



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση»

Διπλωματική Εργασία
Σύγχρονες μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών στο γάλα

Αγγελική Σαριδάκη

Επιβλέπων καθηγητής: Γεώργιος Λαγουμιντζής

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας Αγγελικής Σαριδάκη («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης η συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας της συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση της συγγραφέα/δημιουργού. Η συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



Σύγχρονες μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών στο γάλα

Αγγελική Σαριδάκη

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γεώργιος Λαγουμιντζής

Επίκουρος Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Πατρών

Συν-Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Σουλτάνα Μαρκοπούλου

Μέλος Σ.Ε.Π.
Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Ευχαριστίες

Ειλικρινείς ευχαριστίες οφείλονται στον επιβλέποντα της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας Επικ. Καθ. Γεώργιο Λαγουμιντζή και στην οικογένειά μου. Χωρίς τη στήριξή τους, η εργασία αυτή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί.

Περίληψη

Το γάλα αποτελεί πηγή απαραίτητων βιταμινών και ιχνοστοιχείων για τον άνθρωπο. Η υψηλή θρεπτική του αξία το καθιστά ευάλωτο στη μόλυνση από μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί που επιμολύνουν το γάλα ανήκουν σε ένα ευρύ φάσμα ταξινομικών ομάδων και πολλοί από αυτούς είναι ικανοί να προκαλέσουν ασθένειες, των οποίων η σοβαρότητα κυμαίνεται από ήπια συμπτώματα έως και το θάνατο. Έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις επιδημιών που συνδέθηκαν με την κατανάλωση μολυσμένου γάλακτος, οι οποίες συχνά επηρεάζουν άτομα μικρής ηλικίας λόγω της σημασίας αυτού του τροφίμου στη διατροφή τους.

Σκοπός της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας είναι να γίνει ανασκόπηση της μέχρι τώρα βιβλιογραφίας σχετικά με τις μοριακές μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση των παθογόνων του γάλακτος. Συγκεκριμένα θα μελετηθούν οι τρόποι με τους οποίους μπορεί να γίνει ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων των παθογόνων μικροοργανισμών και στις περισσότερες περιπτώσεις η ποσοτικοποίησή τους ανά μονάδα όγκου γάλακτος. Η εργασία αυτή θα προσπαθήσει να καταδείξει τη σημασία της μοριακής ανίχνευσης στον έλεγχο του γάλακτος και τα πλεονεκτήματα που έχει έναντι της ανίχνευσης των παθογόνων μέσω της καλλιέργειάς τους σε θρεπτικά υποστρώματα. Παράλληλα, με εκτεταμένη αναφορά της μεθοδολογίας που ακολουθείται σε κάθε περίπτωση, θα παρουσιαστούν τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει κάθε μέθοδος και σε ποιες περιπτώσεις έχει βρει εφαρμογή. Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελείται από 3 κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στα συστατικά και στις μορφές του γάλακτος που υπάρχουν προς κατανάλωση. Στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί του γάλακτος που έχουν αναφερθεί, οι μέγιστες επιτρεπτές συγκεντρώσεις τους με βάση τη νομοθεσία και οι πιθανοί τρόποι επιμολύνσης του γάλακτος. Στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται εκτενής αναφορά στις μοριακές μεθόδους ανίχνευσης παθογόνων στο γάλα, οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε μεθόδους υβριδισμού, μεθόδους ενίσχυσης γενετικών τόπων με εναλλαγές θερμοκρασιών, ισοθερμικές μεθόδους και μεθόδους αλληλούχησης. Τέλος, στον επίλογο συνοψίζονται τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τον κυρίως κορμό της εργασίας.

Λέξεις – κλειδιά

Παθογόνα γάλακτος, μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης, μέθοδοι υβριδοποίησης, μέθοδοι ενίσχυσης DNA, μέθοδοι αλληλούχησης DNA

Molecular methods for the detection of pathogen microorganisms in milk

Aggeliki Saridaki

Abstract

Milk is a source of essential vitamins and trace elements for humans. Its high nutritional value, together with the processing and transportation steps present between its production and the consumer, make it vulnerable to microorganism contamination. Microorganisms that contaminate milk, raw or processed, belong to a wide range of taxa, and many of them may cause disease, the severity of which ranges from mild symptoms to death. Several cases of outbreaks linked to the consumption of contaminated milk have been reported, often affecting young people due to the importance of this food in their diet.

The purpose of this diploma thesis is to review the literature so far on the molecular methods developed for detecting milk pathogens. Particular reference will be made to the detection methods of pathogens nucleic acids, which in most cases also result in pathogens quantification. This thesis will also attempt to demonstrate the importance of molecular detection in milk control and its advantages over pathogen detection using culture-dependent methods. At the same time, the disadvantages and the application of each method will also be illuminated.

The present Thesis consists of 3 chapters. In the first chapter, references are made to milk ingredients and processed forms available for consumption. The second chapter presents milk pathogens, their maximum acceptable concentrations based on the legislation, and the possible ways milk contamination can occur. In the third chapter, an extensive review covers the molecular methods of milk pathogen detection, categorized into hybridization methods, amplification methods using thermal cycling, isothermal methods, and sequencing methods. Finally, the last section summarizes the conclusions drawn from the main body of this thesis.

Keywords

Milk pathogens, molecular detection methods, hybridization methods, DNA amplification methods, DNA sequencing

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	V
ABSTRACT.....	VI
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	VII
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	IX
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	XII
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ & ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	XIII
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. ΣΥΣΤΑΣΗ – ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	3
1.1 Συστατικά γάλακτος	3
1.2 Μορφές γάλακτος	4
2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	6
2.1 Παθογόνοι μικροοργανισμοί γάλακτος	6
2.2 Τρόποι επιμόλυνσης του γάλακτος.....	8
2.3 Όρια παθογόνων μικροοργανισμών στο γάλα - Νομοθεσία.....	9
3. ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ.....	12
3.1 Μέθοδοι κυτταροκαλλιέργειας	12
3.2 Εναλλακτικές μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων	14
4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ.....	16
4.1 Μέθοδοι υβριδισμού	16
4.1.1 Επιτόπιος υβριδισμός με χρήση φθορισμού	17
4.1.2 Μικροσυστοιχίες DNA	20
4.2 Μέθοδοι ενίσχυσης γενετικών τόπων με εναλλαγές θερμοκρασιών	25
4.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	25
4.2.2 Πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	31
4.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο	32
<i>Ταυτόχρονη ανίχνευση των παθογόνων S. aureus, L. monocytogenes και Salmonella spp. με χρήση πολλαπλής RT-PCR</i>	<i>37</i>

Ανίχνευση των ζωντανών κυττάρων των παθογόνων <i>L. monocytogenes</i> , <i>C. sakazakii</i> , <i>S. aureus</i> και <i>Salmonella</i> με συνδυασμό μονοαζίδιου του προπιδίου και πολλαπλής RT-PCR.....	43
4.2.4 Ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σταγόνας.....	51
4.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης συζευγμένη με αντίστροφη μεταγραφή.....	52
4.3 Ισοθερμικές μέθοδοι ενίσχυσης γενετικών τόπων.....	54
4.3.1 Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχων.....	54
4.3.2 Ενίσχυση με χρήση ρεκομπινάσης και πολυμεράσης.....	56
4.3.3 Ενίσχυση με κυλιόμενους κύκλους.....	60
4.3.4 Ενίσχυση με ασυνεχείς κυλιόμενους κύκλους.....	62
4.3.5 Ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων βασιζόμενη στην αλληλουχία.....	64
4.4 Μέθοδοι αλληλούχησης.....	65
4.4.1 Πρώτη γενιά μεθόδων αλληλούχησης.....	66
4.4.2 Δεύτερη γενιά μεθόδων αλληλούχησης.....	67
4.4.3 Τρίτη γενιά μεθόδων αλληλούχησης.....	68
4.4.4 Εφαρμογές των μεθόδων αλληλούχησης επόμενης γενιάς στην ανίχνευση παθογόνων του γάλακτος.....	69
4.5 Ανίχνευση υποτύπων παθογόνων.....	70
4.5.1 Ηλεκτροφόρηση σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο.....	70
4.5.2 Καθορισμός ριβότυπου.....	72
4.5.3 Ανάλυση του μεταβλητού αριθμού επαναλήψεων σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους.....	72
4.5.4 Ανάλυση αλληλουχιών σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους.....	73
4.5.5 Ανίχνευση υποτύπων με χρήση των επαναλήψεων CRISPR.....	74
ΕΠΙΛΟΓΟΣ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	79

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Διαφοροποίηση των παθογόνων που επιμολύνουν το γάλα ανάλογα με το στάδιο παραγωγής ή επεξεργασίας.....	9
Εικόνα 2. Βασικά στάδια εφαρμογής της μεθόδου FISH	19
Εικόνα 3. Ανίχνευση του στελέχους <i>E. coli</i> O157:H7 με την τεχνική FISH και χρήση ανιχνευτών PNA	19
Εικόνα 4. Μικροσυστοιχία DNA και σχηματική απεικόνιση των θέσεων πρόσδεσης των μορίων-ανιχνευτών	20
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων που περιλαμβάνει η ανίχνευση παθογόνων με χρήση μικροσυστοιχίας DNA.....	22
Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου των μικροσυστοιχιών με χρήση σφαιριδίων.....	23
Εικόνα 7. Ανιχνευτής πυρολιδινυλο-PNA (κόκκινο χρώμα), που φέρει τις βάσεις κυτοσίνη, θυμίνη, αδερίνη και γουανίνη	24
Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ανίχνευσης <i>B. cereus</i> με χρήση συστοιχίας σφαιριδίων και ανιχνευτών PNA.....	25
Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης... ..	27
Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση των θερμοκρασιακών μεταβολών κατά τη διάρκεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	29
Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων.....	29
Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού	30
Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση της πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. ..	31
Εικόνα 14. Διάγραμμα ενίσχυσης της μεθόδου RT-PCR.	32
Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της ανίχνευσης του προϊόντος της αντίδρασης RT-PCR με χρήση της χρωστικής SYBR green και ιχνηθέτη υδρόλυσης τύπου TaqMan.....	34
Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των ιχνηθετών υβριδοποίησης και των μοριακών φάρων.....	36
Εικόνα 17. Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> και <i>Salmonella</i> spp. σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα.....	38
Εικόνα 18. Πρότυπες καμπύλες της ανίχνευσης των παθογόνων <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> και <i>Salmonella</i> spp. σε δείγματα καθαρής καλλιέργειας και τεχνητά μολυσμένου γάλακτος με τη μέθοδο της πολλαπλής RT-PCR	41
Εικόνα 19. Χημική δομή της χρωστικής PMA	43

Εικόνα 20. Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του SDS για την ανίχνευση των βακτηρίων <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. sakazakii</i> και <i>Salmonella</i> spp	46
Εικόνα 21. Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του PMA για την ανίχνευση των βακτηρίων <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. sakazakii</i> και <i>Salmonella</i> spp.	47
Εικόνα 22. Στάδια της μεθόδου ανίχνευσης των παθογόνων <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. sakazakii</i> και <i>Salmonella</i> spp. σε δείγματα τεχνητά μολυσμένου γάλακτος με χρήση SDS, PMA και πολλαπλής RT-PCR.	48
Εικόνα 23. Πρότυπες καμπύλες της μεθόδου SDS-PMA- πολλαπλής RT-PCR για την ανίχνευση των βακτηρίων <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. sakazakii</i> και <i>Salmonella</i> spp....	49
Εικόνα 24. Εφαρμογή της μεθόδου SDS-PMA-πολλαπλής RT-PCR για την ανίχνευση των βακτηρίων <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. sakazakii</i> και <i>Salmonella</i> spp. παρουσία κυττάρων <i>E. coli</i>	50
Εικόνα 25. Σύγκριση της μεθόδου των Qin et al. (2020) με την καταμέτρηση αποικιών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.....	51
Εικόνα 26. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου της ψηφιακής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σταγόνας.....	52
Εικόνα 27. Σχηματική απεικόνιση της συζευγμένης με αντίστροφη μεταγραφή PCR.....	53
Εικόνα 28. Σχηματισμός του μορίου με τη μορφή αλτήρα κατά τα πρώτα στάδια της αντίδρασης LAMP.	55
Εικόνα 29. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου RPA	57
Εικόνα 30. Σχηματική απεικόνιση της χρήσης βιοτινυλιωμένου ιχνηθέτη και φθορίζοντα εκκινητή κατά την εφαρμογή της μεθόδου RPA	58
Εικόνα 31. Συνδυασμός των μεθόδων RPA και CRIPSR/Cas12a για την ανίχνευση μικροοργανισμών.....	59
Εικόνα 32. Ανίχνευση του παθογόνου <i>L. monocytogenes</i> στο γάλα με συνδυασμό RPA και CRIPSR/Cas12a.....	60
Εικόνα 33. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ενίσχυσης με κυλιόμενους κύκλους.....	61
Εικόνα 34. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου SRCA	63
Εικόνα 35. Ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης SRCA	63
Εικόνα 36. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου NASBA.....	65
Εικόνα 37. Εξέλιξη των μεθόδων αλληλούχησης.....	66
Εικόνα 38. Μέθοδοι αλληλούχησης πρώτης γενιάς.....	67
Εικόνα 39. Διάκριση των υποτύπων του βακτηρίου <i>Salmonella</i> με ηλεκτροφόρηση σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο.....	71

Εικόνα 40. Εφαρμογή της μεθόδου MLVA για το διαχωρισμό υποτύπων του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i>	73
Εικόνα 41. Ανίχνευση βακτηριακών υποτύπων με τη μέθοδο CRISPR..	75

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Γενική σύσταση του γάλακτος διαφόρων θηλαστικών	3
Πίνακας 2. Επίπεδα βιταμινών του γάλακτος, εκφρασμένα σε mg ή µg ανά 200 ml γάλακτος.	4
Πίνακας 3. Κυριότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί του γάλακτος και επακόλουθα συμπτώματα.	7
Πίνακας 4. Αποδεκτές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών στο γάλα σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 92/46/EEC.....	11
Πίνακας 5. Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθετών για την ανίχνευση των παθογόνων <i>S.</i> <i>aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> και <i>Salmonella</i> στο γάλα.	39
Πίνακας 6. Κλίση πρότυπων καμπυλών και απόδοση ενίσχυσης των αντιδράσεων RT-PCR.	40
Πίνακας 7. Όρια ανίχνευσης παθογόνων γάλακτος με και χωρίς προηγούμενο εμπλουτισμό του δείγματος.	42
Πίνακας 8. Αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης ανίχνευσης των τριών παθογόνων μέσω RT-PCR και καλλιέργειας σε θρεπτικό υπόστρωμα.	42
Πίνακας 9. Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθετών για την ανίχνευση των παθογόνων <i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> και <i>C. sakazakii</i> στο γάλα.	44
Πίνακας 10. Βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ειδικότητας της πολλαπλής RT-PCR.	44
Πίνακας 11. Οι κυριότερες πλατφόρμες αλληλούχησης NGS.	68

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

AMP	μονοφωσφορική αδενοσίνη
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη
cfu	μονάδες καταμέτρησης αποικιών (colony-forming units)
ddNTPs	τριφωσφορικά διδεόξυ-ριβονουκλεοτίδια
ddPCR	ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σταγόνας
DNA	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTP	τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο
EFSA	Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (European Food and Safety Authority)
FISH	επιτόπιος υβριδισμός με χρήση φθορισμού (fluorescence in situ hybridization)
FRET	μεταφορά ενέργειας μέσω φθορίζοντος συντονισμού (fluorescent resonance energy transfer)
LAB	βακτήρια γαλακτικού οξέος (lactic acid bacteria)
LAMP	ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχων (loop-mediated isothermal amplification)
IMPs	ανοσομαγνητικά σφαιρίδια (immunomagnetic particles)
MLST	ανάλυση αλληλουχιών σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους (multilocus sequence typing)
MLVA	ανάλυση του μεταβλητού αριθμού των επαναλήψεων σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους (multiple locus variable number of tandem repeats analysis)
MRSA	ανθεκτικός στη μεθικιλίνη <i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin-resistant <i>S. aureus</i>)
MVLST	ανάλυση αλληλουχιών σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους λοιμογονικότητας (multi-virulence-locus sequence typing)
NASBA	μέθοδος ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων βασιζόμενη στην αλληλουχία (nucleic acid sequence-based amplification)
NGS	αλληλούχηση επόμενης γενιάς
PCR	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PFGE	ηλεκτροφόρηση σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο
PMA	μονοαζίδιο του προπιδίου (propidium monoazide)
PNA	πεπτιδικός ανιχνευτής νουκλεϊκών οξέων (peptide nucleic acid probe)
RAA	ενίσχυση υποβοηθούμενη από ρεκομπινάση (recombinase-aided amplification)
RCA	ενίσχυση με κυλιόμενους κύκλους (rolling cycle amplification)
RNA	ριβονουκλεϊκό οξύ
RPA	ενίσχυση με χρήση ρεκομπινάσης και πολυμεράσης (recombinase polymerase amplification)
rRNA	ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό οξύ
RT-PCR	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού σε πραγματικό χρόνο
SDS	θειικό δωδεκυλικό νάτριο (sodium dodecyl sulphate)
SMRT	αλληλούχηση μεμονωμένου μορίου σε πραγματικό χρόνο (single molecule real time sequencing)
SRCA	ενίσχυση με ασυνεχείς κυλιόμενους κύκλους (saltatory rolling cycle amplification)
SSB	πρωτεΐνες πρόσδεσης σε μονή αλυσίδα (single strand-binding proteins)
STEC	<i>Escherichia coli</i> που παράγει σιγκατοξίνη (shigatoxin-producing <i>E. coli</i>)
TBEV	ιός κορωνογενούς εγκεφαλίτιδας (tick-borne encephalitis virus)
UHT	υπερ-υψηλή θερμοκρασία (ultra high temperature)
WGS	αλληλούχηση πλήρους γονιδιώματος

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γάλα αποτελεί καθοριστική τροφή, τόσο για την ανάπτυξη των παιδιών, όσο και για την υγεία των ενηλίκων. Λόγω της υψηλής του θρεπτικής αξίας, το γάλα μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών, οι οποίοι επηρεάζουν όχι μόνο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος, αλλά μπορούν να οδηγήσουν και στην εκδήλωση ασθενειών. Σε παγκόσμια κλίμακα, έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις έξαρσης τροφιμογενών λοιμώξεων εξαιτίας των γαλακτοκομικών προϊόντων, ιδιαίτερα του γάλακτος. Στις ανεπτυγμένες χώρες, η πλειονότητα των μολύνσεων από γάλα αφορά σποραδικές καταγραφές, ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες έχει αναφερθεί ενδημικότητα συγκεκριμένων νόσων όπως η βρουκέλλωση. Η πρωτοβουλία «Global Burden of Foodborne Disease» του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (<https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-diseases>), υποστηρίζει ότι το 4% των περιπτώσεων τροφιμογενών νόσων οφείλεται στο γάλα, αν και το ποσοστό αυτό θεωρείται υποεκτιμημένο λόγω έλλειψης επαρκών δεδομένων (Havelaar et al., 2015). Υπολογίζεται ότι το 1-6% του συνόλου των βακτηριακών τροφιμογενών λοιμώξεων αφορούν το γάλα και τα υπόλοιπα γαλακτοκομικά προϊόντα (Ahmed & Shimamoto, 2014), από τις οποίες το 39.1% αφορά το γάλα (Claeys et al., 2013). Επιπλέον των υγειονομικών επιπτώσεων, η ετήσια οικονομική ζημιά από το χαμηλό επίπεδο υγιεινής του γάλακτος και των κτηνοτροφικών μονάδων υπολογίζεται σε 77 δισεκατομμύρια δολάρια στις ανεπτυγμένες και έως 95.2 δισεκατομμύρια δολάρια στις αναπτυσσόμενες χώρες (Karoor et al., 2023).

Μεταξύ των διάφορων μορφών επεξεργασμένου γάλακτος, το απαστεριώτο, θερμικά μη επεξεργασμένο γάλα αποτελεί τη μορφή που ενέχει το υψηλότερο ρίσκο για την ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών (Taylor et al., 2013). Υπολογίζεται ότι το απαστεριώτο γάλα προκαλεί 840 φορές περισσότερες νόσους και 45 φορές περισσότερες νοσηλείες από ότι το παστεριωμένο (Costard et al., 2017). Στατιστικά, το νεαρότερο τμήμα του πληθυσμού βρίσκεται σε μεγαλύτερο κίνδυνο νόσησης λόγω κατανάλωσης απαστεριώτου γάλακτος, πιθανότατα λόγω της ευρέως διακινούμενης πεποίθησης ότι η παστερίωση μειώνει τη θρεπτική αξία του γάλακτος (Robinson et al., 2014).

Παρόλα αυτά, η κατανάλωση παθογόνων μικροοργανισμών μέσω του γάλακτος δεν προεξοφλεί την εμφάνιση συμπτωμάτων και την ανάπτυξη κάποιας νόσου. Το εύρος των παθοφυσιολογικών αντιδράσεων που προκύπτουν συχνά ποικίλλει και εξαρτάται από ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων όπως το είδος του παθογόνου, το μικροβιακό φορτίο που

καταναλώθηκε, τον κύκλο ζωής του μικροοργανισμού και τη γενικότερη κατάσταση της υγείας του ατόμου (Verraes et al., 2015). Σε κάθε περίπτωση, καθίσταται σαφές ότι η αποτελεσματική και έγκαιρη ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών του γάλακτος αποτελεί αναγκαία συνθήκη για τη διαφύλαξη της δημόσιας υγείας.

1. ΣΥΣΤΑΣΗ – ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

1.1 Συστατικά γάλακτος

Το γάλα έχει εξελιχθεί ως την προτιμώμενη τροφή των νεογνών και αναπόσπαστο τμήμα της διατροφής των ενηλίκων λόγω της υψηλής θρεπτικής του αξίας. Συνήθως καταναλώνεται γάλα από βοοειδή, κατσίκες ή πρόβατα. Το αγελαδινό γάλα καταναλώνεται σε μεγαλύτερες ποσότητες λόγω της υψηλής διαθεσιμότητας και της μεγάλης παραγωγής παγκοσμίως. Το γάλα από τα άλλα ζωικά είδη καλύπτει κυρίως διατροφικές ανάγκες στις αναπτυσσόμενες χώρες ή στις χώρες που λόγω κλίματος ή διαθέσιμων πόρων η κτηνοτροφία των βοοειδών δεν επαρκεί για να καλύψει τις ανάγκες. Τέτοια παραδείγματα αφορούν την κατανάλωση γάλακτος βουβαλιού στην Ασία, πρόβειου στις χώρες της Μεσογειακής λεκάνης, καμήλας στην Αφρική, κατσίκας στην Αφρική και στη νότια Ασία, αλόγου στις στέπες της κεντρικής Ασίας, ταράνδου στη Σκανδιναβία κ.α. (Faye & Konuspayeva, 2012).

Η σύσταση του γάλακτος ποικίλλει ανάλογα με το ζωικό είδος από το οποίο προέρχεται. Το νερό είναι το βασικό συστατικό σε κάθε περίπτωση, το οποίο καταλαμβάνει το 83-91% της συνολικής ποσότητας. Οι πρωτεΐνες, τα λίπη, η λακτόζη και τα ιχνοστοιχεία αποτελούν τα βασικότερα συστατικά σε κάθε περίπτωση. Επιπροσθέτως, οι σχετικές αναλογίες των συστατικών του γάλακτος μεταβάλλονται ανάλογα με τη φυλή του γαλακτοπαραγωγού ζώου, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, τη συχνότητα άλμεξης, το είδος των ζωοτροφών και το κλίμα (Claeys et al., 2014). Ο Πίνακας 1 συνοψίζει την περιεκτικότητα του γάλακτος σε ολικά στερεά, πρωτεΐνες, λίπη, λακτόζη, ξηρά ουσία και ολιγοσακχαρίτες για τα πιο κοινά είδη γάλακτος.

	Αγελαδινό	Κατσικίσιο	Πρόβειο	Βουβαλίσιο
Ολικά στερεά (g/100 ml)	11.8-13.0	11.9-16.3	18.1-20.0	15.7-17.2
Πρωτεΐνες (g/100 ml)	3.0-3.9	3.0-5.2	4.5-7.0	2.7-4.7
Λίπη (g/100 ml)	3.3-5.4	3.0-7.2	5.0-9.0	5.3-9.0
Λακτόζη (g/100 ml)	4.4-5.6	3.2-5.0	4.1-5.9	3.2-4.9
Ξηρά ουσία (g/100 ml)	0.7-0.8	0.7-0.9	0.8-1.0	0.8-0.9
Ολιγοσακχαρίτες (g/100 ml)	0.003-0.006	0.025-0.030	0.002-0.004	απουσία δεδομένων

Πίνακας 1. Γενική σύσταση του γάλακτος διαφόρων θηλαστικών. Προσαρμοσμένος από Roy et al., 2020.

Εκτός από τα παραπάνω, το γάλα περιέχει σε μικροποσότητες βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Τα κυριότερα ιχνοστοιχεία που ανιχνεύονται είναι ο σίδηρος, το ιώδιο, χαλκός, μαγνήσιο, ψευδάργυρος, σελήνιο και χρώμιο. Τα επίπεδα των βιταμινών που ανιχνεύονται στο γάλα από διάφορα ζώα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**.

Βιταμίνες	Αγελαδινό	Βουβαλίσιο	Πρόβειο	Κατσικίσιο
Θιαμίνη (μg)	80	100	160	80
Ριβοφλαβίνη (μg)	324	200	712	260
Νιασίνη (μg)	168	520	832	620
Βιταμίνη B6 (μg)	120	760	160	120
Βιταμίνη B12 (μg)	0.7	0.6	1.4	0.2
Φυλλικό οξύ (μg)	10	20	12	2.0
Παντοθενικό οξύ (μg)	628	300	816	820
Βιοτίνη (μg)	4.0	5.2	10.0	6.0
Βιταμίνη C (mg)	1.8	5.0	1.9	2.6
Βιταμίνη A (μg)	104	140	168	88
Βιταμίνη D (μg)	0.36	0.00	0.06	0.22
Βιταμίνη E (mg)	0.18	0.20	0.22	0.06

Πίνακας 2. Επίπεδα βιταμινών του γάλακτος, εκφρασμένα σε mg ή μg ανά 200 ml γάλακτος.

Προσαρμοσμένος από Gordon I, 2014.

1.2 Μορφές γάλακτος

Το γάλα καταναλώνεται σε διαφορετικές μορφές, ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, τις διατροφικές συνήθειες και τις κοινωνικοοικονομικές συνθήκες.

Οι κυριότερες μορφές γάλακτος αναφέρονται επιγραμματικά παρακάτω:

- Το υγρό γάλα είναι η μορφή με τη μεγαλύτερη κατανάλωση κατ' όγκο και περιλαμβάνει το παστεριωμένο, το ημιαποβουτυρωμένο, το ανασυσταμένο, το τυποποιημένο, το ενισχυμένο με βιταμίνες γάλα και το γάλα υπερυψηλής θερμικής επεξεργασίας (ultra high temperature milk, UHT).
- Το συμπυκνωμένο γάλα, το οποίο προέρχεται από μερική απομάκρυνση του νερού από το πλήρες ή ημιαποβουτυρωμένο γάλα. Η διαδικασία επεξεργασίας περιλαμβάνει θερμική επεξεργασία και συμπύκνωση. Συνήθως περιλαμβάνει επιπλέον γλυκαντικούς παράγοντες.

- Το γάλα τύπου «εβαπορέ», το οποίο επίσης προκύπτει με μερική απομάκρυνση του νερού από το πλήρες ή ημιαποβουτυρωμένο γάλα και χρησιμοποιείται κυρίως για ανάμιξη με άλλες τροφές (πχ. καφές).
- Το γάλα σε σκόνη, το οποίο προκύπτει από πλήρη αφυδάτωση του γάλακτος.

2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το μικροβίωμα του φρέσκου μη επεξεργασμένου γάλακτος μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις βασικές κατηγορίες: στους ευεργετικούς, στους αλλοιωγόνους και στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα βακτηριακά γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* και *Enterococcus* ανήκουν στην κατηγορία των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (lactic acid bacteria, LAB) και θεωρούνται ευεργετικά, καθώς βοηθούν την πέψη και μειώνουν τον κίνδυνο αλλεργιών, όπως άσθμα, αλλεργική ρινίτιδα και ατοπική δερματίτιδα. Οι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί είναι ψυχρόφιλα μικρόβια που επιβιώνουν σε χαμηλές θερμοκρασίες και αποικοδομούν συστατικά του γάλακτος, προκαλώντας αλλαγή στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Παραδείγματα αλλοιωγόνων μικροοργανισμών είναι τα βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia* και *Aeromonas*. Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν μικροοργανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες και θα αναλυθούν εκτενέστερα παρακάτω (Karoor et al., 2023).

2.1 Παθογόνοι μικροοργανισμοί γάλακτος

Η ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια τροφίμων (European Food and Safety Authority, EFSA) έχει καθορίσει τους μικροοργανισμούς για τους οποίους υπάρχει σαφής σύνδεση μεταξύ της κατανάλωσης ανεπεξέργαστου γάλακτος και νόσησης. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι είδη των γενών *Campylobacter*, *Salmonella*, το στέλεχος του βακτηρίου *E. coli* που παράγει σιγκατοξίνη (shigatoxin-producing *E. coli*, STEC), οι μικροοργανισμοί *Brucella melitensis*, *Mycobacterium bovis* και ο ιός της κροτωνογενούς εγκεφαλίτιδας (tick-borne encephalitis virus, TBEV). Ο ιός TBEV προκαλεί την κροτωνογενή εγκεφαλίτιδα, η οποία είναι μια από τις πιο κοινές και δυνητικά θανατηφόρες μολύνσεις του νευρικού συστήματος. Αυτή η ζωνοσός θεωρείται ενδημική στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη και Ρωσία και μεταδίδεται κυρίως μέσω τσιμπήματος μολυσμένου κρότωνα (τσιμπούρι) και σπανιότερα (αλλά με μικρότερη περίοδο επώασης) μέσω της κατανάλωσης απαστερίωτου γάλακτος από μολυσμένα ζώα (Ricci et al., 2015).

Το γάλα μπορεί να γίνει πηγή βακτηρίων ανθεκτικών σε αντιβιοτικά, ανάλογα με την ύπαρξη των αντίστοιχων βακτηρίων στις κτηνοτροφικές εγκαταστάσεις και στα επόμενα στάδια επεξεργασίας. Η κατανάλωση γάλακτος που φέρει το πολυανθεκτικό μικρόβιο *Salmonella enterica* serovar Typhimurium προκαλεί νόσηση που ανθίσταται στους συγκεκριμένους

αντιμικροβιακούς παράγοντες. Άλλα γνωστά παθογόνα του γάλακτος με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά περιλαμβάνουν τους μικροοργανισμό *Campylobacter*, το στέλεχος STEC, το ανθεκτικό στη μεθικιλίνη βακτήριο *Staphylococcus aureus* (methycillin-resistant *S. aureus*, MRSA) και όλο το φάσμα των βακτηρίων που φέρουν το γονίδιο της β-λακταμάσης/AmpC (Ricci et al., 2015).

