



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
& ΠΟΤΩΝ

**ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ  
ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΟΥ *Listeria monocytogenes*  
ΣΕ ΝΩΠΟ ΚΡΕΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΝΙΚΟΛΑΟΥ Δ. ΑΝΔΡΙΤΣΟΥ**

**ΑΘΗΝΑ  
2012**



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
& ΠΟΤΩΝ

**ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ  
ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΟΥ *Listeria monocytogenes*  
ΣΕ ΝΩΠΟ ΚΡΕΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΝΙΚΟΛΑΟΥ Δ. ΑΝΔΡΙΤΣΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ Χ. ΔΡΟΣΙΝΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**2012**

Copyright © 2012 Νικόλαος Δ. Ανδρίτσος

*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

ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ  
ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΟΥ *Listeria monocytogenes*  
ΣΕ ΝΩΠΟ ΚΡΕΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥ

**ΝΙΚΟΛΑΟΣ Δ. ΑΝΔΡΙΤΣΟΣ**

Γεωπόνος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, M.Sc.  
Υπότροφος του Κοινοφελούς Ιδρύματος Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης

## ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

**Ελευθέριος Χ. Δροσινός**, Ph.D., Αναπληρωτής Καθηγητής  
Συστημάτων Διασφάλισης Ποιότητας & Υγιεινής Τροφίμων,  
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ

**Ελευθέριος Χ. Δροσινός**, Ph.D., Αναπληρωτής Καθηγητής  
Συστημάτων Διασφάλισης Ποιότητας & Υγιεινής Τροφίμων,  
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Γεώργιος-Ιωάννης Ε. Νυχάς**, Ph.D., Καθηγητής Μικροβιολογίας Τροφίμων,  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης**, Ph.D., Επίκουρος Καθηγητής  
Υγιεινής Εγκαταστάσεων Βιομηχανιών Τροφίμων,  
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Ελευθέριος Χ. Δροσινός**, Ph.D., Αναπληρωτής Καθηγητής  
Συστημάτων Διασφάλισης Ποιότητας & Υγιεινής Τροφίμων,  
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Μάριος Α. Ματαράγκας**, M.Sc., Ph.D., Λέκτορας Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων,  
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Ιωάννης Σ. Μποζιάρης**, M.Sc., Ph.D., Επίκουρος Καθηγητής  
Υγιεινής & Συντήρησης Ιχθυηρών,  
Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος  
Σχολής Γεωπονικών Επιστημών Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Γεώργιος-Ιωάννης Ε. Νυχάς**, Ph.D., Καθηγητής Μικροβιολογίας Τροφίμων,  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Ευστάθιος Ζ. Πανάγου**, M.Sc., Ph.D., Επίκουρος Καθηγητής  
Μικροβιολογίας Τροφίμων-Ποσοτικής Μικροβιολογίας,  
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης**, Ph.D., Επίκουρος Καθηγητής  
Υγιεινής Εγκαταστάσεων Βιομηχανιών Τροφίμων,  
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Χρυσούλα Χ. Τάσσου**, Ph.D., Ερευνήτρια Α΄,  
Τμήμα Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων  
Ινστιτούτου Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων  
Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού-Δήμητρα

*Στους γονείς μου,  
Στην αδελφή μου,  
Στην Τατιάνα*

*«Το προλαμβάνει καλύτερο του θεραπεύειν»*

*Ιπποκράτης ο Κώος, 460 - 370 π.Χ.*

*«Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* είναι για τον κόσμο των μικροβίων ο  
λύκος μεταμφιεσμένος σε πρόβατο ή ο Δρ. Τζέκυλ και ο κορ Χάϊντ»*

*Dongyou Liu (Κτηνίατρος, Ph.D) στον πρόλογό του ως εκδότης στο  
Handbook of *Listeria monocytogenes* (CRC Press, 2008)*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μετά την ολοκλήρωση ενός τόσο σημαντικού και κοπιαστικού πονήματος, όπως είναι η παρούσα διδακτορική διατριβή, νιώθω την υποχρέωση να αφιερώσω έναν ξεχωριστό χώρο στους ανθρώπους εκείνους που συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Κοινωφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης για την παρεχόμενη υποτροφία και την εν γένει στήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια των διδακτορικών σπουδών μου. Το Ίδρυμα στάθηκε από το 2006 αρωγός της προσπάθειάς μου για επιστημονική εξειδίκευση στο γνωστικό πεδίο της υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων, ενισχύοντας οικονομικά το σύνολο των μεταπτυχιακών σπουδών μου (M.Sc. και Ph.D.). Δίχως αυτή τη στήριξη η ευτυχής κατάληξη της προαναφερόμενης προσπάθειας δεν θα ήταν δεδομένη.

Θερμά ευχαριστώ και τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Αναπληρωτή Καθηγητή κο Δροσινό Ελευθέριο, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση του θέματος της διατριβής, την άψογη συνεργασία, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση και τη συμβουλευτική και διδακτική συμβολή του όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κο Σκανδάμη Παναγιώτη για τους εύστοχους προβληματισμούς και τον γόνιμο διάλογο επί θεμάτων συναφών με το αντικείμενο του διδακτορικού, αλλά και τον Καθηγητή κο Νυχά Γεώργιο-Ιωάννη για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε και τη διεύρυνση του επιστημονικού μου «ορίζοντα».

Επίσης, επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής που συμμετείχαν στην κατά το δυνατό αρτιότερη παρουσίαση του

παρόντος έργου. Ειδικότερα, είμαι ευγνώμων στον Λέκτορα κο Ματαράγκα Μάριο για την ειλικρινή και καταλυτική βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, καθώς και για τις σημαντικές παρατηρήσεις και καθοριστικές συμβουλές του που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Ιδιαίτερη μνεία αξίζει στο προσωπικό του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών και σε όλους όσους άμεσα ή έμμεσα συνετέλεσαν στην εκπόνηση αυτής της εργασίας. Μέσα σε αυτούς ξεχωριστή θέση κατέχει ο Δρ. Παραμυθιώτης Σπυρίδων, η ουσιαστική βοήθεια του οποίου κατά τη διεξαγωγή των μοριακών τεχνικών ταυτοποίησης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* υπήρξε αποφασιστικής σημασίας. Πολλές ευχαριστίες για την άψογη και εποικοδομητική συνεργασία μας όλο το διάστημα διεξαγωγής των διδακτορικών μου σπουδών οφείλω στους υποψήφιους διδάκτορες Μανιό Σταύρο, Καπετανάκου Νατάσα και Μπέλεση Χαραλαμπία-Ειρήνη, στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Καραμπέρη Βασιλική, αλλά και στους προπτυχιακούς φοιτητές Μαύρου Ελπίδα και Καμπόλη Δημήτριο του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, στην υποψήφια και νυν διδάκτορα Χατζηφράγκου Αφροδίτη και στην υποψήφια διδάκτορα Μετσοβίτη Μαρία του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, στον υποψήφιο διδάκτορα Δήμου Ανδρέα του εργαστηρίου Μηχανικής Τροφίμων, Συντήρησης και Επεξεργασίας Γεωργικών Προϊόντων και τέλος στον υποψήφιο και νυν διδάκτορα Κουτελιδάκη Αντώνιο του εργαστηρίου Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων.

Τέλος, η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί χωρίς τη συμπαράσταση και παντός είδους συμβολή των γονιών μου, Δημητρίου και Ιουλιέττας, αλλά και την υποστήριξη της αδελφής μου Ηλιάνας. Ευχαριστώ ολόψυχα



και την Τατιάνα για την κατανόηση και πνευματική ενθάρρυνση όλα αυτά τα χρόνια.

Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται στα αγαπημένα μου αυτά πρόσωπα.

Νικόλαος Δ. Ανδρίτσος

Απρίλιος 2012

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	4
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	7
<b>1. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	12
<b>1.1. <i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	12
1.1.1. Εισαγωγικές πληροφορίες.....	12
1.1.2. Φυλογενετική ταξινόμηση του γένους <i>Listeria</i> .....	15
1.1.3. Χαρακτηριστικά μικροοργανισμού.....	19
1.1.3.1. Μορφολογία.....	19
1.1.3.2. Καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα.....	19
1.1.3.3. Απαιτήσεις μικροβιακής αύξησης.....	20
1.1.3.3.1. Οξυγόνο.....	20
1.1.3.3.2. Θερμοκρασία.....	20
1.1.3.3.3. pH.....	21
1.1.3.3.4. Ενεργότητα νερού.....	21
1.1.3.3.5. Θρεπτικά συστατικά.....	22
1.1.3.4. Μεταβολισμός και βιοχημικά χαρακτηριστικά.....	22
1.1.4. Ορολογική τυποποίηση.....	23
<b>1.2. Λιστερίωση</b> .....	24
1.2.1. Επιδημιολογικά στοιχεία.....	24

1.2.2. Παθογένεια.....	30
1.2.3. Νοσολογία του ανθρώπου.....	32
1.2.4. Θεραπεία.....	33
1.2.5. Προληπτικά μέτρα.....	35
<b>2. ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ</b>	
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b>38</b>
<b>2.1. Απαρίθμηση μικροοργανισμών.....</b>	<b>38</b>
2.1.1. Θρεπτικά υποστρώματα αύξησης μικροοργανισμών.....	38
2.1.2. Έλεγχος επιλεκτικότητας στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων.....	39
2.1.3. Υπολογισμός μικροβιακών πληθυσμών.....	39
<b>2.2. Ταυτοποίηση του <i>Listeria monocytogenes</i>.....</b>	<b>40</b>
2.2.1. Απομόνωση χαρακτηριστικών αποικιών του μικροοργανισμού.....	40
2.2.2. Προκαταρκτική διαδικασία.....	43
2.2.3. Βιοχημικές δοκιμές.....	44
2.2.3.1. Χρώση κατά Gram.....	44
2.2.3.2. Δοκιμή κινητικότητας.....	45
2.2.3.3. Δοκιμή καταλάσης.....	46
2.2.3.4. Δοκιμή οξειδάσης.....	47
2.2.3.5. Αιμόλυση.....	47
2.2.3.6. Ζύμωση σακχάρων.....	49
2.2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	51
2.2.4.1. Είδη PCR.....	55

2.2.4.1.1. Πολλαπλή PCR (multiplex PCR).....	55
2.2.4.1.2. PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).....	55
2.2.4.1.3. PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR).....	56
2.2.4.1.4. Φωλιασμένη PCR (nested PCR).....	57
2.2.4.1.5. PCR επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR).....	57
2.2.4.1.6. Τυχαία ενίσχυση του πολυμορφικού DNA (RAPD).....	58
2.2.4.1.7. Πολυμορφισμός ενισχυμένου μήκους θραύσματος (AFLP).....	58
2.2.4.1.8. Ανάλυση μεταβλητού αριθμού δίδυμων επαναλήψεων πολλαπλών περιοχών (MLVA).....	59
2.2.4.1.9. PCR και ηλεκτροφόρηση πηκτής με βαθμίδωση αποδιατακτικού παράγοντα (PCR-DGGE).....	59
<b>3. ΕΡΕΥΝΑ ΠΕΔΙΟΥ ΣΕ ΝΩΠΟ ΧΟΙΡΕΙΟ ΚΙΜΑ</b>	62
<b>3.1. Εισαγωγή</b> .....	62
<b>3.2. Στόχος</b> .....	66
<b>3.3. Πειραματικός σχεδιασμός</b> .....	66
3.3.1. Παρασκευή κιμά - προετοιμασία δειγμάτων.....	67
3.3.2. Δείγματα κιμά.....	67
3.3.3. Μικροβιολογική ανάλυση.....	68
3.3.4. Μέτρηση του pH.....	70
3.3.5. Στατιστική επεξεργασία δεδομένων.....	70
<b>3.4. Αποτελέσματα</b> .....	71

3.4.1. Μικροβιακοί πληθυσμοί.....	71
3.4.2. Πολυμεταβλητή ανάλυση.....	72
<b>3.5. Συζήτηση.....</b>	<b>73</b>
<b>4. ΕΠΙΔΟΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ <i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b>82</b>
<b>4.1. Εισαγωγή.....</b>	<b>82</b>
<b>4.2. Στόχος.....</b>	<b>85</b>
<b>4.3. Πειραματικός σχεδιασμός.....</b>	<b>85</b>
4.3.1. Μικροβιολογική, βιοχημική και μοριακή ανάλυση.....	86
4.3.2. Υπολογισμός χαρακτηριστικών επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων.....	87
4.3.3. Φαινομενική και πραγματική τιμή επιπολασμού.....	89
4.3.4. Στατιστική ανάλυση.....	90
4.3.5. Έλεγχος πολλαπλών δοκιμών και παράλληλη χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L.mono.....	90
4.3.6. Καθορισμός ορίου ανίχνευσης.....	92
<b>4.4. Αποτελέσματα.....</b>	<b>93</b>
4.4.1. Επιπολασμός παθογόνου και χαρακτηριστικά επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων.....	93
4.4.2. Παράλληλος έλεγχος με χρήση των θρεπτικών υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L.mono.....	97
4.4.3. Όριο ανίχνευσης.....	98

4.5. Συζήτηση.....	100
<b>5. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ <i>Listeria monocytogenes</i></b>	106
5.1. Εισαγωγή.....	106
5.2. Στόχος.....	109
5.3. Πειραματικός σχεδιασμός.....	110
5.3.1. Μικροβιολογικά δεδομένα.....	110
5.3.2. Μπαγεσιανή ανάλυση.....	111
5.3.3. Μέτρα διαγνωστικής ακρίβειας.....	113
5.4. Αποτελέσματα.....	115
5.5. Συζήτηση.....	119
<b>6. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ <i>Listeria monocytogenes</i> ΣΕ ΝΩΠΟ ΧΟΙΡΕΙΟ ΚΙΜΑ ΜΕΣΩ ΜΠΑΓΕΣΙΑΝΗΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗΣ</b>	125
6.1. Εισαγωγή.....	125
6.2. Στόχος.....	127
6.3. Πειραματικός σχεδιασμός.....	127
6.3.1. Συλλογή δειγμάτων νωπού χοίρειου κιμά.....	128
6.3.2. Ανίχνευση και απαρίθμηση του <i>L. monocytogenes</i> σε κιμά.....	128
6.3.3. Επιβεβαίωση παρουσίας του <i>L. monocytogenes</i> σε κιμά.....	129

6.3.4. Μπαγεσιανή μοντελοποίηση.....	129
6.3.4.1. Επιπολασμός και χαρακτηριστικά μεθόδων ανίχνευσης του <i>L. monocytogenes</i> σε κιμά.....	130
6.3.4.2. Συγκέντρωση του <i>L. monocytogenes</i> σε κιμά.....	132
6.3.5. Επικύρωση μπαγεσιανού μοντέλου.....	134
<b>6.4. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....</b>	<b>135</b>
<b>7. ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΤΟΥ <i>Listeria monocytogenes</i> ΣΕ ΝΩΠΟ ΧΟΙΡΕΙΟ ΚΙΜΑ</b>	<b>145</b>
<b>7.1. Εισαγωγή.....</b>	<b>145</b>
<b>7.2. Στόχος.....</b>	<b>148</b>
<b>7.3. Πειραματικός σχεδιασμός.....</b>	<b>148</b>
7.3.1. Στελέχη του <i>L. monocytogenes</i> .....	148
7.3.2. Απομόνωση DNA του μικροοργανισμού.....	149
7.3.3. Εκκνητές DNA.....	153
7.3.4. Ορολογική τυποποίηση.....	153
7.3.5. Ανάλυση RAPD.....	155
7.3.6. Ανάλυση rep-PCR.....	156
7.3.7. Δείκτης διάκρισης.....	157
<b>7.4. Αποτελέσματα.....</b>	<b>157</b>
7.4.1. Ορότυποι στελεχών του <i>L. monocytogenes</i> .....	157
7.4.2. Αποτύπωση DNA στελεχών του <i>L. monocytogenes</i> .....	158
7.4.3. Διακριτική ικανότητα τεχνικών PCR.....	164

7.5. Συζήτηση.....	165
<b>8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>171</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι</b>	<b>174</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ</b>	<b>179</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ</b>	<b>182</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>189</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ</b>	<b>229</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ-ΣΧΗΜΑΤΩΝ-ΕΙΚΟΝΩΝ</b>	<b>233</b>
<b>ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ</b>	<b>240</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</b>	<b>244</b>



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* είναι το παθογόνο αίτιο της λιστερίωσης. Μολονότι η συχνότητα εμφάνισης της νόσου στον άνθρωπο είναι σχετικά μικρή, τα κρούσματα λιστεριώσεων χαρακτηρίζονται από υψηλή θνητότητα (20-30%), ιδιαιτέρως μεταξύ ατόμων που ανήκουν σε ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού, όπως τα νεογνά, οι ηλικιωμένοι, οι έγκυες και οι ανοσοκατεσταλμένοι. Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες τα καταγεγραμμένα κρούσματα λιστεριώσεων έχουν αυξηθεί σημαντικά, εξαιτίας ομαδικών προσβολών από *L. monocytogenes* τροφιμογενούς προέλευσης. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ποσοτικοποίηση της παρουσίας και η μελέτη της βιοποικιλότητας του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε νωπό κρέας και προϊόντα του. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού τέθηκαν ως κύριοι στόχοι μελέτης οι εξής:

- Η διεξαγωγή έρευνας πεδίου για τη μελέτη της μικροχλωρίδας και για την εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας και υγιεινής νωπού χοίρειου κιμά.
- Ο υπολογισμός του επιπολασμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε νωπό χοίρειο κιμά, καθώς και ο προσδιορισμός των παραμέτρων-χαρακτηριστικών επίδοσης τριών μικροβιολογικών θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του παθογόνου στον κιμά.
- Ο προσδιορισμός του διαστήματος εμπιστοσύνης και της αβεβαιότητας καθεμίας των παραμέτρων επίδοσης των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων, με εφαρμογή της μπαγεσιανής προσεγγιστικής μεθόδου.
- Η πρόβλεψη του επιπολασμού και της συγκέντρωσης του βακτηρίου *L. monocytogenes* σε νωπό χοίρειο κιμά, με χρήση της μπαγεσιανής προσεγγιστικής μεθόδου.

- Η μελέτη της βιοποικιλότητας του *L. monocytogenes* σε νωπό χοίρειο κιμά με τη βοήθεια μοριακών μεθόδων αποτύπωσης του γονιδιώματος του μικροοργανισμού, όπως είναι η πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (mPCR), η τυχαία ενίσχυση του πολυμορφικού DNA (RAPD) και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR).

Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών, πλην του *L. monocytogenes*, οι οποίοι προσδιορίστηκαν κατά τη διεξαγωγή της προαναφερόμενης έρευνας πεδίου, επεξεργάστηκαν μέσω της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης. Από τις κατανομές των μικροβιακών πληθυσμών στα δείγματα του νωπού χοίρειου κιμά που αναλύθηκαν, διαπιστώθηκε η επικράτηση των ψευδομονάδων έναντι όλων των υπολοίπων ομάδων μικροοργανισμών. Με τη βοήθεια εργαλείων της πολυμεταβλητής ανάλυσης οι μικροβιακοί πληθυσμοί αναδιατάχθηκαν σε κύριες συνιστώσες σχετιζόμενες με τη μικροβιολογική ποιότητα και υγιεινή του κρέατος.

Όσον αφορά στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, για τον ακριβή υπολογισμό του επιπολασμού του στο νωπό χοίρειο κιμά έγινε παράλληλη χρήση των μικροβιολογικών υποστρώματων PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono. Κατόπιν αυτού, ο επιπολασμός του παθογόνου στον κιμά υπολογίστηκε στο 22%. Εξάλλου, η παράλληλη χρήση δύο τουλάχιστον χρωμογόνων θρεπτικών υποστρωμάτων, όπως είναι τα ALOA και RAPID'L.mono, σε συνδυασμό με την εφαρμογή της μπαγεσιανής προσεγγιστικής μεθόδου κατέστησε δυνατή την πρόβλεψη του επιπολασμού του *L. monocytogenes* στο νωπό χοίρειο κιμά. Μέσω της μπαγεσιανής ανάλυσης είναι δυνατός ο καλύτερος χειρισμός της αβεβαιότητας και για άλλες παραμέτρους, εκτός του επιπολασμού του μικροοργανισμού, όπως είναι η ευαισθησία και η ικανότητα εξειδίκευσης των χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υποστρωμάτων. Ταυτόχρονα, με χρήση των αποτελεσμάτων παρουσίας και απουσίας του

μικροοργανισμού εκτιμήθηκε η συγκέντρωση του *L. monocytogenes* στον κιμά σε 14 και 17 cfu/kg προϊόντος με βάση τα υποστρώματα ALOA και RAPID'L.mono αντίστοιχα.

Η μελέτη της βιοποικιλότητας του *L. monocytogenes* σε νωπό χοίρειο κιμά με τη βοήθεια της mPCR αποκάλυψε την παρουσία των ορότυπων 1/2a (77%), 1/2b (5%), 1/2c (1%), 4b (5%) και 4ab (10%), ενώ η ορολογική τυποποίηση ορισμένων στελεχών (2%) δεν ήταν δυνατή. Οι RAPD και rep-PCR διαχώρισαν και ομαδοποίησαν ικανοποιητικά το σύνολο των στελεχών του μικροοργανισμού που απομονώθηκαν από τον κιμά, συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στη διερεύνηση της γενετικής παραλλακτικότητας του *L. monocytogenes*. Σε ορισμένες περιπτώσεις ωστόσο, η γενετική ομοιότητα των στελεχών δεν σχετιζόταν με την προέλευσή τους.

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is the causative agent of listeriosis. Despite the low incidence of the disease in humans, listeriosis is characterized by high hospitalization and case fatality rates (i.e. 20-30%), especially among individuals belonging in the YOPI segment, i.e. young, old, pregnant, and immune-compromised people. During the past three decades, the recorded cases of *L. monocytogenes* infections have been grown significantly due to several outbreaks of foodborne-related listeriosis. The aim of this thesis was to quantify *L. monocytogenes* presence and study pathogen's biodiversity in fresh meat and products thereof. The following main objectives were set:

- Screening for microbial populations in naturally contaminated fresh minced pork meat and thus evaluating its microbiological quality and hygiene by conducting a field survey.
- Estimation of prevalence for *L. monocytogenes* in fresh minced pork meat and determination of the performance attributes (e.g. sensitivity, specificity) of three culture media used for the detection of pathogen in mince.
- Estimating the confidence intervals and uncertainties (i.e. diagnostic accuracy) for the performance attributes of each medium used for the *L. monocytogenes* detection, from a Bayesian perspective.
- Quantifying *L. monocytogenes* prevalence and concentration in fresh minced pork meat from presence/absence microbiological testing, through Bayesian inference.

- Studying the biodiversity of *L. monocytogenes* in naturally contaminated fresh minced pork meat by applying molecular DNA-based typing methods (i.e. multiplex PCR, RAPD, rep-PCR).

The microbial association of naturally contaminated fresh minced pork meat and its hygienic condition were established, while data for the populations of microorganisms detected were subjected to multivariate statistical analysis. All the microbiological parameters examined during the field survey, except *L. monocytogenes*, were reconstructed to principal components related to shelf life and meat hygiene using tools provided by multivariate analysis. The distribution of populations in mince demonstrates a classic synthesis of a microbial association, with dominance of pseudomonads.

As far as *L. monocytogenes* is concerned, prevalence of the pathogen in minced pork meat was calculated at 22% by simultaneous (i.e. parallel) use of the PALCAM, ALOA and RAPID'L.mono selective media. None of the aforementioned media was efficient in detecting the true prevalence of *L. monocytogenes* in mince alone. However, the parallel use of at least two chromogenic media, such as ALOA and RAPID'L.mono, together with the application of a Bayesian modeling approach enabled the prediction of pathogen's prevalence in fresh minced pork meat with high accuracy, without the need for further confirmation of typical *L. monocytogenes* colonies isolated from Petri dishes. Better handling of the uncertainty associated with other attributes of interest apart from prevalence, such as sensitivity and specificity of culture media, could be achieved through the Bayesian analysis, as well as an estimation of *L. monocytogenes* concentration in mince could be obtained from microbiological presence/absence testing. As a result, *L. monocytogenes*

concentration in minced pork meat was estimated at 14 and 17 cfu/kg of mince based on ALOA and RAPID'L.mono agars, respectively.

Finally, studying biodiversity of *L. monocytogenes* in fresh minced pork meat through serotyping of identified isolates of the pathogen by multiplex PCR revealed the presence of serovars 1/2a (77%), 1/2b (5%), 1/2c (1%), 4b (5%) and 4ab (10%), whereas serotyping of some isolates (2%) was not feasible. RAPD and rep-PCR resulted in reproducible distinct electrophoretic DNA patterns, managing in that way to differentiate and group *L. monocytogenes* mince isolates into clusters with possible references to strain variability. Nevertheless, the recovery of strains sharing identical typing results indicated that similar strains were not associated with the same minced meat samples and isolation media.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν αύξηση του αριθμού των τροφιμογενών νοσημάτων, δηλαδή των ασθενειών εκείνων που σχετίζονται με λοιμογόνους ή τοξικούς παράγοντες, κυρίως μικροβιολογικής αιτιολογίας, οι οποίοι εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό διαμέσου της τροφής. Ειδικότερα, ποσοστό 10-15% του πληθυσμού των ανεπτυγμένων χωρών αντιμετωπίζει τουλάχιστον μια φορά το χρόνο κάποια διαταραχή στην υγεία του που αποδίδεται σε κατανάλωση τροφίμου μη ικανοποιητικής μικροβιολογικής ασφάλειας (Käferstein, 2003). Για παράδειγμα στις Η.Π.Α., εξαιτίας αυτού του γεγονότος νοσούν κατά προσέγγιση 48 εκατομμύρια άνθρωποι κάθε χρόνο, με συνέπεια να παρατηρούνται περί τις 128.000 περιπτώσεις νοσηλείας για παροχή ιατρικής βοήθειας και 3.000 θάνατοι (Scallan, Griffin, Angulo, Tauxe, & Hoekstra, 2011α· Scallan και συν., 2011β). Το πρόβλημα οξύνεται στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου τα τροφιμογενή νοσήματα και οι λοιμώξεις που οφείλονται σε νερό που δεν έχει υποστεί εξυγίανση αποτελούν το κύριο αίτιο πρόκλησης ασθενειών και θανάτων, με τα θύματα να ανέρχονται περίπου στα 2 εκατομμύρια άτομα ετησίως, τα περισσότερα εκ των οποίων είναι παιδιά (Schlundt, 2002). Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) του Ο.Η.Ε., μόνον για το έτος 2005, 1,8 εκατομμύρια άνθρωποι κατέληξαν εξαιτίας διαρροϊκών συνδρόμων προκαλούμενων από μiasμένα τρόφιμα ή από κατανάλωση νερού ακατάλληλου προς πόση (WHO, 2005).

Η πραγματική έκταση του προβλήματος όμως είναι ακόμα μεγαλύτερη αν αναλογιστούμε πως μόνον ένα πολύ μικρό ποσοστό (5-10%) των συνολικών τροφιμογενών νοσημάτων μικροβιολογικής αιτιολογίας γίνεται γνωστό και

καταχωρείται στις επίσημες στατιστικές εκθέσεις των χωρών (Γενηγιώργης, 2004· Mead και συν. 1999). Η ελλιπής καταγραφή (underreporting) των κρουσμάτων σχετίζεται με την πολυπλοκότητα της διαδικασίας καταγραφής τους, αλλά και την έλλειψη οργανωμένης επιδημιολογικής παρατήρησης. Έτσι, θα πρέπει το άτομο που κατανάλωσε το τρόφιμο και μολύνθηκε από τον μικροοργανισμό, εφ' όσον νοσήσει να καταφύγει σε θεράποντα ιατρό και ο τελευταίος να ζητήσει εργαστηριακές εξετάσεις, ώστε να απομονωθεί και να ταυτοποιηθεί ο υπεύθυνος για τη νόσο μικροοργανισμός. Ακολουθεί η δήλωση του κρούσματος στις αρμόδιες υγειονομικές υπηρεσίες και τελικά η δημοσίευση των στατιστικών στοιχείων (Βάσσος, 2004· Rocourt, Moy, Vierk, & Schlundt, 2003). Εξάλλου, συχνά η ήπια μορφή των συμπτωμάτων από τη μόλυνση με τον υπεύθυνο μικροοργανισμό έχει ως αποτέλεσμα οι ασθενείς να μην αναζητούν ιατρική βοήθεια, γεγονός το οποίο συντελεί στην περαιτέρω μείωση του ποσοστού των καταγεγραμμένων τροφιμογενών νοσημάτων (Γενηγιώργης, 2004· Mossel, Corry, Struijk, & Baird, 1995).

Το κόστος των συνεπειών των τροφιμογενών ασθενειών είναι σημαντικό και αφορά τόσο τον άνθρωπο σε ατομικό επίπεδο όσο και την κοινωνία γενικότερα (ιατρικές δαπάνες, απώλεια παραγωγικότητας, θάνατοι κ.λπ.), αλλά και τη βιομηχανία τροφίμων (ανακλήσεις προϊόντων, επιπλέον εργαστηριακοί έλεγχοι, απώλεια της αγοράς, νομικές δαπάνες για διοικητικές κυρώσεις-πρόστιμα, αμοιβές δικηγόρων, αποζημιώσεις καταναλωτών κ.λπ.) (Buzby & Roberts, 2009). Στις Η.Π.Α. το ιατρικό κόστος και η απώλεια παραγωγικότητας από όλα τα βακτηριακά τροφιμογενή νοσήματα εκτιμήθηκε από τον Roberts (1989) στα 4,8 δισεκατομμύρια δολάρια ανά έτος, ενώ το αντίστοιχο ετήσιο συνολικό κόστος για έξι κύρια βακτηριακά παθογόνα τροφιμογενούς προέλευσης (*Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* και



*Clostridium perfringens*) κυμάνθηκε μεταξύ 2,9 και 6,7 δισεκατομμυρίων δολαρίων (Buzby, Roberts, & Lin, 1996). Νεότερα επιδημιολογικά δεδομένα και ακριβέστερη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, υπολογίζουν το συνολικό κόστος των τροφιμογενών ασθενειών στις Η.Π.Α. στα 77,7 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως (Scharff, 2012). Στην Ε.Ε. των 15 χωρών-μελών, το κόστος των διαταραχών που οφείλονταν σε βιολογικούς παράγοντες υπολογίστηκε στα 8,3 δισεκατομμύρια ευρώ ετησίως (Βάσσος, 2004).

Τα παραδοσιακά παθογόνα μικρόβια *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *St. aureus*, *Cl. perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella* spp., *E. coli* και *Cl. botulinum* αποτελούν τα κύρια αίτια τροφιμογενών νοσημάτων, η σημασία των οποίων διαφέρει μεταξύ των χωρών. Εντούτοις, νέοι, αναδυόμενοι (emerging) παθογόνοι παράγοντες, οι οποίοι έχουν εμφανιστεί τα τελευταία τριάντα χρόνια, όπως ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχουν παγκοσμίως θέσει σε συναγερμό τη βιομηχανία τροφίμων.

Περίπου 30-35% όλων των θανάτων που προκαλούνται κατά έτος στις Η.Π.Α. από βακτηριακά τροφιμογενή παθογόνα, αποδίδονται στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* (Mead και συν., 1999· Scallan και συν., 2011β). Η προκαλούμενη από το παθογόνο ασθένεια (λιστερίωση) χαρακτηρίζεται από υψηλή θνητότητα που κυμαίνεται σε ποσοστό 20-30% των προσβεβλημένων ατόμων (Mead και συν., 1999), ιδιαίτερος μεταξύ εκείνων που ανήκουν σε ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού, όπως τα νεογνά, οι ηλικιωμένοι, οι έγκυες και οι ανοσοκατεσταλμένοι (young, old, pregnant and immune-compromised, YOPI). Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) και του Ευρωπαϊκού Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC), η συχνότητα

εμφάνισης της νόσου (incidence) για το έτος 2010 ήταν 0,35 κρούσματα ανά πληθυσμό 100.000 κατοίκων στην Ε.Ε. των 27 χωρών (EFSA & ECDC, 2012). Μολονότι η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι σχετικά μικρή, δεδομένου της σοβαρότητας των συμπτωμάτων και του ποσοστού θνητότητας της λιστερίωσης, η ανάγκη μελέτης του παθογόνου παράγοντα *L. monocytogenes* για την αποτροπή ή τον περιορισμό της πιθανότητας εμφάνισης της προκύπτουσας ασθένειας στον άνθρωπο καθίσταται επιτακτική.



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

# 1

## ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. *Listeria monocytogenes*

#### 1.1.1. Εισαγωγικές πληροφορίες

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* (Λιστέρια μονοκυτταρογόνος) είναι το παθογόνο αίτιο της λιστερίωσης (listeriosis). Το βακτήριο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1926 στο Κέιμπριτζ του Ηνωμένου Βασιλείου, ως ο αιτιολογικός παράγοντας μιας σηψαιμικής ασθένειας που παρατηρήθηκε σε κόνικλους και ινδικά χοιρίδια (Murray, Webb, & Swann, 1926). Χαρακτηριστικό της μόλυνσης από το βακτήριο ήταν ο σχηματισμός μεγάλου αριθμού μονοπύρηνων λευκοκυττάρων στο αίμα των ζώων. Για το λόγο αυτό ονομάστηκε αρχικά *Bacterium monocytogenes*. Την ίδια περίοδο διαπιστώθηκε ότι ο μικροοργανισμός ήταν παθογόνος και για τον άνθρωπο.

Το 1924 στις εγκαταστάσεις εκτροφής ζώων του Τμήματος Παθολογίας του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, ο Murray και οι συνεργάτες του κατέγραψαν έξι κρούσματα αιφνίδιου θανάτου νεαρών κόνικλων και ακόμα περισσότερα τους αμέσως επόμενους 15 μήνες που ακολούθησαν. Τα χαρακτηριστικά της ασθένειας από την οποία έπασχαν οι κόνικλοι παρουσίαζαν έντονο ενδιαφέρον, τα οποία σε συνδυασμό και με την αυξημένη θνητότητα της νόσου ήταν στοιχεία που έχριζαν περαιτέρω έρευνας. Οι ερευνητές συγκεκριμένα έγραφαν (Murray και συν., 1926):

«Τόσο η φυσικώς όσο και η πειραματικώς προκύπτουσα νόσος διακρίνονται από ενδιαφέροντα και χαρακτηριστικά γνωρίσματα των οποίων η μελέτη μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο αιτιολογικός οργανισμός είτε δεν έχει περιγραφεί προηγούμενα, είτε δεν έχει περιγραφεί επαρκώς και κατά συνέπεια δεν μπορεί να ευρεθεί στη βιβλιογραφία. Σε κάθε περίπτωση, αισθανόμαστε τη δικαιολογημένη ανάγκη ονομασίας του. Το προεξέχον γνώρισμά του είναι η παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού μονοπύρηνων λευκοκυττάρων. Αυτό είναι μακράν το σημαντικότερο και χαρακτηριστικότερο γνώρισμα που έχουμε ανακαλύψει και για το λόγο αυτό ονομάζουμε τον μικροοργανισμό “*Bacterium monocytogenes*”, τον οποίο και ακολούθως θα περιγράψουμε. Το ερώτημα του ονόματος του γένους είναι δυσκολότερο να απαντηθεί καθώς δεν έχουμε πετύχει να συσχετίσουμε τον οργανισμό μας με πολλά άλλα γένη που έχουν προταθεί στην κλείδα *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology* (1925). Προς το παρόν λοιπόν προτείνουμε ως γένος τον ακαθόριστο όρο *Bacterium* [...]»

Την αμέσως επόμενη χρονιά από την περιγραφή του μικροοργανισμού, κατά τη διάρκεια ερευνών για τη διαπίστωση των αιτιών αιφνίδιων θανάτων άγριων τρωκτικών που παρατηρήθηκαν κοντά στο Γιοχάνεσμπουργκ της Νοτίου Αφρικής, ο Pirie ανακάλυψε έναν νέο μικροοργανισμό (Pirie, 1927), παράγοντα αυτού που ο ίδιος αποκάλεσε «νόσος του ποταμού Τίγρη» (“the Tiger river disease”) και τον ονόμασε *Listerella hepatolytica*. Η πρόταση του ονόματος *Listerella* για το γένος έγινε προς τιμήν του Άγγλου χειρουργού λόρδου Joseph Lister (1827-1912). Ο Pirie έγραφε χαρακτηριστικά (Pirie, 1927):

«Ο αιτιολογικός οργανισμός είναι ένας θετικός κατά Gram βάκιλος για τον οποίο, λόγω του χαρακτηριστικότερου γνωρίσματος παθογένειας, προτείνω το εξειδικευμένο όνομα *hepatolytica* και για το γένος το όνομα *Listerella*, προς τιμήν του λόρδου Lister, ενός εκ

των περισσότερο διακεκριμένων ατόμων που σχετίζονται με τη βακτηριολογία και του οποίου το όνομα δεν έχει μνημονευτεί στη βακτηριολογική ονοματολογία [...]»

Οι ερευνητές Murray και Pirie έστειλαν τα στελέχη που απομόνωσαν στην Εθνική Συλλογή Καλλιεργείων (National Collection of Type Cultures, NCTC) του Ινστιτούτου Lister στο Λονδίνο, όπου ο διευθυντής Δρ. Leningham εξεπλάγη από την ομοιότητα των δύο μικροοργανισμών και έφερε τους δύο ερευνητές σε επαφή. Αμέσως έγινε σαφές και στους δύο ότι αναφέρονταν στις εργασίες τους στο ίδιο είδος βακτηρίου και αποφάσισαν να συνδυάσουν τα δύο προτεινόμενα ονόματα, ονομάζοντας το βακτήριο *Listerella monocytogenes*. Τελικά, η ονομασία του γένους *Listerella* αργότερα άλλαξε για λόγους συστηματικής ταξινόμησης και έτσι ο μικροοργανισμός έλαβε το όνομα *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940).

Σε αντίθεση με άλλους παθογόνους παράγοντες υπεύθυνους για μεγάλο αριθμό κρουσμάτων που σημάδεψαν την ιστορία του ανθρώπου στο πέρασμα των αιώνων, η ιστορία του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* και της προκύπτουσας λιστερίωσης είναι πρόσφατη, δεδομένου ότι επίσημα ξεκινά το έτος 1924. Η πρώτη επιβεβαιωμένη διάγνωση ανθρώπινης λιστερίωσης αφορά έναν στρατιώτη στα τέλη του Α΄ Παγκοσμίου Πολέμου, ο οποίος έπασχε από μηνιγγίτιδα. Πράγματι, το 1919 στο Παρίσι αναφέρθηκε η απομόνωση ενός βακτηρίου από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ενός στρατιώτη που έμοιαζε στο βακτήριο της διφθερίτιδας και το οποίο αργότερα ταυτοποιήθηκε ως *L. monocytogenes* (Cotoni, 1942). Νωρίτερα υπήρχαν αναφορές για απομόνωση *Listeria* spp., με πιο πειστική αυτή του Hülphers (1911). Στη Δανία ο Nyfeldt (1929) προχώρησε στην απομόνωση *L. monocytogenes* από τις καλλιέργειες αίματος ασθενών που παρουσίαζαν συμπτώματα παρόμοια με αυτά της λοιμώδους μονοπυρήνωσης-μια σπάνια εκδήλωση της ασθένειας-, ενώ το 1936 στις Η.Π.Α., ο Burn κατέστησε τη λιστερίωση ως την αιτία τόσο για την εμφάνιση σηπτικών

καταστάσεων μεταξύ νεογέννητων βρεφών όσο και μηνιγγίτιδων στους ενήλικες (Gray & Killinger, 1966). Μολαταύτα, οι προσβολές του ανθρώπου από το παθογόνο ήταν ασυνήθεις και μέχρι το 1955 ο συνολικός αριθμός ανθρώπινων λιστεριώσεων για τις Η.Π.Α. έφθανε στις 20 (Μπαλατσούρας, 2006). Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1980, το τοπίο γύρω από την ανθρώπινη λιστερίωση παρέμενε σχετικά νεφελώδες ενώ και η ίδια η ασθένεια βρισκόταν μακριά από το επίκεντρο της προσοχής. Πριν το 1982 ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* ενοχοποιούνταν για αποβολές και εγκεφαλίτιδες σε πολλά ζώα, ιδίως στα βοοειδή και στα πρόβατα, ενώ συσχετιζόταν με τη μίανση των ζωοτροφών. Παρά το γεγονός ότι το βακτήριο είχε εξαρχής αναγνωριστεί ως παράγοντας πρόκλησης νόσου στον άνθρωπο, μόλις το 1981 έγινε κοινά αποδεκτή η συσχέτιση του μικροοργανισμού με τα τρόφιμα και καθιερώθηκε ο τροφιμογενής χαρακτήρας της λιστερίωσης (Harris, 2002).

#### 1.1.2. Φυλογενετική ταξινόμηση του γένους *Listeria*

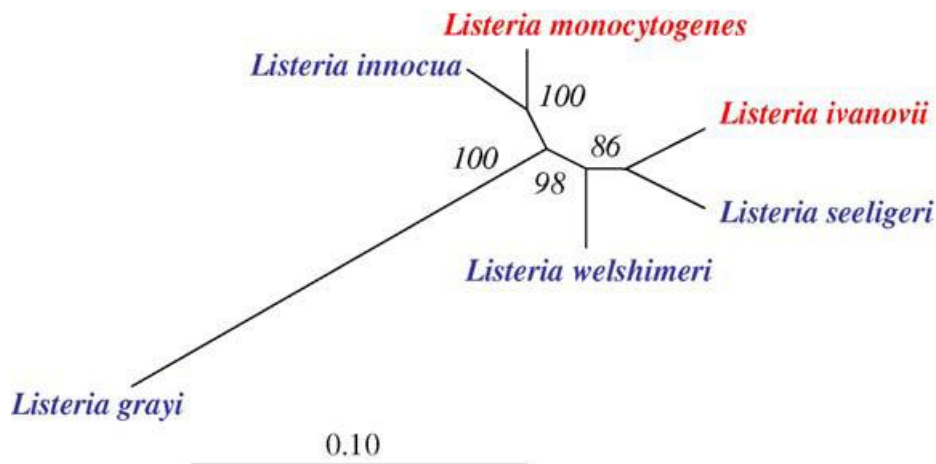
Μέχρι τη δεκαετία του 1970, τα *Listeria* spp. θεωρούνταν ως κορυνοβακτηριοειδή ή κορυνοβακτηριδιόμορφα (coryneforms) και εντάσσονταν στην οικογένεια *Corynebacteriaceae*. Εντούτοις, τα δεδομένα αναλύσεων των τριών τελευταίων δεκαετιών κατέδειξαν ότι το γένος *Listeria* αποτελεί μια αυτοτελή ταξινομική βαθμίδα (taxon) με διακριτά χαρακτηριστικά για τα είδη του, ικανά να τα διαφοροποιήσουν έναντι άλλων ειδών από γειτονικές ταξινομικές βαθμίδες. Φαινοτυπικές μελέτες, χημειοταξινομικά (chemotaxonomic) χαρακτηριστικά (π.χ. περιεκτικότητα του DNA σε βάσεις G + C), καθώς και η εύρεση της αλληλουχίας (sequencing) του ριβοσωμικού RNA (ribosomal RNA, rRNA) και DNA, απέδειξαν ότι όλα τα είδη *Listeria* σχηματίζουν μια σταθερή και ομοιογενή ομάδα βακτηρίων (Feresu & Jones, 1988· Glaser και συν., 2001· Hartford & Sneath, 1993· Rocourt,

Grimont, Grionot, & Seeliger, 1982· Wilkinson & Jones, 1977). Όμως, η ακριβής φυλογενετική θέση του γένους *Listeria* παραμένει ακόμα και σήμερα αντικείμενο αντιπαραθέσεων. Μολονότι είναι γενικά παραδεκτός ο ισχυρισμός ότι το κοντινότερο φυλογενετικά γένος είναι το *Brochothrix*, υπάρχει στενή συγγένεια του γένους *Listeria* με άλλα χαμηλής περιεκτικότητας (<55%) σε βάσεις G + C θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* και *Lactobacillus* (Collins και συν., 1991· Feresu & Jones, 1988· Glaser και συν., 2001).

Το γένος *Listeria*, όπως και το γένος *Brochothrix*, ανήκει στην οικογένεια *Listeriaceae* της τάξης *Bacillales*, που περιλαμβάνεται στην κλάση *Bacilli* όπου ευρίσκονται όλοι οι βάκιλοι, η οποία με τη σειρά της εντάσσεται στο φύλο *Firmicute* (NCBI, 2011). Αρχικά το γένος περιελάμβανε μόνο το είδος *L. monocytogenes*, με βάση όμως τα ευρήματα μοριακών αναλύσεων το γένος σήμερα αποτελείται από τα ακόλουθα έξι είδη: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* και *L. grayi* (Rocourt & Buchrieser, 2007), ενώ προσφάτως ταυτοποιήθηκε και ένα νέο είδος για το οποίο προτάθηκε το όνομα *L. marthii* sp. nov. (Graves και συν., 2010). Ειδικότερα, εντός του *L. ivanovii* διακρίνουμε τα *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* και *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* (Boerlin και συν., 1992). Παλαιότερα υφίστατο ξεχωριστά ως είδος και το *L. murrayi* το οποίο όμως πλέον έχει ενσωματωθεί στο *L. grayi* (Rocourt, Boerlin, Grimont, Jacquet, & Piffaretti, 1992). Εξάλλου, η φυλογενετική ανάλυση που στηρίχθηκε στα αποτελέσματα του υβριδισμού DNA/DNA, της ενζυμικής ανάλυσης πολλαπλών περιοχών (multilocus enzyme analysis) και της αλληλουχίας του rRNA της 16S υπομονάδας του προκαρυωτικού ριβοσώματος, αποκάλυψε ότι το *L. grayi* αποτελεί τον κοινό πρόγονο όλων των ειδών *Listeria* (Rocourt & Buchrieser, 2007· Schmid, Ng, Lampidis,

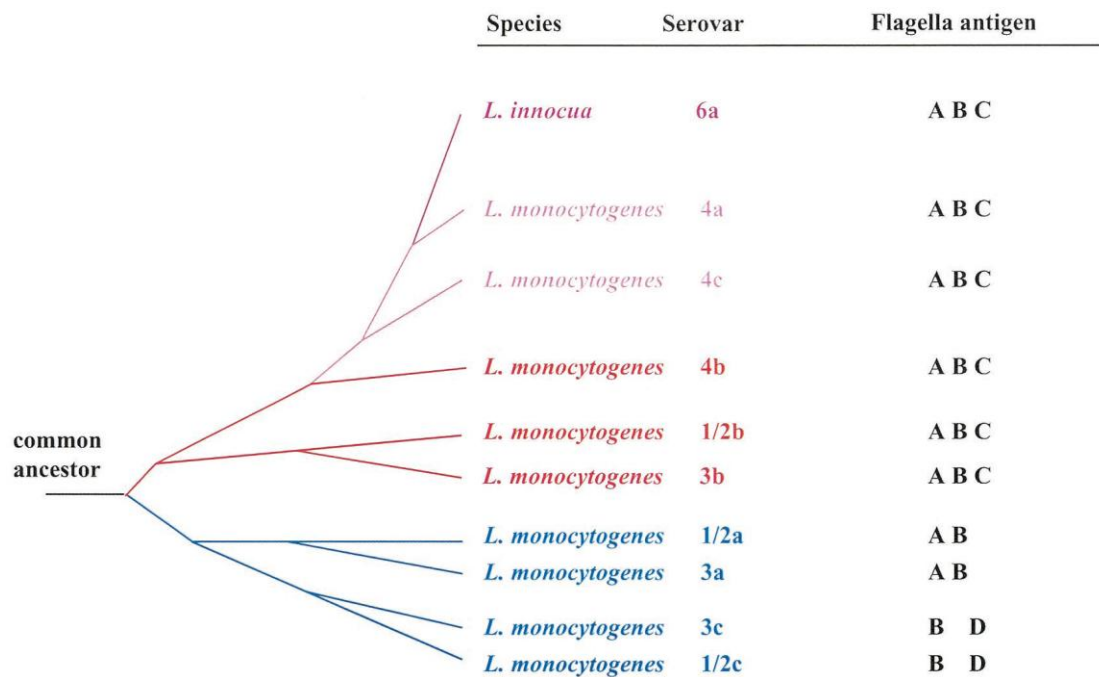


Emmerth, & Walcher, 2005). Τα υπόλοιπα πέντε είδη του γένους *Listeria* διαχωρίζονται περαιτέρω σε δύο εξελικτικές καταγωγές (lineages). Τα *L. monocytogenes* και *L. innocua* διαμορφώνουν την μια εξελικτική καταγωγή, ενώ η άλλη διαμορφώνεται από τα *L. ivanovii*, *L. seeligeri* και *L. welshimeri* (Σχήμα 1). Επιπλέον, εντός του *L. monocytogenes* έχουν βρεθεί τρεις διακριτές εξελικτικές καταγωγές που σχετίζονται με διαφορετικούς ορότυπους (παρ. 1.1.4.) του είδους (Bibb, Schwartz, Gellin, Plikaytis, & Weaver, 1989· Brosch, Chen, & Luchansky, 1994· Graves και συν., 1994· Piffaretti και συν., 1989). Συγκεκριμένα, οι ορότυποι 1/2a, 1/2c, 3a και 3c εντάσσονται στην πρώτη εξελικτική καταγωγή (lineage I), οι ορότυποι 1/2b, 3b και 4b στη δεύτερη (lineage II), ενώ οι ορότυποι 4a και 4c ανήκουν στην τρίτη εξελικτική καταγωγή (lineage III) (Σχήμα 2).



**Σχήμα 1.** Δενδρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης του γένους *Listeria*, όπου τα παθογόνα και μη παθογόνα είδη σημειώνονται με κόκκινο και μπλε χρώμα αντίστοιχα (πηγή: Hain, Steinweg, & Chakraborty, 2006).

Από τα προαναφερόμενα είδη μόνο τα *L. monocytogenes* και *L. ivanovii* είναι παθογόνα (Vázquez-Boland και συν., 2001), με το *L. monocytogenes* να θεωρείται σημαντικό παθογόνο του ανθρώπου και των ζώων, ενώ το *L. ivanovii* να σχετίζεται σχεδόν αποκλειστικά με προσβολές σε ζώα και ιδιαίτερα σε πρόβατα, όπου προκαλεί αποβολές (Sergeant, Love, & McInnes, 1991· Chand & Sadana, 1999). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί σποραδικές περιπτώσεις ανθρώπινης μόλυνσης από τα *L. ivanovii* (Cummins, Fielding, & McLauchlin, 1994· Guillet και συν., 2010· Lessing, Curtis, & Bowler, 1994· Snapir, Vaisbein, & Nassar, 2006) και *L. grayi* (Todeschini και συν., 1998).



**Σχήμα 2.** Υποθετικό δενδρόγραμμα των διαφορετικών εξελικτικών καταγωγών (lineages) και ορότυπων (serovars) εντός του *Listeria monocytogenes*, βασισμένο στην παρουσία/απουσία γονιδίων και στο συσχετισμό τους με βλεφαριδικά (flagella) αντιγόνα. Οι ορότυποι της πρώτης (I), δεύτερης (II) και τρίτης (III) εξελικτικής καταγωγής σημειώνονται με μπλέ, κόκκινο και μωβ χρώμα αντίστοιχα (πηγή: Doumith και συν., 2004).

### 1.1.3. Χαρακτηριστικά μικροοργανισμού

#### 1.1.3.1. Μορφολογία

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι ένας θετικός κατά Gram βάκιλος διαστάσεων  $0,4-0,5 \mu\text{m} \times 0,5-2,0 \mu\text{m}$ , που εγγίζει τα όρια του κόκκου (κοκκοβάκιλος) και απαντάται υπό μορφή μεμονωμένων κυττάρων ή αλυσίδων μικρού μήκους (παρ. 2.2.3.1.). Πρόκειται για ένα μη σπορογόνο βακτήριο το οποίο παρουσιάζει ικανότητα κίνησης σε θερμοκρασία δωματίου ( $20^{\circ}-25^{\circ}\text{C}$ ) λόγω των περιτρίχων βλεφαρίδων που διαθέτει (παρ. 2.2.3.2.), ενώ στερείται κίνησης σε θερμοκρασίες άνω των  $30^{\circ}\text{C}$  (Peel, Donachie, & Shaw, 1988).

#### 1.1.3.2. Καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* παρουσιάζει αύξηση στα περισσότερα από τα κοινά χρησιμοποιούμενα βακτηριολογικά υποστρώματα, ενώ παρατηρείται έντονη αύξηση στο αιματούχο άγαρ (blood agar) (παρ. 2.2.3.5.) και στο άγαρ τρυπτόζης (tryptose agar). Ο ρυθμός αύξησης του βακτηρίου μεγαλώνει παρουσία ζυμώσιμων σακχάρων (παρ. 2.2.3.6.), ιδιαίτερα παρουσία γλυκόζης. Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση μιας ιδιαίτερα διαπεραστικής οσμής η οποία οφείλεται στο σχηματισμό καρβοξυλικών οξέων, υδροξυοξέων και αλκοολών (Daneshvar, Brooks, Malcolm, & Pine, 1989). Αύξηση του μικροοργανισμού σε υγρό θρεπτικό μέσο (ζωμός) παρατηρείται μετά πάροδο 8 έως 24 h από τον ενοφθαλμισμό του βακτηριδίου στο ζωμό, με ταυτόχρονη επώαση σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$ . Στις καλλιέργειες του μικροοργανισμού διάρκειας πολλών ημερών ανευρίσκονται πλειομορφικές δομές (διφθεροειδή κύτταρα) ανάλογες με εκείνες του γένους *Corynebacterium* (Μπαλατσούρας, 2006), ενώ κάποια κύτταρα χάνουν την ικανότητα συγκράτησης της

χρώσης Gram. Επίσης, στην περίπτωση αυτή εμφανίζονται λεπτά, νηματοειδή κύτταρα μήκους ακόμη και έως 6  $\mu\text{m}$  (Wagner & McLauchlin, 2008). Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση καλλιέργειας του μικροοργανισμού μετά από οσμωτική κατάπληξη (osmotic shock) (Jorgensen, Stephens, & Knoche, 1995) ή κατά την έκθεσή του σε υποθανάτιες (sublethal) συνθήκες αλκαλικής καταπόνησης (stress) (Giotis, Blair, & McDowell, 2007).

Οι αποικίες του *L. monocytogenes* εμφανίζονται στο θρεπτικό άγαρ (nutrient agar) κυκλικές, μικρές (0,2-0,8 mm σε διάμετρο), γαλακτόχρες, διαφανείς και λείες μετά από επώαση 24 h σε θερμοκρασία 37°C, ενώ δεν διαφέρουν από τις αποικίες των αιμολυτικών στρεπτόκοκκων στο αιματούχο άγαρ. Αντίθετα, στο άγαρ τρυπτόζης οι αποικίες εμφανίζουν χαρακτηριστικό κυανοπράσινο χρώμα στις ακτίνες πλάγιας προσπτώσεως του φωτός (Gray, 1957· Henry, 1933).

### 1.1.3.3. Απαιτήσεις μικροβιακής αύξησης

#### 1.1.3.3.1. Οξυγόνο

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο το οποίο αυξάνεται καλύτερα υπό συγκέντρωση 5-10% διοξειδίου του άνθρακα (Lungu, Ricke, & Johnson, 2009· Μπαλατσούρας, 2006).

#### 1.1.3.3.2. Θερμοκρασία

Το κατώτερο και ανώτερο θερμοκρασιακό όριο αύξησης του *L. monocytogenes* είναι 1°-2°C και 45°C αντίστοιχα (Junttila, Niemelä, & Hirn, 1988). Πρόκειται λοιπόν για έναν ψυχρότροφο μικροοργανισμό, η βέλτιστη αύξηση του οποίου παρατηρείται σε θερμοκρασία μεταξύ 35°C και 37°C. Η ικανότητα του βακτηρίου να πολλαπλασιάζεται ακόμη και σε θερμοκρασίες ψυγείου (2°-4°C) καθιστά το

τεχνολογικό εμπόδιο της ψύξης ανεπαρκές για τον πλήρη έλεγχο του παθογόνου στα τρόφιμα. Ωστόσο, η παρατηρούμενη μικροβιακή αύξηση στις θερμοκρασίες ψυγείου είναι σχετικά αργή, με τον μικρότερο χρόνο διπλασιασμού του βακτηρίου να έχει καταγραφεί περίπου στις 1-2 ημέρες κατά τη συντήρηση γαλακτοκομικών προϊόντων σε θερμοκρασία 4°C (Ryser, 2007). Σε θερμοκρασίες μικρότερες των 5°C, η λανθάνουσα φάση (lag phase) κατά την αύξηση του μικροοργανισμού διαρκεί συνήθως από 1 έως και 33 ημέρες (Adams & Moss, 2008). Ο μικροοργανισμός επιβιώνει σε θερμοκρασίες μικρότερες από τους 0°C.

#### 1.1.3.3.3. pH

Αύξηση του *L. monocytogenes* παρατηρείται σε ζωμούς με τιμές pH μεταξύ 4,4 και 9,4, με τη βέλτιστη αύξηση να λαμβάνει χώρα σε τιμή pH 7,0 (Harris, 2002· Parish & Higgins, 1989). Τιμές pH μικρότερες της τιμής 5,5 καταλήγουν σε σημαντική μείωση του ρυθμού αύξησης του μικροοργανισμού (Adams & Moss, 2008).

#### 1.1.3.3.4. Ενεργότητα νερού

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι ένα από τα λίγα βακτηριακά τροφιμογενή παθογόνα που παρουσιάζουν ικανότητα αύξησης σε τιμές ενεργότητας νερού μικρότερες της τιμής 0,93 (Farber, Coates, & Daley, 1992). Το βακτήριο είναι ανθεκτικό στην ξηρασία και στη μεγάλη συγκέντρωση αλάτων, καθώς είναι σε θέση να αυξάνεται σε 10% (w/v) χλωριούχο νάτριο ή 200 ppm νιτρώδους νατρίου και να επιβιώνει σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των αλάτων αυτών (Shahamat, Seaman, & Woodbine, 1980). Εξάλλου, η επιβίωση του *L. monocytogenes* σε χαμηλή τιμή pH

και υψηλή συγκέντρωση άλατος εξαρτάται σχεδόν αποκλειστικά από τη θερμοκρασία (Cole, Jones, & Holyoak, 1990).

#### 1.1.3.3.5. Θρεπτικά συστατικά

Σύμφωνα με τα δημοσιευμένα δεδομένα αναφορικά με τις απαιτήσεις του *L. monocytogenes* σε θρεπτικά συστατικά, εκτός των γνωστών πηγών άνθρακα και αζώτου που απαιτούνται, οι παράγοντες εκείνοι οι οποίοι συμβάλλουν στη μικροβιακή αύξηση περιλαμβάνουν την παρουσία στο υπόστρωμα αύξησης του μικροοργανισμού των αμινοξέων: κυστίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, αργινίνη, μεθειονίνη, βαλίνη, κυστεΐνη, καθώς και των βιταμινών: ριβοφλαβίνη, βιοτίνη, θυαμίνη και λιποϊκό οξύ (Premaratne, Lin, & Johnson, 1991· Siddiqi & Khan, 1989· Welshimer, 1963). Επίσης, η αύξηση διεγείρεται από την ύπαρξη τρισθενούς σιδήρου και φαινυλαλανίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα (Premaratne και συν., 1991· Siddiqi & Khan, 1982).

#### 1.1.3.4. Μεταβολισμός και βιοχημικά χαρακτηριστικά

Ο *L. monocytogenes* είναι ένας ομοζυμωτικός μικροοργανισμός που οξειδώνει ενδιάμεσα προϊόντα του γλυκολυτικού κύκλου (Cotoni, 1942), ενώ επίσης διαθέτει τα ένζυμα οξειδάση της γλυκόζης και οξειδάση του NADH (Patcett, Kelly, & Kroll, 1991).

Το βακτήριο αυξάνεται παρουσία γλυκόζης, σχηματίζοντας ως κύρια τελικά προϊόντα μεταβολισμού γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και ακετοΐνη υπό αερόβιες συνθήκες (Pine, Malcolm, Brooks, & Daneshvar, 1989· Romick, Fleming, & McFeeters, 1996), ενώ η τελευταία δεν παράγεται υπό αναερόβιες συνθήκες. Η αναερόβια αύξηση λαμβάνει χώρα παρουσία μόνο εξοζών και πεντοζών. Η παρουσία

μαλτόζης υποστηρίζει την αύξηση του βακτηριακού είδους σε αντίθεση με τη σακχαρόζη (Pine και συν., 1989). Επίσης, το βακτήριο αυξάνεται παρουσία του γλυκοζίτη αισκουλίνη, το προϊόν υδρόλυσης του οποίου (αισκουλετίνη) μαζί με τρισθενές κιτρικό σίδηρο οδηγεί στη δημιουργία σκουρόχρωμου μαύρου ή καφετί συμπλόκου που επιτρέπει την ανίχνευση του μικροοργανισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα. Ο καταβολισμός της γλυκόζης γίνεται είτε αερόβια είτε αναερόβια και ακολουθείται το βιοχημικό μονοπάτι των Embden-Meyerhof.

