u> 91,1 g Sorbitol 100 mL EDTA 0,5M ~300 mL H ₂ O Ρύθμιση pH 7,5 H ₂ O έως τελικό όγκο
▪ Tris- HCl 50 mM – EDTA 20 mM, pH 7,4	<u>Τελικός όγκος 1lt</u> 50 mL Tris- HCl 1M 40 mL EDTA 0,5 M ~710 mL H ₂ O Ρύθμιση pH 7,4 H ₂ O έως τελικό όγκο
▪ SDS 10%	<u>Τελικός όγκος 100 mL</u> 10 g SDS 100 mL H ₂ O
▪ Οξικό κάλιο 5M	<u>Τελικός όγκος 500 mL</u> 245 g οξικό κάλιο 500 mL H ₂ O
▪ Αιθανόλη 70%	<u>Τελικός όγκος 100 mL</u> 70 mL καθαρή αιθανόλη 30 mL H ₂ O

<i>Χημικά αντιδραστήρια</i>	<i>Παρασκευή</i>
▪ TAE 1X	<u>Τελικός όγκος 1lt</u> 20 mL TAE 50X 980 mL H ₂ O
▪ Πηκτική αγαρόζης 1,5%	<u>Τελικός όγκος 100 mL</u> 1,5 g αγαρόζης 100 mL TAE 1X
▪ Loading dye buffer 6X	<u>Τελικός όγκος 10 mL</u> 0,45 mL Bromophenol blue 2% 0,45 mL Xylene cyanol 2% 6 mL glycerol 1,2 mL EDTA 0,5 M H ₂ O έως τελικό όγκο
▪ ladder	<u>Ανάμειξη συστατικών σε αναλογία 1:1:4</u> 1 μL DNA ladder 1 μL loading dye buffer 6x 4 μL H ₂ O

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική

- ΚΕ.ΕΛ.ΠΝΟ (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων). 2016. Αύξηση δηλωθέντων κρουσμάτων λιστερίωσης στην Ελλάδα, 2015-2016 – Αποτελέσματα της έως τώρα διερεύνησης. Διαθέσιμο online: <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=6889>. Τελευταία πρόσβαση: 30.12.2016.
- Κωλέττας Ε. 2010. Σημειώσεις στη «Φυσιολογία του πεπτικού συστήματος». Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Διαθέσιμο online: http://ecourse.uoi.gr/pluginfile.php/85906/mod_folder/content/0/21%20-%207._DIGESTIVE_SYSTEM_PHYSIOLOGY.pdf?forcedownload=1.
- Λάζος, Ε.Σ. 2010. Ελεγχόμενες και Τροποποιημένες Ατμόσφαιρες. Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων. ΤΕΙ Αθηνών. Διαθέσιμο online: www.foodtech.gr/old/pdfs/CAMAFoods.pdf.
- Πολυσίου, Μ.Γ., Ταραντίλης, Π.Α. 2008. Ενόργανη Ανάλυση. Εργαστηριακές σημειώσεις. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Χημείας.

Ξενόγλωσση

- Aarts, H.J.M., Hakemulder, L.E., Van Hoef, A.M.A. 1999. Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns. *Int. J. Food Microbiol.*, 49:95–102.
- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Vinas I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruits and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int. J. Food Microbiol.*, 123(1-2):121-129.
- 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*, 51:832–841.
- Adams, M.R., Moss, M.O. 2008. *Food microbiology*. (3rd edn.). Cambridge: RSC Publishing.
- Adegoke, G.O., Odesola, B.A. 1996. Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agents of biodeterioration using the powder and essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). *Int. Biodeter. Biodegr.*, 6:81–84.

- Alessandria, V., Rantsiou, K., Dolci, P., Zeppa, G., Cocolin, L.A. 2013. Comparison of gene expression of *Listeria monocytogenes* in vitro and in the soft cheese Crescenza. *Int. J. Dairy Technol.*, 66:83-89.
- Allerberger, F., Langer, B., Hirsch, O., Dierich, M.P., Seeliger, H.P. 1989. *Listeria monocytogenes* cholecystitis. *Z Gastroenterol.*, 27:145–147.
- Allcock, J. 1992. Cutaneous listeriosis, *Vet. Rec.*, 130:18-19.
- Amagliani, G., Brandi, G., Omiccioli, E., Casiere, A., Bruce, I.J., Magnani, M. 2004. Direct detection of *Listeria monocytogenes* from milk by magnetic based DNA isolation and PCR. *Food Microbiol.*, 21:597–603.
- Amodio, M.L., Cabezas, A., Rinaldi, R., Colelli, G. 2007. Implementation of rating scale for visual quality evaluation of various vegetables. Appendix 1. In *Produce Quality Rating Scales and Color Charts Postharvest Horticulture Series No. 23*. Kader, A.A., Cantwell, M., Eds.: University of California: Davis, CA, USA.
- Amodio, M.L., Derossi, A., Mastrandrea, L., Colelli, G. 2015. A study of the estimated shelf life of fresh rocket using a non-linear model. *J. Food Eng.*, 150:19-28.
- Amit, K.T., Malik, A. 2010. Liquid and vapor-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: Microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complement. Altern. Med.*, 10:1–11.
- 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.
- Andrigetto C, Zampese L, Lombardi A. 2001. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Lett. Appl. Microbiol.*, 33:26-30.
- Andritsos, N., Mataragas, M., Paramithiotis, S., Nychas, G.J.E., Drosinos, E.H. 2012. Estimating the diagnostic accuracy of three culture-dependent methods for the *Listeria monocytogenes* detection from a Bayesian perspective. *Int. J. Food Microbiol.*, 156:181-185.
- Andritsos, N., Mataragas, M., Paramithiotis, S., Drosinos, E.H. 2013. Quantifying *Listeria monocytogenes* prevalence and concentration in minced pork meat and estimating performance of three culture media from presence/absence microbiological testing using a deterministic and stochastic approach. *Food Microbiol.*, 36:395-405.

- Aragon-Alegro, L.C., Aragon, D.C., Martinez, E.Z., Landgraf, M., de Melo Franco, B.D.G., Destro, M.T. 2008. Performance of a chromogenic medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* in food. *Food Control*, 19:483–486.
- Archambaud, C., Nahori, M. A., Soubigou, G., Becavin, C., Laval, L., Lechat, P., Smokvina T, Langella, P., Lecuit, M., Cossart, P. 2012. Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109:16684–16689.
- Armstrong, R.W., Fung, P.C. 1993. Brainstem encephalitis (rhombencephalitis) due to *Listeria monocytogenes*: Case report and review. *Clin. Infect. Dis.*, 16:689–702.
- Armstrong, D. 1995. *Listeria monocytogenes*. New York: Churchill Livingstone.
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R., Korsten, L. 2010. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Prot.*, 29:369–377.
- Arya, M., Shergill, I., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Hiteudra, R.H.P. 2005. “Basic principles of Real Time quantitative PCR”. *Expert Reviews Molecular Diagnostics*, London, UK. Vol 5 No2 Διαθέσιμο online: <https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/BIO286/Christopoulos/Fluorescence%20%26%20PCR%20%23.pdf>. Τελευταία πρόσβαση: 27.04.2016.
- Aurora, R., Prakash, A., Prakash, S., Rawool, D.B., Barbuddhe, S.B. 2008. Comparison of PI-PLC based assays and PCR along with in vivo pathogenicity tests for rapid detection of pathogenic *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 19:641–647.
- Avila-Sosa, R., Palou, E., Jimenez-Munguia, M.T., Nevarez-Moorillon, G.V., Navarro Cruz, A.R., Lopez-Malo, A. 2012. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *Int. J. Food Microbiol.*, 153:66–72.
- Azaraksh, N., Osman, A., Ghazali, H.M., Tan, C.P., Adzahan, N.M. 2014. Lemongrass essential oil incorporated into alginate-based edible coating for shelf-life extension and quality retention of fresh-cut pineapple. *Postharvest Biol. Technol.*, 88:1–7.
- Bandelt, H.J., Dress, A.W.M. 1992. A canonical decomposition theory for metrics on a finite set. *Adv. Math.*, 92:47–105.
- Baracchini, E., Bremer, H. 1987. Determination of synthesis rate and lifetime of bacterial mRNAs. *Anal. Biochem.*, 167:245-260.
- Baratta, M.T., Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Ruberto, G. 1988. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Fragr. J.*, 13:235–244.
- Barillari, J., Canistro, M.E., Paolini, M., Ferroni, F., Pedulli, G.F., Iori, R., Valmigli, L. 2005. Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite

- contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts. *J. Agric. Food Chem.*, 53:2475-2482.
- Barry, T., Collieran, 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 Methods Appl.*, 15-56. (Erratum, 1:149.)
- Barth, M., Hankinson, T.R., Zhuang, H., Breidt, F. 2009. Microbiological Spoilage of Fruits and Vegetables. In W.H. Sperber, M.P. Doyle (eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, Food Microbiology and Food Safety, Springer-Verlag New York, pp.135-183.
- Bavishi, C., Dupont, H.L. 2011. Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 34:1269–1281.
- Beauregard, K.E., Lee, K.D., Collier, R.J., Swanson, J.A. 1997. pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin o from *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.*, 186(7):1159-1163.
- Becker, L.A., Cetin, M.S., Hutkins, R.W., Benson, A.K. 1998. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor σ_B from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J. Bacteriol.*, 180:4547-4554.
- Begley, M., Gahan, C.G., Hill, C. 2005a. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29:625–651.
- Begley, M., Sleator, R.D., Gahan, C.G., Hill, C. 2005b. Contribution of three bile-associated loci, *bsh*, *pva*, and *btlB*, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, 73:894–904.
- Behari, J., Youngman, P. 1998. Regulation of *hly* expression in *Listeria monocytogenes* by carbon sources and pH occurs through separate mechanisms mediated by PrfA. *Infect. Immun.*, 66:3635-3642.
- Bergmann, B., Raffelsbauer, D., Kuhn, M., Goetz, M., Hom, S., Goebel, W. 2002. InlA- but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by nonphagocytic mammalian cells needs the support of other internalins, *Mol. Microbiol.*, 43:557-570.
- Berkvens, D., Speybroeck, N., Praet, N., Adel, A., Lesaffre, E. 2006. Estimating disease prevalence in a Bayesian framework using probabilistic constraints. *Epidemiology*, 17:145-153.
- Berrang, M.E., Brackett, R.E. 1989. Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. *J. Food Prot.*, 52:702–705.