Εκτός από τους παραπάνω μικροοργανισμούς, άλλα παθογόνα τα οποία πιθανώς μεταφέρονται μέσω του γάλακτος είναι τα βακτήρια *Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Nocardia asteroides*, είδη του γένους *Corynebacterium*, το βακτήριο *Streptococcus suis* subsp. *zooepidemicus* και τα παράσιτα *Toxoplasma gondii* και *Cryptosporidium parvum*. Ο Πίνακας 3 παρουσιάζει τα κυριότερα παθογόνα του γάλακτος και τα συμπτώματα που προκαλούν σε περίπτωση νόσησης.

Μικροοργανισμός	Κλινικά συμπτώματα στους ανθρώπους
<i>Campylobacter</i> spp.	Αίμα στα κόπρανα, πυρετός, κοιλιακές κράμπες
<i>Brucella</i> spp.	Πυρετός, αδυναμία, ηπατοσπληνομεγαλία, απώλεια βάρους
Μη τυφοειδής <i>Salmonella</i>	Πυρετός, κοιλιακές κράμπες, εμετός, διάρροια
<i>Mycobacterium</i> spp.	Πυρετός, νυχτερινή εφίδρωση, απώλεια βάρους, χρόνιος
<i>Coxiella burnetii</i>	Πυρετός, ρίγη, κόπωση, πονοκέφαλος, μη παραγωγικός βήχας
<i>Helicobacter pylori</i>	Γαστρίτιδα, πεπτικό έλκος, καρκίνωμα του στομάχου
Ιός coxsackie	Εξανθήματα στα άκρα και στο στόμα, πυρετός, πονόλαιμος
<i>Nocardia asteroides</i>	Πυρετός, απώλεια βάρους, νυχτερινή εφίδρωση

Πίνακας 3. Κυριότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί του γάλακτος και επακόλουθα συμπτώματα.

Παράλληλα με τους βακτηριακούς πληθυσμούς, στο απαστερίωτο γάλα έχει αναφερθεί επίσης η ύπαρξη νηματωδών μυκήτων και ζυμών. Οι ζύμες στο γάλα μπορεί να φτάσουν σε συγκέντρωση έως 10^4 cfu/ml και προέρχονται από τα γένη *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Candida*, *Trichosporon* και *Cryptococcus*. Αντιθέτως, οι νηματώδεις μύκητες απαντούν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και ταξινομούνται στα γένη *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* and *Cladosporium* (Delavenne et al., 2011).

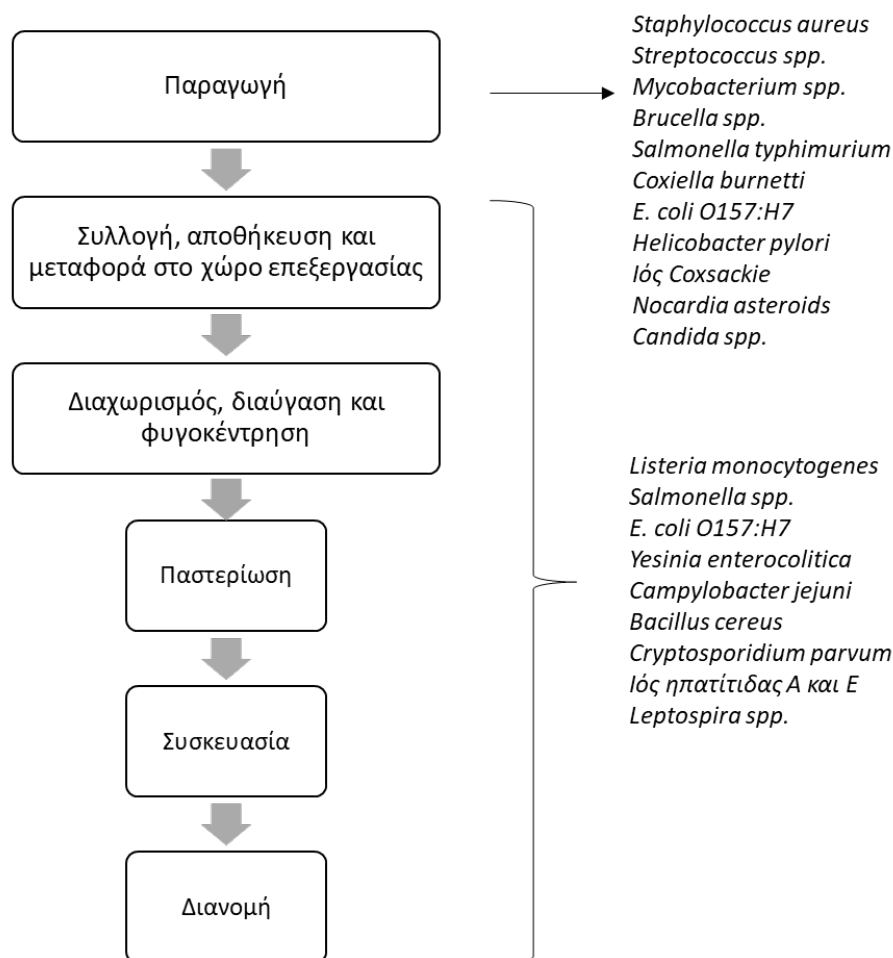
Άλλα σημαντικά παθογόνα του απαστερίωτου γάλακτος περιλαμβάνουν φύκη του γένους *Prototheca*. Τα είδη *P. zopfii*, *P. blaschkeae*, *P. stagnora* και *P. wickerhamii* έχουν απομονωθεί

από δείγματα γάλακτος σε αναπτυσσόμενες χώρες και αποτελούν ιδιαίτερο παράγοντα επαγρύπνησης, καθώς πολλά από τα είδη του γένους *Prototheca*, ιδιαίτερα το είδος *P. zopfii*, εμφανίζει υψηλή αντίσταση στα περισσότερα αντιμυκητιακά και αντιβακτηριακά φάρμακα (AbdelHameed, 2016).

2.2 Τρόποι επιμόλυνσης του γάλακτος

Το γάλα, διαθέτοντας πληθώρα θρεπτικών και ουδέτερο pH, είναι πιθανόν να επιμολυνθεί σε όλα τα στάδια από την παραγωγή μέχρι την κατανάλωση. Παρόλο που το γάλα εξέρχεται από το μαστό θεωρητικά στείρο μικροβίων, στην πραγματικότητα μικροβιακή επιμόλυνση μπορεί να προκύψει τόσο εντός του μαστού, όσο και μετά την έξοδό του, σε επαφή με την εξωτερική επιφάνεια του μαστού ή με τις επιφάνειες που μεσολαβούν στην επεξεργασία και την αποθήκευση του προϊόντος (Murphy & Boor, 2000).

Η επιμόλυνση του γάλακτος εντός του παραγωγού ζώου μπορεί να είναι αποτέλεσμα μιας συστηματικής ασθένειας ή μιας τοπικής μόλυνσης του γαλακτοφόρου αδένος, όπως η μαστίτιδα. Το γάλα που προέρχεται από ζώα με συμπτώματα κλινικής μαστίτιδας συνήθως έχει αλλοιωμένη εμφάνιση, εντοπίζεται γρήγορα και απομακρύνεται από τη γραμμή παραγωγής. Αντιθέτως, σε περίπτωση υποκλινικής μαστίτιδας, το γάλα δεν διαφέρει εμφανώς από το γάλα υγιών ζώων και εισέρχεται στην τροφική αλυσίδα, απειλώντας την ανθρώπινη υγεία. Η μαστίτιδα μπορεί να προκληθεί από πάνω από 150 διαφορετικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν βακτηριακά είδη, μυκοπλάσματα, ζύμες και φύκη, πολλά από τα οποία εκκρίνονται στο γάλα. Παρόλα αυτά, θεωρείται ότι τα κυριότερα τροφιμογενή παθογόνα, όπως τα βακτήρια *Salmonella*, *Campylobacter* και το στέλεχος του βακτηρίου *Escherichia coli* που παράγει σιγκατοξίνη (shigatoxin-producing *E. coli*, STEC), δεν αποικίζουν το γάλα λόγω προϋπάρχουσας μαστίτιδας, αλλά προέρχονται από τον γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων. Παράλληλα, η επαφή του γάλακτος με επιμολυσμένη αλμεκτική μηχανή ή τα χέρια του κτηνοτρόφου αποτελούν πιθανές πηγές μικροβίων. Τέλος, η θερμοκρασία και η διάρκεια της αποθήκευσης του γάλακτος επηρεάζουν το επίπεδο της μικροβιακής επιμόλυνσης και τα είδη των μικροοργανισμών που ανιχνεύονται (Zastempowska et al., 2016). Η **Εικόνα 1** παρουσιάζει τους διαφορετικούς μικροοργανισμούς που εποικίζουν το γάλα, ανάλογα με το στάδιο στο οποίο γίνεται η επιμόλυνση.



Εικόνα 1. Διαφοροποίηση των παθογόνων που επιμολύνουν το γάλα ανάλογα με το στάδιο παραγωγής ή επεξεργασίας. Προσαρμοσμένη από Karoor et al., 2023.

2.3 Όρια παθογόνων μικροοργανισμών στο γάλα - Νομοθεσία

Δεδομένων των κινδύνων που ελλοχεύουν από την κατανάλωση ακατάλληλου γάλακτος, η ευρωπαϊκή νομοθεσία καθορίζει αυστηρά τα όρια της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών που είναι αποδεκτά. Οι οδηγίες που αφορούν την παραγωγή του γάλακτος και των υπόλοιπων γαλακτοκομικών προϊόντων ορίζονται από την ευρωπαϊκή νομοθεσία Νο. 2073/2005 και τις επεκτάσεις αυτής. Ιδιαίτερα για το ωμό, απαστερίωτο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, η ευρωπαϊκή νομοθεσία καθορίζει τις συνθήκες υγιεινής που πρέπει να τηρούνται σε όλη τη γραμμή παραγωγής, σε επίπεδο παραγωγικού ζώου, κτηνοτροφικής μονάδας, εξοπλισμού που έρχεται σε επαφή με το γάλα και δικτύου διανομής. Η συγκεκριμένη νομοθεσία μείωσε τα προϋπάρχοντα όρια ασφαλείας για τροφιμογενή βακτήρια και τις τοξίνες τους, όπως στις περιπτώσεις των βακτηρίων *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii* και

τις σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες. Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις, η απουσία των μικροοργανισμών πρέπει να πιστοποιείται με κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους υψηλής ευαισθησίας. Όπως ορίζουν οι κατευθυντήριες οδηγίες του ISO 707:2008 που αναφέρεται στη σωστή δειγματοληψία του γάλακτος, το δείγμα που λαμβάνεται προς ανάλυση πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό, δηλαδή η σύστασή του να είναι ισοδύναμη με τη σύσταση ολόκληρης της ποσότητας και το βάρος του να είναι 25 g, το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 25 ml. Ο όγκος του δείγματος που αναλύεται σχετίζεται με την πιθανότητα ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι συνήθως είναι παρόντες σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ο Πίνακας 4 παρουσιάζει τα όρια που καθορίζουν τις αποδεκτές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών για τις διαφορετικές μορφές γάλακτος σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 92/46/EEC.

Κατηγορία τροφίμου	Μικροοργανισμοί	Όριο	m*	M**
Ανεπεξέργαστο γάλα αγελάδας για περαιτέρω επεξεργασία	Καταμέτρηση ολικών αποικιών στους 30°C	10 ⁵ cfu/ml		
	<i>S. aureus</i>		500 cfu/ml	2000 cfu/ml
Πρόβειο, κατσικίσιο, βουβαλίσιο ανεπεξέργαστο γάλα	Καταμέτρηση ολικών αποικιών στους 30°C	5 x 10 ⁵ cfu/ml		
	Καταμέτρηση ολικών αποικιών στους 30°C	1.5 x 10 ⁶ cfu/ml		
Ανεπεξέργαστο γάλα αγελάδας για άμεση κατανάλωση	<i>Salmonella</i>	Απουσία σε 25 g		
	<i>S. aureus</i>		100 cfu/ml	500 cfu/ml
	Καταμέτρηση ολικών αποικιών στους 30°C	5 x 10 ⁴ cfu/ml		
	Παθογόνοι μικροοργανισμοί και οι τοξίνες τους	Ποσότητες που επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία		
Παστεριωμένο γάλα	Παθογόνοι μικροοργανισμοί	Απουσία σε 25 g		
	Κολοβακτηρίδια		0 cfu/ml	5 cfu/ml
	Καταμέτρηση ολικών αποικιών στους 21°C		5 x 10 ⁴ cfu/g	5 x 10 ⁵ cfu/g
Γάλα υπερυψηλής θερμικής επεξεργασίας	Καταμέτρηση ολικών αποικιών στους 30°C	10 cfu / 0.1 ml		
Γάλα σε σκόνη και προϊόντα	<i>Salmonella</i>	Απουσία σε 1 g		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Απουσία σε 1 g		

με βάση το γάλα σε σκόνη	<i>S. aureus</i>		10 cfu/g	100 cfu/g
	Κολοβακτηρίδια		0 cfu/g	10 cfu/g
Κατεψυγμένα προϊόντα με βάση το γάλα	<i>Salmonella</i>	Απουσία σε 1 g		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Απουσία σε 1 g		
	<i>S. aureus</i>		10 cfu/g	100 cfu/g
	Κολοβακτηρίδια		10 cfu/g	100 cfu/g
	Καταμέτρηση ολικών αποικιών		10 ⁵ cfu/g	5 x 10 ⁵ cfu/g
Υγρά τρόφιμα με βάση το γάλα	<i>Salmonella</i>	Απουσία σε 1 g		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Απουσία σε 1 g		
	Κολοβακτηρίδια		0 cfu/g	5 cfu/g
	Καταμέτρηση ολικών αποικιών		5 x 10 ⁴ cfu/g	10 ⁵ cfu/g

* m = όριο διαφοροποίησης μεταξύ καλής και οριακά αποδεκτής ποιότητας

** M = όριο διαφοροποίησης μεταξύ οριακά αποδεκτής και μη αποδεκτής ποιότητας

Πίνακας 4. Αποδεκτές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών στο γάλα σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 92/46/EEC.

3. ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

3.1 Μέθοδοι κυτταροκαλλιέργειας

Παραδοσιακά, η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο γάλα, όπως και στα υπόλοιπα τρόφιμα, γίνεται με μεθοδολογίες που βασίζονται στην ανάπτυξη του μικροβιακού φορτίου σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα. Η συγκέντρωση των μικροοργανισμών του γάλακτος εκτιμάται με βάση τον αριθμό των αποικιών που αναπτύσσονται, με χρήση της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων, με ανάπτυξη των μικροοργανισμών έπειτα από επαφή του τροφίμου με θρεπτικό υπόστρωμα ή με τεχνικές που περιλαμβάνουν τη διήθηση του δείγματος μέσω μεμβράνης. Η επακόλουθη ταυτοποίηση των μικροοργανισμών γίνεται συνήθως με χρήση κατάλληλων βιοχημικών μεθόδων ή μέσω των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Η μέθοδος θεωρείται από τις πλέον ευαίσθητες, καθώς μπορεί να οδηγήσει στην ανίχνευση ακόμη και ενός μόνο κυττάρου, με την προϋπόθεση ότι αυτό είναι μεταβολικά ενεργό και μπορεί να διαιρεθεί στις δεδομένες εργαστηριακές συνθήκες. Δεδομένου ότι συχνά η συγκέντρωση των παθογόνων είναι σε χαμηλά επίπεδα, προκειμένου να αποφευχθεί ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα, προηγείται ένα στάδιο μη εκλεκτικού εμπλουτισμού του δείγματος με ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε γενικού τύπου θρεπτικό υπόστρωμα και ακολουθεί η επιλεκτική ανάπτυξη ενός συγκεκριμένου παθογόνου (Rajapaksha et al., 2019).

Με βάση τα παραπάνω, η ανίχνευση παθογόνων μέσω καλλιέργειας συνήθως περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- 1) Εμβολιασμός σε μη επιλεκτικό θρεπτικό μέσο για εμπλουτισμό του δείγματος.
- 2) Εμβολιασμός σε ένα ή περισσότερα θρεπτικά υποστρώματα που αναστέλλουν την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών εκτός από τους μικροοργανισμούς που εξετάζονται.
- 3) Εμβολιασμός σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα που υποστηρίζει μόνο την ανάπτυξη του υπό εξέταση παθογόνου.
- 4) Βιοχημική ή άλλου είδους ταυτοποίηση.

Η εφαρμογή αυτής της μεθοδολογίας γίνεται ανεξάρτητα για διαφορετικά υπό εξέταση παθογόνα. Συχνά η σύνθεση συγκεκριμένων ενζύμων ή μεταβολιτών κατά την ανάπτυξη των κυττάρων μπορεί να ανιχνευτεί με αλλαγή του χρώματος του κατάλληλου υποστρώματος και

διευκολύνει την επιλογή των κυττάρων. Σε κάθε περίπτωση, η οριστική ταυτοποίηση του μικροοργανισμού στηρίζεται σε βιοχημικές δοκιμασίες, όπως τα εμπορικά διαθέσιμα kit Vitek 2 API 20 STREP και API 20 STAPH της εταιρείας bioMérieux, που ανιχνεύουν βακτήρια του γένους *Enterococcus* και *Staphylococcus* αντίστοιχα (Sudhakaran & Anand, 2020).

Παρόλο που οι μέθοδοι που βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία, ανάλογα με τα είδη που πρόκειται να ανιχνευθούν, η διαδικασία πιθανόν να διαρκέσει έως και εβδομάδες μέχρι να γίνει επαλήθευση των πρωταρχικών θετικών αποτελεσμάτων (Velusamy et al., 2010). Επιπλέον, οι τεχνικές αυτές συχνά απαιτούν εντατική ενασχόληση του εργαστηριακού προσωπικού και μπορούν -υπό προϋποθέσεις- να καταστούν ασύμφορες οικονομικά. Παράλληλα, η ικανότητα των μικροοργανισμών να αναστέλλουν τον κυτταρικό τους κύκλο και να εισέρχονται σε φάση χαμηλού μεταβολικού ρυθμού σε μη ευνοϊκές συνθήκες πιθανόν να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Oliver, 2010), ενώ πρέπει να ληφθεί υπόψη και το γεγονός ότι δεν καλλιεργούνται στο εργαστήριο όλοι οι μικροοργανισμοί.

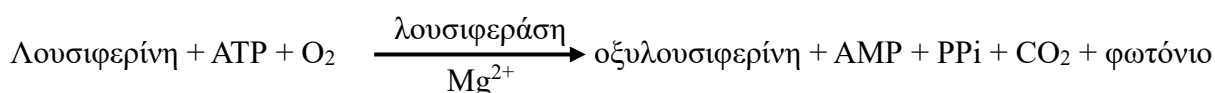
Παρά τα μειονεκτήματα των μεθόδων καλλιέργειας που αναφέρθηκαν παραπάνω, η εφαρμογή τους αποτελεί ακόμα και σήμερα μια ελκυστική επιλογή σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Η ανίχνευση των παθογόνων γίνεται με μεθόδους καλλιέργειας όταν η διαθέσιμη ποσότητα DNA από το δείγμα δεν επαρκεί ή είναι χαμηλής ποιότητας για την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών ανάλυσης. Άλλη αιτία που προκρίνει την καλλιέργεια είναι η ταυτόχρονη παρουσία μη παθογόνων μικροοργανισμών σε συντριπτικά μεγαλύτερη ποσότητα, η οποία πιθανόν να εμποδίζει την ανίχνευση παθογόνων που πιθανόν να είναι παρόντα σε πολύ μικρότερη αναλογία ή είναι πιο δύσκολο να καλλιεργηθούν. Επιπλέον, η διαδικασία λύσης των κυττάρων που αποτελεί προϋπόθεση για την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων πολλές φορές αποτελεί πρόκληση σε περιπτώσεις ενδοσπορίων ή βακτηρίων θετικών κατά Gram. Παράλληλα, η υψηλή συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου και πρωτεασών που απαντούν στο γάλα παρεμποδίζουν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και τις παραλλαγές της που χρησιμοποιούνται στην πλειονότητα των περιπτώσεων για την ανίχνευση του DNA των παθογόνων μικροοργανισμών. Τέλος, η επιλογή των μεθόδων καλλιέργειας είναι μονόδρομος όταν το εργαστήριο ελέγχου δεν διαθέτει τον εξοπλισμό ή το εκπαιδευμένο προσωπικό που απαιτείται για την εφαρμογή των μοριακών μεθόδων ανίχνευσης (Fusco & Quero, 2014).

3.2 Εναλλακτικές μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων

Η χρήση βιοαισθητήρων και η κυτταρομετρία ροής αποτελούν εναλλακτικές μεθόδους για την ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών. Οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούνται συνήθως σε μικροβιολογικές μεθόδους ανίχνευσης παθογόνων είναι αμπερομετρικοί ή ποτενσιομετρικοί μεταλλάκτες, οι οποίοι δεν επηρεάζονται από τη θολότητα του δείγματος. Η αρχή λειτουργίας τους εκμεταλλεύεται την οξειδωση ενός υποστρώματος από ένα ένζυμο (αλκαλική φωσφατάση ή υπεροξειδάση αγριοράπανου), η οποία προκαλεί τη δημιουργία ηλεκτρικού ρεύματος. Το σήμα του ρεύματος αυτού που ανιχνεύεται είναι ανάλογο με το μικροβιακό φορτίο. Πιο εξελιγμένη μορφή βιοαισθητήρων αποτελούν οι νανο-βιοαισθητήρες, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία (Sudhakaran & Anand, 2020).

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια οπτική μέθοδος ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων. Τα κύτταρα ρέουν σε ένα υγρό μέσο και ακτινοβολούνται από μια ακτίνα laser. Το πρότυπο ανάκλασης της ακτίνας laser, που καταγράφεται από φωτοκύτταρα, εξαρτάται από τις ιδιότητες των κυττάρων και οδηγεί στο καθορισμό του μεγέθους, του σχήματος και του αριθμού των κυττάρων. Πιο εξελιγμένη μέθοδος είναι η φωτοακουστική κυτταρομετρία ροής που ανιχνεύει φωτοακουστικά σήματα που μπορούν να διαφοροποιήσουν και να αναγνωρίσουν συγκεκριμένα παθογόνα (He et al., 2015).

Το φαινόμενο του βιοφωσφορισμού (bioluminescence) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιομηχανία του γάλακτος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ζωντανών μικροοργανισμών σε υπό έλεγχο δείγματα. Ο όρος «βιοφωσφορισμός» περιγράφει την έκλυση φωτονίου που συνοδεύει τη μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη με τη βοήθεια του ενζύμου λουσιφεράση παρουσία τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Το μόριο ATP υπάρχει σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, καθώς αντιπροσωπεύει το ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου. Γι' αυτό το λόγο, το ATP χρησιμοποιείται με τη μέθοδο του βιοφωσφορισμού ως δείκτης βιωσιμότητας που σχετίζεται με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων που υπάρχουν στο δείγμα. Η μετατροπή του ATP σε μονοφωσφορική αδενοσίνη

(AMP) και πυροφωσφορικό (PPi) συνοδεύεται από έκλυση ακτινοβολίας με μέγιστο τα 562 nm, η οποία μετριέται με ένα λουμινόμετρο. Η αντίδραση του βιοφωσφορισμού οδηγεί σε εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου, αλλά όχι σε ταυτοποίηση ειδών. Η ταυτοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών μπορεί να γίνει με ταυτόχρονη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων που σχηματίζουν σύμπλοκο με τα αντίστοιχα κύτταρα, των οποίων ο αριθμός προσδιορίζεται στη συνέχεια με την αντίδραση της λουσιφεράσης (Hunter & Lim, 2010).

4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

Η παγκοσμιοποίηση του εμπορίου των γαλακτοκομικών προϊόντων και η ανάγκη για ταχεία μεταφορά τροφίμων σε μεγάλες αποστάσεις επιβάλλουν την ανάπτυξη και χρησιμοποίηση γρήγορων και αξιόπιστων αναλύσεων για την ανίχνευση παθογόνων που απειλούν τη δημόσια υγεία. Η ανάγκη αυτή ικανοποιήθηκε με τη ραγδαία εξέλιξη των τεχνικών ανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων, η οποία οδήγησε στην ανάπτυξη μιας πληθώρας μοριακών μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών στο γάλα, που αναλύονται στις ενότητες που ακολουθούν.

Η εφαρμογή μοριακών μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών στο γάλα προϋποθέτει την ύπαρξη αρχικών σταδίων προετοιμασίας του δείγματος, με στόχο τη συμπίκνωσή του, την αποδέσμευση των μικροοργανισμών από τα υπόλοιπα συστατικά και τελικά την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων τους. Επιπλέον, η σύσταση του γάλακτος είναι τέτοια ώστε συχνά παρεμποδίζει τις αντιδράσεις των μοριακών μεθόδων. Οι υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και ασβεστίου στο γάλα είναι γνωστό ότι αναστέλλουν τις αντιδράσεις ενίσχυσης των νουκλεϊκών οξέων (Rossen et al., 1992). Για την προετοιμασία των δειγμάτων γάλακτος έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι που βασίζονται στη χρήση ενζυμικών αντιδράσεων, επιφανειοδραστικών ουσιών ή απορρυπαντικών. Επιπλέον, συχνά χρησιμοποιείται φυγοκέντρωση (Hsu & Tsen, 2001), φιλτράρισμα ή ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (Öngör et al., 2004) προκειμένου να απομονωθούν οι προς ανάλυση μικροοργανισμοί σε ένα μικρό και διαχειρίσιμο όγκο. Οι ιδιαίτερες απαιτήσεις κάποιων μοριακών μεθόδων ως προς την προετοιμασία των δειγμάτων αναλύονται λεπτομερέστερα στις ενότητες που ακολουθούν.

4.1 Μέθοδοι υβριδισμού

Το μόριο του DNA αποτελείται από δύο αντιπαράλληλες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, οι οποίες συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου σχηματίζοντας διπλή έλικα. Οι μέθοδοι υβριδισμού βασίζονται στην ιδιότητα των δίκλωνων μορίων νουκλεϊκών οξέων να αποδιατάσσονται αντιστρεπτά σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, χαμηλής αλατότητας ή παρουσία χημικών αποδιατακτικών ουσιών, με αποτέλεσμα το σπάσιμο των δεσμών

υδρογόνου και των διαχωρισμό των δύο αλυσίδων. Εφόσον η επαναδιάταξη των μορίων γίνεται παρουσία κάποιου σημασμένου μορίου-ανιχνευτή, είναι δυνατή η ανίχνευση των επιθυμητών αλληλουχιών-στόχων, η οποία επιτρέπει την ταυτοποίηση συγκεκριμένων μικροοργανισμών.

4.1.1 Επιτόπιος υβριδισμός με χρήση φθορισμού

Η τεχνική του επιτόπιου υβριδισμού με χρήση φθορισμού (fluorescence in situ hybridization, FISH) αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990, όταν οι ερευνητικές ομάδες των Amann και DeLong περιέγραψαν τη χρήση φθορίζοντων ανιχνευτών για την ανίχνευση μορίων ριβοσωμικού RNA και επακόλουθη ταυτοποίηση των μικροοργανισμών στους οποίους ανήκουν (Amann et al., 1990; DeLong et al., 1989). Το rRNA διαθέτει περιοχές υψηλής μεταβλητότητας, καθώς και περιοχές που είναι γνωστές για τον υψηλό βαθμό συντήρησης. Με δεδομένα τα χαρακτηριστικά αυτά, το rRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών μέχρι και σε επίπεδο είδους.

Παρόλο που τα πρωτόκολλα εφαρμογής της μεθόδου FISH διαφέρουν ανάλογα με το είδος των δειγμάτων και τους οργανισμούς που πρόκειται να ανιχνευθούν, η γενική μεθοδολογία περιλαμβάνει αρχικά ένα στάδιο προεπεξεργασίας, το οποίο έχει ως στόχο την ομογενοποίηση και σε κάποιες περιπτώσεις τον εμπλουτισμό του δείγματος. Στην περίπτωση του γάλακτος, μετά την ομογενοποίηση, είναι συχνή η χρησιμοποίηση μη ειδικών πρωτεασών για τη διάσπαση των πρωτεϊνών, όπως η σαβινάση (πρωτεάση του βακτηρίου *Bacillus cereus*) ή η πρωτεάση K. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται, το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεχτικά και το ίζημα που περιλαμβάνει τους μικροοργανισμούς μετατρέπεται σε εναίωρημα που μεταφέρεται σε γυάλινη πλάκα για περαιτέρω επεξεργασία (Gunasekera et al., 2003).

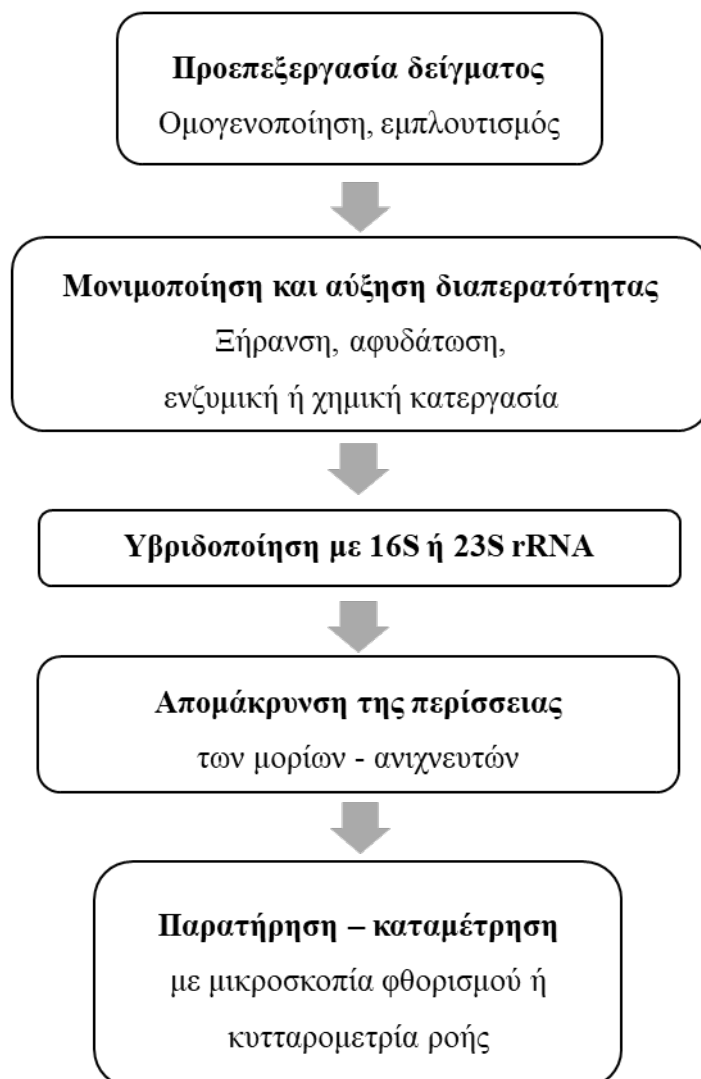
Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει τη μονιμοποίηση του δείγματος και την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων, με στόχο την είσοδο των φθορίζοντων ανιχνευτών. Το στάδιο αυτό μπορεί να περιλαμβάνει ξήρανση ή χημική κατεργασία του δείγματος με οργανικούς διαλύτες. Η ελεγχόμενη πέψη με ένζυμα όπως η λυσοζύμη οδηγεί στη μερική λύση του κυτταρικού τοιχώματος, απαραίτητη προϋπόθεση για την είσοδο των ανιχνευτών.