#### 1.1.4. Ορολογική τυποποίηση

Τα στελέχη *Listeria* διακρίνονται σε ορότυπους (serotypes ή serological variants, serovars) βάσει των σωματικών (O) και βλεφαριδικών (H) αντιγόνων που διαθέτουν (Seeliger & Jones, 1986), τα οποία χρησιμοποιούνται ως στόχοι αντίστοιχων μονόκλωνων και πολύκλωνων αντισωμάτων κατά τον ανοσολογικό προσδιορισμό και την ορολογική τυποποίηση (serotyping) των στελεχών. Για όλα τα είδη *Listeria* έχουν χαρτογραφηθεί 15 διαφορετικοί υπότυποι (subtypes) σωματικών αντιγόνων (I-XV) και τέσσερις υπότυποι βλεφαριδικών αντιγόνων (A-D). Μέχρι σήμερα, για τον *L. monocytogenes* είναι γνωστοί οι 13 ορότυποι του Πίνακα 1. Παρόμοια χαρτογραφημένα αντιγόνα ανευρίσκονται μεταξύ των *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* και *L. welshimeri*. Η ορολογική τυποποίηση μολονότι δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση του είδους, εξυπηρετεί τόσο την επιβεβαίωση της ανίχνευσης του *Listeria* sp. όσο και επιδημιολογικούς σκοπούς.

**Πίνακας 1.** Σωματικά (O) και βλεφαριδικά (H) αντιγόνα γνωστών ορότυπων του *Listeria monocytogenes*<sup>a</sup>.

Ορότυπος	Σωματικά (O) αντιγόνα <sup>b</sup>	Βλεφαριδικά (H) αντιγόνα
1/2a	I, II	A, B
1/2b	I, II	A, B, C
1/2c	I, II	B, D
3a	II, IV	A, B
3b	II, IV	A, B, C
3c	II, IV	B, D
4a	(V), VII, IX	A, B, C
4ab	V, VI, VII, IX	A, B, C
4b	V, VI	A, B, C
4c	V, VII	A, B, C
4d	(V), VI, VIII	A, B, C
4e	V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
7	XII, XIII	A, B, C

<sup>a</sup> Πηγή: προσαρμογή από Gorski, 2008.

<sup>b</sup> Τα εντός παρενθέσεως αντιγόνα μπορεί να μην ανιχνεύονται σε όλες τις απομόνωσεις του μικροοργανισμού.

## 1.2. Λιστερίωση

### 1.2.1. Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* απαντάται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον, ευρισκόμενος στο έδαφος, στη βλάστηση, στα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών, στα λύματα, στη λάσπη των βιολογικών καθαρισμών και στα κόπρανα ανθρώπου και ζώων (Allerberger, 2007· Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991). Η επιβίωση του βακτηρίου στο έδαφος και στο νερό μπορεί να συμβεί για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο του έτους, ενώ στα κόπρανα των ζώων μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από δύο χρόνια. Το βακτήριο έχει απομονωθεί από τα κόπρανα υγιών



ενήλικων ατόμων σε ποσοστό *ca.* 5% (Schlech και συν., 1983· Schuchat και συν., 1991) με τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης να έχουν αναφερθεί σε κλινικές περιπτώσεις μόλυνσης από τον μικροοργανισμό (Schuchat και συν., 1993). Η απομόνωση από το φυσικό περιβάλλον όχι μόνον του συγκεκριμένου μικροοργανισμού αλλά γενικότερα των *Listeria* spp., επηρεάζεται σαφώς από τους κατά τόπους περιβαλλοντικούς και μετεωρολογικούς παράγοντες που επικρατούν (Ivanek και συν., 2009). Γενικά, ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* απομονώνεται από θηλαστικά, πτηνά, τρωκτικά, ερπετά, ψάρια, ακόμη και έντομα, ενώ μπορεί να μολύνει πάνω από 50 είδη οικόσιτων και άγριων ζώων ή πτηνών, μεταξύ των οποίων τα βοοειδή, τα αιγοπρόβατα, τους χοίρους και τα πουλερικά.

Εκτός του αβιοτικού περιβάλλοντος, υποδόχο (reservoir) των *Listeria* spp., κατά συνέπεια και του *L. monocytogenes*, αποτελούν και τα άγρια θηλαστικά από τα οποία μολύνονται διάφορα άλλα ζώα καθώς και ο άνθρωπος. Η μόλυνση των ζώων από τον μικροοργανισμό προκαλεί συχνά λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) υπό μορφή εγκεφαλομυελίτιδας και αποβολές, με τα πρόβατα να είναι ιδιαίτερα ευπρόσβλητα. Εξάλλου, η εγκεφαλίτιδα λόγω λιστερίωσης στα βοοειδή συνδυάστηκε με αρκετές από τις επιδημίες ανθρώπινης λιστερίωσης που μελετήθηκαν την τελευταία δεκαετία (Βάσσος, 2004· Pohl, Wiedmann, & Nightingale, 2006).

Ο κύριος τρόπος μετάδοσης του μικροοργανισμού στον άνθρωπο, εκτός από την άμεση μετάδοση από τα προσβεβλημένα ζώα, είναι τα μiasμένα τρόφιμα, όπου κατά καιρούς έχουν ενοχοποιηθεί το απαστερίωτο αλλά και το παστεριωμένο γάλα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. μαλακά τυριά, παγωτό, βούτυρο), το κρέας και διάφορα κρεατοσκευάσματα (λουκάνικα, ζυμούμενα αλλαντικά, πατέ κ.ά.), οι ωμές σαλάτες και τα λαχανικά (π.χ. μαρούλι, λάχανο, ραπανάκι), τα πουλερικά, τα ψάρια

και τα οστρακοειδή (Farber & Peterkin, 1991· Mossel και συν., 1995· Rocourt & Cossart, 1997).

Ο μικροοργανισμός μαιώνει τα προαναφερόμενα τρόφιμα με έναν από τους ακόλουθους τρόπους:

- Μέσω της διασποράς του με τα κόπρανα ανθρώπου και ζώων στο περιβάλλον, οπότε ανευρίσκεται στο χώμα και στο νερό. Με τον τρόπο αυτό μαιίνονται τα λαχανικά, τα ψάρια, τα οστρακοειδή, αλλά και έμμεσα τα υπόλοιπα τρόφιμα.
- Με την απευθείας μίανση προϊόντων προερχόμενων από μολυσμένα ζώα (π.χ. γάλα, τυρί, κρέας, πουλερικά, ψάρια, οστρακοειδή).
- Από κακούς χειρισμούς κατά την παρασκευή και διανομή των τροφίμων με συνέπεια την εμφάνιση φαινομένων διαμίανσης (cross-contamination) των έτοιμων προς κατανάλωση (ready-to-eat) τελικών προϊόντων.

Τα αποτελέσματα δύο μελετών ενεργούς παρακολούθησης του *L. monocytogenes* που διεξάχθηκαν από τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) των Η.Π.Α. κατά τα έτη 1980-1982 και 1986, κατέδειξαν ετήσια 7,4 κρούσματα ανά εκατομμύριο πληθυσμού, γεγονός που μεταφράστηκε σε περίπου 1.850 κρούσματα και 425 θανάτους κατ' έτος από τη μόλυνση με το παθογόνο (Ciesielski, Hightower, Parsons, & Broome, 1988· Gellin και συν., 1991). Μέχρι το 1993, μετά την υιοθέτηση συστάσεων για ελαχιστοποίηση του κινδύνου εμφάνισης τροφιμογενούς λιστερίωσης (NACMCF, 1991) από τις αρμόδιες κρατικές υπηρεσίες των Η.Π.Α. (FDA, FSIS κ.ά.) και την εναρμόνιση της βιομηχανίας τροφίμων στις απαιτήσεις της προκύπτουσας σχετικής νομοθεσίας, η ετήσια συχνότητα εμφάνισης της νόσου μειώθηκε στα 4,4 κρούσματα ανά εκατομμύριο πληθυσμού ή στα 1.092 κρούσματα και 248 θανάτους περίπου κατ' έτος (Tappero, Schuchat, Deaver, Mascola, & Wenger, 1995). Παρόμοια μείωση στη

συχνότητα εμφάνισης της ανθρώπινης λιστερίωσης παρατηρήθηκε και στη Γαλλία, μετά την εφαρμογή μέτρων ελέγχου για την αποτροπή ή την μείωση του επιπέδου μίανσης των τροφίμων (Goulet και συν., 2001). Στην Ε.Ε. των 27 χωρών, όπως ήδη αναφέρθηκε, η συχνότητα εμφάνισης της λιστερίωσης για το έτος 2010 ανερχόταν στα 3,5 κρούσματα ανά εκατομμύριο πληθυσμού (EFSA & ECDC, 2012).

Τα στοιχεία που προωθήθηκαν στον WHO σχετικά με τις καταγεγραμμένες τροφιμογενείς λοιμώξεις και δηλητηριάσεις στη χώρα μας κατά τα έτη 1993-1998, δείχνουν μόνο ένα κρούσμα ανθρώπινης λιστερίωσης το οποίο καταγράφηκε το 1998 (Tirado & Schmidt, 2000), ενώ τα έτη 1999-2000 επιβεβαιώθηκαν επτά και έξι κρούσματα λιστερίωσης αντίστοιχα (Schmidt & Gervelmeyer, 2003). Μετά την ίδρυση της EFSA το 2002 και του ECDC το 2005, η καταγραφή των τροφιμογενών κρουσμάτων για όλες τις χώρες της Ε.Ε. και η δημοσίευση των στατιστικών στοιχείων που τα αφορούν αποτελεί αρμοδιότητα των προαναφερόμενων αρχών. Τα επιβεβαιωμένα κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης στη χώρα μας κατά τα έτη 2004-2010 ήταν τρία (2004), οκτώ (2005), επτά (2006), δέκα (2007), ένα (2008), τέσσερα (2009) και δέκα (2010), αντίστοιχα (EFSA & ECDC, 2010, 2011, 2012). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται συνοπτικά μερικές από τις σημαντικότερες εξάρσεις (outbreaks) τροφιμογενούς λιστερίωσης που έχουν καταγραφεί τα τελευταία 30 χρόνια περίπου.

**Πίνακας 2.** Τροφιμογενείς λιστεριώσεις κατά τα έτη 1976-2005<sup>α</sup>.

Έτος	Ενεχόμενο Τρόφιμο	Χώρα	Κρούσματα	Θάνατοι
1976	Νωπή σαλάτα	Η.Π.Α.	20	0
1978-1979	Ωμά λαχανικά	Αυστραλία	12	0
1979	Ωμά λαχανικά	Η.Π.Α.	20	5
1980	Νωπά ιχθυηρά	Νέα Ζηλανδία	22	6
1981	Διάφορα γαλακτοκομικά	Αγγλία	11	5
1981	Ωμά λαχανικά (κυρίως λαχανοσαλάτα)	Καναδάς	41	18
1983	Παστεριωμένο γάλα	Η.Π.Α.	49	14
1983-1987	Μαλακό τυρί Vacherin Mont d' Or	Ελβετία	122	34
1985	Τυρί μεξικάνικου τύπου (από απαστερίωτο γάλα)	Η.Π.Α.	142	48
1986	Απαστερίωτο γάλα, ωμά λαχανικά	Αυστρία	28	5
1986-1987	Παγωτό, σαλάμι, μαλακό τυρί Brie	Η.Π.Α.	36	16
1986-1987	Ωμά αβγά	Η.Π.Α.	2	άγνωστο
1987	Βούτυρο	Η.Π.Α.	11	άγνωστο
1987-1989	Πατέ & επαλειφόμενα προϊόντα κρέατος	Αγγλία	355	94
1989	Γαρίδες	Η.Π.Α.	10	0
1989-1990	Ημίσκληρα τυριά	Δανία	23	0
1990	Πατέ & επαλειφόμενα προϊόντα κρέατος	Αυστραλία	11	6

Πίνακας 2. (συνέχεια)

Έτος	Ενεχόμενο Τρόφιμο	Χώρα	Κρούσματα	Θάνατοι
1991	Καπνιστά μύδια	Αυστραλία	4	0
1992	Καπνιστά μύδια	Νέα Ζηλανδία	4	0
1992	Πηκτή χοίρειου κρέατος	Γαλλία	279	85
1993	Πατέ	Γαλλία	38	11
1993	Σαλάτα με ρύζι	Ιταλία	18	0
1994	Παστεριωμένο σοκολατούχο γάλα	Η.Π.Α.	48	0
1994-1995	Καπνιστά ιχθυηρά	Σουηδία	9	2
1995	Μαλακά τυριά με >50% υγρασία (Brie, Camembert, Φέτα, Mozzarella)	Γαλλία	33	4
1997	Μαλακό τυρί Pont l' évêque	Γαλλία	14	0
1998	Hot dog	Η.Π.Α.	105	άγνωστο
1998-1999	Βούτυρο	Φινλανδία	25	6
1999	Αλλαντικά γαλοπούλας, χοίρειου και βόειου κρέατος (έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα κρέατος)	Η.Π.Α.	2	άγνωστο
1999	Πατέ	Η.Π.Α.	11	άγνωστο
1999	Αλλαντικά (έτοιμα προς κατανάλωση)	Η.Π.Α.	5	άγνωστο
1999	Hot dog	Η.Π.Α.	4	άγνωστο
1999	Άγνωστο	Η.Π.Α.	6	άγνωστο
1999-2000	Πηκτή χοίρειου κρέατος	Γαλλία	26	7
2000	Αλλαντικό γαλοπούλας (έτοιμα προς κατανάλωση)	Η.Π.Α.	30	άγνωστο

Πίνακας 2. (συνέχεια)

Έτος	Ενεχόμενο Τρόφιμο	Χώρα	Κρούσματα	Θάνατοι
2000	Έτοιμα προς κατανάλωση κρεατοσκευάσματα	Η.Π.Α.	29	7
2000	Μεξικάνικο τυρί Queso fresco (από θερμισμένο γάλα)	Η.Π.Α.	13	άγνωστο
2000-2001	Τυρί μεξικάνικου τύπου (από απαστερίωτο γάλα)	Η.Π.Α.	12	5
2001	Σάντουιτς αλλαντικών	Η.Π.Α.	6	άγνωστο
2002	Αλλαντικό γαλοπούλας	Η.Π.Α.	54	άγνωστο
2002	Μεξικάνικο τυρί Queso fresco (από απαστερίωτο γάλα)	Η.Π.Α.	12	άγνωστο
2003	Άγνωστο	Η.Π.Α.	3	άγνωστο
2005	Αλλαντικά αίματος	Η.Π.Α.	άγνωστο	άγνωστο
2005	Αλλαντικά αίματος χοίρειου κρέατος	Η.Π.Α.	άγνωστο	άγνωστο

<sup>a</sup> Πηγή: προσαρμογή από Ανδρίτσος, Παραμυθιώτης, & Δροσινός, 2008· Αρβανιτογιάννης, Σάνδρου, & Κούρτης, 2001· Drosinos, Paramithiotis, & Andritsos, 2011· ECDC, 2008· FSIS, 2008· Painter & Slutsker, 2007.

### 1.2.2. Παθογένεια

Το παθογόνο *L. monocytogenes* είναι ένα ενδοκυτταρικό παράσιτο. Οι παράγοντες εκείνοι οι οποίοι κυρίως ευθύνονται για την παθογένεια του μικροοργανισμού είναι η λιστεριολυσίνη O (listeriolysin O, LLO), η ειδική φωσφολιπάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης και η λεκιθινάση (Dussurget, Pizarro-Cerda, & Cossart, 2004· Portnoy, Auerbach, & Glomski, 2002· Vázquez-Boland και συν., 2001). Ο

μικροοργανισμός εισάγεται στο υγιές κύτταρο μέσω του σχηματισμού φαγοσωμάτων (phagosomes). Όταν το φαγόσωμα εισαχθεί με φαγοκύτωση στο κύτταρο, με τη βοήθεια των ενζύμων που προαναφέρθηκαν, επέρχεται λύση της μεμβράνης του φαγοσώματος και το βακτήριο απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα όπου και πολλαπλασιάζεται. Σημαντικό στοιχείο της παθογένειας του *L. monocytogenes* είναι η ικανότητά του να εισβάλλει σε γειτονικά κύτταρα. Για να το επιτύχει αυτό, το βακτήριο κινητοποιεί μηχανισμούς του κυττάρου-ξενιστή, οι οποίοι μεταξύ αυτών περιλαμβάνουν τον πολυμερισμό της ακτίνης, για τη δημιουργία βλεφαρίδας στον έναν από τους δύο πόλους του (Sanger, Sanger, & Southwick, 1992· Southwick & Purich, 1996). Η βλεφαρίδα αυτή εξυπηρετεί στην προώθηση του παθογόνου και στη μετατόπισή του δίπλα στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή. Εξαιτίας της υφιστάμενης ώθησης από τον μικροοργανισμό, στο σημείο αυτό δημιουργείται μια προεκβολή της κυτταρικής μεμβράνης η οποία μπορεί να εισχωρήσει σε ένα γειτονικό κύτταρο. Ομοίως, όπως και στην περίπτωση του φαγοσώματος, ακολουθεί λύση της κυτταρικής μεμβράνης της προεκβολής που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του παθογόνου στο κυτταρόπλασμα του νεοπροσβαλλόμενου κυττάρου.

Η ανθρώπινη μόλυνση από τον παθογόνο μικροοργανισμό συνηθέστερα προκύπτει μετά από κατανάλωση μiasμένου τροφίμου. Αρχικά, ο *L. monocytogenes* επιβιώνει της γαστρικής διέλευσης από τον στόμαχο και αυξάνεται στο έντερο, ενώ στη συνέχεια κύτταρα του μικροοργανισμού διηθούν τον εντερικό βλεννογόνο, με τη βοήθεια ενεργού ενδοκύττωσής τους από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του μολυσμένου οργανισμού (Cossart & Sansonetti, 2004· Farber & Peterkin, 1991). Η αλκαλοποίηση του στομάχου από αντιόξινα, οι αναστολείς υδρογόνου, οι παρεμποδιστές λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων των επιθηλιακών κυττάρων ή ακόμη και οι χειρουργικές

επεμβάσεις για θεραπεία του έλκους του στομάχου, είναι παράγοντες που μπορούν να προάγουν τη μόλυνση (Ho, Shands, Friedland, Eckind, & Fraser, 1986· Schlech, Chase, & Badley, 1993). Το παθογόνο μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος προσβάλλοντας διάφορα όργανα (ήπαρ, σπλήνας κ.ά.) και ιστούς γενικότερα, μεταξύ άλλων και το ΚΝΣ και τον πλακούντα των εγκύων γυναικών. Περαιτέρω διασπορά του μικροοργανισμού στον εγκέφαλο προκαλεί σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες επιφέρουν ακόμη και θάνατο.

### 1.2.3. Νοσολογία του ανθρώπου

Η τροφιμογενής λιστερίωση εμφανίζεται στον άνθρωπο υπό μορφή σποραδικών κρουσμάτων, εξάρσεων ή επιδημιών. Η περίοδος επώασης της ασθένειας εξαρτάται από την ευπάθεια του προσβεβλημένου ατόμου και τον λαμβανόμενο με το τρόφιμο πληθυσμό του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Συνέπεια του γεγονότος αυτού είναι η περίοδος επώασης της λιστερίωσης να ποικίλλει σημαντικά, ενώ έχουν καταγραφεί περίοδοι από 24 ώρες έως και 91 ημέρες με τη μέση περίοδο επώασης να διαρκεί 31 ημέρες (Harris, 2002· Lorber, 2007· Ooi & Lorber, 2005).

Τα συμπτώματα της λιστερίωσης μπορεί να είναι ήπια, όμοια με εκείνα μιας τοπικής λοίμωξης του δέρματος ή γρίπης. Εντούτοις, συνήθως η λιστερίωση παρουσιάζεται ως μηνιγγοεγκεφαλίτιδα με μικροβαιμία (Allerberger, 2007· Buchholz & Mascola, 2001· Lorber, 1997· Wing & Gregory, 2002). Γενικά, τα συμπτώματα από προσβολή από *Listeria* spp. συνίστανται στην εμφάνιση μηνιγγιτιδων και διαταραχών του ΚΝΣ. Το τυπικότερο σύμπτωμα είναι η πολυμορφοπύρηνη λευκοκυττάρωση (polymorphonuclear leukokytosis) και αργότερα η μονοπύρηνη λευκοκυττάρωση. Σε μέσης ηλικίας άτομα η λιστερίωση εκδηλώνεται σε ποσοστό 55% ως μηνιγγίτιδα, 25% ως βακτηριαιμία και 7% ως άτυπες νοσηρές καταστάσεις



(Μπαλατσούρας, 2006), ενώ η θνητότητα της νόσου είναι μεγάλη και κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα (20-30%) (Mead και συν., 1999). Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα (παρ.1.2.2.), το παθογόνο αίτιο μεταφερόμενο διαμέσου της κυκλοφορίας του αίματος μπορεί να προσβάλλει πληθώρα οργάνων, όπως οι μήνιγγες, το ήπαρ, ο σπλήνας, ο θυρεοειδής αδένας κ.ά., με συνέπεια την εμφάνιση φλεγμονών και νεκρωτικών τόπων. Στις ομάδες ειδικού κινδύνου στη νόσο, όπως τα νεογνά, οι έγκυες, οι ηλικιωμένοι και οι ανοσοκατεσταλμένοι, το ποσοστό θνητότητας μπορεί να ξεπεράσει το 30% (Allerberger, 2007· Guerro και συν., 2004).

#### *1.2.4. Θεραπεία*

Εκτεταμένες ανασκοπήσεις σχετικά με τη θεραπεία της λιστερίωσης είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία (Hof, Nichterlein, & Kretschmar, 1997· Lorber, 2007). Παρ' όλα αυτά δεν έχουν υπάρξει παρεμβατικές μελέτες με τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές (randomized controlled trials) για τον καθορισμό της βέλτιστης θεραπείας έναντι της νόσου, ώστε να διαπιστωθεί επακριβώς το καταλληλότερο αντιβιοτικό για την καταπολέμησή της ή η απαιτούμενη διάρκεια της θεραπείας της. Η τελευταία στηρίζεται στη χορήγηση αντιβιοτικών με βάση την πενικιλίνη (αμινοπενικιλινών). Στο πλαίσιο αυτό, η αμπικιλίνη (ampicillin) μαζί με την προσθήκη ποσότητας γενταμικίνης (gentamicin) θεωρούνταν μέχρι πρότινος ως ο ενδεδειγμένος τρόπος αντιμετώπισης της λιστερίωσης (Lorber, 1997, 2002· Safdar & Armstrong, 2003· Scheld, 1983), πρόσφατα δεδομένα όμως καθιστούν τη χρήση υψηλών δόσεων αμοξικιλίνης (amoxicillin) σε συνδυασμό με μια επιπλέον δόση γενταμικίνης για τις μη εγκυμονούσες, ως τη δημοφιλέστερη πλέον θεραπεία (Hof, 2004). Ο ρόλος των αμινογλυκοζιδίων, όπως η γενταμικίνη, που προστίθενται στις δοσολογίες των αμινοπενικιλινών δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί. Η μικρή

ικανότητα διείσδυσης στο εσωτερικό των κυττάρων του προσβαλλόμενου οργανισμού, καθιστά τα αμινογλυκοζίδια αναποτελεσματικά ως προς την ενδοκυτταρική αντιμετώπιση του *L. monocytogenes*. Ωστόσο, στην πλειοψηφία των κρουσμάτων μηνιγγίτιδας, ο μικροοργανισμός ευρίσκεται εξωκυτταρικά (Hof, 2003).

Στα άτομα που δεν παρουσιάζουν ανεκτικότητα (π.χ. αντιδράσεις υπερευαισθησίας) στην πενικιλίνη συνιστάται η χρήση τριμεθοπρίμης-σουλφαμεθοξαζόλης (trimethoprim-sulfamethoxazole, TMP-SMX) (Spitzer, Hammer, & Karchmer, 1986· Winslow & Pankey, 1982). Το TMP-SMX δρα ενδοκυτταρικά και παρουσιάζει βακτηριοκτόνο δράση, όπως και οι αμινοπενικιλίνες. Εναλλακτικά, έχει αναφερθεί η χρήση χλωραμφαινικόλης (chloramphenicol), τετρακυκλίνης (tetracycline) και κεφαλοσπορινών (cephalosporines), τα αντιβιοτικά αυτά όμως έχουν κατηγορηθεί για τα υψηλά ποσοστά αποτυχίας των θεραπευτικών αγωγών που τα περιλαμβάνουν, λόγω των συχνών περιστατικών υποτροπής που εμφανίζονται στους ασθενείς. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη βακτηριοστατική δράση της χλωραμφαινικόλης και της τετρακυκλίνης, η οποία δεν επαρκεί ώστε να ανακόψει την ικανότητα του *L. monocytogenes* να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται εντός των προσβαλλόμενων κυττάρων του οργανισμού (Southwich & Purick, 1996). Από την άλλη μεριά, οι κεφαλοσπορίνες δεν συνιστώνται για τη θεραπεία της λιστερίωσης εξαιτίας της χαμηλής συγγένειας που παρουσιάζουν με την πρωτεΐνη δέσμευσης της πενικιλίνης του μικροοργανισμού (Vicente, Berenguer, de Pedro, Pérez-Díaz, & Baquero, 1990).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένα, δεν υπάρχει ακόμα τεκμηριωμένος καθορισμός της βέλτιστης διάρκειας θεραπείας της ανθρώπινης λιστερίωσης. Μια θεραπευτική αγωγή διάρκειας δύο εβδομάδων κρίνεται αρκετή για την αντιμετώπιση της λιστερίωσης κατά την εγκυμοσύνη, ενώ δύο έως τρεις εβδομάδες απαιτούνται για

την αντιμετώπιση της βρεφικής λιστερίωσης. Για τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα, ίσως είναι συνετή μια θεραπεία διάρκειας τριών έως έξι εβδομάδων. Το χρονικό διάστημα της θεραπείας μειώνεται σχεδόν στο μισό (δύο έως τέσσερις εβδομάδες) στην περίπτωση των μη ανοσοκατεσταλμένων ενήλικων ατόμων με συμπτώματα μηνιγγίτιδας και βακτηριαιμίας, ενώ σε πολυπλοκότερες περιπτώσεις μολύνσεων (π.χ. ενδοκαρδίτιδα) το χρονικό αυτό διάστημα μπορεί να επεκταθεί.

#### 1.2.5. Προληπτικά μέτρα

Δεδομένης της αδυναμίας μετάδοσης της λιστερίωσης με την απλή επαφή μεταξύ των ανθρώπων, εκτός από την περίπτωση της απευθείας μετάδοσής της από την κυοφορούσα μητέρα στο έμβρυο, ο κυριότερος τρόπος πρόκλησης της νόσου στον άνθρωπο είναι η κατανάλωση μiasμένων τροφίμων.

Ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης της τροφιμογενούς λιστερίωσης είναι η πρόληψη. Προληπτικό εμβόλιο έναντι της νόσου δεν υπάρχει, οπότε κατά καιρούς έχουν προταθεί μέτρα για την αποφυγή προσβολής από *L. monocytogenes* τροφιμογενούς προέλευσης. Παραδείγματα τέτοιων μέτρων, όπως αυτά που έχουν προταθεί από τα CDC στις Η.Π.Α. (Broome, 1993· CDC, 2011), παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3.** Διατροφικές συστάσεις για την αποφυγή πρόκλησης τροφιμογενούς λιστερίωσης<sup>α</sup>.

---

Για το γενικό πληθυσμό:

1. Καλό πλύσιμο των λαχανικών, ιδιαίτερα εκείνων που προορίζονται να καταναλωθούν ωμά σε σαλάτες και γενικά καλό πλύσιμο όλων των τροφίμων πριν μαγειρευτούν.
  2. Ενδεδειγμένο μαγείρεμα όλων των νωπών προϊόντων ζωικής προέλευσης (π.χ. βόειο, χοίρειο κρέας και κρέας πουλερικών).
  3. Διατήρηση των ωμών τροφίμων (λαχανικά, τυριά, κρέατα κ.λπ.) καλά καλυμμένων και διαχωρισμένων από μαγειρεμένα φαγητά και έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα.
-

**Πίνακας 3.** (συνέχεια)

- 
4. Αποφυγή κατανάλωσης απαστερίωτου γάλακτος ή τροφίμων παρασκευασμένων από απαστερίωτο γάλα.
  5. Λήψη μέτρων υγιεινής στην κουζίνα, που μεταξύ άλλων θα περιλαμβάνουν το καλό πλύσιμο χεριών, εργαλείων (π.χ. μαχαιριών) και σκευών (π.χ. επιφάνειες κοπής) που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον χειρισμό ωμών τροφίμων.

Για τις ομάδες ειδικού κινδύνου<sup>β</sup>:

1. Αποφυγή κατανάλωσης μαλακών τυριών (π.χ. Φέτα, Brie, Camembert, τυριά μεξικάνικου τύπου) καθώς και μπλε τυριών· δεν υπάρχει λόγος αποφυγής των σκληρών τυριών, των κρεμοδών τυριών ή της γιαούρτης.
2. Τα υπολείμματα τροφίμων ή τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα θα πρέπει να αναθερμαίνονται ικανοποιητικά προτού καταναλωθούν.
3. Η αποφυγή προϊόντων που προέρχονται από πάγκους αλλαντικών θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη<sup>γ</sup>.

---

<sup>α</sup> Πηγή: προσαρμογή από Lorber, 2007.

<sup>β</sup> Ανοσοκατεσταλμένοι λόγω ασθένειας ή φαρμακευτικής αγωγής, έγκυες και ηλικιωμένοι.

<sup>γ</sup> Ο κίνδυνος (risk) λιστερίωσης λόγω κατανάλωσης προϊόντων από πάγκους αλλαντικών μπορεί να είναι σχετικά μικρός, ωστόσο οι έγκυες και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα καλό είναι να αποφεύγουν την κατανάλωση τέτοιων προϊόντων ή να προχωρούν στην αναθέρμανσή τους προτού τα καταναλώσουν.



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

# 2

## ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

### ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ *Listeria monocytogenes*

#### 2.1. Απαρίθμηση μικροοργανισμών

##### 2.1.1. Θρεπτικά υποστρώματα αύξησης μικροοργανισμών

Για την απαρίθμηση (enumeration) συγκεκριμένων μικροβιακών πληθυσμών και ομάδων μικροοργανισμών έγινε χρήση των στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων του Παραρτήματος I. Για κάθε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που περιγράφηκε χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο επαναλήψεις (τρυβλία) τριών διαδοχικών αραιώσεων. Η στερεοποίηση του θρεπτικού υλικού στα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν για την επιφανειακή επίστρωση (spread plates) ποσότητας ενοφθαλμίματος από το κάθε δείγμα, γινόταν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (laminar flow cabinet). Η σύσταση των χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υποστρωμάτων παρουσιάζεται επίσης στο Παράρτημα I. Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της αντίστοιχης προμηθεύτριας εταιρείας, με προσθήκη απιονισμένου νερού και ακόλουθη θερμική μεταχείριση (αποστείρωση ή βρασμός) του υλικού. Στις περιπτώσεις υποστρωμάτων που προέκυψαν από συνδυασμό επιμέρους βασικών συστατικών, για τις αναλογίες ανάμιξης των συστατικών και τον τρόπο παρασκευής των υποστρωμάτων αναζητήθηκαν στη βιβλιογραφία οι κατάλληλες πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση και τη μέθοδο παρασκευής του κάθε υποστρώματος. Εξάλλου, για θρεπτικά υποστρώματα των οποίων η επιλεκτικότητα (selectivity) βασίζεται στη χρήση

αντιβιοτικών ουσιών, η προσθήκη τους γινόταν, με βάση τις αναγραφόμενες οδηγίες στην ετικέτα του φιαλιδίου, μετά την αποστείρωση (121°C, 15 min) και την ακόλουθη ψύξη του υλικού σε θερμοκρασία *ca.* 50°C. Μετά την παρασκευή τους, τα χρησιμοποιούμενα υδατικά διαλύματα και όλα τα θρεπτικά υποστρώματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκιερό μέρος ή σε θερμοκρασία 4°C για μέγιστη περίοδο συντήρησης, όπως συνιστάται από τις προμηθεύτριες εταιρείες. Όσον αφορά στα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ενσωμάτωση ποσότητας ενοφθαλμίσματος από το κάθε δείγμα, η παρασκευή τους γινόταν ακριβώς πριν τη διεξαγωγή της απαιτούμενης δειγματοληψίας, οπότε ακολούθως τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο, ώστε η θερμοκρασία τους να σταθεροποιηθεί στους 45°C προτού χρησιμοποιηθούν.

#### *2.1.2. Έλεγχος επιλεκτικότητας στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων*

Όλα τα τρυβλία εξετάστηκαν οπτικά για την παρουσία χαρακτηριστικών αποικιών του προς ανίχνευση κάθε φορά μικροοργανισμού, ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα αύξησής του. Επίσης, ελέγχθηκε περιοδικά και η επιλεκτικότητα των θρεπτικών υποστρωμάτων κατά Harrigan (1998), με τη διεξαγωγή δοκιμών άμεσης απόκρισης (π.χ. χρώση κατά Gram και μικροσκοπική εξέταση, δοκιμή καταλάσης) σε ποσοστό *ca.* 10% του συνόλου των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με 30 έως 300 αποικίες.

#### *2.1.3. Υπολογισμός μικροβιακών πληθυσμών*

Για τον υπολογισμό των μικροβιακών πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των αριθμήσεων των δύο επαναλήψεων, επιλέγοντας την περισσότερο στατιστικά αξιόπιστη εκ των τριών αραιώσεων. Αυτή προέκυπτε λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των αποικιών σε κάθε τρυβλίο της αραιώσεως, ο οποίος έπρεπε να κυμαίνεται μεταξύ

30 έως 300 αποικίες. Όταν υπήρχαν δύο αραιώσεις με αριθμήσιμους μικροβιακούς πληθυσμούς, ο υπολογισμός βασιζόταν στην αραιώση με το μεγαλύτερο αριθμό αποικιών. Στην περίπτωση εμφάνισης μεγάλου αριθμού αποικιών στα τρυβλία η απαρίθμηση λάμβανε χώρα μετά από διαίρεση του τρυβλίου σε επαρκή αριθμό τομέων, ικανών να προσεγγίσουν κατά το πλησιέστερο δυνατό το ακριβές πλήθος των αποικιών. Ο μέσος όρος των αριθμήσεων πολλαπλασιαζόταν κάθε φορά με την κατάλληλη αραιώση και τον όγκο του ενοφθαλμίματος από το κάθε δείγμα και έτσι προέκυπτε ο μικροβιακός πληθυσμός ανά γραμμάριο (cfu/g) εξεταζόμενου προϊόντος.

## 2.2. Ταυτοποίηση του *Listeria monocytogenes*

Η επιβεβαίωση της παρουσίας του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στα δείγματα κρέατος που εξετάστηκαν πραγματοποιήθηκε με τη διεξαγωγή βιοχημικών δοκιμών και μοριακής μεθόδου ταυτοποίησης του παθογόνου.

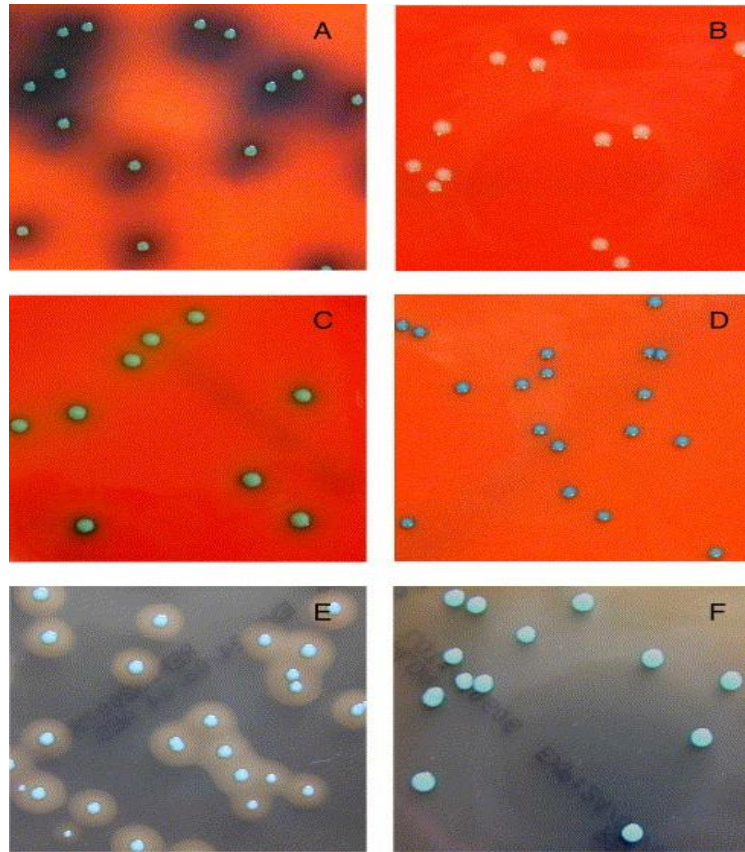
### 2.2.1. Απομόνωση χαρακτηριστικών αποικιών του μικροοργανισμού

Από κάθε ύποπτο ως προς την παρουσία του *L. monocytogenes* δείγμα, απομονώθηκαν χαρακτηριστικές μεμονωμένες αποικίες του μικροοργανισμού από τα χρησιμοποιούμενα επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα αύξησής του (Εικόνα 1).

Η αρχή της μεθόδου ανίχνευσης για τα κοινά επιλεκτικά υποστρώματα, όπως είναι το PALCAM, βασίζεται στην ικανότητα υδρόλυσης της αισκουλίνης από το σύνολο των ειδών *Listeria*, καθιστώντας δύσκολο τον διαχωρισμό του παθογόνου *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα *Listeria* spp. λόγω των παρόμοιων μορφολογικών χαρακτήρων που παρουσιάζουν οι αποικίες σε αυτά τα υποστρώματα. Από την άλλη μεριά τα χρωμογόνα υποστρώματα, όπως είναι τα ALOA και RAPID'L.mono, επιτρέπουν τη διάκριση του *L. monocytogenes*, αξιοποιώντας τις χρωματικές αλλαγές



που προκαλούνται τόσο στο θρεπτικό υλικό όσο και στις σχηματιζόμενες αποικίες, από τη συμμετοχή συστατικών των υποστρώματων σε αντιδράσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα εξαιτίας του βακτηριακού μεταβολισμού.



**Εικόνα 1:** Μορφολογικοί χαρακτήρες αποικιών *Listeria* spp. σε επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα: A) *Listeria* sp. (PALCAM), B) *L. innocua* (RAPID'L.mono), C) *L. monocytogenes* (RAPID'L.mono), D) *L. ivanovii* (RAPID'L.mono), E) *L. monocytogenes* (ALOA), F) *L. innocua* (ALOA) (πηγή: Becker και συν., 2006)

Ο διαχωρισμός των *Listeria* spp. χρησιμοποιώντας το άγαρ ALOA (Ottaviani, Ottaviani, & Agosti, 1997) βασίζεται στην ενεργότητα του ενζύμου β-γλυκοζιδάση που διαθέτουν τα βακτήρια. Το συγκεκριμένο ένζυμο διασπά ένα χρωμογόνο συστατικό που περιέχεται στο υπόστρωμα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός γαλαζοπράσινου χρωματισμού για τις αποικίες. Υπάρχουν και άλλοι μικροοργανισμοί

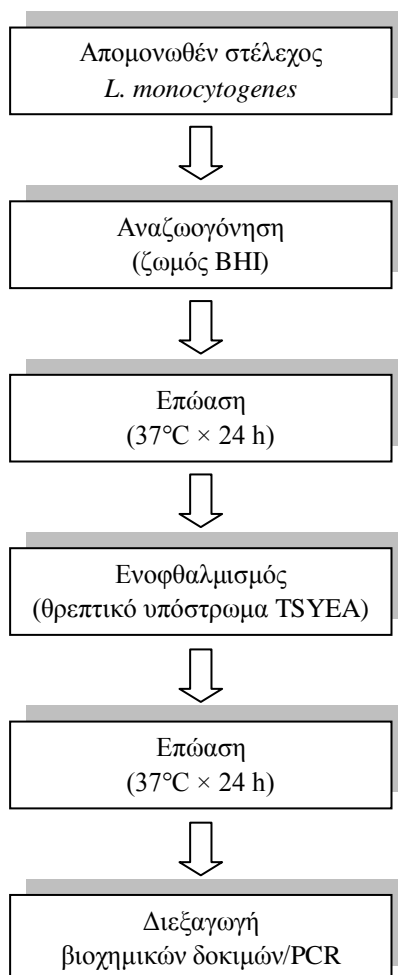
που διαθέτουν β-γλυκοζιδάση, όπως οι εντερόκοκκοι, όμως οι επιλεκτικοί παράγοντες του θρεπτικού υλικού παρεμποδίζουν την αύξησή τους. Επιπλέον, η παρουσία λεκιθίνης στο υπόστρωμα συνεισφέρει στη διάκριση των *L. monocytogenes* και *L. ivanovii* μέσω της δημιουργίας μίας άλω (halo) γύρω από την αποικία (Εικόνα 1), η οποία προκύπτει ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης της λεκιθίνης από τη φωσφολιπάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (παρ. 1.2.2.). Μόνον τα προηγούμενα δύο παθογόνα είδη μεταξύ των *Listeria* παράγουν το συγκεκριμένο ένζυμο, δεδομένης δε της μη συχνής συχνότητας εμφάνισης του *L. ivanovii* στα τρόφιμα, σε κάθε περίπτωση εμφάνισης στο ALOA χαρακτηριστικής γαλαζοπράσινης αποικίας με άλω κρίνεται σκόπιμη η θεώρηση της αποικίας ως *L. monocytogenes* (Hitchins & Jinnerman, 2011). Οι αποικίες των προαναφερόμενων ειδών εμφανίζονται επίσης γαλαζοπράσινες και στο RAPID'L.mono, εξαιτίας της ενζυμικής δράσης της ειδικής φωσφολιπάσης, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα είδη *Listeria* τα οποία εμφανίζονται ως λευκές αποικίες (Εικόνα 1). Ο διαχωρισμός μεταξύ *L. ivanovii* και *L. monocytogenes* στο RAPID'L.mono προκύπτει μέσω της ικανότητας ζύμωσης ή μη της ξυλόζης (παρ. 2.2.3.6.) και τη δημιουργία ή απουσία αντίστοιχα κίτρινης άλω γύρω από την αποικία.

Στόχος ήταν η απομόνωση τουλάχιστον πέντε χαρακτηριστικών αποικιών του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* από κάθε χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα. Στην περίπτωση που ο αριθμός των αποικιών και των δύο επαναλήψεων του ίδιου υποστρώματος ήταν μικρότερος του πέντε, απομονώνονταν όλες οι αποικίες από τα τρυβλία. Οι αποικίες αυτές απομονώθηκαν τυχαία από τη μικρότερη αριθμήσιμη αραιώση ή/και από την επιφάνεια των ενοφθαλμισμένων με βακτηριολογικό κρίκο (streaking) θρεπτικών υποστρωμάτων, κατά τη διαδικασία ανίχνευσης του παθογόνου. Ύστερα από έλεγχο της καθαρότητάς τους με ανακαλλιέργεια (subculturing) σε άγαρ τρυπτικάσης και σόγιας με 0,6% κ.ό. (w/v) εκχύλισμα ζύμης

(tryptic soy yeast extract agar, TSYEA), οι απομονώσεις (isolates) κωδικοποιούνται και διατηρούνται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  σε ζωμό (broth) έγχυσης καρδιακού ιστού (brain heart infusion, BHI) που περιείχε 20% γλυκερόλη.

### 2.2.2. Προκαταρκτική διαδικασία

Για τη διεξαγωγή των βιοχημικών δοκιμών και της μοριακής μεθόδου ταυτοποίησης του *L. monocytogenes*, αρχικά ακολουθήθηκε η προκαταρκτική διαδικασία του Σχήματος 3.



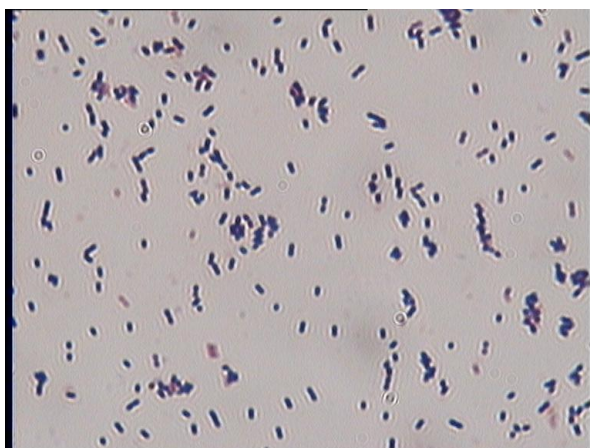
**Σχήμα 3.** Διαδικασία για τη διεξαγωγή βιοχημικών δοκιμών και μοριακής μεθόδου (PCR) επιβεβαίωσης της παρουσίας του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε προϊόντα με βάση το κρέας.

Μετά την αναζωογόνηση (resuscitation) των στελεχών του μικροοργανισμού και τον ενοφθαλμισμό καθενός ξεχωριστά με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου σε TSYEA, τα τρυβλία επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37°C για 24 h. Για τη διεξαγωγή των απαιτούμενων βιοχημικών δοκιμών και της μοριακής μεθόδου ταυτοποίησης του μικροοργανισμού επιλέχθηκαν κυκλικές, διαφανείς και λείες αποικίες του, οι οποίες εμφάνιζαν χαρακτηριστικό κυανοπράσινο χρώμα στις ακτίνες πλάγιας προσπτώσεως του φωτός (Gray, 1957· Henry, 1933).

### 2.2.3. Βιοχημικές δοκιμές

#### 2.2.3.1. Χρώση κατά Gram

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι ένας θετικός κατά Gram βάκιλος, οπότε μετά την ομώνυμη διαδικασία χρώσης (Gram stain or staining, Παράρτημα II) (Hucker, 1921) και τη μικροσκοπική εξέταση κυττάρων του συγκεκριμένου βακτηρίου, παρατηρήθηκαν μπλε-ιώδη μεμονωμένα κύτταρα ή αλυσίδες κυττάρων μικρού μήκους (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2.** Χρώση κατά Gram κυττάρων *Listeria monocytogenes*.

## 2.2.3.2. Δοκιμή κινητικότητας

Ο έλεγχος κινητικότητας (motility) περιλαμβάνει είτε την απευθείας μικροσκοπική παρατήρηση του μικροβίου σε σταγόνα ζωμού TSYE (tryptic soy yeast extract broth, TSYEB) βακτηριακής καλλιέργειάς του, είτε την εμφάνιση χαρακτηριστικής αύξησης σε ημίρευστο θρεπτικό μέσο. Καθώς τα περισσότερα στελέχη *Listeria* δεν παρουσιάζουν ικανότητα κίνησης σε θερμοκρασίες άνω των 25°C, οι δοκιμές κινητικότητας θα πρέπει να διεξάγονται σε σταθερή θερμοκρασία δωματίου.

Όπως αναφέρθηκε και στη γενική εισαγωγή (παρ. 1.1.3.1.), ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, όπως άλλωστε και όλα τα είδη *Listeria*, παρουσιάζει χαρακτηριστική κινητικότητα σε TSYEB που επωάζεται σε θερμοκρασία μικρότερη των 25°C για τουλάχιστον 18 h, η οποία συνίσταται στη γρήγορη και στροβιλώδη κίνησή του με ακαθόριστες περιστροφές προς όλες τις κατευθύνσεις. Καλλιέργειες του μικροοργανισμού διάρκειας πολλών ημερών εμφανίζουν μικρότερη κινητικότητα σε σχέση με πρόσφατες καλλιέργειες διάρκειας λίγων ημερών (Prentice & Neaves, 1992).

Μέτα τον ενοφθαλμισμό με νύξη ημιστερεού θρεπτικού υλικού σε δοκιμαστικό σωλήνα και κατάλληλη επώαση (25°C, 48 h), ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* εμφανίζει χαρακτηριστική αύξηση μορφής ‘ομπρέλας’ ή ‘ανεστραμμένου έλατου’ (Εικόνα 3). Το γεγονός αυτό οφείλεται στην κινητικότητα και στην προτίμηση που παρουσιάζει το παθογόνο σε μικροαερόφιλες συνθήκες, με αποτέλεσμα η μέγιστη αύξηση και κατά συνέπεια το μέγιστο θόλωμα να εμφανίζεται σε ορισμένη απόσταση από το σημείο νύξης και περίπου 0,5-1 cm από την επιφάνεια του υλικού (Prentice & Neaves, 1992· Rocourt & Buchrieser, 2007). Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε τελικά ως η καταλληλότερη για τον έλεγχο κινητικότητας των απομονωθέντων στελεχών *L. monocytogenes* από τα δείγματα νωπού κρέατος.



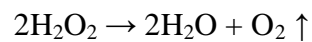
(α)

(β)

**Εικόνα 3.** Έλεγχος κινητικότητας με νύξη ημιστερεού θρεπτικού υλικού: α) παρουσία κινητικότητας (θετική αντίδραση) και β) απουσία κινητικότητας (αρνητική αντίδραση).

#### 2.2.3.3. Δοκιμή καταλάσης

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) το οποίο παράγεται κατά την αερόβια αναπνοή των οργανισμών, περιέχει την υπεροξειδική ελεύθερη ρίζα οξυγόνου ( $O_2^- \cdot$ ), η οποία με τη σειρά της είναι πολύ τοξική για τα κυτταρικά συστατικά. Για τον λόγο αυτό οι μικροοργανισμοί που αυξάνουν παρουσία οξυγόνου συνθέτουν το ένζυμο καταλάση που το εξουδετερώνει. Η αντίδραση που καταλύεται παρουσία του ενζύμου είναι η εξής:



Στην περίπτωση του *L. monocytogenes*, η δράση της καταλάσης ήταν εύκολο να ανιχνευθεί με την παρουσία φυσαλίδων οξυγόνου που απελευθερώνονταν όταν μια σταγόνα 3% κ.ό (v/v) υπεροξειδίου του υδρογόνου προσθέτονταν σε μια βακτηριακή αποικία του μικροοργανισμού.

#### 2.2.3.4. Δοκιμή οξειδάσης

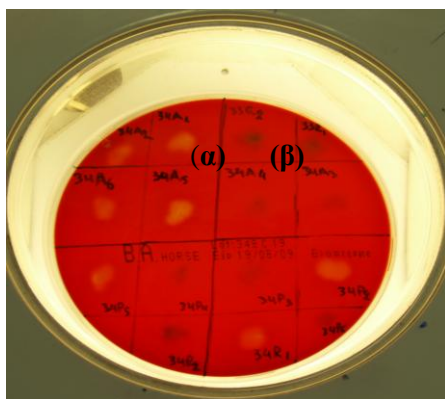
Η δοκιμή αυτή βασίζεται στην απουσία συγκεκριμένων οξειδασών στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*. Στα βακτήρια τα ένζυμα αυτά καταλύουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ενός δότη και ενός δέκτη ηλεκτρονίων, με το ρόλο του πρώτου να τον αναλαμβάνει μια αναγωγική χρωστική η οποία στην περίπτωση παρουσίας του ενζύμου λαμβάνει μαύρο ή βαθύ ιώδες χρώμα. Εντούτοις, η μεταφορά αποικίας *L. monocytogenes* σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με διάλυμα 1% κ.ό (w/v) τετραμεθυλ-p-φαινυλεν-διαμινοδιυδροχλωριδίου (tetramethyl-p-phenylene-diamine dihydrochloride) δεν προκαλεί αλλαγή χρώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι για την αποφυγή αυτό-οξειδωσης του προαναφερόμενου διαλύματος, προστέθηκε σε αυτό 0,1% κ.ό (w/v) ασκορβικό οξύ, ενώ το διάλυμα διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 4°C αποφεύγοντας την απευθείας έκθεσή του στο φως.

#### 2.2.3.5. Αιμόλυση

Η αιμόλυση αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό ταξινόμησης ενός στελέχους *Listeria* σε επίπεδο είδους (Πίνακας 4). Όπως προηγούμενα περιγράφηκε (παρ. 1.2.2.), η λοιμογόνος δύναμη (virulence) του *L. monocytogenes* οφείλεται στην παραγωγή LLO. Η αιμολυσίνη αυτή είναι υπεύθυνη για την πλήρη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων του αίματος (β-αιμόλυση). Τρία είδη -*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* και *L. seeligeri*- είναι αιμολυτικά και άρα διαθέτουν την ικανότητα παραγωγής LLO (Gouin, Mengaud, & Cossart, 1994). Από αυτά όμως μόνον τα δύο, *L. monocytogenes* και *L. ivanovii*, είναι παθογόνα του ανθρώπου και των ζώων. Επομένως, από μόνη της η εμφάνιση αιμολυτικής ικανότητας δεν είναι αρκετή για τη διαπίστωση της παθογονικότητας ενός στελέχους, αν και ελάχιστες μη αιμολυτικές απομονώσεις *L. monocytogenes* έχουν παρατηρηθεί.

Η παρουσία β-αιμόλυσης συνίσταται στην εμφάνιση κίτρινης και διαφανούς περιοχής σε ενοφθαλμισμένο αιματούχο άγαρ. Το θρεπτικό υπόστρωμα ενοφθαλμίζεται με το ύποπτο στέλεχος, επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 18-24 h και κατόπιν εξετάζεται για την εμφάνιση χαρακτηριστικών περιοχών β-αιμόλυσης σε σύγκριση με γνωστό θετικό και αρνητικό μάρτυρα, οι οποίοι προκύπτουν από τον ενοφθαλμισμό με στελέχη αναφοράς *L. monocytogenes* και *L. innocua* αντίστοιχα. Ο ενοφθαλμισμός γίνεται είτε επιφανειακά με βακτηριολογικό κρίκο, είτε με νύξη του υποστρώματος και εναπόθεση της βακτηριακής αποικίας. Στη δεύτερη περίπτωση λοιπόν, το ίδιο τρυβλίο αιματούχου άγαρ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ενοφθαλμισμό περισσότερων της μίας ύποπτων αποικιών, συνήθως υπό μορφή πλέγματος (Εικόνα 4). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό και με τη δεδομένη ευαισθησία της LLO παρουσία οξυγόνου, συνέβαλαν στην επιλογή της συγκεκριμένης μεθόδου ως καταλληλότερης για τη διαπίστωση της αιμολυτικής ικανότητας στελεχών *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από ύποπτα ως προς την παρουσία του μικροοργανισμού δείγματα νωπού κρέατος, εξαιτίας της ευκρινέστερης β-αιμόλυσης σε σχέση με την έτερη μέθοδο που αναφέρθηκε. Αξίζει τέλος να σημειωθεί, ότι συγκριτικά προτιμήθηκε το αιματούχο άγαρ από αίμα αλόγου έναντι του αντίστοιχου άγαρ από αίμα προβάτου, διότι επιτρέπει εντονότερη β-αιμόλυση. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα τρυβλία αιματούχου άγαρ από αίμα αλόγου ευρισκόμενα σε συσκευασία των 10 τεμαχίων.





**Εικόνα 4.** Αιμολυτική ικανότητα ύποπτων στελεχών *Listeria monocytogenes* σε έτοιμο τρυβλίο αιματούχου άγαρ από αίμα αλόγου: α) παρουσία β-αιμόλυσης (θετική αντίδραση) και β) απουσία β-αιμόλυσης (αρνητική αντίδραση).

#### 2.2.3.6. Ζύμωση σακχάρων

Όλα τα είδη *Listeria* ζυμώνουν συγκεκριμένα σάκχαρα παράγοντας διάφορα οξέα, μεταξύ άλλων γαλακτικό και οξικό οξύ. Οι δοκιμές παραγωγής οξέως από σάκχαρα γίνονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 9 ml ζωμού, παρουσία του δείκτη κυανού της βρωμοκρεζόλης (Παράρτημα Ι). Στον ζωμό προσθέτονταν κάθε φορά υπό ασηπτικές συνθήκες 1 ml φιλτραρισμένου διαλύματος σακχάρου L-ραμνόζης, D-ξυλόζης, D-μαννιτόλης και α-μεθυλ-D-μαννοπυρανοζιδίου ( $\alpha$ -methyl-D-mannopyranoside) συγκέντρωσης 10%, 10%, 10% και 5% κ.ό (w/v), αντίστοιχα. Ακολουθούσε ο ενοφθαλμισμός του κάθε ζωμού σακχάρου με τα προς εξέταση στελέχη. Επίσης, συμπεριλήφθηκαν θετικοί μάρτυρες, ενοφθαλμίζοντας τους ζωμούς σακχάρων με γνωστό στέλεχος αναφοράς *L. monocytogenes* και αρνητικοί μάρτυρες, αφήνοντας ζωμούς σακχάρων χωρίς ενοφθάλμιση. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37°C για 48 h και εξετάστηκαν για χρωματική αλλαγή από βαθύ ιώδες σε κίτρινο χρώμα, ώστε να διαπιστωθεί η παραγωγή οξέως (Εικόνα 5). Ειδικότερα για το α-μεθυλ-D-μαννοπυρανοζίδιο, μετά την παρέλευση 48 h και την πρώτη εξέταση

των αποτελεσμάτων, οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάστηκαν περαιτέρω έως τις 7 ημέρες οπότε και καταγράφηκε το τελικό αποτέλεσμα της εξέτασης. Σε κάθε περίπτωση οι δοκιμαστικοί σωλήνες που χαρακτηρίστηκαν αρνητικοί ως προς την παραγωγή οξέως, ελέγχθηκαν ως προς το θόλωμα που παρουσίαζαν, ώστε να διαπιστωθεί η μικροβιακή αύξηση χωρίς την παραγωγή οξέως. Φαινοτυπικά όλα τα *Listeria* spp. είναι παρόμοια, εντούτοις μπορούν να διαχωριστούν συνδυάζοντας τα αποτελέσματα αιμόλυσης και ζύμωσης των τεσσάρων σακχάρων που προαναφέρθηκαν (Πίνακας 4).

**Πίνακας 4.** Βιοχημικός διαχωρισμός ειδών *Listeria*<sup>α</sup>.

Είδος	Παραγωγή οξέως από				
	β-αιμόλυση	L-ραμνόζη	D-ξυλόζη	D-μαννιτόλη	α-μέθυλ-D-μαννοζίδιο
<i>L. monocytogenes</i>	+ <sup>β</sup>	+	-	-	+
<i>L. innocua</i>	- <sup>γ</sup>	V <sup>στ</sup>	-	-	+
<i>L. ivanovii</i>	++ <sup>δ</sup>	-	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	(+) <sup>ε</sup>	-	+	-	V
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	+
<i>L. grayi</i>	-	-	-	+	+
<i>L. murrayi</i>	-	V	-	+	+

<sup>α</sup> προσαρμογή από Prentice & Neaves, 1992.

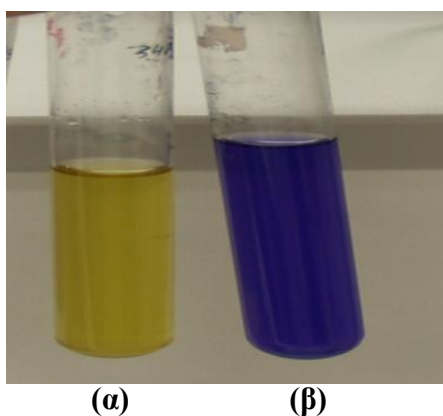
<sup>β</sup> +: θετική αντίδραση.

<sup>γ</sup> -: αρνητική αντίδραση.

<sup>δ</sup> ++: έντονη θετική αντίδραση.

<sup>ε</sup> (+): ασθενής αντίδραση.

<sup>στ</sup> V: μεταβλητή (variable) αντίδραση εξαρτώμενη από το στέλεχος.



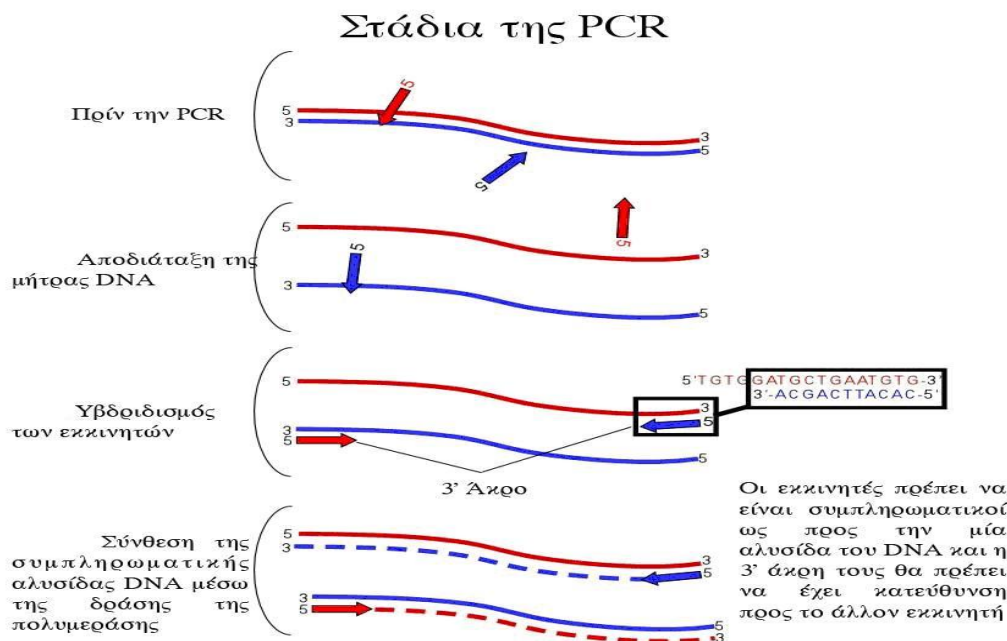
**Εικόνα 5.** Ζύμωση σακχάρων από στέλεχος *Listeria* sp.: α) ικανότητα ζύμωσης σακχάρου (θετική αντίδραση) και β) αδυναμία ζύμωσης σακχάρου (αρνητική αντίδραση).