- Betrán, E., Rozas, J., Navarro, A., Barbadilla, A. 1997. The estimation of the number and the length distribution of gene conversion tracts from population DNA sequence data. *Genetics*, 146:89-99.
- Beuchat, L.R., Brackett, R.E. 1990. Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:1734-1742.
- Beuchat, L.R. 1996. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Food Control*, 7: 223-228.
- Beuchat L.R., World Health Organization (WHO). 2002. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Geneva: World Health Organization, 2002.
- 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.
- Bilir Ormanci, F.S., Erol, I., Ayaz, N.D., Iseri, O., Sariguzel, D. 2008. Immunomagnetic separation and PCR detection of *Listeria monocytogenes* in turkey meat and antibiotic resistance of the isolates. *Br. Poult. Sci.*, 49:560-565.
- Bille, J. 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. Amsterdam: Elsevier.
- Bio-rad, 2010. Introduction to PCR Primer & Probe Chemistries. Διαθέσιμο online: <http://www.bio-rad.com/en-cy/applications-technologies/introduction-pcr-primer-probe-chemistries>. Τελευταία πρόσβαση: 27.04.2016.
- 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.
- Blackwood, K.S., Turenne, C.Y., Harmsen, D., Kabani, A.M. 2004. Reassessment of sequence-based targets for identification of *Bacillus* species. *J. Clin. Microbiol.*, 42:1626–1630.
- Blenden, D.C., Szatalowicz, F.T. 1967. Ecological aspects of listeriosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 151:1761-6.
- Bohne, J., Sokolovic, Z., Goebel, W. 1994. Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.*, 11:1141-1150.
- Bonada de Silva, C., Guterres, S.S., Weisheimer, V., Schapoval, E.E.S. 2008. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida species*. *Braz. J. Infect. Dis.*, 12:63–66.
- Bowman, J.P., Bittencourt, C.R., Ross, T., 2008. Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology*, 154:462-475.

- Brackett, R.E. 1999. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens on produce. *Postharvest Biol. Tec.*, 15:305–31.
- Braun, L. Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G., Cossart, P. 1997. InlB: An invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol. Microbiol.*, 25:285-294.
- Brehm, K., Kreft, J., Ripio, M.T., Vazquez-Boland, J.A. 1996. Regulation of virulence gene expression in pathogenic *Listeria*. *Microbiology*, 12:219-236.
- Briggs, A.H., Ades, A.E., Price, M.J. 2003. Probabilistic sensitivity analysis for decision trees with multiple branches: Use of the Dirichlet distribution in a Bayesian framework. *Med. Decis. Making*, 23:341-350.
- Broemeling, L.D. 2007. Bayesian biostatistics and diagnostic medicine. (1st edn.). Boca Raton, FL: Chapman and Hall/CRC.
- Brouwer M.C. van de Beek, D., Heckenberg, S.G.B., Spanjaard, L., de Gans, J. 2006. Community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. *Clin. Infect. Dis.*, 43:1233-1238.
- Brown, C.J., Garner, E.C., Keith Dunker, A., Joyce, P. 2001. The power to detect recombination using the coalescent. *Mol. Biol. Evol.*, 18(7):1421–1424.
- Bruen, T.C., Herve P., Bryant, D. 2006. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics*, 172:2665–2681.
- Bruminhent, J., Lynch, T.K., Gefen, J., Santoro, J. 2013. *Listeria monocytogenes* cholecystitis: a possible new syndrome. *Am. J. Med. Sci.*, 345:414–417.
- Bubert, A., Kuhn, M., Goebel, W., Köhler, S. 1992. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J. Bacteriol.*, 174:8166-8171.
- Bubert, A., Sokolovic, Z., Chun, S.K., Papatheodorou, L., Simm, A., Goebel, W. 1999. Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. *MGG.*, 261:323–336.
- Burchill, S.A., Lewis, I.J., Selby, P. 1999. Improved methods using the reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect tumour cells. *Br. J. Cancer.*, 79:971-977.
- Burdette, D.L., Vance, R.E. 2013. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat. Immunol.*, 14:19–26.
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods— A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94:223-253.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.*, 25:169-193.

- Bustin, S.A., 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, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J. Mol. Endocrinol.*, 34:597-601.
- Cabanes, D., 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.*, 10:238.
- Camejo A, Buchrieser, C., Couvé, E., Carvalho, F., Reis, O., Ferreira, P., Sousa, S., Cossart, P., Cabanes, D. 2009. In vivo transcriptional profiling of *Listeria monocytogenes* and mutagenesis identify new virulence factors involved in infection. *PLoS Pathog.*, 5:e1000449.
- Carlin, F., Nguyen-the, C., Cudennec, P., Reich, M. 1989. Microbiological spoilage of fresh, « ready-to-use » grated carrots. *Sci. Aliments*, 9:371–386.
- Carlson, L.H.C., Machado, R.A.F., Spricigo, C.B., Pereira, L.K., Bolzan, A. 2001. Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, 21:33–39.
- Cavaiuolo, M., Cocetta, G., Bulgari, R., Spinardi, A., Ferrante, A. 2015. Identification of innovative potential quality markers in rocket and melon fresh-cut produce. *Food Chem.*, 188:225-233.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1992. Preventing foodborne illness: Listeriosis. Atlanta: Division of Bacterial and Mycotic Diseases, National Center for Infectious Diseases, U.S. Centers for Disease Control and Prevention.
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2012. Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen farms, Colorado. 2012. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/082712/index.html>. Τελευταία ενημέρωση: 01.03.2015.
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2016a. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>. Τελευταία ενημέρωση: 31.03.2016.
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2016b. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Frozen Vegetables. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/frozen-vegetables-05-16/index.html>. Τελευταία ενημέρωση: 03.05.2016.
- CFR (Code of Federal Regulations). 2015a. Title 21, Food and Drugs. Chapter I, Food and Drug Administration (FDA). Department of Health and Human Services. Subchapter B, Food for Human Consumption. Part 101, Food Labeling. Sec. 101.95, “Fresh”, “Freshly Frozen”, “Fresh Frozen”, “Frozen Fresh”. Διαθέσιμο online:

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=101.95>.

Τελευταία πρόσβαση: 25.07.2016.

CFR (Code of Federal Regulations). 2015b. Title 21, Food and Drugs. Chapter I, Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Subchapter B, Food for Human Consumption (Continued). Part 182, Substances Generally Recognized as Safe. Subpart A, General Provisions. Sec. 182.20 Essential Oils, Oleoresins (Solvent Free), and Natural Extracts (Including Distillates). Διαθέσιμο online: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=182&showFR=1>. Τελευταία πρόσβαση: 26.07.2016.

Chan, Y.C., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2007. s^B -dependent and s^B -independent mechanisms contribute to transcription of *Listeria monocytogenes* cold stress genes during cold shock and cold growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:6019-6029.

Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., de Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L., Vlietink, A.J. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.*, 79:213–220.

Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., Boor, K.J. 2008. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.*, 16:388-396.

Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Martinez-Canamero, M., Galvez, A. 2010. A quantitative real-time PCR assay for quantification of viable *Listeria monocytogenes* cells after bacteriocin injury in food—first insights. *Curr. Microbiol.*, 61:515–519.

Cocolin, L., Stella, S., Nappi, R., Bozzetta, E., Cantoni, C., Comi, G. 2005. Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. *Int. J. Food Microbiol.*, 103:167-178.

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.*, 88:132-141.

Cole, M.B., Jones, M.V., Holyoak, C. 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 69:63–72.

Commission Regulation (EC). 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, Official Journal of the European Union, L 338, 22.12.2005, p1-26.

- Conner, D.E., Scott, V.N., Sumner, S.S., Bernard, D.T. 1989. Pathogenicity of food-borne, environmental and clinical isolates of *Listeria monocytogenes* in mice, *J. Food Sci.*, 54, 1553.
- Conte, M.P., Petrone, G., Di Biase, A.M., Longhi, C., Penta, M., Tinari, A., Superti, F., Fabozzi, G., Visca, P., Seganti L. 2002. Effect of acid adaptation on the fate of *Listeria monocytogenes* in THP-1 human macrophages activated by gamma interferon. *Infect. Immun.*, 70:4369–4378.
- Cordano, A.M., Jacquet, C. 2009. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization. *Int. J. Food Microbiol.*, 132:176–179.
- 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.
- 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.
- Cotter, P.D., Gahan C.G.M., Hill, C. 2001. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Mol. Microbiol.*, 40(2):465-475.
- Cotter, P. D., Ryan, S., Gahan, C.G., Hill, C. 2005. Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:2832–2839.
- 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.
- Crandall, K.A., Templeton, A.R. 1999. Statistical approaches to detecting recombination, in *The Evolution of HIV*, K.A. Crandall (ed.). Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 153–176.
- Crépet, A., Stahl, V., Carlin, F. 2009. Development of hierarchical Bayesian model to estimate the growth parameters of *Listeria monocytogenes* in minimally processed fresh leafy salads. *Int. J. Food Microbiol.*, 131:112-119.
- Crimmins, G.T., Herskovits, A.A., Rehder, K., Sivick, K.E., Lauer, P., Dubensky, T.W. Jr, Portnoy, D.A. 2008. *Listeria monocytogenes* multidrug resistance transporters activate a cytosolic surveillance pathway of innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105:10191–10196.
- Cristani, M., D’Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A., Trombetta, D. 2007. Interaction of four monoterpenes

- contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 25:6300–6308.
- Crosby, L.D., Criddle, C.S. 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to *rrn* operon copy number heterogeneity. *Biotechniques*, 34:790–794.
- Cummins, A.J., Fielding, A.K., McLauchlin, J. 1994. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS, *J. Infect.*, 28, 89.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* sub sp. *michiganensis*. *Crop Prot.*, 22:39-44.
- D'Agostino, M., Wagner, M., Vazquez-Boland, J.A., Kuchta, T., Karpiskova, R., Hoorfar, J., Novella, S., Scotti, M., Ellison, J., Murray, A., Fernandes, I., Kuhn, M., Pazlarova, J., Heuvelink, A., Cook, N. 2004. A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model—towards an international standard. *J. Food Prot.*, 67:1646–1655.
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E., Griffin, P.M. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. M.*, 336(2):100-105.
- 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.
- Da Mota, F.F., Gomes, E.A., Paiva, E., Rosado, A.S., Seldin, L. 2004. Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the *16S* rRNA gene. *Lett. Appl. Microbiol.*, 39:34-40.
- Dawson, S.J., Evans, M.R.W., Willby, D., Bardwell, J., Chamberlain, N., Lewiset, D.A. 2006. *Listeria* outbreak associated with sandwich consumption from a hospital retail shop, United Kingdom, *Euro Surveill.*, 11:89.
- Delaquis, P.J., Stewart, S., Toivonen, P.M.A., Moyls, A.L. 1999. Effect of warm, chlorinated water on the microbial flora of shredded lettuce. *Food Res. Int.*, 32:7–14.
- Delignette-Muller, M.L., Cornu, M., Pouillot, R., Dennis, J.B. 2006. Use of Bayesian modeling in risk assessment: Application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.*, 106:195-208.
- den Bakker, H.C., Didelot, X., Fortes, E.D., Nightingale, K.K., Wiedmann, M. 2008. Lineage specific recombination rates and microevolution in *Listeria monocytogenes* *BMC Evol.*, 8(8):277.