Ακολουθεί η ανίχνευση των επιθυμητών αλληλουχιών με υβριδοποίηση των μορίων του ανιχνευτή. Τα μόρια-ανιχνευτές της μεθόδου FISH είναι συνήθως ολιγονουκλεοτίδια σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική και η αλληλουχία τους είναι κατάλληλα επιλεγμένη ώστε

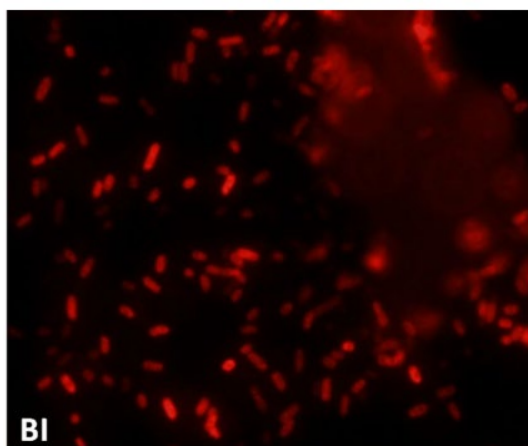
να υβριδοποιείται με το 16S rRNA ή το 23S rRNA συγκεκριμένης ταξινόμικής ομάδας μικροοργανισμών. Ανάλογα με το βαθμό ομολογίας των μορίων του rRNA και την περιοχή που θα επιλεγεί για ανίχνευση, τα φθορίζοντα ολιγονουκλεοτίδια αναγνωρίζουν βακτήρια σε επίπεδο οικογένειας (π.χ. *Staphylococcaceae*, *Enterobacteriaceae*) ή σε επίπεδο είδους.

Η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών για την επακόλουθη απομάκρυνση των μη υβριδοποιημένων μορίων του ανιχνευτή, σε συνδυασμό με την επιλογή του κατάλληλου ανιχνευτή, εξασφαλίζει την ειδικότητα της μεθόδου. Τέλος, η παρατήρηση του δείγματος γίνεται με μικροσκοπία φθορισμού ή με κυτταρομετρία ροής εφόσον η διαδικασία γίνεται σε διάλυμα (Amann & Fuchs, 2008). Η **Εικόνα 2** περιγράφει διαγραμματικά τα βήματα που ακολουθούνται κατά την εφαρμογή της μεθόδου FISH.

Παραλλαγή της κλασικής μεθόδου επιτόπιου υβριδισμού περιλαμβάνει τη χρήση πεπτιδικών ανιχνευτών νουκλεϊκών οξέων (peptide nucleic acid probes, PNA) (Rohde et al., 2015). Τα μόρια PNA μιμούνται τη δομή του DNA και ακολουθούν τους κανόνες της συμπληρωματικότητας των βάσεων, αλλά διαθέτουν έναν ηλεκτρικά ουδέτερο σκελετό από N-(2-αμινοαιθυλ)-γλυκίνη, σε αντίθεση με τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό των νουκλεϊκών οξέων. Η απουσία των αρνητικά φορτισμένων ομάδων στους ανιχνευτές PNA επιτρέπει την ισχυρότερη υβριδοποίηση των ανιχνευτών με την αλληλουχία-στόχο, εφόσον δεν παρεμβάλλονται απωθητικές δυνάμεις και επομένως μπορεί να μειωθεί το μήκος του μορίου-ανιχνευτή. Λόγω της ισχυρής τους πρόσδεσης, οι ανιχνευτές PNA μπορούν να υβριδοποιηθούν ακόμα και σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας ή υψηλής θερμοκρασίας, σε αντίθεση με τους κοινούς ανιχνευτές. Η ιδιότητα αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική σε περιπτώσεις ανίχνευσης περιοχών του rRNA οι οποίες σχηματίζουν πολύπλοκες δευτεροταγείς δομές και είναι δύσκολα προσπελάσιμες στους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές. Παράλληλα, τα μη πολικά χαρακτηριστικά των ανιχνευτών PNA και η ανθεκτικότητά τους στη δράση πρωτεασών διευκολύνουν την είσοδό τους διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος και της πλασματικής μεμβράνης, επιτρέποντας τη μείωση του χρόνου υβριδοποίησης. Τα πλεονεκτήματα των ανιχνευτών PNA έχουν οδηγήσει στην ολοένα αυξανόμενη χρήση τους στην ανίχνευση παθογόνων σε τρόφιμα (Almeida et al., 2010). Επιπλέον, έχει δειχτεί ότι οι ανιχνευτές PNA μπορούν να ταυτοποιήσουν ένα βακτήριο *E. coli* σε επίπεδο ορότυπου, το οποίο δεν συμβαίνει με τους κλασικούς ανιχνευτές (**Εικόνα 3**, Almeida et al., 2013). Δυστυχώς, η μετατροπή ανιχνευτών DNA σε PNA απαιτεί επαναπροσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών υβριδοποίησης και εκ νέου αξιολόγηση της αναλυτικής διαδικασίας.



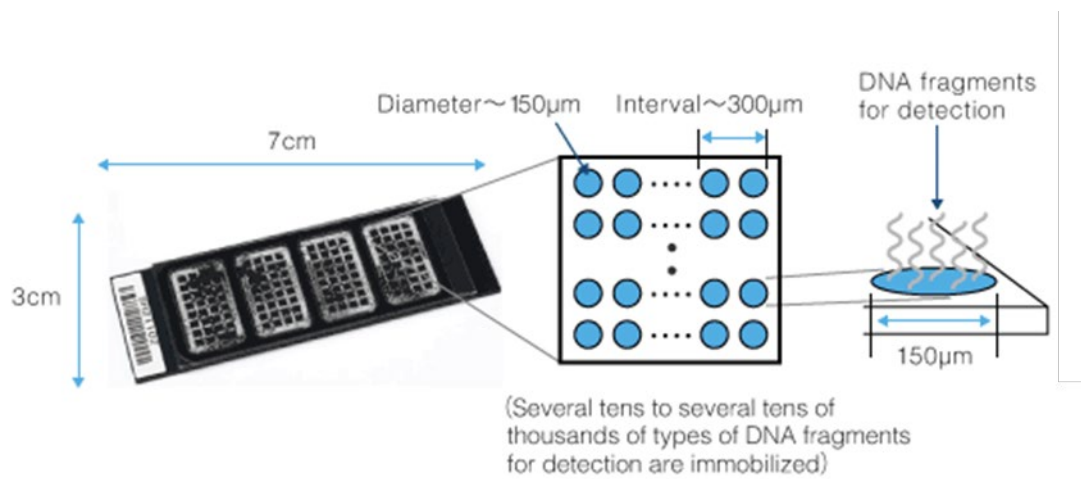
Εικόνα 2. Βασικά στάδια εφαρμογής της μεθόδου FISH



Εικόνα 3. Ανίχνευση του στελέχους *E. coli* O157:H7 με την τεχνική FISH και χρήση ανιχνευτών PNA. Από Almeida et al., 2013.

4.1.2 Μικροσυστοιχίες DNA

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA επιτρέπει την ταυτόχρονη ταυτοποίηση πολλών μικροοργανισμών και βασίζεται στην υβριδοποίηση μορίων-ανιχνευτών με το DNA του δείγματος υπό ανάλυση (Rasooly & Herold, 2008). Μια κλασική μικροσυστοιχία DNA αποτελείται από ένα πλακίδιο στο οποίο έχουν προσκολληθεί μη αντιστρεπτά τα μόρια-ανιχνευτές σε συγκεκριμένες θέσεις. Οι ανιχνευτές μπορεί να εναποτίθενται πάνω στο πλακίδιο μέσω ρομποτικού συστήματος (μικροσυστοιχίες χαμηλής πυκνότητας) ή να συντίθενται *in situ* πάνω στην επιφάνεια του πλακιδίου, προκειμένου για μικροσυστοιχίες υψηλής πυκνότητας. Ανάλογα με τα επιθυμητά αποτελέσματα, τα μόρια-ανιχνευτές είναι συνήθως κατάλληλα σχεδιασμένα ολιγονουκλεοτίδια ή μόρια cDNA. Κάθε μικροσυστοιχία έχει το μέγεθος μιας αντικειμενοφόρου πλάκας μικροσκοπίου ή και μικρότερο και μπορεί να φέρει προσκολλημένους έως και δεκάδες χιλιάδες ανιχνευτές (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Μικροσυστοιχία DNA και σχηματική απεικόνιση των θέσεων πρόσδεσης των μορίων-ανιχνευτών. Από: <https://www.3d-gene.com/en/about/chip>

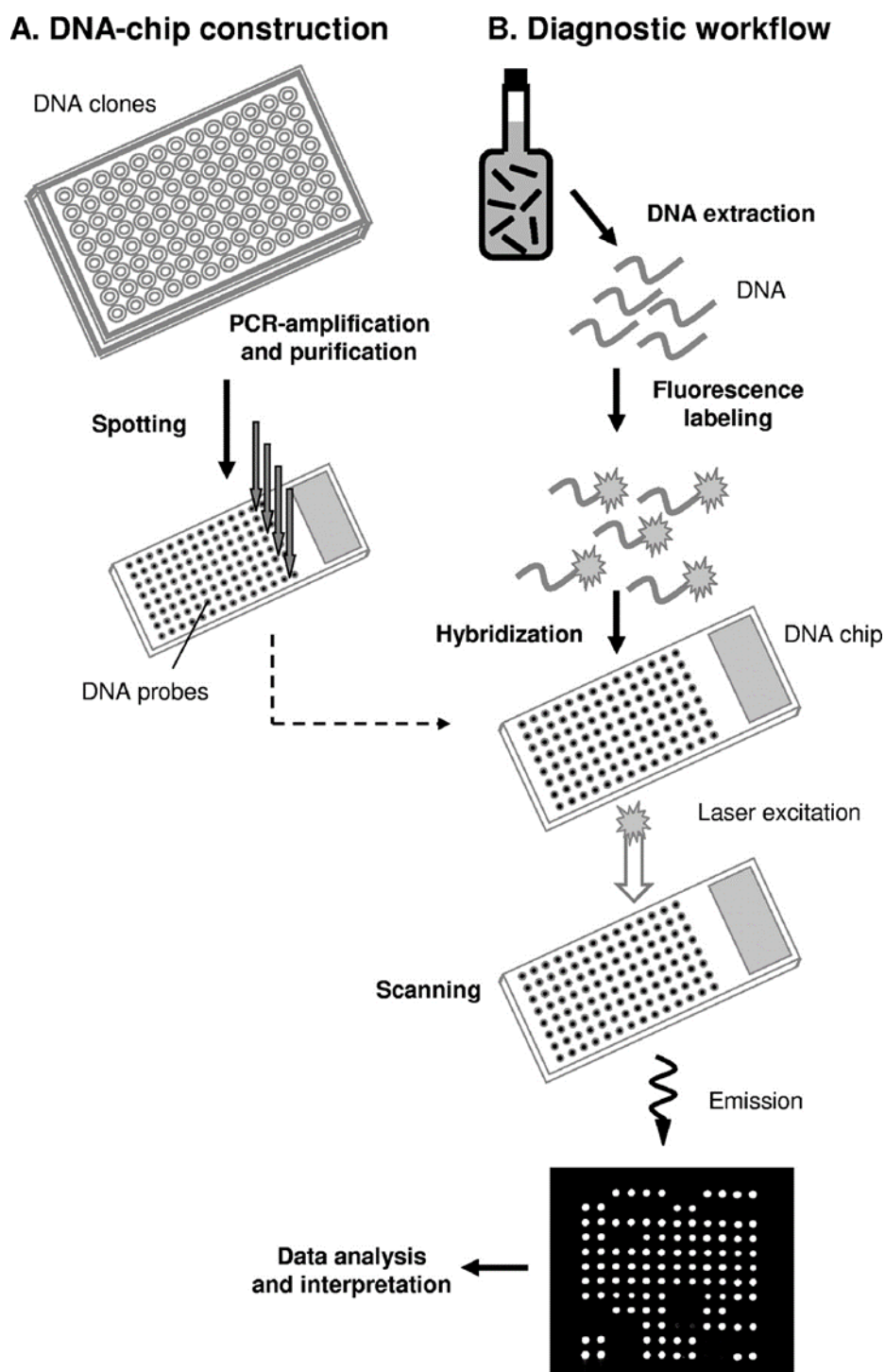
Προκειμένου να ανιχνευτούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί του γάλακτος, απομονώνεται το ολικό DNA, σημαίνεται με φθορίζουσα χρωστική και τέλος υβριδοποιείται με τα συμπληρωματικά μόρια που βρίσκονται πάνω στην συστοιχία. Η ανίχνευση ή όχι φθορισμού σε συγκεκριμένες θέσεις της μικροσυστοιχίας οδηγεί στον προσδιορισμό των βακτηρίων που είναι παρόντα (Εικόνα 5). Η χρήση των μικροσυστοιχιών DNA επιτρέπει, με τον κατάλληλο σχεδιασμό, όχι μόνο τη μοριακή ταυτοποίηση, αλλά και τον χαρακτηρισμό πολλών αλληλουχιών-στόχων σε μία δοκιμασία ελέγχου, γεγονός που επιτρέπει την απόκτηση πλήθους

πληροφοριών σχετικά με τα παθογόνα, όπως την ύπαρξη ή όχι λοιμωδών παραγόντων ή ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (Giannino et al., 2009).

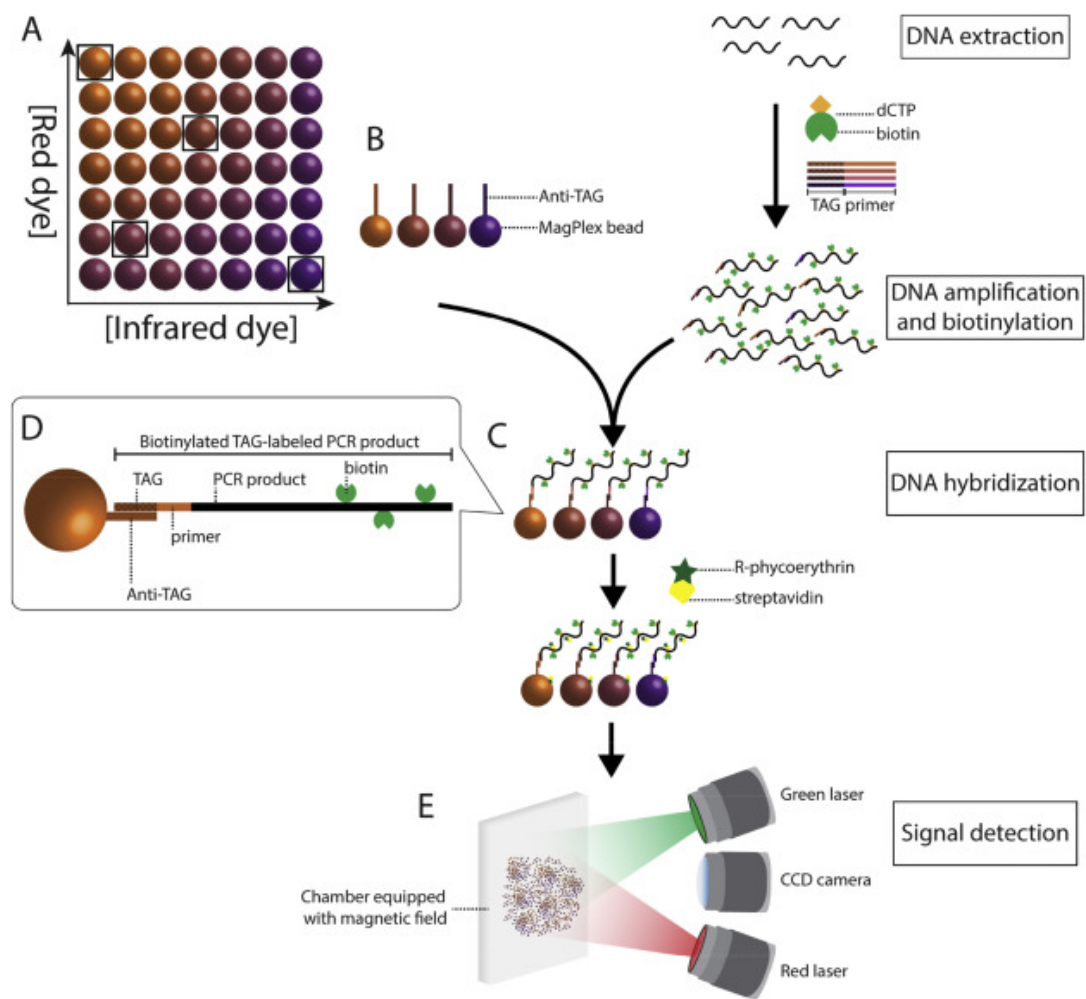
Παραλλαγή των μικροσυστοιχιών με πλακίδια που φέρουν ανιχνευτές σε προκαθορισμένες θέσεις αποτελούν οι μικροσυστοιχίες με χρήση σφαιριδίων. Στην περίπτωση αυτή, τα μόρια-ανιχνευτές προσκολλώνται σε σφαιρίδια, καθένα από τα οποία είναι σημασμένο με μια μοναδική αναλογία δύο χρωστικών, που φθορίζουν σε διαφορετικά μήκη κύματος (**Εικόνα 6**). Συνεπώς, κάθε σφαιρίδιο φέρει μια μοναδική φθορίζουσα ταυτότητα, η οποία μπορεί να ανιχνευτεί στο τέλος με κυτταρομετρία ροής. Τα μόρια-ανιχνευτές (ολιγονουκλεοτίδια ή αντισώματα) συνδέουν τα σφαιρίδια με τα αντίστοιχα μόρια-στόχους, τα οποία είναι επίσης σημασμένα.

Μια δοκιμασία με συστοιχία σφαιριδίων πραγματοποιείται συνήθως σε βοθρία (πηγάδια), σε κάθε ένα από τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν έως και 100 διαφορετικοί ανιχνευτές. Παρόλο που οι συστοιχίες σφαιριδίων πλεονεκτούν ως προς το χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωση της διαδικασίας, δεν μπορούν να υποστηρίξουν τον μεγάλο αριθμό αντιδράσεων ανά πείραμα που υποστηρίζουν οι κλασικές μικροσυστοιχίες υψηλής πυκνότητας. Για το λόγο αυτό, οι συστοιχίες με σφαιρίδια προτιμώνται σε περιπτώσεις μεγάλου αριθμού δειγμάτων στα οποία μελετάται ένας μικρός αριθμός χαρακτηριστικών, ενώ οι κλασικές μικροσυστοιχίες προτιμώνται όταν το αντικείμενο μελέτης είναι ένας μεγάλος αριθμός χαρακτηριστικών ενός μικρού αριθμού δειγμάτων (Rasooly & Herold, 2008).

Όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση της μεθόδου FISH, η χρήση μορίων DNA ως ανιχνευτές στη μέθοδο των μικροσυστοιχιών παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα, εφόσον το DNA μπορεί να αποικοδομηθεί σε ακραίες τιμές θερμοκρασίας, pH ή παρουσία ενζύμων. Επιπλέον, η ειδικότητα του υβριδισμού μεταξύ δυο μορίων νουκλεϊκών οξέων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία υβριδισμού και το μήκος του μορίου-ανιχνευτή. Οι ανιχνευτές PNA, η δομή των οποίων μιμείται τη δομή των νουκλεϊκών οξέων, πλεονεκτούν ως προς τη θερμική σταθερότητα, την ανθεκτικότητα στην παρουσία νουκλεασών ή πρωτεασών, την υψηλή εξειδίκευση και την υψηλή ευαισθησία σε σχέση με τους κλασικούς ανιχνευτές. Για τους λόγους αυτούς, οι συγκεκριμένοι ανιχνευτές έχουν βρει εφαρμογή και στην ανίχνευση παθογόνων με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών.

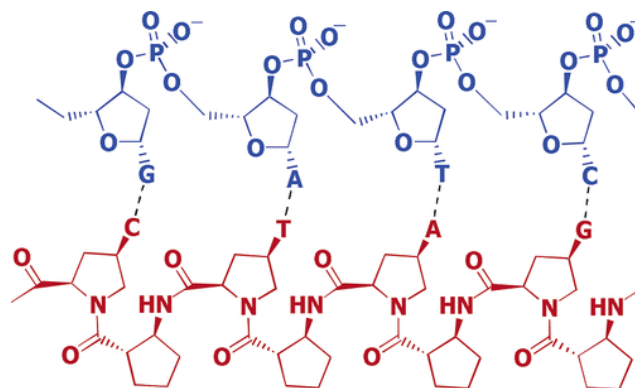


Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων που περιλαμβάνει η ανίχνευση παθογόνων με χρήση μικροσυστοιχίας DNA. Α) Δημιουργία της μικροσυστοιχίας. Β) Σήμανση, υβριδισμός των μορίων-στόχου, ανίχνευση του φορτισμού και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Από Cleven et al., 2006.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου των μικροσυστοιχιών με χρήση σφαιριδίων. Τα σφαιρίδια είναι σημασμένα σε διαφορετικές αναλογίες με δύο χρωστικές που εκπέμπουν στο ερυθρό και στο υπέρυθρο φάσμα, και φέρουν το αντίσωμα που αναγνωρίζει τον επίτοπο TAG. Το DNA-στόχος ενισχύεται και βιοτινυλιώνεται με μία αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού και στη συνέχεια προσκολλάται πάνω στα σφαιρίδια μέσω του επιτόπου TAG που περιλαμβάνουν οι εκκινητές της αντίδρασης. Έπειτα από την προσθήκη του συμπλόκου R φυκοερυθρίνης-στρεπταβιδίνης στο μίγμα, γίνεται ανίχνευση του φθορισμού και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Από Charlermroj et al., 2019.

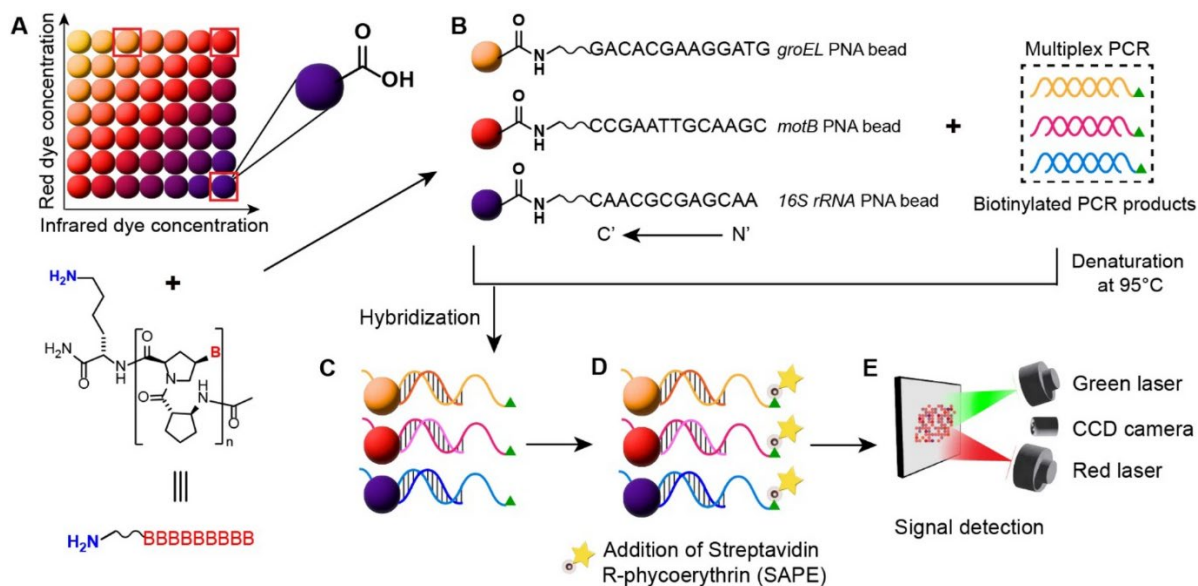
Οι Norpakuadritidej et al. (2023) χρησιμοποίησαν ανιχνευτές πυρολιδινυλο-PNA για την ανίχνευση του παθογόνου *Bacillus cereus* με χρήση μικροσυστοιχίας σφαιριδίων. Οι ανιχνευτές πυρολιδινυλο-PNA περιλαμβάνουν αλληλουχίες τροποποιημένων μορίων προλίνης και κυκλικών β-αμινοξέων σε αντικατάσταση του φωσφοδιεστερικού σκελετού των νουκλεϊκών οξέων (Εικόνα 7) και προσδένονται σε αντιπαράλληλες συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA με ιδιαίτερη σταθερότητα και υψηλότερη εξειδίκευση.



Εικόνα 7. Ανιχνευτής πυρολιδινυλο-PNA (κόκκινο χρώμα), που φέρει τις βάσεις κυτοσίνη (C), θυμίνη (T), αδενίνη (A) και γουανίνη (G). Οι αζωτούχες βάσεις του ανιχνευτή σχηματίζουν δεσμούς με τις βάσεις στην αλυσίδα DNA (μπλε χρώμα) σύμφωνα με τους κανόνες συμπληρωματικότητας των Watson-Crick.

Από Vilaivan & Srisuwannaket, 2006.

Για την ανίχνευση του βακτηρίου *B. cereus* χρησιμοποιήθηκαν μόρια PNA με αλληλουχίες συμπληρωματικές των γονιδίων *groEL*, *motB* και *16S rRNA*. Οι ίδιες αλληλουχίες ενισχύθηκαν από τα μόρια-στόχους μέσω μιας πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, η οποία επιπλέον σήμανε τα μόρια με βιοτίνη. Στη συνέχεια έγινε αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA, υβριδοποίηση με τις αλληλουχίες των σφαιριδίων και προσθήκη του φθορίζοντος συμπλόκου R φυκοερυθρίνης-στρεπταβιδίνης. Η ανίχνευση φθορισμού στην πράσινη περιοχή του φάσματος προερχόταν από το σύμπλοκο φυκοερυθρίνης-στρεπταβιδίνης, ενώ φθορισμός στην κόκκινη περιοχή προερχόταν από τη φθορίζουσα σήμανση των σφαιριδίων (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ανίχνευσης *B. cereus* με χρήση συστοιχίας σφαιριδίων και ανιχνευτών PNA. Α) Τα παραμαγνητικά σφαιρίδια είναι σημασμένα σε διαφορετικές αναλογίες με δύο χρωστικές που εκπέμπουν στο ερυθρό και στο υπέρυθρο φάσμα και ενώνονται ομοιοπολικά με τα μόρια των ανιχνευτών PNA. Β) Οι ανιχνευτές περιλαμβάνουν αλληλουχίες των γονιδίων *groEL*, *motB* και *16S rRNA*, συμπληρωματικές ως προς τα προϊόντα της αντίδρασης ενίσχυσης των μορίων-στόχων. Γ) Τα βιοτινυλιωμένα μόρια-στόχοι αποδιατάσσονται και στη συνέχεια υβριδίζονται με τους ανιχνευτές των σφαιριδίων. Δ) Προσθήκη του συμπλέγματος R φυκοερυθρίνης-στρεπταβιδίνης, το οποίο προσδένεται στη βιοτίνη του συμπλόκου DNA στόχου - ανιχνευτή - σφαιριδίου. Ε) Ανίχνευση φθορισμού στην πράσινη περιοχή του φάσματος προέρχεται από το σύμπλοκο φυκοερυθρίνης-στρεπταβιδίνης, ενώ φθορισμός στην κόκκινη περιοχή προέρχεται από τη φθορίζουσα σήμανση των σφαιριδίων. Από Noppakuadritidej et al., 2023.

4.2 Μέθοδοι ενίσχυσης γενετικών τύπων με εναλλαγές θερμοκρασιών

4.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

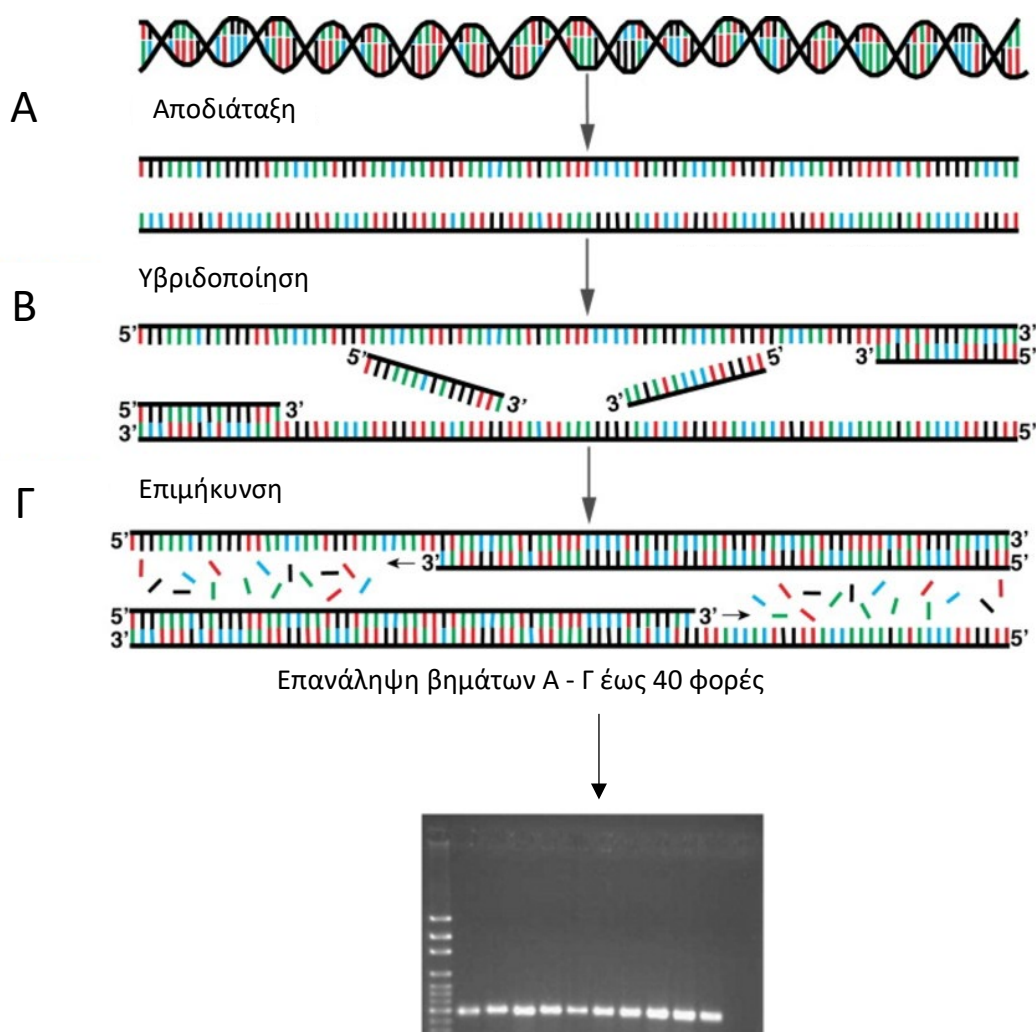
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA σε εκατομμύρια αντίτυπα και χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλές εφαρμογές, μεταξύ των οποίων και στην ανίχνευση παθογόνων στα τρόφιμα. Η αντίδραση PCR εφευρέθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Kary Banks Mullis (Saiki et al., 1985), ο οποίος βραβεύτηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1993 για την ανακάλυψη αυτή.