#### 2.2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή ή αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι μια τεχνική της μοριακής βιολογίας η οποία χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό ενός ή περισσοτέρων αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA (γονίδιο) μέχρι και ένα δισεκατομμύριο φορές, δίνοντας με αυτό τον τρόπο αυξημένες ποσότητες συγκεκριμένων γονιδίων και κατά συνέπεια επαρκές DNA για τον έλεγχό του. Η τεχνική αυτή βρίσκει εφαρμογή, εκτός των άλλων, και στην ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, όπως του *L. monocytogenes*. Η PCR προσφέρει μεγάλη ευαισθησία, αξιοπιστία και ταχύτητα κατά την επιβεβαίωση της παρουσίας του παθογόνου στο δείγμα.

Η τεχνική PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών απλών αντιδράσεων, οι οποίες διαφέρουν στη θερμοκρασία και στο χρόνο (Mullis, Ferré, & Gibbs, 1994). Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια (Σχήμα 4):

1. αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
2. υβριδισμός των εκκινητών (primers) με την αλληλουχία-στόχο (primer annealing)
3. σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης (primer extension).



**Σχήμα 4.** Σχεδιαγραμματική απεικόνιση των επαναλαμβανόμενων σταδίων της PCR.

Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA του μικροοργανισμού που έχει απομονωθεί από το δείγμα (Παράρτημα III), αυξάνοντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης συνήθως μεταξύ 92°C και 96°C. Με αυτό τον τρόπο οι συμπληρωματικοί κλώνοι του DNA απομακρύνονται.

Στο δεύτερο βήμα με μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης (50°-65°C) επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές είναι συνθετικά oligονουκλεοτίδια, μήκους 18-30 βάσεων, τα οποία

συνδέονται με την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Οι εκκινητές αποτελούνται από διαφορετικές, μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους παρά μόνον με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA.

Στο τρίτο και τελευταίο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72°C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση που επιτρέπει τη σύνθεση του DNA σε κατεύθυνση 5' προς 3'. Μεγάλη ώθηση στην τεχνική PCR έδωσε η ανακάλυψη του θερμοανθεκτικού ενζύμου πολυμεράσης του βακτηριδίου *Thermus aquaticus* (Taq polymerase). Η συγκεκριμένη πολυμεράση συνθέτει περίπου 2.000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό. Ο χρόνος που απαιτείται για την αντιγραφή του DNA-στόχου εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR.

Σε μια τυπική PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, συνήθως 30-40, καταλήγοντας στο σχηματισμό μερικών εκατομμυρίων έως και δισεκατομμυρίου, ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA.

Η αξιολόγηση του προϊόντος της PCR γίνεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (Ανδρίτσος, 2006) ή αγαρόζης (Παράρτημα III). Η πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται πιο συχνά στο διαχωρισμό τμημάτων DNA μήκους από λίγες εκατοντάδες έως και 20.000 ζεύγη βάσεων (base pairs, bp). Το DNA γίνεται ορατό με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide). Το πολυακρυλαμίδιο χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μικρότερων τμημάτων DNA, λιγότερων bp. Το μήκος του προϊόντος συγκρίνεται με το μήκος γνωστού μάρτυρα (DNA ladder) το οποίο ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα.

Πιο συγκεκριμένα, για τη διεξαγωγή της PCR για την επιβεβαίωση της παρουσίας του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στα δείγματα κρέατος που εξετάστηκαν, επιλέχθηκαν οι εκκινητές του γονιδίου του Πίνακα 5.

**Πίνακας 5.** Αλληλουχίες εκκινητών γονιδίου-στόχου και μέγεθος προϊόντος PCR για ταυτοποίηση του *Listeria monocytogenes*<sup>a</sup>.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος PCR
<i>prfa</i>	LIP 1	5'-GATACAGAAACATCGGTTGGC-3'	274 bp
	LIP 2	5'-GTGTAATCTTGATGCCATCAGG-3'	

<sup>a</sup> Πηγή: προσαρμογή από D'Agostino και συν., 2004.

Όλα τα γονίδια λοιμογόνου δύναμης στον *L. monocytogenes* βρίσκονται υπό τον έλεγχο της ενεργοποιού πρωτεΐνης *prfa* η οποία κωδικοποιείται από το ομώνυμο γονίδιο (Leimeister-Wächter, Haffner, Domann, Goebel, & Chakraborty, 1990· Vázquez-Boland και συν., 2001). Η πρωτεΐνη αυτή είναι μέλος της CAP/FnR οικογένειας των μεταγραφικών ρυθμιστών και η αλληλουχία της είναι χαρακτηριστική για το παθογόνο. Οι εκκινητές LIP 1 και LIP 2 κατευθύνονται με αντίθετη φορά, υβριδίζοντας πάνω στην ίδια αλυσίδα DNA την αλληλουχία εκείνη του γονιδίου *prfa* από το νουκλεοτίδιο 634 στο 654 και από το 886 στο 907, αντίστοιχα (Simon, Gray, & Cook, 1996). Επομένως, στην περίπτωση παρουσίας του *L. monocytogenes*, μετά τη διεξαγωγή της PCR θα ενισχυθεί η αλληλουχία DNA του συγκεκριμένου γονιδίου, μεγέθους 274 bp.

#### 2.2.4.1. Είδη PCR

Παραλλαγές της τεχνικής PCR, όπως οι παρακάτω, χρησιμοποιούνται για την επίτευξη περαιτέρω εξειδικευμένων στόχων, πλην της απλής επιβεβαίωσης της παρουσίας του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στο δείγμα.

##### 2.2.4.1.1. Πολλαπλή PCR (multiplex PCR)

Η πολλαπλή PCR αποτελεί μια τεχνική με την οποία 2-3 διαφορετικές αλληλουχίες του γονιδιώματος (DNA) μπορούν να πολλαπλασιαστούν ταυτόχρονα σε μια αντίδραση χρησιμοποιώντας διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών. Η πολλαπλή PCR χρησιμοποιείται ευρύτατα στην ανίχνευση διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών, όπως του *L. monocytogenes*, και ιδιαίτερα για τον προσδιορισμό ορότυπων του (Doumith, Buchrieser, Glaser, Jacquet, & Martin, 2004; Doumith και συν., 2005).

##### 2.2.4.1.2. PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

Η εφαρμογή της PCR αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription PCR, RT-PCR) έχει σκοπό τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης δεδομένου ότι επιτρέπει την ταχεία ανάλυση του αγγελιοφόρου RNA (messenger RNA, mRNA). Σε μια τυπική αντίδραση RT-PCR το RNA απομονώνεται από τα βακτηριακά κύτταρα και το mRNA του μικροοργανισμού μετατρέπεται στο συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase). Το ένζυμο αυτό απαιτεί δίκλωνο DNA για την παραγωγή cDNA. Αυτό εξασφαλίζεται από τον ειδικό για κάθε περίπτωση εκκινητή ο οποίος υβριδίζεται με το συμπληρωματικό κομμάτι του mRNA κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Το cDNA πολλαπλασιάζεται ακολούθως χρησιμοποιώντας DNA πολυμεράση και ειδικούς εκκινητές. Όπως σε όλες τις αντιδράσεις PCR έτσι και εδώ τα προϊόντα της PCR

γίνονται ορατά σε πηκτή αγαρόζης με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Η τεχνική αυτή πλεονεκτεί έναντι της απλής PCR εξαιτίας της αδυναμίας πολλαπλασιασμού DNA προερχόμενου από μη ζώντα κύτταρα του μικροοργανισμού. Συνέπεια αυτού του γεγονότος είναι η αποφυγή της καταγραφής ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Klein & Juneja, 1997).

#### 2.2.4.1.3. PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου ή ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real time PCR, Q-PCR/qPCR/qrt-PCR) είναι μια τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται ταυτόχρονος πολλαπλασιασμός και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένου τμήματος του DNA του μικροοργανισμού. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του φθορισμού που εκπέμπεται από ειδικά φθοριοχρώματα, ενώ η αρχική αύξηση της ποσότητας του προϊόντος της PCR ( $C_T$ -threshold cycle) συσχετίζεται με την αρχική ποσότητα DNA του μικροοργανισμού. Κατά τη διάρκεια της PCR πραγματικού χρόνου μετράται ο φθορισμός που εκπέμπεται από ιχνηθέτες που υβριδίζουν με το παραγόμενο προϊόν της αντίδρασης. Ο φθορισμός που παράγεται σε κάθε κύκλο είναι ανάλογος του πληθυσμού των παραγόμενων αλληλουχιών DNA (Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996· Rodríguez-Lázaro, Jofré, Aymerich, Hugas, Pla, 2004). Η PCR πραγματικού χρόνου μπορεί να συνδυαστεί με την RT-PCR και να δώσει την ακόμη μεγαλύτερων δυνατοτήτων ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου και αντίστροφης μεταγραφής (quantitative real time RT-PCR, qRT-PCR).



#### 2.2.4.1.4. Φωλιασμένη PCR (nested PCR)

Όταν η αναζητούμενη αλληλουχία DNA ή RNA βρίσκεται σε μικρό αριθμό αντιγράφων, η απλή τεχνική PCR μπορεί να αποδειχθεί ανεπαρκής για την ανίχνευσή της. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται η τεχνική της φωλιασμένης PCR (ή εναλλακτικά RT-PCR), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας (Αναστασιάδου & Καπράνος, 1998). Η φωλιασμένη PCR χρησιμοποιεί δύο διαδοχικές PCR. Η πρώτη PCR χρησιμοποιεί ένα εξωτερικό ζευγάρι εκκινητών (outer primers), ενώ η δεύτερη δύο εκκινητές οι οποίοι είναι εσωτερικοί στο πρώτο ζευγάρι (inner primers). Το προϊόν της πρώτης PCR χρησιμοποιείται ως δείγμα για τη δεύτερη. Το τελικό προϊόν από τη δεύτερη PCR είναι αποτέλεσμα 50 ή περισσότερων κύκλων πολλαπλασιασμού.

Η φωλιασμένη PCR μπορεί να είναι 1000 φορές πιο ευαίσθητη από την απλή PCR. Αυτό οφείλεται στην αποτελεσματικότερη αποδιάταξη των μικρών τμημάτων DNA που προστίθενται στη δεύτερη PCR από το προϊόν της πρώτης.

#### 2.2.4.1.5. PCR επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR)

Η PCR επαναλαμβανόμενων στοιχείων (repetitive element PCR) χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό πολλαπλών τμημάτων του DNA τα οποία βρίσκονται μεταξύ καλά διατηρημένων, επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών νουκλεοτιδίων, διασπαρμένων εντός του βακτηριακού χρωμοσώματος (Georghiou και συν., 1994). Έχουν αναγνωριστεί τρεις οικογένειες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών νουκλεοτιδίων και οι αντίστοιχες τεχνικές, στις οποίες περιλαμβάνονται μια παλινδρομική εξωγονιδιακή αλληλουχία (repetitive extragenic palindrome PCR, REP-PCR), μια ενδογονιδιακή αλληλουχία (enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC-PCR) (Jeršek και συν., 1999) και η αλληλουχία BOX (BOX-PCR).

Από την επιλεκτική ενίσχυση των περιοχών που βρίσκονται μεταξύ των στοιχείων REP, ERIC και BOX, ενισχύονται τμήματα DNA, τα οποία όταν ηλεκτροφορηθούν σε πηκτή αгарόζης και διαχωριστούν, δίνουν διαφορετικούς πολυμορφισμούς μεταξύ των διαφορετικών εξεταζόμενων μικροβιακών στελεχών.

#### 2.2.4.1.6. Τυχαία ενίσχυση του πολυμορφικού DNA (RAPD)

Η τυχαία ενίσχυση του πολυμορφικού DNA (random amplification of polymorphic DNA, RAPD) είναι ένα είδος PCR όπου τα τμήματα του DNA που πολλαπλασιάζονται είναι τυχαία. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται αυθαίρετοι εκκινητές, μικρού μήκους (8-12 βάσεων), για την τυχαία ενίσχυση του DNA του μικροοργανισμού. Το αποτέλεσμα της RAPD μπορεί να οδηγήσει στον προσδιορισμό με μεγάλη ακρίβεια της ποικιλομορφίας μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου μικροοργανισμού (Cocolin και συν., 2005· Farber & Addison, 1994).

#### 2.2.4.1.7. Πολυμορφισμός ενισχυμένου μήκους θραύσματος (AFLP)

Ο πολυμορφισμός ενισχυμένου μήκους θραύσματος (amplified fragment length polymorphism, AFLP) βασίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τμημάτων γονιδιωματικού DNA (θραύσματα) τα οποία έχουν προκύψει μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Στα τμήματα αυτά του DNA προσδένονται ολιγονουκλεοτιδικοί προσαρμογείς, συμπληρωματικοί στις αλληλουχίες βάσεων των σημείων αποκοπής. Μετά την πρόσδεση, τα τμήματα του DNA πολλαπλασιάζονται μέσω δύο κύκλων PCR με εκκινητές συμπληρωματικούς των προσαρμογέων.

Με την τεχνική αυτή είναι δυνατή η ταυτοποίηση και ο ευκρινής διαχωρισμός σχετιζόμενων γενετικά βακτηριακών απομονώσεων, όπως του *L. monocytogenes* (Parisi και συν., 2010). Επιπλέον, πρόκειται για μια εξαιρετικά επαναλήψιμη τεχνική

με καλή διακριτική ικανότητα, η οποία συγκριτικά με άλλες τεχνικές (ορολογική τυποποίηση, RAPD, PFGE, PCR με ανάλυση περιοριστικών ενζύμων) προσφέρει καλύτερα αποτελέσματα κατά τον γενετικό προσδιορισμό του *L. monocytogenes* (Keto-Timonen, Autio, & Korkeala, 2003· Vogel, Fusing, Ojeniyi, Gram, & Ahrens, 2004).

#### 2.2.4.1.8. Ανάλυση μεταβλητού αριθμού δίδυμων επαναλήψεων πολλαπλών περιοχών (MLVA)

Η ανάλυση μεταβλητού αριθμού δίδυμων επαναλήψεων πολλαπλών περιοχών (multilocus variable number of tandem repeat analysis, MLVA) έχει ως στόχο περιοχές του γονιδιώματος του μελετώμενου μικροοργανισμού οι οποίες παρουσιάζουν διαφορές ως προς το μήκος τους. Η ανάλυση των γενετικών παραλλαγών συνήθως περιλαμβάνει τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των προϊόντων της PCR και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό απομονώσεων του *L. monocytogenes* (Murphy και συν., 2007).

#### 2.2.4.1.9. PCR και ηλεκτροφόρηση πηκτής με βαθμίδωση αποδιατακτικού παράγοντα (PCR-DGGE)

Η PCR μαζί με ηλεκτροφόρηση πηκτής με βαθμίδωση αποδιατακτικού παράγοντα (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) αποτελούν μια τεχνική (PCR-DGGE) η οποία μπορεί να ανιχνεύσει διαφορές στο γονιδίωμα μικροοργανισμών. Οι διαφορές αυτές ανιχνεύονται σε ειδική ηλεκτροφόρηση του DNA που πραγματοποιείται σε σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση αποδιατακτικής ουσίας, μέσω διαφορών στην παρατηρούμενη κινητικότητα του DNA σε σχέση με γνωστό DNA του μικροοργανισμού μάρτυρα. Ειδικότερα, στην περίπτωση του *L.*

*monocytogenes* η τεχνική περιλαμβάνει πρώτα την ενίσχυση του γονιδίου *iap* μέσω PCR και ακολουθεί η ειδική ηλεκτροφόρηση (DGGE) (Cocolin, Rantsiou, Cantoni, & Comi, 2002).



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

# 3

## ΕΡΕΥΝΑ ΠΕΔΙΟΥ ΣΕ ΝΩΠΟ ΧΟΙΡΕΙΟ ΚΙΜΑ\*

### 3.1. Εισαγωγή

Η θεώρηση της μικροβιακής οικολογίας των τροφίμων και η συνεισφορά της στην ανάπτυξη κατάλληλων μεθοδολογιών και στρατηγικών παρέμβασης για την αύξηση του χρόνου ζωής και την ενίσχυση της ασφάλειας των τροφίμων, υπήρξε αντικείμενο πολυάριθμων μελετών (Leistner & Gorris, 1995· Mossel & Struijk, 1992· Nychas, Skandamis, Tassou, & Koutsoumanis, 2008). Η μικροβιακή οικολογία του κρέατος και των προϊόντων του, όπως άλλωστε και όλων των τροφίμων, χαρακτηρίζεται από την καθιερωμένη συσχέτιση μεταξύ των διαφορετικών μικροβιακών πληθυσμών που ανευρίσκονται στο τρόφιμο. Οι πληθυσμοί αυτοί μπορεί να αποτελούν τμήμα της φυσικά απαντώμενης χλωρίδας του προϊόντος ή/και να προκύπτουν ως αποτέλεσμα της μίανσής του. Η μίανση του κρέατος και των προϊόντων του με μικροοργανισμούς καταλήγει είτε στην αλλοίωση των προϊόντων ζωικής προέλευσης είτε/και στην εκδήλωση σοβαρών διαταραχών της υγείας στους καταναλωτές, με τελικό επακόλουθο, σε κάθε περίπτωση, τις εκτεταμένες ανακλήσεις προϊόντων από μέρους της βιομηχανίας τροφίμων, οι οποίες και οδηγούν την ίδια σε σοβαρές οικονομικές απώλειες.

---

\* Σχετική δημοσίευση παρόντος κεφαλαίου:

Andritsos, N. D., Mataragas, M., Mavrou, E., Stamatiou, A., & Drosinos, E. H. (2012). The microbiological condition of minced pork prepared at retail stores in Athens, Greece. *Meat Science*, 91, 486-489. doi:10.1016/j.meatsci.2012.02.036

Με την ευρύτερη έννοια του όρου, στα προϊόντα με βάση το κρέας υπάγεται εκτός των άλλων και ο κιμάς, ο οποίος αποτελεί ένα ιδιαίτερα ευαλλοίωτο προϊόν κρέατος. Το κρέας χωρίς οστά το οποίο έχει υποστεί άλεσμα σε τεμάχια και περιέχει αλάτι σε ποσοστό μικρότερο του 1% είναι αυτό που χαρακτηρίζεται ως κιμάς (Ανώνυμος, 2004). Η φύση του κιμά είναι τέτοια που τον κατατάσσει ως ένα από τα πλέον ευπαθή και δυνητικώς επικίνδυνα τρόφιμα (potentially hazardous foods), καθότι είναι εξαιρετικά επιδεκτικός διαμιάνσεων με μικροοργανισμούς από τις οποίες πρακτικά είναι απροστάτευτος. Η μικροβιολογική ποιότητα και ασφάλεια του νωπού κιμά εξαρτάται άμεσα από τις συνθήκες που επικρατούν κατά τη σφαγή, τον τεμαχισμό του σφάγιου και την επεξεργασία του νωπού κρέατος, τη συντήρηση και διανομή του προϊόντος (Adams & Moss, 2008), με το ζώο και το περιβάλλον να αποτελούν τις κύριες πηγές μίανσης. Η αύξηση στο λόγο επιφάνεια:όγκος που προκύπτει ως αποτέλεσμα της μηχανικής επεξεργασίας του νωπού κρέατος κατά τη διαδικασία παρασκευής του κιμά, σε συνδυασμό με τη διασπορά των μικροοργανισμών σε όλη τη μάζα του τροφίμου, αλλά και την ενδεχόμενη έλλειψη ή λανθασμένη τήρηση και εφαρμογή των κανόνων ορθής βιομηχανικής/υγιεινής πρακτικής (good manufacturing/hygiene practices, GMPs/GHPs) ή/και του συστήματος HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), είναι παράγοντες οι οποίοι ευνοούν την αύξηση ενός μεγάλου αριθμού αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα, η μικροβιολογική ποιότητα και ασφάλεια του κιμά, όπως και οποιουδήποτε τροφίμου, επηρεάζεται από πληθώρα εγγενών (intrinsic) (π.χ. pH,  $a_w$ ) και εξωγενών (extrinsic) (π.χ. θερμοκρασία, σχετική υγρασία, ατμόσφαιρα συσκευασίας) παραγόντων (IFT & FDA, 2003· Mossel & Ingram, 1955). Ενδεικτικά αναφέρεται η αξιοσημείωτη επιρροή της θερμοκρασίας συντήρησης και της ατμόσφαιρας συσκευασίας του κιμά (Emswiler, Pierson, & Kotula, 1976· von Holy &

Holzapfel, 1988), καθώς και η επίδραση τόσο του τύπου καταστήματος λιανικής πώλησης από το οποίο λήφθηκε ο κιμάς όσο και της εποχικότητας της δειγματοληψίας (Kammenou, Metaxopoulos, & Drosinos, 2003· Nychas, Robinson, & Board, 1991· Rao & Ramesh, 1988), επί της μικροβιολογικής ποιότητας του προϊόντος. Εγγενείς παράγοντες, όπως το επίπεδο της συγκέντρωσης γλυκόζης στον κιμά, έχουν επίσης συσχετιστεί με τη μικροβιολογική ποιότητά του (Drosinos & Board, 1995α, 1995β· Lambropoulou, Drosinos, & Nychas, 1996· Nychas και συν., 1991). Στην ίδια κατεύθυνση ομοίως, ο έλεγχος της μικροβιακής μίανσης του εισερχόμενου νωπού κρέατος έχει αποδειχθεί εξαιρετικά σημαντικός στην προσπάθεια περαιτέρω βελτίωσης της ποιότητας του παραγόμενου κιμά στο επίπεδο της βιομηχανίας κρέατος και κρεατοσκευασμάτων (Eisel, Linton, & Muriana, 1997· Scanga και συν., 2000). Δεδομένου ότι απαγορεύεται η προσθήκη οποιασδήποτε ουσίας θα μπορούσε να παρεμποδίσει την αύξηση των μικροοργανισμών που ανευρίσκονται στον κιμά που παρασκευάζεται επιτόπου σε καταστήματα λιανικής πώλησης και προορίζεται για απευθείας διάθεση στον τελικό καταναλωτή (Ανώνυμος, 2004), τα μόνα προστατευτικά εμπόδια του προϊόντος, εξαιρουμένων των βέλτιστων συνθηκών υγιεινής κατά την παραγωγική διαδικασία, είναι η ψύξη και η διάθεσή του προς κατανάλωση στο συντομότερο χρονικό διάστημα μετά την παρασκευή του, η οποία συνήθως ακολουθείται και από κάποιου είδους θερμική επεξεργασία (π.χ. μαγείρεμα).

Απ' όλα τα είδη κρέατος, το χοίρειο κρέας είναι το ευρύτερα καταναλισκόμενο είδος στην Ε.Ε. (Verbeke, Pérez-Cueto, & Grunert, 2011). Οι αντιλήψεις, οι προτιμήσεις και η συμπεριφορά των καταναλωτών έναντι του κρέατος και των προϊόντων του επηρεάζονται από μια σειρά παραγόντων, στους οποίους συμπεριλαμβάνεται η τιμή σε συνάρτηση με το ατομικό εισόδημα του καταναλωτή,



οι διατροφικές συνήθειες και η ευχαρίστηση που απορρέει από αυτές, καθώς και οι προσλαμβάνουσες του ατόμου σχετικά με ζητήματα υγιεινής, ασφάλειας, ευζωίας του ζώου αλλά και περιβαλλοντικών ζητημάτων που ανακύπτουν ως συνέπεια της επιλογή του προϊόντος (McCarthy, O'Reilly, Cotter, & De Boer, 2004). Ταυτόχρονα, οφείλεται να λαμβάνονται υπόψη κοινωνιολογικές, πολιτισμικές αλλά και θρησκευτικές παράμετροι, οι οποίες επίσης διαμορφώνουν την προαναφερόμενη επιλογή. Σε μια ποσοτική, ευρείας κλίμακας καταναλωτική έρευνα η οποία διεξάχθηκε σε πέντε Ευρωπαϊκές χώρες (*Q-PorkChains*, 6<sup>ο</sup> Πρόγραμμα Πλαίσιο), ο κιμάς από χοίρειο κρέας είχε ένα από τα υψηλότερα επίπεδα διείσδυσης στην αγορά μεταξύ 30 συγκεκριμένων προϊόντων χοίρειου κρέατος που μελετήθηκαν, με ποσοστό που ξεπερνούσε το 90% (Verbeke, Pérez-Cueto, de Barcellos, Krystallis, & Grunert, 2010).

Κατά καιρούς έχουν γίνει προσπάθειες για την αξιολόγηση της μικροβιολογικής ποιότητας και ασφάλειας του νωπού κιμά στη χώρα μας (Βασιλόπουλος, Σταματίου, Σκανδάμης, Κουτσουμανής, & Νυχάς, 2005· Kammenou και συν., 2003· Papadopoulou, Panagou, Tassou, & Nychas, 2011), ωστόσο η μικροβιολογική κατάσταση του χοίρειου κιμά που παρασκευάζεται επιτόπου σε καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος δεν έχει μελετηθεί σε τέτοια έκταση, ώστε να επιτευχθεί επαρκής συσχετισμός μεταξύ της ποιότητας του νωπού χοίρειου κρέατος από όπου προέρχεται ο κιμάς, των συνθηκών υγιεινής κατά την παραγωγική διαδικασία αλλά και της υγιεινής του προσωπικού των καταστημάτων διάθεσης του προϊόντος.

### 3.2. Στόχος

Στόχος της πειραματικής αυτής ενότητας ήταν η μελέτη της μικροχλωρίδας νωπού χοίρειου κιμά για την εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας και υγιεινής του προϊόντος. Ως εκ τούτου προσδιορίστηκε η κατανομή των μικροβιακών πληθυσμών στον κιμά και ακολούθως διενεργήθηκε πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση για την απεικόνιση της μικροβιολογικής ποιότητας του νωπού κρέατος από το οποίο προήλθε ο κιμάς και για τη συσχέτιση της μικροβιολογικής ποιότητας και υγιεινής του προϊόντος.

### 3.3. Πειραματικός σχεδιασμός

Δείγματα νωπού χοίρειου κιμά (παρ. 3.3.1.) λήφθηκαν επιτόπου από κρεοπωλεία και υπεραγορές (supermarkets) του κέντρου και της ευρύτερης περιοχής της Αθήνας, σε δύο διαφορετικές εποχές (καλοκαίρι, χειμώνας) (παρ. 3.3.2.). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν υπό ψύξη στο εργαστήριο όπου και έλαβε χώρα η μικροβιολογική ανάλυση (παρ. 3.3.3.) και η μέτρηση του pH τους (παρ. 3.3.4.). Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων συνίστατο στον προσδιορισμό της αλλοιογόνου χλωρίδας του κιμά (ολική μεσόφιλη χλωρίδα, ψευδομονάδες, *Brochothrix thermosphacta*, οξυγαλακτικά και υδρόθειο-παραγωγά βακτήρια, ζύμες και μύκητες) και ορισμένων χαρακτηριστικών μικροβιολογικών δεικτών υγιεινής (εντεροβακτήρια, ολικά κολοβακτηριοειδή, *Escherichia coli*, σταφυλόκοκκοι, *Staphylococcus aureus* και *Listeria* spp.) (παρ. 3.3.3.). Ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων με εφαρμογή πολυμεταβλητής ανάλυσης αποτελούμενης από ανάλυση συνδιακύμανσης, συσχετίσεις και ανάλυση κύριων συνιστωσών (παρ. 3.3.5.). Τελικά, με βάση τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών

και στατιστικών αναλύσεων, μελετήθηκε η μικροχλωρίδα και εκτιμήθηκε η μικροβιολογική κατάσταση του νωπού χοίρειου κιμά.

### 3.3.1. Παρασκευή κιμά - προετοιμασία δειγμάτων

Στην ελληνική αγορά κρέατος αποτελεί συνήθη, κοινή πρακτική ο κιμάς να παρασκευάζεται στα καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος τη στιγμή της διάθεσής του, από αυτούσια τεμάχια κρέατος που επιλέγονται επιτόπου από τον καταναλωτή. Ο προ-συσκευασμένος υπό κενό ή σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες (modified atmosphere packaged, MAP) κιμάς λαμβάνει ένα πολύ μικρό μερίδιο της συγκεκριμένης αγοράς. Τα τεμάχια κρέατος από τα οποία προέρχεται ο κιμάς συντηρούνται αερόβια και υπό ψύξη (2°-4°C). Η παρασκευή του κιμά λαμβάνει χώρα ενώπιον του πελάτη αφού αποτελεί νομική απαίτηση για τους κρεοπώλες (Ανώνυμος, 2012). Μετά την παρασκευή του, ο κιμάς συσκευάζεται με ανθεκτικό χαρτί περιτύλιξης τύπου kraft επενδυμένου εσωτερικά με σελοφάν.

### 3.3.2. Δείγματα κιμά

Τα δείγματα νωπού χοίρειου κιμά ( $n = 150$ ) παρασκευάστηκαν επιτόπου τη στιγμή της διάθεσής τους σε κρεοπωλεία ( $n = 127$ ) και υπεραγορές ( $n = 23$ ) του κέντρου και της ευρύτερης περιοχής της Αθήνας, από αυτούσια τεμάχια κρέατος προερχόμενα από την ωμοπλάτη και τον μηρό σφάγιου χοίρου τα οποία είχαν συντηρηθεί αερόβια και υπό ψύξη (2°-4°C). Τα δείγματα κιμά ακολούθως συσκευάστηκαν με χαρτί περιτύλιξης τύπου kraft. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε κατά τη διάρκεια περιόδου 10 μηνών αποτελούμενης από δύο διαφορετικές εποχές δειγματοληψίας. Το ήμισυ των δειγμάτων (κρεοπωλεία,  $n = 66$  και υπεραγορές,  $n = 9$ ) λήφθηκε κατά τους θερινούς μήνες μεταξύ Μαΐου και Σεπτεμβρίου (2009), ενώ τα υπόλοιπα δείγματα

(κρεοπωλεία,  $n = 61$  και υπεραγορές,  $n = 14$ ) λήφθηκαν κατά τους χειμερινούς μήνες μεταξύ Νοεμβρίου (2009) και Μαρτίου (2010). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν υπό ψύξη εντός ισοθερμικών περιεκτών στο εργαστήριο, όπου και συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες και θερμοκρασίες ψύξης ( $4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) έως ότου λάβει χώρα η μικροβιολογική ανάλυση και η μέτρηση του pH τους. Σε κάθε περίπτωση η ανάλυση των δειγμάτων ξεκινούσε εντός δύο ωρών από τη στιγμή της άφιξής τους στο εργαστήριο, ενώ η σειρά ανάλυσής τους ήταν τυχαία.

### 3.3.3. Μικροβιολογική ανάλυση

Αντιπροσωπευτική αναλυτική μονάδα 25 g, λαμβανόμενη κατά τυχαίο τρόπο από διαφορετικά μέρη της μάζας του κάθε δείγματος (500 g κιμά), μεταφερόταν ασηπτικά εντός σακούλας stomacher (Seward Medical, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο) και στη συνέχεια προσθέτονταν 225 ml αποστειρωμένου υδατικού διαλύματος MRD (maximum recovery diluent) [0,1% κ.ό. (w/v) πεπτόνη και 0,85% κ.ό. (w/v) χλωριούχο νάτριο] (Biolife, Μιλάνο, Ιταλία). Το περιεχόμενο ομογενοποιούνταν σε θερμοκρασία δωματίου ( $20^{\circ}$ - $25^{\circ}\text{C}$ ) σε συσκευή Stomacher 400 (Seward Medical), για 1 min υπό κανονική ταχύτητα και 30 sec υπό υψηλή ταχύτητα. Ακολουθούσε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα MRD για την επίτευξη της επιθυμητής αραιώσης.

Για την απαρίθμηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX), των ζυμών και μυκήτων, των ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.), του *Brochothrix thermosphacta*, των *Listeria* spp., των σταφυλόκοκκων (*Staphylococcus* spp.) και του *Staphylococcus aureus*, ποσότητα 0,1 ml από την κατάλληλη αραιώση εξαπλώθηκε επιφανειακά σε τρυβλία με κοινό άγαρ καταμέτρησης μικροβίων (plate count agar, PCA, Merck, Darmstadt, Γερμανία), άγαρ με χλωραμφαινικόλη, γλυκόζη και εκχύλισμα ζύμης

(chloramphenicol glucose yeast extract agar, CGYE agar, Biolife), άγαρ με κετριμίδη, φουσιδικό οξύ και παράγωγο κεφαλοσπορίνης (cetrimide fucidin cephaloridine agar, CFC agar, Biolife), άγαρ με στρεπτομυκίνη, οξικό θάλλιο και κυκλοεξιμίδιο (streptomycin thallos acetate actidione agar, STAA agar, Biolife), άγαρ με πολυμυξίνη, ακριφλαβίνη, χλωριούχο λίθιο, κεφταζιντίμη, αισκουλίνη και μαννιτόλη (polymyxin, acriflavine, lithium chloride, ceftazidime aesculin mannitol agar, PALCAM agar, Biolife) και άγαρ Baird-Parker (Baird-Parker agar, BP agar, Biolife), αντίστοιχα. Επιπλέον και ειδικότερα για την απαρίθμηση *Listeria* spp., ποσότητα 1 ml ομογενοποιημένου δείγματος εξαπλώθηκε επιφανειακά σε τρία τρυβλία με θρεπτικό υλικό PALCAM (δηλ. 0,33 ml σε κάθε τρυβλίο) για τη μείωση του ορίου ανίχνευσης από 100 σε 10 cfu/g ή από 2 σε 1 log cfu/g αντίστοιχα. Τα τρυβλία κατόπιν επώστηκαν ανεστραμμένα σε θερμοκρασία 25°C για 48 h (CFC και STAA), 72 h (PCA) ή 5 ημέρες (CGYE), σε θερμοκρασία 30°C για 48 h (PALCAM) και σε θερμοκρασία 37°C για 48 h (BP). Για την απαρίθμηση των εντεροβακτηρίων (οικ. *Enterobacteriaceae*), των ολικών κολοβακτηριοειδών (total coliforms) και του κολοβακτηριδίου *Escherichia coli*, των οξυγαλακτικών (lactic acid bacteria, LAB) και των υδρόθειο (H<sub>2</sub>S)-παραγωγών βακτηρίων (hydrogen sulfide producing bacteria), ποσότητα 1 ml από την κατάλληλη αραιώση ενσωματώθηκε σε τρυβλία με 10 ml τετηγμένου (45°C) άγαρ με κρυσταλλικό ιώδες, ουδέτερο ερυθρό, χολικά άλατα και γλυκόζη (violet red bile glucose agar, VRBGA, Biolife), Chromocult® (Merck), άγαρ de Man, Rogosa και Sharp (MRS agar, Biolife) και άγαρ σιδήρου (iron agar, IA, θρεπτικό υλικό παρασκευασμένο από βασικά συστατικά στο εργαστήριο, βλ. Παράρτημα I), αντίστοιχα. Μετά τη στερεοποίηση του θρεπτικού υλικού, προστέθηκε μια επιπλέον στρώση 3-5 ml τετηγμένου (45°C) υλικού. Όμοια με προηγούμενα, τα τρυβλία επώστηκαν ανεστραμμένα σε θερμοκρασία 25°C για 48 h

(IA), σε θερμοκρασία 30°C για 72 h (MRS) και σε θερμοκρασία 37°C για 24 h (VRBGA και Chromocult®). Σημειώνεται ότι η απαρίθμηση των εντεροβακτηρίων στο VRBGA περιελάμβανε την καταμέτρηση μόνο των μεγάλων αποικιών με τη χαρακτηριστική κυανή άλω γύρω από αυτές (Mossel, Eelderink, Koopmans, & van Rossem, 1979). Για κάθε θρεπτικό υπόστρωμα που περιγράφηκε χρησιμοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις τριών διαδοχικών αραιώσεων.

#### 3.3.4. Μέτρηση του pH

Το pH κάθε δείγματος μετρήθηκε μετά το τέλος της μικροβιολογικής ανάλυσης, σύμφωνα με τη σχετική μέθοδο αναφοράς του Διεθνή Οργανισμού Τυποποίησης (International Organization for Standardization, ISO) (ISO, 1999), με χρήση ψηφιακού πεχάμετρου (WTW, pH 526, Weilheim, Γερμανία).

#### 3.3.5. Στατιστική επεξεργασία δεδομένων

Τα αποτελέσματα αρίθμησης των μικροοργανισμών στα τρυβλία εκφράστηκαν σε log cfu/g και υποβλήθηκαν σε ανάλυση συνδιακύμανσης (analysis of covariance, ANCOVA) με χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS v15.0 (SPSS, Inc., Σικάγο, Ιλινόις, Η.Π.Α.). Οι ανεξάρτητες μεταβλητές περιελάμβαναν τον τύπο καταστήματος λιανικής πώλησης του κρέατος και την εποχή δειγματοληψίας του κιμά, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τύπου καταστήματος και εποχής δειγματοληψίας. Τιμή πιθανότητας μικρότερη της τιμής 0,05 ( $p < 0,05$ ) θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική. Οι κατανομές των πληθυσμών των μικροοργανισμών υπολογίστηκαν με χρήση του στατιστικού προγράμματος @Risk 4.5 (Palisade Corp., Ithaca, Νέα Υόρκη, Η.Π.Α.), ενώ για τον έλεγχο της κανονικότητάς τους χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμή  $\chi^2$ . Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (ΑΚΣ)

(principal component analysis) και η ανάλυση συσχετίσεων κατά Pearson (Pearson correlation analysis) διεξάχθηκαν επίσης με τη βοήθεια του SPSS v15.0.

### 3.4. Αποτελέσματα

#### 3.4.1. Μικροβιακοί πληθυσμοί

Η κατανομή της OMX στο νωπό χοίρειο κιμά ήταν  $6,8 \pm 1,0$  log cfu/g, με ένα εύρος τιμών από 4,9 έως 8,7 log cfu/g. Σε σχέση με τον τύπο του καταστήματος λιανικής πώλησης κρέατος από όπου λήφθηκε ο κιμάς, οι μέσες τιμές της OMX ήταν  $6,7 \pm 1,0$  και  $7,2 \pm 0,7$  log cfu/g για τα κρεοπωλεία και τις υπεραγορές αντίστοιχα. Οι κατανομές των πληθυσμών των μικροοργανισμών που είναι σε θέση να προκαλέσουν αλλοίωση του νωπού χοίρειου κιμά και αποτελούν την αλλοιογόνο μικροχλωρίδα του προϊόντος, δίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 6. Στον ίδιο πίνακα παρουσιάζονται επίσης οι κατανομές ορισμένων χαρακτηριστικών μικροβιολογικών δεικτών υγιεινής (εντεροβακτήρια, ολικά κολοβακτηριοειδή, *E. coli*, σταφυλόκοκκοι, *S. aureus* και *Listeria spp.*) που αφορούν το εξεταζόμενο προϊόν.

Η στατιστική δοκιμή  $\chi^2$  έδειξε ότι όλα τα αποτελέσματα αρίθμησης των μικροοργανισμών στα τρυβλία (log cfu/g) ακολουθούσαν κανονική κατανομή ( $p > 0,05$ ). Οι ψευδομονάδες, ο *B. thermosphacta* και τα LAB αποτελούν κατά σειρά σημαντικότητας τις τρεις πολυπληθέστερες ομάδες δυνητικά αλλοιογόνων μικροοργανισμών του νωπού κιμά που συντηρείται σε αερόβιες συνθήκες. Από την άλλη μεριά, τα είδη *Listeria* μαζί με το κολοβακτηρίδιο *E. coli* ήταν οι λιγότερο επικρατέστεροι μικροοργανισμοί του μικροβιακού οικοσυστήματος του κιμά, ακολουθούμενοι από τον *S. aureus*, τα ολικά κολοβακτηριοειδή και τα εντεροβακτήρια. Σε 105 από τα 150 δείγματα που εξετάστηκαν (70%), οι πληθυσμοί του *E. coli* ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 10 cfu/g ή 1 log cfu/g.

**Πίνακας 6.** Κατανομές αλλοιογόνου μικροχλωρίδας και μικροβιολογικών δεικτών υγιεινής νωπού χοίρειου κιμά τη στιγμή της διάθεσής του από καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος<sup>α</sup>.

Μικροοργανισμός(-οί) <sup>β</sup>	Επιπολασμός δειγμάτων <sup>γ</sup> (%)	Μέση τιμή (log cfu/g)	Τυπική απόκλιση (log cfu/g)	95% διάστημα εμπιστοσύνης (log cfu/g)
Ψευδομονάδες	100	6.4	1.2	4.1-8.8
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	100	5.9	1.1	3.8-8.0
Οξυγαλακτικά βακτήρια	100	5.3	1.0	3.4-7.3
Ζύμες και μύκητες	100	4.6	0.7	3.3-5.9
H <sub>2</sub> S-παραγωγά βακτήρια	100	4.3	1.3	1.6-6.9
Εντεροβακτήρια	98	3.6	1.2	1.4-5.9
Ολικά κολοβακτηριοειδή	87	2.9	1.1	0.8-5.0
<i>Escherichia coli</i>	30	1.4	0.7	1.1-2.8
<i>Listeria</i> spp.	36	1.4	0.6	0.3-2.6
Σταφυλόκοκκοι	79	4.3	1.0	2.3-6.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	2.4	0.9	0.6-4.2

<sup>α</sup> Τα δείγματα χοίρειου κιμά προετοιμάστηκαν και παρασκευάστηκαν με βάση τα όσα αναφέρονται στις παρ. 3.3.1. και 3.3.2. αντίστοιχα.

<sup>β</sup> Η κατανομή του pH για το σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν ( $n = 150$ ) ήταν  $5,9 \pm 0,2$  (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 5,5-6,3).

<sup>γ</sup> Με βάση το όριο ανίχνευσης των μεθόδων.

#### 3.4.2. Πολυμεταβλητή ανάλυση

Η ANCOVA έδειξε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική επίδραση ( $p > 0,05$ ) του τύπου του καταστήματος λιανικής πώλησης (κρεοπωλείο, υπεραγορά) και της εποχής δειγματοληψίας επί των μικροβιακών πληθυσμών που προσδιορίστηκαν. Οι συντελεστές συσχέτισης κατά Pearson ( $r$ ) των διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών (Πίνακας 7) κατέδειξαν ότι οι μεγαλύτερες συσχετίσεις υπήρχαν



μεταξύ OMX και ψευδομονάδων ( $r = 0,90$ ), *B. thermosphacta* ( $r = 0,86$ ) και H<sub>2</sub>S-παραγωγών βακτηρίων ( $r = 0,71$ ), ενώ οι μικρότερες μεταξύ ολικών κολοβακτηριοειδών και όλων των υπόλοιπων μικροβιολογικών παραμέτρων που εξετάστηκαν, εκτός των εντεροβακτηρίων.

Κατά την εφαρμογή της ΑΚΣ επιλέχθηκαν τρεις κύριες συνιστώσες (principal components, PCs), αντιπροσωπεύοντας το 79,8% της ολικής διακύμανσης των δεδομένων. Ποσοστό 50,3% της ολικής διακύμανσης επεξηγήθηκε από την PC1, 17,4% από την PC2 και 12,1% από την PC3. Με βάση την ΑΚΣ λοιπόν, η μικροβιολογική ποιότητα του χοίρειου κιμά για το σύνολο των κρεοπωλείων και υπεραγορών από όπου λήφθηκαν τα δείγματα, απεικονίστηκε γραφικά (Σχήμα 5). Τιμές μεγαλύτερες από 0,400 θεωρήθηκαν σημαντικές, οπότε υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ εξεταζόμενης μεταβλητής και της αντίστοιχης κύριας συνιστώσας. Η πρώτη συνιστώσα (PC1) σχετίστηκε με τους δυνητικά αλλοιογόνους μικροοργανισμούς του νωπού χοίρειου κιμά που παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 6 (μαζί με την OMX), η δεύτερη (PC2) συσχετίστηκε με τα εντεροβακτήρια και τα ολικά κολοβακτηριοειδή, ενώ η τρίτη κύρια συνιστώσα (PC3) αφορούσε τους σταφυλόκοκκους που ανευρίσκονται στο προϊόν.

### 3.5. Συζήτηση

Η σύσταση της αλλοιογόνου χλωρίδας του νωπού κιμά υπό ψύξη καθορίζεται σχεδόν αποκλειστικά από τους σχετικούς πληθυσμούς ψυχρότροφων μικροοργανισμών που απαντώνται στο προϊόν και από τους ρυθμούς αύξησής τους στις χαμηλές θερμοκρασίες. Οι ψευδομονάδες παρουσιάζουν ένα συγκριτικό πλεονέκτημα στο ρυθμό αύξησης στις θερμοκρασίες ψυγείου σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες μικροοργανισμών. Συνεπώς, στο αερόβια συντηρημένο κρέας υπό

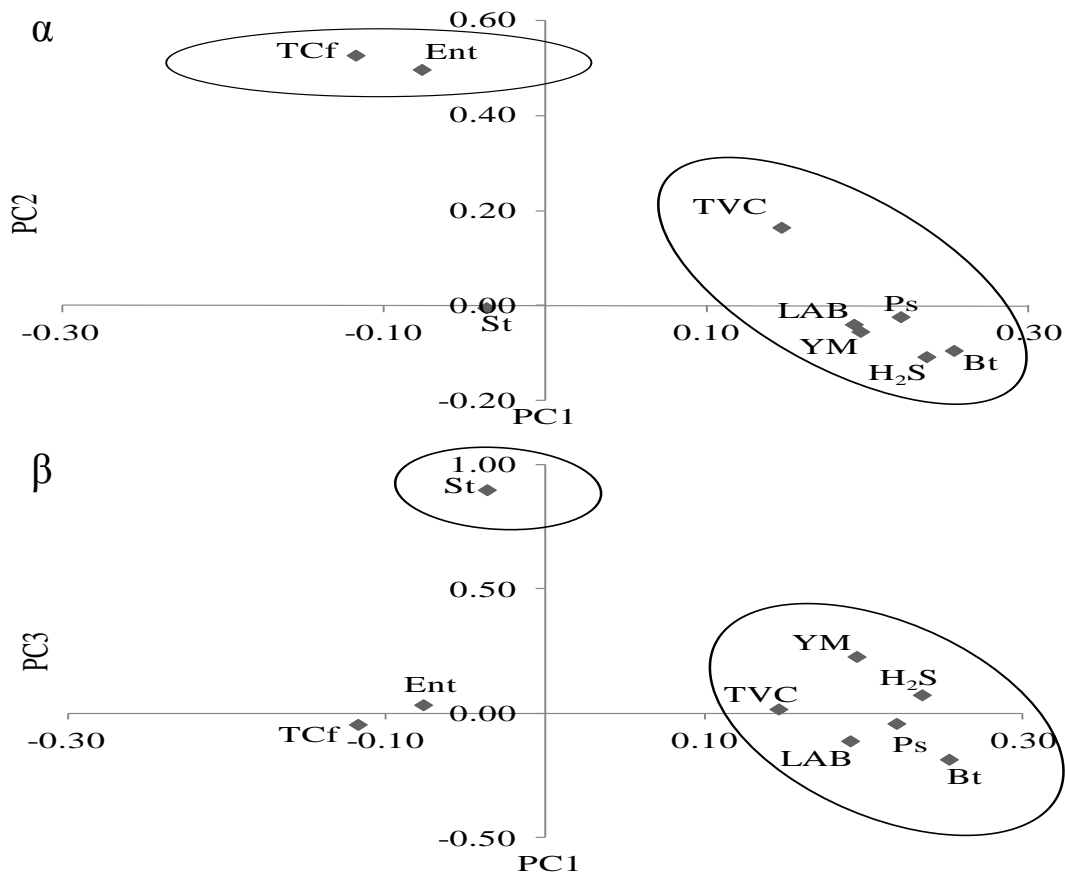
**Πίνακας 7.** Συσχετίσεις<sup>α</sup> μικροχλωρίδας νωπού χοίρειου κιμά τη στιγμή της διάθεσής του από καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος<sup>β</sup>.

Μικροοργανισμός(-οί) <sup>γ</sup>	OMX	Εντεροβακτήρια	Ολικά κολοβ/ειδή	Ζύμες και μύκητες	Οξύ/κα βακτήρια	<i>B. thermosphacta</i>	Ψευδομονάδες	H <sub>2</sub> S-παραγωγά βακτήρια	Σταφυλόκοκκοι
OMX	1.00	0.61	0.43	0.64	0.57	0.86	0.90	0.71	0.22
Εντεροβακτήρια	0.61	1.00	0.79	0.37	0.27	0.55	0.53	0.56	0.12
Ολικά κολοβακτηριοειδή	0.43	0.79	1.00	0.11	0.07	0.09	0.20	0.02	0.08
Ζύμες και μύκητες	0.64	0.37	0.11	1.00	0.44	0.64	0.71	0.58	0.18
Οξυγαλακτικά βακτήρια	0.57	0.27	0.07	0.44	1.00	0.53	0.50	0.54	0.26
<i>B. thermosphacta</i>	0.86	0.55	0.09	0.64	0.53	1.00	0.86	0.73	0.08
Ψευδομονάδες	0.90	0.53	0.20	0.71	0.50	0.86	1.00	0.71	0.09
H <sub>2</sub> S-παραγωγά βακτήρια	0.71	0.56	0.02	0.58	0.54	0.73	0.71	1.00	0.16
Σταφυλόκοκκοι	0.22	0.12	0.08	0.18	0.26	0.08	0.09	0.16	1.00

<sup>α</sup> Όλες οι συσχετίσεις ήταν στατιστικά σημαντικές ( $p < 0,05$ ).

<sup>β</sup> Τα δείγματα χοίρειου κιμά προετοιμάστηκαν και παρασκευάστηκαν με βάση τα όσα αναφέρονται στις παρ. 3.3.1. και 3.3.2. αντίστοιχα.

<sup>γ</sup> Οι συσχετίσεις των *E. coli*, *Listeria* spp. και *S. aureus* δεν συμπεριλήφθηκαν, εξαιτίας της εμφάνισης μεροληπτικών (biased) αποτελεσμάτων κατά τη διεξαγωγή της σχετικής ανάλυσης λόγω μη επαρκών δεδομένων.



**Σχήμα 5.** Σχεδιαγραμματική απεικόνιση ανάλυσης κύριων συνιστωσών (ΑΚΣ) σε νωπό χοίρειο κιμά, με παρουσίαση των σημαντικότερων εξεταζόμενων μεταβλητών για κάθε κύρια συνιστώσα (PC). α) PC1 vs. PC2 και β) PC1 vs. PC3. Όπου: TVC = OMX, TCf = ολικά κολοβακτηριοειδή, Ent = εντεροβακτήρια, LAB = οξυγαλακτικά βακτήρια, Ps = ψευδομονάδες, YM = ζύμες και μύκητες, Bt = *Brochothrix thermosphacta*, H<sub>2</sub>S = υδρόθειο-παραγωγά βακτήρια και St = σταφυλόκοκκοι.

ψύξη από το οποίο παρασκευάζεται ο κιμάς, τα είδη *Pseudomonas* σχηματίζουν την πολυπληθέστερη ομάδα μικροοργανισμών της τελικής αλλοιογόνου χλωρίδας του προϊόντος (Gill & Newton, 1977, 1978). Πράγματι, οι ψευδομονάδες αποτέλεσαν την επικρατέστερη ομάδα δυνητικά αλλοιογόνων μικροοργανισμών του νωπού χοίρειου κιμά, με τους μικροβιακούς πληθυσμούς του *B. thermosphacta* και των LAB να ακολουθούν. Τα βακτήρια αυτά (*Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, LAB)

ευθύνονται κυρίως για το μειωμένο χρόνο ζωής ή διάρκεια εμπορίας (shelf life) και για την αλλοίωση του νωπού κιμά. Τα προαναφερόμενα συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Drosinos και Board (1995α, 1995β) και Βασιλόπουλου, Σταματίου, Σκανδάμη, Κουτσουμανή και Νυχά (2005). Ειδικότερα, ψευδομονάδες και *B. thermosphacta* αποτελούν την κύρια αλλοιογόνο χλωρίδα του κιμά (Koutsoumanis, Stamatiou, Drosinos, & Nychas, 2008; Koutsoumanis, Stamatiou, Skandamis, & Nychas, 2006).

Τα είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, τα ολικά κολοβακτηριοειδή καθώς και το κολοβακτηρίδιο *E. coli* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της υγιεινολογικής κατάστασης του νωπού κρέατος ή των συνθηκών υγιεινής κατά τη διαδικασία παρασκευής του κιμά. Τα εντεροβακτήρια επικρατούν έναντι των άλλων ομάδων μικροοργανισμών σε υψηλότερες θερμοκρασίες (15°C) παρά σε θερμοκρασίες ψύξης (Kleeberger & Busse, 1975), εντούτοις έχει αναφερθεί υψηλό ποσοστό ανάκτησης μελών *Enterobacteriaceae* σε χαμηλές θερμοκρασίες (Mossel και συν., 1979). Η κατανομή των εντεροβακτηρίων στο νωπό χοίρειο κιμά της παρούσας μελέτης ήταν παρόμοια με αντίστοιχες κατανομές για διάφορα δείγματα νωπού κιμά που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες (Drosinos & Board, 1995β; Kammenou και συν., 2003; Koutsoumanis και συν., 2006, 2008). Εξάλλου, τα εντεροβακτήρια εμφάνισαν υψηλή συσχέτιση με τα ολικά κολοβακτηριοειδή και μικρότερη με το *E. coli*. Η μικρότερη συσχέτιση υποδηλώνει ότι τα αντίστοιχα αποτελέσματα αρίθμησης των μικροοργανισμών παρέχουν διαφορετικού είδους πληροφορίες σχετικά με τις ακολουθούμενες πρακτικές υγιεινής. Έτσι, τα εντεροβακτήρια θεωρούνται ως ένας χαρακτηριστικός, γενικός δείκτης των εφαρμοζόμενων συνθηκών υγιεινής, σε αντίθεση με το *E. coli* που χρησιμοποιείται ως δείκτης πιθανής κοπρανώδους ρύπανσης. Επίσης, οι παρατηρούμενοι μικροί

συντελεστές συσχέτισης των *Staphylococcus* spp. με όλα τα υπόλοιπα μέλη του μελετώμενου μικροβιακού οικοσυστήματος, υποδεικνύουν τη διαφορετική ερμηνεία των σταφυλόκοκκων ως δεικτών ανθρωπογενούς μίανσης του κιμά, εξαιτίας κακής εφαρμογής GHPs κατά το χειρισμό του προϊόντος.

Η OMX του κιμά υπόκειται σε μεγάλη διακύμανση με τις τιμές της σε επίπεδο λιανικής πώλησης να κυμαίνονται μεταξύ 2,0 και 9,0 log cfu/g· τις περισσότερες φορές με μέσες τιμές πάνω από 6,0 log cfu/g. Σε γενικές γραμμές, δεν υπάρχει διαφορά σε επίπεδο λιανικής πώλησης στις τιμές OMX μεταξύ βόειου και χοίρειου κρέατος, αλλά και μεταξύ των κιμάδων που κατά αντιστοιχία προκύπτουν από τα δύο είδη κρέατος (Scriven & Singh, 1986). Όλες οι κατηγορίες μικροοργανισμών που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη συσχετίστηκαν με την OMX. Η υψηλή συσχέτιση μεταξύ μεσόφιλων μικροοργανισμών και ψευδομονάδων καθώς και η μεγάλη συχνότητα εμφάνισης του *B. thermosphacta* και των H<sub>2</sub>S-παραγωγών βακτηρίων, δείχνουν ότι ο χρόνος ζωής του νωπού κιμά είναι μικρός (π.χ. 2-3 ημέρες).

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων (ANCOVA) έδειξε ότι τόσο ο τύπος καταστήματος λιανικής πώλησης του κρέατος όσο και η εποχικότητα της δειγματοληψίας δεν είχαν καμία σημαντική επίδραση ( $p > 0,05$ ) επί της μικροβιολογικής ποιότητας του νωπού χοίρειου κιμά. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα ευρήματα των Roberts, Britton και Hudson (1980) αλλά και με εκείνα των Hudson, Roberts, Crossland και Casey (1986), παρόλο που έχουν υπάρξει περιπτώσεις όπου έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές ( $p < 0,05$ ) στους βακτηριακούς πληθυσμούς μεταξύ δειγμάτων νωπού κιμά από κρεοπωλεία και υπεραγορές (Kammenou και συν., 2003· Nychas και συν., 1991), καθώς και για μεγάλες μονάδες παραγωγής κρέατος και κρεατοσκευασμάτων (Hinton και συν.,

1998). Επιπρόσθετα, οι Nychas και συν. (1991) έχουν καταγράψει διαφορές στη μικροβιολογική ποιότητα του κιμά ως αποτέλεσμα της επίδρασης της εποχικότητας επί των μικροβιακών πληθυσμών που προσδιορίστηκαν, ωστόσο, όπως ήδη αναφέρθηκε, κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία. Η απουσία επιρροής των δύο προηγούμενων παραμέτρων (τύπος καταστήματος, εποχή δειγματοληψίας) στη μικροβιολογική ποιότητα του κιμά, οφείλεται ενδεχομένως στις μεγάλες ομοιότητες που παρουσιάζονται στον τρόπο παρασκευής και χειρισμού του προϊόντος στα κρεοπωλεία και στις υπεραγορές.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σχολιαστούν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με βάση τον Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα (Ανώνυμος, 2005, 2007). Η μέση τιμή της OMX που προσδιορίστηκε ήταν σε κάθε περίπτωση μεγαλύτερη ή ίση του ορίου που προβλέπεται από το αντίστοιχο κριτήριο υγιεινής για την OMX σε κιμά ( $\geq 6,7 \log \text{ cfu/g}$ ). Επομένως, η μικροβιολογική ποιότητα για το σύνολο των δειγμάτων αλλά και για τα δείγματα των υπεραγορών κρίθηκε ως μη κανοποιητική, ενώ η αντίστοιχη ποιότητα των δειγμάτων από τα κρεοπωλεία χαρακτηρίστηκε ως οριακά αποδεκτή. Επίσης, σε σχέση με το δείκτη κοπρανώδους ρύπανσης *E. coli*, η ποιότητα των δειγμάτων χαρακτηρίστηκε ως ικανοποιητική καθώς συνολικά η μέση τιμή των δειγμάτων ήταν σε συμφωνία με το σχετικό κριτήριο υγιεινής ( $< 1,7 \log \text{ cfu/g}$ ). Το ανώτατο όριο "M" του σχετικού κριτηρίου υγιεινής ξεπεράστηκε στο 56,0% (84) και 2,7% (4) των δειγμάτων για την OMX και τον δείκτη *E. coli* αντίστοιχα. Τα ποσοστά αυτά ήταν σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα ποσοστά που βρέθηκαν σε πρόσφατη μελέτη των Paulsen, Smulders, Aydin και Höck (2011).

Εξάλλου, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Συμβουλευτικής Επιτροπής για τα Τρόφιμα και τα Γαλακτοκομικά Προϊόντα (Advisory Committee for Food and

Dairy Products) της Εργαστηριακής Υπηρεσίας Δημόσιας Υγείας (Public Health Laboratory Service, PHLS) του Ηνωμένου Βασιλείου, 5,3% (8), 4,8% (7) και 12,0% (18) του συνόλου των δειγμάτων χοίρειου κιμά που εξετάστηκαν ήταν μη ικανοποιητικής μικροβιολογικής ποιότητας όσον αφορά στους μικροοργανισμούς-δείκτες υγιεινής *Listeria* spp. ( $\geq 10^2$  cfu/g), *E. coli* ( $\geq 10^2$  cfu/g) και *S. aureus* ( $\geq 10^2$ - $10^4$  cfu/g), αντίστοιχα. Ακόμα, τρία δείγματα (2,0%) βρέθηκαν ότι ήταν μη αποδεκτής μικροβιολογικής ποιότητας εξαιτίας του υψηλού πληθυσμού του μικροοργανισμού *S. aureus* ( $\geq 10^4$  cfu/g) (Gilbert και συν., 2000).

Από όλα τα προηγούμενα έγινε φανερό ότι, η κατανομή των πληθυσμών στην περίπτωση του χοίρειου κιμά που εξετάστηκε επιβεβαιώνει την ισχύουσα αποτύπωση της μικροβιακής οικολογίας ενός τέτοιου τροφίμου, με επικράτηση των ψευδομονάδων. Με τη βοήθεια εργαλείων της πολυμεταβλητής ανάλυσης και συγκεκριμένα μέσω της ΑΚΣ, οι μικροβιολογικές μεταβλητές αναδιατάχθηκαν σε κύριες συνιστώσες σχετιζόμενες με το χρόνο ζωής/διάρκεια εμπορίας (PC1), τις συνθήκες υγιεινής κατά τη διαδικασία παρασκευής του κιμά (PC2) αλλά και την υγιεινή του προσωπικού των καταστημάτων διάθεσης του προϊόντος (PC3). Γενικά, ένα ποσοστό αθροιστικής διακύμανσης άνω του 50%, όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση, θεωρείται ικανοποιητικό για τους εξαγόμενους συντελεστές, με την πρώτη κύρια συνιστώσα να αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο τμήμα της ολικής διακύμανσης των δεδομένων (Mataragas, Skandamis, Nychas, & Drosinos, 2007). Τέλος, σημειώνεται ο διαφορετικός ρόλος ψευδομονάδων, εντεροβακτηρίων, ολικών κολοβακτηριοειδών και *E. coli*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί χαρακτηρίζουν τη μικροβιολογική ποιότητα του νωπού κιμά, αλλά παρέχουν διαφορετικού είδους πληροφορίες: οι ψευδομονάδες σχετίζονται με το χρόνο ζωής, ενώ οι υπόλοιπες

μικροβιολογικές μεταβλητές σχετίζονται με τις συνθήκες υγιεινής κατά τη διαδικασία παρασκευής του προϊόντος.