- den Bakker, H.C., Manuel, C.S., Fortes, E.D., Wiedmann, M., Nightingale, K.K. 2013. Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradonensis* subsp. nov., isolated from a ranch. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63:3257-3268.
- Dennis, P.P., Bremer, H. 1974. Macromolecular composition during steady-state growth of *Escherichia coli* B/r. *J. Bacteriol.*, 119:270-281.
- 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.*, 55:99-108.
- Descy, J., de Mol, P., Hayette, M.P., Huynen, P., Meex, C., Melin, P. 2012. Acute cholecystitis with *Listeria monocytogenes*. *Acta Clin. Belg.*, 67:295–297.
- Doganay, M. 2003. Listeriosis: Clinical presentation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 35:173-175.
- 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., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 42(8):3819–3822.
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jaquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P., Buchrieser, C. 2004. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics. *Infect. Immun.*, 72:1072–1083.
- Dowd, G.C., Joyce, S.A., Hill, C., Gahan, C.G. 2011. Investigation of the mechanisms by which *Listeria monocytogenes* grows in porcine gallbladder bile. *Infect. Immun.*, 79:369–379.
- Dramsı, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens, P.L., Cossart, P. 1997. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun.*, 65(5):1615-1625.
- Dramsı, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., Cossart, P. 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires the expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.*, 16:251-261.
- Dramsı, S., Cossart, P. 2002. Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *J. Cell Biol.*, 156(6):943–946.

- Drancourt, M., Roux, V., Fournier, P.E., Raoult, D. 2004. *rpoB* gene sequence-based identification of aerobic grampositive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. J. Clin. Microbiol., 42:497–504.
- Drebbt, M., Neal, S., Schlech, W., Rozee, K. 1996. Differentiation of *Listeria* isolates by PCR amplicon profiling and sequence analysis of 16s-23s rRNA internal transcribed spacer loci. J. Appl. Bacteriol., 80:174-178.
- Duodu, S., Holst-Jensen, A., Skjerdal, T., Cappelier, 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 (European Food Safety Authority). 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA Journal 2011, 9, 2090.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA Journal 2012, 10, 2597.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2013. *Listeria*. <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/listeria.htm>. Τελευταία ενημέρωση: 27.06.2013.
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2010. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2008. EFSA Journal, 8, 1496, pp 410.
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA Journal, 9, 2090, pp 378.
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2015a. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA Journal 2015;13(1):3991, 69 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991.

- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2015b. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015;13(12):4329, doi:10.2903/j.efsa.2015.4329.
- Elgart, V., Jia, T., Kulkarni, R. 2010. Quantifying mRNA synthesis and decay rates using small RNAs. *Biophys. J.*, 98:2780-2784.
- Ellner, P.D., Stoessel, C.J., Drakeford, E., Vasi, F. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:502-504.
- Eusebi, P. 2013. Diagnostic Accuracy Measures. *Methodological Notes. Cerebrovasc Dis.*, 36:267–272.
- Engelbrecht, F., Chun, S.K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., Sokolovic, Z. 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.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, 55:476-511.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I., Carter, A.O., Varughese, P.V., Ashton, F.E., Ewan, E.P. 1991. Neonatal listeriosis due to cross-infection confirmed by isoenzyme typing and DNA fingerprinting. *J Infect Dis.*, 163(4):927–928.
- Farber, J.M., Addison, C.J. 1994. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.*, 77:242–250.
- Feresu, S.B., 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 σ^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* σ^B in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:2692-2698.
- Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V., Reingold, A.L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Engl. J. Med.*, 312:404–407.
- Fonnesbech Vogel B., Vigel Jørgensen L., Ojeniyi, B., Hus, H.H., Gram, L. 2001. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analyses. *Int. J. Food Microbiol.*, 65:83–92.

- Food and Drug Administration (FDA). 1995. Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. Revision A, 1998. Published by AOAC International.
- Food Safety Authority of Ireland (FSAI). 2011. *Listeria monocytogenes*. Microbial Factsheet Series. Issue no.1. Διαθέσιμο στο διαδίκτυο: <https://www.fsai.ie/listeriamonocytogenes.html>.
- Fraser, J.A., Sperber, W.H. 1988. Rapid detection of *Listeria* spp in food and environmental samples by esculin hydrolysis. J. Food Protect. 51(10):762-765.
- Freitag, N.E., Rong, L., Portnoy, D.A. 1993. Regulation of the *prfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. Infect. Immun., 61(6):2537-2544.
- Fu, Y.X., Li, W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics, 133: 693-709.
- Gahan, C.G., Hill, C. 1999. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 50(1-2):93-100.
- Gahan, C.G.M., Hill, C. 2014. *Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. Front. Cell Infect. Microbiol., 4:9. doi: 10.3389/fcimb.2014.00009.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Sansonetti, P.J. 1986. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun., 52:50.
- Gaillard, J.L., Beretti, J.L., Boulot-Tolle, M., Wilhelm, J.M., Bertrand, J.L., Herbelleau, T., Berche, P. 1992. Serological evidence for culture negative listeriosis of the central nervous system. Lancet, 340:560.
- Gallagher, P.G., Watakunakorn, C. 1998. *Listeria monocytogenes* endocarditis: A review of the literature 1950–1986. Scand. J. Infect. Dis., 20:359-368.
- Galsworthy, S.B., Girdler, S., Koval. S.F. 1990. Chemotaxis in *Listeria monocytogenes*. Acta Microbiol. Hung., 37:81–85.
- Garner, M.R., Njaa, B.L., Wiedmann, M., Boor, K.J. 2006. Sigma B contributes to *Listeria monocytogenes* gastrointestinal infection but not to systemic spread in the guinea pig infection model. Infect. Immun., 74:876–886.
- Garrity, M.G., Bell, A.J., Lilburn, G.T. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edition. Springer, New York.
- Gaul, L.K., Farag, N.H., Shim, T., Kingsley, M.A., Silk, B.J., Trees, E.H. 2012. Hospital-acquired listeriosis outbreak caused by contaminated diced celery- Texas, 2010. Clin. Infect. Dis., 56(1):20–26.

- Gauto A.R., Cone L.A., Woodward D.R., Mahler R.J., Lynch R.D., Stolzman D.H. 1992. Arterial infections due to *Listeria monocytogenes*: Report of four cases and review of the world literature. *Clin. Infect. Dis.*, 14:23-28.
- 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.*, 55:1641-1646.
- George, S.M., Lund, B.M. 1992. The effect of culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15:49-52.
- Georghiou, P.R., Doggett, A.M., Kielhofner, M.A., Stout, J.E., Watson, D.A., Lupski, J.R. Hamill, R.J. 1994. Molecular fingerprinting of *Legionella* species with repetitive element PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 32:2989-2994.
- Germini., A., Masola, A., Carnevali, P., Marchelli, R. 2009. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. *Food Control.*, 20:733-738.
- Gevers D., Huys G., Swings, J. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 205:31-36.
- 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.
- Gilsbach, R., Kouta, M., Bonisch, H., Bruss, M. 2006. Comparison of *in vitro* and *in vivo* reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques*, 40:173-177.
- Giovannacci, I., Ragimbeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendeuvre, J.L., Carlier, V., Ermel, G. 1999. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *Int. J. Food Microbiol.*, 53:127-140.
- Giraffa, G., Carminati, D. 2008. Molecular techniques in food fermentation: principles and applications. In L. Cocolin and D. Ercolini (ed.), *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*. Springer, New York, pp.1-30.
- 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*, 25:386-401.
- Glas, A.S., Lijmer, J.G., Prins, M.H., Bonsel G.J., Bossuyt, P.M.M. 2003. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J. Clin. Epidemiol.*, 56:1129-1135.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Baquerd, F., Berce, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Cetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A.,

- Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., Portillo, F. G., Gerrido, P., Gautier, L., Goebe, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J. M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J. C., Purcell, R., Remmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J. A., Voss, H., Wehland, J., Cossart, P. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 294:849-852.
- Gloffke W., 2003. “Quantitative PCR Update”. The Scientist Διαθέσιμο online: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/14697/title/Quantitative-PCR-Update/> Τελευταία πρόσβαση: 27.04.2016.
- Goni, P., Lopez, P., Sanchez, C., Gomez-Lus, R., Becerril, R., Nerin, C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.*, 116:982–989.
- Gorski, L. 2008. Phenotypic identification. Handbook of *Listeria monocytogenes* Liu Dongyou (ed.) CRC Press. pp.139-168.
- Gouin, E., Mengaud, J., Cossart, P. 1994. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect. Immun.*, 62:3550-3553.
- Goulet, V., Jacquet, C., Vaillant, V., Rebière, I., Mouret, E., Lorente, C., Maillot, E., Stäiner, F., Rocourt, J. 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., Wiedmann, M., Swaminathan, B., Sauders B.D. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60:1280-1288.
- Gray, M., Stafseth, J., Thorp, F., Sholl, L.B., Riley, W.F. 1948. A new technique for isolating *Listerellae* from the bovine brain. *J. Bacteriol.*, 55:471–476.
- Gregory, S.H., Sagnimeni, A.J., Wing, E.J. 1997. Internalin B promotes the replication of *Listeria monocytogenes* in mouse hepatocytes. *Infect. Immun.*, 65:5137.
- Greiffenberg, L. Goebel, W., Sik Kim, K., 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.*, 66:5260-5267.

- 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.
- Guerzoni, E.M., Gianotti, A., Corbo, R.M., Sinigaglia, M. 1996. Self-life modelling for fresh-cut vegetables. *Postharvest Biol. Technol.*, 9(2):195-207.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M.-F., Bielecka, M. K., Scortti, M., Disson, O., Berche, P., Vázquez-Boland, J., Lortholary, O., Lecuit, M. 2010. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg. Infect. Dis.*, 16:136-138.
- Gurtler, V., Stanisich, V.A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16s-23s rDNA spacer region. *Microbiology*, 143:2-16.
- Gutekunst, K.A., Pine, L., White, E., Kathariou, S., Carlone, G. M. 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. 2014. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale multilocus sequence typing study. *Environ. Microbiol.*, 16(2):405–416.
- Habib, I., Sampers, I., Uyttendaele, M., De Zutter, L., Berkvens, D. 2008. A Bayesian modeling framework to estimate *Campylobacter* prevalence and culture methods sensitivity: application to a chicken meat survey in Belgium. *J. Appl. Microbiol.*, 105:2002–2008.
- Hadjilouka, A., Andritsos, N.D., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Drosinos, E.H. 2014a. *Listeria monocytogenes* serotype prevalence and biodiversity in diverse food products. *J. Food Protect.*, 77(12):2115–2120.
- Hadjilouka A., Paramithiotis S., Drosinos E.H. 2014b. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and occurrence of listeriosis from ready to eat fresh fruits and vegetables. In: E.C. Hambrick (Ed.) *Listeria monocytogenes: Food Sources, Prevalence and Management Strategies*. Nova Publishers, pp. 283-296.
- Hadjilouka A., Paramithiotis S., Drosinos E.H. 2015. *Listeria monocytogenes* as a food contaminant; a genomic perspective. In: Tiffany Vicario (Ed.) *Listeria monocytogenes: Incidence, Growth behavior and Control*. Nova Science Publishers, pp. 1-35.
- Hadjilouka, A., Mantzourani, K.S., Katsarou, A., Cavaiuolo, M., Ferrante, A., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Drosinos, E.H. 2015b. Estimation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence and levels in naturally contaminated rocket and