Η PCR βασίζεται σε μια ταχεία προγραμματισμένη εναλλαγή θερμοκρασιών, η οποία συμβαίνει σε μηχανήματα που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές. Η εναλλαγή των

θερμοκρασιών επιτρέπει εναλλάξ την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA και τον σχηματισμό συμπληρωματικών αλυσίδων μέσω πολυμερισμού νουκλεοτιδίων. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση, εκτός από τα μόρια DNA που χρησιμεύουν ως αρχικό υπόστρωμα, είναι απαραίτητη η παρουσία μιας DNA πολυμεράσης, ενός ζευγαριού ολιγονουκλεοτιδίων που δρουν ως πρωταρχικά τμήματα πολυμερισμού και ενός μίγματος τριφωσφορικών δεόξυ-ριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) (Zhu et al., 2020).

Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η θερμοανθεκτική Taq πολυμεράση, η οποία απομονώθηκε από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και επιτρέπει τον πολυμερισμό σε θερμοκρασίες που αποδιατάσσουν τις συμβατικές DNA πολυμεράσες. Η δράση της Taq πολυμεράσης προϋποθέτει την ύπαρξη KCl και ιόντων Mg^{2+} στο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη νουκλεοτιδίου αδενίνης στο 3' άκρο της νέας αλυσίδας. Σε αντίθεση με άλλες DNA πολυμεράσες, η Taq πολυμεράση δεν διαθέτει 3' προς 5' εξωνουκλεοτιδική δράση, με αποτέλεσμα την ενσωμάτωση ενός λάθους ανά περίπου 10.000 νουκλεοτίδια. Σε περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη η υψηλή πιστότητα πολυμερισμού κατά την αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται άλλες εμπορικά διαθέσιμες θερμοανθεκτικές πολυμεράσες, όπως είναι η πολυμεράση Pfu.

Η Taq πολυμεράση καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ δεοξυριβονουκλεοτιδίων σύμφωνα με τους κανόνες της συμπληρωματικότητας των βάσεων, έχοντας ως καλούπι μια αλυσίδα DNA, εφόσον υπάρχει διαθέσιμο ένα ελεύθερο 3' άκρο DNA. Το 3' άκρο για τη δράση της Taq πολυμεράσης παρέχεται από ένα ζεύγος αντιπαράλληλων ολιγονουκλεοτιδίων, συμπληρωματικών ως προς τη μητρική αλυσίδα, τα οποία ονομάζονται εκκινητές και οριοθετούν την περιοχή που πρόκειται να ενισχυθεί (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Α) Αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA που δρουν ως υπόστρωμα. Β) Υβριδοποίηση των εκκινήτων στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες. Γ) Επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA. Τα βήματα Α έως Γ επαναλαμβάνονται έως και 40 φορές και στο τέλος η παρουσία του προϊόντος της αντίδρασης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Προσαρμοσμένη από Wood et al., 2013.

Τα βασικά βήματα της PCR είναι διαδοχικά τα ακόλουθα:

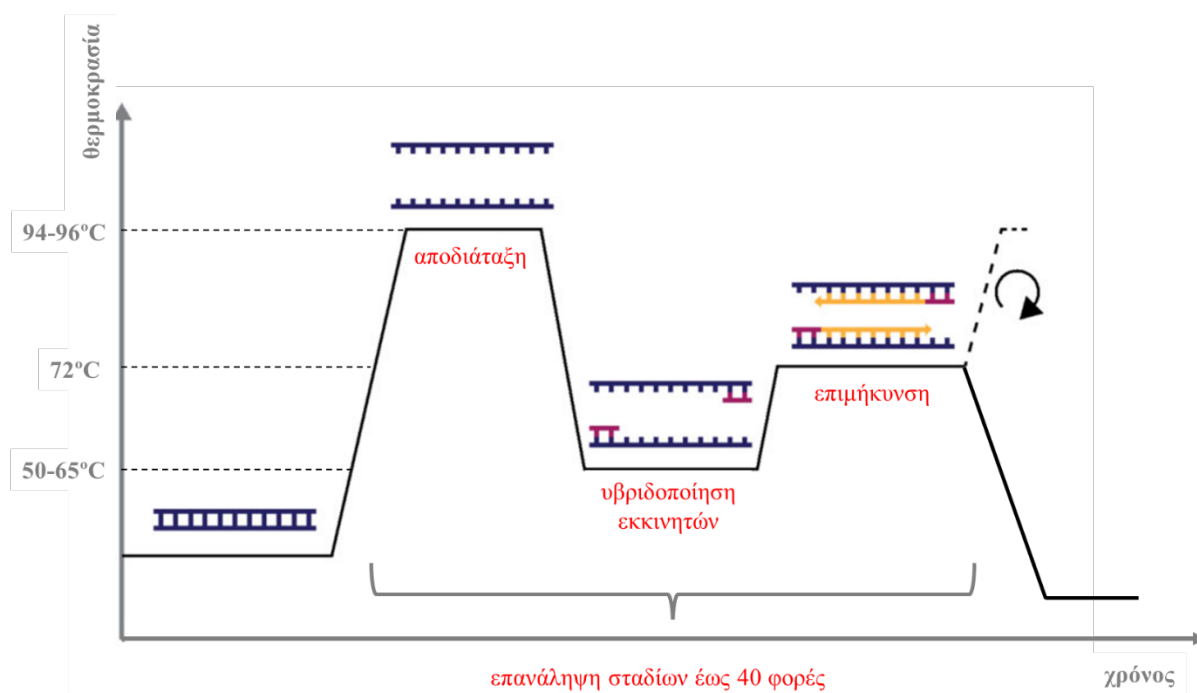
- Αρχική αποδιάταξη: Η θερμοκρασία της αντίδρασης διατηρείται σε 94-96°C για 1-10 λεπτά, έτσι ώστε να αποδιαταχτούν πλήρως τα μόρια DNA και να ενεργοποιηθεί η πολυμεράση σε περίπτωση που είναι συζευγμένη με αντίσωμα (αντιδράσεις θερμής έναρξης).

- Αποδιάταξη: Η θερμοκρασία της αντίδρασης διατηρείται σε 94-96°C για 20-30 δευτερόλεπτα.
- Υβριδοποίηση εκκινητών: Η θερμοκρασία διατηρείται σε 50-65°C για 20-40 δευτερόλεπτα, ανάλογα με το σημείο τήξης των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές. Οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τη συμπληρωματική τους αλληλουχία και παρέχουν το 3' άκρο ως υπόστρωμα για τη δράση της πολυμεράσης.
- Επιμήκυνση: Η θερμοκρασία διατηρείται στη βέλτιστη για τη δράση της πολυμεράσης (συνήθως 72°C) για όσο χρόνο χρειάζεται για την δημιουργία συμπληρωματικής αλυσίδας. Εμπειρικά χρησιμοποιείται η αναλογία 1 λεπτό για κάθε 1000 νουκλεοτίδια που προστίθενται στη νέα αλυσίδα.

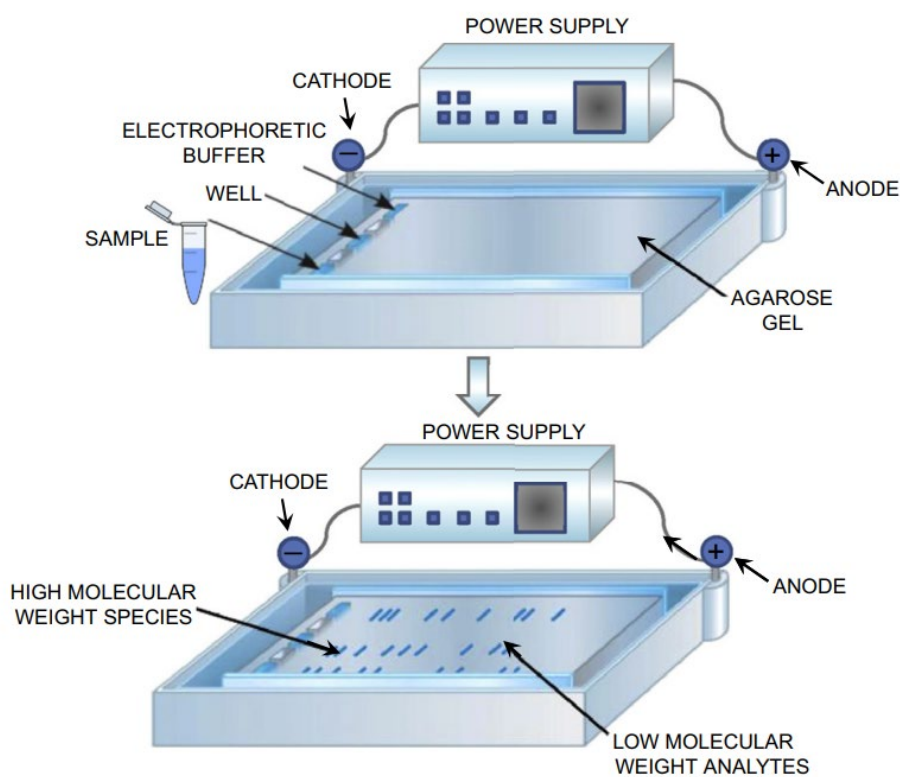
Τα στάδια της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης συνιστούν ένα κύκλο πολυμερισμού, κατά τον οποίο, σε ιδανικές συνθήκες, τα μόρια της αντίδρασης διπλασιάζονται. Ανάλογα με τις απαιτήσεις της δοκιμασίας ελέγχου και την ποσότητα του αρχικού DNA που λειτουργεί ως υπόστρωμα της αντίδρασης, η PCR μπορεί να περιλαμβάνει έως και 40 κύκλους. Μετά την ολοκλήρωσή τους, λαμβάνει χώρα ένα στάδιο τελικής επιμήκυνσης, όπου η πολυμεράση ολοκληρώνει τη σύνθεση των νέων αλυσίδων που πιθανώς να έμειναν ημιτελείς και τα προϊόντα της αντίδρασης διατηρούνται στους 4°C για μικρό χρονικό διάστημα (λίγες ώρες) ή στους -20°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, μέχρι να ελεγχθεί η ύπαρξη προϊόντος της αντίδρασης (**Εικόνα 10**).

Η ύπαρξη προϊόντος μετά τη λήξη της PCR ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, κατά την οποία τα μόρια DNA μεταναστεύουν διαμέσου ενός πηκτώματος προς τον θετικό πόλο ενός ηλεκτρικού πεδίου με διαφορετικές ταχύτητες ανάλογα με το μέγεθός τους (**Εικόνα 11**). Τα μεγαλύτερα μόρια κινούνται πιο αργά και διανύουν τελικά μικρότερη απόσταση από τα μικρότερα. Με τον τρόπο αυτό γίνεται διαχωρισμός των μορίων που υπάρχουν στην PCR σε ζώνες που γίνονται ορατές λόγω της χρήσης χρωστικών που παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα όπως το βρωμιούχο αιθίδιο ή η χρωστική Midori Green. Παράλληλα, γίνεται σύγκριση του μεγέθους των άγνωστων ζωνών με τις ζώνες ενός δείγματος-μάρτυρα, το οποίο περιλαμβάνει μόρια DNA γνωστών μοριακών βαρών, τα οποία μεταναστεύουν ταυτόχρονα με τα υπό μελέτη δείγματα.

Με τη χρήση εκκινητών ειδικών για ένα παθογόνο ή για μια ομάδα παθογόνων, μπορεί να γίνει η ανίχνευσή τους στο γάλα με μεγάλη ευαισθησία, δεδομένου ότι τα μόρια που προκύπτουν από την PCR πολλαπλασιάζονται εκθετικά σε κάθε κύκλο (Allmann et al., 1995; Khan et al., 2022).

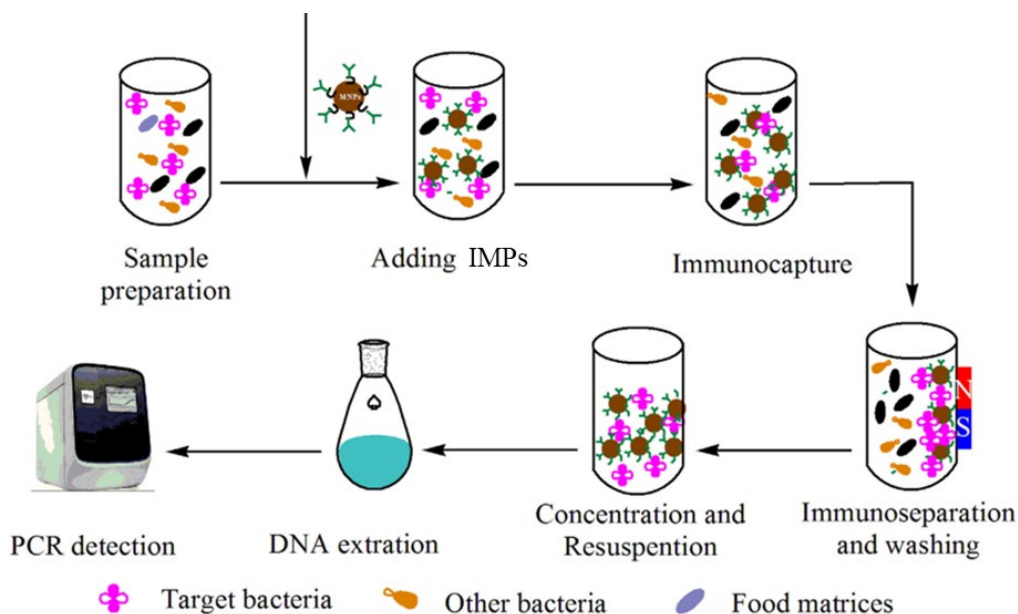


Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση των θερμοκρασιακών μεταβολών κατά τη διάρκεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων. Από Drabik et al., 2016.

Παρά το υψηλό επίπεδο ευαισθησίας της ανίχνευσης με τη μέθοδο PCR, υπάρχει πάντα ο κίνδυνος του ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος, ειδικά σε περιπτώσεις όπου οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, η ανεπαρκής απομάκρυνση των υπόλοιπων συστατικών του γάλακτος παρεμποδίζει τη δράση της πολυμεράσης και επίσης οδηγεί σε λανθασμένα αποτελέσματα. Για τους λόγους αυτούς, συχνά προηγείται μια προετοιμασία του δείγματος γάλακτος, η οποία περιλαμβάνει τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό των παθογόνων που πρόκειται να ανιχνευτούν.

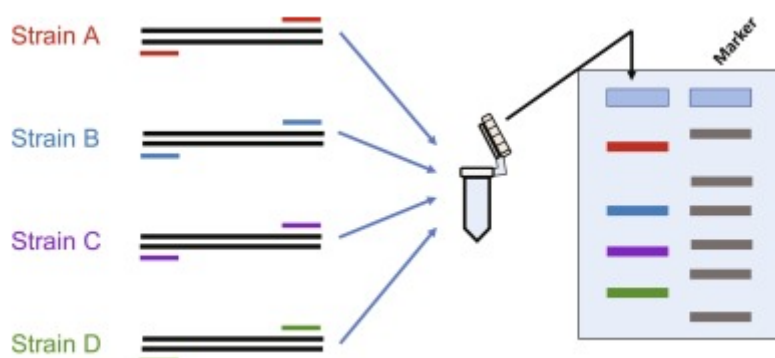


Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού. Από Wang et al., 2020.

Ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός στηρίζεται στη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων (immunomagnetic particles, IMPs) που φέρουν στην επιφάνειά τους κατάλληλα αντισώματα, τα οποία αναγνωρίζουν το υπό εξέταση παθογόνο (Εικόνα 12). Μετά την ανάμιξη του δείγματος με τα IMPs, οι μικροοργανισμοί-στόχοι προσκολλώνται στα σφαιρίδια και διαχωρίζονται από το υπόλοιπο δείγμα με τη βοήθεια μαγνητικού πεδίου. Στη συνέχεια γίνεται ξέπλυμα των IMPs για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ουσιών και επαναδιαλυτοποίηση των μικροοργανισμών σε μικρότερο όγκο υγρού πριν την εξαγωγή του DNA και την εκτέλεση της PCR. Ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός επιτυγχάνει ταυτόχρονα την απομάκρυνση ανασταλτικών ουσιών του γάλακτος και τη συμπύκνωση του δείγματος που πρόκειται να αναλυθεί επιτρέποντας υψηλά επίπεδα ευαισθησίας (Mercanoglu Taban et al., 2009; Grant et al., 1998).

4.2.2 Πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η μέθοδος της πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (multiplex PCR) βασίζεται στην ταυτόχρονη χρήση δύο ή περισσότερων ζευγών εκκινητών με στόχο την ενίσχυση διαφορετικών αλληλουχιών-στόχων κατά την PCR. Η πολλαπλή PCR μπορεί να εφαρμοστεί με ένα υπόστρωμα ανά δοκιμαστικό σωλήνα ή με περισσότερα υποστρώματα. Σε κάθε περίπτωση, οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται πρέπει να σχεδιαστούν κατάλληλα ώστε να διαθέτουν παραπλήσιες θερμοκρασίες τήξης, να μην υβριδοποιούνται μεταξύ τους και να οδηγούν στο σχηματισμό διακριτών προϊόντων έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 13).



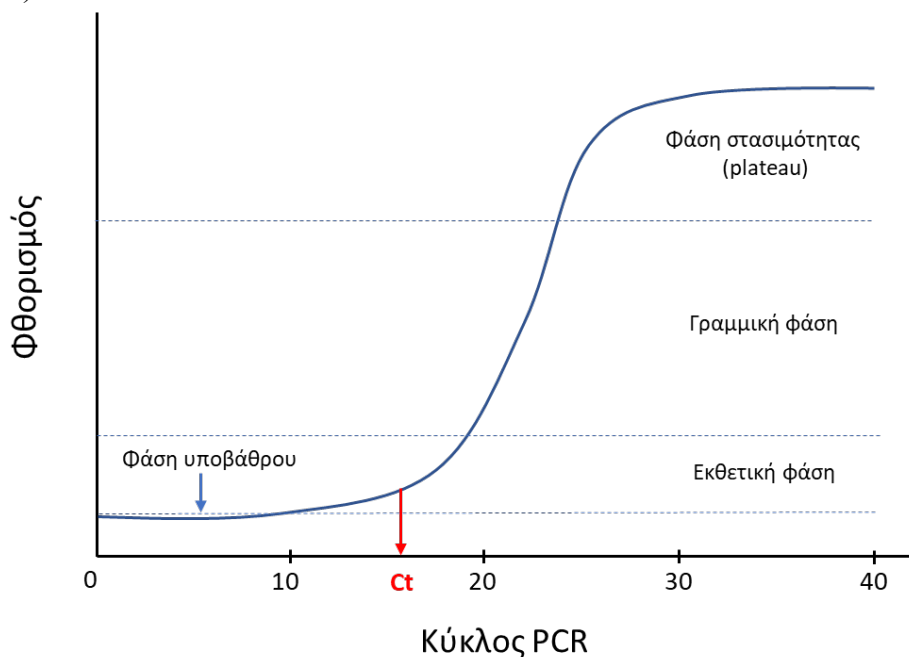
Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση της πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Από Shen C-H, 2019.

Η πολλαπλή PCR πλεονεκτεί ως προς το χρόνο και την εξοικονόμηση αντιδραστηρίων, εφόσον επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση περισσότερων του ενός παθογόνων με μία αντίδραση. Επιπλέον, κατά την εκτέλεση της πολλαπλής PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα ζεύγος εκκινητών ως αντίδραση εσωτερικού ελέγχου, η οποία περιορίζει την πιθανότητα ψευδώς αρνητικών ή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Δεδομένης της ανάγκης για γρήγορη ανίχνευση πολλών διαφορετικών παθογόνων στο γάλα, η πολλαπλή PCR έχει βρει πολλές εφαρμογές που υποστηρίζουν την ανίχνευση έως και δέκα διαφορετικών βακτηρίων σε δύο μόνο δοκιμαστικούς σωλήνες (Shome et al., 2011). Παρά τα πλεονεκτήματά της, η πολλαπλή PCR είναι συχνά λιγότερο ευαίσθητη από την απλή PCR και απαιτεί περισσότερη προσπάθεια για το σχεδιασμό της.

4.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

Η PCR επιτρέπει τη δημιουργία εκατομμυρίων αντιτύπων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας, αλλά δεν μπορεί να ποσοτικοποιήσει την αρχική μήτρα DNA. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της μείωσης της απόδοσης της αντίδρασης, λόγω της ύπαρξης αναστολέων, της μείωσης των αντιδρώντων και της αύξησης της συγκέντρωσης των πυροφωσφορικών που αναστέλλουν τις DNA πολυμεράσες. Το κενό αυτό καλύπτεται από την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR, RT-PCR), η οποία επιτρέπει την ανίχνευση του προϊόντος της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση φθορίζοντων μορίων, τα οποία συνδέονται με το προϊόν της αντίδρασης με τρόπο ανάλογο της ποσότητάς του. Η καταγραφή του σήματος κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης οδηγεί στην ποσοτικοποίηση της αρχικής ποσότητας DNA που χρησιμοποιήθηκε (Higuchi et al., 1992).

Κατά την πραγματοποίηση της RT-PCR, ο φθορισμός ανιχνεύεται σε κάθε χρονικό σημείο της αντίδρασης (κύκλος PCR) και δημιουργείται με τον τρόπο αυτό το διάγραμμα ενίσχυσης (Εικόνα 14).



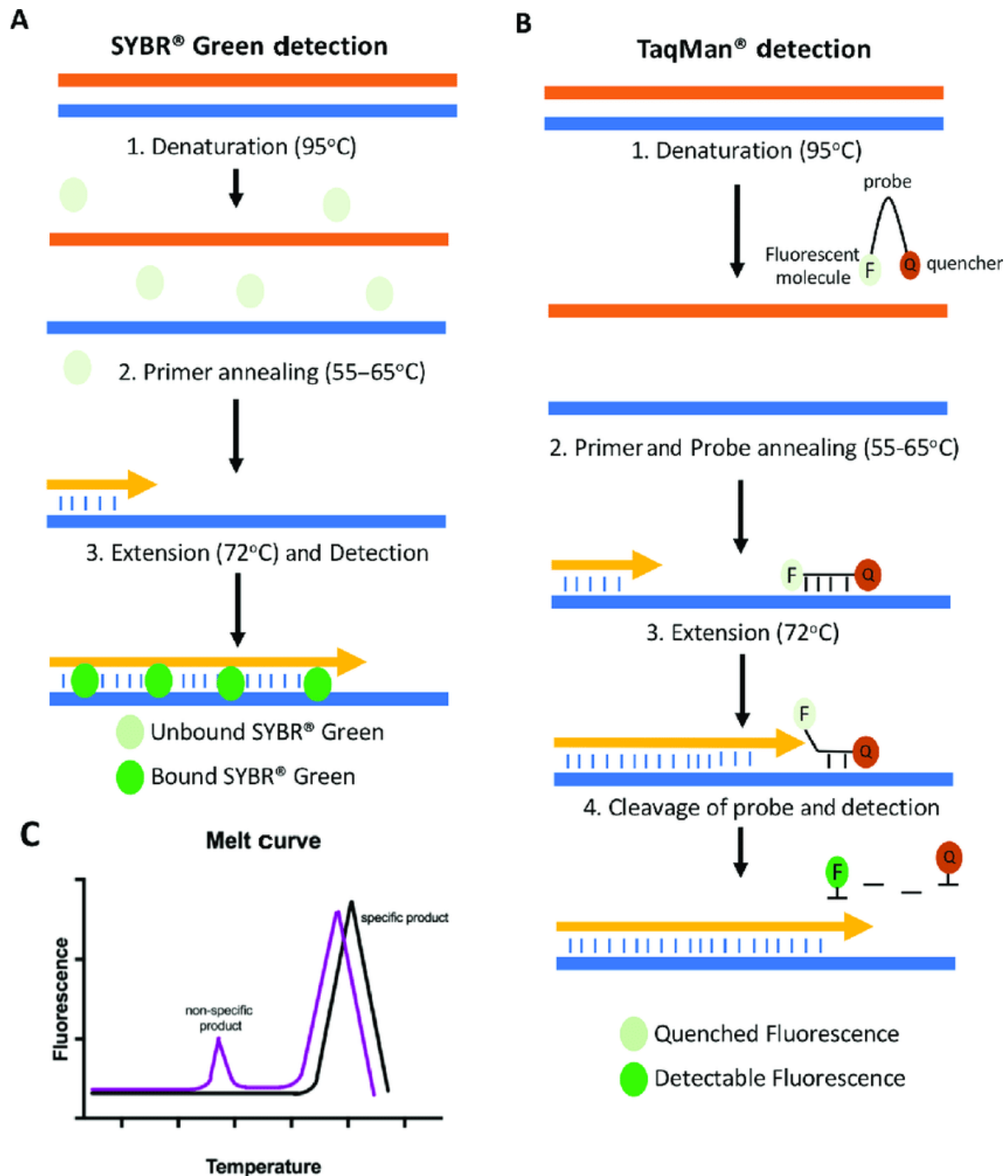
Εικόνα 14. Διάγραμμα ενίσχυσης της μεθόδου RT-PCR.

Η φάση υποβάθρου περιλαμβάνει τους πρώτους κύκλους της αντίδρασης, στους οποίους ο φθορισμός είναι πρακτικά σταθερός. Όταν ο φθορισμός υπερβαίνει ένα προκαθορισμένο όριο, η αντίδραση προσεγγίζει τον *κύκλο κατωφλίου* (threshold cycle, C_t), ο οποίος χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του αρχικού δείγματος. Στη συνέχεια, κατά τη γραμμική φάση, οι συνθήκες προσεγγίζουν το ιδανικό και η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος διπλασιάζεται

μετά από κάθε κύκλο. Τέλος, όταν μειώνεται σημαντικά η ποσότητα των αντιδραστηρίων, η αντίδραση οδηγείται στη φάση στασιμότητας.

Τα κυριότερα συστατικά της αντίδρασης RT-PCR είναι κοινά με αυτά της PCR, καθώς περιλαμβάνουν το τμήμα DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση και το ρυθμιστικό της διάλυμα, μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων και ένα ζεύγος εκκινητών. Στην αντίδραση RT-PCR χρησιμοποιούνται επιπροσθέτως είτε φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται μη ειδικά στο DNA, είτε φθορίζοντες ιχνηθέτες.

Η SYBR green I είναι η συνηθέστερη μη ειδική φθορίζουσα χρωστική, η οποία προσδένεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA. Με τον ίδιο τρόπο δρουν και άλλες χρωστικές, όπως οι χρωστικές BOXTO, SYTO, YO-PRO-1, EvaGreen και άλλες. Οι χρωστικές αυτές δεν προκαλούν ανιχνεύσιμο φθορισμό όταν βρίσκονται ελεύθερες στο διάλυμα της αντίδρασης. Με την πρόοδο της αντίδρασης, η χρωστική προσδένεται στο προϊόν και τελικά ανιχνεύεται φθορισμός ανάλογος της συγκέντρωσής του (**Εικόνα 15**). Καθώς οι χρωστικές αυτής της κατηγορίας δεσμεύονται μη ειδικά σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA, η μέθοδος είναι λιγότερο ειδική σε σχέση με τη χρήση φθορίζοντων ιχνηθετών. Για το λόγο αυτό, συνήθως πραγματοποιείται η ανάλυση της καμπύλης τήξης μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (Pryor & Wittwer, 2006).



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της ανίχνευσης του προϊόντος της αντίδρασης RT-PCR με χρήση της χρωστικής SYBR green (A) και ιχνηθέτη υδρόλυσης τύπου TaqMan (B). Από Adams, 2020.

Η ανάλυση της καμπύλης τήξης προσδιορίζει την ύπαρξη μη ειδικών προϊόντων ή/και συμπλόκων των εκκινητών, τα οποία μειώνουν την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης. Κατά την ανάλυση της καμπύλης τήξης, τα προϊόντα της αντίδρασης αποδιατάσσονται μέσω σταδιακής αύξησης της θερμοκρασίας και καταγράφεται το διάγραμμα του ρυθμού μεταβολής

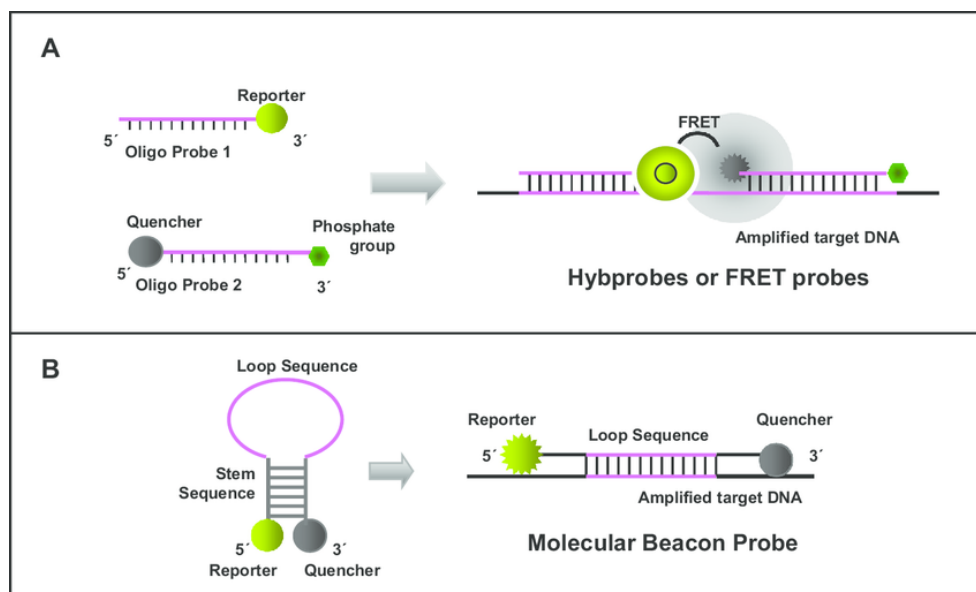
Διπλωματική Εργασία

του φθορισμού ως προς τη θερμοκρασία. Η ανάλυση της καμπύλης τήξης εφαρμόζεται μόνο όταν η φθορίζουσα χρωστική παραμένει συνδεδεμένη με το προϊόν της αντίδρασης.

Σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες χρωστικές, οι φθορίζοντες ιχνηθέτες προσδένονται ειδικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στα μόρια-στόχους. Οι συνηθέστεροι ιχνηθέτες, όπως οι ιχνηθέτες TaqMan, ανήκουν στην κατηγορία των ιχνηθετών υδρόλυσης, οι οποίοι φέρουν μια φθορίζουσα χρωστική στο 5' άκρο και ένα μόριο αποσιώπησης (quencher) στο 3' άκρο του ολιγονουκλεοτιδίου. Ο μη προσδεδεμένος ιχνηθέτης δεν φθορίζει, καθώς το μόριο αποσιώπησης εξουδετερώνει το φθορισμό της χρωστικής του 5' άκρου μέσω του φαινομένου FRET (fluorescent resonance energy transfer, μεταφορά ενέργειας μέσω φθορίζοντα συντονισμού). Κατά την σύνθεση του προϊόντος της αντίδρασης, ο ιχνηθέτης προσδένεται στην περιοχή με την οποία είναι συμπληρωματικός και στη συνέχεια διασπάται μέσω της ενεργότητας της 5'-3' εξωνουκλεάσης της πολυμεράσης. Η διάσπαση του μορίου απομακρύνει τη χρωστική του 5' άκρου από το μόριο αποσιώπησης κι έτσι παράγεται και καταγράφεται φθορισμός (**Εικόνα 15**), (Holland et al., 1991).

Οι ιχνηθέτες υβριδοποίησης αποτελούν μια εναλλακτική κατηγορία ιχνηθετών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ανά ζεύγη. Ο ένας ιχνηθέτης έχει ένα μόριο-δότη φθορισμού στο 3' άκρο και ο άλλος έχει ένα μόριο-δέκτη στο 5' άκρο. Οι δύο ιχνηθέτες προσδένονται στη συμπληρωματική αλληλουχία-στόχο ο ένας δίπλα στον άλλο, όπου το μόριο-δότης φθορισμού γειτνιάζει με το μόριο-δέκτη. Ο μηχανισμός FRET παράγει ανιχνεύσιμο φθορισμό μόνο όταν υβριδοποιηθούν και τα δύο μόρια ιχνηθετών στη σωστή θέση (**Εικόνα 16**). Η ύπαρξη δύο ολιγονουκλεοτιδίων στη συγκεκριμένη τεχνική προσδίδει στη μέθοδο υψηλό επίπεδο εξειδίκευσης (Navarro et al., 2015).

Μία άλλη κατηγορία ιχνηθετών είναι οι ιχνηθέτες τύπου φουρκέτας, οι οποίοι περιλαμβάνουν τους «μοριακούς φάρους» (molecular beacons), τους ιχνηθέτες Scorpions, LUX, Sunrise και άλλους. Οι μοριακοί φάροι περιέχουν μια κεντρική αλληλουχία που σχηματίζει δομή φουρκέτας και δύο άκρα ανεστραμμένων επαναλήψεων (**Εικόνα 16**). Τα άκρα συνδέονται με ένα μόριο αποσιώπησης και μια φθορίζουσα χρωστική. Η δομή φουρκέτας που σχηματίζεται όταν οι ιχνηθέτες δεν έχουν προσδεθεί μειώνει το φθορισμό λόγω του φαινομένου FRET, καθώς τα δύο άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου έρχονται σε επαφή. Αντιθέτως, όταν ο ιχνηθέτης υβριδοποιηθεί με την αλληλουχία-στόχο η δομή φουρκέτας διασπάται, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της φθορίζουσας χρωστικής από το μόριο αποσιώπησης κι τελικά το φθορισμό του ιχνηθέτη (Tyagi & Kramer, 1996).



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των ιχνηθετών υβριδοποίησης (A) και των μοριακών φάρων (B). Από Navarro et al., 2015.

Οι φθορίζουσες χρωστικές που αναφέρθηκαν παραπάνω χρησιμοποιούνται με στόχο την ανίχνευση του προϊόντος της αντίδρασης. Πολλές φορές γίνεται παράλληλα χρήση παθητικών χρωστικών αναφοράς προκειμένου να κανονικοποιηθούν οι ποσότητες των δειγμάτων ως προς τις διακυμάνσεις που σχετίζονται με οργανολογικές διακυμάνσεις ή/και σφάλματα κατά την προσθήκη των μικροποσοτήτων αντιδραστηρίων. Συνηθέστερα χρησιμοποιούνται για το λόγο αυτό η καρβοξυ-ροδαμίνη (ROX) ή η φλουορεσκίνη, οι οποίες δεν συμμετέχουν στην αντίδραση.

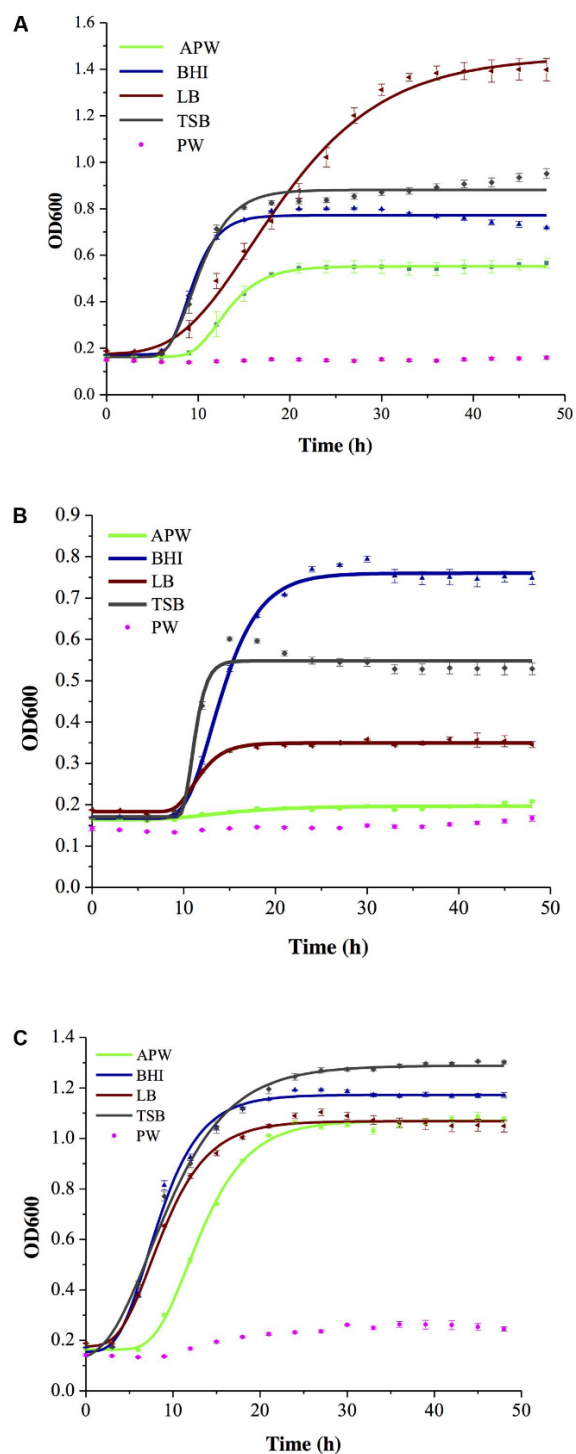
Η μέθοδος της πολλαπλής RT-PCR επιτρέπει την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση περισσότερων του ενός στόχων. Προϋπόθεση της εφαρμογής της μεθόδου αυτής είναι η ταυτόχρονη χρήση δύο φθορίζουσών χρωστικών με διαφορετικό μήκος κύματος εκπομπής φωτονίων, συνεπώς οι χρωστικές που προσδένονται μη ειδικά στο DNA, όπως η SYBR green I, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Η τεχνική της πολλαπλής RT-PCR απαιτεί τη χρήση μικροποσοτήτων δείγματος και αντιδραστηρίων και οδηγεί σε αποτελέσματα σε ελάχιστο χρόνο. Παρόλα αυτά, συχνά παρατηρείται ο σχηματισμός συμπλόκων των εκκινητών λόγω της ταυτόχρονης χρήσης πολλών διαφορετικών μορίων, με αποτέλεσμα τη μείωση της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης. Ένα άλλο μειονέκτημα της πολλαπλής RT-PCR αφορά την ταυτόχρονη ανίχνευση δύο παθογόνων, από τα οποία το ένα βρίσκεται σε συντριπτικά μεγαλύτερη συγκέντρωση από το άλλο. Στην περίπτωση αυτή, παρατηρείται κορεσμός της DNA πολυμεράσης λόγω της ύπαρξης του κυρίαρχου παθογόνου, και καταστολή της ενίσχυσης του δεύτερου προϊόντος.

Πιθανό αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η αυξημένη πιθανότητα για εξαγωγή ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος. Επομένως, η τεχνική της πολλαπλής RT-PCR απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό της αντίδρασης εκ των προτέρων και αυστηρή βελτιστοποίηση των συνθηκών (Sint et al., 2012).

Η ταχύτητα, η υψηλή ευαισθησία και η ποσοτικοποίηση του αρχικού υποστρώματος DNA με τη χρήση της μεθόδου RT-PCR έχει οδηγήσει στην εφαρμογή της μεθόδου για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών του γάλακτος σε διάφορες παραλλαγές. Ανάλογα με τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται, η αντίδραση RT-PCR έχει αναφερθεί ότι επιτρέπει την εκλεκτική ανίχνευση κολοβακτηριδίων (Martín et al., 2010), του παθογόνου *Listeria monocytogenes* (Bai et al., 2022), του βακτηρίου *Salmonella* (Bai et al., 2019) και άλλων. Στις παρακάτω ενότητες γίνεται αναλυτική παρουσίαση δύο παραλλαγών ταυτόχρονης ανίχνευσης παθογόνων του γάλακτος με χρήση πολλαπλής RT-PCR.

Ταυτόχρονη ανίχνευση των παθογόνων S. aureus, L. monocytogenes και Salmonella spp. με χρήση πολλαπλής RT-PCR

Οι Ding et al. (2017) περιέγραψαν την ταυτόχρονη ανίχνευση των παθογόνων *S. aureus*, *L. monocytogenes* και *Salmonella* στο γάλα με χρήση πολλαπλής RT-PCR. Η μέθοδος ανίχνευσης περιλαμβάνει αρχικά ένα στάδιο εμπλουτισμού του δείγματος με προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος και επώαση για 4 ώρες στους 37°C. Οι ερευνητές διερεύνησαν πέντε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (alkaline peptone water: APW, brain heart infusion broth: BHI, Luria-Bertani broth: LB, tryptic soy broth: TSB και peptone water: PW), στα οποία κατέγραψαν τις καμπύλες ανάπτυξης καθαρών καλλιιεργειών των τριών βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου (**Εικόνα 17**). Παράλληλα υπολογίστηκαν οι βασικές παράμετροι ανάπτυξης των τριών παθογόνων σε αυτά τα θρεπτικά υποστρώματα, δηλαδή ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης, ο χρόνος μέχρι το σημείο ανίχνευσης μέσω θολερότητας και ο μέγιστος πληθυσμός κυττάρων σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Με βάση αυτά τα δεδομένα, οι ερευνητές κατέληξαν ότι το θρεπτικό BHI ήταν το πλέον κατάλληλο για να χρησιμοποιηθεί για το στάδιο του εμπλουτισμού.



Εικόνα 17. Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *S. aureus* (A), *L. monocytogenes* (B) και *Salmonella* spp. (C) σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα. Από Ding et al., 2017.

Για την ανίχνευση των συγκεκριμένων βακτηρίων με χρήση πολλαπλής RT-PCR σχεδιάστηκαν οι παρακάτω εκκινητές και ιχνηθέτες τύπου TaqMan (**Πίνακας 5**).

Γονίδιο	Παθογόνο	Εκκινητές/ιχνηθέτες (5' - 3')
<i>nuc</i>	<i>S. aureus</i>	CACCTGAAACAAAGCATCCTAAA
		CGCTAAGCCACGTCCATATT
		FAM-TGGTCCTGAAGCAAGTGCATTTACGA-BHQ1
<i>hlyA</i>	<i>L. monocytogenes</i>	ACTTCGGCGCAATCAGTGA
		TTGCAACTGCTCTTTAGTAACAGCTT
		ROX-TGAACCTACAAGACCTTCCAGATTTTTCGGC-BHQ1
<i>orgC</i>	<i>Salmonella</i> spp.	CTTTATGATGCATTCTACCAACGACTG
		CCGAATCACCAGTGTAGGA
		VIC-CGCTTCCTGAGTCAGCCTCTTCTGAAACG-BHQ1

Πίνακας 5. Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθετών για την ανίχνευση των παθογόνων *S. aureus*, *L. monocytogenes* και *Salmonella* στο γάλα. Από Ding et al., 2017.

Η ειδικότητα και η ευαισθησία των ολιγονουκλεοτιδίων ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας 7 στελέχη *S. aureus*, 6 στελέχη *L. monocytogenes* και 4 στελέχη *Salmonella*, που ανήκαν στα είδη *S. typhimurium*, *S. enterica* και *S. paratyphi* B. Αρχικά απομονώθηκε το DNA καθαρών καλλιιεργειών αυτών των μικροοργανισμών με ένα εμπορικά διαθέσιμο κιτ (TIANamp bacteria DNA kit, Tiangen Biotech, Κίνα) με πέψη με λυσοζύμη και πρωτεΐνάση K για μία και 2 ώρες αντιστοίχως. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις της πολλαπλής RT-PCR, οι οποίες προετοιμάστηκαν σε τελικό όγκο 20 µl με τα παρακάτω συστατικά:

- 2 µL διαλύματος 10x PCR buffer (Invitrogen, Η.Π.Α.),
- 1.2 µL διαλύματος 50 mM MgSO₄ (Invitrogen, Η.Π.Α.),
- 0.5 µL 10 mM μίγματος dNTP (Invitrogen, Η.Π.Α.),
- 0.2 µL διαλύματος πολυμεράσης Taq (5 U/mL) (Invitrogen, Η.Π.Α.),
- 1 µL υποστρώματος DNA,
- 0.5 µL διαλύματος 10 mM εκκινητών
- 0.2 µL διαλύματος 10 mM ιχνηθέτη για κάθε βακτηριακό στέλεχος

Ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμίστηκε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

Βήμα 1: 95°C για 10 min

Βήμα 2: 95°C για 15 s

Βήμα 3: 60°C για 1 min

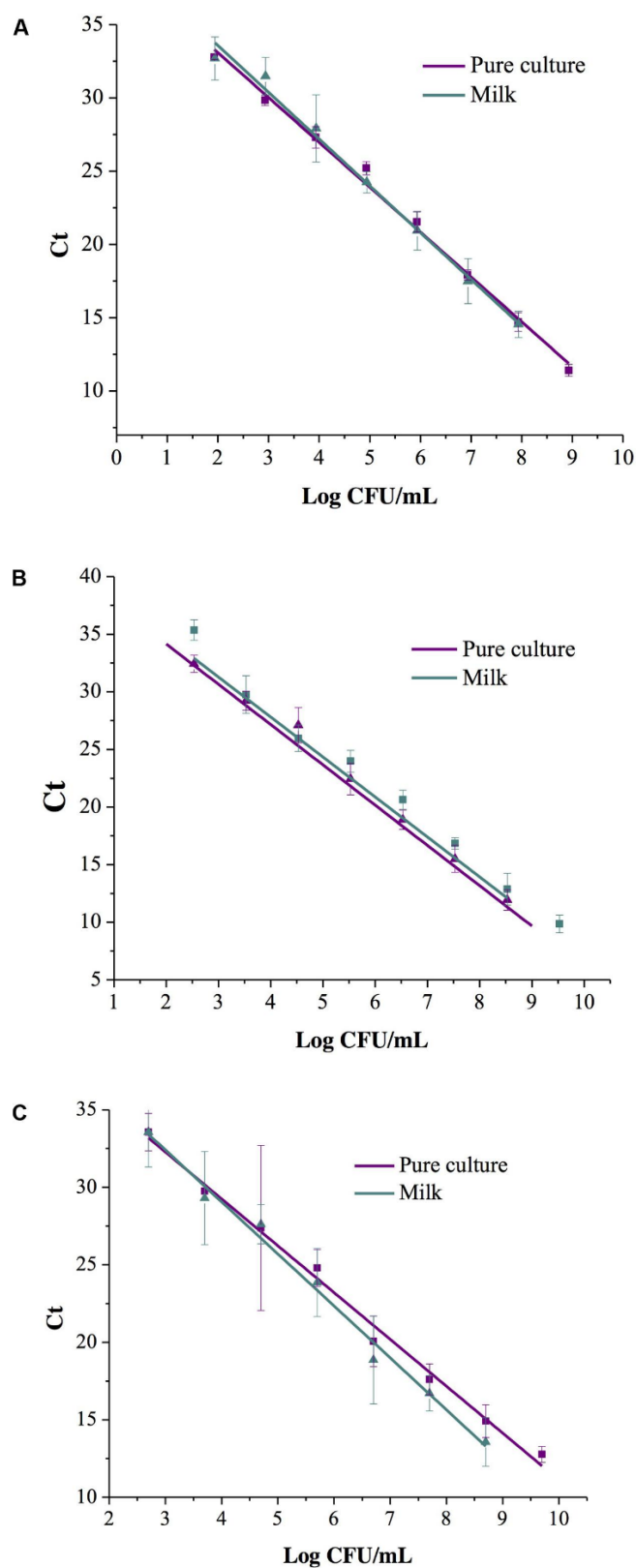
Τα βήματα 2 και 3 επαναλήφθηκαν για 40 κύκλους.

Τα αναμενόμενα προϊόντα ενισχύθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις βακτηριακών στελεχών, ενώ δεν ανιχνεύθηκε σήμα όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το DNA άλλων βακτηρίων, όπως στελέχη των γενών *Campylobacter*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Bacillus* και *Shigella*. Τα πειράματα αυτά απέδειξαν ότι οι συγκεκριμένοι εκκινητές και ιχνηθέτες ήταν ειδικοί ως προς τα εξεταζόμενα παθογόνα.

Η κατασκευή πρότυπων καμπυλών και ο υπολογισμός της αποτελεσματικότητας της πολλαπλής RT-PCR πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις εις τριπλούν, με διαδοχικές αραιώσεις υποστρώματος DNA από καθαρές καλλιέργειες ή τεχνητά μολυσμένο γάλα. Το τεχνητά μολυσμένο γάλα παρασκευάστηκε από μη μολυσμένο γάλα υψηλής παστερίωσης με την προσθήκη καθαρής καλλιέργειας καθενός από τα τρία παθογόνα σε τελική συγκέντρωση 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 και 10^2 CFU/ml. Οι γραφικές παραστάσεις των βακτηριακών συγκεντρώσεων εκφρασμένες ως $\log_{10}(\text{CFU/mL})$ ως προς τις τιμές Ct που προέκυψαν από τις αντιδράσεις RT-PCR είχαν υψηλό βαθμό γραμμικότητας ($R^2 > 0.99$, **Εικόνα 18**). Από τις κλίσεις των πρότυπων καμπυλών υπολογίστηκε στη συνέχεια η απόδοση της ενίσχυσης (E) σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιώντας την εξίσωση: $E = 10^{-1/\text{κλίση}} - 1$ (**Πίνακας 6**).

		<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Καθαρή καλλιέργεια	Κλίση πρότυπης καμπύλης	-3.06	-3.50	-3.02
	Απόδοση ενίσχυσης	112%	95%	114%
Τεχνητά μολυσμένο γάλα	Κλίση πρότυπης καμπύλης	-3.19	-3.47	-3.35
	Απόδοση ενίσχυσης	106%	94%	98%

Πίνακας 6. Κλίση πρότυπων καμπυλών και απόδοση ενίσχυσης των αντιδράσεων RT-PCR. Από Ding et al., 2017.



Εικόνα 18. Πρότυπες καμπύλες της ανίχνευσης των παθογόνων *S. aureus* (A), *L. monocytogenes* (B) και *Salmonella* spp. (C) σε δείγματα καθαρής καλλιέργειας και τεχνητά μολυσμένου γάλακτος με τη μέθοδο της πολλαπλής RT-PCR. Από Ding et al., 2017.

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης των τριών παθογόνων με ανάλυση δειγμάτων τεχνητά μολυσμένου γάλακτος διαφορετικών αραιώσεων με και χωρίς εμπλουτισμό (Πίνακας 7).

	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Χωρίς εμπλουτισμό	100 CFU/ml	100 CFU/ml	100 CFU/ml
Με εμπλουτισμό	12 CFU/25 ml	14 CFU/25 ml	10 CFU/25 ml

Πίνακας 7. Όρια ανίχνευσης παθογόνων γάλακτος με και χωρίς προηγούμενο εμπλουτισμό του δείγματος. Από Ding et al., 2017.

Τέλος, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης των συγκεκριμένων παθογόνων μέσω πολλαπλής RT-PCR με εμπλουτισμό του δείγματος και μέσω της πρότυπης μεθόδου καλλιέργειας σε θρεπτικό υπόστρωμα (ISO 11290-02, 1998 και ISO6579, 2002). Τα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν 15 δείγματα μη μολυσμένου γάλακτος, 7 δείγματα γάλακτος από ζώα που έπασχαν από μαστίτιδα και 6 δείγματα από νερό, χώμα, κόπρανα και ζωοτροφές από διάφορες κτηνοτροφικές μονάδες. Η συγκριτική ανάλυση έδειξε ότι οι δύο μέθοδοι κατέληξαν σε σχεδόν ταυτόσημα αποτελέσματα (Πίνακας 8).

Είδος δείγματος	Θετικά/ολικά δείγματα		<i>S. aureus</i> (PCR/καλλιέργεια)			<i>L. monocytogenes</i> (PCR/καλλιέργεια)			<i>Salmonella</i> spp. (PCR/καλλιέργεια)		
	PCR	Καλλιέργεια	+/+	+/-	-/+	+/+	+/-	-/+	+/+	+/-	-/+
Γάλα	5/15	5/15	4	0	0	1	0	0	0	0	0
Γάλα*	4/7	4/7	3	0	0	1	0	0	0	0	0
Κόπρανα	3/6	3/6	2	0	0	1	0	0	0	0	0
Χώμα	0/6	0/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Τροφές	3/6	2/6	1	1	0	1	0	0	0	0	0
Νερό	0/6	0/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Γάλα από ζώα με μαστίτιδα

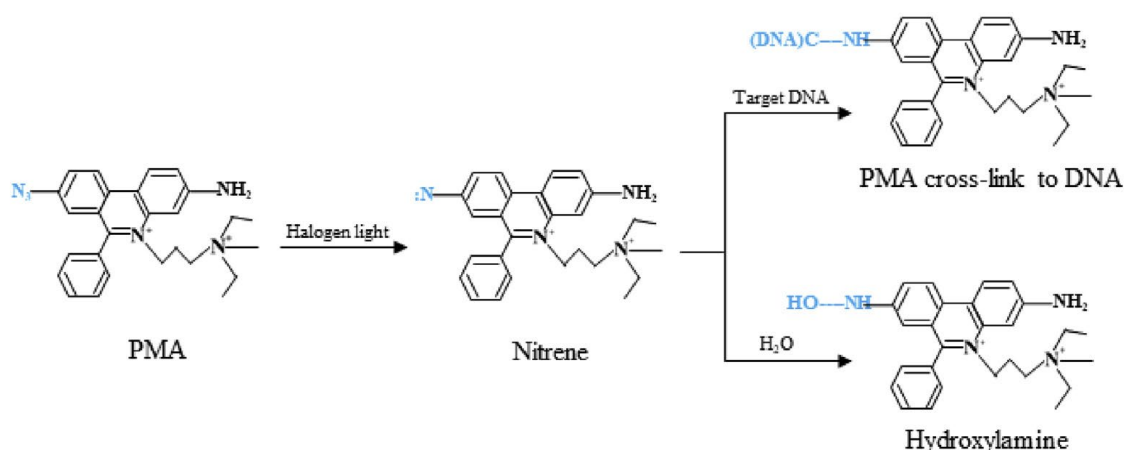
Πίνακας 8. Αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης ανίχνευσης των τριών παθογόνων μέσω RT-PCR και καλλιέργειας σε θρεπτικό υπόστρωμα. Από Ding et al., 2017.

Από τα παραπάνω τεκμηριώθηκε η ειδικότητα, η αποτελεσματικότητα και το χαμηλό όριο ανίχνευσης της μεθόδου έπειτα από εμπλουτισμό του δείγματος. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι η ανίχνευση των παθογόνων μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου δεν κάνει διάκριση μεταξύ των ζώντων κυττάρων και των αναπαραγωγικά μη ενεργών, με κίνδυνο να γίνεται υπερεκτίμηση του μικροβιακού φορτίου. Παρόλα αυτά, ο εμπλουτισμός του δείγματος με επώαση ευνοεί την ποσοτικοποίηση των ζωντανών κυττάρων μειώνοντας το ποσοστό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

Ανίχνευση των ζωντανών κυττάρων των παθογόνων *L. monocytogenes*, *C. sakazakii*, *S. aureus* και *Salmonella* με συνδυασμό μονοαζιδίου του προπιδίου και πολλαπλής RT-PCR

Η μέθοδος της πολλαπλής RT-PCR επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση παθογόνων με εξειδίκευση, ταχύτητα και ακρίβεια. Παρόλα αυτά, η μεθοδολογία που έχει περιγραφεί στην προηγούμενη μελέτη δεν επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ ζωντανών και μεταβολικά ανενεργών κυττάρων, η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν πρόκειται για παθογόνα τροφίμων. Οι Qin et al. (2020) ανέπτυξαν μια μέθοδο βασισμένη στην πολλαπλή RT-PCR, η οποία ανιχνεύει τα ζωντανά κύτταρα των παθογόνων *L. monocytogenes*, *C. sakazakii*, *S. aureus* και *Salmonella* spp. στο γάλα, με χρήση θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS) και μονοαζιδίου του προπιδίου (PMA).

Το PMA είναι μια φωτοευαίσθητη χρωστική, η οποία ενεργοποιείται με έκθεση σε φως και μετατρέπεται σε νιτρένιο (Εικόνα 19). Το νιτρένιο έχει υψηλή συγγένεια με τα νουκλεϊκά οξέα και εισχωρεί επιλεκτικά στα νεκρά κύτταρα μέσω της διάτρητης μεμβράνης τους. Το σύμπλοκο PMA-DNA σχηματίζει μια χημική ρίζα, η οποία εμποδίζει την ενίσχυση μέσω PCR και συνεπώς ενισχύεται μόνο το DNA από κύτταρα που έχουν άθικτες μεμβράνες. Απουσία DNA, το νιτρένιο σχηματίζει μια υδροξυλαμίνη. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η ανίχνευση αποκλειστικά των ζωντανών κυττάρων το PMA χρησιμοποιείται παράλληλα με SDS, ένα ανιονικό απορρυπαντικό που αυξάνει τη διαπερατότητα των νεκρών κυττάρων στο PMA, χωρίς να επηρεάζει τα ζωντανά κύτταρα.



Εικόνα 19. Χημική δομή της χρωστικής PMA. Από Qin et al., 2020.

Προκειμένου να γίνει ανίχνευση των παθογόνων *L. monocytogenes*, *C. sakazakii*, *S. aureus* και *Salmonella* spp., οι Qin et al. (2020) χρησιμοποίησαν ένα εμπορικά διαθέσιμο κιτ απομόνωσης DNA (TIANamp Bacteria DNA Kit, Tiangen Biotech, Κίνα) και τους εκκινητές και ιχνηθέτες

που αναγράφονται στον **Πίνακα 9**. Η ειδικότητα των ολιγονουκλεοτιδίων ελέγχθηκε με αντιδράσεις πολλαπλής RT-PCR με υπόστρωμα DNA από καθαρές καλλιέργειες των αντίστοιχων βακτηριακών στελεχών. Ως στελέχη αρνητικού ελέγχου, στα οποία δεν ανιχνεύθηκε σήμα με την πολλαπλή RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια *E. coli*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* (**Πίνακας 10**). Τα πειράματα αυτά έγιναν σε τρεις επαναλήψεις.

Παθογόνο	Γονίδιο	Εκκινητές/ιχνηθέτες (5' - 3')
<i>Salmonella</i> spp.	<i>fimY</i>	GCGGCGTTGGAGAGTGATA AGCAATGGAAAAAGCAGGATG FAM-CATTTCTTAAACGGCGGTGTCTTTCCCT-BHQ1
<i>S. aureus</i>	<i>gltS</i>	TTCTTCACGACTAAATAACGCTCA GGTACTACTAAAGATTATCAAGACGGCT HEX-CAGAACACAATGTTTCCGATGCAACGT-BHQ1
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	CTGAATCTCAAGCAAAACCTGGT CGCGACCGAAGCCAACTA CY5-ATACGATAACATCCACGGCTCTGGCTGG-BHQ2
<i>C. sakazakii</i>	<i>MMS</i>	GGGATATTGTCCCCTGAAACAG CGAGAATAAGCCGCGCATT Texas red-AGAGTAGTAGTTGTAGAGGCCGTGCTTCCGAAAG-BHQ2

Πίνακας 9. Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθετών για την ανίχνευση των παθογόνων *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes* και *C. sakazakii* στο γάλα. Από Qin et al., 2020.

Βακτήριο	Αντίδραση πολλαπλής RT-PCR			
	<i>fimY</i>	<i>gltS</i>	<i>hlyA</i>	<i>MMS</i>
<i>Salmonella Typhimurium</i>	+	-	-	-
<i>Salmonella paratyphi B</i>	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	+	-
<i>Cronobacter sakazakii</i>	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-

Πίνακας 10. Βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ειδικότητας της πολλαπλής RT-PCR. Από Qin et al., 2020.

Οι αντιδράσεις της πολλαπλής RT-PCR προετοιμάστηκαν σε τελικό όγκο 50 μl με τα παρακάτω συστατικά:

- 25 μL διαλύματος 2x TaqMan Fast qPCR master mix (Sangon Biotech),
- 2 μL υποστρώματος DNA,
- 0.7/0.8/0.8/3.6 μL διαλύματος 50 μM εκκινήτων για τα γονίδια *gltS*, *fimY*,
hlyA και *MMS* αντιστοίχως και
- 0.5 μL διαλύματος 10 μM ιχνηθέτη για κάθε βακτηριακό στέλεχος.

Ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμίστηκε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

Βήμα 1: 94°C για 3 min

Βήμα 2: 94°C για 5 s

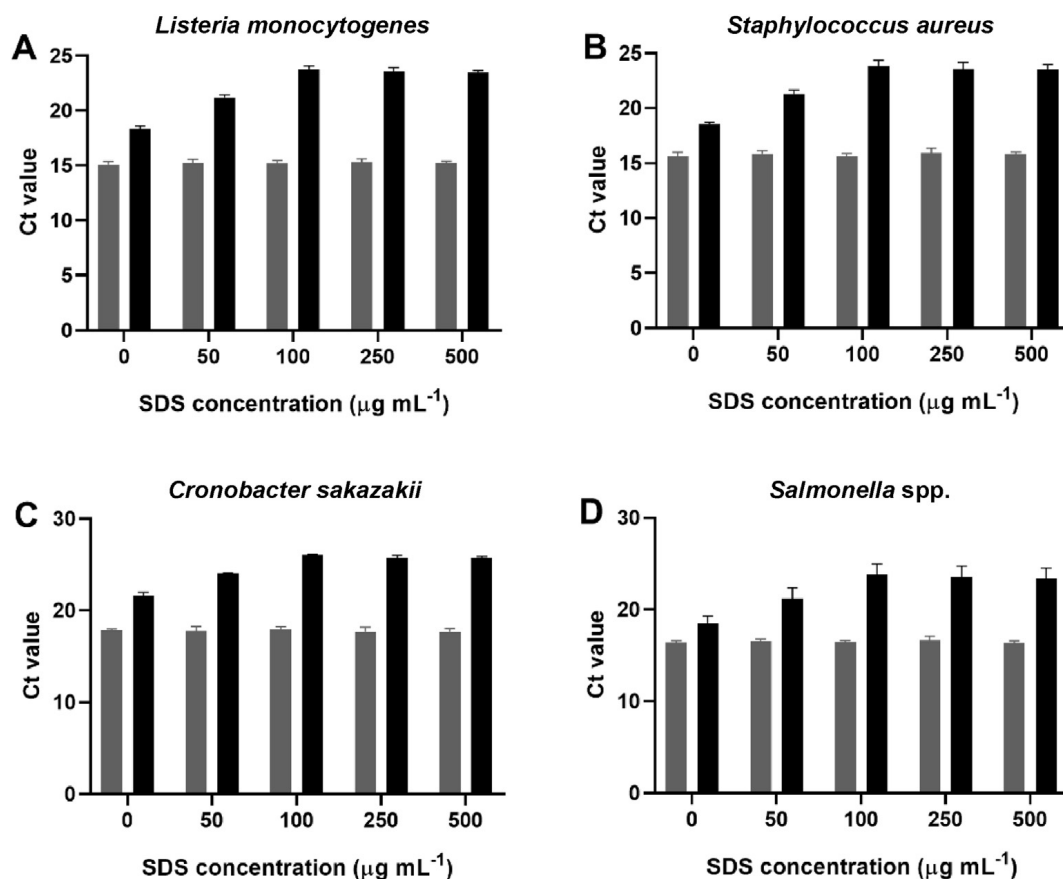
Βήμα 3: 60°C για 30 s

Τα βήματα 2 και 3 επαναλήφθηκαν για 40 κύκλους.

Προκειμένου να γίνει η προετοιμασία των ζωντανών και των νεκρών βακτηριακών κυττάρων για την εκτέλεση των πειραμάτων, έγινε διαχωρισμός υγρών καλλιιεργειών των υπό μελέτη βακτηρίων σε δύο μέρη, όταν αυτές έφτασαν σε συγκέντρωση 10^7 cfu/mL. Το ένα μέρος χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ζωντανών κυττάρων, ενώ το άλλο μέρος θερμάνθηκε στους 60° C για 5 λεπτά ή στους 55° C για 10 λεπτά (στην περίπτωση του *S. typhimurium*) και χρησίμευσε ως δείγμα νεκρών κυττάρων. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ζωντανών κυττάρων σε κάθε περίπτωση έγινε με ανάπτυξη σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB για 24 ώρες σε 37° C.

Πριν την αξιολόγηση της μεθόδου, οι ερευνητές αναζήτησαν τη βέλτιστη συγκέντρωση του απορρυπαντικού SDS για την ανίχνευση των ζωντανών κυττάρων παθογόνων. Για το σκοπό αυτό έγιναν πειράματα πολλαπλής RT-PCR με διαφορετικές συγκεντρώσεις SDS και υπόστρωμα DNA από ζωντανά ή νεκρά κύτταρα και για τα 4 είδη βακτηρίων. Προκειμένου να γίνει η κατεργασία των κυττάρων με SDS πριν την εξαγωγή DNA, το εναιώρημα των κυττάρων επωζόταν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C παρουσία SDS σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0-500 $\mu\text{g/mL}$. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι δεν υπήρχε σημαντική μεταβολή στις τιμές Ct όταν το υπόστρωμα των αντιδράσεων προερχόταν από ζωντανά κύτταρα (Εικόνα 20). Αντιθέτως, οι τιμές Ct των πειραμάτων με υπόστρωμα DNA νεκρών κυττάρων αυξάνονταν με αύξηση της συγκέντρωσης SDS από 0 έως 100 $\mu\text{g/mL}$ και μετά παρέμεναν σταθερές σε συγκεντρώσεις 100-500 $\mu\text{g/mL}$. Η διακύμανση της τιμής Ct

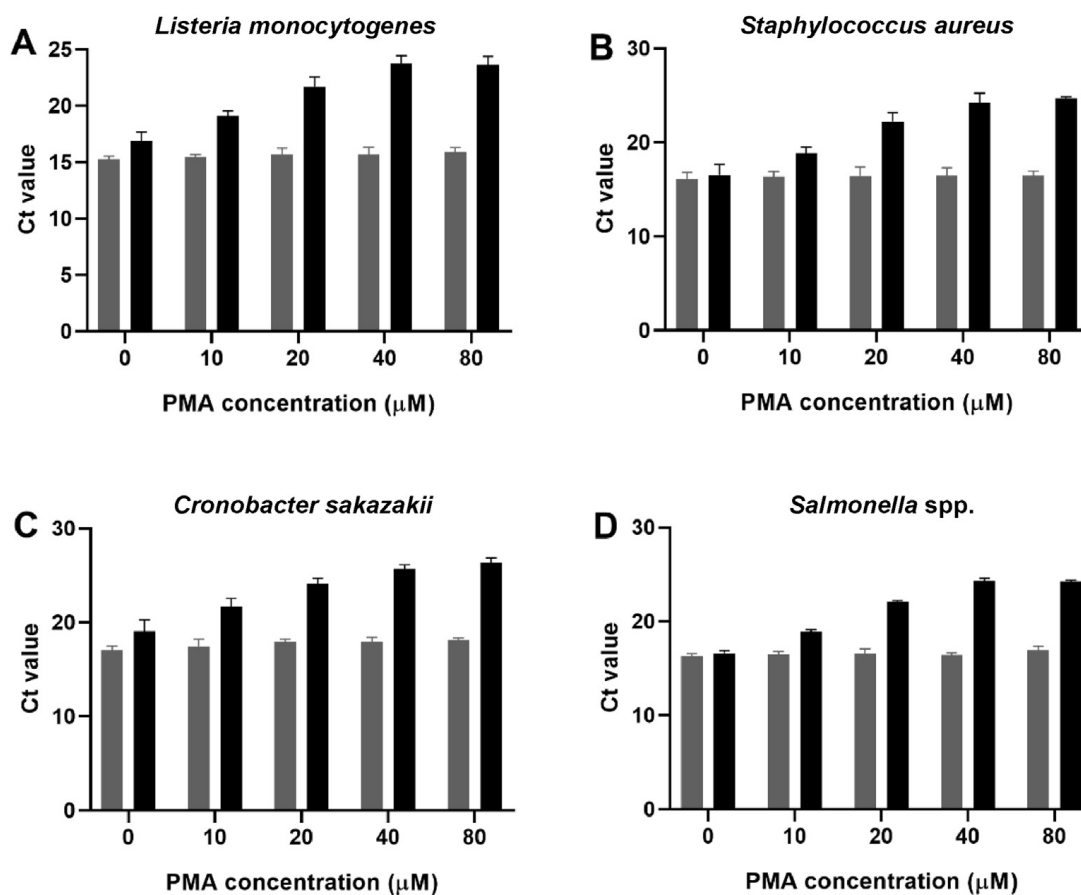
που παρατηρήθηκε ήταν τέτοια που υπέδειξε ότι η συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/mL}$ SDS επέτρεπε την βέλτιστη ανίχνευση των ζωντανών κυττάρων και των τεσσάρων ειδών βακτηρίων με τη μικρότερη παρεμβολή από την παρουσία νεκρών κυττάρων.



Εικόνα 20. Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS) για την ανίχνευση των βακτηρίων *L. monocytogenes* (A), *S. aureus* (B), *C. sakazakii* (C) και *Salmonella spp.* (D). Κάθε στήλη (γκρι: ζωντανά κύτταρα, μαύρη: νεκρά κύτταρα) αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή Ct των πειραμάτων πολλαπλής RT-PCR. Οι γραμμές σφάλματος παρουσιάζουν την τυπική απόκλιση. Από Qin et al., 2020.

Με την ίδια μεθοδολογία έγινε ο προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης PMA. Η κατεργασία των κυττάρων με PMA έγινε σε κάθε περίπτωση μετά την επώαση με SDS, με προσθήκη PMA σε εναιωρήματα κυττάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 10, 20, 40 και 80 μM). Η επώαση με PMA έγινε στο σκοτάδι για 20 λεπτά με περιοδική ανάδευση και στη συνέχεια τα κυτταρικά εναιωρήματα εκτέθηκαν σε λάμπα αλογόνου 500 W σε απόσταση 20 cm για 10 λεπτά πάνω σε πάγο. Τέλος, η απομάκρυνση των αδέσμευτων μορίων PMA μετά την κατεργασία έγινε με ξέπλυμα των κυττάρων με ισοτονικό διάλυμα PBS και στη συνέχεια

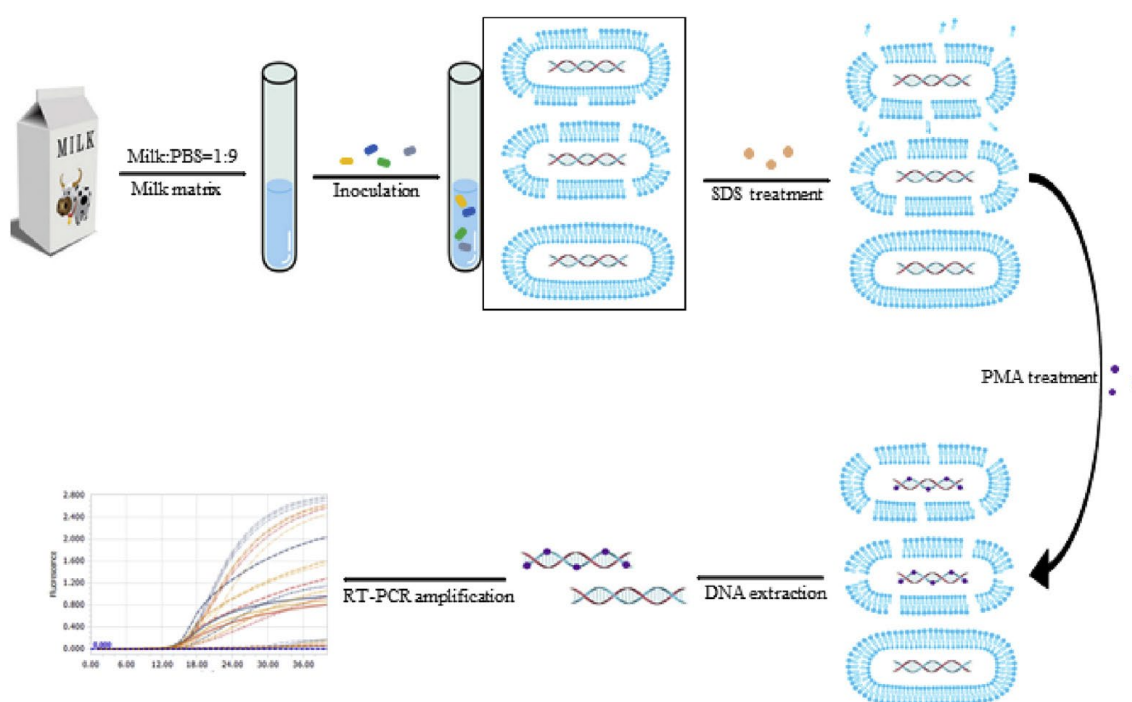
έγινε εξαγωγή DNA και ανίχνευση των παθογόνων με τη μέθοδο της πολλαπλής RT-PCR. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης PMA έδειξαν ότι οι τιμές Ct ήταν ανεξάρτητες της συγκέντρωσης PMA όταν χρησιμοποιήθηκε DNA από ζωντανά κύτταρα και για τα τέσσερα είδη παθογόνων (Εικόνα 21). Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα DNA από νεκρά κύτταρα, η τιμές Ct αυξάνονταν μέχρι τη συγκέντρωση 40 μM και παρέμεναν σταθερές όταν χρησιμοποιήθηκε ακόμα υψηλότερη συγκέντρωση PMA (80 μM). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές επιλέχθηκε η συγκέντρωση 40 μM για την ανίχνευση των ζωντανών κυττάρων των τεσσάρων παθογόνων.



Εικόνα 21. Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του μονοαζιδίου του προπιδίου (PMA) για την ανίχνευση των βακτηρίων *L. monocytogenes* (A), *S. aureus* (B), *C. sakazakii* (C) και *Salmonella* spp. (D). Κάθε στήλη (γκρι: ζωντανά κύτταρα, μαύρη: νεκρά κύτταρα) αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή Ct των πειραμάτων πολλαπλής RT-PCR. Οι γραμμές σφάλματος παρουσιάζουν την τυπική απόκλιση. Από Qin et al., 2020.

Στη συνέχεια, οι ερευνητές κατασκεύασαν πρότυπες καμπύλες της τιμής Ct ως προς τη συγκέντρωση των βακτηρίων υπό μελέτη, προκειμένου να βρεθεί το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Το DNA που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα αυτά προερχόταν είτε από καθαρές

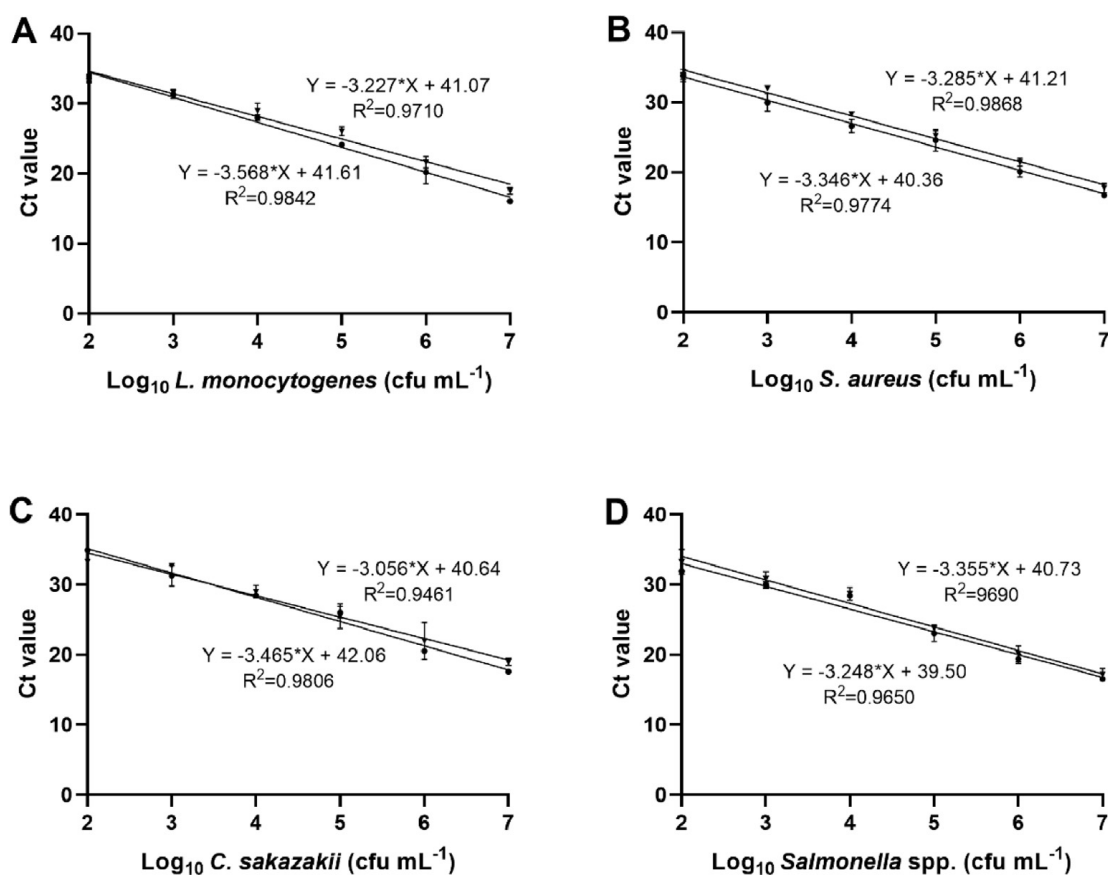
καλλιέργειες των βακτηρίων, οι οποίες στη συνέχεια αραιώθηκαν στις επιθυμητές συγκεντρώσεις (10^7 έως 10^1 cfu/mL), είτε από δείγματα τεχνητά μολυσμένου γάλακτος. Τα δείγματα τεχνητά μολυσμένου γάλακτος προήλθαν από γάλα υψηλής θερμικής επεξεργασίας, αρνητικό για παθογόνα, το οποίο αραιώθηκε με ισοτονικό διάλυμα PBS σε αναλογία 1:9 και στη συνέχεια εμβολιάστηκε με κύτταρα των υπό μελέτη παθογόνων σε συγκεντρώσεις 10^7 έως 10^1 cfu/mL (Εικόνα 22). Ακολούθησε η κατεργασία με SDS και PMA στις βέλτιστες συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν, έγινε απομόνωση DNA από 1 ml εναιωρήματος και στη συνέχεια ανίχνευση των παθογόνων με τη μέθοδο πολλαπλής RT-PCR εις τριπλούν.



Εικόνα 22. Στάδια της μεθόδου ανίχνευσης των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. sakazakii* και *Salmonella* spp. σε δείγματα τεχνητά μολυσμένου γάλακτος με χρήση SDS, PMA και πολλαπλής RT-PCR.

Από Qin et al., 2020.

Οι πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν με αυτά τα πειράματα έδειξαν την καλή γραμμικότητα μεταξύ των τιμών Ct και της συγκέντρωσης των ζωντανών κυττάρων των παθογόνων σε όλες τις περιπτώσεις (Εικόνα 23). Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου προσδιορίστηκε στα 10^2 cfu/mL τόσο στα δείγματα από καθαρές καλλιέργειες, όσο και στα δείγματα από τεχνητά μολυσμένο γάλα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αποκλίσεις ανάλογα με την προέλευση του DNA. Τα αποτελέσματα αυτά απέδειξαν ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί στην ανίχνευση των παθογόνων *L. monocytogenes*, *C. sakazakii*, *S. aureus* και *Salmonella* spp. ως μέθοδος ελέγχου δειγμάτων γάλακτος.

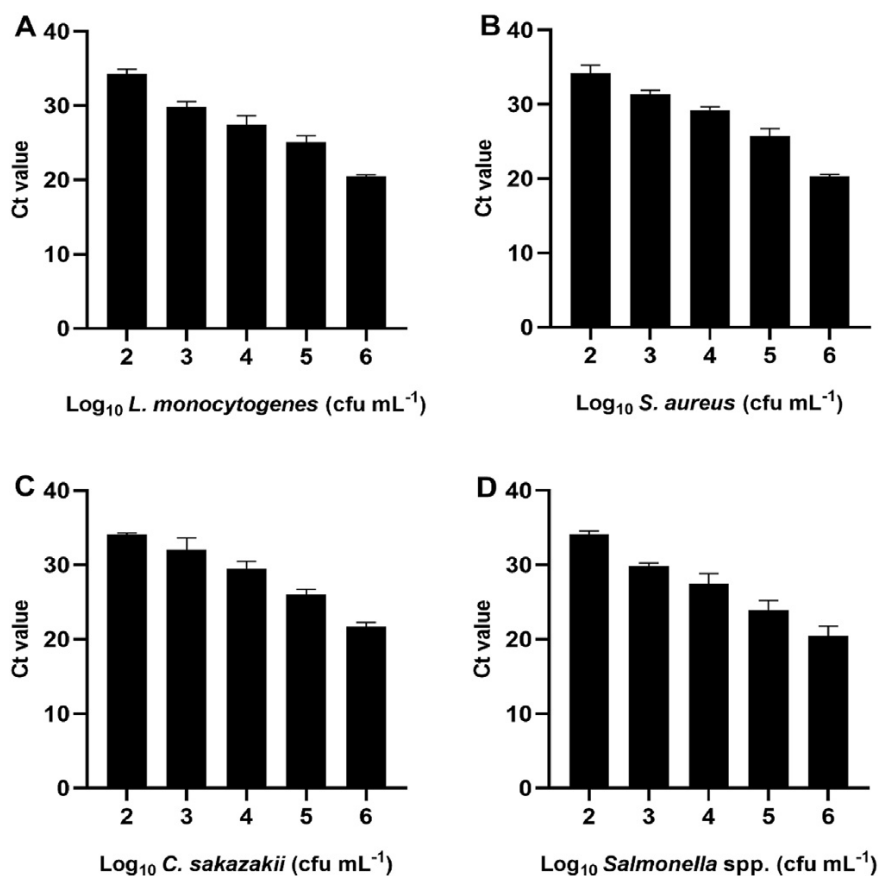


Εικόνα 23. Πρότυπες καμπύλες της μεθόδου SDS-PMA- πολλαπλής RT-PCR για την ανίχνευση των βακτηρίων *L. monocytogenes* (A), *S. aureus* (B), *C. sakazakii* (C) και *Salmonella* spp. (D). Οι μέσοι όροι των τιμών Ct των δειγμάτων από καθαρές καλλιέργειες και από τεχνητά μολυσμένο γάλα αναπαριστώνται με κύκλο και τρίγωνο αντίστοιχα. Από Qin et al., 2020.

Τα ίδια όρια ανίχνευσης των τεσσάρων παθογόνων παρατηρήθηκαν όταν εμπλουτίστηκε το γάλα με κύτταρα *E. coli*, που δεν αποτελεί στόχο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου (Εικόνα 24). Το αποτέλεσμα αυτό απέδειξε την ειδικότητα της μεθόδου και τη δυνατότητα εφαρμογής της παρουσία άλλων βακτηρίων.

Τέλος, έγινε σύγκριση της μεθόδου ανίχνευσης που βασίζεται στην αντίδραση πολλαπλής RT-PCR με την καταμέτρηση αποικιών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που αποκλείει τα νεκρά κύτταρα από το τελικό αποτέλεσμα. Παράλληλα, εξετάστηκε η επίδραση της χρωστικής PMA και του απορρυπαντικού SDS στον αποκλεισμό των νεκρών κυττάρων από την ανίχνευση των παθογόνων μέσω πολλαπλής RT-PCR. Για τη σύγκριση αυτή, παρασκευάστηκαν υγρές

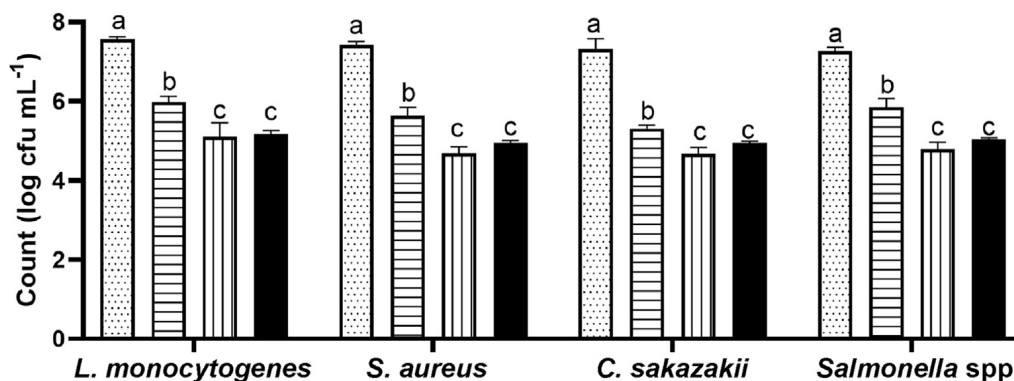
καλλιέργειες των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. sakazakii* και *Salmonella* spp. με συγκέντρωση 10^7 cfu/mL και υποβλήθηκαν στη διαδικασία νέκρωσης των κυττάρων, όπως



Εικόνα 24. Εφαρμογή της μεθόδου SDS-PMA-πολλαπλής RT-PCR για την ανίχνευση των βακτηρίων *L. monocytogenes* (A), *S. aureus* (B), *C. sakazakii* (C) και *Salmonella* spp. (D) παρουσία κυττάρων *E. coli*. Κάθε στήλη αναπαριστά το μέσο όρο των τιμών Ct των αντίστοιχων δειγμάτων. Από Qin et al., 2020.

αυτή αναφέρεται παραπάνω. Κάθε καλλιέργεια χωρίστηκε σε τέσσερα μέρη. Στο ένα μέρος έγινε καταμέτρηση των κυττάρων με ανάπτυξη αποικιών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και στα άλλα τρία μέρη έγινε ανίχνευση των παθογόνων μέσω της πολλαπλής RT-PCR χωρίς επιπλέον κατεργασία, με προσθήκη PMA και με συνδυασμό PMA και SDS. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 25**, ο αριθμός των βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν μέσω της πολλαπλής RT-PCR ήταν υψηλότερος από αυτά που ανιχνεύθηκαν με τις άλλες μεθόδους και ελαττώθηκε όταν προστέθηκε στο πρωτόκολλο η κατεργασία με PMA που αποκλείει το DNA των νεκρών βακτηρίων από την ανίχνευση. Η προσθήκη του SDS στη διαδικασία μείωσε περαιτέρω τον αριθμό των κυττάρων που ανιχνεύονταν, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των κυττάρων που καταμετρήθηκαν ως αποικίες σε στερεό θρεπτικό μέσο και

των κυττάρων που ποσοτικοποιήθηκαν με τον συνδυασμό SDS-PMA-πολλαπλής RT-PCR. Η παρατήρηση αυτή πιθανότατα οφείλεται στην αποτελεσματικότητα της δράσης των αντιδραστηρίων SDS και PMA, τα οποία σε συνδυασμό επιτρέπουν την ανίχνευση σχεδόν αποκλειστικά των ζωντανών κυττάρων.



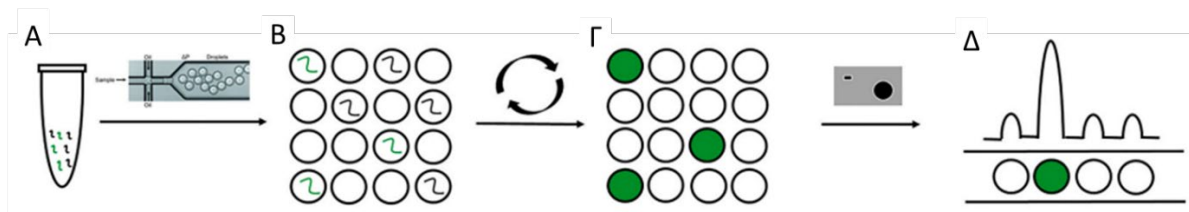
Εικόνα 25. Σύγκριση της μεθόδου των Qin et al. (2020) με την καταμέτρηση αποικιών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Ποσοτικοποίηση των βακτηρίων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. sakazakii* και *Salmonella* spp. με εφαρμογή της μεθόδου της πολλαπλής RT-PCR (πρώτη στήλη), της πολλαπλής RT-PCR με χρήση PMA (δεύτερη στήλη), της πολλαπλής RT-PCR με χρήση SDS και PMA (τρίτη στήλη) και μέσω καταμέτρησης των αποικιών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (τέταρτη στήλη). Οι στήλες που φέρουν το ίδιο γράμμα στην κορυφή δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P > 0.05$). Από Qin et al., 2020.

Το σύνολο των παραπάνω αποτελεσμάτων κατέδειξαν ότι η χρήση SDS σε συνδυασμό με τη χρωστική PMA πριν την πραγματοποίηση αντιδράσεων πολλαπλής RT-PCR αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο ταυτόχρονης ανίχνευσης των ζωντανών παθογόνων *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. sakazakii* και *Salmonella* spp. στο γάλα.

4.2.4 Ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σταγόνας

Η τρίτη γενιά αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης, μετά τις μεθόδους PCR, RT-PCR και των παραλλαγών τους, περιλαμβάνει την ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (digital PCR: dPCR), η οποία εμφανίστηκε μετά το 1990. Η dPCR και ειδικότερα η ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σταγόνας (ddPCR) έχει χρησιμοποιηθεί μεταξύ άλλων και για την ανίχνευση παθογόνων τροφίμων λόγω των πλεονεκτημάτων που διαθέτει. Η ddPCR βασίζεται στο διαχωρισμό του δείγματος σε περίπου 20.000 σταγονίδια, καθένα από τα οποία περιλαμβάνει ένα ή κανένα μόριο του υπό ανίχνευση υποστρώματος. Κάθε σταγονίδιο λειτουργεί ως ανεξάρτητος μικροαντιδραστήρας, στον οποίο πραγματοποιείται αντίδραση PCR. Εφόσον υπάρχει μόριο υποστρώματος, μετά την PCR παράγεται φθορίζον προϊόν. Με

βάση την ποσότητα του φθορισμού που ανιχνεύεται και χρησιμοποιώντας την κατανομή Poisson υπολογίζεται η απόλυτη ποσότητα του αρχικού υποστρώματος χωρίς τη χρήση πρότυπης καμπύλης (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου της ψηφιακής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σταγονίας. Α) Προετοιμασία του μίγματος της αντίδρασης. Β) Διαχωρισμός της αντίδρασης σε σταγονίδια που περιέχουν ένα ή κανένα μόρια υποστρώματος. Γ) Ενίσχυση των μορίων του υποστρώματος. Δ) Ανίχνευση του παραγόμενου φθορισμού και ποσοτικοποίηση του δείγματος. Από Lei et al., 2021.

Λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας της μεθόδου, η ddPCR έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό παθογόνων του γάλακτος, όπως στην περίπτωση του βακτηρίου *B. cereus* (Porcellato et al., 2016) και του βακτηρίου *Coxiella burnetti* (Basanisi et al., 2022). Επίσης, οι Fang et al. (2023) ανέπτυξαν μια μέθοδο τριπλής ddPCR, με την οποία ανίχνευσαν το παθογόνο *Salmonella* και δύο από τους πιο συχνούς υποτύπους του (*Enteritidis* και *Typhimurium*) σε διάφορα τρόφιμα, μεταξύ των οποίων και σε δείγματα γάλακτος. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου υπολογίστηκε σε 5 fg/μl γενωμικού DNA ή 10 CFU/ml καθαρής καλλιέργειας, πολύ χαμηλότερο από το αντίστοιχο όριο με RT-PCR.