Η ανωτέρω ανάλυση παρέχει το απαραίτητο μικροβιολογικό υπόβαθρο για την περαιτέρω διερεύνηση του επιπολασμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στο νωπό χοίρειο κιμά.





**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

# 4

## ΕΠΙΔΟΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ *Listeria monocytogenes*\*

### 4.1. Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1, ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* παρουσιάζει ικανότητα αύξησης σε χαμηλές θερμοκρασίες (παρ. 1.1.3.3.2.), οπότε το αρχικό επίπεδο πληθυσμού του βακτηρίου αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τον προσδιορισμό της μικροβιολογικής ασφάλειας τροφίμων που συντηρούνται υπό ψύξη (NACMCF, 2005). Η αρχική μίανση και ο αποικισμός των τελικών προϊόντων των επιχειρήσεων τροφίμων με τον *L. monocytogenes* οφείλονται στην ευρεία διάδοση του μικροοργανισμού στο περιβάλλον (παρ. 1.2.1.), στην ανθεκτικότητά του σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως είναι οι χαμηλές τιμές pH και οι υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (παρ. 1.1.3.3.3. και 1.1.3.3.4.), αλλά και στην ικανότητά του να επιβιώνει επί του μηχανολογικού εξοπλισμού και των επιφανειών επεξεργασίας των τροφίμων σχηματίζοντας βιοϋμένια (biofilms) (Chorianopoulos, Giaouris, Grigoraki, Skandamis, & Nychas, 2011· Gandhi & Chikindas, 2007· Poimenidou και συν., 2009). Αρκετά τρόφιμα (π.χ. γαλακτοκομικά, προϊόντα κρέατος, λαχανικά κ.ά.) έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση λοιμώξεων

---

\* Σχετική δημοσίευση παρόντος κεφαλαίου:

Andritsos, N. D., Mataragas, M., Karaberi, V., Paramithiotis, S., & Drosinos, E. H. (2012). Performance of three culture media commonly used for detecting *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 75, 1518-1523. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-556

από *L. monocytogenes* (παρ. 1.2.1). Κατά κύριο λόγο η ανθρώπινη λιστερίωση έχει συσχετιστεί με την κατανάλωση αλλαντικών και προϊόντων κρέατος, μη επαρκώς θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων (π.χ. hot dogs), ιχθυηρών και αλιευμάτων, αλλά και μαλακών τυριών. Άλλα τρόφιμα που κατά καιρούς έχουν σχετιστεί με κρούσματα λιστερίωσης στον άνθρωπο περιλαμβάνουν το γάλα και τα προϊόντα του (π.χ. βούτυρο), καθώς και τα ωμά λαχανικά και τις νωπές σαλάτες που παρασκευάζονται από αυτά (π.χ. λαχανοσαλάτα, πατατοσαλάτα) (FAO & WHO, 2004). Ο μικροοργανισμός αποτελεί σοβαρό παράγοντα κινδύνου για ευπαθείς ομάδες ατόμων, όπως είναι τα βρέφη, οι ηλικιωμένοι, οι έγκυες και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα (ICMSF, 1996· Mead και συν., 1999). Κατά τη διάρκεια μιας έξαρσης τροφιμογενούς λιστερίωσης στον Καναδά το 2008, η οποία προήλθε από κατανάλωση μiasμένων προϊόντων κρέατος, 57 άτομα νόσησαν ενώ 23 έχασαν τη ζωή τους. Η μέση ηλικία των θυμάτων ήταν 77 έτη (Anonymous, 2010). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την αδήριτη ανάγκη για μια αξιόπιστη και με υψηλό βαθμό εμπιστοσύνης μέθοδο ανίχνευσης του *L. monocytogenes* στα τρόφιμα. Η ανίχνευση όλων των ειδών *Listeria*, συμπληρωματικά της ανίχνευσης του παθογόνου *L. monocytogenes*, είναι σημαντική καθώς η απομόνωση *Listeria* spp. θα πρέπει να θεωρείται ως ένδειξη πιθανής μίανσης του τροφίμου με χαμηλή συγκέντρωση κυττάρων του *L. monocytogenes* (Greenwood, Willis, Doswell, Allen, & Pathak, 2005). Επίσης, είναι σημαντικός ο διαχωρισμός του συγκεκριμένου παθογόνου μικροοργανισμού από τα υπόλοιπα είδη, ώστε να ανιχνεύεται και να ποσοτικοποιείται και κατά αυτόν τον τρόπο να διασφαλίζεται η τήρηση των σχετικών μικροβιολογικών κριτηρίων για την ασφάλεια των τροφίμων.

Ο ISO έχει δημοσιεύσει πρότυπη μέθοδο για την ανίχνευση και απαρίθμηση του *L. monocytogenes* στα τρόφιμα, προτείνοντας ως επιλεκτικά μέσα καλλιέργειας του μικροοργανισμού τα Oxford και PALCAM (ISO, 1996, 1998). Το γεγονός όμως ότι τα προαναφερόμενα θρεπτικά υποστρώματα δεν είναι σε θέση να διαχωρίσουν το παθογόνο από τα υπόλοιπα είδη *Listeria* (παρ. 2.2.1.), έχει προσφάτως οδηγήσει στην πρόταση για ενσωμάτωση στην προηγούμενη μέθοδο χρωμογόνων διαγνωστικών υποστρωμάτων, όπως είναι τα ALOA, RAPID'L.mono ή OCLA (Becker και συν., 2006· Reissbrodt, 2004· Willis, Baalham, Greenwood, & Presland, 2006). Επειδή δε τα μη παθογόνα *Listeria* spp. συχνά αυξάνονται με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τον *L. monocytogenes* κατά τον εμπλουτισμό του τελευταίου, τα χρωμογόνα υποστρώματα υπερτερούν στην προσπάθεια απομόνωσης ενός μικρού αριθμού χαρακτηριστικών αποικιών του *L. monocytogenes* μεταξύ μη παθογόνων *Listeria* spp. Αυτοί ήταν και οι σημαντικότεροι λόγοι άλλωστε για τους οποίους υπήρξε αναθεώρηση των αρχικών προτύπων του ISO (ISO, 2004α, 2004β) ενώ έπεται συνέχεια. Παρ' όλα αυτά, πριν την υιοθέτηση οποιουδήποτε θρεπτικού υλικού οφείλεται να εξετάζεται η επίδοσή του, ούτως ώστε να αποδεικνύεται η αξιοπιστία του και η καταλληλότητά του όσον αφορά στην απομόνωση του μικροοργανισμού-στόχου. Οι Becker και συν. (2006) και Greenwood και συν. (2005) εξέτασαν και συνέκριναν τις επιδόσεις των υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L.mono με εκείνες των Oxford και PALCAM χρησιμοποιώντας φυσικώς μiasμένα (naturally contaminated) έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (π.χ. καπνιστό σολωμό, θερμικώς επεξεργασμένα αλλαντικά και κρέας), νωπό κρέας και αλλαντικά και έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες από καταστήματα λιανικής πώλησης. Ωστόσο, η επίδοση των θρεπτικών υποστρωμάτων εκφράστηκε μόνον ως ποσοστό επιβεβαιωμένων θετικών δειγμάτων για κάθε μέθοδο ανίχνευσης.

#### 4.2. Στόχος

Αντικείμενο της παρούσας πειραματικής ενότητας αποτέλεσε ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών επίδοσης τριών κοινώς χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υποστρωμάτων για την ανίχνευση του παθογόνου *L. monocytogenes*, με τελικό στόχο την αξιολόγηση και τη σύγκριση της επίδοσής τους.

#### 4.3. Πειραματικός σχεδιασμός

Δείγματα νοπού χοίρειου κιμά λαμβανόμενα από καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος (κρεοπωλεία, υπεραγορές), εξετάστηκαν ως προς την παρουσία του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* με παράλληλη καλλιέργεια σε τρία επιλεκτικά διαγνωστικά υποστρώματα (PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono) (παρ. 4.3.5.). Η επιβεβαίωση της παρουσίας του παθογόνου έγινε με διεξαγωγή βιοχημικών δοκιμών και PCR (παρ. 4.3.1.). Τα αποτελέσματα της επιβεβαίωσης οδήγησαν αρχικά στην εκτίμηση της πραγματικής τιμής επιπολασμού για το παθογόνο (παρ. 4.3.3.) και στη συνέχεια στην ταξινόμηση των δειγμάτων (π.χ. ψευδώς θετικά ή αρνητικά), με συνέπεια τον υπολογισμό των χαρακτηριστικών επίδοσης (π.χ. ευαισθησία, ικανότητα εξειδίκευσης κ.ά.) για τα θρεπτικά υποστρώματα (παρ. 4.3.2.). Επιπλέον, διενεργήθηκε πείραμα προσδιορισμού του ορίου ανίχνευσης 50% των χρωμογόνων υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L.mono (παρ. 4.3.6.). Με βάση τα ανωτέρω στοιχεία αξιολογήθηκε η επίδοση των εξεταζόμενων θρεπτικών υποστρωμάτων (παρ. 4.3.4.).

#### 4.3.1. Μικροβιολογική, βιοχημική και μοριακή ανάλυση

Σύμφωνα με όσα περιγράφηκαν από τους Andritsos, Paramithiotis, Drosinos και Mataragas (2010), ποσότητα 500 g νωπού χοίρειου κιμά ο οποίος παρασκευαζόταν επιτόπου τη στιγμή της διάθεσής του από αυτούσια τεμάχια κρέατος που είχαν συντηρηθεί υπό αερόβιες συνθήκες και ψύξη, λαμβάνονταν από 100 διαφορετικά κρεοπωλεία και υπεραγορές (σύνολο δειγμάτων  $n = 100$ ) και υποβάλλονταν σε μικροβιολογική ανάλυση για τον έλεγχο της παρουσίας του *L. monocytogenes*, σύμφωνα με τα πρότυπα ISO 11290-1 (μέθοδος ανίχνευσης) και ISO 11290-2 (μέθοδος απαρίθμησης) (ISO, 1996, 1998). Η μικροβιολογική ανάλυση περιελάμβανε την εις διπλούν παράλληλη χρήση των ακόλουθων τριών θρεπτικών υποστρωμάτων: PALCAM (Biolife), ALOA (Biolife) και RAPID'L.mono (Bio-Rad, Παρίσι, Γαλλία).

Συνολικά από τα θρεπτικά υποστρώματα απομονώθηκαν 296 χαρακτηριστικές αποικίες *Listeria* spp. (PALCAM) και *L. monocytogenes* (ALOA και RAPID'L.mono) (παρ. 2.2.1.). Η παρουσία του *L. monocytogenes* επιβεβαιώθηκε με τη διεξαγωγή βιοχημικών δοκιμών (παρ. 2.2.3.) (Gasanov, Hughes, & Hanson, 2005· Prentice & Neaves, 1992) και μοριακής μεθόδου ταυτοποίησης του παθογόνου για το σύνολο των απομονώσεων. Η μοριακή ανάλυση συνίστατο στη διεξαγωγή PCR (παρ. 2.2.4.) (D'Agostino και συν., 2004). Η βιοχημική και μοριακή επιβεβαίωση της παρουσίας του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο σύγκρισης (gold standard) για τον περαιτέρω υπολογισμό των χαρακτηριστικών επίδοσης των υποστρωμάτων.

## 4.3.2. Υπολογισμός χαρακτηριστικών επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων

Κάθε δείγμα χαρακτηρίστηκε θετικό ή αρνητικό ως προς την παρουσία του *L. monocytogenes* με βάση τα αποτελέσματα από την καλλιέργεια στα τρυβλία. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με τα αντίστοιχα αποτελέσματα επιβεβαίωσης του προτύπου σύγκρισης οδήγησε στην ταξινόμηση των δειγμάτων στις ακόλουθες κατηγορίες: i) αληθώς θετικά (true positive, *TP*), δηλαδή επιβεβαιωμένα θετικά δείγματα, ii) ψευδώς θετικά (false positive, *FP*), δηλαδή μη επιβεβαιωμένα θετικά δείγματα, iii) αληθώς αρνητικά (true negative, *TN*), δηλαδή επιβεβαιωμένα αρνητικά δείγματα και iv) ψευδώς αρνητικά (false negative, *FN*), δηλαδή μη επιβεβαιωμένα αρνητικά δείγματα. Η κατηγοριοποίηση αυτή των δειγμάτων επέτρεψε τον υπολογισμό των ακόλουθων χαρακτηριστικών επίδοσης: α) ευαισθησία (sensitivity, *Se*) μεθόδου/υποστρώματος, η οποία εκφράζει το ποσοστό των θετικών δειγμάτων που ανιχνεύονται ως θετικά από τη μέθοδο/υπόστρωμα, β) ικανότητα εξειδίκευσης (specificity, *Sp*) μεθόδου/υποστρώματος, η οποία εκφράζει το ποσοστό των αρνητικών δειγμάτων που ανιχνεύονται ως αρνητικά από τη μέθοδο/υπόστρωμα, γ) πιθανότητα ένα θετικό ή αρνητικό δείγμα, σύμφωνα με τη μέθοδο/υπόστρωμα, να είναι πράγματι θετικό (positive predictive value, *PPV*) ή αρνητικό (negative predictive value, *NPV*), δ) λόγος πιθανοφάνειας θετικού (positive likelihood ratio, *PLR*) και αρνητικού (negative likelihood ratio, *NLR*) αποτελέσματος, ε) λόγος διαγνωστικών πιθανοτήτων (diagnostic odds ratio, *DOR*) και λόγος πιθανοτήτων σφάλματος (error odds ratio, *EOR*) και στ) χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας (receiving operating characteristic curve, *ROC* curve) μεθόδου/υποστρώματος, η οποία δεικνύει τη σχέση μεταξύ *TP* και *FP* δειγμάτων για τη μέθοδο/υπόστρωμα, καθώς και η περιοχή κάτω από την καμπύλη *ROC* (area under curve, *AUC*), η οποία είναι δηλωτική της ακρίβειας της μεθόδου/υποστρώματος. Η τιμή *AUC* θα πρέπει να

είναι μεγαλύτερη της τιμής 0,5, διαφορετικά τιμές μικρότερες ή ίσες της τιμής-ορίου 0,5 υποδηλώνουν μηδενική διακριτική ικανότητα της μεθόδου/υποστρώματος. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή *AUC*, τόσο καλύτερη είναι η μέθοδος/υπόστρωμα στο να διαχωρίζει τα θετικά από τα αρνητικά δείγματα. Επίσης, σημαντικό είναι και το ελάχιστο απαιτούμενο σύνολο δειγμάτων για ανάλυση, ώστε η υπολογιζόμενη τιμή *AUC* να είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την τιμή 0,5 στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Τελικά, τα χαρακτηριστικά επίδοσης των θρεπτικών υποστρωμάτων υπολογίστηκαν με τη βοήθεια των παρακάτω εξισώσεων (Glas, Lijmer, Prins, Bonsel, & Bossuyt, 2003· Stevenson, 2011· Thrusfield, 2007· Thrusfield, Ortega, de Blas, Noordhuizen, & Frankena, 2001):

$$Se = TP / (TP + FN) \quad (4.1.)$$

$$Sp = TN / (TN + FP) \quad (4.2.)$$

$$PPV = TP / (TP + FP) \quad (4.3.)$$

$$NPV = TN / (TN + FN) \quad (4.4.)$$

$$PLR = TP / FP \quad (4.5.)$$

$$NLR = FN / TN \quad (4.6.)$$

$$DOR = (TP / FN) / (FP / TN) \quad (4.7.)$$

$$EOR = [Se / (1 - Se)] / [Sp / (1 - Sp)] \quad (4.8.)$$

Οι δείκτες επίδοσης *Se*, *Sp*, *PPV*, *NPV*, *PLR*, *NLR*, *DOR*, *EOR*, καμπύλη *ROC* και *AUC* καθώς και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης αυτών, όπως επίσης και ο ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός δειγμάτων για σύγκριση της τιμής *AUC* με την τιμή-όριο 0,5, υπολογίστηκαν με χρήση του λογισμικού Win Episcopo 2.0 (Thrusfield, 2007·



Thrusfield και συν., 2001) και του Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmont, Ουάσινγκτον, Η.Π.Α.).

#### 4.3.3. Φαινομενική και πραγματική τιμή επιπολασμού

Ο φαινομενικός επιπολασμός (apparent prevalence,  $ApP$ ) εκφράζει το ποσοστό δειγμάτων χοίρειου κινιά που ανιχνεύονται θετικά ως προς την παρουσία του *L. monocytogenes* σύμφωνα με την ακολουθούμενη μέθοδο, ενώ η πραγματική τιμή επιπολασμού (true prevalence,  $TrP$ ) αντιστοιχεί στο ποσοστό των επιβεβαιωμένων θετικών ( $TP$ ) και μη επιβεβαιωμένων αρνητικών ( $FN$ ) δειγμάτων με βάση το πρότυπο σύγκρισης σε μια δεδομένη χρονική στιγμή. Συνεπώς, η τιμή  $ApP$  προκύπτει ως αποτέλεσμα για καθεμία από τις ακολουθούμενες μεθόδους ανίχνευσης ξεχωριστά, χωρίς την περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων από την καλλιέργεια στα τρυβλία (PALCAM, ALOA ή RAPID'L.mono). Ωστόσο, μόνον τα υποστρώματα ALOA και RAPID'L.mono επιτρέπουν τη διάκριση του *L. monocytogenes* μεταξύ των *Listeria* spp., καθώς το PALCAM ανιχνεύει *Listeria* spp. οπότε απαιτείται επιπλέον διαδικασία για τη διαπίστωση της παρουσίας του παθογόνου *L. monocytogenes*. Η τιμή  $TrP$  προκύπτει από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων επιβεβαίωσης όλων των μεθόδων. Απουσία επιβεβαίωσης, η τιμή  $TrP$  δύναται να υπολογιστεί από την τιμή  $ApP$  όταν οι τιμές  $Se$  και  $Sp$  της χρησιμοποιούμενης μεθόδου είναι γνωστές, με τη βοήθεια της ακόλουθης εξίσωσης (Stevenson, 2011· Thrusfield, 2007):

$$TrP = (ApP + Sp - 1) / (Se + Sp - 1) \quad (4.9)$$

Οι τιμές  $ApP$  και  $TrP$ , αλλά και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης των τιμών αυτών, υπολογίστηκαν με χρήση του λογισμικού Win Episcopo 2.0 (Thrusfield, 2007· Thrusfield και συν., 2001) και του Microsoft Excel 2007.

#### 4.3.4. Στατιστική ανάλυση

Οι δείκτες επίδοσης *AUC* των τριών μεθόδων ανίχνευσης του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* συγκρίθηκαν μεταξύ τους χρησιμοποιώντας την ανά ζεύγη δοκιμή *t*-test, ώστε να δειχθεί ενδεχόμενη σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Η στατιστική δοκιμή  $\chi^2$  του McNemar (McNemar's chi-square test statistic) χρησιμοποιήθηκε για να καθοριστεί αν οι διαφορές μεταξύ των μεθόδων ήταν στατιστικά σημαντικές (Siegel, 1956). Η δοκιμή αυτή δεν αποφαινεται για το αν δύο μέθοδοι είναι ισοδύναμες ή όχι, αλλά δείχνει αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων. Η υπολογιζόμενη τιμή  $\chi^2$  συγκρίνεται με την οριακή τιμή  $\chi^2$  στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Υπολογιζόμενη τιμή μεγαλύτερη της οριακής υποδηλώνει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων. Η στατιστική ανάλυση διεξάχθηκε με χρήση του SPSS v15.0 και του Microsoft Excel 2007.

#### 4.3.5. Έλεγχος πολλαπλών δοκιμών και παράλληλη χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων ALOA και RAPID 'L.mono

Ο έλεγχος πολλαπλών δοκιμών (multiple testing) συνίσταται στη χρησιμοποίηση δύο ή περισσότερων θρεπτικών υποστρωμάτων για τον έλεγχο της παρουσίας του μικροοργανισμού-στόχου στο δείγμα, ενώ διακρίνεται σε παράλληλο (parallel) και σε σειρά (serial) έλεγχο. Ο παράλληλος έλεγχος περιλαμβάνει την ταυτόχρονη χρήση δύο ή περισσότερων θρεπτικών υποστρωμάτων για τον έλεγχο στον ίδιο χρόνο του αυτού δείγματος. Το δείγμα χαρακτηρίζεται θετικό ως προς την παρουσία του παθογόνου όταν τουλάχιστον ένα από τα δύο υποστρώματα είναι θετικό. Στον έλεγχο σε σειρά, τα δείγματα ελέγχονται αρχικά με ένα υπόστρωμα υψηλής ευαισθησίας και στη συνέχεια επιλέγονται μόνον τα θετικά δείγματα, τα οποία ελέγχονται εκ νέου με

ένα υπόστρωμα υψηλής ικανότητας εξειδίκευσης για επιβεβαίωση των θετικών δειγμάτων.

Στην παρούσα μελέτη ακολουθήθηκε ο παράλληλος έλεγχος πολλαπλών δοκιμών. Τα δύο χρωμογόνα υποστρώματα ALOA και RAPID'L.mono, όπως προαναφέρθηκε, είναι σε θέση να χρησιμοποιηθούν για την άμεση ανίχνευση του παθογόνου *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα *Listeria* spp., μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τον απαιτούμενο φόρτο εργασίας. Για τον λόγο αυτό, τα αποτελέσματα ανίχνευσης των ALOA και RAPID'L.mono συνδυάστηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό της συνδυαστικής *Se* και *Sp*. Έτσι, υπολογίστηκαν δύο επιπλέον πιθανότητες (Thrusfield, 2007): α) η πιθανότητα ενός αρνητικού δείγματος σύμφωνα με τη μέθοδο/υπόστρωμα να είναι τελικά θετικό ως προς την παρουσία του παθογόνου (*P*, εξ. 4.10.) και β) η πιθανότητα της μεθόδου/υποστρώματος να αποτύχει να ανιχνεύσει τουλάχιστον ένα επιβεβαιωμένο θετικό δείγμα (*P<sub>f</sub>*, εξ. 4.11.).

$$P = [TrP \times (1 - \text{συνδυαστική } Se)] / ([TrP \times (1 - \text{συνδυαστική } Se)] + [(1 - TrP) \times \text{συνδυαστική } Sp]) \quad (4.10.)$$

$$P_f = (1 - \text{συνδυαστική } Se)^{TrP \times 100} \quad (4.11.)$$

Ο λόγος πιθανοφάνειας εκφράζεται, όπως είδαμε, από το λόγο της πιθανότητας να συμβεί ένα γεγονός προς την πιθανότητα του γεγονότος να μη συμβεί. Στην περίπτωση αυτή ορίζονται (Simon, 2008· Thrusfield, 2007): α) η πιθανότητα προ-δοκιμής (pre-test probability) της παρουσίας του *L. monocytogenes*, δηλαδή το ποσοστό θετικών δειγμάτων πριν τον έλεγχο με κάποιο υπόστρωμα (επιπολασμός), β) ο λόγος της πιθανότητας παρουσίας του παθογόνου προς την πιθανότητα απουσίας [δηλ. επιπολασμός / (1 - επιπολασμός) ή αλλιώς έκφραση της πιθανοφάνειας ένα δείγμα να είναι θετικό πριν τον έλεγχο με κάποιο υπόστρωμα] και γ) ο λόγος της

πιθανότητας παρουσίας του παθογόνου προς την πιθανότητα απουσίας μετά τη δοκιμή. Η τελευταία αυτή παράμετρος μπορεί επίσης να καθοριστεί από τα *PLR* και *NLR* πολλαπλασιάζοντας αντίστοιχα με τις πιθανότητες που αναφέρθηκαν στο (β) [δηλ. επιπολασμός / (1 – επιπολασμός) × *PLR* ή *NLR*].

#### 4.3.6. Καθορισμός ορίου ανίχνευσης

Για τον καθορισμό του ορίου ανίχνευσης 50% (50% endpoint limit of detection,  $LOD_{50}$ ) των θρεπτικών υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L.mono, καθώς και για τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας και της αποτελεσματικότητας των επιδόσεων τους (Hitchins, 1989· Twedt, Hitchins, & Prentice, 1994), διενεργήθηκε πείραμα ανίχνευσης του *L. monocytogenes* σε ηθελημένα ενοφθαλμισμένα δείγματα κιμά. Η τιμή  $LOD_{50}$  εκφράζει τη συγκέντρωση (cfu/g) του μικροοργανισμού η οποία αντιστοιχεί σε 50% πιθανότητα ανίχνευσης θετικού δείγματος από τη συγκεκριμένη μέθοδο που ακολουθείται. Η τιμή  $LOD_{50}$  δείχνει την απόσταση και το βαθμό εμπιστοσύνης της μεθόδου από τη θεωρητική μέγιστη τιμή 1 cfu/25 g ή 0,04 cfu/g δείγματος. Εάν η τιμή  $LOD_{50}$  ή το όριο εμπιστοσύνης της είναι σημαντικά μεγαλύτερα της θεωρητικής μέγιστης τιμής, η αποδοτικότητα της μεθόδου είναι μικρότερη της ιδανικής διότι εκτός των αληθώς αρνητικών (*TN*) ανιχνεύονται και ψευδώς αρνητικά (*FN*) δείγματα (FDA, 2006).

Δείγματα νοπού χοίρειου κιμά (100 g) ενοφθαλμίστηκαν με στέλεχος *L. monocytogenes* που απομονώθηκε από το προϊόν (παρ. 4.3.1.). Ο αρχικός πληθυσμός του παθογόνου ήταν  $1,5 \times 10^9$  cfu/ml. Τα επίπεδα ενοφθαλμίσεως ήταν πέντε με τις ακόλουθες τιμές: 15,0, 1,5, 0,15, 0,015 και 0,0015 cfu/g. Πραγματοποιήθηκαν έξι επαναλήψεις για κάθε επίπεδο ενοφθαλμίσεως. Επίσης, έξι επιπλέον μη ενοφθαλμισμένα δείγματα κιμά 100 g χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας. Η

μικροβιολογική ανάλυση διεξάχθηκε όπως περιγράφηκε προηγούμενα (παρ. 4.3.1.) με παράλληλη χρήση των θρεπτικών υλικών ALOA και RAPID'L.mono, ενώ ακολούθησε η επιβεβαίωση της παρουσίας του *L. monocytogenes* με βιοχημικές δοκιμές και PCR. Η αναλογία των επαναλήψεων στις οποίες ανιχνεύθηκε το παθογόνο σε κάθε επίπεδο ενοφθαλμίσματος, χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της τιμής  $LOD_{50}$  και του διαστήματος εμπιστοσύνης της με τη βοήθεια της γενικευμένης μεθόδου των Spearman-Kärber για έκδοση του Microsoft Excel 2007 (Hitchins, 2006). Η στατιστική δοκιμή του Moran (Moran's test statistic) χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση του πειράματος σύμφωνα με τον Jarvis (2008) με εφαρμογή στο Microsoft Excel 2007.

#### 4.4. Αποτελέσματα

##### 4.4.1. Επιπολασμός παθογόνου και χαρακτηριστικά επίδοσης θρεπτικών υποστρωμάτων

Από την καλλιέργεια στα τρυβλία για την απαρίθμηση αποικιών του *L. monocytogenes* προέκυψε ότι η συγκέντρωση του μικροοργανισμού στα δείγματα χοίρειου κιμά ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου (10 cfu/g), μετά και από την επιφανειακή επίστρωση 1 ml ομογενοποιημένου δείγματος σε τρία τρυβλία του ίδιου υποστρώματος (δηλ. 0,33 ml σε κάθε τρυβλίο). Το παθογόνο ανιχνεύθηκε σε ποσοστό δειγμάτων 16, 19 και 26% με βάση τα υποστρώματα PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono αντίστοιχα (*ApP*). Η επιβεβαίωση της παρουσίας του μικροοργανισμού έδειξε την ύπαρξη *FP* και *FN* δειγμάτων. Κατά συνέπεια, ο συνολικός επιπολασμός του παθογόνου στο χοίρειο κιμά ήταν τελικά 22% (*TrP*). Ο αριθμός των δειγμάτων που ταξινομήθηκαν σε καθεμία από τις προαναφερόμενες κατηγορίες (παρ. 4.3.2) παρουσιάζεται στον Πίνακα 8. Από τα δεδομένα του πίνακα

αυτού και με τη βοήθεια των εξισώσεων 4.1. έως 4.8., υπολογίστηκαν τα χαρακτηριστικά επίδοσης των τριών εξεταζόμενων θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του *L. monocytogenes* στα τρόφιμα και δη σε νωπό κρέας και προϊόντα του (Πίνακας 9).

**Πίνακας 8.** Αριθμός και ταξινόμηση δειγμάτων νωπού χοίρειου κιμά σε κατηγορίες<sup>α</sup>, μετά την ανίχνευση στα θρεπτικά υποστρώματα PALCAM, ALOA, RAPID'L.mono του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* και την επιβεβαίωση παρουσίας/απουσίας του παθογόνου με βάση γνωστό πρότυπο σύγκρισης<sup>β</sup>.

Υπόστρωμα ανίχνευσης	Πρότυπο σύγκρισης	
	παρουσία μικροοργανισμού	απουσία μικροοργανισμού
<i>PALCAM</i>		
παρουσία μικροοργανισμού	16 (TP)	0 (FP)
απουσία μικροοργανισμού	6 (FN)	78 (TN)
<i>ALOA</i>		
παρουσία μικροοργανισμού	15 (TP)	4 (FP)
απουσία μικροοργανισμού	7 (FN)	74 (TN)
<i>RAPID'L.mono</i>		
παρουσία μικροοργανισμού	17 (TP)	9 (FP)
απουσία μικροοργανισμού	5 (FN)	69 (TN)

<sup>α</sup> Κατηγορίες δειγμάτων χοίρειου κιμά, όπως περιγράφονται σχετικά στην παρ. 4.3.2.: αληθώς θετικά (TP) δείγματα: δηλ. παρουσία μικροοργανισμού & επιβεβαίωση παρουσίας μικροοργανισμού, ψευδώς θετικά (FP) δείγματα: δηλ. παρουσία μικροοργανισμού & επιβεβαίωση απουσίας μικροοργανισμού, ψευδώς αρνητικά (FN) δείγματα: δηλ. απουσία μικροοργανισμού & επιβεβαίωση παρουσίας μικροοργανισμού, αληθώς αρνητικά (TN) δείγματα: δηλ. απουσία μικροοργανισμού & επιβεβαίωση απουσίας μικροοργανισμού.

<sup>β</sup> Ως πρότυπο σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε η βιοχημική και μοριακή (PCR) επιβεβαίωση της παρουσίας του *L. monocytogenes*, όπως αναφέρεται στην παρ. 4.3.1.

Το άγαρ RAPID'L.mono παρουσίασε τη μεγαλύτερη *Se* αλλά τη μικρότερη *Sp*, δίνοντας αρκετά *FP* αποτελέσματα κατά την ανίχνευση του *L. monocytogenes*. Αντίθετα, το PALCAM παρουσίασε την υψηλότερη δυνατή *Sp*, με συνέπεια να μην προκύπτουν *FP* αποτελέσματα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το υπόστρωμα PALCAM έχει σχεδιαστεί να ανιχνεύει *Listeria* spp. Ως εκ τούτου (*FP* = 0), οι δείκτες *PLR*, *DOR* και *EOR* δεν μπόρεσαν να προσδιοριστούν για το συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό. Ακόμα, το PALCAM παρουσίασε την υψηλότερη τιμή *PPV*, καθώς ο παρονομαστής στην εξίσωση (4.3.) ήταν ίσος με τον αριθμητή.

**Πίνακας 9.** Χαρακτηριστικά επίδοσης τριών επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων (PALCAM, ALOA, RAPID'L.mono) που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του *Listeria monocytogenes* σε νωπό κρέας και προϊόντα του.

Παράμετρος επίδοσης <sup>α</sup>	PALCAM		ALOA		RAPID'L.mono	
	Μέση τιμή	95% διάστημα εμπιστοσύνης	Μέση τιμή	95% διάστημα εμπιστοσύνης	Μέση τιμή	95% διάστημα εμπιστοσύνης
<i>Se</i> (%)	72,7	54,1-91,3	68,2	48,7-87,6	77,3	59,8-94,8
<i>Sp</i> (%)	100,0	95,3-100,0	94,9	90,0-99,8	88,5	81,4-95,6
<i>PPV</i> (%)	100,0	95,5-100,0	78,9	60,6-97,3	65,4	47,1-83,7
<i>NPV</i> (%)	92,9	87,4-98,4	91,4	85,2-97,5	93,2	87,5-99,0
<i>PLR</i>	N/D <sup>β</sup>	N/D	13,30	3,73-47,38	6,70	2,91-15,44
<i>NLR</i>	0,27	0,11-0,65	0,34	0,15-0,73	0,26	0,10-0,69
<i>DOR</i>	N/D	N/D	39,64	7,10-107,81	26,07	5,53-66,47
<i>EOR</i>	N/D	N/D	0,12	0,02-0,32	0,44	0,09-1,13
<i>AUC</i>	0,86	0,78-0,92	0,82	0,73-0,89	0,83	0,74-0,90
<i>ApP</i> (%)	16,0	8,8-23,2	19,0	11,3-26,7	26,0	17,4-34,6
<i>TrP</i> (%)	22,0	13,9-30,1	22,0	13,9-30,1	22,0	13,9-30,1

<sup>α</sup> Οι παράμετροι-χαρακτηριστικά επίδοσης περιγράφονται αναλυτικά στην παρ. 4.3.2.

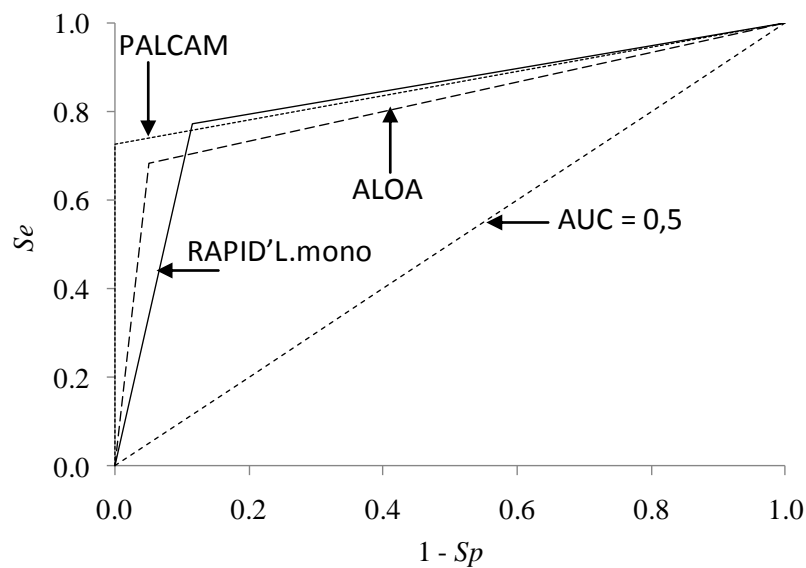
<sup>β</sup> N/D: (not defined/undefined) απροσδιόριστο

Αναφορικά με το ALOA, το συγκεκριμένο επιλεκτικό μέσο επέδειξε μεν τη μικρότερη  $Se$  μεταξύ των τριών υποστρωμάτων, ωστόσο παρείχε λιγότερα  $FP$  αποτελέσματα σε σχέση με το RAPID'L.mono. Οι δείκτες  $PLR$  και  $DOR$  για το ALOA ήταν μεγαλύτεροι των αντίστοιχων δεικτών για το RAPID'L.mono, αλλά το αντίθετο παρατηρήθηκε για το δείκτη  $EOR$ . Γενικά, όλα τα εξεταζόμενα υποστρώματα παρουσίασαν σχετικά υψηλές και χαμηλές τιμές  $NPV$  και  $NLR$  αντίστοιχα.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό επίδοσης των διαγνωστικών μεθόδων είναι η καμπύλη  $ROC$ , η οποία αποτελεί τη γραφική παράσταση της  $Se$  (που εκφράζει τα  $TP$  αποτελέσματα) σε σχέση με την τιμή  $1 - Sp$  (που εκφράζει τα  $FP$  αποτελέσματα). Στο Σχήμα 6 φαίνονται οι καμπύλες  $ROC$  των τριών εξεταζόμενων διαγνωστικών μεθόδων. Το γράφημα επιβεβαιώνει τα προηγούμενα ευρήματα, ότι δηλαδή το άγαρ RAPID'L.mono ήταν το περισσότερο ευαίσθητο εκ των τριών υποστρωμάτων, ενώ το PALCAM παρουσίασε την υψηλότερη  $Sp$ . Παρ' όλα αυτά, το πιο σημαντικό σε μια καμπύλη  $ROC$  είναι η περιοχή κάτω από αυτήν ( $AUC$ ). Η περιοχή  $AUC$  εκφράζει την ακρίβεια της διαγνωστικής μεθόδου, η οποία όπως αναφέρθηκε (παρ. 4.3.2.) θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη της τιμής 0,5. Οι τιμές  $AUC$  για κάθε υπόστρωμα (PALCAM = 0,864, ALOA = 0,815, RAPID'L.mono = 0,829) ήταν σχετικά υψηλές ενώ και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης των τιμών αυτών δεν εμπεριείχαν την τιμή 0,5. Η σύγκριση ανά ζεύγη μεταξύ των τιμών  $AUC$  δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p > 0,05$ ). Εξάλλου, βρέθηκε ότι ο ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός δειγμάτων προς ανάλυση, ώστε η τιμή  $AUC$  να είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την τιμή 0,5 στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05, ήταν 58, 80 και 72 για τα PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono αντίστοιχα. Δεδομένου λοιπόν ότι ο συνολικός αριθμός δειγμάτων που αναλύθηκαν ήταν  $n = 100$ , συμπεραίνεται ότι οι προσδιοριζόμενες



τιμές  $AUC$  είναι έγκυρες. Τέλος, η στατιστική δοκιμή  $\chi^2$  του McNemar έδειξε σημαντική διαφορά ( $p = 0,031$ ) μεταξύ των αληθώς θετικών αποτελεσμάτων των PALCAM ( $TP = 16$ ) και RAPID'L.mono ( $TP = 26$ ), ενώ για τους υπόλοιπους συνδυασμούς υποστρωμάτων (PALCAM-ALOA και ALOA-RAPID'L.mono) δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές ( $p > 0,05$ ) κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων τους.



**Σχήμα 6.** Χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας και περιοχή κάτω από αυτήν για τρία επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα ανίχνευσης του *Listeria monocytogenes*.

#### 4.4.2. Παράλληλος έλεγχος με χρήση των θρεπτικών υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L.mono

Τα χαρακτηριστικά επίδοσης από την παράλληλη χρήση των θρεπτικών υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L.mono ήταν τα εξής: α) συνδυασμένη  $Se = 92,8\%$ , β) συνδυασμένη  $Sp = 83,9\%$ , γ) συνδυασμένη  $PPV = 62,0\%$  και δ) συνδυασμένη  $NPV = 97,6\%$ . Έτσι, με τη βοήθεια των εξισώσεων 4.10. και 4.11. προέκυψε ότι:  $P = 2,4\%$  (από  $8,6\%$  και  $6,7\%$  για μεμονωμένη χρήση των ALOA και RAPID'L.mono αντίστοιχα) και  $P_f = 7,3 \times 10^{-26}$  (αμελητέα πιθανότητα).

Ο συνολικός επιπολασμός του *L. monocytogenes* στο χοίρειο κιμά ( $TrP = 22\%$  ή 0,22), μπορεί να θεωρηθεί ως η πιθανότητα παρουσίας του παθογόνου πριν τον έλεγχο με κάποιο υπόστρωμα (pre-test probability). Οι αντίστοιχες πιθανότητες παρουσίας του παθογόνου πριν τον έλεγχο με κάποιο υπόστρωμα (pre-test odds) ήταν ίσες με 0,28 [ $= 0,22/(1 - 0,22)$ ]. Έτσι, οι πιθανότητες παρουσίας του παθογόνου μετά τον έλεγχο με τα ALOA και RAPID'L.mono (post-test odds) όταν χρησιμοποιούνταν η αντίστοιχη τιμή *PLR* (Πίνακας 9) ήταν 3,75 ( $= 0,28 \times 13,30$ ) (ALOA) και 1,89 ( $= 0,28 \times 6,70$ ) (RAPID'L.mono). Σε περίπτωση χρησιμοποίησης της τιμής *NLR* για τα υποστρώματα, οι πιθανότητες ήταν 0,10 ( $= 0,28 \times 0,34$ ) και 0,07 ( $= 0,28 \times 0,26$ ) για τα ALOA και RAPID'L.mono αντίστοιχα.

#### 4.4.3. Όριο ανίχνευσης

Τα αποτελέσματα της αναλογίας των επαναλήψεων όπου ανιχνεύθηκε το παθογόνο *L. monocytogenes* σε κάθε επίπεδο ενοφθαλμίσματος, παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Τα αποτελέσματα ταυτίζονταν για τα τρυβλία ALOA και RAPID'L.mono. Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα, η τιμή  $LOD_{50}$  υπολογίστηκε σε 0,15 cfu/g (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 0,04-0,53 cfu/g) ή 3,8 cfu/25 g (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 1,0-13,3 cfu/25 g).

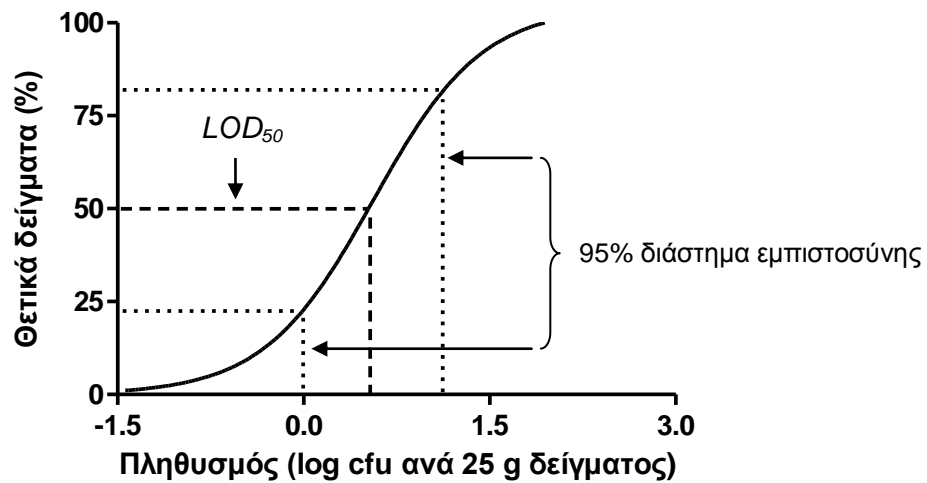
Η στατιστική δοκιμή του Moran για την επικύρωση του πειράματος ενοφθαλμισμού, δεν έδειξε καμιά στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p > 0,05$ ) μεταξύ παρατηρούμενων και αναμενόμενων αποτελεσμάτων ανίχνευσης για τα υποστρώματα ALOA και RAPID'L.mono, βάσει της θεωρητικής μέγιστης τιμής (δηλ. 1 cfu/25 g ή 0,04 cfu/g).

**Πίνακας 10.** Ανάκτηση του *Listeria monocytogenes* από νωπό χοίρειο κιμά ενοφθαλμισμένου με διαφορετικά επίπεδα πληθυσμού του μικροοργανισμού.

Αποτέλεσμα <sup>α</sup>	Μάρτυρας	Επίπεδο ενοφθαλμίσιματος (cfu/g)				
		0,0015	0,015	0,15	1,5	15,0
Θετικό	0	0	1	2	6	6
Αρνητικό	6	6	5	4	0	0
Σύνολο επαναλήψεων	6	6	6	6	6	6

<sup>α</sup> Μετά από παράλληλη καλλιέργεια σε τρυβλία ALOA και RAPID'L.mono

Με βάση τα προηγούμενα, η προκύπτουσα καμπύλη δόσης-απόκρισης για τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.



**Σχήμα 7.** Καμπύλη δόσης-απόκρισης για την ανίχνευση του *Listeria monocytogenes* με βάση την επίδοση των θρεπτικών υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L.mono.

#### 4.5. Συζήτηση

Όπως προαναφέρθηκε, η *Se* εκφράζει την πιθανότητα ένα δείγμα να ανιχνευθεί ως θετικό, δεδομένης της παρουσίας του μικροοργανισμού-στόχου σε αυτό, ενώ η *Sr* αντιστοιχεί στην πιθανότητα ένα δείγμα να ανιχνευθεί ως αρνητικό, δεδομένης της απουσίας του μικροοργανισμού-στόχου από αυτό. Ο δείκτης *Se* ενός θρεπτικού υποστρώματος οφείλει να είναι υψηλός αν το προς ανίχνευση τροφιμογενές παθογόνο αποτελεί σοβαρό παράγοντα κινδύνου για τον άνθρωπο. Στην παρούσα μελέτη υπήρχαν περιπτώσεις όπου όλα τα υποστρώματα, με εξαίρεση το PALCAM, κατέληξαν στη λανθασμένη ανίχνευση του τροφιμογενούς παθογόνου *L. monocytogenes*, παρέχοντας *FP* αποτελέσματα. Παρ' όλα αυτά, αν ο στόχος είναι η ανίχνευση του μικροοργανισμού-στόχου, όπως προηγούμενα αναφέρθηκε, ο αριθμός *FP* αποτελεσμάτων αποτελεί λιγότερο κρίσιμη παράμετρο από ότι η *Se*. Οι δείκτες *Se* και *Sr* είναι αρκετά σταθεροί, γι' αυτό το λόγο χαρακτηρίζουν μια μέθοδο ανίχνευσης δίνοντας με αυτόν τον τρόπο μια γενική εκτίμηση της ποιότητας των αποτελεσμάτων της (SISA, 2011· Thrusfield, 2007).

Οι αμέσως επόμενοι χρήσιμοι δείκτες είναι οι τιμές *PPV* και *NPV*, οι οποίες εκφράζουν αντίστοιχα την πιθανότητα παρουσίας και απουσίας του παθογόνου μετά τον έλεγχο με κάποιο θρεπτικό υπόστρωμα. Το μειονέκτημα των δεικτών αυτών είναι η εξάρτησή τους από τον επιπολασμό του μικροοργανισμού. Για το λόγο αυτό λοιπόν, χρησιμοποιούνται οι δείκτες *PLR*, *NLR*, *DOR* και *EOR*, οι τιμές των οποίων είναι ανεξάρτητες από τον επιπολασμό του παθογόνου.

Ο λόγος πιθανοφάνειας εκφράζει την πιθανότητα το αποτέλεσμα της μεθόδου να προέρχεται από θετικό (*PLR*) ή αρνητικό (*NLR*) ως προς την παρουσία του *L. monocytogenes* δείγμα. Επομένως, το θρεπτικό υπόστρωμα με τη μεγαλύτερη τιμή *PLR* συνηγορεί περισσότερο υπέρ της παρουσίας του παθογόνου στην περίπτωση

εμφάνισης θετικού αποτελέσματος. Αντίθετα, το καλύτερο υπόστρωμα για τον αποκλεισμό της παρουσίας του παθογόνου σε περίπτωση εμφάνισης αρνητικού αποτελέσματος, είναι εκείνο με τη χαμηλότερη τιμή *NLR*. Ο δείκτης *DOR* δεικνύει το βαθμό συσχέτισης μεταξύ του αποτελέσματος της μεθόδου και της κατάστασης του δείγματος όσον αφορά στην παρουσία/απουσία του *L. monocytogenes* (Glas και συν., 2003). Για παράδειγμα, η τιμή του δείκτη *DOR* για το ALOA υπολογίστηκε σε 39,64, το οποίο μεταφράζεται σε περίπου 40 φορές περισσότερες πιθανότητες να ανιχνευθεί θετικό δείγμα μεταξύ δειγμάτων όπου πράγματι υπάρχει παρουσία του *L. monocytogenes*, παρά μεταξύ δειγμάτων όπου δεν υπάρχει παρουσία του μικροοργανισμού. Από την άλλη, ο δείκτης *EOR* δείχνει αν η πιθανότητα λανθασμένης ταξινόμησης ενός δείγματος είναι μεγαλύτερη στη θετική ή στη μη-θετική ομάδα δειγμάτων. Έτσι, αν ο συγκεκριμένος δείκτης είναι μικρότερος της μονάδας, τότε η πιθανότητα λανθασμένης ταξινόμησης είναι μεγαλύτερη στη μη-θετική ομάδα δειγμάτων. Σε αντίθεση, αν ο *EOR* είναι μεγαλύτερος της μονάδας, τότε η πιθανότητα λανθασμένης ταξινόμησης ενός δείγματος είναι μεγαλύτερη στη θετική ομάδα δειγμάτων (SISA, 2011). Στην περίπτωση των υποστρωμάτων που εξετάστηκαν, ο δείκτης *EOR* των ALOA και RAPID'L.mono ήταν μικρότερος της μονάδας, επιβεβαιώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα υποστρώματα ήταν καλύτερα στο να συνηγορούν υπέρ της παρουσίας του *L. monocytogenes*.

Ακόμα ένα χαρακτηριστικό εκτίμησης της επίδοσης των χρησιμοποιούμενων μεθόδων για την ανίχνευση του *L. monocytogenes* είναι η καμπύλη *ROC*, η οποία δείχνει τη σχέση μεταξύ *TP* και *FP* δειγμάτων. Η τιμή *AUC* της καμπύλης *ROC* είναι δηλωτική της ακρίβειας της μεθόδου και λαμβάνει τιμές μεταξύ μηδέν (0) και μονάδας (1). Η τιμή *AUC* θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη της τιμής 0,5, διαφορετικά

σε οποιαδήποτε άλλη περίπτωση (δηλ.  $AUC \leq 0,5$ ) η μέθοδος χαρακτηρίζεται από μηδενική διακριτική ικανότητα. Επιπλέον, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή  $AUC$ , τόσο καλύτερη είναι η μέθοδος στο να διαχωρίζει τα θετικά από τα αρνητικά δείγματα. Οι τιμές  $AUC$  και των τριών μεθόδων βρέθηκαν αρκετά μεγαλύτερες της τιμής 0,5, ενώ η μεταξύ τους σύγκριση δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές ( $p > 0,05$ ) διαφορές, γεγονός που συνεπάγεται ότι όλα τα υποστρώματα ήταν σε θέση να διαχωρίσουν ικανοποιητικά τα θετικά από τα αρνητικά δείγματα.

Ο επιπολασμός του *L. monocytogenes* με βάση τη μεμονωμένη καλλιέργεια στα θρεπτικά υποστρώματα (*ApP*) παρουσίασε διαφορές, ενώ σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ PALCAM και RAPID'L.mono όσον αφορά στα προσδιοριζόμενα θετικά αποτελέσματα των δύο μεθόδων, με συνέπεια ενδεχόμενες λανθασμένες εκτιμήσεις και συμπεράσματα σχετικά με τον επιπολασμό του παθογόνου στο προϊόν. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ικανότητα των ALOA και RAPID'L.mono για άμεση διάκριση του *L. monocytogenes*, την απουσία σημαντικών διαφορών μεταξύ των αποτελεσμάτων αυτών των δύο μεθόδων, αλλά και την αυξημένη ευαισθησία του RAPID'L.mono, συνέστησε τον πολλαπλό παράλληλο έλεγχο με ταυτόχρονη χρήση των ALOA και RAPID'L.mono. Η προσέγγιση αυτή αυξάνει τις τιμές  $Se$  και  $NPV$ , το οποίο είναι επιθυμητό σε περιπτώσεις όπου επιδιώκεται η ανίχνευση του παθογόνου, από την άλλη όμως οδηγεί σε μείωση των τιμών  $Sr$  και  $PPV$ . Με αυτόν τον τρόπο, η πιθανότητα μη ανίχνευσης του μικροοργανισμού-στόχου μειώνεται, αλλά η πιθανότητα να προκύψουν  $FP$  αποτελέσματα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με πριν. Βέβαια, η τελευταία αυτή πιθανότητα δεν είναι τόσο κρίσιμη όσο η πιθανότητα μη ανίχνευσης του παθογόνου, οπότε ενδεχόμενη αύξηση των  $FP$  δειγμάτων κρίνεται ως «το μη χείρον βέλτιστον». Ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ελέγχου δειγμάτων και ερευνών πεδίου για την ανίχνευση

ενός τροφιμογενούς παθογόνου, χρησιμοποιούνται διαγνωστικές μέθοδοι αυξημένης *Se* σε βάρος της *Sp* (Thrusfield, 2007). Αυτό συμβαίνει καθώς σκοπός της έρευνας δεν είναι η ακριβής και οριστική διάγνωση της παρουσίας του μικροοργανισμού-στόχου, αλλά η ανίχνευση όσο το δυνατόν περισσότερων περιπτώσεων παρουσίας του. Έτσι εξηγείται γιατί η αυξημένη αναλογία *FP* δειγμάτων, ως αποτέλεσμα της αυξημένης *Se*, δεν αποτελεί τόσο κρίσιμη παράμετρο όσο η αυξημένη αναλογία *FN* δειγμάτων, η οποία προκύπτει συνεπεία της αυξημένης *Sp*. Οι συνδυαστικές τιμές *Se* (92,8%) και *P* (2,4%) για τα ALOA και RAPID'L.mono, αποδεικνύουν την προστιθέμενη αξία του παράλληλου ελέγχου για την ανίχνευση οποιουδήποτε τροφιμογενούς παθογόνου μικροοργανισμού σε συγκεκριμένο προϊόν, με ταυτόχρονη χρήση τουλάχιστον δύο χρωμογόνων θρεπτικών υποστρωμάτων.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η τιμή  $LOD_{50}$  των προαναφερόμενων υποστρωμάτων δεν ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ( $p > 0,05$ ) της θεωρητικής μέγιστης τιμής (1 cfu/25 g δείγματος), οπότε τα ALOA και RAPID'L.mono δεν αποδίδουν λιγότερο από το ιδανικό όσον αφορά στην ανίχνευση του *L. monocytogenes*. Για την ακρίβεια, η θεωρητική μέγιστη επίδοση εμπεριέχεται στο 95% διάστημα εμπιστοσύνης για τη μέση τιμή  $LOD_{50}$  των μεθόδων. Εξάλλου, το γεγονός ότι η μέση τιμή αυτή (3,8 cfu/25 g) είναι μεγαλύτερη της θεωρητικής μέγιστης, υποδεικνύει την ανίχνευση μαζί με τα *TN* και *FP* δειγμάτων. Με δεδομένο ότι η τιμή  $LOD_{50}$  αντιστοιχεί στο σημείο όπου η καμπύλη δόσης-απόκρισης παρέχει θετικά αποτελέσματα για το 50% των δειγμάτων, ο καθορισμός της τιμής  $LOD_{90}$  συμπληρωματικά της  $LOD_{50}$  θα όριζε καλύτερα την καμπύλη και θα κατέληγε σε μια πιο ακριβή περιγραφή της επίδοσης των μεθόδων σε χαμηλές δόσεις του μικροοργανισμού-στόχου. Άξιο σχολιασμού επίσης είναι και το γεγονός ότι, ο μάρτυρας στο πείραμα προσδιορισμού του ορίου ανίχνευσης ήταν αρνητικός. Κατά

αυτόν τον τρόπο διαπιστώθηκε ότι οι πληθυσμοί του *L. monocytogenes* στα διάφορα επίπεδα ενοφθαλμίσματος (Πίνακας 10) προέρχονταν από το ενοφθαλμισμένο στέλεχος του μικροοργανισμού και δεν αποτελούσαν τμήμα της ενδογενούς χλωρίδας του κιμά.





**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

# 5

## ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ *Listeria monocytogenes*\*

### 5.1. Εισαγωγή

Τα κρούσματα τροφιμογενών λιστεριώσεων μπορεί να καταγράφονται σε μικρότερη έκταση σε σχέση με άλλα βακτηριακά τροφιμογενή νοσήματα του ανθρώπου, ωστόσο τα υψηλά ποσοστά θνητότητας της συγκεκριμένης νόσου κατατάσσουν τον υπεύθυνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* στην κορυφή των παθογόνων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τη δημόσια υγεία (Kathariou, 2002). Ο αρχικός πληθυσμός του βακτηρίου στα τρόφιμα, ο οποίος τις περισσότερες φορές βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης (10 cfu/g) (ISO, 1998), καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη μικροβιολογική ασφάλειά τους, καθώς το παθογόνο δύναται να αυξάνεται στις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης των τροφίμων (παρ. 1.1.3.3.2.) (NACMCF, 2005). Γίνεται σαφές λοιπόν ότι, προαπαιτούμενο αποτελεί η ύπαρξη μιας αξιόπιστης μεθόδου για την ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε οποιοδήποτε προϊόν προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση.

---

\* Σχετική δημοσίευση παρόντος κεφαλαίου:

Andritsos, N. D., 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. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 181-185. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.027

Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα (παρ. 4.1.), ο ISO έχει εκδώσει δύο πρότυπα για την ανίχνευση και απαρίθμηση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στα τρόφιμα (ISO, 1996, 1998). Στα πλαίσια αναθεώρησης αυτών των προτύπων και στην προσπάθεια βελτιστοποίησης των αποτελεσμάτων των μεθόδων που περιγράφονται σε αυτά, εξετάζεται η αντικατάσταση των προτεινόμενων επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων (π.χ. PALCAM) με χρωμογόνα διαγνωστικά υποστρώματα (π.χ. ALOA).

Είναι πλέον κοινά αποδεκτό το γεγονός ότι κανένα υπόστρωμα δεν είναι απόλυτα αποτελεσματικό όσον αφορά στην ανίχνευση του *L. monocytogenes* αλλά και οποιουδήποτε μικροοργανισμού-στόχου από δείγματα τροφίμων, με συνέπεια οι τιμές ευαισθησίας και ικανότητας εξειδίκευσης (παρ. 4.3.2.) να είναι μικρότερες της μονάδας και να ποικίλουν ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα. Αυτό επιφέρει ανάλογη ετερογένεια στα αποτελέσματα, ως συνέπεια της ακολουθούμενης μεθόδου κατά τη διαδικασία μικροβιολογικής ανάλυσης τροφίμων για την ανίχνευση του παθογόνου, ακόμα και κατά την ανάλυση του ίδιου δείγματος τροφίμου. Οι Vlaemyck και συν. (2000) κατέγραψαν αύξηση του επιπολασμού του *L. monocytogenes* σε γαλακτοκομικά και προϊόντα κρέατος κατά 4,3% όταν χρησιμοποιήθηκε ALOA για την ανίχνευση του μικροοργανισμού αντί για PALCAM ή Oxford. Γενικά, δοκιμές οι οποίες έλαβαν χώρα με σκοπό τη σύγκριση μεταξύ χρωμογόνων υποστρωμάτων και των PALCAM ή Oxford, κατέδειξαν ότι τα ALOA και RAPID'L.mono (χρωμογόνα υποστρώματα) απέδωσαν καλύτερα ή τουλάχιστον το ίδιο όσον αφορά στην ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε σχέση με τα μη χρωμογόνα PALCAM και Oxford (Reissbrodt, 2004). Γίνεται φανερό λοιπόν ότι, η πραγματική τιμή επιπολασμού του παθογόνου δεν μπορεί να καθοριστεί επακριβώς από ένα και μοναδικό υπόστρωμα.

Όταν χρησιμοποιούνται ατελείς διαγνωστικές μέθοδοι με άγνωστες τιμές αναφορικά με την ευαισθησία και την ικανότητα εξειδίκευσης, τότε ο αριθμός των παραμέτρων που πρέπει να υπολογιστούν (φαινομενικός επιπολασμός, ευαισθησία και ικανότητα εξειδίκευσης της μεθόδου) είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό των εξισώσεων (παρ. 4.3.3.) (Berkvens, Speybroeck, Praet, Adel, & Lesaffre, 2006· Lesaffre, Speybroeck, & Berkvens, 2007). Τα πειραματικά δεδομένα παρέχουν πληροφορίες μόνον για τη φαινομενική τιμή επιπολασμού, δηλαδή για το ποσοστό θετικών δειγμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο επί του συνόλου των δειγμάτων που εξετάστηκαν. Οι τιμές ευαισθησίας και ικανότητας εξειδίκευσης θα πρέπει να ληφθούν από άλλες πηγές, όπως διαφορετικά πειραματικά δεδομένα, άλλες μελέτες, γνωμοδοτήσεις εμπειρογνομόνων ή ακόμη και από χρήση ειδικών τύπων κατανομών όταν καμία προγενέστερη (prior) γνώση δεν είναι διαθέσιμη (Lesaffre και συν., 2007· Vose, 2000). Αυτό το τελευταίο μπορεί να επιτευχθεί μέσω της μπαγεσιανής ανάλυσης (Bayesian analysis). Επιπρόσθετα, ο έλεγχος πολλαπλών δοκιμών (παρ. 4.3.5.) σε συνδυασμό με τη μπαγεσιανή επαγωγή (Bayesian inference) επιτρέπει την καλύτερη εκτίμηση της πραγματικής τιμής επιπολασμού του *L. monocytogenes*. Ο έλεγχος πολλαπλών δοκιμών οδηγεί στην εισαγωγή επιπλέον μεταβλητών, ενώ με τη μπαγεσιανή επαγωγή επιτυγχάνεται συνδυασμός προγενέστερης γνώσης με υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα, οπότε υπολογίζονται τόσο η πραγματική τιμή επιπολασμού όσο και τα χαρακτηριστικά επίδοσης των χρησιμοποιούμενων μεθόδων. Στη μπαγεσιανή ανάλυση, κατανομές πιθανοτήτων που αναφέρονται σε προγενέστερη γνώση συνδυάζονται με πειραματικά δεδομένα για τον υπολογισμό επικαιροποιημένων μεταγενέστερων (posterior) κατανομών πιθανοτήτων (Lesaffre και συν., 2007). Η διαφορά μεταξύ αιτιοκρατικής (deterministic) και μπαγεσιανής προσέγγισης αναφορικά με τον καθορισμό της πραγματικής τιμής επιπολασμού, της

ευαισθησίας και της ικανότητας εξειδίκευσης, έγκειται στο γεγονός ότι οι τιμές ευαισθησίας και ικανότητας εξειδίκευσης αποτελούν μεταβλητές στη μπαγεσιανή ενώ στην αιτιοκρατική προσέγγιση είναι προκαθορισμένες παράμετροι με μόνη μεταβλητή τον επιπολασμό (Berkvens και συν., 2006· Lesaffre και συν., 2007). Συνεπώς, το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μπαγεσιανής προσέγγισης έναντι της αιτιοκρατικής είναι οι καλύτερες εκτιμήσεις της πραγματικής τιμής επιπολασμού και των χαρακτηριστικών των χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υποστρωμάτων, συνδυάζοντας τα αποτελέσματα ατελών διαγνωστικών μεθόδων (Pouillot, Gerbier, & Gardner, 2002). Σε διαφορετική περίπτωση τα προαναφερόμενα χαρακτηριστικά θα παρέμεναν απροσδιόριστα.