- cucumber samples by deterministic and stochastic approaches. *J. Food Prot.*, 78:311-322.
- Hadjilouka, A., Molfeta, C., Panagiotopoulou, O., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Drosinos, E.H. 2016. Expression of *Listeria monocytogenes* key virulence genes during growth in liquid medium, on rocket and melon at 4, 10 and 30°C. *Food Microbiol.*, 55:7-15.
- Hadjilouka, A., Nikolidakis, K., Paramithiotis, S., Drosinos, E.H. 2016a. Effect of co-culture with enterogenic *E. faecium* on *L. monocytogenes* key virulence gene expression. *AIMS Microbiology*, 2(3):359-371.
- Hain, T., Hossain, H., Chatterjee, S.S., Machata, S., Volk, U., Wagner, S., Brors, B., Haas, S., Kuenne, C.T., Billion, A., Otten, S., Pane-Farre, J., Engelmann, S., Chakraborty, T. 2008. Temporal transcriptomic analysis of the *Listeria monocytogenes* EGD-e σ^B regulon. *BMC Microbiol.*, 8:20. 10.1186/1471-2180-8-20
- Haley, B.J., Sonnier, J., Schukken, Y.H., Karns, J.S., Van Kessel, J.A.S. 2015. Diversity of *Listeria monocytogenes* within a U.S. dairy herd, 2004–2010. *Foodborne Pathog Dis.*, 10:844-850.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.*, 86:985–990.
- 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., Sneath, P.H.A. 1993. Optical DNA-DNA homology in the genus *Listeria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43:26-31.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 22:160-174.
- Havell, E.A. 1986. Synthesis and secretion of interferon by murine fibroblasts in response to intracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, 54:787–792.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6(10):986-994.
- Hein, J. 1990. Reconstructing evolution of sequences subject to recombination using parsimony. *Math. Biosci.*, 98(2): 185–200.
- Hein, J. 1993. A heuristic method to reconstruct the history of sequences subject to recombination. *J. Mol. Evol.*, 36(4): 396–405.
- Ho, J.L., Shands, K.N., Friedland, G., Eckind, P., Fraser, D.W. 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.
- Hofmann, A.F. 1999. Bile acids: the good, the bad, and the ugly. *News Physiol. Sci.*, 14:24–29.
- Horev, B., Sela, S., Vinokur, Y., Gorbatshevich, E., Pinto, R., Rodov, V. 2012. The effects of active and passive modified atmosphere packaging on the survival of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium on washed romaine lettuce leaves. *Food Res. Int.*, 45:1129–1132.
- Hough, A.J., Harbison, S.A., Savill, M.G., Melton, L.D., Fletcher, G. 2002. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. *J. Food Prot.*, 65:1329-1332.
- Houghton, S., Cockerill, F. 2006. RealTime PCR: Overview and applications. *Surgery*, 139(1):1-5.
- Hudson, R.R., Kreitman M., Aguade, M. 1987. A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data. *Genetics*, 116:153-159.
- Hulton, C.J.S., Higgins, C.F. Sharp, P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.*, 5:825–834.
- Hunt M., 2006. Real Time PCR Tutorial. University of South Carolina. Διαθέσιμο online:<http://www.microbiologybook.org/pcr/Real%20Time%20PCR%20Tutorial.pdf>
- Hunter, P.R., Gaston, M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, 26:2465–2466.
- Huson, D.H. 1998. SplitsTree: a program for analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics*, 14(10):68–73.
- Huson, D.H., Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.*, 23:254-267.
- Hyden, P., Pietzka, A., Lennkh, A., Murer, A., Springer, B., Blaschitz, M., Indra, A., Huhulescu, S., Allerberger, F., Ruppitsch, W., Sensen, C.W. 2016. Whole genome sequence-based serogrouping of *Listeria monocytogenes* isolates. *J Biotechnol.*, 235:181-186.
- International Organization for Standardization (ISO). 1996. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria*

- monocytogenes* - Part 1: detection method. Modification of the detection medium. ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004(E). Geneva, Switzerland.
- International Standardization Organization (ISO). 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -Part 2: Enumeration method. Modification of the enumeration medium. ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004(E). Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization (ISO). 2004a. Microbiology of food and animal feeding stuff—horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1. Detection method. Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. Reference number: ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004.
- International Organization for Standardization (ISO). 2004b. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method. Amendment 1: Modification of the enumeration medium. Reference number: ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004.
- Jackson, K.A., Iwamoto, M., Swerdlow, D. 2010. Pregnancy-associated listeriosis. *Epidemiol. Infect.*, 138(10):1503-1509.
- Jacquet, C., Gouin, E., Jeannel, D., Cossart, P., Rocourt, J. 2002. Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:616–622.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Van der Steen, C., Debevere, J. 2001. Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. *Int. J. Food Microbiol.*, 71 (2-3):197-210.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Ragaert, P., Vanneste, E., Debevere, J. 2003. Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *Int. J. Food Microbiol.*, 83(3):263-280.
- Jakobsen, I.B., Easteal, S. 1996. A program for calculating and displaying compatibility matrices as an aid in determining reticulate evolution in molecular sequences. *Comput. Appl. Biosci.*, 12(4):291–295.
- Jaloustre, S., Cornu, M., Morelli, E., Noël, V., Delignette-Muller, M.L. 2011. Bayesian modeling of *Clostridium perfringens* in beef-in-sauce products. *Food Microbiol.*, 28:311-320.

- Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C., Baerheim Svendsen, A. 1987. Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-86 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Med.*, 53:395–398.
- Jaradat, Z.W., Schutze, G.E., Bhunia, A.K. 2002. Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. *Int. J. Food Microbiol.*, 76:1-10.
- Jarvis B. 2007. On the compositing of samples for quantitative microbiological testing. *Lett. Appl. Microbiol.*, 45:592-598.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. *Modern Food Microbiology*, 7th ed.; Springer Science & Business Media: New York, NY, USA.
- Jofre., A., Martin, B., Garriga, M., Pla, M., PRodriguez-Lazaro, D., Aymerich, T. 2005. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiol.*, 22:109-115.
- Jones, B.V., Begley, M., Hill, C., Gahan, C.G., Marchesi, J.R. 2008. Functional and comparative metagenomics analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105:13580–13585.
- Jorgensen, F., Stephens, P.J., Knoche, S. 1995. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, 79:274–281.
- Ji, Y.E., Kempell, K.E., Colston, M.J, Cox, R.A. 1994. Nucleotide sequences of the spacer-1, spacer-2 and trailer regions of the *rrn* operons and secondary structures of precursor 23s rRNAs and precursor 5s rRNAs of slow-growing mycobacteria. *Microbiology*, 140:1763-1773.
- Junttila, J.R., Niemelä, S.I., Hirn, J. 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., 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.
- Kader, A.A., Zagory, D., Kerbel, E.L. 1989. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Technol.*, 28(1):1-30.
- 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.

- Kathariou, S., Metz, P., Hof, H., Goebel, W. 1987. Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol., 169:1291-1297.
- Kathariou, S. 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. J. Food Prot., 65:1811–1829.
- Kazmierczak, M.J., Mithoe, S.C., Boor, K.J., Wiedmann M. 2003. *Listeria monocytogenes* σ^B regulates stress response and virulence functions. J. Bacteriol., 185(19):5722–5734.
- Kazmierczak, M.J., Wiedmann, M., Boor, K.J. 2006. Contributions of *Listeria monocytogenes* σ^B and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth. Microbiology, 152:1827-1838.
- Kerr, K.G., Kite, P., Heritage, J., Hawkey P.M. 1995. Typing of epidemiologically associated environmental and clinical strains of *Listeria monocytogenes* by random amplification of polymorphic DNA. J. Food Prot., 58:609-613.
- Keto-Timonen, R.O., Autio, T.J., Korkeala, H.J. 2003. An improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for discrimination of *Listeria isolates*. Syst. Appl. Microbiol., 26:236–244.
- Ki, J.S., Zhang, W., Qian, P.Y. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and *rpoB* comparisons and their usefulness for species identification. J Microbiol Methods., 77:48–57.
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:454-458.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, Massachusetts.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med., 44:301.
- 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.
- Koukounaras, A., Siomos, A.S., Sfakiotakis, E. 2006. 1-Methylcyclopropene prevents ethylene induced yellowing of rocket leaves. Postharvest Biol. Technol., 41: 109-111.
- Koukounaras, A., Siomos, A.S., Sfakiotakis, E. 2007. Postharvest CO₂ and ethylene production and quality of rocket (*Eruca sativa* Mill.) leaves as affected by leaf age and storage temperature. Postharvest Biol. Technol., 46:167-173.

- Koukounaras, A., Siomos, A.S., Sfakiotakis, E. 2009. Impact of heat treatment on ethylene production and yellowing of modified atmosphere packaged rocket leaves. *Postharvest Biol. Technol.*, 54:172-176.
- Kourkoutas, D., Elmore, J.S., Mottram, D.S. 2006. Comparison of the volatile compositions and flavor properties of cantaloupe, Galia and honeydew muskmelons. *Food Chem.*, 97:95-102.
- Koutsoumanis, K.P., Sofos, J.N. 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 104:83–91.
- Koutsoumanis, K.P., Kendhall, P.A., Sofos, J.N. 2004. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiol.*, 21:415–422.
- Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Pölttsama, P., Elias, T. 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control*, 30:24-29.
- Kreitman, M. 1983. Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 304:412-417.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.*, 27:95-125.
- 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. Τελευταία πρόσβαση: 25.05.2016. http://www.tataa.com/wp-content/uploads/2012/09/GIT_Laboratory-Journal_33-35_2007.pdf.
- Kuhn, M., Goebel, W., 1989. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in the intracellular uptake by mammalian cells, *Infect. Immun.*, 57:55.
- Kuhn, M., Goebel, W. 2007. Molecular virulence determinants of *Listeria monocytogenes*. In E.T Ryser and E.H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (3rd edn.). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 111-155.
- Kuhn, M., Scortti, M., Vázquez-Boland J.A. 2008. Pathogenesis. In Liu Dongyou (ed.), *Handbook of Listeria monocytogenes*. CRC Press. pp. 97-135.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. 1994. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.*, 10:189–191.