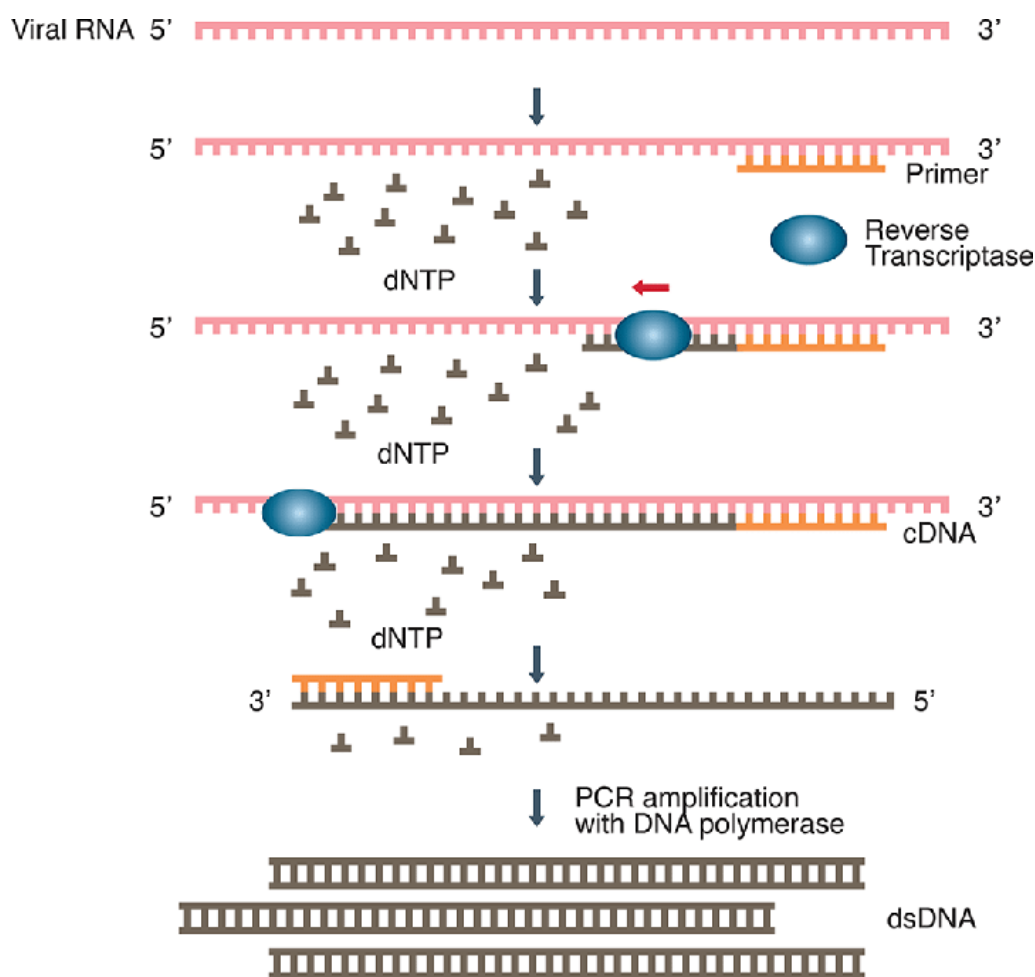
Παρά τα σαφή πλεονεκτήματά της, η ddPCR δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως μέθοδος ευρείας χρήσης λόγω του υψηλού κόστους και του εξειδικευμένου προσωπικού που απαιτεί. Επιπλέον, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας της μεθόδου, τα πυκνά δείγματα δεν μπορούν να ποσοτικοποιηθούν χωρίς προηγούμενη αραίωση.

4.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης συζευγμένη με αντίστροφη μεταγραφή

Η PCR χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα μόρια DNA και συνεπώς δεν μπορεί να διακρίνει την ύπαρξη κυττάρων που είναι νεκρά ή σε λανθάνουσα φάση από βιοχημικά ενεργά κύτταρα. Παράλληλα, παθογόνοι RNA ιοί δεν μπορούν να ανιχνευτούν με την απλή PCR χωρίς προηγούμενη προεπεξεργασία. Η μετατροπή μορίων RNA σε DNA με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και η επακόλουθη ανίχνευσή τους με PCR ή RT-PCR δίνει λύση σε

αυτά τα προβλήματα, αν και η χρήση της μεθόδου είναι σχετικά περιορισμένη λόγω των τεχνικών δυσκολιών στην απομόνωση RNA.

Κατά το πρώτο στάδιο της μεθόδου, γίνεται απομόνωση μορίων RNA, είτε ιικών, είτε μορίων mRNA προκειμένου να εξεταστεί η ύπαρξη βιοχημικά ενεργού παθογόνου. Τα μόρια DNA απομακρύνονται από το δείγμα με κατεργασία με μια νουκλεάση, προκειμένου να μην επηρεάσουν την τελική ανίχνευση. Στη συνέχεια, το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση καταλύει το σχηματισμό μονόκλωνου DNA σύμφωνα με τους κανόνες της συμπληρωματικότητας έχοντας ως υπόστρωμα το RNA. Το RNA απομακρύνεται είτε με θέρμανση είτε με προσθήκη αποδιατακτικών παραγόντων και το μονόκλωνο DNA χρησιμεύει ως μήτρα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας από την DNA πολυμεράση. Η αλληλουχία αυτών των αντιδράσεων μετατρέπει το αρχικό RNA σε δίκλωνο DNA, το οποίο πλέον μπορεί να ανιχνευτεί με PCR ή RT-PCR (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Σχηματική απεικόνιση της συζευγμένης με αντίστροφη μεταγραφής PCR. Από Carter et al., 2020.

Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ιού TBEV που προκαλεί εγκεφαλίτιδα στους ανθρώπους (Hennechart-Collette et al., 2022), καθώς και σε περιπτώσεις άλλων RNA ιών του γάλακτος που ευθύνονται για ζωνοδούς. Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί η ανίχνευση ζώντων παθογόνων στο γάλα όπως *Salmonella* (Bai et al., 2019), *Listeria* (Yan et al., 2009) και βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Choi & Lee, 2011) με συνδυασμό αντίστροφης μεταγραφής και PCR.

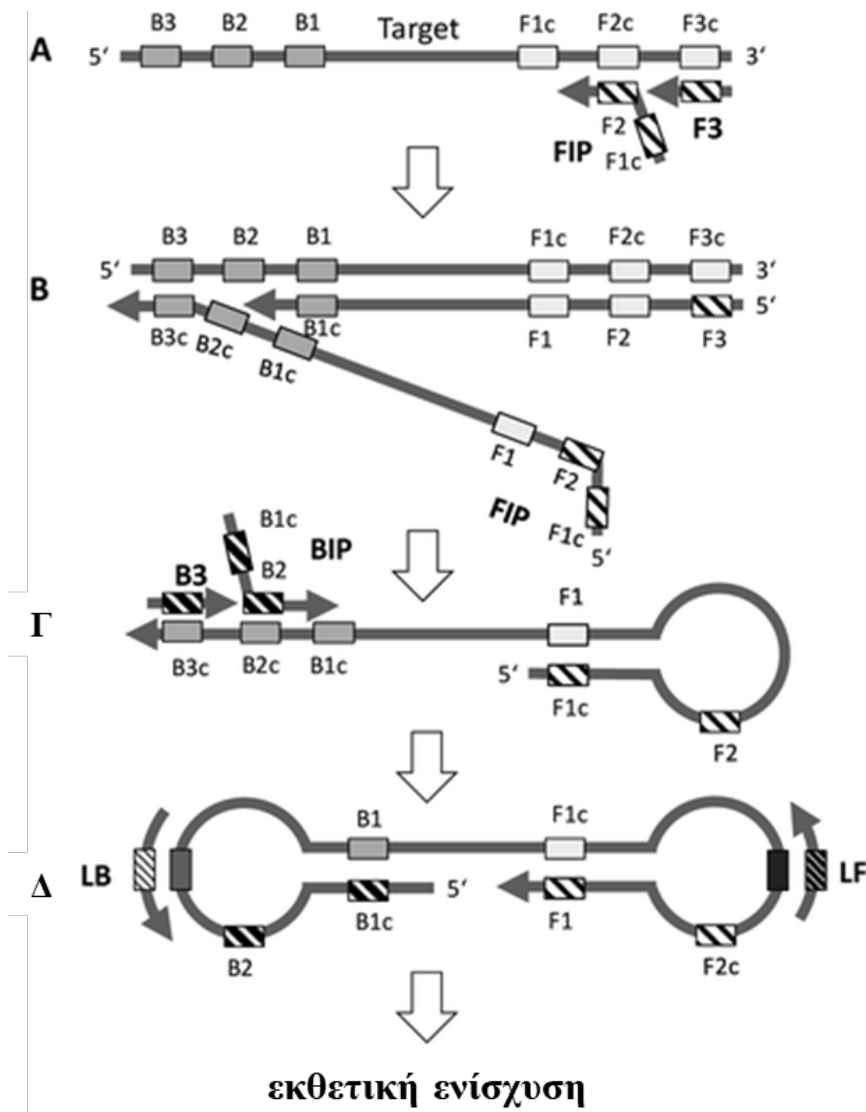
4.3 Ισοθερμικές μέθοδοι ενίσχυσης γενετικών τύπων

4.3.1 Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχων

Η ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχων (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) εφευρέθηκε από τους Notomi et al. (2000) και αποτελεί μια μέθοδο ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων που χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και ταχύτητα. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση 4-6 κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών, που αναγνωρίζουν 6-8 περιοχές του DNA στόχου. Η αντίδραση γίνεται σε σταθερή θερμοκρασία, χωρίς να απαιτείται η ύπαρξη θερμοκυκλοποιητή και ολοκληρώνεται σε λιγότερο από μία ώρα, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα εύκολη στην εφαρμογή ακόμα και σε συνθήκες εκτός εργαστηρίου (Becherer et al., 2020).

Η αντίδραση LAMP προϋποθέτει την ύπαρξη δύο εξωτερικών εκκινητών (F3 και B3), δύο εσωτερικών εκκινητών (FIP και BIP) και μιας DNA πολυμεράσης που να είναι ικανή να εκτοπίζει νουκλεοτιδικές αλυσίδες. Συνηθέστερα χρησιμοποιείται η πολυμεράση Bst. Η ενίσχυση μπορεί να επιταχυνθεί με τη χρήση δύο επιπλέον εκκινητών, των εκκινητών των βρόγχων (LF και LB). Οι εσωτερικοί εκκινητές είναι μεγαλύτεροι σε μήκος (45-49 νουκλεοτίδια) και βρίσκονται σε υψηλότερη συγκέντρωση στο μίγμα της αντίδρασης από ότι οι εξωτερικοί εκκινητές. Κατά την αρχική φάση της αντίδρασης, η δράση της πολυμεράσης οδηγεί στο σχηματισμό μορίων με μορφή αλτήρα, τα οποία λειτουργούν ως υπόστρωμα για τη δεύτερη φάση της αντίδρασης, κατά την οποία γίνεται εκθετική ενίσχυση των μορίων αυτών. Αναλυτικότερα, στο πρώτο βήμα της διαδικασίας, ο εσωτερικός εκκινητής FIP υβριδοποιείται στην αλληλουχία-στόχο και αρχίζει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας (**Εικόνα 28Α**). Ταυτόχρονα, ο εξωτερικός εκκινητής F3 υβριδοποιείται κι αυτός και ο πολυμερισμός στο 3' άκρο του εκτοπίζει την αλυσίδα του εκκινητή FIP (**Εικόνα 28Β**). Με τον τρόπο αυτό απελευθερώνεται μία μονόκλωνη αλυσίδα DNA που χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τους οπίσθιους εκκινητές BIP και B3 (**Εικόνα 28Γ**). Καθώς τα δύο άκρα του μορίου που

σχηματίζεται είναι συμπληρωματικά με εσωτερικές αλληλουχίες (περιοχή B1c συμπληρωματική με B1 και περιοχή F1c με F1), το μόριο αποκτά μορφή διπλής φουρκέτας (δομή αλτήρα) και αποτελεί την αρχή του σταδίου εκθετικής ενίσχυσης. Η προσθήκη των εκκινητών των βρόγχων που αναγνωρίζουν αλληλουχίες στη δομή αλτήρα (LB και LF, **Εικόνα 28Δ**) προσφέρει νέα σημεία έναρξης του πολυμερισμού και αυξάνει την ταχύτητα και την ειδικότητα της αντίδρασης, μειώνοντας το χρόνο κατά 50%.



Εικόνα 28. Σχηματισμός του μορίου με τη μορφή αλτήρα κατά τα πρώτα στάδια της αντίδρασης LAMP.

Από Becherer et al., 2020.

Το μόριο με τη δομή αλτήρα αποτελεί υπόστρωμα για την επιμήκυνση του 3' άκρου του (περιοχή F1, Εικόνα 28Δ), η οποία εκτοπίζει το 5' άκρο, ξεδιπλώνει τη μορφή φουρκέτας και αναδιπλώνει τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα. Η επανάληψη της διαδικασίας παράγει μόρια με διαφορετικό αριθμό επαναλαμβανόμενων περιοχών, τα οποία εμφανίζονται με τη μορφή διαφορετικών ζωνών έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

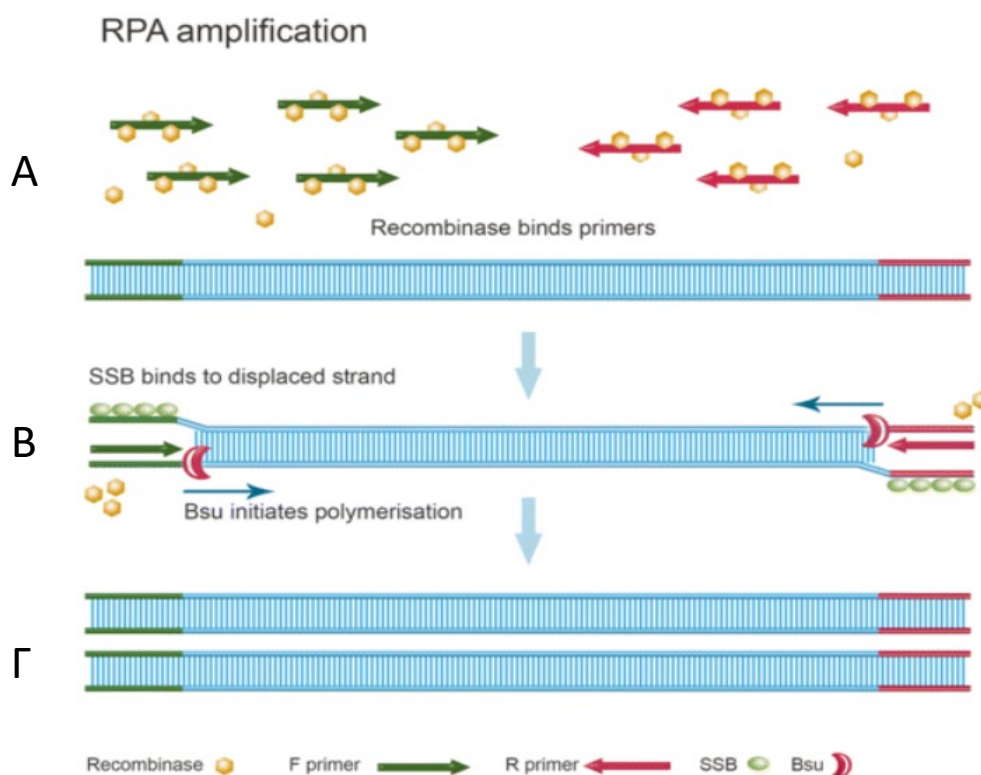
Δεδομένου ότι η τεχνική LAMP δεν περιλαμβάνει στάδιο αποδιάταξης λόγω της ικανότητας της πολυμεράσης Bst να εκτοπίζει νουκλεοτιδικές αλυσίδες, πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία 60-65°C, πλεονεκτώντας έναντι της αντίδρασης PCR. Η ανίχνευση των παραγόμενων μορίων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, όπως με χρήση φθορίζοντων χρωστικών, ηλεκτροφόρηση, ηλεκτροχημικούς αισθητήρες ή ανοσοδοκιμασίες. Ιδιαίτερη πρακτικότητα βρίσκει η ανίχνευση των προϊόντων της LAMP με θολωσιμετρία, η οποία βασίζεται στη δημιουργία ιζήματος πυροφωσφορικού μαγνησίου ως παραπροϊόντος των αντιδράσεων ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων, το οποίο είναι ορατό ακόμα και με γυμνό οφθαλμό. Η παραγωγή του πυροφωσφορικού μαγνησίου δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένδειξη θετικής αντίδρασης στην περίπτωση της PCR, καθώς η συγκέντρωσή του στην περίπτωση αυτή είναι πολύ μικρότερη και οι υψηλή θερμοκρασία αποδιάταξης της PCR υδρολύει τα πυροφωσφορικά ιόντα σε φωσφορικά (Soroka et al., 2021).

Παρά τη δυσκολία στο σχεδιασμό των εκκινήτων που απαιτούνται, τα πλεονεκτήματα της της μεθόδου LAMP έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη διάφορων παραλλαγών με συνδυασμό άλλων τεχνικών, όπως LAMP με αντίστροφη μεταγραφή, LAMP σε πραγματικό χρόνο, πολλαπλή LAMP, ψηφιακή LAMP και άλλες. Στην περίπτωση των παθογόνων του γάλακτος, η μέθοδος LAMP έχει βρει ευρεία εφαρμογή μεταξύ άλλων στην ανίχνευση του εντεροτοξικού στελέχους *E. coli* (Yang et al., 2014), των βακτηρίων *M. bovis* (Tao et al., 2020), *Pseudomonas fluorescens* (Bu et al., 2022), *Streptococcus agalactiae* (Bosward et al., 2016), *S. aureus* (Srimongkol et al., 2020), *Shigella* (Zhang et al., 2018), *Salmonella* spp. και *Vibrio parahaemolyticus* (Liu et al., 2017) και άλλων.

4.3.2 Ενίσχυση με χρήση ρεκομπινάσης και πολυμεράσης

Η ενίσχυση γενετικών τόπων με χρήση ρεκομπινάσης και πολυμεράσης (recombinase polymerase amplification, RPA) ανήκει στις ισοθερμικές μεθόδους ενίσχυσης και μπορεί να παράγει εκατομμύρια αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου με επώαση σε χαμηλές θερμοκρασίες (37-42°C) σε λιγότερο από μία ώρα. Η τεχνική στηρίζεται αρχικά στο σύμπλοκο

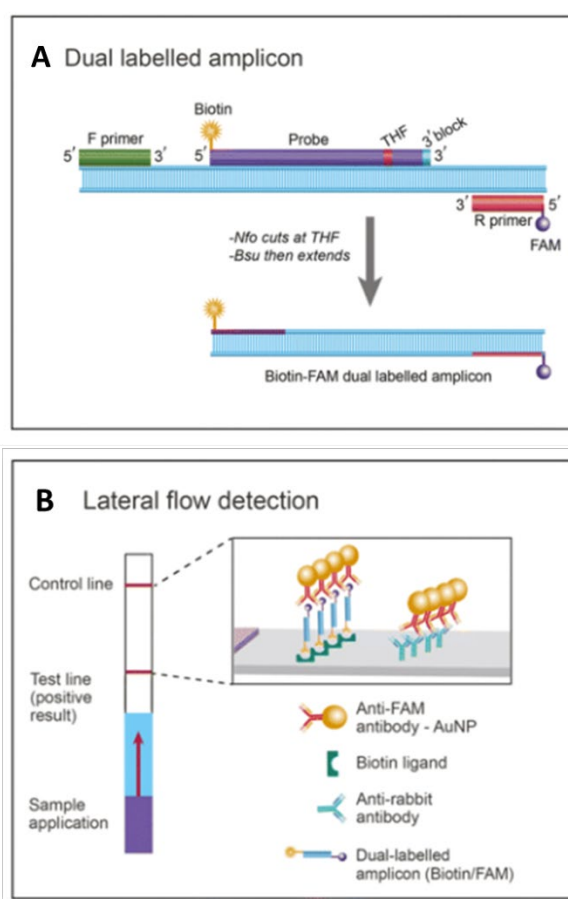
που σχηματίζει η ρεκομπινάση με τους εκκινητές, το οποίο σαρώνει το υπόστρωμα για ομόλογες αλληλουχίες. Όταν ο εκκινητής προσδεθεί στην κατάλληλη αλληλουχία, μια πολυμεράση επεκτείνει το 3' άκρο του εκτοπίζοντας την μητρική αλυσίδα, ενώ τα μονόκλωνα τμήματα DNA σταθεροποιούνται με την πρόσδεση πρωτεϊνών SSB (single strand-binding proteins) σε αυτά. Αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι η σύνθεση δίκλωνων μορίων DNA όμοιων με το αρχικό υπόστρωμα (**Εικόνα 29**). Η μέθοδος RPA είναι ταυτόσημη με τη μέθοδο RAA (Recombinase-Aided Amplification), με μόνη διαφορά την προέλευση των πολυμερασών που χρησιμοποιούνται: στη μέθοδο RPA χρησιμοποιείται συνήθως η πολυμεράση του φάγου T4, ενώ στη μέθοδο RAA έχει αναφερθεί η χρήση διάφορων ενζύμων βακτηριακής ή μυκητιακής προέλευσης (Ndraha et al., 2023).



Εικόνα 29. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου RPA. Α) Τα μόρια της ρεκομπινάσης προσδένονται στους εκκινητές και τα οδηγούν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες. Β) Η πολυμεράση Bsu καταλύει τον πολυμερισμό της νέας αλυσίδας εκτοπίζοντας την παλιά. Οι πρωτεΐνες SSB σταθεροποιούν τα μονόκλωνα τμήματα. Γ) Σχηματισμός δύο δίκλωνων μορίων DNA πανομοιότυπων με το αρχικό. Από Rames & McDonald, 2019.

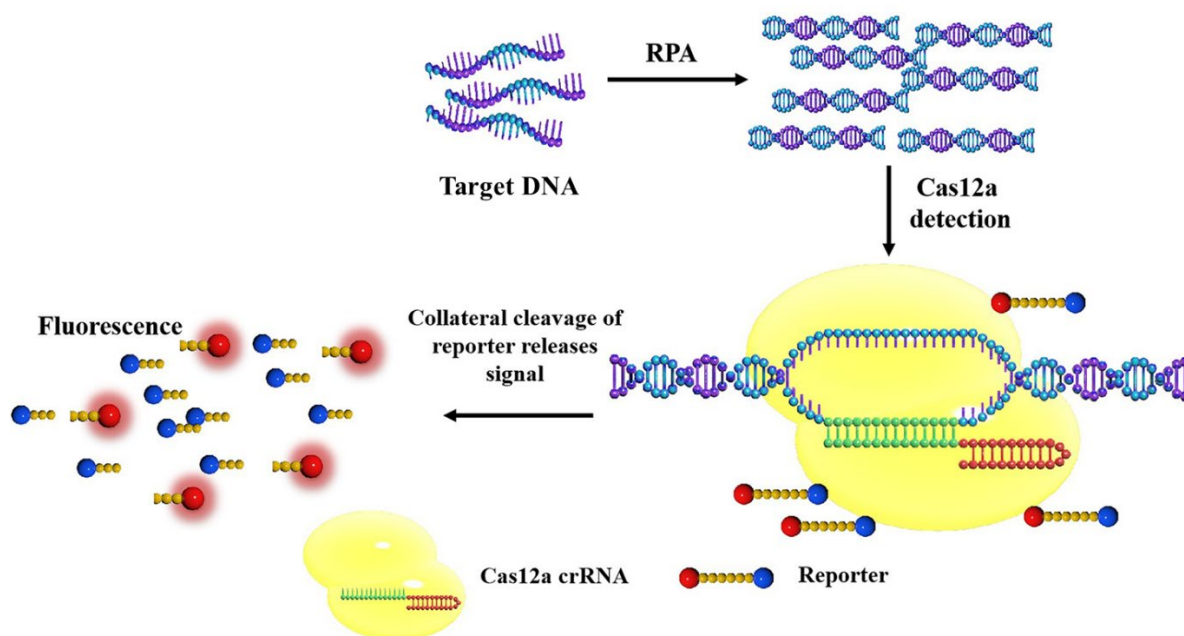
Η ανίχνευση του τελικού προϊόντος της μεθόδου RPA μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, όπως με χρήση φθορίζοντων χρωστικών, με ανοσοδοκιμασία ροής ή με εφαρμογή της τεχνικής CRISPR/Cas. Η χρήση φθορίζοντων χρωστικών και η ανίχνευση του παραγόμενου φθορισμού

είναι η απλούστερη επιλογή. Συνηθέστερα χρησιμοποιείται η ανοσοδοκιμασία ροής, η οποία περιλαμβάνει ενίσχυση με κατάλληλα σχεδιασμένους ιχνηθέτες και ανίχνευση με ανοσοχρωματογραφία σταθερού υποστρώματος. Οι ιχνηθέτες αυξάνουν την ειδικότητα της αντίδρασης και σημαίνουν το τελικό προϊόν με βιοτίνη και τον επίτοπο FAM. Στη συνέχεια, το δείγμα υποβάλλεται σε ανοσοδοκιμασία ροής, όπου η βιοτίνη προσδένει το σημασμένο μόριο στο υπόστρωμα και αντισώματα που φέρουν νανοσφαιρίδια με χρυσό ή ευρώπιο προσδένονται στον επίτοπο FAM (**Εικόνα 30**). Οι Chen et al. (2021) εφάρμοσαν τη μέθοδο RPA με ανοσοδοκιμασία ροής για την ανίχνευση *L. monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus* και *E. coli* O157:H7 σε διάφορα τρόφιμα μεταξύ των οποίων και σε γάλα. Η χρήση νανοσφαιριδίων με ευρώπιο επέτρεψε πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης (9, 7 και 4 CFU/ml αντίστοιχα), χωρίς εμπλουτισμό του δείγματος. Παραπλήσιες εφαρμογές της μεθόδου έχουν αναφερθεί για την ανίχνευση των βακτηρίων *Mycoplasma bovis* (Li et al., 2021), *Salmonella typhimurium* (Hu et al., 2019) και άλλων.



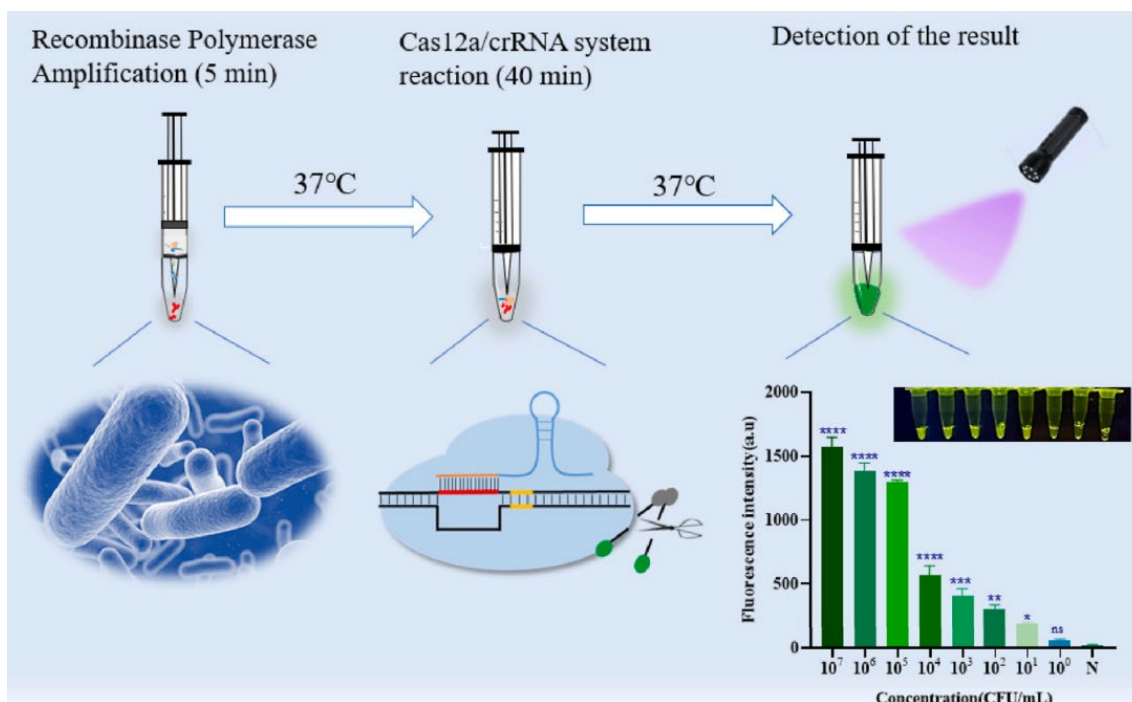
Εικόνα 30. Σχηματική απεικόνιση της χρήσης βιοτινυλιωμένου ιχνηθέτη και φθορίζοντα εκκινητή κατά την εφαρμογή της μεθόδου RPA (A). Το τελικό προϊόν ανιχνεύεται με ανοσοδοκιμασία ροής με χρήση αντισωμάτων που φέρουν νανοσφαιρίδια χρυσού (B). Προσαρμοσμένη από Rames & McDonald, 2019.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η μέθοδος CRISPR/Cas και συγκεκριμένα το σύστημα CRISPR/Cas12a έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του προϊόντος της αντίδρασης RPA. Τα συστήματα CRISPR/Cas έχουν αναπτυχθεί από βακτήρια ως απόκριση στην εισβολή ιικού DNA. Κεντρικό ρόλο στην απόκριση αυτή παίζει ένα μόριο RNA (crRNA), το οποίο προσδένεται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες στο DNA-στόχο και προκαλεί την ενεργοποίηση της νουκλεολυτικής δράσης της ενδονουκλεάσης Cas. Η ενδονουκλεάση Cas12a μπορεί να κόβει το δίκλωνο DNA του μορίου-στόχου, αλλά παράλληλα κόβει μη ειδικά μονόκλωνα μόρια DNA, τα οποία προστίθενται στην αντίδραση ως μόρια αναφοράς. Τα μόρια αναφοράς είναι σημασμένα με ένα μόριο που φθορίζει και ένα μόριο αποσιώπησης. Όταν είναι ακέραια, τα μόρια αναφοράς δεν φθορίζουν. Όταν όμως ενεργοποιηθεί η ενδονουκλεάση Cas12a, αποκόπτεται το μόριο αποσιώπησης και έτσι ανιχνεύεται φθορισμός (Εικόνα 31).



Εικόνα 31. Συνδυασμός των μεθόδων RPA και CRISPR/Cas12a για την ανίχνευση μικροοργανισμών.
Προσαρμοσμένη από Huang et al., 2022.

Το σύστημα CRISPR/Cas12a έχει εφαρμοστεί σε συνδυασμό με την τεχνική RPA για την ανίχνευση του παθογόνου *L. monocytogenes* στο γάλα (Tian et al., 2021). Η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύει το DNA στόχο σε επίπεδο αττομοριακότητας (10^{-18} moles/l) και όριο ανίχνευσης 10 CFU/ml. Σε αυτή την περίπτωση, η αντίδραση RPA διαρκεί 5 λεπτά, η αντίδραση της Cas12a 40 λεπτά και στη συνέχεια το σήμα φθορισμού ανιχνεύεται σε μπλε φως με γυμνό οφθαλμό ή με μηχανήμα ανίχνευσης φθορισμού (Εικόνα 32). Παρόμοιες εφαρμογές σε δείγματα γάλακτος έχει βρει ο συνδυασμός RPA και CRISPR/Cas12a στην ανίχνευση των παθογόνων *Brucella* (Xu et al., 2022) και *Salmonella* (Zhao et al., 2022).