## 5.2. Στόχος

Στη συγκεκριμένη πειραματική ενότητα επιδιώχθηκε ο χειρισμός της αβεβαιότητας των μέτρων διαγνωστικής ακρίβειας τριών θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του τροφιμογενούς παθογόνου *L. monocytogenes*, με χρήση παράλληλου ελέγχου και μπαγεσιανής ανάλυσης. Η προσέγγιση αυτή επιλέχθηκε διότι παρουσιάζει έναντι της αιτιοκρατικής τα ακόλουθα πλεονεκτήματα: α) καλύτερο χειρισμό μηδενικών αποτελεσμάτων για κάποιες παραμέτρους, β) καλύτερο χειρισμό της αβεβαιότητας των προσδιοριζόμενων μέτρων διαγνωστικής ακρίβειας και γ) καλύτερες εκτιμήσεις για την πραγματική τιμή επιπολασμού καθώς και για τα χαρακτηριστικά των χρησιμοποιούμενων διαγνωστικών μεθόδων.

### 5.3. Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε, όπως και στις προηγούμενες πειραματικές ενότητες, τη συλλογή δειγμάτων νωπού χοίρειου κιμά από τοπικές αγορές κρέατος. Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την παρουσία του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* με παράλληλο έλεγχο σε τρία επιλεκτικά υποστρώματα (PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono) (παρ. 5.3.1.). Με τη βοήθεια της μπαγεσιανής ανάλυσης (παρ. 5.3.2.) υπολογίστηκαν τα χαρακτηριστικά επίδοσης (πιθανότητες ταξινόμησης, τιμές πιθανοτήτων θετικού ή αρνητικού αποτελέσματος, λόγοι πιθανοφάνειας και τιμές *AUC*) τα οποία ταυτόχρονα αποτελούν μέτρα της διαγνωστικής ακρίβειας των υποστρωμάτων (παρ. 5.3.3.) και επιτεύχθηκε ο χειρισμός της αβεβαιότητάς τους.

#### 5.3.1. Μικροβιολογικά δεδομένα

Για τον ορισμό των μέτρων διαγνωστικής ακρίβειας των εξεταζόμενων υποστρωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα του κεφαλαίου 4. Δείγματα νωπού χοίρειου κιμά που λήφθηκαν από 100 διαφορετικά καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος (σύνολο δειγμάτων  $n = 100$ ), εξετάζονταν κάθε φορά ως προς την παρουσία του *L. monocytogenes* με παράλληλη χρήση τριών επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων. Η ακολουθούμενη πειραματική διαδικασία για κάθε δείγμα περιελάμβανε την εις διπλούν καλλιέργεια στα υποστρώματα PALCAM (Biolife), ALOA (Biolife) και RAPID'L.mono (Bio-Rad). Ο εμπλουτισμός και η καλλιέργεια στα τρυβλία με τα υποστρώματα έλαβαν χώρα σύμφωνα με τα πρότυπα ISO 11290-1:1996 και ISO 11290-2:1998 αντίστοιχα (ISO, 1996, 1998). Με βάση τα αποτελέσματα από την καλλιέργεια στα άγαρ PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono, 34 δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως ύποπτα για παρουσία του *L. monocytogenes*. Αξίζει

να σημειωθεί ωστόσο, ότι τα ύποπτα δείγματα δεν ανιχνεύθηκαν όλα (34) ως θετικά και από τα τρία χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (δηλ. για ένα συγκεκριμένο δείγμα, τρία, δύο ή και μόλις ένα από τα θρεπτικά υποστρώματα έδειξαν πιθανή παρουσία του μικροοργανισμού). Συνολικά από τα υποστρώματα απομονώθηκαν 296 χαρακτηριστικές αποικίες του μικροοργανισμού-στόχου (παρ. 2.2.1.). Η διεξαγωγή βιοχημικών δοκιμών (παρ. 2.2.3.) (Gasanon και συν., 2005· Prentice & Neaves, 1992) και PCR (παρ. 2.2.4.) (D'Agostino και συν., 2004) για το σύνολο των απομονώσεων (296), χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο σύγκρισης. Η προσέγγιση αυτή των δύο μεθόδων επιβεβαίωσης της παρουσίας του *L. monocytogenes* (δηλ. βιοχημικής και μοριακής μεθόδου), ακολουθήθηκε για ελαχιστοποίηση του περιθωρίου σφάλματος.

### 5.3.2. Μπαγεσιανή ανάλυση

Κάθε δείγμα ταξινομήθηκε σε μία από τις τέσσερις κατηγορίες ( $x_{ij}$ ):  $x_{00}$ ,  $x_{01}$ ,  $x_{10}$  και  $x_{11}$ , όπου  $x_{ij}$  ο αριθμός των δειγμάτων που ανιχνεύθηκαν από τη μέθοδο αρνητικά ( $i = 0$ ) ή θετικά ( $i = 1$ ) ως προς την παρουσία του παθογόνου, σε σχέση και με την πραγματική κατάσταση ( $j = 0$  ή  $1$ , δηλ. απουσία ή παρουσία του παθογόνου σύμφωνα με το πρότυπο σύγκρισης). Καθεμία από τις παραπάνω κατηγορίες χαρακτηριζόταν από την αντίστοιχη πιθανότητα  $p_{ij}$ . Εξαιτίας της πολωνυμικής φύσης των δεδομένων, λόγω του διαχωρισμού τους σε τέσσερις αντί για δύο κατηγορίες, για την περιγραφή της αβεβαιότητας των πιθανοτήτων τους χρησιμοποιήθηκε η κατανομή Dirichlet (Vose, 2000). Η τελευταία χρησιμοποιείται συχνά για την περιγραφή της αβεβαιότητας πιθανοτήτων πολωνυμικής μορφής. Η κατανομή Dirichlet είναι η γενίκευση μιας κατανομής Βήτα με παραμέτρους αντίστοιχες σε αριθμό με τις κατηγορίες της πολωνυμικής κατανομής (Briggs, Ade, & Price, 2003):

$$\{p_1, p_2, \dots, p_n\} = \text{Dirichlet} (\{x_1, x_2, \dots, x_n\}) \quad (5.1.)$$

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

Η μπαγεσιανή ανάλυση καθορίζει τα χαρακτηριστικά της μεταγενέστερης κατανομής για κάθε σχετική παράμετρο, όπως μέση τιμή, τυπική απόκλιση, διάμεση τιμή, διάστημα εμπιστοσύνης και σχετιζόμενο οικόπεδο πυκνότητας (density plot), από τις διαθέσιμες προγενέστερες πληροφορίες προηγούμενης μελέτης (Broemeling, 2007). Έτσι, η μπαγεσιανή ανάλυση βοηθά στον υπολογισμό της μεταγενέστερης κατανομής Dirichlet, επικαιροποιώντας την καθορισμένη προγενέστερη κατανομή Dirichlet. Οι μεταγενέστερες παράμετροι της κατανομής προκύπτουν προσθέτοντας στις προγενέστερες παραμέτρους τα αντίστοιχα προκύπτοντα δεδομένα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε μια ομοιόμορφη (uniform) προγενέστερη κατανομή, υποδεικνύοντας κατά αυτό τον τρόπο ότι κάθε αποτέλεσμα ήταν εξίσου πιθανό να συμβεί (Briggs και συν., 2003· Vose, 2000):

$$\{p_1, p_2, \dots, p_n\} = \text{Dirichlet} (\{1, 1, \dots, 1\}) \quad (5.2.)$$

Με βάση τα προαναφερόμενα, συνδυάζοντας την εξίσωση (5.2.) με τα προκύπτοντα δεδομένα λαμβάνεται η μεταγενέστερη κατανομή, άρα οι παράμετροι της κατανομής Dirichlet είναι ο αριθμός των δειγμάτων σε κάθε κατηγορία συν ένα. Η κατανομή Dirichlet μπορεί να υπολογιστεί με δύο τρόπους ως: α) κανονικοποιημένο (normalized) σύνολο ανεξάρτητων μεταβλητών Γάμμα και β) σειρά κατανομών Βήτα υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Briggs και συν., 2003· Vose, 2000). Ο πρώτος τρόπος ήταν αυτός που χρησιμοποιήθηκε, καθώς στην περίπτωση πολυωνυμικών δεδομένων ο δεύτερος τρόπος είναι λιγότερο εύχρηστος υπολογιστικά (Briggs και συν., 2003):



$$p_i = g_i / \sum_{i=1}^n g_i \quad (5.3)$$

όπου  $p_i$  οι απαιτούμενες πιθανότητες και  $g_i = \text{Γάμμα}(a_i, \beta)$ . Επομένως, η κατανομή Dirichlet μπορεί να υπολογιστεί δημιουργώντας ξεχωριστές κατανομές Γάμμα για κάθε κατηγορία  $i$ , όπου ένας συγκεκριμένος αριθμός δειγμάτων  $x_{ij}$  έχει παρατηρηθεί, με μια κοινή κλιμακωτή παράμετρο  $\beta$ , δηλαδή  $\text{Γάμμα}(x_{ij}+1, 1)$  και στη συνέχεια διαιρώντας καθεμία τέτοια κατανομή Γάμμα με το άθροισμα των κατανομών Γάμμα όλων των κατηγοριών (Πίνακας 11). Κατά τη μπαγεσιανή ανάλυση για τον καθορισμό των μέτρων διαγνωστικής ακρίβειας υιοθετήθηκε η άμεση μέθοδος δειγματοληψίας σύμφωνα με τον Broemeling (2007). Η επικαιροποίηση των παραμέτρων της μεταγενέστερης κατανομής Dirichlet από την ομοιόμορφη προγενέστερη κατανομή πραγματοποιήθηκε στο Microsoft Excel 2007 με τη βοήθεια του λογισμικού @Risk 4.5 (Palisade Corp.), πραγματοποιώντας 1.000 επαναλήψεις (iterations).

### 5.3.3. Μέτρα διαγνωστικής ακρίβειας

Θεωρήθηκαν τα ακόλουθα μέτρα διαγνωστικής ακρίβειας των εξεταζόμενων θρεπτικών υποστρωμάτων: α) πιθανότητες ταξινόμησης, οι οποίες αποτελούν στατιστικά μέτρα της επίδοσης μιας δυαδικής ταξινόμησης των αποτελεσμάτων ενός υποστρώματος, περιλαμβανομένων των αληθώς θετικών ( $TP$ ) (δηλ. ευαισθησία) και ψευδώς θετικών ( $FP$ ) (δηλ.  $1 -$  ικανότητα εξειδίκευσης) κλασμάτων, β) μέτρα πρόβλεψης θετικού ( $PPV$ ) ή αρνητικού ( $NPV$ ) αποτελέσματος, γ) λόγοι πιθανοφάνειας θετικού ( $PLR$ ) ή αρνητικού ( $NLR$ ) αποτελέσματος και δ) τιμές  $AUC$  των αντίστοιχων καμπύλων  $ROC$  των υποστρωμάτων (παρ. 4.3.2 και 4.4.1.).

**Πίνακας 11.** Μπαγεσιανή ανάλυση παραμέτρων της κατανομής Dirichlet κατά την ανίχνευση του *Listeria monocytogenes* σε νωπό χοίρειο κιμά, δίχως προγενέστερη γνώση για τις παραμέτρους, χρησιμοποιώντας μια ομοιόμορφη προγενέστερη κατανομή.

Παράμετροι	PALCAM	ALOA	RAPID'L.mono
<i>Προγενέστερη (prior) κατανομή</i>			
$x_{00}^p$	1	1	1
$x_{10}^p$	1	1	1
$x_{01}^p$	1	1	1
$x_{11}^p$	1	1	1
<i>Πειραματικά δεδομένα (observed data)</i>			
$x_{00}^o$	78	74	69
$x_{10}^o$	0	4	9
$x_{01}^o$	6	7	5
$x_{11}^o$	16	15	17
<i>Μεταγενέστερη (posterior) κατανομή</i>			
$x_{00}^{ps}$		Γάμμα( $x_{00}^o + x_{00}^p, 1$ ) <sup>α</sup>	
$x_{10}^{ps}$		Γάμμα( $x_{10}^o + x_{10}^p, 1$ ) <sup>α</sup>	
$x_{01}^{ps}$		Γάμμα( $x_{01}^o + x_{01}^p, 1$ ) <sup>α</sup>	
$x_{11}^{ps}$		Γάμμα( $x_{11}^o + x_{11}^p, 1$ ) <sup>α</sup>	
Σύνολο	Γάμμα( $x_{00}^o + x_{00}^p, 1$ ) + Γάμμα( $x_{10}^o + x_{10}^p, 1$ ) + Γάμμα( $x_{01}^o + x_{01}^p, 1$ ) + Γάμμα( $x_{11}^o + x_{11}^p, 1$ ) <sup>α</sup>		
<i>Πιθανότητα (<math>p_{ij}</math>) (@Risk αποτέλεσμα)<sup>α</sup></i>			
$p_{00}$		$x_{00}^{ps} / \text{Σύνολο}$ <sup>α</sup>	
$p_{10}$		$x_{10}^{ps} / \text{Σύνολο}$ <sup>α</sup>	
$p_{01}$		$x_{01}^{ps} / \text{Σύνολο}$ <sup>α</sup>	
$p_{11}$		$x_{11}^{ps} / \text{Σύνολο}$ <sup>α</sup>	

<sup>α</sup> Οι εξισώσεις είναι ίδιες για όλα τα υποστρώματα (PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono), με μόνη διαφορά στους αριθμούς δειγμάτων κάθε κατηγορίας  $x_{ij}$ .

Οι καμπύλες *ROC* προσδιορίστηκαν αιτιοκρατικά στο προηγούμενο κεφάλαιο, κατά τον προσδιορισμό της επίδοσης των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του *L. monocytogenes*. Τα προαναφερόμενα μέτρα διαγνωστικής ακρίβειας ορίζονται σε συνάρτηση με την πιθανότητα  $p_{ij}$  ως εξής (Broemeling, 2007):

$$TP = p_{11} / (p_{11} + p_{01}) \quad (5.4.)$$

$$FP = p_{10} / (p_{10} + p_{00}) \quad (5.5.)$$

$$PPV = p_{11} / (p_{11} + p_{10}) \quad (5.6.)$$

$$NPV = p_{00} / (p_{00} + p_{01}) \quad (5.7.)$$

$$PLR = [p_{11} / (p_{11} + p_{01})] / [p_{10} / (p_{10} + p_{00})] = TP / FP \quad (5.8.)$$

$$NLR = [p_{01} / (p_{11} + p_{01})] / [p_{00} / (p_{10} + p_{00})] = FN / TN \quad (5.9.)$$

όπου κατά τα γνωστά, *FN* είναι τα ψευδώς αρνητικά δείγματα και *TN* τα αληθώς αρνητικά δείγματα. Οι πιθανότητες  $p_{ij}$  υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις του Πίνακα 11 με τη βοήθεια του @Risk 4.5.

#### 5.4. Αποτελέσματα

Σε κανένα από τα δείγματα δεν αριθμήθηκαν αποικίες του *L. monocytogenes* από την καλλιέργεια στα θρεπτικά υποστρώματα, καθώς η συγκέντρωση του παθογόνου στον κιμά ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου ( $< 10$  cfu/g). Η διαδικασία εμπλουτισμού, ωστόσο, οδήγησε στην εμφάνιση θετικών αποτελεσμάτων όσον αφορά στην ανίχνευση του μικροοργανισμού. Ο αριθμός των δειγμάτων που ταξινομήθηκαν σε καθεμία από τις τέσσερις κατηγορίες ήταν:  $x_{00} = 78$ ,  $x_{10} = 0$ ,  $x_{01} = 6$ ,  $x_{11} = 16$  για το PALCAM,  $x_{00} = 74$ ,  $x_{10} = 4$ ,  $x_{01} = 7$ ,  $x_{11} = 15$  για το ALOA και  $x_{00} = 69$ ,  $x_{10} = 9$ ,  $x_{01} = 5$ ,  $x_{11} = 17$  για το RAPID'L.mono.

**Πίνακας 12.** Χαρακτηριστικά<sup>α</sup> μεταγενέστερων κατανομών Dirichlet τριών επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων (PALCAM, ALOA, RAPID'L.mono) για την ανίχνευση του *Listeria monocytogenes* σε νωπό κρέας και προϊόντα του.

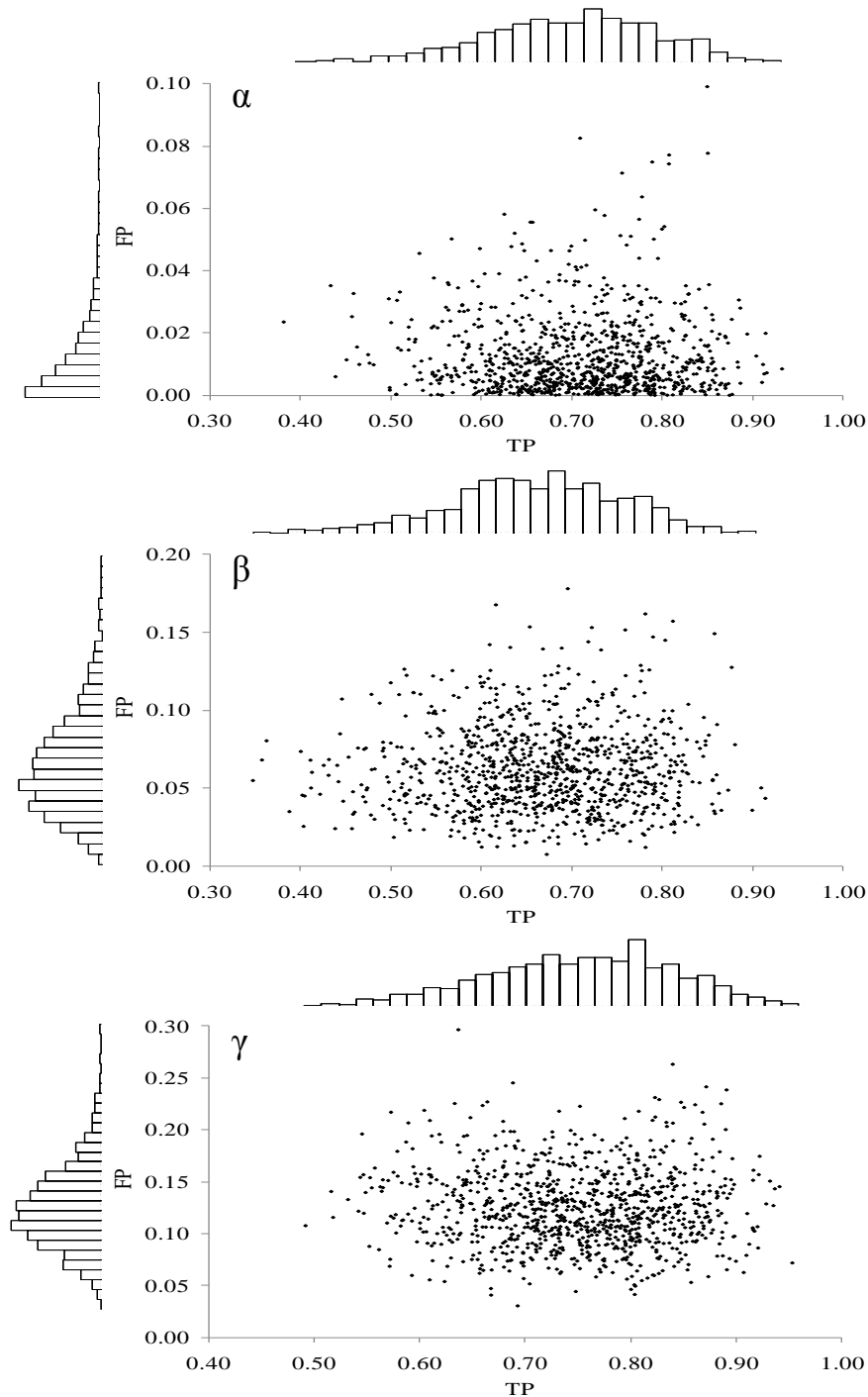
Παράμετρος	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεση τιμή	95% διάστημα εμπιστοσύνης για μέση τιμή
<b>PALCAM</b>				
<i>TP</i>	0,709	0,089	0,714	0,522-0,867
<i>FP</i>	0,013	0,013	0,009	0,000-0,046
<i>PPV</i>	0,952	0,051	0,952	0,797-0,990
<i>NPV</i>	0,919	0,030	0,922	0,852-0,967
<i>PLR</i>	144,288	198,041	76,278	14,717-698,285
<i>NLR</i>	0,295	0,091	0,290	0,135-0,485
<i>AUC</i>	0,805	0,055	0,809	0,686-0,901
<b>ALOA</b>				
<i>TP</i>	0,667	0,096	0,672	0,466-0,838
<i>FP</i>	0,063	0,027	0,059	0,021-0,126
<i>PPV</i>	0,762	0,090	0,769	0,570-0,914
<i>NPV</i>	0,904	0,032	0,907	0,834-0,958
<i>PLR</i>	13,211	8,020	11,185	5,000-33,500
<i>NLR</i>	0,356	0,103	0,350	0,172-0,573
<i>AUC</i>	0,763	0,056	0,767	0,643-0,862
<b>RAPID'L.mono</b>				
<i>TP</i>	0,750	0,085	0,754	0,578-0,900
<i>FP</i>	0,125	0,037	0,122	0,062-0,207
<i>PPV</i>	0,643	0,088	0,646	0,463-0,805
<i>NPV</i>	0,921	0,031	0,925	0,849-0,970
<i>PLR</i>	6,593	2,344	6,154	3,380-12,360
<i>NLR</i>	0,286	0,099	0,281	0,114-0,491
<i>AUC</i>	0,775	0,052	0,776	0,673-0,874

<sup>α</sup> *TP*: αληθώς θετικά, *FP*: ψευδώς θετικά, *PPV*: θετική πιθανότητα πρόβλεψης, *NPV*: αρνητική πιθανότητα πρόβλεψης, *PLR*: λόγος πιθανοφάνειας θετικού αποτελέσματος, *NLR*: λόγος πιθανοφάνειας αρνητικού αποτελέσματος και *AUC*: περιοχή κάτω από τη χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας υποστρώματος.

Τα χαρακτηριστικά των μεταγενέστερων κατανομών Dirichlet για τα *TP* και *FP* αποτελέσματα των τριών θεραπευτικών υποστρώματων παρουσιάζονται στον Πίνακα 12. Από την άλλη, στο Σχήμα 8 εμφανίζεται το γράφημα των 1000 τιμών για μεταγενέστερες κατανομές Dirichlet καθενός υποστρώματος, μαζί με τα αντίστοιχα ιστογράμματα συχνότητας των οριακών κατανομών. Η μεταγενέστερη πιθανότητα των ζευγών *TP* και *FP* να βρίσκονται στην περιοχή του 95% διαστήματος εμπιστοσύνης  $(0,522, 0,867) \times (0,000, 0,046)$  (PALCAM),  $(0,466, 0,838) \times (0,021, 0,126)$  (ALOA) και  $(0,578, 0,900) \times (0,062, 0,207)$  (RAPID'L.mono) ήταν 0,901, 0,904 και 0,898 για τα υλικά PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono αντίστοιχα.

Αναφορικά με τις τιμές πρόβλεψης και τους λόγους πιθανοφάνειας, τα χαρακτηριστικά των *PPV*, *NPV*, *PLR* και *NLR* μεταγενέστερων κατανομών δίνονται επίσης στον Πίνακα 12. Όλα τα υποστρώματα επέδειξαν σχετικά υψηλή τιμή *NPV*. Ειδικότερα, το PALCAM επέδειξε υψηλότερες τιμές *PPV* και *PLR* συγκρινόμενο με τα άλλα δύο στερεά θεραπευτικά μέσα. Όμως, η τιμή *PLR* για το PALCAM ήταν εξαιρετικά αβέβαιη, εξαιτίας του ευρύτατου 95% διαστήματος εμπιστοσύνης και της μεγάλης τυπικής απόκλισης που παρατηρήθηκαν λόγω της μηδενικής τιμής της παραμέτρου  $x_{10}$ . Θα πρέπει ακόμη να αναφερθεί για το συγκεκριμένο υπόστρωμα ότι, η μεταγενέστερη κατανομή *PLR* ήταν κατά πολύ μετατοπισμένη προς τα δεξιά, καθώς η μέση τιμή ανερχόταν σε 144,288 ενώ η διάμεση τιμή ανερχόταν μόλις σε 76,278. Όσον αφορά λοιπόν στην ακρίβεια της μεθόδου, η μέση τιμή θα μπορούσε να οδηγήσει σε λανθασμένα υψηλή τιμή *PLR*. Η διάμεση τιμή *PLR* για το PALCAM υποδηλώνει ότι η αναλογία των *TP* ήταν περίπου 76 φορές μεγαλύτερη από την αναλογία των *FP* αποτελεσμάτων. Επιπλέον, στον Πίνακα 12 δίνονται οι μεταγενέστερες κατανομές των χαρακτηριστικών *AUC* για τα θεραπευτικά υποστρώματα. Από ότι φαίνεται οι τιμές *AUC* όλων των υποστρώματων ήταν σχετικά

υψηλές, ενώ η τιμή-όριο 0,5 δεν συμπεριλήφθηκε σε κανένα από τα διαστήματα εμπιστοσύνης των μεθόδων.



**Σχήμα 8.** Γραφική απεικόνιση 1000 τιμών από τη συνδυασμένη μεταγενέστερη κατανομή Dirichlet των  $TP$  και  $FP$  αποτελεσμάτων για τα θρεπτικά υλικά: α) PALCAM, β) ALOA και γ) RAPID'L.mono.

### 5.5. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το περισσότερο ευαίσθητο θεραπευτικό υπόστρωμα για την ανίχνευση του *L. monocytogenes* ήταν το RAPID'L.mono, το οποίο όμως έδωσε το υψηλότερο ποσοστό *FP* δειγμάτων μεταξύ των τριών υποστρωμάτων. Αντίθετα, το υπόστρωμα PALCAM παρείχε το μικρότερο ποσοστό *FP* δειγμάτων. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο μιας και η παράμετρος  $x_{10}$  για το PALCAM βρέθηκε ίση με μηδέν, καθώς το υπόστρωμα δεν διακρίνει τον μικροοργανισμό-στόχο *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα είδη *Listeria*. Ο μόνος τρόπος ελέγχου της παρουσίας του *L. monocytogenes* στο υλικό PALCAM είναι με διεξαγωγή βιοχημικών ή/και μοριακών μεθόδων επιβεβαίωσης χαρακτηριστικών αποικιών του μικροοργανισμού. Στην περίπτωση του PALCAM λοιπόν, αποκλείεται η εμφάνιση *FP* αποτελεσμάτων. Οι τιμές *PPV* και *NPV* για το συγκεκριμένο υπόστρωμα ήταν 0,952 και 0,919 αντίστοιχα, οι οποίες συνεπάγονται 95,2% και 91,9% πιθανότητες ανίχνευσης πραγματικά θετικού ή αρνητικού δείγματος όταν το αποτέλεσμα της μεθόδου είναι θετικό ή αρνητικό αντίστοιχα.

Παρ' όλα αυτά, τα προαναφερόμενα μέτρα διαγνωστικής ακρίβειας (*TP*, *FP*, *PPV* και *NPV*) εξαρτώνται από τον επιπολασμό του παθογόνου. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο συχνά χρησιμοποιούνται τα ανεξάρτητα του επιπολασμού μέτρα διαγνωστικής ακρίβειας *PLR* και *NLR*. Το υπόστρωμα με την υψηλότερη τιμή *PLR* είναι καλύτερο στο να συνηγορεί υπέρ της παρουσίας του *L. monocytogenes*, ενώ εκείνο με τη χαμηλότερη τιμή *NLR* είναι καλύτερο στο να αποκλείει την παρουσία του παθογόνου. Όλες οι εξεταζόμενες μέθοδοι αποδείχθηκε ότι ευνοούσαν την ανίχνευση του *L. monocytogenes*, καθώς παρουσίασαν σχετικά χαμηλές τιμές *NLR*. Αυτό είναι μια επιθυμητή ιδιότητα για τα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα όταν

σκοπός της έρευνας πεδίου είναι η ανίχνευση ενός συγκεκριμένου παθογόνου σε κάποιο τρόφιμο.

Με την μπαγεσιανή προσέγγιση αποφεύχθηκε το αδιέξοδο που δημιουργείται από την αιτιοκρατική προσέγγιση και την εμφάνιση μηδενικών αποτελεσμάτων για κάποιες παραμέτρους. Αν η τελευταία προσέγγιση είχε ακολουθηθεί στην περίπτωση του PALCAM, τότε η ικανότητα εξειδίκευσης του υποστρώματος [ $x_{00} / (x_{00} + x_{10})$ ] θα ήταν 100% και ο υπολογισμός της τιμής *PLR* δεν θα ήταν δυνατός ( $TP / FP$ , όπου  $FP = 1 - \text{ικανότητα εξειδίκευσης}$ ).

Οι τιμές *AUC* όλων των υποστρωμάτων ήταν μεγαλύτερες της τιμής-όριο 0,5 ενώ η τιμή αυτή δεν συμπεριλήφθηκε σε κανένα από τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι όλες οι μέθοδοι αποτέλεσαν χρήσιμες διαδικασίες για την ανίχνευση του *L. monocytogenes*. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί επίσης το ζήτημα του προς ανάλυση αριθμού δειγμάτων, το οποίο έχει άμεσο αντίκτυπο στην αξιοπιστία των πληροφοριών που παρέχονται από τα δεδομένα ανίχνευσης. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των δειγμάτων που αναλύονται, τόσο περισσότερο αξιόπιστα και χρήσιμα είναι τα προκύπτοντα μικροβιολογικά δεδομένα. Συνήθως, ενδιαφέρει να γνωρίζουμε τον ελάχιστο απαιτούμενο αριθμό δειγμάτων για να επιτύχουμε με ακρίβεια την εκτίμηση μιας άγνωστης παραμέτρου (Mitra, 2008). Ο ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός δειγμάτων για την εγκυρότητα της παρούσας μελέτης ήταν κατά πολύ μικρότερος των 100 δειγμάτων που τελικά αναλύθηκαν (παρ. 4.4.1.).

Τελικά, από τα αποτελέσματα προέκυψε, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή (παρ. 5.1.), ότι δεν υπήρχε υπόστρωμα που να εμφανίζει τη θεωρητική μέγιστη τιμή όσον αφορά στην ανίχνευση του *L. monocytogenes*, ενώ όλες οι μέθοδοι συνέτειναν κυρίως στην ανίχνευση του παθογόνου παρά στον αποκλεισμό της παρουσίας του.



Παρ' όλο που το PALCAM φαίνεται να παρουσιάζει την καλύτερη επίδοση με όρους τιμών *PPV*, *PLR* και *AUC*, καθώς για το εν λόγω υπόστρωμα δεν προκύπτουν *FP* αποτελέσματα, τα θρεπτικά μέσα ALOA και RAPID'L.mono διαθέτουν το πλεονέκτημα της άμεσης διάκρισης του *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα *Listeria* spp. Εξάλλου, το PALCAM μειονεκτούσε συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποστρώματα όσον αφορά στην ευαισθησία. Πράγματι, το PALCAM επέδειξε τη χαμηλότερη τιμή επιπολασμού (16%) σε σχέση με τα ALOA (19%) και RAPID'L.mono (26%) και τη συνολική πραγματική τιμή επιπολασμού (22%) για το παθογόνο. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων ανίχνευσης από την παράλληλη χρήση των ALOA και RAPID'L.mono μπορεί να επιτρέψει την εκτίμηση με μεγάλη ευαισθησία (*ca.* 93%) του επιπολασμού του παθογόνου (Andritsos και συν. 2010).

Οι Stessl, Luf, Wagner, & Schoder (2009) συνέκριναν με το PALCAM έξι, όμοια με το ALOA, χρωμογόνα θρεπτικά υποστρώματα, ελέγχοντας ως προς την παρουσία του *L. monocytogenes*, δείγματα ιχθυηρών, προϊόντων κρέατος και άλλων τροφίμων. Οι ερευνητές κατέγραψαν τιμές ευαισθησίας και ικανότητας εξειδίκευσης 86,7% και 94,4% αντίστοιχα για το PALCAM, ενώ για τα υπόλοιπα υποστρώματα οι αντίστοιχες τιμές κυμαίνονταν μεταξύ 83,3-96,7% και 50,0-88,9%. Σε άλλη μελέτη, κατά την ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε διάφορα δείγματα τροφίμων, η ευαισθησία και η ικανότητα εξειδίκευσης του θρεπτικού μέσου CHROMagar υπολογίστηκαν σε 56,2% (45,6-66,4%) και 73,6% (64,9-81,8%) για φέτες χοιρινού ζαμπόν θερμικής επεξεργασίας, σε 92,7% (83,8-98,0%) και 76,8% (68,7-84,0%) για κιμά μόσχου και σε 91,2% (80,0-97,6%) και 84,2% (73,6-92,6%) για αλλαντικά τύπου Φρανκφούρτης αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας μια μπαγεσιανή προσέγγιση (Aragon-Alegro και συν., 2008). Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές ευαισθησίας και ικανότητας εξειδίκευσης των τριών θρεπτικών υποστρωμάτων που

χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε χοίρειο κιμά, ήταν αντίστοιχα μικρότερες και μεγαλύτερες συγκρινόμενες με τις τιμές των προαναφερόμενων μελετών. Οι προκύπτουσες τιμές για τα υποστρώματα PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono δεν θα πρέπει λοιπόν να θεωρούνται απόλυτες, αλλά αντιθέτως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε ωπό χοίρειο κιμά. Επιπρόσθετα, η συγκριμένη έρευνα σε συνδυασμό και με τις προηγούμενες αποδεικνύει ότι τα μικροβιολογικά δεδομένα μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υπόστρωμα. Ο παράλληλος έλεγχος με χρήση τουλάχιστον δύο θρεπτικών υποστρωμάτων ευνοεί τον υπολογισμό της πραγματικής τιμής επιπολασμού του παθογόνου στον χοίρειο κιμά. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα υποστρώματα αποτελούν από τη φύση τους ατελείς διαγνωστικές μεθόδους ελέγχου της παρουσίας του μικροοργανισμού-στόχου, η θεώρηση της μπαγεσιανής επαγωγής για την ανάλυση μικροβιολογικών δεδομένων βοηθά στην καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων έρευνας πεδίου σχετικά με τον *L. monocytogenes* (Habib, Sampers, Uyttendaele, De Zutter, & Berkvens, 2008).

Η πρακτική εφαρμογή της γνώσης των χαρακτηριστικών επίδοσης των συγκεκριμένων διαγνωστικών μεθόδων, έγκειται στη χρησιμότητά τους ως προγενέστερη γνώση σε άλλες σχετικές μελέτες για τον καθορισμό της πραγματικής τιμής επιπολασμού του *L. monocytogenes* ή σε μελέτες αξιολόγησης κινδύνου (risk assessment studies), όπου ο επιπολασμός και η συγκέντρωση του παθογόνου παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκτίμηση του τελικού κινδύνου. Η μπαγεσιανή ανάλυση συνιστά ένα ισχυρό εργαλείο, με το οποίο ξεπερνιέται το πρόβλημα των μηδενικών αποτελεσμάτων για κάποιες παραμέτρους και επιτυγχάνεται καλύτερος χειρισμό της αβεβαιότητας των μέτρων διαγνωστικής ακρίβειας μέσω στοχαστικής (stochastic or probabilistic) προσέγγισης. Ο μικροβιολόγος τροφίμων οφείλει να λαμβάνει πάντοτε

υπόψη του τους περιορισμούς που προκύπτουν από τη χρήση διαγνωστικών μεθόδων κατά τη διαδικασία ανίχνευσης ενός μικροοργανισμού-στόχου. Σημαντική θεωρείται λοιπόν η επικύρωση των μικροβιολογικών θρεπτικών υποστρωμάτων όσον αφορά την επίδοσή τους σε διαφορετικά τρόφιμα, με πρωταρχικό στόχο την εκτίμηση των τιμών ευαισθησίας και ικανότητας εξειδίκευσης για τα υποστρώματα.



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

# 6

## ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ *Listeria monocytogenes* ΣΕ ΝΩΠΟ ΧΟΙΡΕΙΟ ΚΙΜΑ ΜΕΣΩ ΜΠΑΓΕΣΙΑΝΗΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗΣ\*

### 6.1. Εισαγωγή

Ο κιμάς αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα αύξησης μικροοργανισμών, μεταξύ άλλων και για τον *Listeria monocytogenes*, το παθογόνο αίτιο της λιστερίωσης (Lianou & Sofos, 2007· Sofos, Barbosa, Wederquist, Schmidt, & Smith, 1995). Μολονότι η συχνότητα εμφάνισης της νόσου στον άνθρωπο είναι σχετικά μικρή, τα κρούσματα λιστεριώσεων χαρακτηρίζονται από υψηλή θνητότητα (20-30%), ιδιαιτέρως μεταξύ ατόμων που ανήκουν σε ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού (π.χ. ΥΟΠΙ) (Mead και συν., 1999). Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες τα καταγεγραμμένα κρούσματα λιστεριώσεων έχουν αυξηθεί σημαντικά, εξαιτίας ομαδικών προσβολών από *L. monocytogenes* τροφιμογενούς προέλευσης. Το επίπεδο μίανσης των τροφίμων το οποίο σχετίζεται με την εμφάνιση συμπτωμάτων στον άνθρωπο από τη μόλυνση με τον υπεύθυνο μικροοργανισμό, κυμαίνεται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων σε  $10^2$ - $10^6$  log cfu ανά g ή ml τροφίμου (Dawson και συν., 2006).

---

\* Σχετική δημοσίευση παρόντος κεφαλαίου:

Andritsos, N. D., Mataragas, M., Paramithiotis, S., Skandamis, P. N., & Drosinos, E. H. (2012). Bayesian inference for quantifying *Listeria monocytogenes* prevalence and concentration in minced pork meat from presence/absence microbiological testing. *Food Microbiology*, 31, 148-153. doi:10.1016/j.fm.2012.02.016

Η ποσοτική ή προρητική μικροβιολογία (predictive microbiology) είναι ένας διακριτός κλάδος της μικροβιολογίας τροφίμων, ο οποίος συνδυάζει τη γνώση των μικροβιακών αποκρίσεων υπό δεδομένες συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία, pH,  $a_w$ ) και των αποτελεσμάτων από την καλλιέργεια μικροοργανισμών σε τρυβλία με μαθηματικές εξισώσεις (μοντέλα). Τα μοντέλα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς παθογόνων ή αλλοιογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (McDonald & Sun, 1999· Vadasz & Vadasz, 2008). Τα περισσότερα δημοσιευμένα μοντέλα υιοθετούν μια αιτιοκρατική προσέγγιση για την πρόβλεψη της μικροβιακής συμπεριφοράς, δίχως να λαμβάνονται υπόψη η ενδεχόμενη μεταβλητότητα ή/και αβεβαιότητα των μικροβιολογικών δεδομένων. Η χρησιμότητα τέτοιων μοντέλων κρίνεται μάλλον περιορισμένη όσον αφορά στην αξιολόγηση κινδύνου και άλλους συναφείς σκοπούς (Nauta, 2002· Rouillot & Lubran, 2011). Ως εκ τούτου, είναι αναγκαία μια περισσότερο στοχαστική προσέγγιση· ιδιαίτερα αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι οι συνήθεις διαγνωστικές μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών μέσω θρεπτικών υποστρωμάτων παρουσιάζουν περιορισμένη ευαισθησία και ικανότητα εξειδίκευσης (παρ. 4.3.2.), δεδομένου ότι οι τιμές τους είναι μικρότερες από το ιδανικό ποσοστό 100% (Habib και συν., 2008· Rosenquist, Bengtsson, & Hansen, 2007). Κατά συνέπεια ο επιπολασμός ενός παθογόνου που υπολογίζεται απευθείας με βάση τα αποτελέσματα ερευνών πεδίου ή μικροβιολογικών δοκιμών μπορεί να είναι εσφαλμένος. Παρ' όλα αυτά, η πραγματική τιμή επιπολασμού για το παθογόνο μπορεί εύκολα να υπολογιστεί αν η ευαισθησία και η ικανότητα εξειδίκευσης των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων είναι γνωστές (παρ. 4.3.3.) (Thrusfield, 2007). Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να αποφευχθούν ανεπιθύμητες εσφαλμένες εκτιμήσεις του επιπολασμού για το παθογόνο και να εκτιμηθεί με ακρίβεια ο πληθυσμός του στα

διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας. Προς αυτή την κατεύθυνση έχουν χρησιμοποιηθεί προσφάτως με επιτυχία οι μπαγεσιανές μέθοδοι, με σκοπό την πρόβλεψη των παραμέτρων μικροβιακής αύξησης και τη βελτίωση της ακρίβειας των στοχαστικών μοντέλων που αναπτύσσονται (Crépet, Stahl, & Carlin, 2009· Delignette-Muller, Cornu, Pouillot, & Denis, 2006· Jaloustre, Cornu, Morelli, Noël, & Delignette-Muller, 2011· Pouillot, Albert, Cornu, Denis, 2003). Η μπαγεσιανή ανάλυση συνδυάζει προγενέστερη γνώση, που περιγράφεται από κατανομές πιθανοτήτων, με τα διαθέσιμα δεδομένα για τη δημιουργία επικαιροποιημένων μεταγενέστερων κατανομών (παρ. 5.3.2.) (Lesaffre και συν., 2007).

## 6.2. Στόχος

Ο στόχος της παρούσας πειραματικής ενότητας ήταν η ακριβής ποσοτική εκτίμηση του πληθυσμού του παθογόνου *L. monocytogenes* σε χοίρειο κιμά μέσω μπαγεσιανής προσέγγισης.

## 6.3. Πειραματικός σχεδιασμός

Ο έλεγχος της παρουσίας του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε δείγματα νωπού χοίρειου κιμά, περιελάμβανε αρχικά την παράλληλη καλλιέργεια σε δύο χρωμογόνα (ALOA και RAPID'L.mono) και ένα επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα (PALCAM) (παρ. 6.3.2) και στη συνέχεια τη διεξαγωγή βιοχημικών δοκιμών και PCR για την ταυτοποίηση χαρακτηριστικών αποικιών του μικροοργανισμού-στόχου (παρ. 6.3.3.). Με τη βοήθεια της μπαγεσιανής ανάλυσης εκτιμήθηκε η ευαισθησία και η ικανότητα εξειδίκευσης για τα υποστρώματα, ενώ αναπτύχθηκαν δύο μοντέλα πρόβλεψης τιμών για τον επιπολασμό του *L. monocytogenes* (παρ. 6.3.4.1.) και ένα μοντέλο πρόβλεψης της συγκέντρωσης του

βακτηρίου στον κιμά (παρ. 6.3.4.2.). Ανεξάρτητα πειράματα διεξάχθηκαν με σκοπό την επικύρωση ενός εκ των δύο προαναφερόμενων μοντέλων πρόβλεψης του επιπολασμού του παθογόνου (παρ. 6.3.5.).

### 6.3.1. Συλλογή δειγμάτων νωπού χοίρειου κιμά

Δείγματα νωπού χοίρειου κιμά ( $n = 100$ ), παρασκευασμένα από αυτούσια τεμάχια κρέατος επιτόπου τη στιγμή της διάθεσής τους, λήφθηκαν από τοπικές αγορές κρέατος κατά τη διάρκεια έρευνας πεδίου που διεξάχθηκε σύμφωνα με όσα περιγράφηκαν σχετικά στο κεφάλαιο 4 (παρ. 4.3.1.). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν υπό ψύξη εντός ισοθερμικών περιεκτών στο εργαστήριο, όπου και συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες και θερμοκρασίες ψύξης ( $4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) έως ότου λάβει χώρα η μικροβιολογική ανάλυσή τους. Τα δείγματα αναλύονταν αυθημερόν, ενώ η σειρά ανάλυσής τους ήταν τυχαία.

### 6.3.2. Ανίχνευση και απαρίθμηση του *L. monocytogenes* σε κιμά

Ο εμπλουτισμός και η καλλιέργεια στα θρεπτικά υποστρώματα για την ανίχνευση και την απαρίθμηση του *L. monocytogenes* στον χοίρειο κιμά, πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα πρότυπα ISO 11290-1:1996 και ISO 11290-2:1998 αντίστοιχα (ISO, 1996, 1998). Αναλυτική μονάδα 25 g, λαμβανόμενη κατά τυχαίο τρόπο από διαφορετικά μέρη της μάζας του κάθε δείγματος (500 g κιμά), μεταφερόταν υπό ασηπτικές συνθήκες εντός σακούλας stomacher (Seward Medical) και στη συνέχεια προσθέτονταν 225 ml αποστειρωμένου θρεπτικού ζωμού Fraser ημίσειας συγκεντρώσεως (half-concentrated Fraser broth) (Biolife). Το περιεχόμενο ομογενοποιούνταν σε θερμοκρασία δωματίου σε συσκευή Stomacher 400 (Seward Medical) για 1 min σε κανονική ταχύτητα και 30 sec σε υψηλή ταχύτητα και



ακολούθως επωαζόταν σε θερμοκρασία 30°C για 24 h. Στη συνέχεια ποσότητα 10 μl του ομογενοποιημένου δείγματος ενοφθαλμιζόταν με βακτηριολογικό κρίκο (streaking) εις διπλούν στην επιφάνεια των επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων PALCAM (Biolife), ALOA (Biolife) και RAPID'L.mono (Bio-Rad). Τα τρυβλία επωάζονταν σε θερμοκρασία 37°C για 48 h. Η απαρίθμηση του *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε μετά από επιφανειακή επίστρωση 1 ml (δηλ. 0,33 ml σε κάθε τρυβλίο) από τη 10<sup>-1</sup> αραιώση επί των ίδιων επιλεκτικών υποστρωμάτων εις διπλούν και επώαση των τρυβλίων σε θερμοκρασία 37°C για 24 h.

### 6.3.3. Επιβεβαίωση παρουσίας του *L. monocytogenes* σε κιμά

Από κάθε ύποπτο ως προς την παρουσία του *L. monocytogenes* δείγμα χοίρειου κιμά, απομονώθηκαν τουλάχιστον 10-15 χαρακτηριστικές αποικίες του μικροοργανισμού (παρ. 2.2.1.) για περαιτέρω επιβεβαίωση της παρουσίας του στον κιμά. Συνέπεια τούτου ήταν η απομόνωση συνολικά 296 αποικιών από τα υποστρώματα. Η επιβεβαίωση της παρουσίας του *L. monocytogenes* επιτεύχθηκε με διεξαγωγή βιοχημικών δοκιμών (παρ. 2.2.3.) (Gasanon και συν., 2005· Prentice & Neaves, 1992) και της τεχνικής PCR (παρ. 2.2.4.) (D'Agostino και συν., 2004).

### 6.3.4. Μπαγεσιανή μοντελοποίηση

Για την επίτευξη του στόχου της παρούσας εργασίας, επιδιώχθηκε η δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης τιμών για τον επιπολασμό και τη συγκέντρωση του παθογόνου *L. monocytogenes* στον χοίρειο κιμά μέσω της μπαγεσιανής προσεγγιστικής μεθόδου. Για το σκοπό αυτό, τα δεδομένα της σχετικής έρευνας πεδίου του κεφαλαίου 4 αναφορικά με την παρουσία του *L. monocytogenes* σε χοίρειο κιμά χρησιμοποιήθηκαν στη μπαγεσιανή ανάλυση. Όλα τα δεδομένα (*ApP*, *TrP*, *TP*, *FP*,

$TN$ ,  $FN$ ,  $Se$  και  $Sp$ ) έχουν περιγραφεί και εκφραστεί προηγούμενα (παρ. 4.3.2. και 4.3.3.)

#### 6.3.4.1. Επιπολασμός και χαρακτηριστικά δοκιμών ανίχνευσης του *L. monocytogenes* σε κιμά

Με βάση τα αποτελέσματα για την παρουσία του παθογόνου, αναπτύχθηκαν δύο μπαγεσιανά μοντέλα πρόβλεψης της πραγματικής τιμής επιπολασμού ( $TrP$ ) του *L. monocytogenes* στον χοίρειο κιμά σύμφωνα με τον Vose (2008). Το πρώτο μοντέλο πρόβλεψης (Μοντέλο 1) χρησιμοποιήθηκε και για τον καθορισμό, εκτός της τιμής  $TrP$ , των τιμών ευαισθησίας ( $Se$ ) και ικανότητας εξειδίκευσης ( $Sp$ ) για κάθε υπόστρωμα ανίχνευσης ξεχωριστά (Σχήμα 9α). Το δεύτερο μοντέλο πρόβλεψης (Μοντέλο 2) χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό των ίδιων χαρακτηριστικών, όπως και το προηγούμενο μοντέλο, συνδυάζοντας όμως μόνο τα αποτελέσματα από την παράλληλη χρήση των θρεπτικών υλικών ALOA και RAPID'L.mono (Σχήμα 9β). Αυτό έγινε με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανότητας πρόβλεψης του επιπολασμού του παθογόνου απευθείας, με χρήση των αποτελεσμάτων από την καλλιέργεια στα τρυβλία για την ανίχνευση του μικροοργανισμού-στόχου, χωρίς την ανάγκη περαιτέρω επιβεβαίωσης της παρουσίας του μέσω βιοχημικών δοκιμών και μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης. Τα αποτελέσματα των δύο μπαγεσιανών μοντέλων ήταν οι επικαιροποιημένες κατανομές για τις τιμές  $TrP$ ,  $Se$  και  $Sp$ . Οι κατανομές αβεβαιότητας των προαναφερόμενων χαρακτηριστικών συσχετίστηκαν με τη φαινομενική τιμή επιπολασμού ( $ApP$ ) σύμφωνα με την προκύπτουσα από την (4.9.) εξίσωση:

$$ApP = TrP \times Se + (1 - TrP) \times (1 - Sp) \quad (6.1.)$$

Η μπαγειανή ανάλυση διεξάχθηκε με τη βοήθεια της μεθόδου Monte Carlo της αλυσίδας Markov (Markov chain Monte Carlo), με χρήση του λογισμικού WinBUGS v1.4 (Spiegelhalter, Thomas, Best, & Lunn, 2003) πραγματοποιώντας 100.000 επαναλήψεις. Η σύγκλιση των δύο μοντέλων ελέγχθηκε με αναφορά στα διαγνωστικά γραφήματα σύγκλισης των Gelman-Rubin.

α)	β)
<pre> model { detected~dbin (ApP, total) ApP&lt;-TrP*Se+(1-TrP)*(1-Sp) Se~dbeta(17,7) Sp~dbeta(79,1) TrP~dbeta(1,1) }  Data list(detected=16, total=100) </pre>	<pre> model { d[1:4]~dmulti(ApP[1:4],100) ApP[1]&lt;-TrP*(1-Se1)*(1-Se2)+(1-TrP)*Sp1*Sp2 ApP[2]&lt;-TrP*(1-Se1)*Se2+(1-TrP)*Sp1*(1-Sp2) ApP[3]&lt;-TrP*Se1*(1-Se2)+(1-TrP)*(1-Sp1)*Sp2 ApP[4]&lt;-TrP*Se1*Se2+(1-TrP)*(1-Sp1)*(1-Sp2) }  TrP~dbeta(1,1) Se1~dbeta(16,8) Se2~dbeta(18,6) Sp1~dbeta(75,5) Sp2~dbeta(70,10) }  Data list(d=c(66,15,8,11)) </pre>

**Σχήμα 9.** Μοντέλα 1 (α) και 2 (β) για την πρόβλεψη της πραγματική τιμής επιπολασμού (*TrP*) του *Listeria monocytogenes*, της ευαισθησίας (*Se*) και της ικανότητας εξειδίκευσης (*Sp*) για κάθε υπόστρωμα, με τη μέθοδο Monte Carlo της αλυσίδας Markov στο WinBUGS. Τα δεδομένα που εμφανίζονται στο Μοντέλο 1 (α) προέρχονται από το PALCAM. Για το Μοντέλο 2 (β), οι τιμές *Se1*, *Sp1* και *Se2*, *Sp2* αναφέρονται στα ALOA και RAPID'L.mono αντίστοιχα, ενώ κάθε εξίσωση της τιμής *ApP* ανταποκρίνεται στις κατηγορίες δειγμάτων *TN*, *FN*, *FP* και *TP* αντίστοιχα.

6.3.4.2. Συγκέντρωση του *L. monocytogenes* σε κιμά

Από τα θετικά δείγματα κιμά με βάση την καλλιέργεια στα δύο χρωμογόνα θρεπτικά υποστρώματα ALOA και RAPID'L.mono, όπως και προηγούμενα, ένα αντίστοιχο μπαγεσιανό μοντέλο κατά Vose (2008) δημιουργήθηκε στο Microsoft Excel 2007 και αναπτύχθηκε με το λογισμικό @Risk 4.5 για τον υπολογισμό των μεταγενέστερων κατανομών, σε μια προσπάθεια εκτίμησης της συγκέντρωσης του βακτηρίου στο προϊόν. Σχετικά αναφέρεται ότι, δημιουργήθηκαν τέσσερις στήλες δεδομένων (A1, A2, A3 και A4). Η στήλη A1 περιελάμβανε τη *συγκέντρωση* (cfu/kg) από 0,05 έως 50,00, με εμφάνιση τιμών ανά 0,05. Η επόμενη στήλη (A2) περιείχε την *προγενέστερη* κατανομή, η οποία όμως ισούταν με τη μονάδα καθώς καμία προτέρα γνώση δεν ήταν γνωστή αναφορικά με τη συγκέντρωση του *L. monocytogenes* (ομοιόμορφη προγενέστερη κατανομή). Οι τελευταίες δύο στήλες περιελάμβαναν την *πιθανοφάνεια* (A3) και τη *μεταγενέστερη* κατανομή (A4). Για την *πιθανοφάνεια* χρησιμοποιήθηκε μια διωνυμική κατανομή, υποθέτοντας πως κάθε δείγμα είναι ανεξάρτητο και έχει την ίδια πιθανότητα να είναι μiasμένο με τον μικροοργανισμό. Η σύνταξη αυτής της κατανομής ήταν:

$$\text{BINOMDIST}(t, n, p, c) \quad (6.2.)$$

όπου  $t$ , ο αριθμός επιτυχημένων δοκιμών·  $n$ , ο αριθμός ανεξάρτητων δοκιμών·  $p$ , η πιθανότητα επιτυχίας σε κάθε δοκιμή·  $c$ , τιμή που καθορίζει τη μορφή της παραμέτρου *πιθανοφάνεια*. Αν  $c$  ισούται με: α) μονάδα, τότε η κατανομή της εξίσωσης (6.2.) δίνει τη συγκεντρωτική κατανομή για την παράμετρο, β) μηδέν, τότε η BINOMDIST δίνει τη μαζική πιθανότητα της παραμέτρου (Βοήθεια του Microsoft Excel). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η τιμή  $c$  ήταν ίση με μηδέν οπότε η εξίσωση

(6.2.) παρέχει την πιθανότητα να υπάρχουν  $t$  μιασμένα δείγματα σε ένα σύνολο  $n$ . Η μεταγενέστερη κατανομή (στήλη A4) ήταν ίση με:

$$\text{μεταγενέστερη} = \text{RiskMean} (\text{προγενέστερη} \times \text{πιθανοφάνεια}) \quad (6.3.)$$

Για τους υπολογισμούς της παρούσας μελέτης θεωρήθηκε ότι ο πληθυσμός του *L. monocytogenes* σε ένα δείγμα ακολουθεί μια κατανομή Poisson( $\lambda \times s$ ), όπου  $\lambda$  είναι η μέση τιμή της συγκέντρωσης του *L. monocytogenes* στο δείγμα (cfu/kg) και  $s$  είναι το μέγεθος του δείγματος που αναλύθηκε (kg) (δηλ. 0,025 kg). Η πιθανότητα να βρίσκεται έστω και ένα κύτταρο του *L. monocytogenes* σε ποσότητα δείγματος 0,025 kg είναι  $1 - \text{EXP}(-\lambda)$ , αφού η πιθανότητα να μην υπάρχει κάποιο κύτταρο του μικροοργανισμού σε 0,025 kg δείγματος δίνεται από μια μαζική πιθανότητα Poisson για  $x = 0$ , δηλαδή  $p(0) = \text{EXP}(-\lambda)$  (Vose, 2008). Συνεπώς, η πιθανότητα  $p$  της διωνυμικής κατανομής που περιγράφηκε στην εξίσωση (6.2.) ήταν ίση με:

$$p = 1 - \text{EXP}(-\lambda \times s \times Se) \quad (6.4.)$$

όπου  $\lambda$  είναι η συγκέντρωση του *L. monocytogenes* ίση κάθε φορά με την αντίστοιχη τιμή που αναγράφεται στο κελί της στήλης A1 και  $Se$  η ευαισθησία της κάθε μεθόδου. Η τιμή  $Se$  δίνεται από την ακόλουθη κατανομή Βήτα:

$$Se = \text{Βήτα}(\text{επιβεβαιωμένα θετικά δείγματα} + 1, \text{ αναμενόμενα θετικά δείγματα} - \text{επιβεβαιωμένα θετικά δείγματα} + 1) \quad (6.5.)$$

όπου τα *επιβεβαιωμένα θετικά δείγματα* είναι τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά με βάση τα υποστρώματα ALOA ή RAPID'L.mono μετά τη διεξαγωγή των μεθόδων επιβεβαίωσης, ενώ τα *αναμενόμενα θετικά δείγματα* είναι ο συνολικός αριθμός δειγμάτων που επιβεβαιώθηκαν ως θετικά τόσο από τις βιοχημικές δοκιμές όσο και

από τη μοριακή μέθοδο ταυτοποίησης του *L. monocytogenes* (δηλ. συνολική πραγματική τιμή επιπολασμού).

#### 6.3.5. Επικύρωση μπαγεσιανού μοντέλου

Για την επιβεβαίωση της δυνατότητας του Μοντέλου 2, από τη συνδυαστική παράλληλη χρήση των υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L.mono, να χρησιμοποιηθεί για ορθή εκτίμηση της τιμής *TrP* του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στο χοίρειο κιμά, διεξήχθη ανεξάρτητο πείραμα επικύρωσης του μοντέλου με επιπλέον ανάλυση δειγμάτων. Για το σκοπό αυτό δείγματα ( $n = 10$ ) νωπού χοίρειου κιμά 500 g λήφθηκαν από κρεοπωλεία και υπεραγορές του κέντρου και της ευρύτερης περιοχής της Αθήνας, το χρονικό διάστημα μεταξύ Απριλίου και Μαΐου 2010. Οι συνθήκες μεταφοράς και συντήρησης των δειγμάτων μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους ήταν οι ίδιες με αυτές που περιγράφηκαν προηγούμενα (παρ. 6.3.1.). Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας μόνο τα θρεπτικά υποστρώματα ALOA και RAPID'L.mono, καθώς και η επιβεβαίωση με βιοχημικές δοκιμές και PCR των χαρακτηριστικών αποικιών του *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν, διεξήχθησαν ακολουθώντας τις ως άνω περιγραφόμενες διαδικασίες (παρ. 6.3.2. και 6.3.3.).

#### 6.4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

Από την καλλιέργεια στα τρυβλία για την απαρίθμηση του *L. monocytogenes* προέκυψε ότι η συγκέντρωση του μικροοργανισμού στα δείγματα χοίρειου κιμά ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου ( $< 10$  cfu/g). Ο εμπλουτισμός, ωστόσο, είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση του παθογόνου σε ποσοστό δειγμάτων 16, 19 και 26% για τα υποστρώματα PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono αντίστοιχα, χωρίς όμως περαιτέρω επιβεβαίωση της παρουσίας του στον κιμά (*ApP*). Η διαδικασία ανίχνευσης του *L. monocytogenes* περιελάμβανε ένα και μοναδικό στάδιο εμπλουτισμού, διότι έχει αποδειχθεί ότι τα συνήθη χρησιμοποιούμενα θρεπτικά υποστρώματα για την ανίχνευση του παθογόνου (π.χ. PALCAM) αποδίδουν καλύτερα μετά από επώαση διαφόρων δειγμάτων τροφίμων για 24 h σε θρεπτικό ζωμό Fraser ημίσειας συγκέντρωσης (αρχικός εμπλουτισμός) (Becker και συν., 2006). Εξάλλου, τα θρεπτικά υλικά ALOA και RAPID'L.mono δεν επέδειξαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στην ανίχνευση του παθογόνου, ακόμη και όταν συμπεριλήφθηκε ένα δεύτερο στάδιο εμπλουτισμού στη διαδικασία ανίχνευσης του *L. monocytogenes* (Becker και συν., 2006). Εντούτοις, μετά την επιβεβαίωση της παρουσίας του μικροοργανισμού μέσω βιοχημικών δοκιμών και μοριακής μεθόδου, 22 δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως θετικά για το σύνολο των υποστρωμάτων ( $TrP = 22\%$ ). Ο αριθμός των δειγμάτων που ταξινομήθηκαν ως *TP*, *FP*, *FN* και *TN* παρουσιάστηκε στον Πίνακα 8. Από τα δεδομένα του πίνακα αυτού και με τη βοήθεια των εξισώσεων (4.1.) και (4.2.), οι τιμές *Se* και *Sp* υπολογίστηκαν σε 72,7%, 68,2%, 77,3% και 100,0%, 94,9%, 88,5% για τα θρεπτικά μέσα PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono, αντίστοιχα.