- Kumar, S., Dudley, J. 2007. Bioinformatics software for biologists in the genomics era. *Bioinformatics*, 23:1713–1717.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K. 2008. MEGA: a biologistcentric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.*, 9:299–306.
- Lang Halter, E., Neuhaus, K., 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.
- Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M., Altier, C. 2002. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol. Microbiol.*, 46:1451–1464.
- 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., Ohayon, M., 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.*, 65:5309-5319.
- 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. USA*, 101, 6152.
- Leimeister-Wachter, M., Domann, E., Chakraborty, T. 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J. Bacteriol.*, 174:947-952.
- Lesaffre, E., Speybroeck, N., Berkvens, D. 2007. Bayes and diagnostic testing. *Vet. Parasitol.*, 148:58–61.
- Lester, G.E., 2008. Antioxidant, sugar, mineral, and phytonutrient concentrations across edible fruit tissues of orange-fleshed honeydew melon (*Cucumis melo* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 56:3694-3698.
- 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):1334-1340.
- Liang, S.T., Xu, Y.C., Dennis, P., Bremer, H. 2000. mRNA composition and control of bacterial gene expression. *J. Bacteriol.*, 182:3037-3044.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451-1452.

- Lin, C.M., Fernando, S.Y., Wei, C.I. 1996. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in vegetable salads. *Food Control*, 7:135-40.
- 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):3896-3903.
- Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonkura, M.L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B.D., Fannin, S.L., Kleks, A., Broome. C.V. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New Engl. J. Med.*, 319:823–828.
- Liu, W., Saint, D.A. 2002. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294(2):347-353.
- Liu, D., Ainsworth, A., Austin, F., Lawrence, M., 2003. Characterization of virulent and a virulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. *J. Med. Microbiol.*, 52:1065–1070.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J., Austin, F.W., 2007. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int. J. Food Microbiol.*, 118:101-115.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402-408.
- Lokke, M.M., Seefeldt, H.F., Edelenbos, M. 2012. Freshness and sensory quality of packaged wild rocket. *Postharvest Biol. Technol.*, 73:99–106.
- Lomonaco, S., Patti, R., Knabel, S.J., Civera, T. 2012. Detection of virulence-associated genes and epidemic clone markers in *Listeria monocytogenes* isolates from PDO Gorgonzola cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 160:76–79.
- Lorber, B. 1996. Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.*, 24(1):1-9.
- Low, J.C., Donachie, W. 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet. J.*, 153:9-29.
- LPSN bacterio.net. <http://www.bacterio.net/-classifgenerafamilies.html>. Τελευταία πρόσβαση: 20.10.2016.
- Lund, B.M. 1982. The effect of bacteria on post-harvest quality of vegetables and fruits, with particular reference to spoilage. Ch. 9 In M.E. Rhodes-Roberts and F.A. Skinner (eds.), *Bacteria and plants* (pp. 133–153). Society for Applied Bacteriology. Symposium Series No. 10. Sydney: Academic Press.

- Luo, Q., Rauch, M., Marr, A.K., Muller-Altrock, S., Goebel, W. 2004. *In vitro* transcription of the *Listeria monocytogenes* virulence genes *inlC* and *mpl* reveals overlapping PrfA dependent and -independent promoters that are differentially activated by GTP. *Mol. Microbiol.*, 52:39–52.
- 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.*, 137:1381–1392.
- Marr, A.K., Joseph, B., Mertins, S., Ecke, R., Muller-Altrock, S., Goebel, W. 2006. Overexpression of *prfA* leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake. *J. Bacteriol.*, 188:3887–3901.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R. 1992. A highly repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.*, 20(13):3479–3483.
- Martin, D., Rybicki, E. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, 16(6):562–563.
- Maxam, A.M., Gilbert, W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:560-564.
- Maynard Smith, J. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.*, 34(2): 126–129.
- McDonald, J.H., Kreitman, M. 1991. Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature*, 351:652-654.
- McDowell, D.G., Burns, N.A., 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(14):3340-3347.
- McGann, P., Ivanek, R., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2007. Temperature-dependent expression of *Listeria monocytogenes* internalin and internalin-like genes suggests functional diversity of these proteins among the listeriae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:2806-2814.
- McGann, P., Wiedmann, M., Boor, K.J. 2007a. The alternative sigma factor sB and the virulence gene regulator PrfA both regulate transcription of *Listeria monocytogenes* internalins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:2919– 2930.
- McGann, P., Raengpradub, S., Ivanek, R., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2008. Differential regulation of *Listeria monocytogenes* internalin and internalin-like genes by s^B and

- PrfA as revealed by subgenomic microarray analyses. *Foodborne Pathog. Dis.*, 5:417-435.
- McLauchlin J, Hall SM, Velani SK, Gilbert RJ. 1991. Human listeriosis and pate: a possible association. *BMJ*, 303:773-775.
- McLauchlin, J., Low, C. 1994. Primary cutaneous listeriosis in adults: An occupational disease of veterinarians and farmers. *Vet. Rec.*, 135:615.
- McLauchlin, J. 1996. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, 7: 187.
- Mead, G.C., Adams, B.W. 1977. *Br. Poult. Sci.*, 18:661-667.
- Meijerink, J., Mandigers, C., van de Locht, L., Tonnissen, E., Goodsaid, F., Raemaekers, J. 2001. A novel method to compensate for differential amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J. Mol. Diagn.*, 3:55- 61.
- Melchini, A., Costa, C., Traka, M., Miceli, N., Mithen, R., De Pasquale, R., Trovato, A. 2009. Erucin, a new promising cancer chemopreventive agent from rocket salads, shows anti-proliferative activity on human lung carcinoma A549 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 47:1430-1436.
- Mendoza, L., Wilkens, M., Urzua, A. 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (*Asteraceae*). *J. Ethnopharmacol.*, 58:85–88.
- Mengaud, J., Vicente, M.F., Cossart, P. 1989. Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Listeria monocytogenes hlyA* region reveal structural features that may be involved in regulation. *Infect. Immun.*, 57:3695-3701.
- Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J.-A., Milon, G., Cossart, P. 1991a. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol. Microbiol.*, 5:2273-2283.
- Mengaud, J., Geoffroy, C., Cossart, P. 1991. Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: Its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect. Immun.*, 59:1043.
- Milenbachs, A.A., Brown, D.P., Moors, M., Youngman, P. 1997. Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.*, 23:1075-1085.
- Milenbachs Lukowiak, A., Mueller, K.J., Freitag, N.E., Youngman, P. 2004. Deregulation of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression by two distinct and semi-independent pathways. *Microbiology*, 150:321-333.
- Miner, M.D., Port, G.C., Bouwer, H.G.A., Chang, J.-C., Freitag, N.E.A. 2008. Novel *prfA* mutation that promotes *Listeria monocytogenes* cytosol entry but reduces bacterial spread and cytotoxicity. *Microb. Pathog.*, 45:273-281.

- Mishra, A.K., Dubey, N.K. 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:1101–1105.
- Miya, S., Takahashi, H., Nakagawa, M., Kuda, T., Igimi, S., Kimura, B. 2015. Genetic characteristics of Japanese clinical *Listeria monocytogenes* isolates. *PLoS ONE* 10: e0122902.
- Moreno, L.Z., Paixão, R., de Gobbi, D.D.S., Raimundo, D.C., Ferreira, T.S.P., Moreno, A.M., Hofer, E., dos Reis, C.M.F., Matté, G.R., Matté, M.H. 2014. Phenotypic and genotypic characterization of a typical *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. *BioMed. Res. Int.*, Article ID 742032.
- Mossel, D.A.A., Mengerink, W.H.J., Scholts, H.H. 1962. Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.*, 84:381.
- Mossel, D.A.A., Bijken, P.H.G., Eelderink, I., van Spreckens, K.A. 1978. *Streptococci*. ed.: Skinner, F.A., Quesnel, L.B. SAB Symposium Series No. 7 Academic Press, London.
- Mullis, K.B., Ferré, F., Gibbs, R.A. (Eds.) 1994. *The polymerase chain reaction (PCR)*. Birkhäuser. Verlag AG, Basel, Switzerland. ISBN 3-7643-3607-2.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R. 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J. Pathol. Bacteriol.*, 28:407-439.
- Nadon, C.A., Woodward, D.L., Young, C., Rodgers, F.G., Wiedmann, M. 2001. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.*, 39:2704-2707.
- Nadon, C.A., Bowen, B.M., Wiedmann, M., Boor, K.J. 2002. σ^B contributes to PrfA mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, 70:3948-3952.
- Naik, M.I., Fomda, B.A., Jaykumar, E., Bhat, J.A. 2010. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 3:535–538.
- Nauta, M.J. 2002. Modeling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: Is it possible? *Int. J. Food Microbiol.*, 73:297-304.
- Nazer, A.I., Kobilinsky, A., Tholozana, J.L., Dubois-Brissonneta, F. 2005. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: A synergistic effect. *Food Microbiol.*, 22:391–398.

- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J. 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 20:157–160.
- Nei, M., Gojobori, T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.*, 3:418-426.
- Nelson, K.E., Fouts, D.E., Mongodin, E.F., Ravel, J., DeBoy, R., Kolonay, J.F., Rasko, D.A., Angiuoli, S.V., Gill, S.R., Paulsen, I.T., Peterson, J., White, O., Nelson, W.C., Nierman, W., Beanan, M.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Madupu, R., Haft, D.H., Selengut, J., Van Aken, S., Khouri, H., Fedorova, N., Forberger, H., Tran, B., Kathariou, S., Wonderling L.D., Uhlich, G.A., Bayles, D.O., Luchansky, J.B., Fraser, C.M. 2004. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res.*, 32: 2386-2395.
- Neuhaus, K., Satorhelyi, P., Schauer, K., Scherer, S., Fuchs, T.M. 2013. Acid shock of *Listeria monocytogenes* at low environmental temperatures induces *prfA*, epithelial cell invasion, and lethality towards *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics*, 14:285.
- Nguyen-the, C., Carlin, F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34:371–401.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information), Literature, MeSH Database. Διαθέσιμο online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004755>
- Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.*, 178:5636–5643.
- Nychas, G.J.E., Tassou, C.C. Traditional preservatives-oils and spices. 2000. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D., (eds.) Academic Press: London, UK pp. 1717–1722.
- Nyfeldt, A. 1929. Etiologie de la mononucleose infectieuse. *Soc. Biol.*, 101:590–592.
- O'Connor-Shaw, R.E., Roberts, R., Ford, A.L., Nottingham, S.M. 1994. Shelf life of minimally processed honeydew melon, kiwifruit, papaya, pineapple and cantaloupe. *J. Food Sci.*, 59:1202–1206, 1215.
- O'Driscoll, B., Gahan, C.G.M., Hill, C. 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(5):1693–1698.