Η αρχική αβεβαιότητα των τιμών  $Se$  και  $Sr$  περιγράφηκε από μια κατανομή Βήτα. Η προγενέστερη κατανομή  $TrP$  ήταν ίση με Βήτα(1,1), δηλαδή μια ομοιόμορφη κατανομή που δεν υποδηλώνει καμία προγενέστερη γνώση (Σχήμα 9). Σημειώνεται ότι ο επιπολασμός του *L. monocytogenes* μετά τη διεξαγωγή των βιοχημικών δοκιμών και της μοριακής μεθόδου επιβεβαίωσης της παρουσίας του μικροοργανισμού (22%), δεν χρησιμοποιείται ως προγενέστερη γνώση. Ο επιπολασμός δεν αποτελεί μια σταθερή τιμή αλλά μεταβάλλεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που λαμβάνονται από έναν πληθυσμό. Από την άλλη μεριά όμως, τα χαρακτηριστικά  $Se$  και  $Sr$  τείνουν να είναι αρκετά σταθερά καθώς οι τιμές τους μεταβάλλονται ελάχιστα μεταξύ πληθυσμών μικροοργανισμών με χαμηλές και υψηλές τιμές επιπολασμού (Thrusfield, 2007· SISA, 2011). Σε μελλοντικές έρευνες νοπού χοίρειου κιμά, ο επιπολασμός του παθογόνου μπορεί να αποτελεί την άγνωστη παράμετρο η οποία οφείλει να προσδιοριστεί από το μοντέλο πρόβλεψης που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία. Σε γενικές γραμμές, ο επιπολασμός αυτός θα πρέπει να περιγράφεται από μια κατανομή που δεν δείχνει καμία προγενέστερη γνώση σχετικά με την εξεταζόμενη παράμετρο, όπως είναι η Βήτα(1,1).

Οι παράμετροι της κατανομής Βήτα για τις τιμές  $Se$  και  $Sr$  υπολογίστηκαν ως εξής: τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών και της μοριακής μεθόδου επιβεβαίωσης έδειξαν τελικά ότι 22 δείγματα είχαν μιανθεί από τον *L. monocytogenes*, όπου 16, 15, 17 και 78, 74, 69 δείγματα αντιστοίχως επιβεβαιώθηκαν ως θετικά και αρνητικά για τα θρεπτικά υλικά PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono, αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι, 22 δείγματα αναμένονταν θετικά αλλά 16, 15 και 17 δείγματα επιβεβαιώθηκαν ως θετικά κατά την ανίχνευση με τα PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono, αντίστοιχα. Ομοίως, 78 δείγματα αναμένονταν αρνητικά αλλά 78, 74 και 69 δείγματα επιβεβαιώθηκαν ως αρνητικά



από τα PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono, αντίστοιχα. Με βάση την εξίσωση (6.5.) επομένως, η κατανομή Βήτα για την τιμή  $Se$  του PALCAM είναι:  $Se = \text{Βήτα}(16 + 1, 22 - 16 + 1) = \text{Βήτα}(17,7)$ . Με παρόμοιο τρόπο βρίσκεται και η κατανομή Βήτα για την τιμή  $Sp$  του ίδιου υποστρώματος (PALCAM) από την παρακάτω εξίσωση:

$$Sp = \text{Βήτα}(\text{επιβεβαιωμένα αρνητικά δείγματα} + 1, \text{αναμενόμενα αρνητικά δείγματα} - \text{επιβεβαιωμένα αρνητικά δείγματα} + 1) \quad (6.6.)$$

οπότε,  $Sp = \text{Βήτα}(78 + 1, 78 - 78 + 1) = \text{Βήτα}(79,1)$ . Επίσης, με τον ίδιο τρόπο υπολογίστηκαν οι κατανομές Βήτα για τις τιμές  $Se$  και  $Sp$  των ALOA και RAPID'L.mono (Πίνακας 13).

**Πίνακας 13.** Υπολογισμός αρχικής αβεβαιότητας για τις τιμές ευαισθησίας ( $Se$ ) και ικανότητας εξειδίκευσης ( $Sp$ ) τριών θρεπτικών υποστρωμάτων (PALCAM, ALOA, RAPID'L.mono) που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του *Listeria monocytogenes* σε νωπό χοίρειο κιμά.

Θρεπτικό υπόστρωμα	$TP^a$	$FN^a$	$TrP^a$	$FP^a$	$TN^a$	$TCN^a$	Βήτα $Se^b$	Βήτα $Sp^γ$
PALCAM	16	6	22	0	78	78	(17,7)	(79,1)
ALOA	15	7	22	4	74	78	(16,8)	(75,5)
RAPID'L.mono	17	5	22	9	69	78	(18,6)	(70,10)

<sup>a</sup>  $TP$ : αληθώς θετικά δείγματα,  $FN$ : ψευδώς αρνητικά δείγματα,  $TrP$ : πραγματική τιμή επιπολασμού,  $FP$ : ψευδώς θετικά δείγματα,  $TN$ : αληθώς αρνητικά δείγματα,  $TCN$ : σύνολο επιβεβαιωμένων αρνητικών δειγμάτων.

<sup>b</sup> Βήτα( $TP + 1, TrP - TP + 1$ ).

<sup>γ</sup> Βήτα( $TN + 1, TCN - TN + 1$ ).

Η παράμετρος ανίχνευσης (“detected” parameter) του Μοντέλου 1 (Σχήμα 9α) αντιστοιχούσε στον αριθμό θετικών δειγμάτων που ανιχνεύθηκαν από τη μέθοδο, δηλαδή στο άθροισμα *TP* και *FP* δειγμάτων για κάθε υπόστρωμα (16 για το PALCAM, 19 για το ALOA και 26 για το RAPID’L.mono). Η συγκεκριμένη παράμετρος αρχικά περιγράφηκε από μια διωνυμική κατανομή ως η πιθανότητα λήψης  $x$  δειγμάτων (ίσων με  $ApP$ ) μiasμένων με τον *L. monocytogenes* από το σύνολο του εξεταζόμενου πληθυσμού ( $n = 100$ ), υποθέτοντας πως κάθε δείγμα ήταν ανεξάρτητο και είχε την ίδια πιθανότητα να ευρίσκεται σε αυτό ο μικροοργανισμός. Κατόπιν, η τιμή  $ApP$  περιγράφηκε ως συνάρτηση των τιμών  $TrP$ ,  $Se$  και  $Sp$  σύμφωνα με την εξίσωση (6.1.). Στον Πίνακα 14, δίνονται οι κατανομές των χαρακτηριστικών επίδοσης καθενός υποστρώματος μετά από την εφαρμογή του Μοντέλου 1. Τα αποτελέσματα φανέρωσαν για ακόμα μια φορά την ατέλεια που διακρίνει τις μεθόδους ανίχνευσης μικροοργανισμών με χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων.

Το υπόστρωμα RAPID’L.mono επέδειξε την υψηλότερη  $Se$  αλλά ταυτόχρονα και τη χαμηλότερη  $Sp$ , γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο μεγάλο αριθμό *FP* δειγμάτων που ανιχνεύθηκαν με τη εν λόγω μέθοδο. Αντίθετα με το RAPID’L.mono, το PALCAM επέδειξε την υψηλότερη  $Sp$ , όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς το συγκεκριμένο υπόστρωμα ανιχνεύει *Listeria* spp. οπότε απαιτείται περαιτέρω επιβεβαίωση της παρουσίας του *L. monocytogenes*. Συνεπώς, η χρήση του PALCAM αποκλείει την εμφάνιση *FP* αποτελεσμάτων, σε αντίθεση με τα άλλα δύο θρεπτικά υποστρώματα τα οποία επιτρέπουν την άμεση διάκριση του παθογόνου από τα υπόλοιπα είδη *Listeria* και επομένως είναι δυνατή η εμφάνιση *FP* αποτελεσμάτων. Στον Πίνακα 14, εκτός της μέσης δίνεται και η διάμεση τιμή, καθώς και για κατανομές που περιλαμβάνουν ακραίες τιμές στις ουρές (tails) τους η διάμεση τιμή παρέχει μια καλύτερη εκτίμηση σε σχέση με τη μέση τιμή (Anonymous, 2011). Η διάμεση τιμή

είναι ένα μέτρο θέσης (location measure) το οποίο τείνει να παραμένει σταθερό και παρουσιάζει εγκυρότητα, πράγμα που σημαίνει ότι τα διαστήματα εμπιστοσύνης για τον εντοπισμό του πληθυσμού έχουν 95% πιθανότητα να καλύπτουν τη θέση του πληθυσμού ανεξάρτητα από την υποκείμενη κατανομή (Mosteller & Tukey, 1977).

**Πίνακας 14.** Κατανομές χαρακτηριστικών επίδοσης<sup>a</sup> τριών θρεπτικών υποστρωμάτων (PALCAM, ALOA, RAPID'L.mono) για την ανίχνευση του *Listeria monocytogenes* σε νωπό χοίρειο κιμά με μπαγεσιανή μοντελοποίηση (Μοντέλο 1).

Θρεπτικό υποστρώμα	Χαρακτηριστικό επίδοσης	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	95% διάστημα εμπιστοσύνης για μέση τιμή	Διάμεση τιμή
PALCAM	<i>TrP</i>	0,230	0,068	0,119-0,384	0,223
	<i>Se</i>	0,695	0,094	0,495-0,861	0,701
	<i>Sp</i>	0,987	0,013	0,954-1,000	0,991
ALOA	<i>TrP</i>	0,232	0,090	0,075-0,434	0,224
	<i>Se</i>	0,650	0,098	0,448-0,827	0,654
	<i>Sp</i>	0,937	0,027	0,875-0,979	0,940
RAPID'L.mono	<i>TrP</i>	0,231	0,094	0,059-0,432	0,227
	<i>Se</i>	0,736	0,091	0,542-0,892	0,743
	<i>Sp</i>	0,874	0,036	0,796-0,937	0,877

<sup>a</sup> *TrP*: πραγματική τιμή επιπολασμού, *Se*: ευαισθησία, *Sp*: ικανότητα εξειδίκευσης.

Το γεγονός ότι τα θρεπτικά υλικά ALOA και RAPID'L.mono επιτρέπουν τον άμεσο διαχωρισμό του *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα *Listeria* spp., σε συνδυασμό με τις ενδείξεις των τιμών *Se* και *Sp*, ήταν παράγοντες που οδήγησαν στη δημιουργία ενός δεύτερου μοντέλου για τη διερεύνηση της πιθανότητας πρόβλεψης της τιμής *TrP* του παθογόνου στον χοίρειο κιμά, συνδυάζοντας τα αποτελέσματα από την καλλιέργεια στα δύο χρωμογόνα θρεπτικά υποστρώματα χωρίς την ανάγκη

επιβεβαίωσης της παρουσίας του μικροοργανισμού. Έτσι, αναπτύχθηκε το Μοντέλο 2, το οποίο βασίστηκε σε μια πολυωνυμική κατανομή (Σχήμα 9β). Η υπόθεση όριζε ότι υπήρχε προγενέστερη γνώση για τις τιμές  $Se$  και  $Sp$  των δύο διαγνωστικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του *L. monocytogenes*. Βέβαια η γνώση αυτή χαρακτηριζόταν από κάποια αβεβαιότητα αναφορικά με τις τιμές  $Se$  και  $Sp$ . Στόχος ήταν η εκτίμηση του επιπολασμού του παθογόνου μετά τον παράλληλο έλεγχο 100 δειγμάτων και με τα δύο υποστρώματα. Τα αποτελέσματα για τα υποστρώματα ALOA και RAPID'L.mono καταγράφηκαν ως θετικά ή αρνητικά ανάλογα με την ανίχνευση ή όχι του *L. monocytogenes*, καταλήγοντας σε 66  $TN$ , 15  $FN$ , 8  $FP$  και 11  $TP$  δείγματα. Οι τέσσερις αυτές κατηγορίες δειγμάτων περιγράφηκαν ως συνάρτηση των τιμών  $TrP$ ,  $Se$  και  $Sp$ . Οι κατηγορίες  $TN$ ,  $FN$ ,  $FP$  και  $TP$  αντιστοιχούν στις εξισώσεις των τιμών  $ApP[1]$ ,  $ApP[2]$ ,  $ApP[3]$  και  $ApP[4]$  του Μοντέλου 2, αντίστοιχα, με τις τιμές  $Se1$ ,  $Sp1$  και  $Se2$ ,  $Sp2$  του μοντέλου να σχετίζονται με τα θρεπτικά μέσα ALOA και RAPID'L.mono, αντίστοιχα. Για την εφαρμογή του Μοντέλου 2 χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα του Πίνακα 13. Η διάμεση τιμή  $TrP$  εκτιμήθηκε από το μοντέλο στο 22,2%, η οποία σχεδόν ταυτιζόταν με την επιβεβαιωμένη τιμή  $TrP$  (22%). Οι  $Se$  και  $Sp$  εκτιμήθηκαν στις τιμές 0,660 και 0,940, αντίστοιχα για το υπόστρωμα ALOA και στις τιμές 0,748 και 0,876, αντίστοιχα για το άγαρ RAPID'L.mono (Πίνακας 15). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι όλες οι προαναφερόμενες τιμές δεν ήταν ουσιαστικά διαφορετικές από εκείνες που προβλέφθηκαν με βάση το Μοντέλο 1 (Πίνακας 14).

**Πίνακας 15.** Κατανομές χαρακτηριστικών επίδοσης δύο χρωμογόνων θρεπτικών υποστρωμάτων (ALOA και RAPID'L.mono) για την ανίχνευση του *Listeria monocytogenes* σε νωπό χοίρειο κιμά με μπαγεσιανή μοντελοποίηση (Μοντέλο 2), μετά από συνδυασμό των αποτελεσμάτων για τα υποστρώματα.

Χαρακτηριστικό επίδοσης	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	95% διάστημα εμπιστοσύνης για μέση τιμή	Διάμεση τιμή
<i>TrP</i>	0,227	0,065	0,111-0,365	0,222
<i>Se1</i> <sup>α</sup>	0,658	0,087	0,485-0,822	0,660
<i>Sp1</i> <sup>α</sup>	0,938	0,023	0,887-0,977	0,940
<i>Se2</i> <sup>β</sup>	0,744	0,079	0,581-0,887	0,748
<i>Sp2</i> <sup>β</sup>	0,875	0,031	0,810-0,931	0,876

<sup>α</sup> *Se1* και *Sp1*: ευαισθησία και ικανότητα εξειδίκευσης αντίστοιχα για το ALOA.

<sup>β</sup> *Se2* και *Sp2*: ευαισθησία και ικανότητα εξειδίκευσης αντίστοιχα για το RAPID'L.mono.

Όσον αφορά στο πείραμα επικύρωσης του Μοντέλου 2, ο αριθμός των δειγμάτων που ταξινομήθηκαν σε καθεμία από τις τέσσερις κατηγορίες που αναφέρθηκαν προηγούμενα ήταν:  $TN = 7$ ,  $FN = 1$ ,  $FP = 0$  και  $TP = 2$ . Η τιμή *TrP* προβλέφθηκε από το μοντέλο ίση με 29,4%, ενώ η παρουσία του *L. monocytogenes* επιβεβαιώθηκε σε 3 από τα 10 δείγματα (30%). Επιπλέον, οι τιμές *Se* και *Sp* των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων ήταν σχεδόν ίδιες με τις παρατηρούμενες τιμές (Πίνακας 16), οπότε επιβεβαιώνεται ο ισχυρισμός ότι οι δείκτες *Se* και *Sp* είναι αρκετά σταθεροί και μεταβάλλονται ελάχιστα σε σχέση με τον επιπολασμό του παθογόνου (Thrusfield, 2007· SISA, 2011). Τελικά, η τιμή *TrP* του *L. monocytogenes* στον χοίρειο κιμά μπορεί να προβλεφθεί με ακρίβεια από τα αποτελέσματα παρουσίας/απουσίας του μικροοργανισμού, χρησιμοποιώντας ως προγενέστερη γνώση τους δείκτες *Se* και *Sp* των θρεπτικών υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L.mono.

**Πίνακας 16.** Τιμές χαρακτηριστικών επίδοσης πειράματος επικύρωσης μπαγεσιανού Μοντέλου 2, για δυνατότητα πρόβλεψης του επιπολασμού του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε ναπό χοίρειο κιμά από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων για τα θρεπτικά υποστρώματα ALOA και RAPID'L.mono.

Χαρακτηριστικό	Παρατηρούμενη τιμή	Προβλεπόμενη τιμή				Σφάλμα (%) <sup>α</sup>
		Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	95% διάστημα εμπιστοσύνης	Διάμεση τιμή	
<i>TrP</i> <sup>β</sup>	0,300	0,309	0,149	0,068-0,636	0,294	-2,17
<i>SeI</i> <sup>γ</sup>	0,682	0,671	0,091	0,482-0,836	0,675	-1,00
<i>SpI</i> <sup>γ</sup>	0,949	0,942	0,025	0,884-0,981	0,945	-0,38
<i>Se2</i> <sup>δ</sup>	0,773	0,764	0,082	0,586-0,904	0,770	-0,42
<i>Sp2</i> <sup>δ</sup>	0,885	0,879	0,035	0,802-0,939	0,882	-0,38

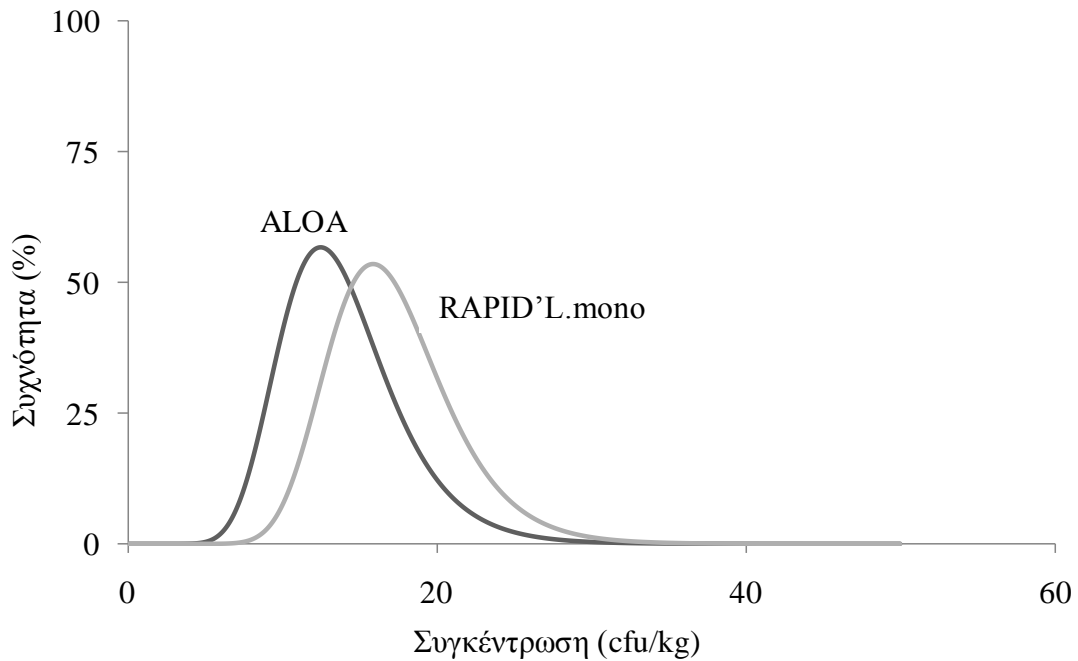
<sup>α</sup> Υπολογισμός σφάλματος μεταξύ διάμεσης και παρατηρούμενης τιμής: Σφάλμα (%) = [(προβλεπόμενη διάμεση τιμή – παρατηρούμενη τιμή) / παρατηρούμενη τιμή] × 100. Το σύμβολο μείον υποδηλώνει ότι η παρατηρούμενη τιμή ήταν μεγαλύτερη από την προβλεπόμενη τιμή.

<sup>β</sup> *TrP*: πραγματική τιμή επιπολασμού.

<sup>γ</sup> *SeI* και *SpI*: ευαισθησία και ικανότητα εξειδίκευσης αντίστοιχα για το ALOA.

<sup>δ</sup> *Se2* και *Sp2*: ευαισθησία και ικανότητα εξειδίκευσης αντίστοιχα για το RAPID'L.mono.

Αναφορικά τέλος με τη συγκέντρωση του *L. monocytogenes*, αυτή εκτιμήθηκε από το αντίστοιχο μπαγεσιανό μοντέλο που αναπτύχθηκε σε 14 cfu/kg (8-23 cfu/kg) με βάση το υπόστρωμα ALOA και σε 17 cfu/kg (11-26 cfu/kg) με βάση το άγαρ RAPID'L.mono (Σχήμα 10). Η διωνυμική κατανομή που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του παθογόνου στο προϊόν περιελάμβανε τα ακόλουθα δεδομένα: εκατό δείγματα ( $n = 100$ ) των 25 g ή 0,025 kg τα οποία εξετάστηκαν ως προς την παρουσία του *L. monocytogenes*. Από αυτά τα δείγματα, 19 βρέθηκαν θετικά κατά τον έλεγχο με το υπόστρωμα ALOA ( $t = 19$ ) και 26 ανιχνεύθηκαν θετικά σύμφωνα με το άγαρ RAPID'L.mono ( $t = 26$ ).



**Σχήμα 10.** Κατανομή της συγκέντρωσης του *Listeria monocytogenes* σε κιμά, μέσω μπαγεσιανής μοντελοποίησης με βάση δύο χρωμογόνα θρεπτικά υποστρώματα (ALOA και RAPID'L.mono).

Τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν στην παρούσα μελέτη δύναται να εφαρμοστούν μόνον μέσα στα στενά πειραματικά όρια που αφορούν τον χοίρειο κιμά, τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* και τα χρησιμοποιούμενα θρεπτικά υποστρώματα (PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono). Διαφορετικές τιμές  $S_e$  και  $S_p$  θα πρέπει να αναμένονται για αυτά καθώς και για άλλα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται κατά την ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε διαφορετικά τρόφιμα.



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7**



# 7

## ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΤΟΥ *Listeria monocytogenes*

### ΣΕ ΝΩΠΙΟ ΧΟΙΡΕΙΟ ΚΙΜΑ

#### 7.1. Εισαγωγή

Ανάμεσα σε όλα τα βακτηριακά τροφιμογενή παθογόνα του ανθρώπου, η μόλυνση από το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* οφείλεται κατά κύριο λόγο στην κατανάλωση τροφίμων ζωικής προέλευσης (παρ. 1.2.1.), όπου ο μικροοργανισμός ανιχνεύεται συνηθέστερα ως αποτέλεσμα των συχνών φαινομένων διαμείανσης που παρατηρούνται κατά το χειρισμό, την παρασκευή και διανομή των συγκεκριμένων τροφίμων (Farber & Peterkin, 1991· Lianou & Sofos, 2007· Sofos και συν., 1995). Ο κιμάς θα πρέπει να θεωρείται ως ένα δυνητικά επικίνδυνο προϊόν κρέατος καθώς η αξιοσημείωτη δυνατότητα αύξησης που προσφέρεται, μεταξύ άλλων και στον *L. monocytogenes*, σε ένα τέτοιο υπόστρωμα, αποτελεί μεγάλο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Για το λόγο αυτό, έχουν προταθεί διάφορα μικροβιολογικά κριτήρια σχετικά με την παρουσία του *L. monocytogenes* σε τρόφιμα που υποστηρίζουν τη μικροβιακή αύξηση, όπως είναι ο κιμάς (Ανώνυμος 2005, 2007· Gilbert et al., 2000· Nørrung, 2000). Με βάση αυτά τα κριτήρια, συγκέντρωση του παθογόνου η οποία δεν υπερβαίνει τα 100 cfu/g τροφίμου κατά τη διάθεση του προϊόντος ή τη στιγμή της κατανάλωσής του (έτοιμο προς κατανάλωση προϊόν), λογίζεται ως χαμηλού κινδύνου συγκέντρωση για τον καταναλωτή. Όπως βρέθηκε σε προηγούμενη πειραματική ενότητα (παρ. 6.4.), η συγκέντρωση του *L. monocytogenes* σε νωπό χοίρειο κιμά κατά τη διάθεση του προϊόντος μπορεί να ήταν αρκετά κάτω του ορίου ανίχνευσης 10

cfu/g της μεθόδου (14-17 cfu/kg), εντούτοις ο επιπολασμός του παθογόνου εκτιμήθηκε στο 22%. Η τελευταία τιμή κρίνεται σχετικά υψηλή συγκρινόμενη με αντίστοιχες τιμές επιπολασμού για το παθογόνο που αφορούν άλλα τρόφιμα. Ενδεικτικά αναφέρεται τιμή επιπολασμού του *L. monocytogenes* περίπου 4% για αλίπαστα προϊόντα αλιείας (Jørgensen & Huss, 1998). Οι υψηλές τιμές επιπολασμού του παθογόνου μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνες για την εκδήλωση σοβαρών προβλημάτων υγείας στους καταναλωτές, σε περίπτωση που δεν ληφθούν κατάλληλα μέτρα αντιμετώπισης του προβλήματος μέσω τήρησης και εφαρμογής κανόνων GMPs/GHPs αλλά και συστημάτων διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων (π.χ. HACCP, ISO 22000:2005).

Σήμερα, υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία πρότυπων μεθόδων για την ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε δείγματα από το περιβάλλον αλλά και στα τρόφιμα (Hitchins & Jinnerman 2011· ISO, 1996), οι οποίες έχουν προταθεί κατά καιρούς από τις αρμόδιες ελεγκτικές αρχές (π.χ. USDA-FSIS) καθώς και διεθνείς φορείς (π.χ. ISO). Αυτές οι μέθοδοι στηρίζονται γενικά σε διαδικασίες οι οποίες περιλαμβάνουν τον εμπλουτισμό του παθογόνου στο δείγμα, την απομόνωσή του με χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων και τέλος την επιβεβαίωση της παρουσίας του με διεξαγωγή βιοχημικών δοκιμών. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στα θρεπτικά υποστρώματα, περιγράφεται στα δημοσιευμένα πρότυπα η χρησιμοποίηση των επιλεκτικών υποστρωμάτων PALCAM, LPM και Oxford. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα υποστρώματα δεν επιτρέπουν την απευθείας διάκριση του *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα είδη *Listeria*, οπότε πρόσφατα έχει προταθεί η αντικατάστασή τους από χρωμογόνα διαγνωστικά υποστρώματα, όπως είναι τα ALOA, RAPID'L.mono, OCLA και BBL CHROMagar (Becker και συν., 2006· Hedge, Leon-Velarde, Stam, Jaykus, & Odumeru, 2007· Reissbrodt, 2004). Στην παρούσα φάση λοιπόν, τα πρότυπα ISO βρίσκονται ήδη υπό

καθεστώς αναθεώρησης προκειμένου να διευκολυνθεί η ταυτοποίηση του *L. monocytogenes* μέσω της χρήσης των εναλλακτικών (χρωμογόνων) καλλιεργητικών υποστρωμάτων.

Η φύση του παθογόνου *L. monocytogenes* και η ευρεία εξάπλωσή του στο φυσικό περιβάλλον, είναι στοιχεία που καθιστούν εύκολη τη μίανση του κρέατος και των προϊόντων του από τον εν λόγω μικροοργανισμό με μια πλειάδα διαφορετικών τρόπων (παρ. 1.2.1.). Υπάρχουν 13 ορότυποι εντός τους είδους (παρ. 1.1.4.), παρ' όλα αυτά μόλις τέσσερις από αυτούς (1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b) απομονώνονται σχεδόν αποκλειστικά (άνω του 98%) από τα ενεχόμενα τρόφιμα και τους ασθενείς των καταγεγραμμένων κρουσμάτων ανθρώπινης λιστερίωσης (Jacquet, Gouin, Jeannel, Cossart, & Rocourt, 2002· Kathariou, 2002). Ως εκ τούτου, η ορολογική τυποποίηση των στελεχών του *L. monocytogenes* είναι περιορισμένης αξίας, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για επιδημιολογικούς σκοπούς (Nadon, Woodward, Young, Rodgers, & Wiedmann, 2001), καθόσον με αυτόν τον τρόπο δεν αποκαλύπτεται η υπάρχουσα γενετική ετερογένεια. Η τελευταία αναδεικνύεται επιτυχώς με τη βοήθεια μοριακών μεθόδων αποτύπωσης του DNA υψηλής διακριτικής ικανότητας (π.χ. τεχνικές PCR, καθορισμός ριβότυπου-ribotyping, PFGE) οι οποίες επιτρέπουν την ομαδοποίηση των στελεχών του παθογόνου. Μεταξύ αυτών των μεθόδων, οι τεχνικές PCR, όπως οι RAPD και *ger*-PCR, έχουν αποδειχθεί αρκετά αποτελεσματικές (Cocolin και συν., 2005· Jeršek και συν., 1999· Lawrence, Harvey, & Gilmour, 1993· van Belkum, 1994· Vogel και συν., 2004· Vogel, Jørgensen, Ojeniyi, Huss, & Gram, 2001), παρά πιθανές ενδογενείς δυσκολίες αναφορικά με θέματα επαναληψιμότητας και τυποποίησης των τεχνικών που μπορεί να ανακύψουν μεταξύ των εργαστηρίων που τις χρησιμοποιούν (Meunier & Grimont, 1993· Wernars και συν., 1996).

## 7.2. Στόχος

Ως στόχος της πειραματικής αυτής ενότητας τέθηκε η μελέτη της βιοποικιλότητας του παθογόνου *L. monocytogenes* σε νοπό χοίρειο κιμά μέσω τεχνικών PCR.

## 7.3. Πειραματικός σχεδιασμός

Δείγματα νοπού χοίρειου κιμά εξετάστηκαν ως προς την παρουσία του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, με παράλληλη καλλιέργεια σε τρία επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono). Η ταυτοποίηση του παθογόνου έγινε μέσω βιοχημικών δοκιμών (παρ. 7.3.1.). Ακολούθησε η διαδικασία για την απομόνωση του DNA του μικροοργανισμού (παρ. 7.3.2.) και η διεξαγωγή της τεχνικής PCR για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος των βιοχημικών δοκιμών. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε ορολογική τυποποίηση των ταυτοποιημένων στελεχών του *L. monocytogenes* με τη βοήθεια της πολλαπλής PCR (παρ. 7.3.4.). Επίσης, διενεργήθηκαν οι μοριακές αναλύσεις RAPD (παρ. 7.3.5.) και *ger*-PCR (παρ. 7.3.6) για περαιτέρω μελέτη της βιοποικιλότητας του *L. monocytogenes*. Ο συνδυασμός των προαναφερόμενων τεχνικών (πολλαπλής PCR, RAPD και *ger*-PCR) οδήγησε τελικά στην αποτύπωση της γενετικής παραλλακτικότητας για τα απομονωμένα, από το νοπό κιμά, στελέχη του *L. monocytogenes*.

### 7.3.1. Στελέχη του *L. monocytogenes*

Ενενήντα εννέα (99) στελέχη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* απομονώθηκαν από δείγματα νοπού χοίρειου κιμά σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο κατά ISO 11290-1:1996 (ISO, 1996), με εις διπλούν παράλληλη χρήση των επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων PALCAM (Biolife), ALOA (Biolife) και RAPID'L.mono (Bio-Rad) (Πίνακας 17). Τα δείγματα λήφθηκαν από καταστήματα

λιανικής πώλησης κρέατος κατά τη διάρκεια έρευνας πεδίου που περιγράφηκε προηγούμενα (παρ. 4.3.1.). Τα απομονωμένα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *L. monocytogenes* μέσω βιοχημικών δοκιμών (παρ. 2.2.3.) (Gasanon και συν., 2005· Prentice & Neaves, 1992), ενώ το αποτέλεσμα των βιοχημικών δοκιμών επιβεβαιώθηκε με τη διεξαγωγή PCR (Παράρτημα ΙΙΙ) (D'Agostino και συν., 2004). Τα στελέχη κωδικοποιήθηκαν και διατηρήθηκαν στους -20°C σε ζωμό έγχυσης καρδιακού ιστού (BHI, Biolife) που περιείχε 20% γλυκερόλη (Merck).

### 7.3.2. Απομόνωση DNA του μικροοργανισμού

Ποσότητα 5 ml ημερήσιας (24 h) αναζωογονημένης βακτηριακής καλλιέργειας του *L. monocytogenes* σε θερμοκρασία 37°C και θρεπτικό ζωμό BHI, φυγοκεντρήθηκε (3.500×g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C) σε φυγόκεντρο Heraeus Megafuge 1.0R (DJB Labcare, Newport Pagnell, Ηνωμένο Βασίλειο) για παραλαβή των κυττάρων του μικροοργανισμού υπό μορφή ιζήματος. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (sodium phosphate buffer saline, NaPBS) και υποβλήθηκαν σε διαδικασία για την απομόνωση του DNA τους (Παράρτημα ΙΙΙ), όπως έχει περιγραφεί από τους Querol, Barrio, & Ramón (1992), με μόνη τροποποίηση τη χρήση λυσοζύμης (25 mg/ml, Sigma, Μιλάνο, Ιταλία) και ακόλουθη επώαση σε θερμοκρασία 37°C για τουλάχιστον 2 h, ώστε να επέλθει λύση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος.

**Πίνακας 17.** Στελέχη του *Listeria monocytogenes* απομονωθέντα από νοπό χοίρειο κιμά.

Κωδικός στελέχους	Κωδικός στελέχους LQC <sup>a</sup>	Θρεπτικό υπόστρωμα απομόνωσης	Προέλευση κιμά
10P1	15132	PALCAM	Κρεοπωλείο
10P3	15133	PALCAM	Κρεοπωλείο
10R3	15134	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
10A1	15135	ALOA	Κρεοπωλείο
10A2	15136	ALOA	Κρεοπωλείο
10A3	15137	ALOA	Κρεοπωλείο
10A4	15138	ALOA	Κρεοπωλείο
10A5	15139	ALOA	Κρεοπωλείο
18P1	15140	PALCAM	Υπεραγορά
18P2	15141	PALCAM	Υπεραγορά
18R2	15142	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
18A1	15143	ALOA	Υπεραγορά
18A2	15144	ALOA	Υπεραγορά
18A3	15145	ALOA	Υπεραγορά
20R5	15146	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
21A1	15147	ALOA	Κρεοπωλείο
21A3	15148	ALOA	Κρεοπωλείο
23P1	15149	PALCAM	Υπεραγορά
23R1	15150	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
23R2	15151	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
23R3	15152	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
23R4	15153	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
23R5	15154	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
23A3	15155	ALOA	Υπεραγορά
25R1	15156	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
25R2	15157	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
25R3	15158	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
27P1	15159	PALCAM	Κρεοπωλείο
27A1	15160	ALOA	Κρεοπωλείο
27A2	15161	ALOA	Κρεοπωλείο
29R1	15162	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
29R2	15163	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
29R3	15164	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο

Πίνακας 17. (συνέχεια)

Κωδικός στελέχους	Κωδικός στελέχους LQC <sup>a</sup>	Θρεπτικό υπόστρωμα απομόνωσης	Πρόελευση κιμά
29R5	15165	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
31R2	15166	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
31R4	15167	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
31R5	15168	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
34P2	15169	PALCAM	Κρεοπωλείο
34P5	15170	PALCAM	Κρεοπωλείο
34R1	15171	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
34A2	15172	ALOA	Κρεοπωλείο
34A5	15173	ALOA	Κρεοπωλείο
34A6	15174	ALOA	Κρεοπωλείο
37P1	15175	PALCAM	Υπεραγορά
37P2	15176	PALCAM	Υπεραγορά
37P3	15177	PALCAM	Υπεραγορά
37A3	15178	ALOA	Υπεραγορά
37A4	15179	ALOA	Υπεραγορά
40P1	15180	PALCAM	Υπεραγορά
40A1	15181	ALOA	Υπεραγορά
41R1	15182	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
41R2	15183	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
41R4	15184	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
41R5	15185	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
42R1	15186	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
42R2	15187	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
42R3	15188	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
42R4	15189	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
42R5	15190	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
43P2	15191	PALCAM	Υπεραγορά
43P3	15192	PALCAM	Υπεραγορά
43P4	15193	PALCAM	Υπεραγορά
43P5	15194	PALCAM	Υπεραγορά
43R1	15195	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
43R2	15196	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
43R3	15197	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
43R4	15198	RAPID'L.mono	Υπεραγορά

Πίνακας 17. (συνέχεια)

Κωδικός στελέχους	Κωδικός στελέχους LQC <sup>a</sup>	Θρεπτικό υπόστρωμα απομόνωσης	Προέλευση κιμά
43R5	15199	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
43A1	15200	ALOA	Υπεραγορά
43A4	15201	ALOA	Υπεραγορά
51P1	15202	PALCAM	Υπεραγορά
51P6	15203	PALCAM	Υπεραγορά
51P12	15204	PALCAM	Υπεραγορά
52P13	15205	PALCAM	Υπεραγορά
51P16	15206	PALCAM	Υπεραγορά
51P18	15207	PALCAM	Υπεραγορά
51R2	15208	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
51R3	15209	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
51R4	15210	RAPID'L.mono	Υπεραγορά
51A1	15211	ALOA	Υπεραγορά
51A2	15212	ALOA	Υπεραγορά
51A3	15213	ALOA	Υπεραγορά
51A4	15214	ALOA	Υπεραγορά
51A5	15215	ALOA	Υπεραγορά
51A6	15216	ALOA	Υπεραγορά
51A7	15217	ALOA	Υπεραγορά
51A8	15218	ALOA	Υπεραγορά
52A1	15219	ALOA	Υπεραγορά
68P4	15220	PALCAM	Κρεοπωλείο
68P5	15221	PALCAM	Κρεοπωλείο
68R5	15222	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
73P1	15223	PALCAM	Κρεοπωλείο
73A3	15224	ALOA	Κρεοπωλείο
73A4	15225	ALOA	Κρεοπωλείο
82P4	15226	PALCAM	Κρεοπωλείο
82R5	15227	RAPID'L.mono	Κρεοπωλείο
82A2	15228	ALOA	Κρεοπωλείο
84A2	15229	ALOA	Κρεοπωλείο
91A5	15230	ALOA	Κρεοπωλείο

<sup>a</sup> Συλλογή Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών.



### 7.3.3. Εκκινητές DNA

Οι αλληλουχίες των 14 εκκινητών DNA που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον Πίνακα 18. Οι εκκινητές αυτοί έχουν σχεδιασθεί και χρησιμοποιηθεί σε αντίστοιχες εργασίες αναφοράς.

### 7.3.4. Ορολογική τυποποίηση

Η ορολογική τυποποίηση των 99 στελεχών του *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της πολλαπλής PCR (mPCR), με μικρές τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου που περιγράφηκε από τους Doumith και συν. (2004). Περιληπτικά αναφέρεται ότι, η mPCR διεξάχθηκε σε τελικό όγκο 25  $\mu$ l που περιείχε 10 $\times$  ρυθμιστικό διάλυμα (*Taq* DNA polymerase, Invitrogen, Καλιφόρνια, Η.Π.Α.), 0,2 mM τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (deoxynucleotide triphosphates, dNTP's) (Invitrogen), 1,5 mM Mg<sup>+2</sup>, 0,13  $\mu$ M εκκινητών των γονιδίων *lmo0737* και ORF2819, 0,3  $\mu$ M εκκινητών των γονιδίων *lmo1118* και ORF2110 και 2 U *Taq* DNA πολυμεράσης (Invitrogen). Οι συνθήκες στο θερμικό κυκλοποιητή (PTC-200 Thermo Cycler, MJ Research, Waltham, Μασαχουσέτη, Η.Π.Α.) ήταν οι ακόλουθες: αρχική θερμοκρασία 94°C για 3 min, μετά 35 κύκλοι σε θερμοκρασίες 94°C για 0,4 min, 53°C για 1,15 min και 72°C για 1,15 min, ακολουθούμενοι από τελική σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72°C για 7 min. Μετά το τέλος της PCR, ακολουθούσε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 2% αγαρόζης (Applichem, Darmstadt, Γερμανία) για να διαπιστωθεί ο πολλαπλασιασμός του DNA. Τα τμήματα του DNA γίνονταν ορατά με τη βοήθεια 10 ng/ml βρωμιούχου αιθιδίου (Applichem). Η ορολογική τυποποίηση των στελεχών έλαβε χώρα τουλάχιστον δύο φορές.

**Πίνακας 18.** Αλληλουχίες εκκινητών DNA για μελέτη της βιοποικιλότητας του *Listeria monocytogenes* σε νωπό χοίρειο κιμά.

Εκινήτης ή γονίδιο-στόχος	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Τεχνική PCR	Βιβλιογραφική αναφορά
LIP 1 ( <i>prfa</i> )	GATACAGAAACATCGGTTGGC <sup>α</sup>	PCR	Leimeister-Wächter και συν., 1990
LIP 2 ( <i>prfa</i> )	GTGTAACCTTGATGCCATCAGG <sup>β</sup>	PCR	Leimeister-Wächter και συν., 1990
<i>lmo0737</i>	AGGGCTTCAAGGACTTACCC <sup>α</sup> ACGATTTCTGCTTGCCATTC <sup>β</sup>	mPCR	Doumith και συν., 2004
<i>lmo1118</i>	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA <sup>α</sup> CGGCTTGTTTCGGCATACTTA <sup>β</sup>	mPCR	Doumith και συν., 2004
ORF2819	AGCAAAATGCCAAACTCGT <sup>α</sup> CATCACTAAAGCCTCCCATTG <sup>β</sup>	mPCR	Doumith και συν., 2004
ORF2110	AGTGGACAATTGATTGGTGAA <sup>α</sup> CATCCATCCCTTACTTTGGAC <sup>β</sup>	mPCR	Doumith και συν., 2004
HLWL85	ACAACCTGCTC	RAPD	Wernars και συν., 1996
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	RAPD	Andrighetto, Zampese, & Lombardi, 2001
UBC155	CTGGCGGCTG	RAPD	Farber & Addison, 1994
(GTG) <sub>5</sub>	GTGGTGGTGGTGGTG	rep-PCR	Versalovic, Schneider, de Bruijn, & Lupski, 1994

<sup>α</sup> Επέκταση εκκινητή προς τα εμπρός κατά τη σύνθεση cDNA.

<sup>β</sup> Επέκταση εκκινητή προς τα πίσω κατά τη σύνθεση cDNA.

### 7.3.5. Ανάλυση RAPD

Ποσότητα 0,1-1,0 µg DNA κάθε στελέχους του *L. monocytogenes* που απομονώθηκε από τον χοίρειο κιμά, υποβλήθηκε σε RAPD-PCR χρησιμοποιώντας διαδοχικά τους εκκινητές HLWL85, M13 και UBC155 (Πίνακας 18). Οι αντιδράσεις της RAPD-PCR διεξάχθηκαν σε τελικό όγκο 20 µl που περιείχε κάθε φορά 10× ρυθμιστικό διάλυμα (*Taq* DNA polymerase), 0,2 mM dNTP's, 2,5 mM Mg<sup>+2</sup>, 4 µM (HLWL85 και M13) ή 1,5 µM (UBC155) εκκινητή και τέλος 1 U *Taq* DNA πολυμεράσης. Για κάθε εκκινητή, οι συνθήκες που επικρατούσαν κάθε φορά στο θερμικό κυκλοποιητή για τον πολλαπλασιασμό του DNA του μικροοργανισμού εμφανίζονται στον Πίνακα 19. Τα προϊόντα της RAPD-PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 1,5% (w/v) αγαρόζης, με προσθήκη 1× ρυθμιστικού διαλύματος Tris και συμπυκνωμένου οξικού οξέως μαζί με EDTA (Tris-acetate-EDTA, TAE, Appllichem) και σταθερή παροχή ρεύματος 100 V για 1,5 h. Οι πηκτές τοποθετήθηκαν για περίπου 30 min σε απιονισμένο νερό που περιείχε 10 ng/ml βρωμιούχο αιθίδιο και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν ψηφιακά με τη βοήθεια της συσκευής Molecular Imager® Gel Doc™ XR (Bio-Rad) μέσω του λογισμικού Image Lab™ (Bio-Rad). Οι κατατομές των τμημάτων του DNA (banding profiles) για τα στελέχη του *L. monocytogenes* εξετάστηκαν οπτικά και αποδόθηκαν σε αυτές αριθμητικοί προσδιορισμοί (τύποι RAPD). Οι κατατομές επεξεργάστηκαν μέσω του λογισμικού BioNumerics v6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Βέλγιο) με χρήση του αλγόριθμου ομαδοποίησης UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average clustering algorithm) (Vauterin & Vauterin, 1992), για την κατασκευή των αντίστοιχων δενδρογραμμάτων για κάθε χρησιμοποιούμενο εκκινητή. Τα στελέχη υποβλήθηκαν σε ανάλυση RAPD εις διπλούν.

**Πίνακας 19.** Συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA στελεχών του *Listeria monocytogenes* με διαφορετικούς εκκινητές κατά την ανάλυση RAPD.

Εκινητής	Αρχική αποδιάταξη DNA	Συνθήκες στο θερμικό κυκλοποιητή	Τελική επιμήκυνση cDNA	Κύκλοι PCR
HLWL85	95°C για 2 min	95°C για 1 min, 35°C για 2 min, 72°C για 1 min	72°C για 10 min	45
M13	95°C για 2 min	95°C για 1 min, 38°C για 1 min, 72°C για 2 min <sup>α</sup>	72°C για 10 min	35
UBC155	95°C για 2 min	95°C για 1 min, 45°C για 1 min <sup>β</sup> , 72°C για 2 min, 95°C για 1 min, 35°C για 1 min, 72°C για 2 min	72°C για 10 min	40

<sup>α</sup> Η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 38°C στους 72°C γίνεται με ρυθμό 0,6°C/sec.

<sup>β</sup> Μείωση της θερμοκρασίας κατά 1°C σε κάθε κύκλο PCR για ένα σύνολο 10 κύκλων, μέχρι τη θερμοκρασία των 36°C.

### 7.3.6. Ανάλυση *rep*-PCR

Όπως και προηγουμένως, ίδια ποσότητα DNA (0,1-1,0 µg) από κάθε απομονωμένο στέλεχος του *L. monocytogenes* υποβλήθηκε σε *rep*-PCR με χρησιμοποίηση του ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή (GTG)<sub>5</sub>, σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Gevers, Huys, & Swings (2001). Συγκεκριμένα, η αντίδραση *rep*-PCR διεξάχθηκε σε τελικό όγκο 25 µl που περιείχε 10× ρυθμιστικό διάλυμα (*Taq* DNA polymerase), 0,2 mM dNTP's, 3 mM Mg<sup>+2</sup>, 2 µM εκκινητή (GTG)<sub>5</sub> και 1 U *Taq* DNA πολυμεράσης. Οι συνθήκες στο θερμικό κυκλοποιητή κατά την αντίδραση *rep*-PCR

ήταν οι εξής: αρχική θερμοκρασία 95°C για 5 min, μετά 40 κύκλοι σε θερμοκρασίες 90°C για 30 sec, 40°C για 1 min και 72°C για 8 min, ακολουθούμενοι από τελική σύνθεση cDNA σε θερμοκρασία 72°C για 16 min. Η ανάλυση των προϊόντων της *rep*-PCR και η επεξεργασία των προκυπτουσών κατατομών DNA έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω (παρ. 7.3.5.). Όμοια η ανάλυση *rep*-PCR των στελεχών έλαβε χώρα δύο φορές.

### 7.3.7. Δείκτης διάκρισης

Η διακριτική ικανότητα των τεχνικών PCR καθορίστηκε με τον υπολογισμό του δείκτη διάκρισης  $D$  (discrimination index), ο τύπος του οποίου περιγράφηκε μαθηματικά από τους Hunter & Gaston (1988) ως ακολούθως:

$$D = 1 - \sum_{j=1}^s n_j \times (n_j - 1) / N \times (N - 1) \quad (7.1.)$$

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

## 7.4. Αποτελέσματα

### 7.4.1. Ορότυποι στελεχών του *L. monocytogenes*

Η πολλαπλή PCR για την ορολογική τυποποίηση των απομονωθέντων στελεχών του *L. monocytogenes* αποκάλυψε την παρουσία των ορότυπων 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b και 4ab στο νοπό χοίρειο κινιά (Πίνακας 20). Όπως φάνηκε, η πλειοψηφία των στελεχών (82 από τα 99 στελέχη) ανήκε στην ορολογική ομάδα 1/2, ενώ τα υπόλοιπα ανήκαν στην ορολογική ομάδα 4. Επίσης, η ορολογική τυποποίηση ορισμένων στελεχών (2) δεν ήταν δυνατή.

**Πίνακας 20.** Κατανομή ορότυπων στελεχών του *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκαν από χοίρειο κιμά.

Θρεπτικό υπόστρωμα	Στελέχη	Ορότυποι					Μη ορολογικά τυποποιημένα στελέχη
		1/2a	1/2b	1/2c	4b	4ab	
PALCAM	26	20	0	1	0	4	1
ALOA	35	32	1	0	0	1	1
RAPID'L.mono	38	24	4	0	5	5	0
<b>Σύνολο</b>	99	76	5	1	5	10	2
<b>%</b>	100	76,8	5,0	1,0	5,1	10,1	2

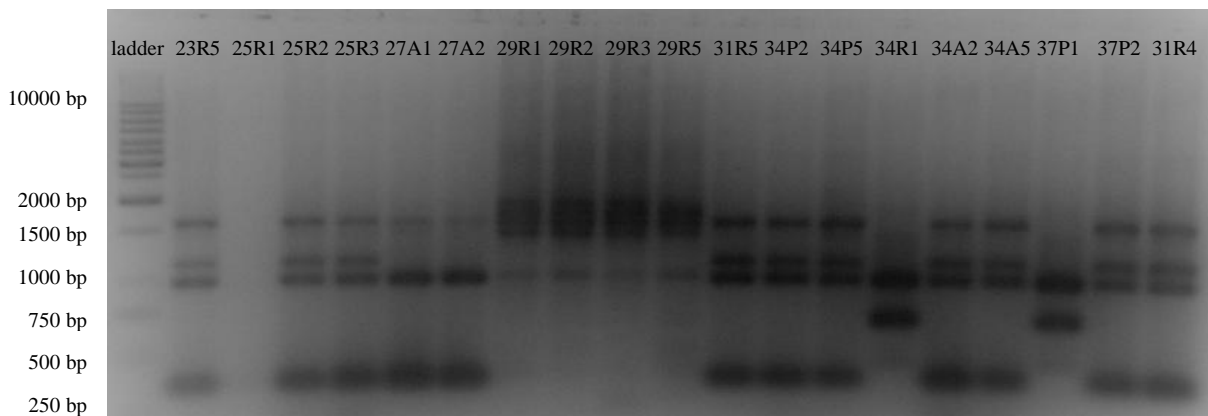
#### 7.4.2. Αποτύπωση DNA στελεχών του *L. monocytogenes*

Ευκρινείς κατατομές τμημάτων του DNA που διαχωρίστηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης, αποκτήθηκαν για τα απομονωμένα από τον κιμά στελέχη του *L. monocytogenes* με χρήση των εκκινητών HLWL85, M13 (Εικόνα 5), UBC155 και (GTG)<sub>5</sub>. Τα συγκεκριμένα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα αναπαράχθηκαν με επιτυχία.

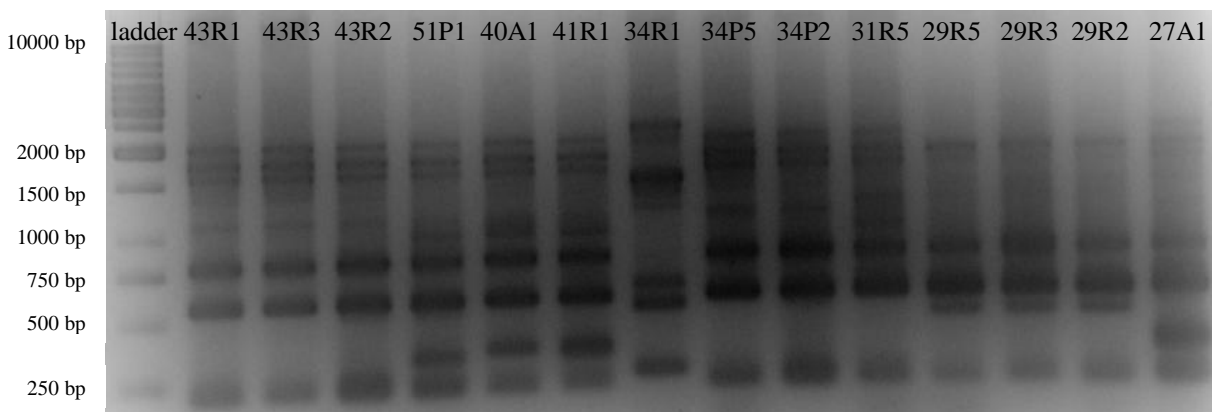
Το προϊόν της PCR περιελάμβανε μέχρι και 5, 9 ή 7 τμήματα DNA ανάλογα με το αν χρησιμοποιούνταν οι εκκινητές HLWL85, M13 και UBC155 αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση χρήσης του εκκινητή (GTG)<sub>5</sub> το προϊόν αποτελούσαν μέχρι και 6 τμήματα πολλαπλασιασμένου DNA. Η ανάλυση RAPD των 99 στελεχών του *L. monocytogenes* κατέληξε σε 41, 33 και 67 διαφορετικούς τύπους RAPD χρησιμοποιώντας τους εκκινητές HLWL85, M13 και UBC155, αντίστοιχα. Κατά την ανάλυση rep-PCR με τον εκκινητή (GTG)<sub>5</sub> προέκυψαν 47 διαφορετικοί τύποι rep-PCR. Τα δένδρογράμματα που αντιστοιχούν στις δύο αυτές αναλύσεις (RAPD και rep-PCR) παρουσιάζονται στα Σχήματα 11 έως 14. Οι απομονώσεις του *L. monocytogenes* ομαδοποιήθηκαν σε 15, 19, 15 και 20 ομάδες (clusters) στελεχών με

τους εκκινητές HLWL85, M13, UBC155 και (GTG)<sub>5</sub>, αντίστοιχα. Η ομοιότητα των στελεχών που εντάχθηκαν στις ομάδες οριοθετήθηκε στο 72% για όλους τους εκκινητές πλην του M13, όπου η ομοιότητα ήταν 78%. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των τριών εκκινητών RAPD οδήγησε σε ένα σύνολο 93 διαφορετικών σύνθετων κατατομών του DNA.

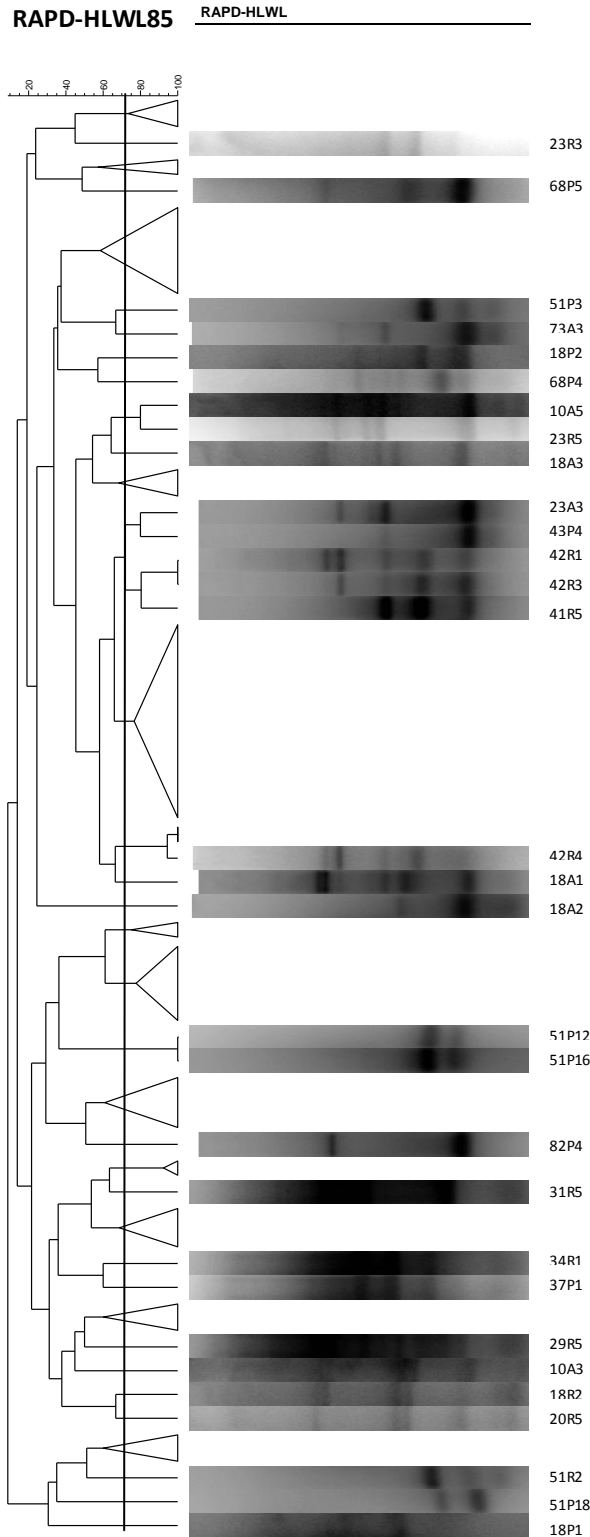
α)



β)

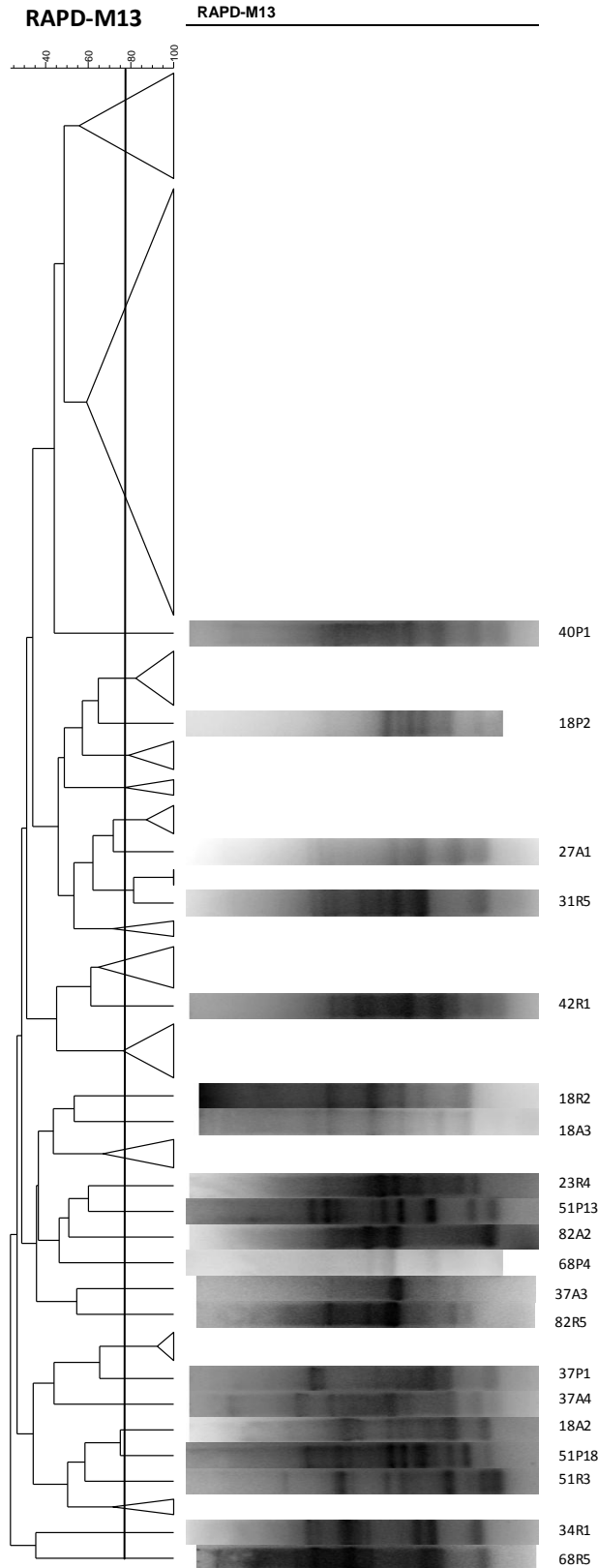


**Εικόνα 5:** Αποτύπωση DNA απομονώσεων του *Listeria monocytogenes* από χοίρειο κιμά μέσω τριών διαφορετικών υποστρωμάτων (P: PALCAM, A: ALOA, R: RAPID'L.mono), κατά την ανάλυση RAPD των στελεχών με τους εκκινητές α) HLWL85 και β) M13. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης μοριακών βαρών GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas, Glen Burnie, Maryland, Η.Π.Α.).