- 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., 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.
- Olesen, I., Thorsen, L., Jespersen, L. 2010. Relative transcription of *Listeria monocytogenes* virulence genes in liver pates with varying NaCl content. *Int. J. Food Microbiol.*, 141:S60-S68.
- Oliveira, M., Usall, J., Solsona, C., Alegre, I., Vinas, I., Abadias, M. 2010. Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded ‘Romaine’ lettuce. *Food Microbiol.*, 27:375–380.
- Ollinger J., Bowen B., Wiedmann M., Boor K. J., Bergholz T. M. 2009. *Listeria monocytogenes* σ^B modulates PrfA-mediated virulence factor expression. *Infect Immun.*, 77:2113–2124.
- Orsi, R.H., Sun, Q., Wiedmann, M. 2008a. Genome-wide analyses reveal lineage specific contributions of positive selection and recombination to the evolution of *Listeria monocytogenes*. *BMC Evol. Biol.*, 8:233.
- Orsi, R.H., Maron, S.B., Nightingale, K.K., Jerome, M., Tabor, H., Wiedmann, M. 2008b. Lineage specific recombination and positive selection in coding and intragenic regions contributed to evolution of the main *Listeria monocytogenes* virulence gene cluster. *Infect. Genet. Evol.*, 8:566-576.
- Orsi, R.H., den Bakker, H.C., 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*, in: Quinper Froid Symposium. Proceedings. P6 A.D.R.I.A. Quimper (F) 16-18 June, 1997.
- Painter, J., Slutsker L. 2007. Listeriosis in humans. In E.T Ryser και E.H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (3rd edn.). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 85-109.
- Palmer, M. 2001. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* 39:1681–1689.

- Paramithiotis S., Hadjilouka A., Drosinos E.H. 2014. *Listeria* pathogenicity island 1. Structure and function. In: E.C. Hambrick (Ed.) *Listeria monocytogenes: Food Sources, Prevalence and Management Strategies*. Nova Publishers, pp. 265-282.
- 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.*, 28:81-93.
- Parish, M.E., Higgins. D.P. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *J. Food Prot.*, 52:144–147.
- Paziak-Domanska, B., Bogulawska, E., Wiekowska-Szakiel, M., Kotlowski, R., Rozalska, B., Chmiela, M., Kur, J., Dabrowski, W., Rudnicka, W. 1999. Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. *FEMS Microbiol. Lett.*, 171:209–214.
- Patchett, R.A., Kelly, A.F., Kroll, R.G. 1991. Respiratory activity in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 78:95–98.
- Payne, A., Schmidt, T.B., Nanduri, B., Pendarvis, K., Pittman, J.R., Thornton, J.A., Grissett, J., Donaldson, J.R. 2013. Proteomic analysis of the response of *Listeria monocytogenes* to bile salts under anaerobic conditions. *J. Med. Microbiol.*, 62:25–35.
- Pereira, R.S., Sumita, T.C., Furlan, M.R., Jorge, A.O.C., Ueno, M. 2004. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infections. *Rev. Saude Publ.*, 38:326–328.
- Petran, R.L., Zptola, E.A. 1989. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Sci.*, 54:458–460.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9):e45.
- Pfaffl, M.W., Lange, I.G., Daxenberger, A., Meyer, H.H.D. 2001. Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR. *APMIS.*, 109(5): 345-355.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., 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.
- Pfaffl M.W., 2004. “Quantification strategies in real-time PCR”. In *A-Z of quantitative PCR* (Editor: S.A. Bustin). La Jolla: International University Line. Chaper 3, pp. 87-112.
- Phan-Thanh, L. 1998. Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44:183–191.

- Phillips, C.A., Laird, K., Allen, S.C. 2012. The use of Citri-V™—An antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* *in vitro* and on food. *Food Res. Int.*, 47:310–314.
- 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.* 35:245–254.
- Pirie, J.H.H. 1927. A new disease of veld rodents, Tiger River Disease, *Publ. S. Afr. Inst. Med. Res.*, 3:163.
- Pirie, J.H.H. 1940. *Listeria*: Change of name for a genus of bacteria, *Nature*, 145:264.
- Plotto, A., Roberts, D.D., Roberts, R.G. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Acta Hort.*, 628:737–745.
- Polivka, C. 2001. Identification of *Listeria* with a new chromogenic medium RAPID'L.mono. *Arch. Lebensmittelhygiene*, 52:22-23.
- Portnoy, D.A., Jacks, P.S., Hinrichs, D.J. 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.*, 167:1459.
- Posada, D., Crandall, K.A. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(24):13757–13762.
- Posada, D. 2002. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: empirical data. *Mol. Biol. Evol.*, 19(5):708–717.
- Pouillot, R., Gerbier, G., Gardner, I.A. 2002. “TAGS”, a program for the evaluation of test accuracy in the absence of gold standard. *Prev. Vet. Med.*, 53:67-81.
- Pouillot, R., Lubran, M.B. 2011. Predictive microbiology models vs. modeling microbial growth within *Listeria monocytogenes* risk assessment: What parameters matter and why. *Food Microbiol.*, 28:720-726.
- Premaratne, R.J., Lin, W.J., Johnson, E.A. 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:3046–3048.
- Prentice, G.A., Neaves, P. 1992. The identification of *Listeria* species. In R. G. Board, D. Jones, & F.A. Skinner (Eds.), *Applied Bacterial Symposium* (pp. 283-296). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramon, D. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(9):2948-2953.

- Quillin, S.J., Schwartz, K.T., Leber, J.H. 2011. The novel *Listeria monocytogenes* bile sensor BrtA controls expression of the cholic acid efflux pump MdrT. *Mol. Microbiol.*, 81: 129–142.
- 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.*, 260:144–158.
- Ramirez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., Calafell, F., Navarro, A. 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*, 179:555–567.
- Rantsiou, K., Mataragas, M., Alessandria, V., Cocolin, L. 2012a. Expression of virulence genes of *Listeria monocytogenes* in food. *J. Food Saf.*, 32:161-168.
- Rantsiou, K., Greppi, A., Garosi, M., Acquadro, A., Mataragas, M., Cocolin, L. 2012b. 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.
- Rasmussen, R. 2001. Quantification on the LightCycler. In: *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*, Meuer, S., Wittwer, C., and Nakagawara, K., (eds) pp. 21-34, Springer Press, ISBN 3-540-66736-9.
- Rauch, M., Luo, Q., Muller-Altrock, S., Goebel, W. 2005. SigB-dependent *in vitro* transcription of *prfA* and some newly identified genes of *Listeria monocytogenes* whose expression is affected by PrfA *in vivo*. *J. Bacteriol.*, 187: 800-804.
- Raveneau, J., Geoffroy, C., Beretti, J.L., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., Berche, P. 1992. Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect. Immun.*, 60:916-921.
- Raybaudi-Massilis, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Martin-Belloso, O. 2006. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices. *J. Food Prot.*, 69:1579–1586.
- Reasoner, D.J., Geldreich, E.E. 1985. A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from potable water. *App. Environ. Microbiol.*, 49(1):1-7.
- Reissbrodt, R. 2004. New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp.-an overview. *Int. J. Food Microbiol.*, 95:1-9.
- 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.

- 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.
- Reynolds, J.E.F. 1996. Martindale: the Extra Pharmacopoeia, 31st ed.; Royal Pharmaceutical Society of Great Britain: London, UK.
- Rico, D., Martín-Diana, A.B., Frias, J.M., Barat, J.M., Henehan, G.T.M., Barry-Rya N.C. 2007. Improvement in texture using calcium lactate and heat-shock treatments for stored ready-to-eat carrots. *J. Food Eng.*, 79:1196-1206.
- Riedo, F.X., Pinner, R.W., Tosca, M.L., Cartter, M.L., Graves, L.M., Reeves, M.W., Weaver, R.E, Plikaytis, B.D., Broome, C.V. 1994. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *J. Infect. Dis.*, 170(3):693-6.
- 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, M.S., Velge, P., Liu, D. 2008. Virulence determination. In Liu Dongyou (ed.). *Handbook of Listeria monocytogenes*. CRC Press. pp. 241-270.
- Rocourt, J., Seeliger, H.P. 1985. Distribution of species of the genus *Listeria*. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. (A)*, 259:317.
- Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R., Bille, J. 1986. Méningite purulente aiguë à *Listeria seeligeri* chez un adulte immunocompétent. *Schweiz Med Wochenschr.* 116(8):248–251.
- Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, Ch., 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.*, 42:69–73.
- Rocourt, J., Buchrieser, C. 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy, and identification. In E.T Ryser και E.H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (3rd edn., pp. 1-20). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Rodov, V., Horev, B., Goldman, G., Vinokur, Y., Fishman, S. 2007. Model-driven development of microperforated active modified-atmosphere packaging for fresh-cut produce. *Acta Hort.*, 746:83–88.
- Rojas-Grau, M.A., Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. 2009. The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: A review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44:875–889.

- Romick, T.L., Fleming, H.P., McFeeters, R.F. 1996. Aerobic and anaerobic metabolism of *Listeria monocytogenes* in defined glucose medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:304–307.
- Roseburg, T., Epps, L.J., Clarke, A.R. 1944. A study of the isolation, cultivation and pathogenicity of *Actinomyces israeli* recovered from the human mouth and from actinomycosis in man. *J. inf. Dis.*, 74:131-149.
- Rosenow, E.C. 1919. Studies on selective localisation; focal infection with special reference to oral sepsis. *J. Dent. Res.*, 1:205-267.
- Ryan, S., Hill, C, Gahan, C.G. 2008. Acid stress responses in *Listeria monocytogenes*. *Adv. Appl. Microbiol.*, 65:67–91.
- 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.*, 73:6912–6922.
- Safdar, A., Armstrong, D. 2003. Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955-1997). *J. Clin. Microbiol.*, 41:483-485.
- Saklani-Jusforgues, H., Fontan, E., Goossens, P.L. 2000. Effect of acid-adaptation on *Listeria monocytogenes* survival and translocation in a murine intragastric infection model. *FEMS Microbiol. Immunol.*, 193:155-159.
- Saladie, M., Cañizares, J., Phillips, M.A., Rodriguez-Concepcion, M., Larrigaudiere, C., Gibon, Y., Stitt, M., Lunn, J.E., Garcia-Mas, J. 2015. Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (*Cucumis melo* L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. *BMC Genom.*, 16:440.
- Sandhya. 2010. Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs. *LWT- Food Sci. Technol.*, 43(3):381-392.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467.
- Sauders, B.D., Wiedmann, M. 2007. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In E.T Ryser and E.H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (3rd edn.). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 21-53.
- Sawyer, S. 1989. Statistical tests for detecting gene conversion. *Mol. Biol. Evol.*, 6(5): 526–538.
- Schlech, W.E., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, W.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nichols, E.S., Broome, C.V. 1983.

- Epidemic listeriosis - Evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.*, 308:203-206.
- 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., Swaminathan, B., Broome C.V. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4:169-183.
- Schuchat, A., Deaver, K., Wenger, J.D., Plikaytis, B.D., Mascola, L., Pinner, R.W., Reingold, A.L., Broome, C.V., Group, T.L.S. 1992. Role of foods in sporadic listeriosis. I: Case-control study of dietary risk factors. *JAMA*, 267:2041–2045.
- Schwab, U., Bowen, B., Nadon, C., Wiedmann, M., Boor, K.J. 2005. The *Listeria monocytogenes* prfA P2 promoter is regulated by s^B in a growth phase dependent manner. *FEMS Microbiol. Lett.*, 245:329-336.
- Schwartz, K.T., Carleton, J.D., Quillin, S.J., Rollins, S.D., Portnoy, D.A., Leber, J.H. 2012. Hyperinduction of host beta interferon by a *Listeria monocytogenes* strain naturally over expressing the multi drug efflux pump MdrT. *Infect. Immun.*, 80:1537–1545.
- Seeliger, H.P.R., Bockemühl, J. 1968. Kritische Untersuchungen zur Frage einer Kapselbildung bei *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakteriol. Parasit. Infekt. Hyg., I. Orig.* 206:216–227.
- Seeliger, H.P.R., Jonesy, D. 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.
- Seeliger, H.P.R., Hohne, K. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species, *Methods Microbiol.*, 13:31.
- Serrano, M., Martinez-Romero, D., Castillo, S., Guillen, F., Valero, D. 2005. The use of the natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 6:115–123.
- Shan, S., Zhang, Y., Zhang, Z., Chen, M., Su, Y., Yuan, Y., Alam, M.J., Yan, H., Shi, L. 2012. Rapid detection of food-borne *Listeria monocytogenes* by real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Food Sci. Biotechnol.*, 21:101-106.
- Sharma, H.L., Mutharasan, R. 2013. *hlyA* gene-based sensitive detection of *Listeria monocytogenes* using a novel cantilever sensor. *Anal. Chem.*, 85:3222–3228.
- Shahamat, M., Seaman A., Woodbine, M. 1980. Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentration. *Zentbl. Bakteriol. Hyg. Abt. 1 Orig. A*, 246:506-511.
- Shampo, M.A., Kyle, R.A. 2002. Kary B. Mullis -Nobel Laureate for procedure to replicate DNA. *Proceedings (Mayo Clinic)* 77 (7): 606. doi:10.4065/77.7.606. PMID 12108595.

- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Msadek, T., Cossart, P. 1995. Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. *J. Bacteriol.*, 177:6469-6476.
- Sheikh-Zeinoddin, M., Pehinec, T.M., Hill, S.E., Rees, C.E.D., 2000. Maillard reaction causes suppression of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 61:41-49.
- Shetron-Rama, L.M., Mueller, K., Bravo, J.M., Bouwer, H.G.A., Way, S.S., Freitag, N.E. 2003. Isolation of *Listeria monocytogenes* mutants with high-level *in vitro* expression of host cytosol-induced gene products. *Mol. Microbiol.*, 48:1537-1551.
- Sheikh-Zeinoddin, M., Pehinec, T.M., Hill, S.E., Rees, C.E.D., 2000. Maillard reaction causes suppression of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 61:41-49.
- Shen, A., Higgins, D.E. 2006. The MogR transcriptional repressor regulates nonhierarchical expression of flagellar motility genes and virulence in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathogens*, 2(4):282-295.
- Shi, H., Trinh, Q., Xu, W., Luo, Y., Tian, W., Huang, K., 2013. The transcriptional response of virulence genes in *Listeria monocytogenes* during inactivation by nisin. *Food Control*, 31:519-524.
- Siddiqi, R., Khan, M.A. 1989. Amino acid requirement of six strains of *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakteriologie*, 271:146–152.
- Siegel, S. 1956. *Non-parametric statistics for the behavioral sciences*. New York, NY: McGraw-Hill.
- 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. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 54 Suppl 5:S396-3404.
- Singh, M., Anderson, B.L. 2002. Toward a perceptual theory of transparency. *Psychol. Rev.*, 109:492–519.
- Sivakumar, D., Bautista-Banos, S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Prot.*, 64:27–37.
- Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. 1995. Antimicrobial activity of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 43:2384–2388.

- Sleator, R.D., Wemekamp-Kamphuis, H.H., Gahan, C.G., Abee, T., Hill, C. 2005. A PrfA-regulated bile exclusion system(BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.*, 55:1183–1195.
- Slutsker, L., Schuchat, A. 1999. Listeriosis in humans. In: E.T. Riser and E.H. Marth (ed.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2nd ed. MarcelDekker, Inc., New York, N.Y., pp.75-95.
- Smith, J.L., Liu, Y., Paoli, G.C. 2013. How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions? *Can. J. Microbiol.*, 59:141–152.
- Soni, D.K., Dubey, S.K. 2014. Phylogenetic analysis of the *Listeria monocytogenes* based on sequencing of 16S rRNA and *hlyA* genes. *Mol. Biol. Rep.*, 41:8219–8229.
- Southwick, F.S., Purich, D.L. 1996. Intracellular pathogenesis of listeriosis. *New Engl. J. Med.* 334:770–776.
- Spiegelhalter, D.J., Thomas, A., Best, N.G., Lunn, D. 2003. WinBUGS version 1.4 user manual. Medical Research Council, Biostatistics Unit, Cambridge.
- Stasiewicz, M.J., Wiedmann, M., Bergholz, T.M. 2011. The transcriptional response of *Listeria monocytogenes* during adaptation to growth on lactate and diacetate includes synergistic changes that increase fermentative acetoin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77:5294-5306.
- Stratagene, 2006. Introduction to Quantitative PCR. Methods and Application Guide. Stratagene Διαθέσιμο online:
http://qcbs.ca/wiki/media/stratagene_introduction_to_quantitative_pcr_methods_and_application_guide.pdf.
- Straka, R.P., Stokes, J.L. 1957. Rapid destruction of bacteria in commonly used diluents and its elimination. *Appl. Microbiol.*, 5:21-25.
- Stessl, B., Luf, N., Wagner, M., Schoder, D. 2009. Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.*, 106:651–659.
- Stevenson, M. 2005. An introduction to veterinary epidemiology. EpiCentre, Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences, Massey University, Palmerston North, New Zealand. Available at: <http://epicentre.massey.ac.nz>. Accessed 29 February 2016.
- Struelens, M.J. 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2(1):2-11.
- Stüken, A., Riobó, P., Franco, J., Jakobsen, K.S., Guillou, L., Figueroa, R.I. 2015. Paralytic shellfish toxin content is related to genomic *sxtA4* copy number in *Alexandrium minutum* strains. *Front. Microbiol.*, Volume 6, Article 404.

- 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.
- Sutherland, P.S. 1989. *Listeria monocytogenes*. Foodborne Microorganisms of Public Health Significance, 4th Edition, AIFST NSW Food Microbiology Group, Sydney.
- Swaminathan, B. 2001. *Listeria monocytogenes*. In: M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville (eds), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd edition. ASM Press, Washington DC, pp. 383–409.
- Swaminathan B, Gerner-Smidt P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.*, 9:1236–1243.
- 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.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28:2731-2739.
- Tang, M.J., Zhou, S., Zhang, X.Y., Pu, J.H., Ge, Q.L., Tang, X.J., Gao, Y.S. 2011. Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by loop-mediated isothermal amplification. *Curr. Microbiol.*, 63:511-516.
- Teissedre, P.L. 2000. Waterhouse, A.L. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 48:3605–3801.
- Temoin, S., Roche, S.M., Grepinet, O., Fardini, Y., Velge, P. 2008. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. *Microbiology*, 154:939-948.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.*, 75:291–295.
- Thermo Fisher Scientific. 2015. RNA quantitation is an important and necessary step prior to most RNA analysis methods. Διαθέσιμο online: <https://www.thermofisher.com/cy/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/quantitating-rna.html>. Τελευταία πρόσβαση: 18.05.2016.

- Thermo Fisher Scientific. 2016. Greater performance with our qPCR master mix formulations. Affymetrix. Διαθέσιμο online: [http://www.affymetrix.com/estore/browse/promotionLandingPage.jsp?promotionId=romo550032&navModeValue=35689&isHtmlStatic=true&aidValue=usbNav](http://www.affymetrix.com/estore/browse/promotionLandingPage.jsp?promotionId=promo550032&navModeValue=35689&isHtmlStatic=true&aidValue=usbNav). Τελευταία πρόσβαση: 16.05.2016.
- Thrusfield, M. 2007. Veterinary epidemiology. Oxford: Blackwell Science.
- Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J.P., Frankena, K. 2001. Win Episcopo 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. Vet. Rec., 148:567–572.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., Pfaffl, M.W. 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. Nucleic Acids Res., 31(20):e122.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A., Ross, T., 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl and lactic acid. Appl. Environ. Microbiol., 66:4979–4987.
- Tilney, L.G., Portnoy, D.A. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. J. Cell Biol., 109:1597–1608.
- Todeschini, G., Friso, S., Lombardi, S., Casaril, M., Fontana, R., Corrocher, R. 1998. A case of *Listeria murrayi/grayi* bacteremia in a patient with advanced Hodgkin's disease. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 17:808-810.
- Toinoven A.M.P, Brummell, A.D. 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. Postharvest Biol. Tech., 48(1):1-14.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., Barthelemy, M., Vergassola, M., Nahori, M.A., Soubigou, G., Régnaul, B., Coppée, J.Y., Lecuit, M., Johansson, J., Cossart, P. 2009. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. Nature, 459:950–956.
- 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.
- Tyagi, A.K., Malik, A. 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. Food Control, 22:1707–1714.

- Tyler, K.D., Wang, G., Tyler, S.D., Johnson, W.M. 1997. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, 35(2):339–346.
- Tzortzakis, G.N., Economakis, D.C. 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 8:253–258.
- Ukuku, D.O., Fett, W. 2002. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated on cantaloupe surfaces and efficacy of washing treatments to reduce transfer from rind to fresh-cut pieces. *J. Food Protect.*, 65:924–930.
- Ukuku, D.O., Sapers, G.M. 2005. Microbiological safety issues of fresh melons. In G.M. Sapers, J.R. Gorney, & A.E. Yousef (Eds.), *Microbiology of fruits and vegetables* (pp. 231–251). Boca Raton, FL: CRC Press.
- U.S. Department of Agriculture (USDA). 2003. Control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products; Final Rule. *Fed. Reg.* 68:34208–34254.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). 1992. Eating defensively: Food safety advice for persons with AIDS. Washington, D.C.: Food and Drug Administration. Report No.: FDA publication 92-2232.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). 2013. Outbreaks associated with Fresh Produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091268.htm>. Τελευταία ενημέρωση: 24.04.2013.
- Valasek, M.A., Repa, J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.*, 29(3):151–159.
- Van der Veen, S., Abee, T., 2010. Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76:7854–7860.
- Vandecasteele, S.J., Peetermans, W.E., Merckx, R., Van Eldere, J. 2001. Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions. *J. Bacteriol.*, 183:7094–7101.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research0034. 1–11.