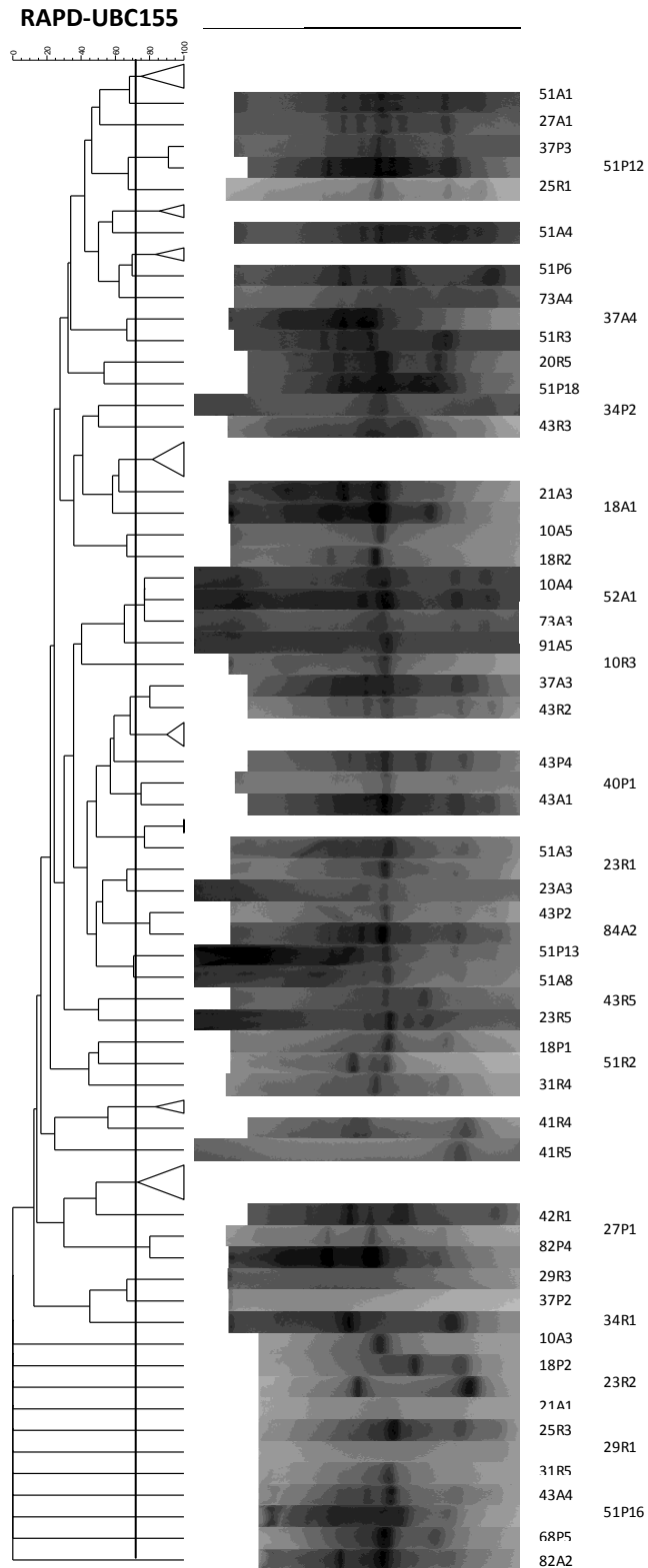


**Σχήμα 11.** Δενδρόγραμμα ανάλυσης RAPD με τον εκκινητή HLWL85 για στελέχη του *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκαν από νοπό χοίρειο κιμά, όπου παρουσιάζονται μόνον οι κατατομές των μοναδικών τύπων RAPD για τον εκκινητή.

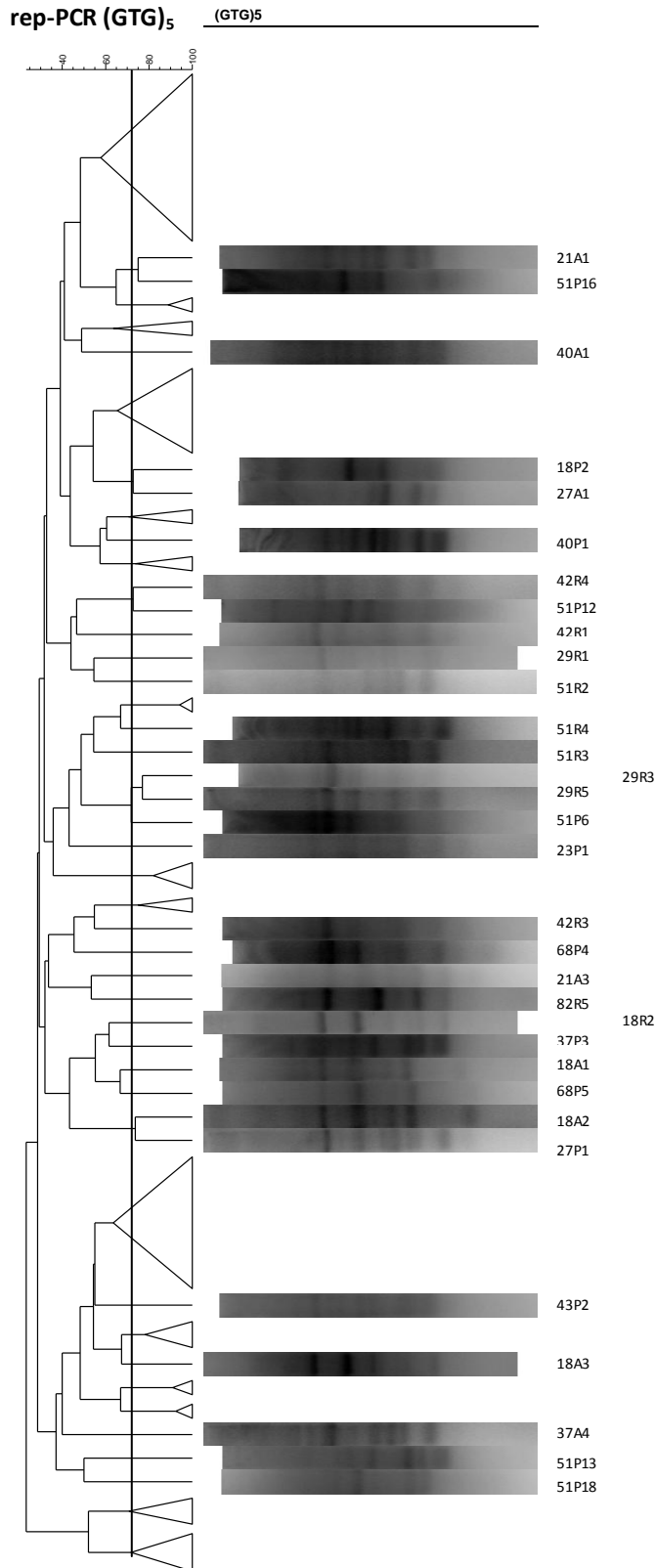




**Σχήμα 12.** Δενδρόγραμμα ανάλυσης RAPD με τον εκκινητή M13 για στελέχη του *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκαν από νωπό χοίρειο κινιά, όπου παρουσιάζονται μόνον οι κατατομές των μοναδικών τύπων RAPD για τον εκκινητή.



**Σχήμα 13.** Δενδρόγραμμα ανάλυσης RAPD με τον εκκινητή UBC155 για στελέχη του *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκαν από νωπό χοίρειο κιμά, όπου παρουσιάζονται μόνον οι κατατομές των μοναδικών τύπων RAPD για τον εκκινητή.



**Σχήμα 14.** Δενδρόγραμμα ανάλυσης rep-PCR με τον εκκινητή (GTG)<sub>5</sub> για στελέχη του *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκαν από νωπό χοίρειο κιμά, όπου παρουσιάζονται μόνον οι κατατομές των μοναδικών τύπων rep-PCR για τον εκκινητή.

### 7.4.3. Διακριτική ικανότητα τεχνικών PCR

Όπως αναφέρθηκε, η διακριτική ικανότητα των τεχνικών PCR χαρακτηρίζεται από το δείκτη διάκρισης *D*. Η τιμή του συγκεκριμένου δείκτη μαζί με άλλες χαρακτηριστικές τιμές για κάθε τεχνική και εκκινητή που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των 99 στελεχών του *L. monocytogenes* παρουσιάζονται στον Πίνακα 21. Ακόμα, δίνονται οι αντίστοιχες τιμές που προκύπτουν από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων για τους εκκινητές της ανάλυσης RAPD (Πίνακας 22).

**Πίνακας 21.** Διακριτική ικανότητα τεχνικών PCR και διαχωρισμός απομονωθέντων στελεχών του *Listeria monocytogenes* από χοίρειο κιμά.

Τεχνική PCR	Σύνολο τύπων	Επιπολασμός (%) επικρατέστερου τύπου	Αριθμός μοναδικών τύπων <sup>α</sup>	Δείκτης <i>D</i> <sup>β</sup>
mPCR	7	76 (77%)	2	0,399
RAPD <sup>γ</sup>	41	21 (22%)	28	0,935
RAPD <sup>δ</sup>	33	35 (36%)	20	0,858
RAPD <sup>ε</sup>	67	13 (13%)	57	0,976
rep-PCR	47	15 (15%)	32	0,953

<sup>α</sup> Αριθμός τύπων που περιλαμβάνουν ένα και μόνον στέλεχος του *L. monocytogenes*.

<sup>β</sup> Ο δείκτης *D* υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση 7.1.

<sup>γ</sup> Αποτελέσματα από τη χρήση του εκκινητή HLWL85.

<sup>δ</sup> Αποτελέσματα από τη χρήση του εκκινητή M13.

<sup>ε</sup> Αποτελέσματα από τη χρήση του εκκινητή UBC155.

Κατά σειρά αυξανόμενης διακριτικής ικανότητας, πρώτη κατατάχθηκε η πολλαπλή PCR ακολουθούμενη από τις rep-PCR και RAPD (με συνδυασμό αποτελεσμάτων εκκινητών). Η πολλαπλή PCR ήταν η τεχνική που παρουσίασε τη μικρότερη διακριτική ικανότητα ( $D = 0,399$ ), επιτυγχάνοντας διαχωρισμό των εξεταζόμενων στελεχών του *L. monocytogenes* σε μόλις επτά (7) τύπους. Αντίθετα, η

RAPD-PCR με συνδυασμό αποτελεσμάτων των τριών χρησιμοποιούμενων εκκινητών (HLWL85, M13 και UBC155) κατάφερε να διαχωρίσει τα στελέχη του μικροοργανισμού σε 88 μοναδικούς τύπους.

**Πίνακας 22.** Διακριτική ικανότητα τεχνικής RAPD-PCR με συνδυασμό αποτελεσμάτων για τους εκκινητές, κατά την ανάλυση στελεχών του *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκαν από χοίρειο κιμά.

Τεχνική PCR	Σύνολο τύπων	Επιπολασμός (%) επικρατέστερου τύπου	Αριθμός μοναδικών τύπων <sup>α</sup>	Δείκτης <i>D</i> <sup>β</sup>
RAPD <sup>γ</sup>	60	14 (14%)	43	0,973
RAPD <sup>δ</sup>	89	4 (4%)	83	0,997
RAPD <sup>ε</sup>	87	4 (4%)	79	0,997
RAPD <sup>στ</sup>	93	2 (2%)	88	0,998

<sup>α</sup> Αριθμός τύπων που περιλαμβάνουν ένα και μόνον στέλεχος του *L. monocytogenes*.

<sup>β</sup> Ο δείκτης *D* υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση 7.1.

<sup>γ</sup> Συνδυασμός αποτελεσμάτων των εκκινητών HLWL85 και M13.

<sup>δ</sup> Συνδυασμός αποτελεσμάτων των εκκινητών HLWL85 και UBC155.

<sup>ε</sup> Συνδυασμός αποτελεσμάτων των εκκινητών M13 και UBC155.

<sup>στ</sup> Συνδυασμός αποτελεσμάτων των εκκινητών HLWL85, M13 και UBC155.

## 7.5. Συζήτηση

Η μελέτη της βιοποικιλότητας (biodiversity) οποιουδήποτε μικροοργανισμού συνίσταται στη διερεύνηση της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των στελεχών του (strain variability). Η διαπίστωση της τελευταίας επιτυγχάνεται μέσω αποτύπωσης του γονιδιώματος (DNA) του μικροοργανισμού πάνω σε πηκτή για το σύνολο των στελεχών. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, χρησιμοποιείται πληθώρα μοριακών μεθόδων και τεχνικών (π.χ. τεχνικές PCR, AFLP, PFGE), καθεμία από τις οποίες χαρακτηρίζεται από διαφορετικό βαθμό αποτελεσματικότητας (efficacy) και

χρηστικότητα ή αποδοτικότητα (efficiency) (Struelens, 1996). Για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου λαμβάνονται υπόψη παράμετροι σχετικές με το κόστος του απαραίτητου μηχανολογικού εξοπλισμού, τη διακριτική ικανότητα, το εύρος χρήσης, την επαναληψιμότητα, τον απαιτούμενο χρόνο εκτέλεσης και το κόστος ανάλυσης της μεθόδου.

Στο πλαίσιο αυτό, αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της βιοποικιλότητας του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που απομονώθηκε από δείγματα νωπού χοίρειου κιμά μέσω τεχνικών PCR, από τις οποίες η RAPD-PCR χρησιμοποιήθηκε εκτενέστερα. Από μια μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων εκκινητών για την ανάλυση RAPD επιλέχθηκαν τρεις αντιπροσωπευτικοί εκκινητές (HLWL85, M13, UBC155) με βάση την επίδοσή τους, η οποία χαρακτηριζόταν από τον αριθμό και την ευκρίνεια των εμφανιζόμενων τμημάτων DNA καθώς και από την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων τους.

Από τις τρεις χρησιμοποιούμενες τεχνικές PCR στην παρούσα μελέτη, οι RAPD και rep-PCR παρουσίασαν σχεδόν την ίδια διακριτική ικανότητα με όμοια υψηλούς δείκτες διάκρισης  $D$  (Πίνακας 21). Εξάιρεση αποτέλεσε η περίπτωση της μεμονωμένης χρήσης του εκκινητή M13, οπότε και δεν παρατηρήθηκε τόσο μεγάλη διακριτική ικανότητα κατά την ανάλυση RAPD όσο και συμφωνία μεταξύ των δεικτών  $D$  των δύο τεχνικών, αφού οι τιμές τους ήταν 0,858 (RAPD) και 0,953 (rep-PCR). Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται στη χαμηλότερη εξειδίκευση που παρουσιάζει ο συγκεκριμένος εκκινητής με τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, δεδομένου ότι η χρήση του αφορά κυρίως τη διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Andrighetto και συν., 2001). Η άποψη αυτή ενισχύεται και από το αυξημένο επίπεδο ομοιότητας το οποίο απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός και ομαδοποίηση μεταξύ των

στελεχών. Οι Cocolin και συν. (2005) προσδιόρισαν τον επιθυμητό συντελεστή ομοιότητας για τον εκκινητή M13 στο 80%, η τιμή του οποίου βρίσκεται πολύ κοντά στο επίπεδο ομοιότητας που χρησιμοποιήθηκε κατά την ομαδοποίηση των στελεχών του *L. monocytogenes* από το χοίρειο κιμά (78%). Παρά τη μειωμένη διακριτική ικανότητα του εκκινητή M13 ωστόσο, ταυτοποιήθηκαν συνολικά 33 διαφορετικοί τύποι ενώ επιτεύχθηκε ικανοποιητική ομαδοποίηση των στελεχών με καλή αντιστοιχία σε σχέση με τους υπόλοιπους εκκινητές της RAPD-PCR.

Σε αντίθεση με τις RAPD και rep-PCR, η πολλαπλή PCR ήταν η τεχνική που παρουσίασε τη μικρότερη διακριτική ικανότητα. Ο δείκτης  $D = 0.399$  υποδηλώνει ότι αν επιλεγθούν τυχαία δύο εκ των 99 απομονωμένων στελεχών του *L. monocytogenes* από το νωπό χοίρειο κιμά, τότε μόλις στο 40% περίπου των περιπτώσεων τα στελέχη αυτά θα ανήκουν σε διαφορετικούς τύπους mPCR. Γίνεται φανερό λοιπόν σε σχέση και με τα προηγούμενα ότι, όσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης  $D$  τόσο μεγαλύτερη είναι η διακριτική ικανότητα της μεθόδου (Hunter & Gaston, 1988). Η πολλαπλή PCR οδήγησε σε ποσοστό *ca.* 88% στην εμφάνιση των ορότυπων 1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b στο χοίρειο κιμά, με επικρατέστερο τον ορότυπο 1/2a, αποτελέσματα τα οποία βρίσκονται σε συμφωνία με τα διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα για τον *L. monocytogenes* (Jacquet και συν., 2002· Kathariou, 2002). Οι προσδιοριζόμενοι αυτοί ορότυποι ανήκουν στις εξελικτικές καταγωγές I (1/2a, 1/2c) και II (1/2b, 4b) (Doumith και συν., 2004). Κατά την ομαδοποίηση των στελεχών του *L. monocytogenes* (cluster analysis) υπήρξε επιβεβαίωση του φυλογενετικού διαχωρισμού με βάση τη διάκριση σε εξελικτικές καταγωγές για όλους τους χρησιμοποιούμενους εκκινητές, με μόνη εξαίρεση την ομαδοποίηση τεσσάρων (41R5, 42R4, 42R5, 51A6) και ενός (51A6) στελεχών όταν χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές HLWL85 και M13, αντίστοιχα. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι, με

εξάιρεση τους ορότυπους 1/2a και 4ab, οι ορότυποι 1/2b, 1/2c και 4b δεν απομονώθηκαν από το σύνολο των χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υποστρωμάτων. Συγκεκριμένα, ο ορότυπος 1/2b δεν απομονώθηκε από το PALCAM παρά μόνο από τα ALOA και RAPID'L.mono, ενώ οι ορότυποι 1/2c και 4b απομονώθηκαν μόνο από τα PALCAM και RAPID'L.mono αντίστοιχα. Ειδικότερα, ο ορότυπος 4b παρουσιάζει αυξημένο ενδιαφέρον καθώς απομονώνεται συχνότερα από τους ασθενείς των καταγεγραμμένων κρουσμάτων ανθρώπινης λιστερίωσης (Goulet, Hedberg, Le Monnier, & de Valk, 2006· Hofer, Ribeiro, & Feitosa, 2000· Leite και συν., 2006· Voetsch και συν., 2007). Συνεπώς, η αποκλειστική απομόνωση του ορότυπου 4b από το RAPID'L.mono θα μπορούσε να ληφθεί υπόψη κατά την επιλογή θρεπτικού υποστρώματος το οποίο προορίζεται να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε τρόφιμα ή κλινικά δείγματα του ανθρώπου. Εξάλλου, το γεγονός ότι τα περισσότερα επιβεβαιωμένα στελέχη του *L. monocytogenes* (38) ανιχνεύθηκαν από το υπόστρωμα RAPID'L.mono, ενώ ακολούθησε το ALOA με 35 και τέλος το PALCAM με 26 επιβεβαιωμένα στελέχη του μικροοργανισμού, συνηγορεί υπέρ της επιλογής ενός τουλάχιστον εκ των δύο χρωμογόνων υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L.mono για την ανίχνευση του παθογόνου στον κινιά.

Σε αρκετές περιπτώσεις η γενετική ομοιότητα στελεχών του *L. monocytogenes* δεν παρουσίασε καμία συσχέτιση με την προέλευσή τους. Με άλλα λόγια, η απομόνωση στελεχών του μικροοργανισμού που παρουσίαζαν παρόμοιες ηλεκτροφορητικές κατατομές τμημάτων του DNA τους δεν ήταν απολύτως δηλωτική του δείγματος και του θρεπτικού υποστρώματος από όπου προήλθαν τα στελέχη. Προς αυτή την κατεύθυνση οι Autio και συν. (2001) απέδειξαν ότι, παρόμοιοι τύποι στελεχών του *L. monocytogenes* μπορούν να υπάρχουν όχι μόνον σε διαφορετικούς τύπους προϊόντων



αλλά και σε διαφορετικούς χώρους επεξεργασίας τροφίμων. Επομένως, η ανάκτηση παρόμοιων αποτυπώσεων του DNA για στελέχη μικροοργανισμών που απομονώνονται από τρόφιμα και κλινικά δείγματα ασθενών, δεν ενοχοποιεί *de facto* το μελετώμενο τρόφιμο ως υπεύθυνο για την τροφιμογενή μόλυνση του ανθρώπου από το παθογόνο στέλεχος.

Τέλος, ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων για τους εκκινητές της RAPD-PCR παρείχε καλύτερο διαχωρισμό των στελεχών του *L. monocytogenes* (Πίνακας 22). Γενικά, έχει προταθεί η χρήση τριών τουλάχιστον εκκινητών σε περίπτωση κατά την οποία η τεχνική RAPD αποτελεί τη μοναδική μοριακή μέθοδο διερεύνησης της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ στελεχών (Kerr, Kite, Heritage, & Hawkey, 1995), ειδάλλως συστήνεται η χρησιμοποίηση περισσότερων της μίας τεχνικών (Vogel και συν., 2001).



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8**

# 8

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όλα όσα αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια κατέληξαν σε ορισμένα ουσιαστικά συμπεράσματα αναφορικά με την παρουσία του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε νωπό κρέας και προϊόντα του.

Αρχικά, η κατανομή των μικροβιακών πληθυσμών που προσδιορίστηκαν σε νωπό χοίρειο κιμά που συντηρήθηκε αερόβια και υπό ψύξη επιβεβαίωσε την ισχύουσα αποτύπωση της μικροβιακής οικολογίας ενός τέτοιου τροφίμου, όπου οι ψευδομονάδες αποτέλεσαν την κυρίαρχη αλλοιογόνο χλωρίδα του προϊόντος (κεφάλαιο 3). Με τη βοήθεια εργαλείων της πολυμεταβλητής ανάλυσης και συγκεκριμένα μέσω της ΑΚΣ, η μικροβιολογική ποιότητα του κρέατος, η οποία εκφράζεται ως συνάρτηση των προσδιοριζόμενων πληθυσμών, σχετίστηκε με το χρόνο ζωής καθώς και με τις συνθήκες υγιεινής κατά τη διαδικασία παρασκευής του κιμά. Ειδικότερα, έμφαση δόθηκε στην υγιεινή του εξοπλισμού αλλά και του προσωπικού των καταστημάτων διάθεσης του προϊόντος (κεφάλαιο 3).

Η απαρίθμηση αποικιών *Listeria* spp. και ο προσδιορισμός της κατανομής τους στον κιμά, αποτέλεσε το έναυσμα για την εκτίμηση του πληθυσμού του *L. monocytogenes* στο προϊόν. Ο παράλληλος έλεγχος με χρήση των επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono για την ανίχνευση του *L. monocytogenes*, απέδειξε ότι η μεμονωμένη χρήση οποιουδήποτε από τα τρία υποστρώματα δεν είναι σε θέση να προσδιορίσει με ακρίβεια την πραγματική τιμή επιπολασμού του παθογόνου στο νωπό κιμά (κεφάλαιο 4). Ακόμα έδειξε ότι, τα προαναφερόμενα υποστρώματα έχουν την τάση να συνηγορούν υπέρ της παρουσίας

του *L. monocytogenes*, ιδιότητα η οποία κρίνεται επιθυμητή όταν στόχος είναι η ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων επικίνδυνων για τη δημόσια υγεία. Με δεδομένο λοιπόν ότι τα ALOA και RAPID'L.mono επιτρέπουν την άμεση διάκριση του *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα είδη *Listeria* και ότι δεν αποδίδουν λιγότερο από το ιδανικό όσον αφορά στην ανίχνευση του παθογόνου (δηλ. 1 cfu/25 g κιμά), ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των δύο αυτών χρωμογόνων υποστρωμάτων κατά τον παράλληλο έλεγχο μπορεί να οδηγήσει με μεγάλη ευαισθησία στην εκτίμηση του επιπολασμού του *L. monocytogenes* στο νωπό κρέας από το οποίο προέρχεται ο κιμάς (κεφάλαιο 4). Εξάλλου, μέσω της μπαγεσιανής ανάλυσης είναι δυνατός ο καλύτερος χειρισμός της αβεβαιότητας που σχετίζεται και με άλλες ενδιαφέρουσες παραμέτρους εκτός του επιπολασμού, όπως είναι η ευαισθησία και η ικανότητα εξειδίκευσης των χρησιμοποιούμενων θρεπτικών υποστρωμάτων (κεφάλαιο 5).

Η παράλληλη χρήση δύο τουλάχιστον χρωμογόνων θρεπτικών υποστρωμάτων, όπως είναι τα ALOA και RAPID'L.mono, σε συνδυασμό με την εφαρμογή της μπαγεσιανής προσεγγιστικής μεθόδου, ενισχύουν την αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης του *L. monocytogenes* στο νωπό χοίρειο κιμά. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή η πρόβλεψη με μεγάλη ακρίβεια της πραγματικής τιμής επιπολασμού για το παθογόνο, χωρίς την ανάγκη για περαιτέρω επιβεβαίωση των εμφανιζόμενων χαρακτηριστικών αποικιών του μικροοργανισμού στα τρυβλία (κεφάλαιο 6). Ταυτόχρονα, με χρήση των αποτελεσμάτων παρουσίας και απουσίας του μικροοργανισμού δύναται να εκτιμηθεί η συγκέντρωση του *L. monocytogenes* στον κιμά (κεφάλαιο 6). Γενικά, η μπαγεσιανή μοντελοποίηση μπορεί να ελαχιστοποιήσει τον απαιτούμενο χρόνο για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την παρουσία του *L. monocytogenes* και την αβεβαιότητα των αποτελεσμάτων.

Η χρησιμότητα όλων των παραπάνω συμπερασμάτων καταδεικνύεται από την ευρεία εφαρμογή που βρίσκουν στις μελέτες αξιολόγησης κινδύνου, όπου ο επιπολασμός ενός παθογόνου αποτελεί κρίσιμη παράμετρο και συνήθως προσδιορίζεται μέσω βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Η γνώση της ευαισθησίας και της ικανότητας εξειδίκευσης των διαγνωστικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή των μικροβιολογικών δεδομένων, μπορεί να οδηγήσει με ακρίβεια στην εκτίμηση της πραγματικής τιμής επιπολασμού για το παθογόνο.

Η μελέτη της βιοποικιλότητας του *L. monocytogenes* σε νωπό χοίρειο κιμά μέσω τεχνικών PCR (πολλαπλή PCR, RAPD, rep-PCR) οδήγησε τελικά στην αποτύπωση της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ στελεχών του μικροοργανισμού. Σε αρκετές περιπτώσεις η γενετική ομοιότητα στελεχών του *L. monocytogenes* δεν παρουσίασε καμία συσχέτιση με την προέλευσή τους (κεφάλαιο 7). Η αποτύπωση της γενετικής ετερογένειας του *L. monocytogenes* είναι απαραίτητη για την κατανόηση της επιδημιολογίας του οργανισμού τόσο στον άνθρωπο όσο και στα προσβαλλόμενα ζώα, καθώς η αποσαφήνιση της δομής του DNA δύναται να προσφέρει χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά στην παθογονικότητα ενός στελέχους.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

## ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

### I. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

<i>Θρεπτικό υλικό (εταιρεία, κωδικός αναφοράς)</i>	<i>Συστατικά, συγκέντρωση (g/l), pH</i>	<i>Κύρια βιβλιογραφική αναφορά</i>
1. Κοινό άγαρ ή plate count agar (Merck, 105463)	Πεπτόνη από καζεΐνη, 5,0· εκχύλισμα ζύμης, 2,5· D(+)-γλυκόζη, 1,0· άγαρ, 14,0. pH 7.0±0.2 (25°C)	Downes & Ito, 2001
2. Άγαρ Baird-Parker (Biolife)		Baird-Parker, 1962
α) Βάση άγαρ (Biolife, 401116):	Παγκρεατικό υδρόλυμα καζεΐνης, 10,0· εκχύλισμα βόειου κρέατος, 5,0· εκχύλισμα ζύμης, 1,0· πυρροβικό νάτριο, 10,0· γλυκίνη, 12,0· χλωριούχο λίθιο, 5,0· άγαρ 15,0. Γαλάκτωμα κρόκου αυγού και τελουρίτη,	
β) Διαχωριστικός παράγοντας (Biolife, 423700):	20% (50 ml). Τελικό pH 7,2±0,2	
3. Άγαρ CGYE (Biolife, 401289)	Εκχύλισμα ζύμης, 5,0· γλυκόζη, 20,0· χλωραμφαινικόλη, 0,1· άγαρ, 15,0. pH 6,6±0,2	Anonymous, 1987
4. Άγαρ CFC (Biolife)		Mead & Adams, 1977
α) Βάση άγαρ ψευδομονάδων (Biolife, 401960):	Παγκρεατικό αφομοίωμα ζελατίνης, 16,0· Όξινο υδρόλυμα καζεΐνης, 10,0· χλωριούχο μαγνήσιο, 1,4· θειικό κάλιο, 10,0· άγαρ, 11,5.	
β) Επιλεκτικοί παράγοντες (Biolife, 4240075):	Κετριμίδη, 0,01· φουσιδικό οξύ, 0,01· κεφαλοσπορίνη, 0,05. Τελικό pH 7,2±0,2	

<i>Θρεπτικό υλικό (εταιρεία, κωδικός αναφοράς)</i>	<i>Συστατικά, συγκέντρωση (g/l), pH</i>	<i>Κύρια βιβλιογραφική αναφορά</i>
5. Άγαρ MRS (Biolife, 401728)	Πεπτόνη, 10,00· εκχύλισμα βόειου κρέατος, 10,00· εκχύλισμα ζύμης, 5,00· γλυκόζη, 20,00· όξινο φωσφορικό νάτριο, 2,00· οξικό νάτριο, 5,00· κιτρικό αμμώνιο, 2,00· θειικό μαγνήσιο, 0,20· θειικό μαγγάνιο, 0,05· άγαρ, 15,00· Tween® 80, 1.00.  pH 6,4±0,2 (χωρίς ρύθμιση)	de Man και συν., 1960
6. Άγαρ PALCAM (Biolife)		van Netten και συν.,
α) Βάση άγαρ (Biolife, 401604):	Σύμπλεγμα πεπτόνης, 10,00· τρυπτόζη, 10,00· πεπτόνη, 3,00· εκχύλισμα ζύμης, 3,00· άμυλο αραβόσιτου, 1,00· χλωριούχο νάτριο, 5,00· γλυκόζη, 0,50· μαννιτόλη, 10,00· αισκουλίνη, 0,80· κιτρικό αμμώνιο σιδήρου, 0,50· χλωριούχο λίθιο, 15,00· ερυθρό της φαινόλης, 0,08· άγαρ, 12,00.	1989
β) Επιλεκτικοί παράγοντες (Biolife, 4240042):	Πολυμυξίνη Β, 100.000 IU· κεφταζιντίμη, 0,020· υδροχλωρική ακριφλαβίνη, 0,005.  Τελικό pH 7,2±0,2	
7. Άγαρ STAA (Biolife)		Gardner, 1966
α) Βάση άγαρ (Biolife, 402079):	Πεπτόνη, 20,00· Εκχύλισμα ζύμης, 2,00· όξινο φωσφορικό κάλιο, 1,00· επταϋδρικό θειικό μαγνήσιο, 0,10· κυκλοεξιμίδιο, 0,05· άγαρ, 11,50· κυανό της βρωμοκρεζόλης, 0,02.	
β) Επιλεκτικός παράγοντας (Biolife, 4240052):	Θειική στρεπτομυκίνη, 0,50· οξικό θάλλιο, 0,05.  Τελικό pH 7,0±0,1	

<i>Θρεπτικό υλικό (εταιρεία, κωδικός αναφοράς)</i>	<i>Συστατικά, συγκέντρωση (g/l), pH</i>	<i>Κύρια βιβλιογραφική αναφορά</i>
8. Άγαρ σιδήρου ή iron agar (από βασικά συστατικά)	Πεπτικό αφομοίωμα ζωικού ιστού, 20,0· εκχύλισμα βόειου κρέατος, 3,0· εκχύλισμα ζύμης, 3,0· κιτρικό άλας σιδήρου, 0,3· Θειοθειικό νάτριο, 0,2· χλωριούχο νάτριο, 5,0· L-κυστεΐνη, 0,6· άγαρ, 12,0.  pH 7,4±0,2	Gram και συν., 1987
9. Chromocult® (Merck, 110426)	Πεπτόνη, 3,00· χλωριούχο νάτριο, 5,00· δισόξινο φωσφορικό νάτριο, 2,20· όξινο φωσφορικό νάτριο, 2,70· πυρουβικό νάτριο, 1,00· τρυπτοφάνη, 1,00· άγαρ, 10,00· σορβιτόλη, 1,00· επταδεκυλ-θειικό νάτριο, 0,15· χρωμογόνο μίγμα, 0,40.	Turner και συν., 2000
10. VRBGA	Πεπτόνη, 7,000· εκχύλισμα ζύμης, 3,000· χλωριούχο νάτριο, 5,000· χολικά άλατα, 1,500· γλυκόζη, 10,000· ουδέτερο ερυθρό, 0,030· κρυσταλλικό ιώδες, 0,002· άγαρ, 15,000.	Mossel και συν., 1962, 1978



Π. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ *Listeria spp.*

Θρεπτικό υλικό (εταιρεία, κωδικός αναφοράς)	Συστατικά, συγκέντρωση (g/l), pH	Κύρια βιβλιογραφική αναφορά
1. ALOA (Biolife)		Ottaviani και συν.,
α) Βάση άγαρ (Biolife, 401605):	Πεπτόνη κρέατος, 18,00· τρυπτόνη, 6,00· εκχύλισμα ζύμης, 10,00· πυρουβικό νάτριο, 2,00· γλυκόζη· γλυκεροφωσφορικό μαγνήσιο, 1,00· θειικό μαγνήσιο, 0,50· χλωριούχο νάτριο, 5,00· χλωριούχο λίθιο, 10,00· άνυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο, 2,50· 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γλυκοκυρανοσίδιο, 0,05· άγαρ, 13,5.	1997
β) Επιλεκτικοί παράγοντες (Biolife, 423501)	Ναλιδιζικό οξύ, 0,02· κεφαζιντίμη, 0,02· κυκλοεξιμίδιο, 0,05· πολυμυξίνη Β, 76.700 IU. Τελικό pH 7,2±0,2	
2. Άγαρ PALCAM	Βλ. σύσταση θρεπτικού υλικού No.6 προηγούμενου πίνακα (I) παραρτήματος	van Netten και συν., 1989
3. Άγαρ RAPID'L.mono (Bio-Rad, 356-3694) (έτοιμα τρυβλία)	90 mm × 20 τρυβλία	Polivka, 2001
4. Αιματούχο άγαρ από αίμα αλόγου ή horse blood agar (Bioprepate, 010011) (έτοιμα τρυβλία)	Μίγμα πεπτόνης, 23,0· άμυλο αραβόσιτου, 1,0· χλωριούχο νάτριο, 5,0· άγαρ, 12,0· αίμα αλόγου, 60 ml ή 6% (v/v). (90 mm × 10 τρυβλία)	Ellner και συν., 1966

<i>Θρεπτικό υλικό (εταιρεία, κωδικός αναφοράς)</i>	<i>Συστατικά, συγκέντρωση (g/l), pH</i>	<i>Κύρια βιβλιογραφική αναφορά</i>
5. Ζωμός για έλεγχο ζύμωσης σακχάρου (από βασικά συστατικά)	Παγκρεατικό αφομοίωμα ζελατίνης, 10,00· χλωριούχο νάτριο, 5,00· κυανό της βρωμοκρεζόλης, 0,02·  Διάλυση και διανομή ποσοτήτων 9 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Αποστείρωση και προσθήκη 1 ml φιλτραρισμένου διαλυματος σακχάρου (10% L-ραμνόζης, 10% D-ξυλόζης, 10% μαννιτόλης, 5% α-μεθυλ-D-μαννοπυρανοζίδιο).	Technical data sheet #645, PML micro-biologicals
6. Ημιστερεό υλικό για έλεγχο κινητικότητας (από βασικά συστατικά)	Πεπτόνη καζεΐνης, 20,0· πεπτόνη κρέατος, 6,1· άγαρ, 5,0.  Διάλυση με βρασμό και διανομή ποσοτήτων 10 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες πριν την αποστείρωση. Άμεση ισχυρή ανάδευση μετά την αποστείρωση.	Prentice & Neaves, 1992

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

### ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ GRAM

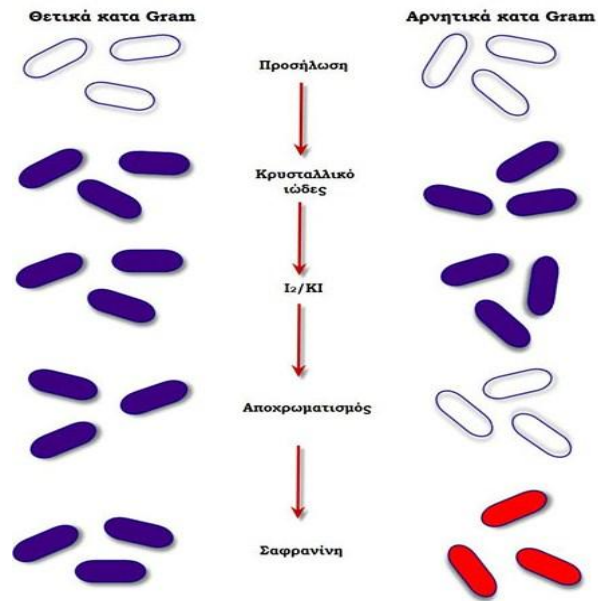
Η χρώση κατά Gram είναι μια απλή μέθοδος η οποία κατατάσσει τα βακτηριακά κύτταρα και κατά συνέπεια τα είδη των βακτηρίων σε δύο μεγάλες ομάδες: α) τα θετικά κατά Gram και β) τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Στην πρώτη περίπτωση τα βακτήρια διατηρούν το μπλε-ιώδες χρώμα της πρώτης χρώσης, ενώ στη δεύτερη λαμβάνουν ερυθρό χρώμα που οφείλεται στη δεύτερη χρώση. Η διαφορά στη χρώση ανάμεσα στους δύο τύπους κυττάρων οφείλεται στη δομή και χημική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και ιδιαίτερα στην ύπαρξη ή μη επιπλέον πεπτιδογλυκάνης. Το κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων περιέχει περισσότερη πεπτιδογλυκάνη (*ca.* 50% ή και περισσότερο του ξηρού βάρους του κυτταρικού τοιχώματος) σε σχέση με το κυτταρικό τοίχωμα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, το τελευταίο όμως παρουσιάζει πολυπλοκότερη δομή, με εξωτερική μεμβράνη που καλύπτει την πεπτιδογλυκάνη (5-10% του ξηρού βάρους του κυτταρικού τοιχώματος) η οποία βρίσκεται ανάμεσα στην κυταροπλασματική και εξωτερική μεμβράνη.

Τα κύτταρα βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες και ιώδιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συμπλόκου κρυσταλλικού ιώδους-ιωδίου. Όταν ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο εκπλυθεί με αιθανόλη, τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης διαλύονται και απομακρύνονται. Η εξωτερική μεμβράνη αποσταθεροποιείται και η διαπερατότητά της αυξάνεται. Συνεπώς, το σύμπλοκο της χρωστικής μπορεί να εκπλυθεί, αποχρωματίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο το αρνητικό κατά Gram βακτήριο, το οποίο στη συνέχεια εμφανίζεται ερυθρόχρωμο λόγω της σαφρανίνης. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια, η αιθανόλη προκαλεί το σχηματισμό πόρων στο στρώμα της

πεπτιδογλυκάνης, το οποίο συρρικνώνεται και εγκλωβίζει το σύμπλοκο κρυσταλλικού ιώδους-ιωδίου εντός του κυττάρου.

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΧΡΩΣΗΣ ΚΑΤΑ GRAM

1. Μια σταγόνα απιονισμένου νερού τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
2. Βακτηριακή αποικία μεταφέρεται ασηπτικά με βακτηριολογικό κρίκο και διαλύεται στη σταγόνα νερού, προς σχηματισμό κατά το δυνατόν ομοιογενούς γαλακτώματος.
3. Το παρασκεύασμα προσηλώνεται περνώντας την αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω από τη φλόγα λύχνου, προσέχοντας όμως να μην υπερθερμανθεί. Η προσήλωση ολοκληρώνεται όταν το παρασκεύασμα στεγνώσει.
4. Στο παρασκεύασμα προστίθεται κρυσταλλικό ιώδες και η χρωστική αφήνεται να δράσει για 1 min. Όλα ανεξαιρέτως τα βακτηριακά κύτταρα χρωματίζονται βαθύ κυανό χρώμα.
5. Η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνεται με νερό και το παρασκεύασμα επεξεργάζεται για 3 min με διάλυμα ιωδίου ( $I_2/KI$ ).
6. Το παρασκεύασμα ξεπλένεται με αλκοόλη για 1-3 min και στη συνέχεια με άφθονο νερό. Στο στάδιο αυτό μερικά μόνον κύτταρα (τα θετικά κατά Gram) διατηρούν το κυανό χρώμα, τα υπόλοιπα αποχρωματίζονται.
7. Το παρασκεύασμα καλύπτεται με σαφρανίνη για 1-2 min και στη συνέχεια η περίσσεια της χρωστικής ξεπλένεται με νερό.
8. Η περίσσεια του νερού απομακρύνεται προσεκτικά με απορροφητικό χαρτί, χωρίς αυτό να σύρεται στην επιφάνεια της πλάκας.
9. Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση με προσοφθάλμιο φακό X40 και στη συνέχεια X100 (ελαιοκαταδυτικός φακός).

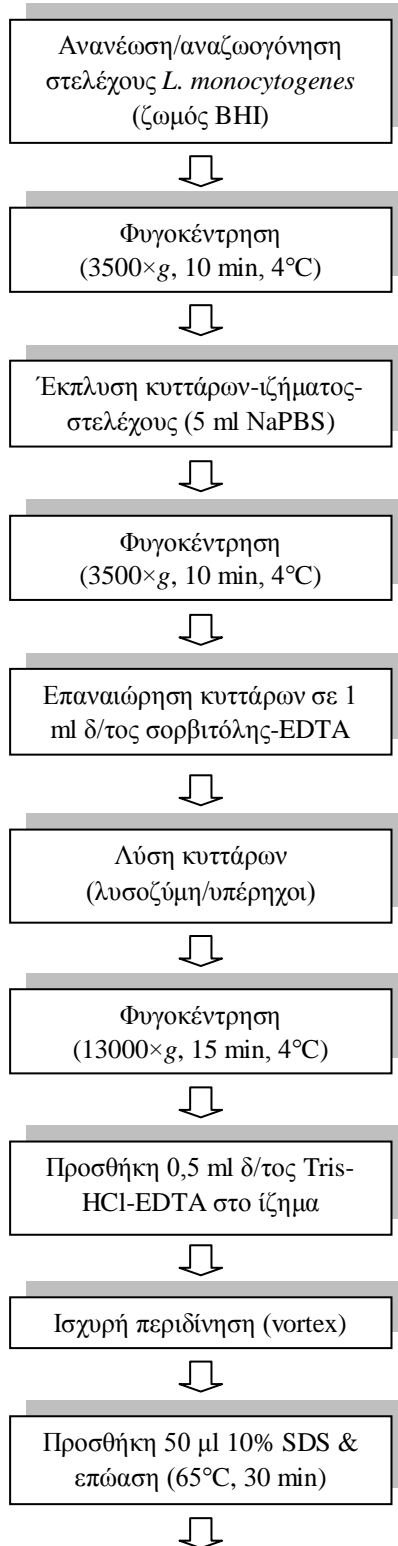


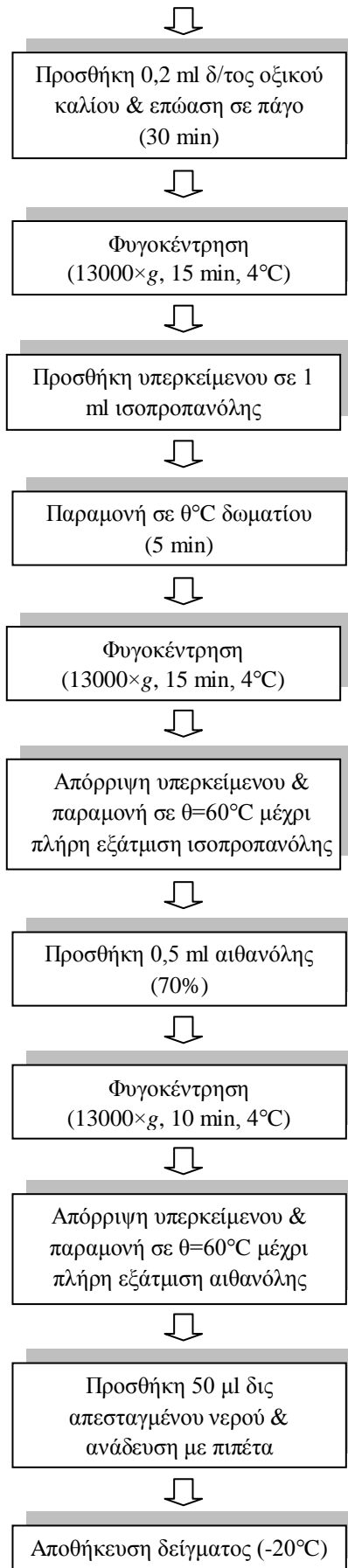
Σχήμα 15. Σχεδιαγραμματική απεικόνιση διαδικασίας χρώσης βακτηριακών κυττάρων κατά Gram.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

### ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ (DNA EXTRACTION)





Για την πραγματοποίηση της ως άνω περιγραφόμενης διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αποστειρωμένα διαλύματα (παρασκευασμένα όλα με χημικά αντιδραστήρια της AppliChem, Darmstadt, Γερμανία), ο σκοπός και η σύσταση των οποίων επίσης παρουσιάζεται:

- Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaPBS), pH 7,3, για έκπλυση κυττάρων του μικροοργανισμού: Προσθήκη απιονισμένου νερού σε 40,5 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 9,5 ml 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  και 8,0 g NaCl, μέχρι τελικού όγκου 1 lit. Η έκπλυση συνίσταται στην απομάκρυνση τελικών προϊόντων μεταβολισμού που τυχόν βρίσκονται δεσμευμένα επί των βακτηριακών κυττάρων.
- Διάλυμα 1 M σορβιτόλης και 0,1 M αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA): Προσθήκη απιονισμένου νερού σε 18,22 g σορβιτόλης και 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), μέχρι όγκου 80 ml. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στην τιμή 7,5 και συμπλήρωση με απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml. Η σορβιτόλη συμβάλλει στη διατήρηση της ωσμωτικότητας του κυττάρου, ενώ η χρήση του EDTA αποσκοπεί κυρίως στη δέσμευση δισθενών κατιόντων του εναιωρήματος που παρεμποδίζουν τη μετέπειτα δράση των δεοξυριβονουκλεασών (DNases). Στην περίπτωση που η επερχόμενη λύση των κυττάρων του μικροοργανισμού γίνεται με τη βοήθεια λυσοζύμης, τότε προστίθενται 25 mg ενζύμου ανά ml διαλύματος και τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για τουλάχιστον 2 h.
- Διάλυμα 50 mM τρι-υδροξυμεθυλ-αμινομεθανίου (tris-hydroxymethyl-aminomethane, Tris) και συμπυκνωμένου υδροχλωρίου μαζί (Tris-HCl) και 20 mM EDTA: Προσθήκη απιονισμένου νερού σε 5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0) και 4 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), μέχρι όγκου 80 ml. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στην τιμή 7,4 και συμπλήρωση με απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml. Το



Tris-HCl χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της ρυθμιστικής ικανότητας του διαλύματος, ενώ το EDTA για περαιτέρω δέσμευση δισθενών κατιόντων.

- Διάλυμα 10% (w/v) δωδεκυλ-θειικού νατρίου (sodium dodecyl sulfate, SDS): Προκύπτει με διάλυση 10 g SDS σε 100 ml απιονισμένου νερού, υπό ελαφρά ανάδευση για αποφυγή αφρισμού. Το SDS μαζί με τη θέρμανση (65°C) κατά το στάδιο που χρησιμοποιείται, συνεισφέρει στην αποδέσμευση πρωτεϊνών και λιπιδίων.
- Διάλυμα 5 M οξικού καλίου: Παρασκευάζεται με διάλυση 49 g οξικού καλίου σε 100 ml απιονισμένου νερού. Χρησιμοποιείται για τη δέσμευση του SDS, επιτρέποντας την απομάκρυνση των πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία απομόνωσης του DNA. Η άμεση πτώση της θερμοκρασίας (πάγος) κατά την εφαρμογή του διαλύματος οξικού καλίου οδηγεί στην κατακρήμνιση του SDS.
- Καθαρή (99%) ισοπροπανόλη. Η προσθήκη της οδηγεί στο διαχωρισμό του DNA μέσω φυγοκέντρωσης, λόγω αδυναμίας διάλυσης στον διαλύτη, με συνέπεια την κατακρήμνιση του DNA υπό μορφή ιζήματος.
- Διάλυμα 70% (v/v) αιθανόλης: Προκύπτει με ανάμιξη 70 ml καθαρής αιθανόλης και απιονισμένου νερού, μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Η χρήση της αποσκοπεί στην διάλυση και αφαίρεση υπολειμμάτων ισοπροπανόλης κατά το προηγούμενο στάδιο εφαρμογής της.
- Μητρικό διάλυμα (stock solution) 0,5 M EDTA, pH 8,0: Προσθήκη απιονισμένου νερού σε 33,6 g EDTA, μέχρι όγκου 80 ml. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στην τιμή 8,0 με χρήση NaOH και συμπλήρωση με απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

- Μητρικό διάλυμα 1 M Tris-HCl, pH 8,0: Προσθήκη απιονισμένου νερού σε 12,2 g Tris-HCl, μέχρι όγκου 80 ml. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στην τιμή 8,0 με χρήση NaOH και συμπλήρωση με απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

#### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DNA

Ο προσδιορισμός της επιτυχούς ή μη απομόνωσης DNA από τον μικροοργανισμό έγινε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του δείγματος σε νανοφωτόμετρο (P 300, Implen, Μόναχο, Γερμανία), όπου χρησιμοποιήθηκε ο λόγος των απορροφήσεων σε μήκη κύματος 260 και 280 nm αντίστοιχα ( $A_{260}/A_{280}$ ). Όταν ο συγκεκριμένος λόγος κυμαινόταν μεταξύ 1,8 και 2,0, τότε η απομόνωση του DNA ήταν επιτυχής και η ποσότητά του κρίνονταν ως επαρκής (5-800 ng/μl). Στην περίπτωση όπου ο λόγος ξεπερνούσε την τιμή 2,0, το αντίστοιχο DNA του δείγματος θεωρούνταν ως υψηλής καθαρότητας, ενώ αντίθετα στην περίπτωση όπου ο λόγος ήταν μικρότερος της τιμής 1,8, επιβαλλόταν η αραίωση του δείγματος για ενίσχυση της καθαρότητας του DNA του. Αναφορικά με τις επιμέρους απορροφήσεις, όταν η λαμβανόμενη  $A_{260}$  ήταν μικρότερη της τιμής 0,15, η ποσότητα DNA του δείγματος κρίνονταν ως ανεπαρκής, ενώ μεγάλες τιμές  $A_{280}$  υποδήλωναν την υψηλή περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη και ως εκ τούτου τον ατελή καθαρισμό του.

#### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΙΓΜΑΤΟΣ (MASTER MIX) ΓΙΑ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ PCR

Για τη διεξαγωγή της PCR είναι απαραίτητη η προετοιμασία ενός μίγματος αποτελούμενου από τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- α) 10× ρυθμιστικό διάλυμα (*Taq* DNA polymerase, Invitrogen, Καλιφόρνια, Η.Π.Α.), το οποίο προσφέρει το κατάλληλο περιβάλλον για τη βέλτιστη ενεργότητα και σταθερότητα της πολυμεράσης

- β) 0,2 mM dNTP's (Invitrogen), η ποσότητα των απαραίτητων βάσεων δηλαδή από τις οποίες με την βοήθεια της πολυμεράσης θα προέλθουν οι νέοι κλώνοι DNA
- γ) 0,2 μM από κάθε εκκινητή LIP 1 και LIP 2, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την έναρξη της διαδικασίας σύνθεσης νέων κλώνων DNA
- δ) 1,5 mM  $Mg^{+2}$ , απαιτούμενη συγκέντρωση κατιόντων που δρουν ως συμπράγοντας για την πολυμεράση
- ε) 1 U *Taq* πολυμεράσης (Invitrogen), η οποία προστίθεται τελευταία στο μίγμα της αντίδρασης και
- στ) δις απεσταγμένο νερό.

Ο όγκος του μίγματος που παρασκευάζεται εξαρτάται από τον αριθμό των δειγμάτων που προορίζονται για PCR. Ο αριθμός αυτός πολλαπλασιάζεται με τον όγκο του μίγματος αντίδρασης (25 μl) και έτσι προκύπτει ο τελικός όγκος του μίγματος. Σε κατάλληλους μικρούς πλαστικούς περιέκτες για PCR (PCR eppendorfs) τοποθετούνταν κάθε φορά 23 μl του παραπάνω μίγματος και ακολούθως προσθέτονταν 2 μl δείγματος. Οι περιέκτες τοποθετούνταν σε συσκευή PCR ή θερμικό κυκλοποιητή (thermocycler) όπου και επαναλαμβάνονταν ο κύκλος των τριών αντιδράσεων αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA, με βάση σταθερό πρόγραμμα το οποίο περιελάμβανε της εξής συνθήκες: αρχική θερμοκρασία 94°C για 2 min, μετά 40 κύκλους σε θερμοκρασίες 94°C για 30 sec, 55°C για 30 sec και 74°C για 60 sec, ακολουθούμενοι από τελική σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 74°C για 5 min. Μετά το τέλος της PCR, ακολουθούσε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 1,5% (w/v) αγαρόζης με προσθήκη TAE και σταθερή παροχή ρεύματος 100 V για 1,5 h, για να διαπιστωθεί ο

πολλαπλασιασμός του DNA. Τα τμήματα του DNA γίνονταν ορατά με τη βοήθεια 10 ng/ml βρωμιούχου αιθιδίου (AppliChem).

#### ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΗΣ

Για τη διαπίστωση του επιτυχούς πολλαπλασιασμού του DNA και την αξιολόγηση του προϊόντος της PCR, πραγματοποιούταν κάθε φορά οριζόντια ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης η οποία συγκεκριμένα περιελάμβανε τα εξής:

1. Μόνωση με χαρτοταινία των πλαϊνών τμημάτων της βάσης όπου θα σχηματιστεί η πηκτή για αποφυγή διαρροών και τοποθέτηση στη μέση της/των ειδικής(-ών) χτένας(-ων) σχηματισμού των βοθρίων.
2. Προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων (electrode or running buffer) με προσθήκη απιονισμένου νερού σε 4,6 ml Tris-οξικό οξύ-EDTA 50X, μέχρι τελικού όγκου 230 ml.
3. Παρασκευή διαλύματος 1,5% αγαρόζης με προσθήκη 0,45 g αγαρόζης σε 30 ή 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων, ανάλογα με το μέγεθος της πηκτής (μικρή ή μεσαία αντίστοιχα).
4. Τοποθέτηση 5 μl από το κάθε δείγμα σε 1 μl χρωστικής φόρτωσης (loading dye), μετά τον σχηματισμό της πηκτής.
5. Τοποθέτηση 5 μl από το κάθε δείγμα σε κάθε βοθρίο της πηκτής αντίστοιχα.
6. Εκκίνηση ηλεκτροφόρησης με σταθερή παροχή ρεύματος 60 V για 30 min περίπου.
7. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min περίπου και ακολουθεί η επεξεργασία και φωτογράφησή της υπό υπεριώδη ακτινοβολία, όπου το DNA γίνεται ορατό.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Αναστασιάδου, Κ., & Καπράνος, Ν. (1998). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και οι κλινικές της εφαρμογές. *Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής*, 12 (3), 100-108.
- Ανδρίτσος, Ν. Δ. (2006). *Ταυτοποίηση ειδών κρέατος στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης με ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)*. (Πτυχιακή μελέτη). Αθήνα: Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Ανδρίτσος, Ν. Παραμυθιώτης, Σ., & Δροσινός, Ε. Χ. (2008). Λιστέρια: Ένας πονοκέφαλος για τις επιχειρήσεις τροφίμων. *Meat Point*, 12, 52-55.
- Ανώνυμος. (2004). Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 853/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 29<sup>ης</sup> Απριλίου 2004, για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*, L 226, 25/6/2004, 22-82.
- Ανώνυμος. (2005). Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής, της 15<sup>ης</sup> Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*, L 338, 22/12/2005, 1-26.
- Ανώνυμος. (2007). Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1441/2007 της Επιτροπής, της 5<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου 2007 για την τροποποίηση του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*, L 322, 7/12/2007, 12-29.

- Ανώνυμος. (2012). Υγειονομική διάταξη, της 8<sup>ης</sup> Οκτωβρίου 2012 περί νέων κανόνων διακίνησης/εμπορίας προϊόντων και παροχής υπηρεσιών. Υπουργείο Ανάπτυξης, Ανταγωνιστικότητας, Υποδομών, Μεταφορών και Δικτύων, Γενική Γραμματεία Εμπορίου.
- Αρβανιτογιάννης, Ι. Σ., Σάνδρου, Δ., & Κούρτης, Λ. (2001). *Ασφάλεια τροφίμων: Εφαρμογή της ανάλυσης επικινδυνότητας και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών* (1<sup>η</sup> έκδοση, σελ. 24-25). Θεσσαλονίκη: University Studio Press.
- Βασιλόπουλος, Χ., Σταματίου, Α., Σκανδάμης, Π. Ν., Κουτσομανής, Κ., & Νυχάς Γ.-Ι. (2005). Καταγραφή της αλλοιογόνου και παθογόνου χλωρίδας χοιρινού και μοσχαρίσιου κιμά από την κεντρική αγορά Αθηνών. Σε Κ. Ζαβιτσιάνος, & Ι. Φαγλά (Εκδ.), *Πρακτικά 1<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Βιοτεχνολογίας και Τεχνολογίας Τροφίμων* (σελ. 479-484). Αθήνα: Ένωση Ελλήνων Χημικών – Πανελλήνιος Σύλλογος Χημικών Μηχανικών.
- Βάσσος, Δ. Β. (2004). *Τρόφιμα και υγεία του καταναλωτή (Τροφογενείς διαταραχές)* (1<sup>η</sup> έκδοση). Αθήνα: Εκδόσεις Παπασωτηρίου.
- Γενηγιώργης, Κ. (2004). Βιολογικοί κίνδυνοι: Η σημερινή κατάσταση. Σε Σ. Β. Ραμαντάνη (Εκδ.), *Πρακτικά 3<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συμποσίου Υγιεινής & Τεχνολογίας Τροφίμων: Τόμος Β΄. Υγιεινή, Ασφάλεια των Τροφίμων και Υγεία του Ανθρώπου* (σελ. 236-248). Αθήνα: Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρεία, Κλάδος Κτηνιάτρων Υγιεινολόγων & Τεχνολόγων Τροφίμων.
- Καραγκούνη-Κύρτσου, Α. (1999). *Μικροβιολογία*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλης.

Μπαλατσούρας, Γ. (2006). *Μικροβιολογία τροφίμων* (2<sup>η</sup> έκδοση). Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.

### ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). *Food microbiology*. (3<sup>rd</sup> edn.). Cambridge: RSC Publishing.

Allerberger, F. (2007). *Listeria*. In S. Simjee (Ed.), *Foodborne diseases* (pp. 27-39). Totowa, NJ: Humana Press Inc.

Andrighetto, C., Zampese, L., & Lombardi, A. (2001). RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*, 33, 26-30.

Andritsos, N., Paramithiotis, S., Drosinos, E. H., & Mataragas, M. (2010). Bayesian inference for quantifying *Listeria monocytogenes* presence in minced pork meat as well as sensitivity and specificity of culture methods. *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> International ICFMH Symposium: Microbial Behaviour in the Food Chain*, p. 152. Copenhagen, Denmark: Kandrups Bogtrykkeri A/S.

Anonymous. (1987). *Microbiology-General guidance for enumeration of yeasts and moulds-Colony count technique at 25°C. International Standard ISO 7954*. Geneva: International Organization for Standardization.

Anonymous. (2010). Ohio-based seniors' food program shuts down due to *Listeria*. Food Safety Infosheet, 12<sup>th</sup> February 2010. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://www.foodsafetyinfosheets.com>. Προσπελάστηκε στις 27 Ιουλίου 2011.

Anonymous. (2011). Measures of location. In *Engineering Statistics Handbook*.

Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda351.htm>. Προσπελάστηκε στις 22 Ιουλίου 2011.

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.

Autio, T., Lundén, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Björkroth, J., Sjöberg, A.-M., & Korkeala, H. (2002). Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. *International Journal of Food Microbiology*, *77*, 83-90.

Baird-Parker, A. C. (1962). An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive Staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology*, *25*, 12-19.

Becker, B., Schuler, S., Lohneis, M., Sabrowski, A., Curtis, G. D. W., & Holzapfel, W. H. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *International Journal of Food Microbiology*, *109*, 127-131.

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.



- Bibb, W. F., Schwartz, B., Gellin, B. G., Plikaytis, B. D., & Weaver, R. E. (1989). Analysis of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *International Journal of Food Microbiology*, 8, 233-239.
- Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P. A. D., Jacquet, C., & Piffaretti, J. C. (1992). *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 69-73.
- 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. *Medical Decision Making*, 23, 341-350.
- Broemeling, L. D. (2007). *Bayesian biostatistics and diagnostic medicine*. (1<sup>st</sup> edn.). Boca Raton, FL: Chapman and Hall/CRC.
- Broome, C. V. (1993). Listeriosis: Can we prevent it? *ASM News*, 59, 444-446.
- Brosch, R., Chen, J., & Luchansky, J. B. (1994). Pulsed-field fingerprinting of *Listeriae*: Identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2584-2592.
- Bucholz, U., & Mascola, L. (2001). Transmission, pathogenesis, and epidemiology of *Listeria monocytogenes*. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 10, 34-41.
- Buzby, J. C., & Roberts, T. (2009). The economics of enteric infections: Human foodborne disease costs. *Gastroenterology*, 136, 1851-1862.

- Buzby, J. C., Roberts, T., & Lin, C.-T. J. (1996). *Bacterial foodborne disease: Medical costs and productivity losses*. Washington, United States: U.S. Department of Agriculture.
- CDC. (2011). *Listeria (Listeriosis): Prevention*. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://www.cdc.gov/listeria/prevention.html#melonsafety>. Προσπελάστηκε στις 9 Απριλίου 2013. Τελευταία επικαιροποίηση 21 Σεπτεμβρίου 2011. Atlanta, United States: Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases.
- Chand, P., & Sadana, J. R. (1999). Outbreak of *Listeria ivanovii* abortion in sheep in India. *Veterinary Record*, 145, 83-84.
- Chorianopoulos, N., Giaouris, E., Grigoraki, I., Skandamis, P., & Nychas, G.-J. (2011). Effect of acid tolerance response (ATR) on attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to stainless steel under extended exposure to acid or/and salt stress and resistance of sessile cells to subsequent strong acid challenge. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 400-406.
- Ciesielski, C. A., Hightower, A. W., Parsons, S. K., & Broome, C. V. (1988). Listeriosis in the United States: 1980-1982. *Archives of Internal Medicine*, 148, 1416-1419.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Cantoni, K. L., & Comi, G. (2002). Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 6273-6282.

- 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. *International Journal of Food Microbiology*, *103*, 167-178.
- 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*. *Journal of Applied Bacteriology*, *69*, 63-72.
- Collins, M. D., Wallbanks, S., Lane, D. J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., Dorsch, M., & Stackebrandt, E. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *41*, 240-246.
- Cossart, P., & Sansonetti, P. J. (2004). Bacterial invasion: The paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, *304*, 242-248.
- Cotoni, L. (1942). A' propos des bactéries dénommées *Listerella* rappel d' une observation ancienne de méningite chez l' homme. *Annales de l' Institut Pasteur*, *68*, 92-95.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, *131*, 112-119.
- Cummins, A. J., Fielding, A. K., & McLauchlin, J. (1994). *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *Journal of Infection*, *28*, 89-91.

- 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. *Journal of Food Protection*, *67*, 1646-1655.
- Daneshvar, M. I., Brooks, J. B., Malcolm, G. B., & Pine, L. (1989). Analyses of fermentation products of *Listeria* species by frequency-pulsed electron-capture gas-liquid chromatography. *Canadian Journal of Microbiology*, *25*, 786-793.
- Dawson, S. J., Evans, M. R. W., Willby, D., Bardwell, J., Chamberlain, N., & Lewis, D. A. (2006). *Listeria* outbreak associated with sandwich consumption from a hospital retail shop, United Kingdom. *Euro Surveill*, *11*, 89-90.
- de Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, *23*, 130-135.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, *106*, 195-208.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*, 3819-3822.

- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, 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 and DNA arrays. *Infection and Immunity*, 72, 1072-1083.
- Doumith, M., Jacquet, C., Gerner-Smidt, P., Graves, L. M., Loncarevic, S., Mathisen, T., Morvan, A., Salcedo, C., Torpdahl, M., Vazquez, J. A., & Martin, P. (2005). Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: Toward an international standard. *Journal of Food Protection*, 68, 2648-2650.
- Downes, F. P., & Ito, K. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4<sup>th</sup> ed.). Washington, DC: American Public Health Association (Chapter 7).
- Drosinos, E. H. (1994). *Microbial associations of minced lamb and their ecophysiological attributes*. (Διδακτορική διατριβή). Ανακτήθηκε από τη διαδικτυακή υπηρεσία ηλεκτρονικών διατριβών EThOS της Βρετανικής βιβλιοθήκης (αριθμός καταλόγου ILS: 11694345).
- Drosinos, E. H., & Board, R. G. (1995α). A survey of minced lamb packaged in modified atmospheres. *Fleischwirtschaft*, 75, 281-284.
- Drosinos, E. H., & Board, R. G. (1995β). Microbial and physicochemical attributes of minced lamb: Sources of contamination with pseudomonads. *Food Microbiology*, 12, 189-197.

- Drosinos, E. H., Paramithiotis, S., & Andritsos, N. (2011). Microbial foodborne pathogens. In L. M. L. Nollet & F. Toldra (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products* (p. 220). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Dussurget, O., Pizzaro-Cerda, J., & Cossart, P. (2004). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Review of Microbiology*, 58, 587-610.
- Eisel, W. G., Linton, R. H., & Muriana, P. M. (1997). A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meat processing plant. *Food Microbiology*, 14, 273-282.
- Ellner, P. D., Stoessel, C. J., Drakeford, E., & Vasi, F. (1966). A new culture medium for medical bacteriology. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 502-504.
- Emswiler, B. S., Pierson, C. J., & Kotula, A. W. (1976). Bacteriological quality and shelf life of ground beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 36, 826-830.
- ECDC. (2008). Eurosurveillance archives. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://www.eurosurveillance.org/Public/Articles/Archives.aspx>. Προσπελάστηκε στις 10 Νοεμβρίου 2008. Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control.
- EFSA, & ECDC. (2010). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2008. *EFSA Journal*, 8, 1496. [410pp.] doi:10.2903/j.efsa.2009.1438
- EFSA, & ECDC. (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal*, 9, 2090. [378pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2090

- EFSA, & ECDC. (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10, 2597. [442pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2597
- FAO, & WHO. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. In: *Microbiological risk assessment series 4*. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: [http://www.fao.org/documents/advanced\\_s\\_result.asp?FORM\\_C=AND&SERIES=314](http://www.fao.org/documents/advanced_s_result.asp?FORM_C=AND&SERIES=314). Προσπελάστηκε στις 27 Ιουλίου 2011. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization.
- Farber, J. M., & Addison, C. J. (1994). RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 242-250.
- Farber, J. M., Coates, F., & Daley, E. (1992). Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 15, 103-105.
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55, 476-511.
- FDA. (2006). Final report and executive summaries from the AOAC International Presidential Task Force on Best Practices in Microbiological Methodology. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm124900.htm>. Προσπελάστηκε στις 27 Ιουλίου 2011. Silver Spring, Maryland: US Department of Health and Human Services.

- Feresu, S. B., & Jones, D. (1988). Taxonomic studies on *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria* and atypical lactobacilli. *Journal of General Microbiology*, *134*, 1165-1183.
- FSIS. (2008). FSIS recalls. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: [http://www.fsis.usda.gov/Fsis\\_Recalls/Recall\\_Case\\_Archive/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Fsis_Recalls/Recall_Case_Archive/index.asp). Προσπελάστηκε στις 8 Νοεμβρίου 2008. Washington, DC: United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service.
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, *113*, 1-15.
- Gardner, G.A. (1966). A selective medium for the enumeration of *Microbacterium thermosphactum* in meat and meat products. *Journal of Applied Bacteriology*, *29*, 455-460.
- Gasarov, U., Hughes, D., & Hansbro, P. M. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*, 851-875.
- Gellin, B. G., Broome, C. V., Bibb, W. F., Weaver, R. E., Gaventa, S., & Mascola, L. (1991). The epidemiology of listeriosis in the United States-1986. *American Journal of Epidemiology*, *133*, 392-401.
- 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 by repetitive element PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *32*, 2989-2994.



- Gevers, D., Huys, G., & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 31-36.
- Gilbert, R. J., de Louvois, J., Donovan, T., Little, C., Nye, K., Ribeiro, C. D., Richards, J., Roberts, D., Bolton, F. J. (2000). Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Communicable Disease and Public Health*, 3, 163-167.
- Gill, C. O., & Newton, K. G. (1977). The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 43, 189-195.
- Gill, C. O., & Newton, K. G. (1978). The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat Science*, 2, 207-217.
- Giotis, E. S., Blair, I. S., & McDowell, D. A. (2007). Morphological changes in *Listeria monocytogenes* subjected to sublethal alkaline stress. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 250-258.
- 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. *Journal of Clinical Epidemiology*, 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.
- Gorski, L. (2008). Phenotypic identification. In D. Liu (Ed.), *Handbook of Listeria monocytogenes* (pp. 139-168). Boca Raton, FL: CRC Press.
- 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. *Infection and Immunity*, *62*, 3550-3553.
- Goulet, V., de Valk, H., Pierre, O., Stainer, F., Rocourt, J., Vaillant, V., Jacquet, C., & Desenclos, J.-C. (2001). Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987-1997. *Emerging Infectious Diseases*, *7*, 983-989.
- Goulet, V., Hedberg, G., Le Monnier, A., & de Valk, H. (2006). Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging Infectious Diseases*, *14*, 734-740.
- Graves, L. M., Hesel L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Millilo, 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 Natural Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*, 1280-1288.

- Graves, L. M., Swaminathan, B., Reeves, M. W., Hunter, S. B., Weaver, R. E., Plikaytis, B. D., & Schuchat, A. (1994). Comparison of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, *32*, 2936-2943.
- Gray, M. L. (1957). A rapid method for the detection of colonies of *Listeria monocytogenes*. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene Series A*, *169*, 373-377.
- Gray, M. L., & Killinger, A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infection. *Bacteriological Reviews*, *30*, 309-382.
- Greenwood, M., Willis, C., Doswell, P., Allen, G., & Pathak, K. (2005). Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. *Journal of Applied Microbiology*, *99*, 1340-1345.
- Guerro, M. L. F., Rivas, P., Rábago, R., Núñez, A., deGórgolas, M., & Martinelli, J. (2004). Prosthetic valve endocarditis due to *L. monocytogenes*. Report of two cases and reviews. *International Journal of Infectious Diseases*, *8*, 97-102.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M.-F., Bielecka, M. K., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., Vázquez-Boland, J., Lortholary, O., & Lecuit, M. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*, *16*, 136-138.
- Habib, I., Sampers, I., Uyttendaele, M., De Zutter, L., & Berkvens, D. (2008). A Bayesian modelling framework to estimate *Campylobacter* prevalence and culture methods sensitivity: Application to a chicken meat survey in Belgium. *Journal of Applied Microbiology*, *105*, 2002-2008.

- Hain, T., Steinweg, C., & Chakraborty, T. (2006). Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. *Journal of Biotechnology*, 126, 37-51.
- Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology*. (3<sup>rd</sup> edn.). San Diego, CA: Academic Press.
- Harris, L. J. (2002) *Listeria monocytogenes*. In D. O. Cliver & H. P. Riemann (Eds.), *Foodborne diseases* (2<sup>nd</sup> edn., pp. 137-150). San Diego, CA: Academic Press.
- Hartford, T., & Sneath, P. H. A. (1993). Optical DNA-DNA homology in the genus *Listeria*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 26-31.
- Hegde, V., Leon-Velarde, C. G., Stam, C. M., Jaykus, L.-A., & Odumeru, J. A. (2007). Evaluation of BBL CHROMagar *Listeria* agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from food and environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 82-87.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-994.
- Henry, B. S. (1933). Dissociation in the genus *Brucella*. *Journal of Infectious Diseases*, 52, 374-402.
- Hitchins, A. D. (1989). Quantitative comparison of two enrichment methods for isolating *Listeria monocytogenes* from inoculated ice cream. *Journal of Food Protection*, 52, 898-900.

- Hitchins, A. D. (2006). Proposed use of a 50% limit of detection value in defining uncertainty limits in the validation of presence-absence microbial detection methods. (Appendix K, Statistics WG Report Part 4a-LOD 50). Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm124900.htm>. Προσπελάστηκε στις 27 Ιουλίου 2011. Silver Spring, Maryland: US Department of Health and Human Services.
- Hitchins, A. D., & Jinnerman, K. (2011). Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In *Bacterial Analytical Manual Online*. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>. Προσπελάστηκε στις 3 Απριλίου 2012. Τελευταία επικαιροποίηση 11 Νοεμβρίου 2011. Washington, DC: US Food and Drug Administration.
- 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. *Archives of Internal Medicine*, 146, 520-524.
- Hof, H. (2003). Listeriosis: Therapeutic options. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, 203-205.
- Hof, H., Nichterlein, T., & Kretschmar, M. (1997). Management of listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 345-357.
- Hofer, R., Ribeiro, R., & Feitosa, D. P. (2000). Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 615-620.

- Hucker, G. J. (1921). A new modification and application of the Gram stain. *Journal of Bacteriology*, 6, 395-397.
- Hudson, W. R., Roberts, T. A., Crosland, A. R., & Casey, J. C. (1986). The bacteriological quality, fat and collagen content of minced beef at retail level. *Meat Science*, 17, 139-152.
- Hülphers, G. (1911). Liver necrosis in rabbit caused by a hereto not described microorganisms. *Svensk Veterinär Tidskrift*, 16, 265-273.
- Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 2465-2466.
- ICMSF. (1996). *Microorganisms in foods 5: Characteristics of microbial pathogens*. London: Blackie Academic & Professional.
- IFT, & FDA Report on Task Order 4. (2003). Chapter III: Factors that influence microbial growth. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 21s- 32s.
- ISO. (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization 11290-1.
- ISO. (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration method. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization 11290-2.

- ISO. (1999). Meat and meat products – Measurement of pH – Reference method. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO. (2004α). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization 11290-1:1996/Amd 1:2004.
- ISO. (2004β). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization 11290-2:1998/Amd 2:2004.
- Ivanek, R., Gröhn, Y. T., Wells, M. T., Lembo, Jr., A. J., Sauders, B. D., & Wiedmann, M. (2009). Modeling of spatially referenced environmental and meteorological factors influencing the probability of *Listeria* species isolation from natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5893-5909.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 616-622.
- Jaloustre, S., Cornu, M., Morelli, E., Noël, V., & Delignette-Muller, M. L. (2011). Bayesian modeling of *Clostridium perfringens* in beef-in-sauce products. *Food Microbiology*, 28, 311-320.
- Jarvis, B. (2008). *Statistical aspects of the microbiological examination of foods*. London: Academic Press.

- Jeršek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E., Rijpens, N., & Herman, L. (1999). Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 103-109.
- Jørgensen, L. V., & Huss, H. H. (1998). Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 127-131.
- Jørgensen, F., Stephens, P. J., & Knøchel, S. (1995). The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 274-281.
- Junttila, J. R., Niemelä, S. I., & Hirn, J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 321-327.
- Käferstein, F. K. (2003). Actions to reverse the upward curve of foodborne illness. *Food Control*, 14, 101-109.
- Kammenou, M., Metaxopoulos, J., & Drosinos, E. H. (2003). Microbiological quality of minced beef from butcher shops and supermarkets. *Italian Journal of Food Science*, 15, 95-104.
- Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*, 65, 1811-1829.
- 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. *Journal of Food Protection*, 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. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 236-244.
- Kleeberger, A., & Busse, M. (1975). Keimzahl und Florazusammensetzung bei Hackfleisch unter besonderer Berücksichtigung von Enterobakterien und Pseudomonaden [Total count and bacterial flora of minced meat with special reference to enterobacteria and pseudomonads (author's transl.)]. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung A*, 158, 321-331.
- Klein, P. G., & Juneja, V. K. (1997). Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4441-4448.
- Koutsoumanis, K. P., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H., & Nychas, G.-J. E. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology*, 25, 915-921.
- Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P., & Nychas G.-J. E. (2006). Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 124-134.
- Lambropoulou, K. A., Drosinos, E. H., & Nychas, G. J. E. (1996). The effect of glucose supplementation on the spoilage flora and chemical composition of minced beef stored aerobically or under modified atmosphere at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 281-291.

- Lawrence, L. M., Harvey, J., & Gilmour, A. (1993). Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3117-3119.
- Leimeister-Wächter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W., & Chakraborty, T. (1990). Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 8336-8340.
- Leistner, L., & Gorris, G. M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 41-46.
- Leite, P., Rodrigues, R., Ferreira, M., Ribeiro, G., Jacquet, C., Martin, P., & Luisa, B. (2006). Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 111-121.
- Lesaffre, E., Speybroeck, N., & Berkvens, D. (2007). Bayes and diagnostic testing. *Veterinary parasitology*, 148, 58-61.
- Lessing, M. P., Curtis, G. D., & Bowler, I. C. (1994). *Listeria ivanovii* infection. *Journal of Infection*, 29, 230-231.
- Lianou, A., & Sofos, J. N. (2007). A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection*, 70, 2172-2198.
- Lorber, B. (1997). Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 24, 1-11.

- Lorber, B. (2002). *Listeria monocytogenes*. In V. L. Yu, R. Weber & D. Raoult (Eds.), *Antimicrobial therapy and vaccines* (2<sup>nd</sup> edn., pp. 429-436). New York, NY: Apple Trees Production, LLC.
- Lorber, B. (2007). Listeriosis. In H. Goldfine & H. Shen (Eds.), *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and host response* (pp. 13-31). New York, NY: Springer.
- Lungu, B., Ricke, S. C., & Johnson, M. C. (2009). Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: a review. *Anaerobe*, 15, 7-17.
- Mataragas, M., Skandamis, P., Nychas, G.-J. E., & Drosinos, E. H. (2007). Modeling and predicting spoilage of cooked, cured meat products by multivariate analysis. *Meat Science*, 77, 348-356.
- McCarthy, M., O'Reilly, S., Cotter, L., & de Boer, M. (2004). Factors influencing consumption of pork and poultry in the Irish market. *Appetite*, 43, 19-28.
- McDonald, K., & Sun, D. W. (1999). Predictive food microbiology for the meet industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 1-27.
- Mead, G. C., & Adams, B. W. (1977). A selective medium for the rapid isolation of pseudomonas associated with poultry meat spoilage. *British Poultry Science*, 18, 661-670.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., & Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607-625.

- Meunier, J. R., & Grimont, P. A. D. (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology*, *144*, 373-379.7
- Mitra, A. (2008). *Fundamentals of quality control and improvement*. (3<sup>rd</sup> edn.). Chichester, England: John Wiley & Sons.
- Mossel, D. A. A., Corry, J. E. L., Struijk, C. B., & Baird, R. M. (1995). *Essentials of the microbiology of foods: A textbook for advanced studies*. Chichester, England: John Wiley & Sons.
- Mossel, D. A. A., Eelderink, I., Koopmans, M., & van Rossem, F. (1978). Optimisation of a MacConkey-type medium for the enumeration of Enterobacteriaceae. *Laboratory Practice*, *27*, 1049-1050.
- Mossel, D. A. A., Eelderink, I., Koopmans, M., & van Rossem, F. (1979). Influence of carbon source, bile salts and incubation temperature on recovery of Enterobacteriaceae from foods using MacConkey-type agars. *Journal of Food Protection*, *42*, 470-475.
- Mossel, D. A. A., & Ingram, M. (1955). The physiology of the microbial spoilage of foods. *Journal of Applied Bacteriology*, *18*, 232-268.
- 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. *Journal of Bacteriology*, *84*, 381.
- Mossel, D. A. A., & Struijk, C. B. (1992). The contribution of microbial ecology to management and monitoring of the safety, quality and acceptability (SQA) of foods. *Journal of Applied Microbiology*, *73*, 1s-22s.

- Mosteller, F., & Tukey, J. W. (1977). *Data analysis and regression: A second course in statistics*. Reading, Mass: Addison-Wesley Pub. Co.
- Mullis, K. B., Ferré, F., & Gibbs, R. A. (Eds.) (1994). *The polymerase chain reaction*. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag AG.
- Murphy, M., Corcoran, D., Buckley, J. F., O'Mahony, M., Whyte, P., & Fanning, S. (2007). Development and application of Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) to subtype a collection of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 187-194.
- 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*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 28, 407-439.
- NACMCF. (1991). '*Listeria monocytogenes*. Recommendations by the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods'. *International Journal of Food Microbiology*, 14, 186-246.
- NACMCF. (2005). Considerations for establishing safety-based consume-by date labels for refrigerated ready-to-eat foods. *Journal of Food Protection*, 68, 1761-1775.
- NCBI. (2011). Taxonomy browser. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>. Προσπελάστηκε στις 18 Νοεμβρίου 2011. Bethesda, United States: National Center for Biotechnology Information.

- Nadon, C. A., Woodward, D. L., Young, C., Rodgers, F. G., & Wiedmann, M. (2001). Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2704-2707.
- Nauta, M. J. (2002). Modeling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: Is it possible? *International Journal of Food Microbiology*, 73, 297-304.
- Nørrung, B. (2000). Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 217-221.
- Nychas, G. J., Robinson, A., & Board, R. G. (1991). Microbiological and physico-chemical evaluation of ground beef from retail shops. *Fleischwirtschaft*, 71, 1057-1059.
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78, 77-89.
- Nyfeldt, A. (1929). Etiologie de la mononucléose infectieuse. *Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie*, 101, 590-592.
- Ooi, S. T., & Lorber, B. (2005). Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases*, 40, 1327-1332.
- Ottaviani, F., Ottaviani, M., & Agosti, M. (1997). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. *Quinper Froid Symposium Proceedings*, P6 A.D.R.I.A. Quinper, France.

- Painter, J., & Slutsker, L. (2007). Listeriosis in humans. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food Safety* (3<sup>rd</sup> edn., p. 95). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Papadopoulou, O., Panagou, E. Z., Tassou, C. C., & Nychas, G.-J. E. (2011). Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International*, *44*, 3264-3271.
- Parish, M. E., & Higgins, D. P. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *Journal of Food Protection*, *52*, 144-147.
- Parisi, A., Latorre, L., Normanno, G., Miccolupo, A., Fraccalvieri, R., Lorusso, V., & Santagada, G. (2010). Amplified Fragment Length Polymorphism and Multi-Locus Sequence Typing for high-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment. *Food Microbiology*, *27*, 101-108.
- Patchett, R. A., Kelly, A. F., & Kroll, R. G. (1991). Respiratory activity of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, *78*, 95-98.
- Paulsen, P., Smulders, F. J. M., Tichy, A., Aydin, A., & Höck, C. (2011). Application of Classification and Regression Tree (CART) analysis of the microflora of minced meat for classification according to Reg. (EC) 2073/2005. *Meat Science*, *88*, 531-534.
- Peel, M., Donachie, W., & Shaw, A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *Journal of General Microbiology*, *143*, 2171-2178.

- Piffaretti, J. C., Kressebuch, H., Aeschbacher, M., Bille, J., Bannerman, E., Musser, J. M., Selander, R. K., & Rocourt, J. (1989). Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 3818-3822.
- Pine, L., Malcolm, G. B., Brooks, J. B., & Daneshvar, M. I. (1989). Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 245-254.
- Pirie, J. H. H. (1927). A new disease of veld rodents, "Tiger River Disease". *South African Institute for Medical Research*, 3, 163-186.
- Pirie, J. H. H. (1940). *Listeria*: Change of name for a genus of bacteria. *Nature*, 145, 264.
- Pohl, M. A., Wiedmann, M., & Nightingale, K. K. (2006). Associations among *Listeria monocytogenes* genotypes and distinct clinical manifestations of listeriosis in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 67, 616-626.
- Poimenidou, S., Belessi, C. A., Giaouris, E. D., Gounadaki, A. S., Nychas, G.-J. E., & Skandamis, P. N. (2009). *Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7182-7188.
- Polivka, C. (2001). Identification of *Listeria* with a new chromogenic medium RAPID'L.mono. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 52, 22-23.



- Portnoy, D. A., Auerbach, V., & Glomski, I. J. (2002). The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: The intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *Journal of Cell Biology*, *158*, 409-414.
- Pouillot, R., Albert, I., Cornu, M., & Dennis, J. B. (2003). Estimation of uncertainty and variability in bacterial growth using Bayesian inference: Application to *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, *81*, 87-104.
- Pouillot, R., Gerbier, G., & Gardner, I. A. (2002). "TAGS", a program for the evaluation of test accuracy in the absence of gold standard. *Preventive Veterinary Medicine*, *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 Microbiology*, *28*, 720-726.
- Premaratne, R. J., Lin, W. J., & Johnson, E. A. (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, *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., & Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, *15*, 439-446.
- Rao, D. N., & Ramesh B. S. (1988). Microbial profiles of minced meat. *Meat Science*, *23*, 279-291.

- Reissbrodt, R. (2004). New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp. – an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 1-9.
- Roberts, T. (1989). Human illness costs of foodborne bacteria. *American Journal of Agricultural Economics*, 71, 468-474.
- Roberts, T. A., Britton, C. R., & Hudson, W. R. (1980). The bacteriological quality of minced beef in the U.K. *The Journal of Hygiene*, 85, 211-217.
- Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C., & Piffaretti, J. C. (1992). Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description to *Listeria grayi*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 171-174.
- Rocourt, J., & Buchrieser, C. (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In E. T Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (3<sup>rd</sup> edn., pp. 1-20). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Rocourt, J., & Cossart, P. (1997). *Listeria monocytogenes*. In M. P. Doyle, L. R. Buechat, & T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology - fundamentals and frontiers* (pp. 337-352). Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM) Press.
- Rocourt, J., Grimont, F., Grionot, P. A. D., & Seeliger, H. P. R. (1982). DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes sensu lato*. *Current Microbiology*, 7, 383-388.

- Rocourt, J. Moy, G., Vierk, K., & Schlundt, J. (2003). *The present state of foodborne disease in OECD countries*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Rodríguez-Lázaro, D., Jofré, A., Aymerich, T., Hugas, M., & Pla, M. (2004). Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6299-6301.
- Romick, T. L., Fleming, H. P., & McFeeters, R. F. (1996). Aerobic and anaerobic metabolism of *Listeria monocytogenes* in defined glucose medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 304-307.
- Rosenquist, H., Bengtsson, A., & Hansen, T. B. (2007). A collaborative study on a Nordic standard protocol for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* in food (NMKL 119, 3. Ed., 2007). *International Journal of Food Microbiology*, 118, 201-213.
- Ryser, E. T. (2007). Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in unfermented dairy products. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (3<sup>rd</sup> edn., pp. 357-403). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Safdar, A., & Armstrong, D. (2003). Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955-1997). *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 483-485.
- Sanger, J. M., Sanger, J. W., & Southwick, F. S. (1992). Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 60, 3609-3619.

- Scallan, E., Griffin, P. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., & Hoekstra, R. M. (2011α). Foodborne illness acquired in the United States – unspecified agents. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 16-22.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones J. L., & Griffin, P. M. (2011β). Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7-15.
- Scanga, J. A., Grona, A. D., Belk , K. E., Sofos, J. N., Bellinger, G. R., & Smith, G. C. (2000). Microbiological contamination of raw beef trimmings and ground beef. *Meat Science*, 56, 145-152.
- Scharff, R. L. (2012). Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *Journal of Food Protection*, 75, 123-131.
- Scheld, W. M. (1983). Evaluation of rifampin and other antibiotics against *Listeria monocytogenes* in vitro and in vivo. *Clinical Infectious Diseases*, 5, S593-S599.
- Schlech, W. F. III, Chase, D. P., & Badley, A. (1993). A model of food-borne *Listeria monocytogenes* infection in the Sprague-Dawley rat using gastric inoculation: Development and effect of gastric acidity on infective dose. *International Journal of Food Microbiology*, 18, 15-24.
- Schlech, W. F. III, Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S., & Broome, C. V. (1983). Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine*, 308, 203-206.
- Schlundt, J. (2002). New directions in foodborne disease prevention. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 3-17.

- Schmidt, K., & Gervelmeyer, A. (2003). *WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 8<sup>th</sup> Report 1999-2000*. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: [http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp\\_fr.htm](http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm). Τελευταία ενημέρωση 12 Δεκεμβρίου 2003. BfR-FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses, Berlin.
- Schmid, M., Ng, E., Lampidis, R., Emmerth, M., & Walcher, M. (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 1-18.
- Scriven, F. M., & Singh, R. (1986). Comparison of the microbial populations of retail beef and pork. *Meat Science*, 18, 173-180.
- Schuchat, A., Deaver, K., Hayes, P. S., Graves, L., Mascola, L., & Wenger, J. D. (1993). Gastrointestinal carriage of *Listeria monocytogenes* in household contacts of patients with listeriosis. *Journal of Infectious Diseases*, 167, 1261-1262.
- Schuchat A., Swaminathan B., & Broome, C. V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiological Reviews*, 4, 169-183.
- Seeliger, H. P. R., & Jones, D. (1986). Genus *Listeria* Pirie, 1940, 383AL. In P. H. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharp, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol.2, pp. 1235-1245). Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Sergeant, E. S., Love, S. C., & McInnes, A. (1991). Abortions in sheep due to *Listeria ivanovii*. *Australian Veterinary Journal*, 68, 39.

- Shahamat, M., Seaman, A., & Woodbine, M. (1980). Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt., Orig. A*, 246, 506-510.
- Siddiqi, R., & Khan, M. A. (1982). Vitamin and nitrogen base requirements for *Listeria monocytogenes* and haemolysin production. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt., Orig. A*, 253, 225-235.
- Siddiqi, R., & Khan, M. A. (1989). Amino acid requirement of six strains of *Listeria monocytogenes*. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 271, 146-152.
- Siegel, S. (1956). Non-parametric statistics for the behavioral sciences. New York, NY: McGraw-Hill.
- Simon, M. C., Gray, D. I., & Cook, N. (1996). DNA extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 822-824.
- Simon, S. (2008). What is likelihood ratio. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://www.childrensmercy.org/stats/definitions/likelihood.htm>. Προσπελάστηκε στις 27 Ιουλίου 2011.
- SISA. (2011). Diagnostic effectiveness. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/diaghlp.htm>. Προσπελάστηκε στις 27 Ιουλίου 2011.
- Snapir, Y. M., Vaisbein, E., & Nassar, F. (2006). Low virulence but potentially fatal outcome-*Listeria ivanovii*. *European Journal of Internal Medicine*, 17, 286-287.

- Sofos, J. N., Barbosa, W. B., Wederquist, H. J., Schmidt, G. R., & Smith, G. C. (1995). Potential for growth and inhibition of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry products. In G. Charalambous (Ed.), *Food flavors: Generation, analysis and process influence* (pp. 1243-1264). Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Southwick, F. S., & Purich, D. L. (1996). Intracellular pathogenesis of listeriosis. *New England Journal of Medicine*, 334, 770-776.
- Spiegelhalter, D. J., Thomas, A., Best, N. G., & Lunn, D. (2003). WinBUGS version 1.4 User Manual. Cambridge: MRC Biostatistics Unit.
- Spitzer, P. G., Hammer, S. M., & Karchmer, A. W. (1986). Treatment of *Listeria monocytogenes* infection with trimethoprim-sulfamethoxazole: Case report and review of the literature. *Reviews of Infectious Diseases*, 8, 427-430.
- Stessl, B., Luf, N., Wagner, M., & Schoder, D. (2009). Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 651-659.
- Stevenson, M. (2011). An introduction to veterinary epidemiology. (Lecture notes). Palmerston North, New Zealand: EpiCentre, IVABS, Massey University. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://epicentre.massey.ac.nz>. Προσπελάστηκε στις 14 Μαρτίου 2012.
- Struelens, M. J. (1996). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clinical Microbiology and Infection*, 2, 2-11.

- Tappero, J. W., Schuchat, A., Deaver, K. A., Mascola, L., Wenger, J. D. (1995). Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? *Journal of the American Medical Association*, 273, 1118-1122.
- 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. *Veterinary Record*, 148, 567-572.
- Tirado, C., & Schmidt, K. (2000). *WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 7<sup>th</sup> Report 1993-1998*. Διαθέσιμο περιεχόμενο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: [http://www.bfr.bund.de/internet/7threport/7threp\\_fr.htm](http://www.bfr.bund.de/internet/7threport/7threp_fr.htm). Τελευταία ενημέρωση 27 Νοεμβρίου 2003. BGVV-FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses, Berlin.
- 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. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17, 808-810.
- Turner, K. M., Restaino, L., & Frampton, E. W. (2000). Efficacy of chromocult coliform agar for coliform and *Escherichia coli* detection on foods. *Journal of Food Protection*, 63, 539-541.



- Twedt, R. M., Hitchins, A. D., & Prentice, G. (1994). Determination of the presence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products: IDF collaborative study. *Journal of AOAC International*, 77, 395-402.
- Vadasz, P., & Vadasz, A. S. (2008). Microbial models. In S. E. Jorgensen, & B. Fath (Eds.), *Encyclopedia of ecology* (pp. 2369-2389). Amsterdam: Elsevier Science B. V.
- van Belkum, A. (1994). DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 174-184.
- van Netten, P., Perales, I., Curtis, G. D. W., & Mossel, D. A. A. (1989). Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 8, 299-316.
- Vauterin, L., & Vauterin, P. (1992). Computer-aided objective comparison of electrophoretic patterns for grouping and identification of microorganisms. *European Microbiology*, 1, 37-41.
- 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. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 584-640.
- Verbeke, W., Pérez-Cueto, F. J. A., de Barcellos, M. D., Krystallis, A., & Grunert, K. G. (2010). European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat Science*, 84, 284-292.

- Verbeke, W., Pérez-Cueto, F. J. A., & Grunert, K. G. (2011). To eat or not to eat pork, how frequently and how varied? Insights from the quantitative Q-PorkChains consumer survey in four European countries. *Meat Science*, 88, 619-626.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 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 Microbiologica Hungarica*, 37, 227-231.
- Vlaemynck, G., Lafarge, V., & Scotter, S. (2000). Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 430-441.
- Voetsch, A. C., Angulo, F. J., Jones, T. F., Moore, M. R., Nadon, C., McCarthy, P., Shiferaw, B., Megginson, M. B., Hurd, S., Anderson, B. J., Cronquist, A., Vugia, D. J., Medus, C., Segler, S., Graves, L. M., Hoekstra, R., M., & Griffin, P. (2007). Reduction in the incidence of invasive listeriosis in foodborne diseases active surveillance network sites, 1996-2003. *Clinical Infectious Diseases*, 44, 513-520.
- Vogel, B. F., Fussing, V., Ojeniyi, B., Gram, L., & Ahrens, P. (2004). High-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* by fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis compared to pulsed-field gel electrophoresis, random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping, and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Food Protection*, 67, 1656-1665.

- Vogel, B. F., Jørgensen, 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. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 83-92.
- von Holy, A., & Holzapfel, W. H. (1988). The influence of extrinsic factors on the microbiological spoilage pattern of ground beef. *International Journal of Food Microbiology*, 6, 269-280.
- Vose, D. (2000). *Risk analysis: A quantitative guide*. (2<sup>nd</sup> edn.). Chichester, England: John Wiley & Sons.
- Vose, D. (2008). *Risk analysis: A quantitative guide*. (3<sup>rd</sup> edn.). Oxford: John Wiley and Sons.
- Wagner, M., & McLauchlin, J. (2008). Biology. In D. Liu (Ed.), *Handbook of Listeria monocytogenes* (pp. 3-25). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Welshimer, H. J. (1963). Vitamin requirements of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 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). *International Journal of Food Microbiology*, 32, 325-341.
- WHO. (2005). *The World Health Report 2005-Making every mother and child count*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

- Willis, C., Baalham, T, Greenwood, M., & Presland, F. (2006). Evaluation of a new chromogenic agar for the detection of *Listeria* in food. *Journal of Applied Microbiology*, *101*, 711-717.
- Wing, E. J., & Gregory, S. H. (2002). *Listeria monocytogenes*: Clinical and experimental update. *Journal of Infectious Diseases*, *185*, S18-S24.
- Winslow, D. L., & Pankey, G. A. (1982). In vitro activities of trimethoprim and sulfamethoxazole against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *22*, 51-54.
- Wilkinson, B. J., & Jones, D. (1977). A numerical taxonomic survey of *Listeria* and related bacteria. *Journal of General Microbiology*, *98*, 399-421.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

### ΕΛΛΗΝΙΚΑ

ΑΚΣ	ανάλυση κύριων συνιστωσών
Ε.Ε.	Ευρωπαϊκή Ένωση
Η.Π.Α.	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
κ.ά.	και άλλα
κ.β.	κατά βάρος περιεκτικότητα
κ.λπ.	και λοιπά
ΚΝΣ	κεντρικό νευρικό σύστημα
κ.ό.	κατ' όγκον περιεκτικότητα
Ο.Η.Ε.	Οργανισμός Ηνωμένων Εθνών
ΟΜΧ	ολική μεσόφιλη χλωρίδα
π.χ.	παραδείγματος χάριν

## ΑΓΓΛΙΚΑ

AFLP	amplified fragment length polymorphism
ALOA	agar <i>Listeria</i> acc. to Ottaviani and Agosti
ANCOVA	analysis of covariance
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
<i>ApP</i>	apparent prevalence
<i>AUC</i>	area under curve
BHI	brain heart infusion
bp	base pairs
BP	Baird-Parker
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CFC	cetrimide fucidin cephaloridine
cfu	colony forming units
CGYE	chloramphenicol glucose yeast extract
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP's	deoxynucleotide triphosphates
DOR	diagnostic odds ratio
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EFSA	European Food Safety Authority
<i>EOR</i>	error odds ratio
ERIC-PCR	enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction
FAO	Food and Agriculture Organization

FDA	Food and Drug Administration
<i>FN</i>	false negative
<i>FP</i>	false positive
FSIS	Food Safety and Inspection Service
GHP	good hygiene practice
GMP	good manufacturing practice
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
IA	iron agar
ICFMH	International Committee on Food Microbiology and Hygiene
ICMSF	International Commission on Microbiological Specification for Foods
IFT	Institute of Food Technologists
ISO	International Organization for Standardization
LAB	lactic acid bacteria
LLO	listeriolysin O
<i>LOD</i> <sub>50</sub>	50% endpoint limit of detection
LPM	lithium chloride phenylethanol moxalactam
MAP	modified atmosphere packaged
MLVA	multilocus variable number of tandem repeat analysis
mPCR	multiplex PCR
MRD	maximum recovery diluent
MRS	de Man, Rogosa and Sharp
mRNA	messenger ribonucleic acid
NACMCF	National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods
NADH	hydrogenated nicotinamide adenine dinucleotide
NaPBS	sodium phosphate buffer saline

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	National Collection of Type Cultures
<i>NLR</i>	negative likelihood ratio
<i>NPV</i>	negative predictive value
OCLA	Oxoid chromogenic Listeria agar
PALCAM	polymyxin, acriflavin, lithium chloride, ceftazidime, aesculin, mannitol
PC	principal component
PCA	plate count agar
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
PHLS	Public Health Laboratory Service
<i>PLR</i>	positive likelihood ratio
<i>PPV</i>	positive predictive value
qPCR	quantitative or real time polymerase chain reaction
RAPD	random amplification of polymorphic deoxyribonucleic acid
rep-PCR	repetitive element polymerase chain reaction
REP-PCR	repetitive extragenic palindrome polymerase chain reaction
<i>ROC curve</i>	receiving operating characteristic curve
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
<i>Se</i>	sensitivity
SISA	simple interactive statistical analysis
<i>Sp</i>	specificity



STAA	streptomycin thallos acetate actidione
TAE	Tris-acetate-EDTA
TMP-SMX	trimethoprim-sulfamethoxazole
<i>TN</i>	true negative
<i>TP</i>	true positive
<i>TrP</i>	true prevalence
TSYEA	tryptic soy yeast extract agar
TSYEB	tryptic soy yeast extract broth
USDA	U.S. Department of Agriculture
YOPI	young, old, pregnant, immune-compromized
VRBGA	violet red bile glucose agar
WHO	World Health Organization

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ - ΣΧΗΜΑΤΩΝ - ΕΙΚΟΝΩΝ

	Σελίδα
<b>Πίνακας 1.</b> Σωματικά (O) και βλεφαριδικά (H) αντιγόνα γνωστών ορότυπων του <i>Listeria monocytogenes</i> .	24
<b>Πίνακας 2.</b> Τροφιμογενείς λιστεριώσεις κατά τα έτη 1976-2005.	28
<b>Πίνακας 3.</b> Διατροφικές συστάσεις για την αποφυγή πρόκλησης τροφιμογενούς λιστερίωσης.	35
<b>Πίνακας 4.</b> Βιοχημικός διαχωρισμός ειδών <i>Listeria</i> .	50
<b>Πίνακας 5.</b> Αλληλουχίες εκκινητών γονιδίου-στόχου και μέγεθος προϊόντος PCR για ταυτοποίηση του <i>Listeria monocytogenes</i> .	54
<b>Πίνακας 6.</b> Κατανομές αλλοιογόνου μικροχλωρίδας και μικροβιολογικών δεικτών υγιεινής νωπού χοίρειου κιμά τη στιγμή της διάθεσής του από καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος.	72
<b>Πίνακας 7.</b> Συσχετίσεις μικροχλωρίδας νωπού χοίρειου κιμά τη στιγμή της διάθεσής του από καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος.	74
<b>Πίνακας 8.</b> Αριθμός και ταξινόμηση δειγμάτων νωπού χοίρειου κιμά σε κατηγορίες, μετά την ανίχνευση στα θρεπτικά υποστρώματα PALCAM, ALOA, RAPID'L.mono του μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> και την επιβεβαίωση παρουσίας/απουσίας του παθογόνου με βάση γνωστό πρότυπο σύγκρισης.	94
<b>Πίνακας 9.</b> Χαρακτηριστικά επίδοσης τριών επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων (PALCAM, ALOA, RAPID'L.mono) που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του <i>Listeria monocytogenes</i> σε νωπό κρέας και προϊόντα του.	95

<b>Πίνακας 10.</b>	Ανάκτηση του <i>Listeria monocytogenes</i> από νωπό χοίρειο κιμά ενοφθαλμισμένου με διαφορετικά επίπεδα πληθυσμού του μικροοργανισμού.	99
<b>Πίνακας 11.</b>	Μπαγεσιανή ανάλυση παραμέτρων της κατανομής Dirichlet κατά την ανίχνευση του <i>Listeria monocytogenes</i> σε νωπό χοίρειο κιμά, δίχως προγενέστερη γνώση για τις παραμέτρους, χρησιμοποιώντας μια ομοιόμορφη προγενέστερη κατανομή.	114
<b>Πίνακας 12.</b>	Χαρακτηριστικά μεταγενέστερων κατανομών Dirichlet τριών επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων (PALCAM, ALOA, RAPID'L.mono) για την ανίχνευση του <i>Listeria monocytogenes</i> σε νωπό κρέας και προϊόντα του.	116
<b>Πίνακας 13.</b>	Υπολογισμός αρχικής αβεβαιότητας για τις τιμές ευαισθησίας ( $Se$ ) και ικανότητας εξειδίκευσης ( $Sp$ ) τριών θρεπτικών υποστρωμάτων (PALCAM, ALOA, RAPID'L.mono) που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του <i>Listeria monocytogenes</i> σε νωπό χοίρειο κιμά.	137
<b>Πίνακας 14.</b>	Κατανομές χαρακτηριστικών επίδοσης τριών θρεπτικών υποστρωμάτων (PALCAM, ALOA, RAPID'L.mono) για την ανίχνευση του <i>Listeria monocytogenes</i> σε νωπό χοίρειο κιμά με μπαγεσιανή μοντελοποίηση (Μοντέλο 1).	139
<b>Πίνακας 15.</b>	Κατανομές χαρακτηριστικών επίδοσης δύο χρωμογόνων θρεπτικών υποστρωμάτων (ALOA και RAPID'L.mono) για την ανίχνευση του <i>Listeria monocytogenes</i> σε νωπό χοίρειο κιμά με μπαγεσιανή μοντελοποίηση (Μοντέλο 2), μετά από συνδυασμό των αποτελεσμάτων για τα υποστρώματα.	141

<b>Πίνακας 16.</b>	Τιμές χαρακτηριστικών επίδοσης πειράματος επικύρωσης μπαγεσιανού μοντέλου 2, για δυνατότητα πρόβλεψης του επιπολασμού του <i>Listeria monocytogenes</i> σε νωπό χοίρειο κιμά από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων για τα θρεπτικά υποστρώματα ALOA και RAPID'L.mono.	142
<b>Πίνακας 17.</b>	Στελέχη του <i>Listeria monocytogenes</i> απομονωθέντα από νωπό χοίρειο κιμά.	150
<b>Πίνακας 18.</b>	Αλληλουχίες εκκινητών DNA για μελέτη της βιοποικιλότητας του <i>Listeria monocytogenes</i> σε νωπό χοίρειο κιμά.	154
<b>Πίνακας 19.</b>	Συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA στελεχών του <i>Listeria monocytogenes</i> με διαφορετικούς εκκινητές κατά τη ανάλυση RAPD.	156
<b>Πίνακας 20.</b>	Κατανομή ορότυπων στελεχών του <i>Listeria monocytogenes</i> που απομονώθηκαν από χοίρειο κιμά.	158
<b>Πίνακας 21.</b>	Διακριτική ικανότητα τεχνικών PCR και διαχωρισμός απομονωθέντων στελεχών του <i>Listeria monocytogenes</i> από χοίρειο κιμά.	164
<b>Πίνακας 22.</b>	Διακριτική ικανότητα τεχνικής RAPD-PCR με συνδυασμό αποτελεσμάτων για τους εκκινητές, κατά την ανάλυση στελεχών του <i>Listeria monocytogenes</i> που απομονώθηκαν από χοίρειο κιμά.	165

<b>Σχήμα 1.</b>	Δενδρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης του γένους <i>Listeria</i> , όπου σημειώνονται τα παθογόνα και μη παθογόνα είδη.	17
<b>Σχήμα 2.</b>	Υποθετικό δενδρόγραμμα των διαφορετικών εξελικτικών καταγωγών (lineages) και ορότυπων (serovars) εντός του <i>Listeria monocytogenes</i> , βασισμένο στην παρουσία/απουσία γονιδίων και στο συσχετισμό τους με βλεφαριδικά (flagella) αντιγόνα.	18
<b>Σχήμα 3.</b>	Διαδικασία για τη διεξαγωγή βιοχημικών δοκιμών και μοριακής μεθόδου (PCR) επιβεβαίωσης της παρουσίας του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> σε προϊόντα με βάση το κρέας.	43
<b>Σχήμα 4.</b>	Σχεδιαγραμματική απεικόνιση των επαναλαμβανόμενων σταδίων της PCR.	52
<b>Σχήμα 5.</b>	Σχεδιαγραμματική απεικόνιση ανάλυσης κύριων συνιστωσών (ΑΚΣ) σε νωπό χοίρειο κιμά, με παρουσίαση των σημαντικότερων εξεταζόμενων μεταβλητών για κάθε κύρια συνιστώσα (PC).	75
<b>Σχήμα 6.</b>	Χαρακτηριστική καμπύλη λειτουργίας και περιοχή κάτω από αυτήν για τρία επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα ανίχνευσης του <i>Listeria monocytogenes</i> .	97
<b>Σχήμα 7.</b>	Καμπύλη δόσης-απόκρισης για την ανίχνευση του <i>Listeria monocytogenes</i> με βάση την επίδοση των θρεπτικών υποστρωμάτων ALOA και RAPID'L.mono.	99
<b>Σχήμα 8.</b>	Γραφική απεικόνιση 1000 τιμών από τη συνδυασμένη μεταγενέστερη κατανομή Dirichlet των <i>TP</i> και <i>FP</i> αποτελεσμάτων για τα θρεπτικά υλικά PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono.	118

<b>Σχήμα 9.</b>	Μοντέλα 1 και 2 για την πρόβλεψη της πραγματική τιμής επιπολασμού ( <i>TrP</i> ) του <i>Listeria monocytogenes</i> , της ευαισθησίας ( <i>Se</i> ) και της ικανότητας εξειδίκευσης ( <i>Sp</i> ) για τα υποστρώματα PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono, με τη μέθοδο Monte Carlo της αλυσίδας Markov στο WinBUGS.	131
<b>Σχήμα 10.</b>	Κατανομή της συγκέντρωσης του <i>Listeria monocytogenes</i> σε κιμά, μέσω μπαγεσιανής μοντελοποίησης με βάση δύο χρωμογόνα θρεπτικά υποστρώματα (ALOA και RAPID'L.mono).	143
<b>Σχήμα 11.</b>	Δενδρόγραμμα ανάλυσης RAPD με τον εκκινητή HLWL85 για στελέχη του <i>Listeria monocytogenes</i> που απομονώθηκαν από νωπό χοίρειο κιμά, όπου παρουσιάζονται μόνον οι κατατομές των μοναδικών τύπων RAPD για τον εκκινητή.	160
<b>Σχήμα 12.</b>	Δενδρόγραμμα ανάλυσης RAPD με τον εκκινητή M13 για στελέχη του <i>Listeria monocytogenes</i> που απομονώθηκαν από νωπό χοίρειο κιμά, όπου παρουσιάζονται μόνον οι κατατομές των μοναδικών τύπων RAPD για τον εκκινητή.	161
<b>Σχήμα 13.</b>	Δενδρόγραμμα ανάλυσης RAPD με τον εκκινητή UBC155 για στελέχη του <i>Listeria monocytogenes</i> που απομονώθηκαν από νωπό χοίρειο κιμά, όπου παρουσιάζονται μόνον οι κατατομές των μοναδικών τύπων RAPD για τον εκκινητή.	162
<b>Σχήμα 14.</b>	Δενδρόγραμμα ανάλυσης rep-PCR με τον εκκινητή (GTG) <sub>5</sub> για στελέχη του <i>Listeria monocytogenes</i> που απομονώθηκαν από νωπό χοίρειο κιμά, όπου παρουσιάζονται μόνον οι κατατομές των μοναδικών τύπων rep-PCR για τον εκκινητή.	163

<b>Σχήμα 15.</b>	Σχεδιαγραμματική απεικόνιση διαδικασίας χρώσης κατά Gram βακτηριακών κυττάρων.	181
<b>Εικόνα 1</b>	Μορφολογικοί χαρακτήρες αποικιών <i>Listeria</i> spp. σε επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα.	41
<b>Εικόνα 2.</b>	Χρώση κατά Gram κυττάρων <i>Listeria monocytogenes</i> .	44
<b>Εικόνα 3.</b>	Έλεγχος κινητικότητας με νύξη ημιστερεού θρεπτικού υλικού.	46
<b>Εικόνα 4.</b>	Αιμολυτική ικανότητα ύποπτων στελεχών <i>Listeria monocytogenes</i> σε έτοιμο τρυβλίο αιματούχου άγαρ από αίμα αλόγου.	49
<b>Εικόνα 5.</b>	Ζύμωση σακχάρων από στέλεχος <i>Listeria</i> sp.	51
<b>Εικόνα 6.</b>	Αποτύπωση DNA στελεχών του <i>Listeria monocytogenes</i> από χοίρειο κιμά μέσω τριών διαφορετικών υποστρωμάτων, κατά την ανάλυση RAPD των στελεχών με τους εκκινητές HLWL85 και M13.	159

## ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ - ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ (SCI)

1. **Andritsos, N. D.**, Mataragas, M., Mavrou, E., Stamatiou, A., & Drosinos, E. H. (2012). The microbiological condition of minced pork prepared at retail stores in Athens, Greece. *Meat Science*, *91*, 486-489. doi:10.1016/j.meatsci.2012.02.036
2. **Andritsos, N. D.**, Mataragas, M., Karaberi, V., Paramithiotis, S., & Drosinos, E. H. (2012). Performance of three culture media commonly used for detecting *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, *75*, 1518-1523. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-556
3. **Andritsos, N. D.**, 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. *International Journal of Food Microbiology*, *156*, 181-185. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.027
4. **Andritsos, N. D.**, Mataragas, M., Paramithiotis, S., Skandamis, P. N., & Drosinos, E. H. (2012). Bayesian inference for quantifying *Listeria monocytogenes* prevalence and concentration in minced pork meat from presence/absence microbiological testing. *Food Microbiology*, *31*, 148-153. doi:10.1016/j.fm.2012.02.016
5. **Andritsos, N. D.**, Paramithiotis, S., Mataragas, M., & Drosinos, E. H. (2013). *Listeria monocytogenes* serovar prevalence and biodiversity in minced pork. (προς υποβολή)



## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **Andritsos, N.**, Stamatiou, A., Drosinos, E. H., & Mataragas, M. (2010). Application of multivariate analysis to study the microbial association of minced pork meat obtained from local markets. *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> International ICFMH Symposium: Microbial Behaviour in the Food Chain*, p. 187. Copenhagen, Denmark: Kandrups Bogtrykkeri A/S.
2. **Andritsos, N.**, Paramithiotis, S., Drosinos, E. H., & Mataragas, M. (2010). Bayesian inference for quantifying *Listeria monocytogenes* presence in minced pork meat as well as sensitivity and specificity of culture methods. *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> International ICFMH Symposium: Microbial Behaviour in the Food Chain*, p. 152. Copenhagen, Denmark: Kandrups Bogtrykkeri A/S.

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **Ανδρίτσος, Ν. Δ.**, Μαύρου, Ε., Καραμπέρη, Β., Ματαράγκας, Μ., & Δροσινός, Ε. Χ. (2010). Μικροβιολογική ποιότητα και δείκτες υγιεινής χοιρινού κιμά από καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος του κέντρου και της ευρύτερης περιοχής της Αθήνας. *Πρακτικά 3<sup>ov</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου ΔΕΔΥΤ: Σύγχρονες Αντιλήψεις Ασφάλειας και Ποιότητας Τροφίμων, Η Σύγκλιση των Επιστημών* (CD: αριθμ. Ρ03, αναρτημένη ανακοίνωση). Θεσσαλονίκη: Διεπιστημονική Εταιρεία Διασφάλισης Υγιεινής Τροφίμων (ΔΕΔΥΤ).

2. **Ανδρίτσος, Ν. Δ.**, Καραμπέρη, Β., Μαύρου, Ε., Παραμυθιώτης, Σ., Ματαράγκας, Μ., & Δροσινός, Ε. Χ. (2010). Ανίχνευση *Listeria monocytogenes* σε δείγματα χοιρινού κιμά από καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος του κέντρου και της ευρύτερης περιοχής της Αθήνας. *Πρακτικά 3<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου ΔΕΔΥΤ: Σύγχρονες Αντιλήψεις Ασφάλειας και Ποιότητας Τροφίμων, Η Σύγκλιση των Επιστημών* (CD: αριθμ. Ρ04, αναρτημένη ανακοίνωση). Θεσσαλονίκη: Διεπιστημονική Εταιρεία Διασφάλισης Υγιεινής Τροφίμων (ΔΕΔΥΤ).
3. **Ανδρίτσος, Ν. Δ.**, Σταματίου, Α., Ματαράγκας, Μ., & Δροσινός, Ε. Χ. (2010). Η πολυμεταβλητή ανάλυση ως εργαλείο αξιολόγησης της μικροβιολογικής ποιότητας και υγιεινής χοίρειου κιμά. *Πρακτικά 2<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου για το Κρέας και τα Προϊόντα του 'Από το Στάβλο στο Πιάτο'* (σελ. 412-416, προφορική ανακοίνωση). Αθήνα: Ευρωπαϊκός Οργανισμός Στρατηγικού Σχεδιασμού.
4. **Ανδρίτσος, Ν. Δ.**, Παραμυθιώτης, Σ., Ματαράγκας, Μ., & Δροσινός, Ε. Χ. (2010). Κατανομή οροτύπων και μοντελοποίηση κατά Bayes της παρουσίας *Listeria monocytogenes* σε δείγματα χοίρειου κιμά. *Πρακτικά 2<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου για το Κρέας και τα Προϊόντα του 'Από το Στάβλο στο Πιάτο'* (σελ. 235-240, προφορική ανακοίνωση). Αθήνα: Ευρωπαϊκός Οργανισμός Στρατηγικού Σχεδιασμού.
5. **Ανδρίτσος, Ν. Δ.**, Ματαράγκας, Μ., Σταματίου, Α., & Δροσινός, Ε. Χ. (2011). Εφαρμογή της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης για τη μελέτη της μικροβιολογικής ποιότητας και υγιεινής χοίρειου κιμά τη στιγμή της πώλησης. *Πρακτικά 4<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Τροφίμων: Σύγχρονη Προσέγγιση στην Υγιεινή και Ασφάλεια των Τροφίμων* (σελ. 'παράρτημα έκδοσης', προφορική ανακοίνωση). Θεσσαλονίκη: Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρεία.

6. **Ανδρίτσος, Ν. Δ.,** Ματαράγκας, Μ., Παραμυθιώτης, Σ., & Δροσινός, Ε. Χ. (2011). Παράμετροι επίδοσης τριών μικροβιολογικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*: Εφαρμογή σε έρευνα πεδίου που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα χοίρειου κιμά. *Πρακτικά 4<sup>ο</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Τροφίμων: Σύγχρονη Προσέγγιση στην Υγιεινή και Ασφάλεια των Τροφίμων* (τόμος Β΄, σελ. 412-420, προφορική ανακοίνωση). Θεσσαλονίκη: Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρεία.
7. **Ανδρίτσος, Ν. Δ.,** Ματαράγκας, Μ., Παραμυθιώτης, Σ., & Δροσινός, Ε. Χ. (2011). Εκτίμηση του επιπολασμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* και της ευαισθησίας των μεθόδων ανίχνευσης του βακτηρίου με τη βοήθεια της Μπαγεσιανής προσεγγιστικής μεθόδου: Εφαρμογή σε έρευνα πεδίου που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα χοίρειου κιμά. *Πρακτικά 4<sup>ο</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Τροφίμων: Σύγχρονη Προσέγγιση στην Υγιεινή και Ασφάλεια των Τροφίμων* (τόμος Β΄, σελ. 307-316, προφορική ανακοίνωση). Θεσσαλονίκη: Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρεία.
8. **Ανδρίτσος, Ν. Δ.,** Παραμυθιώτης, Σ., Ματαράγκας, Μ., & Δροσινός, Ε. Χ. (2012). Βιοποικιλότητα στελεχών *Listeria monocytogenes* απομονωθέντων από χοίρειο κιμά. *Πρακτικά Πανελληνίου Συνεδρίου Meat Days για το Κρέας και τα Προϊόντα του 'Από το Στάβλο στο Πιάτο'* (σελ. 350-353, προφορική ανακοίνωση). Αθήνα: o.mindcreatives.

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ο Νικόλαος Ανδρίτσος του Δημητρίου γεννήθηκε στη Λάρισα αλλά κατάγεται από το Λιδωρίκι Φωκίδας. Είναι απόφοιτος του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων (2006) του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ) από όπου, έχοντας λάβει διαδοχικές υποτροφίες από το Κοινοφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης για μεταπτυχιακές και διδακτορικές σπουδές στην Ελλάδα, απέκτησε Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (MSc) στην Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου (2008) με ειδίκευση στα Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Διασφάλισης Υγιεινής Τροφίμων (ISO, HACCP) και Διδακτορικό Δίπλωμα (PhD) Γεωπονικών Επιστημών (2012) στο γνωστικό πεδίο της Υγιεινής και Ασφάλειας Τροφίμων.

Ο Δρ. Ανδρίτσος ερευνητικά ασχολείται με την ανίχνευση, τη μελέτη της συμπεριφοράς και τον έλεγχο τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων, με χρήση κλασικών μικροβιολογικών τεχνικών και σύγχρονων τεχνικών μοριακής βιολογίας. Επίσης, στα ερευνητικά του ενδιαφέροντα περιλαμβάνονται η μικροβιακή οικολογία και η μικροβιολογική ασφάλεια του κρέατος και των προϊόντων του, καθώς και η μελέτη της αντιμικροβιακής δραστηριότητας φυσικώς απαντώμενων συστατικών αλλά και χημικών ουσιών που εφαρμόζονται ή δύνανται να εφαρμοστούν για τη συντήρηση των τροφίμων. Στα πεδία αυτά έχει δημοσιεύσει 1 κεφάλαιο σε διεθνές επιστημονικό εγχειρίδιο, 5 άρθρα σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά (SCI), 4 άρθρα σε ελληνικά κλαδικά περιοδικά, ενώ έχει προβεί σε 3 ανακοινώσεις σε διεθνή και 11 ανακοινώσεις σε εθνικά συνέδρια. Επιπλέον, είναι κριτής ερευνητικών εργασιών των διεθνών επιστημονικών περιοδικών *Foodborne Pathogens and Disease* και *Journal of Food Science* του SCI.

Από το 2008, ο Νικόλαος Ανδρίτσος έχει συμμετάσχει σε 3 ερευνητικά προγράμματα χρηματοδότησης της ΕΕ, 1 εθνικό ερευνητικό πρόγραμμα και 1 πρόγραμμα χρηματοδότησης από τρίτους. Εξάλλου, το 2011 συμμετείχε ως επισκέπτης ερευνητής στο Πολιτειακό Πανεπιστήμιο του Κολοράντο (CSU) στις ΗΠΑ, σε πρόγραμμα χρηματοδοτούμενο από το Ίδρυμα του Αμερικανικού Ινστιτούτου Κρέατος (AMIF) το οποίο διεξήχθη υπό την επίβλεψη του Διακεκριμένου Καθηγητή Ιωάννη Ν. Σοφού, νυν Προέδρου του Συμβουλίου του ΓΠΑ. Σήμερα είναι άμισθος επιστημονικός συνεργάτης του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του ΓΠΑ και του Κέντρου Βιολογικών Ερευνών Στρατού στην Πεντέλη Αττικής.