- Van Netten, P., Perales, I., Curtis, G.D.W., Mossel, D.A.A. 1989. Liquid and solid selective differential media for the enumeration of *L. monocytogenes* Int. J. Food Micro., 8(4):299-316.
- Vázquez-Boland, J.A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J., Cossart, P. 1992. Nucleotide Sequence of the Lecithinase Operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. Infect. Immun., 60:219-230.
- Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev., 14:584-640.
- Velazquez-Nunez, M.J., Avila-Sosa, R., Palou, E., Lopez-Malo, A. 2013. Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. Food Control, 31:1-4.
- Versalovic J, Schneider M, de Brulin FJ, Lupski JR. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods Mol. Cell. Biol., 5:25-40.
- Vicente, M.F., Berenguer, J., de Pedro, M.A., Perez-Diaz, J.C., Baquero. F. 1990. Penicillin binding proteins in *Listeria monocytogenes*. Acta Microbiol. Hung. 37:227–231.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulate* L.), grapefruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food Control 19:1130–1138.
- Vlaemynck, G., Lafarge, V., Scotter, S. 2000. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. J. Appl. Microbiol., 88:430–441.
- Vogel, B.F., Jorgensen, L.V., Ojeniyi, B., Huss, H.H., Gram, L. 2001. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by random amplified polymorphic DNA analyses. Int. J. Food Microbiol., 65:83–92.
- Vose, D. 2000. Risk analysis: A quantitative guide. (2nd edn.). Chichester, England: John Wiley & Sons.
- Vose, D. 2008. Risk analysis: a quantitative guide, 3rd ed. John Wiley & Sons, Oxford.
- Wagner, M., McLauchlin, J. 2008. Biology. Handbook of *Listeria monocytogenes*. Liu Dongyou (ed.) CRC Press. pp.3-25.
- Walsh, K.A., Bennett, S.D., Mahovic, M., Hannah Gould, L. 2014. Outbreaks associated with cantaloupe, watermelon and honeydew in the United States, 1973- 2011. Foodborne Pathog. Dis., 11:945-952.

- Wan, C., Yang, Y., Xu, H., Zoraida, P.A., Liu, C., Lai, W., Xiong, Y., Xu, F., Hua, W. 2012. Development of a propidium monoazide treatment combined with loop-mediated isothermal amplification (PMA-LAMP) assay for rapid detection of viable *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 47:2460-2467.
- Wang, X., Jothikumar, N., Griffiths, M.W. 2004. Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *J. Food Prot.*, 67:189-192.
- Wang, L., Li, Y., Chu, L., Xu, Z., Zhong, Q. 2011. Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* strains. *Mol. Biol. Rep.*, 39:445-449.
- Ward, T.J., Gorski, L., Borucki, M.K., Mandrell, R.E., Hutchins, J., Pupedis, K. 2004. Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, 186:4994-5002.
- Ward, T.J., Ducey, T.F., Usgaard, T., Dunn, K.A., Bielawski, J.P. 2008. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74:7629–7642.
- Watson, G.W., Fuller, T. J., Elms, J., Kluge, R.M. 1978. *Listeria cerebritis*: Relapse of infection in renal transplant patients. *Arch. Intern. Med.*, 138:83–87.
- Weiller, G.F. 1998. Phylogenetic profiles: a graphical method for detecting genetic recombinations in homologous sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 15(3):326–335.
- Welshimer, H.J. 1960. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *J. Bacteriol.*, 80: 316-320.
- Welshimer, H.J. 1963. Vitamin requirements of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 85:1156–1159.
- Wernars K., Boerlin P., Audurier A., Russell, E.G., Curtis, G.D.W., van der Mee-Marquet, N. 1996. The WHO multicenter study on *Listeria monocytogenes* subtyping: random amplification of polymorphic DNA (RAPD) *Int. J. Food Microbiol.*, 32:325-341.
- Wesley, I.V. 2007. Listeriosis in animals. In E.T Ryser και E.H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (3rd edn.). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 55-84.
- Wesley, I.V. 2009. Public health impact of food-borne illness: impetus for the international food safety effort. In N. Heredia, I. Wesley, & S. Garcia (Eds.), *Microbiologically safe foods* (pp. 3-13). United States of America: Wiley, A John Wiley & Sons, Inc.
- Wiedmann, M., Arvik, T.J., Hurley, R.J., Boor, K.J. 1998. General stress transcription factor σ^B and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, 180:3650-3656.

- 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.
- Windholz, M., Budavari, S., Blumetti, R.F., Otterbein, E.S. 1983. The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 10th ed.; Merck and Co. Inc.: Rahway, NJ, USA.
- Wiuf, C., Christensen T., Hein, J. 2001. A simulation study of the reliability of recombination detection methods. *Mol. Biol. Evol.*, 18(10):1929–1939.
- 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., Medrano J.F. 2005. Real Time PCR for m-RNA quantitation. *Biotechniques*. 39(1):75-85.
- Wood, S., Maroushek, N., Czuprynski, C.J. 1993. Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. *Infect. Immun.*, 61:3068.
- Woodward, J.J., Iavarone, A.T., Portnoy, D.A. 2010. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science*, 328:1703–1705.
- Yang, H.T., Hsu, C.P., Hwang, M.J. 2007. An analytical rate expression for the kinetics of gene transcription mediated by dimeric transcription factors. *J. Biochem.* 142:135-144.
- 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, InTech, Διαθέσιμο online: <http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/real-time-pcr-for-geneexpression-analysis>.
- Young, K.M., Foegeding, P.M. 1993. Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH. *J. Appl. Bacteriol.*, 74:515–520.
- Zagory, D., Kader, A.A. 1988. Modified atmosphere packaging of fresh produce. *Food Technol.*, 42(9):70-74, 76-77.
- Zhang, W., Jayarao, B.M., Knabel, S.J. 2004. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:913–920.

Zunabovic, M., Domig, K.J., Pichler, I., Kneifel, W. 2012. Monitoring transmission routes of *Listeria* spp. in smoked salmon production with repetitive element sequence-based PCR techniques. *J. Food Prot.*, 75:504–511.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Cavaiuolo, M., Ferrante, A., Paramithiotis, S., **Hadjilouka, A.**, Tzamalís P., Drosinos E.H. 2014. Validation of ELISA-based detection of *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 in fresh cut vegetables. *Journal of Food, Agriculture & Environment (JFAE)*, Vol 12 (3&4), pp 98-99.

Hadjilouka A., Andritsos N., Paramithiotis S., Mataragas M., Drosinos E.H. 2014. *Listeria monocytogenes* serotype prevalence and biodiversity in diverse food products. *Journal of Food Protection (JFP)*, Vol. 77, No. 12, pp 2115–2120.

Hadjilouka, A., Mantzourani, K.S., Katsarou, A., Cavaiuolo, M., Ferrante, A., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Drosinos, E.H. 2015. Estimation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence and concentration in naturally contaminated rocket and cucumber samples by deterministic and stochastic approaches. *Journal of Food Protection (JFP)*, Vol. 78, No 2, pp 311-322.

Hadjilouka, A., Polychronopoulou, M., Paramithiotis, S., Tzamalís, P., Drosinos, E.H. 2015. Effect of lemongrass essential oil vapors on microbial dynamics and *Listeria monocytogenes* survival on rocket and melon stored under different packaging conditions and temperatures. *Microorganisms*, Vol. 3, pp. 535-550.

Hadjilouka, A., Molfeta, C., Panagiotopoulou, O., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Drosinos, E.H. 2016. Expression of *Listeria monocytogenes* key virulence genes during growth in liquid medium, on rocket and melon at 4, 10 and 30 °C. *Food Microbiology*, Vol. 55, pp. 7-15

Hadjilouka, A., Paramithiotis, S., Drosinos, E.H. 2016. Genetic analysis of the *Listeria* Pathogenicity Island 1 of *L. monocytogenes* 1/2a and 4b isolates. Submitted in *Molecular Biology Reports*.

Άλλες δημοσιευμένες εργασίες

Hadjilouka, A., Nikolidakis, K., Paramithiotis, S., Drosinos, E.H. 2016. Effect of co-culture with enterocinogenic *E. faecium* on *L. monocytogenes* key virulence gene expression. *AIMS Microbiology*, 2(3):359-371.

Hadjilouka, A., Mavrogiannis, G., Mallouchos, A., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Drosinos, E.H. 2017. Effect of lemongrass essential oil on *Listeria monocytogenes* gene expression. *LWT- Food Science and Technology*. 77, 510-516..

Hadjilouka A., Koubou V., Paramithiotis S., Mataragas M., Drosinos E.H. in press. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in strawberries. Microbiology-an international journal.

Russo, P., **Hadjilouka, A.**, Beneduce, L., Capozzi, V., Paramithiotis, S., Drosinos, E.H., Spano, G. 2016. *Listeria monocytogenes* biofilm formation and control: a challenge in the fresh-cut processing industry. Submitted in Journal of Food Safety.

Δημοσιευμένα κεφάλαια σε βιβλία

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: E.C. Hambrick (Ed.) *Listeria monocytogenes: Food Sources, Prevalence and Management Strategies*. Nova Publishers, pp. 283-296.

Paramithiotis S., **Hadjilouka A.**, Drosinos E.H. 2014. *Listeria* pathogenicity island 1. Structure and function. In: E.C. Hambrick (Ed.) *Listeria monocytogenes: Food Sources, Prevalence and Management Strategies*. Nova Publishers, pp. 265-282.

Hadjilouka A., Paramithiotis S., Drosinos E.H. 2015. Prevalence of *Salmonella* spp. and occurrence of salmonellosis from ready to eat fresh fruits and vegetables. In: C.B. Hackett (Ed.) *Salmonella: prevalence, risk factors and treatment options*. Nova Publishers. pp. 79-110.

Paramithiotis S., **Hadjilouka A.**, Drosinos E.H. 2015. Molecular typing schemes of food-associated salmonellae. In: C.B. Hackett (Ed.) *Salmonella: prevalence, risk factors and treatment options*. Nova Publishers. pp. 159-178.

Hadjilouka A., Paramithiotis S., Drosinos E.H. 2015. Prevalence of *Escherichia coli* and outbreaks from ready to eat fresh fruits and vegetables. In: G. McCoy (Ed.) *Coliforms: Occurrence, Detection Methods and Environmental Impact*. Nova Publishers. pp. 77- 106.

Hadjilouka A., Paramithiotis S., Drosinos E.H. 2015. *Listeria monocytogenes* as a Food Contaminant: A Genomic Perspective. In: T. Vicario (Ed.) *Listeria Monocytogenes: Incidence, Growth Behavior and Control*. Nova Publishers. pp. 1-36.

Paramithiotis S., **Hadjilouka A.**, Drosinos E.H. in press. Assessment of the microbial ecology of meat and meat products at the molecular level: current status and future perspectives. In: A.F. El Sheikha, R. Levin, J. Xu (Eds.) *Molecular techniques in food biology*, Wiley.

Hadjilouka A., Paramithiotis S., Drosinos E.H. in press. Molecular Typing of Major Foodborne Pathogens. In: A.M. Grumezescu (Ed.) Handbook of Food Bioengineering, Elsevier.