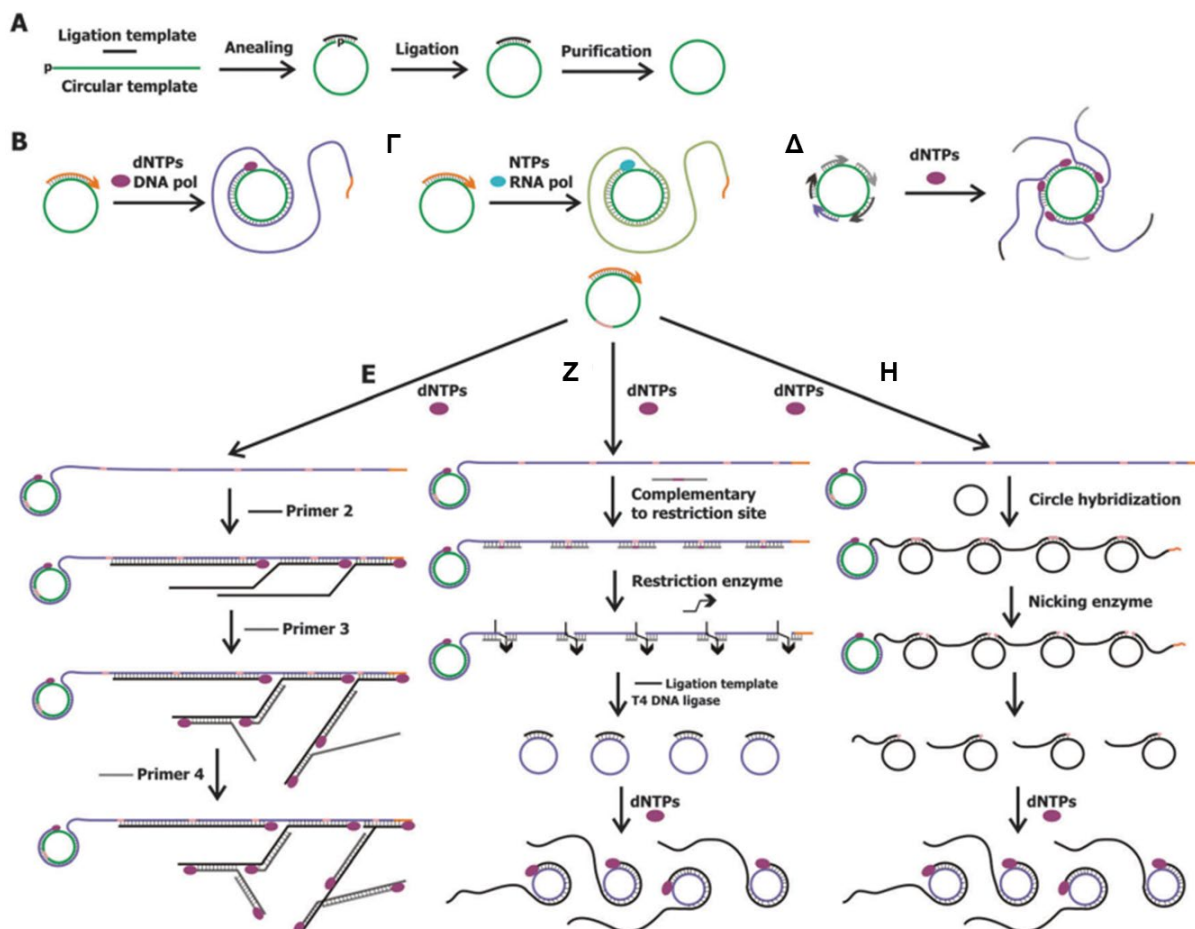


Εικόνα 32. Ανίχνευση του παθογόνου *L. monocytogenes* στο γάλα με συνδυασμό RPA και CRISPR/Cas12a. Από Tian et al., 2021.

4.3.3 Ενίσχυση με κυλιόμενους κύκλους

Η μέθοδος ενίσχυσης με κυλιόμενους κύκλους (rolling cycle amplification, RCA) χρησιμοποιεί κυκλικά υποστρώματα για την παραγωγή γραμμικών αλυσίδων DNA ή RNA με τη βοήθεια DNA ή RNA πολυμερασών αντίστοιχα (Ali et al., 2014). Οι γραμμικές αλυσίδες που παράγονται τελικά φέρουν πολλά αντίγραφα της αλληλουχίας στόχου. Εκτός από πολυμεράση, η μέθοδος RCA απαιτεί και την ύπαρξη μιας λιγάσης για την κυκλοποίηση του υποστρώματος με τη βοήθεια ενός ολιγονουκλεοτιδίου που φέρει κοντά τα δύο άκρα που πρόκειται να συνενωθούν (Εικόνα 33Α). Στην περίπτωση υποστρώματος DNA, η πολυμεράση Phi29 χρησιμοποιείται συχνότερα λόγω της υψηλής ταχύτητας πολυμερισμού και της ικανότητας εκτοπισμού αλυσίδας (Εικόνα 33Β), ενώ όταν το υπόστρωμα είναι RNA η μεταγραφή γίνεται συνήθως με την RNA πολυμεράση T7 (Εικόνα 33Γ).

Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου RCA είναι ότι τα κυκλικά υποστρώματα μπορούν να σχεδιαστούν με τέτοιο τρόπο ώστε το σήμα της αντίδρασης να ενισχυθεί με εκθετικό τρόπο. Ένας τρόπος ενίσχυσης του σήματος είναι η χρήση πολλών εκκινήτων που προσδένονται σε διαφορετικά σημεία του κυκλικού υποστρώματος, έτσι ώστε να παράγονται ταυτόχρονα πολλές νουκλεοτιδικές αλυσίδες (Εικόνα 33Δ).



Εικόνα 33. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ενίσχυσης με κυλιόμενους κύκλους. Από Ali et al., 2014.

Εναλλακτικά, το προϊόν της αντίδρασης RCA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την πρόσδεση επιπλέον εκκινητών που υποστηρίζουν τη δημιουργία νέων θέσεων έναρξης πολυμερισμού με τη μορφή διακλαδώσεων (**Εικόνα 33E**). Μια άλλη παραλλαγή ενίσχυσης του σήματος είναι η κυκλοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης RCA χρησιμοποιώντας τη δράση περιοριστικών ενδονουκλεασών και λιγάσης. Τα νέα κυκλικά μόρια δρουν ως υποστρώματα νέων αντιδράσεων πολυμερισμού (**Εικόνα 33Z**). Τέλος, με υβριδοποίηση επιπλέον κυκλικών μορίων και χρήση ενδονουκλεασών δημιουργούνται πολλαπλές νέες θέσεις πολυμερισμού με RCA (**Εικόνα 33H**).

Η μέθοδος RCA μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάλυμα, σε στερεό υπόστρωμα ή ακόμα και εντός του κυττάρου σε σταθερή θερμοκρασία 37°C, επιτυγχάνοντας την ανίχνευση στόχων έως το επίπεδο ενός μορίου. Η πρόοδος της αντίδρασης RCA και τα τελικά προϊόντα ενίσχυσης μπορούν να ανιχνευτούν με πολλούς διαφορετικούς τρόπους όπως με τη χρήση σημασμένων νουκλεοτιδίων, ιχνηθετών, χρωστικών που προσδένονται στο προϊόν της αντίδρασης ή

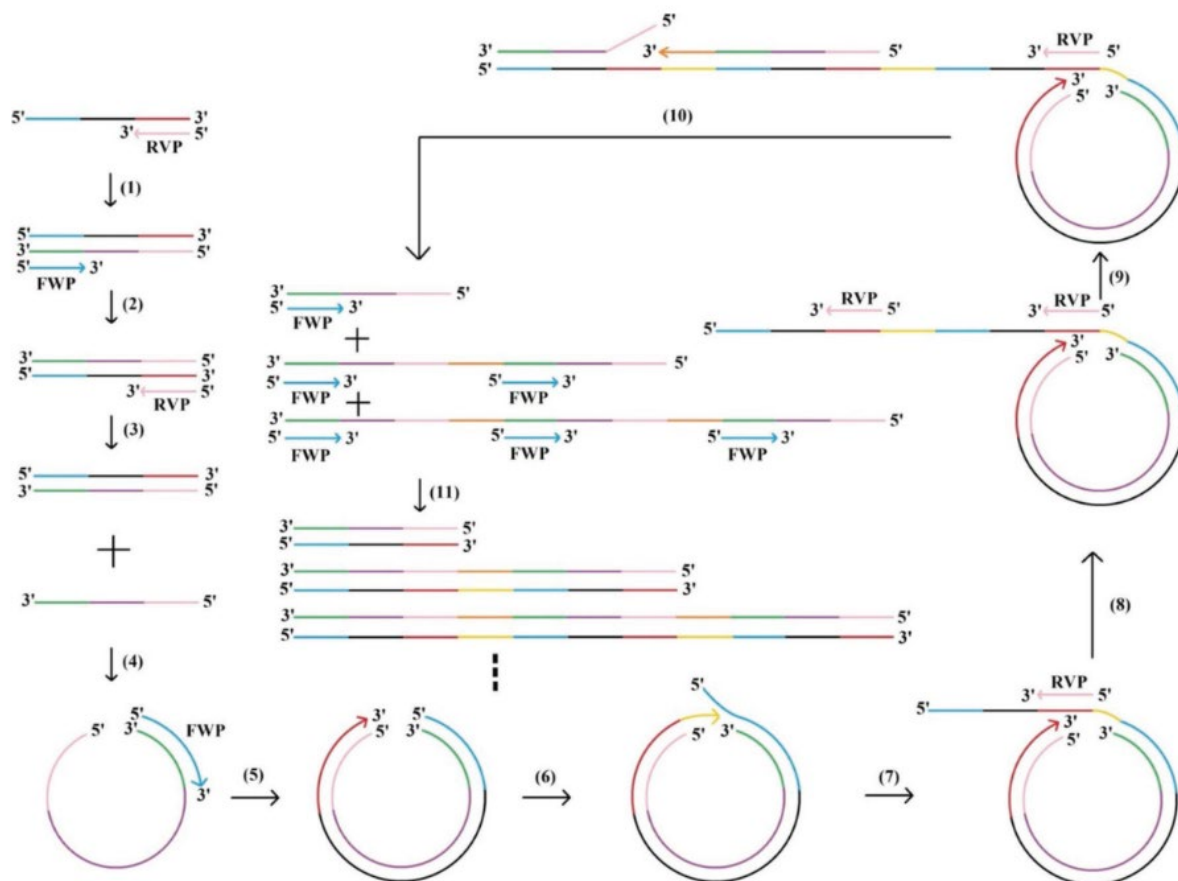
εκμεταλλευόμενοι το πυροφωσφορικό που παράγεται, το οποίο μετατρέπεται σε ATP που δρα ως συμπράγοντας για την ενεργότητα της λουσιφεράσης (Ndraha et al., 2023).

Η μεγάλη δυνατότητα ενίσχυσης του σήματος και οι πολλές διαθέσιμες παραλλαγές της μεθόδου έχουν καταστήσει την RCA χρήσιμο εργαλείο σε πολλούς τομείς της έρευνας, μεταξύ των οποίων και στην ανίχνευση παθογόνων σε τρόφιμα. Η εφαρμογή της RCA στον εντοπισμό του βακτηρίου *Cronobacter* σε δείγματα γάλακτος είχε όριο ανίχνευσης 450 CFU/ml χωρίς προεμπλουτισμό του δείγματος (Liu et al., 2020). Οι Jiang et al. (2019) έδειξαν ότι η μέθοδος RCA μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του παθογόνου *E. coli* O157:H7 σε διάφορα είδη τροφίμων, μεταξύ των οποίων και στο γάλα, ενώ παραλλαγή της μεθόδου έχει εφαρμοστεί και για το παθογόνο *S. aureus* (Gao et al., 2023).

4.3.4 Ενίσχυση με ασυνεχείς κυλιόμενους κύκλους

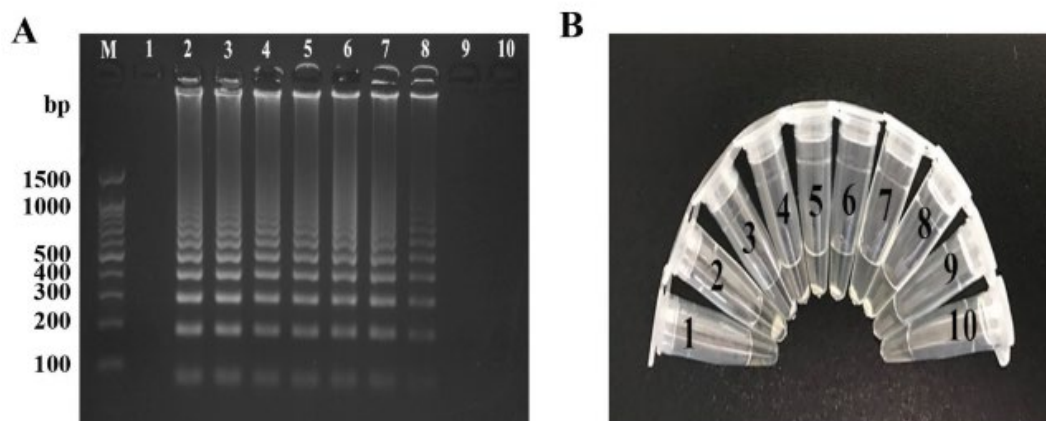
Η κλασική μέθοδος RCA μειονεκτεί ως προς την ανάγκη κυκλοποίησης του αρχικού μορίου και της χρήσης λιγάσης. Η παραλλαγή της που αναφέρεται ως ενίσχυση με ασυνεχείς κυλιόμενους κύκλους (saltatory rolling cycle amplification, SRCA) είναι πιο απλή καθώς δεν περιλαμβάνει κυκλοποίηση, απαιτεί δύο μόνο εκκινητές (FWP και RVP) και διαρκεί 3 ώρες λιγότερο. Η μέθοδος SRCA είναι επίσης ισοθερμική και κάνει χρήση πολυμερασών με ικανότητα εκτόπισης αλυσίδας όπως η πολυμεράση Bst (Yang et al., 2019).

Κατά τα πρώτα στάδια της μεθόδου SRCA, η πρόσδεση των εκκινητών FWP και RVP στην αλληλουχία στόχο έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας μονόκλωνης αλυσίδας με δευτεροταγή δομή που μοιάζει με ασυνεχή κύκλο (στάδια 1-4, **Εικόνα 34**). Στο επόμενο στάδιο συντίθεται η συμπληρωματική αλυσίδα του ασυνεχούς κύκλου με χρήση του εκκινητή FWP. Όταν η σύνθεση της νέας αλυσίδας φτάσει στο σημείο της ασυνέχειας, η πολυμεράση Bst συνεχίζει την προσθήκη νουκλεοτιδίων και εκτοπίζει την υφιστάμενη αλυσίδα (στάδιο 6). Με τον τρόπο αυτό συντίθεται τελικά ένα μόριο με μακρύ μονόκλωνο άκρο (στάδιο 7). Το μονόκλωνο άκρο του μορίου προσφέρει νέες θέσεις πρόσδεσης του εκκινητή RVP και επομένως νέες θέσεις πολυμερισμού (στάδια 8 και 9). Οι πολλαπλές θέσεις πολυμερισμού παράγουν μονόκλωνα μόρια διαφορετικού μήκους που δημιουργούν νέες θέσεις πρόσδεσης για τον εκκινητή FWP (στάδιο 10), με τελικό αποτέλεσμα ένα μίγμα δίκλωνων μορίων με ποικίλο αριθμό επαναλήψεων (στάδιο 11).



Εικόνα 34. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου SRCA. Από Yang et al., 2019.

Τα προϊόντα της μεθόδου SRCA μπορούν να ανιχνευθούν είτε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, είτε μέσω φθορισμού, είτε με γυμνό οφθαλμό μέσω του λευκού ιζήματος πυροφωσφορικού μαγνησίου που σχηματίζει η θετική αντίδραση (Εικόνα 35).



Εικόνα 35. Ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης SRCA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης (Α) ή μέσω του ορατού λευκού ιζήματος (Β). Από Yang et al., 2019.

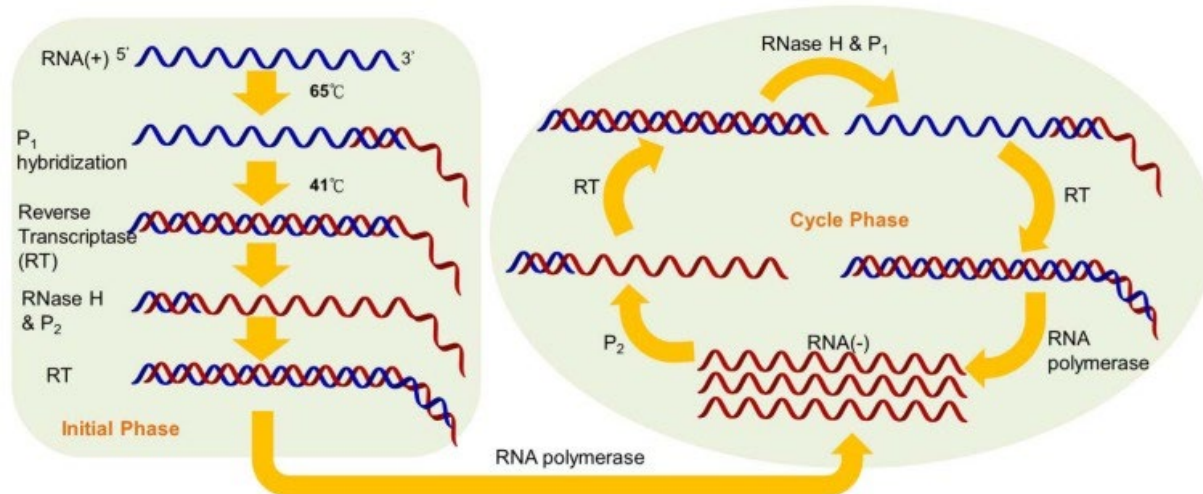
Oι Yang et al. (2019) ανέπτυξαν τη μέθοδο SRCA για την ανίχνευση του *S. aureus* στο γάλα. Η SRCA είχε όριο ανίχνευσης 7.8×10^1 fg/μl γενωμικού DNA του *S. aureus* μέσω του ορατού ιζήματος και 7.8 fg/μl όταν χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I. Συγκρινόμενη με την κλασική PCR, στη συγκεκριμένη περίπτωση η μέθοδος SRCA εμφάνισε τουλάχιστον 100 φορές υψηλότερη ευαισθησία. Παρόμοια συμπεράσματα γρήγορης και εύκολης ανίχνευσης παθογόνου γάλακτος με ευαισθησία πολύ υψηλότερη της απλής PCR αναφέρθηκαν και στην εφαρμογή της SRCA στην περίπτωση του βακτηρίου *L. monocytogenes* (Prasad et al., 2023).

4.3.5 Ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων βασιζόμενη στην αλληλουχία

Η μέθοδος ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων βασιζόμενη στην αλληλουχία (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) ενισχύει μόρια 16S rRNA ή mRNA και για αυτό τον λόγο χρησιμοποιείται όχι μόνο για την ανίχνευση παθογόνων, αλλά και για εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους. Η εφαρμογή της μεθόδου NASBA απαιτεί την ύπαρξη δύο εκκινητών (P1 και P2) και τριών ενζύμων, μιας αντίστροφης μεταγραφάσης, της νουκλεάσης RNase H και της T7 RNA πολυμεράσης. Ο εκκινητής P1 φέρει στην αλληλουχία του τη θέση πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης. Στην αρχική φάση, το RNA-στόχος μετατρέπεται σε δίκλωνο DNA με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης και τη βοήθεια των δύο εκκινητών. Καθώς έχει χρησιμοποιηθεί ο εκκινητής P1, το δίκλωνο DNA έχει ενσωματώσει την θέση πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης. Στη συνέχεια, στην κυκλική φάση ενίσχυσης, το δίκλωνο DNA μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση σε μονόκλωνα μόρια RNA, τα οποία επίσης μετατρέπονται σε δίκλωνα μόρια DNA που μεταγράφονται κ.ο.κ. (**Εικόνα 36**). Υπολογίζεται ότι παράγονται 10-100 μόρια RNA από τη μεταγραφή κάθε δίκλωνου DNA, γεγονός που εξηγεί τη μεγάλη ικανότητα ενίσχυσης της μεθόδου (έως και 10^9 αντίγραφα σε 90 λεπτά) (Oliveira et al., 2021).

Μετά την ολοκλήρωση της ενίσχυσης, η ανίχνευση των τελικών προϊόντων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους όπως ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, χρήση φθορίζουσων χρωστικών ή συνηθέστερα χρήση μοριακών φάρων. Παρόλο που η μέθοδος NASBA απαιτεί τη συντονισμένη δράση τριών ενζύμων, η ισοθερμική εφαρμογή της (41°C), ο σύντομος χρόνος επώασης και η απευθείας χρήση του RNA ως αρχικό υπόστρωμα πλεονεκτούν έναντι άλλων μεθόδων ενίσχυσης. Επιπλέον, πιθανή μόλυνση της αντίδρασης με DNA δεν επηρεάζει

το τελικό αποτέλεσμα, καθώς η θερμοκρασία της αντίδρασης είναι χαμηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης του DNA και έτσι το DNA δεν μπορεί να ενισχυθεί.

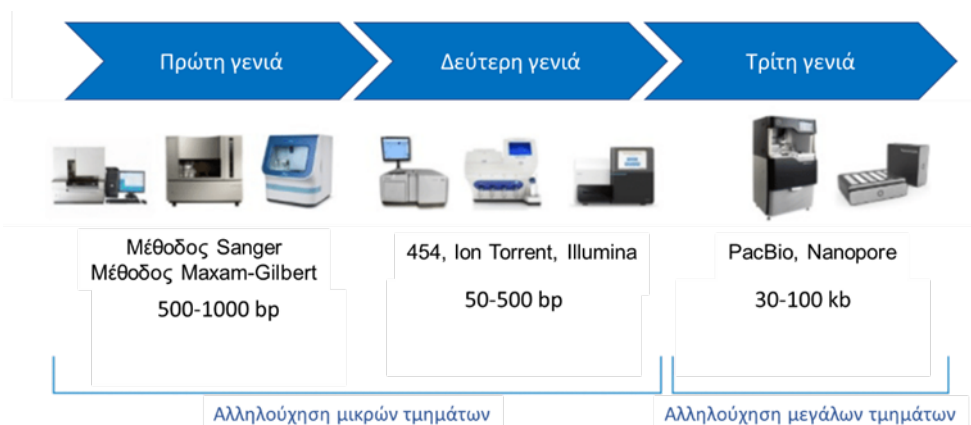


Εικόνα 36. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου NASBA. Από Chang et al., 2012.

Η τεχνική NASBA χρησιμοποιείται κυρίως στην ανίχνευση παθογόνων σε περιβαλλοντικά δείγματα και τρόφιμα. Στο γάλα, έχει αναφερθεί η επιτυχής ανίχνευση των βακτηρίων *L. monocytogenes* (Uyttendaele et al., 1994), *Bacillus* spp. (Gore et al., 2003) και *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Rodriguez-Lazaro et al., 2004). Στην περίπτωση των *Bacillus* spp., η μέθοδος στηρίχθηκε στην ανίχνευση του *hblC* mRNA που κωδικοποιεί την εντεροτοξίνη του βακτηρίου με χρήση ιχνηθετών τύπου μοριακού φάρου.

4.4 Μέθοδοι αλληλούχησης

Η αλληλουχία των αζωτούχων βάσεων των αλυσίδων DNA αποτελεί τη βάση του γενετικού κώδικα των οργανισμών και ταυτόχρονα καθορίζει την ταξινόμική ομάδα του υπό ανίχνευση μικροοργανισμού ή μικροοργανισμών του δείγματος. Οι μέθοδοι αλληλούχησης έχουν εξελιχθεί από τη δεκαετία του 1970 μέχρι σήμερα και είναι πλέον εφικτή η αλληλούχηση ολόκληρων γονιδιωμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα και με περιορισμένο κόστος (Εικόνα 37).

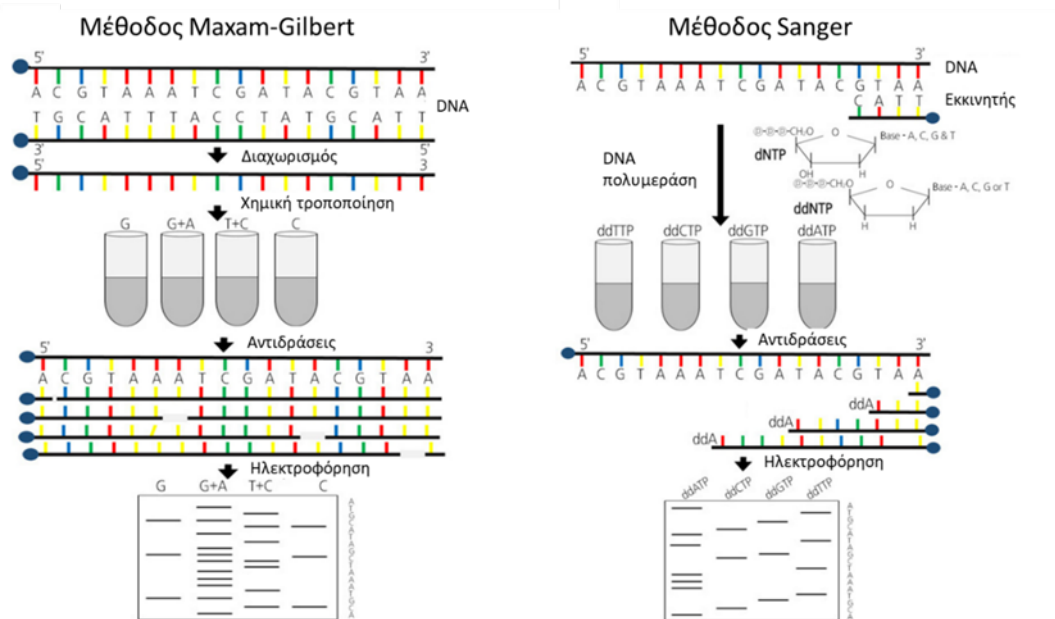


Εικόνα 37. Εξέλιξη των μεθόδων αλληλούχησης.

4.4.1 Πρώτη γενιά μεθόδων αλληλούχησης

Η επίλυση του αινίγματος της τρισδιάστατης μορφής του DNA, η οποία έγινε το 1953, ακολουθήθηκε από εντατική έρευνα με σκοπό την ανάπτυξη μιας μεθόδου ανάγνωσης της αλληλουχίας των αζωτούχων βάσεων. Η ομάδα Sanger πρότεινε το 1977 την πρώτη μέθοδο αλληλούχησης (Sanger et al., 1977), η οποία χρησιμοποιήθηκε ευρέως μέχρι την ανάπτυξη των μεθόδων αλληλούχησης δεύτερης γενιάς. Η μέθοδος Sanger, η οποία ονομάζεται *μέθοδος τερματισμού αλυσίδας*, στηρίζεται στην *in vitro* αντιγραφή του DNA παρουσία τριφωσφορικών διδεόξυ-ριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs). Όταν ενσωματωθούν τα τροποποιημένα αυτά νουκλεοτίδια σε τυχαίες θέσεις σταματάει ο πολυμερισμός της νέας αλυσίδας, με αποτέλεσμα τη σύνθεση αλυσίδων ποικίλου μήκους. Οι αλυσίδες αυτές διαχωρίζονται στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου-ουρίας και ανιχνεύονται λόγω της φθορίζουσας ή ραδιενεργού σήμανσης των ddNTPs (**Εικόνα 38**). Αργότερα, η ανάπτυξη της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, η οποία διαχωρίζει μόρια νουκλεϊκών οξέων με υψηλή αναλυτική ικανότητα, επέτρεψε την αυτοματοποίηση της μεθόδου Sanger, γεγονός που συνέβαλε τα μέγιστα στην αποκωδικοποίηση του πρώτου ανθρώπινου γονιδιώματος (Collins et al., 2003).

Σε αντίθεση με τη μέθοδο Sanger, η μέθοδος Maxam-Gilbert χαρακτηρίζεται ως *χημική μέθοδος αλληλούχησης*, καθώς προϋποθέτει τη ραδιενεργό σήμανση του 5' άκρου του DNA και τη χημική τροποποίηση των αζωτούχων βάσεων με διάφορα αντιδραστήρια (Maxam & Gilbert, 1977).



Εικόνα 38. Μέθοδοι αλληλούχησης πρώτης γενιάς. Από Kang et al., 2019.

Μετά την τροποποίηση των βάσεων, η πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα κόβεται στις θέσεις των χημικών τροποποιήσεων με επίδραση πιπεριδίνης και προκύπτουν με αυτόν τον τρόπο μόρια DNA διαφορετικού μήκους, τα οποία ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία έπειτα από διαχωρισμό σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (**Εικόνα 38**). Η μέθοδος Maxam-Gilbert περιλαμβάνει ραδιενεργό σήμανση και χρήση νευροτοξικών ουσιών για την τροποποίηση των βάσεων, όπως είναι η υδραζίνη, και για το λόγο αυτό θεωρείται ότι υστερεί, παρόλο που είναι πιο ειδική και πιο ευαίσθητη από την αλληλούχηση με τη μέθοδο τερματισμού αλυσίδας.

Οι μέθοδοι αλληλούχησης της πρώτης γενιάς επιτρέπουν την αλληλούχηση περίπου 500-1000 βάσεων σε κάθε αντίδραση και λόγω των σχετικά μειωμένων απαιτήσεων σε εργαστηριακό εξοπλισμό χρησιμοποιήθηκαν ευρέως πριν την ανάπτυξη των μεθόδων αλληλούχησης δεύτερης γενιάς. Παράλληλα, χρησιμοποιούνται ακόμα όταν το ζητούμενο είναι η αλληλούχηση τμημάτων μικρού μήκους.

4.4.2 Δεύτερη γενιά μεθόδων αλληλούχησης

Η δεύτερη γενιά μεθόδων αλληλούχησης (ή αλληλούχηση επόμενης γενιάς, Next Generation Sequencing, NGS) επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλούχηση πολλών αντιδράσεων, με αποτέλεσμα τη δραματική μείωση του χρόνου αλληλούχησης σε σχέση με τις προγενέστερες μεθόδους (Levy & Myers, 2016). Λόγω των πλεονεκτημάτων της, η αλληλούχηση NGS έχει

ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που περιλαμβάνει την αποκωδικοποίηση πλήρους γονιδιώματος, τον εντοπισμό περιοχών DNA που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες (ChIP-Seq), την αλληλούχηση RNA ή εξονίων, την ανίχνευση επιγενετικών τροποποιήσεων κ.α. (Hu et al., 2021). Ο **Πίνακας 11** συνοψίζει τα κυριότερα χαρακτηριστικά των πλατφόρμων αλληλούχησης δεύτερης γενιάς.

Εταιρία-Πλατφόρμα	Βάσεις ανάγνωσης	Gb ανά τρέξιμο	Μέθοδος αλληλούχησης	Χαρακτηριστικά
Roche-454	400	0,40-0,60	Πυροαλληλούχηση	Ανίχνευση φωτός όταν απελευθερώνεται πυροφωσφορικό
Illumina-MiSeq/HiSeq/NextSeq	2x150 2x300	15-1000	Αλληλούχηση μέσω σύνθεσης	Οπτική ανίχνευση σημασμένων νουκλεοτιδίων που φθορίζουν
Life Technologies-SOLiD	20-45	35-50	Αλληλούχηση μέσω λιγασών	Χρήση ανιχνευτών 2 βάσεων
ThermoFisher Scientific - Ion Torrent/ Ion Proton	200	100	Αλληλούχηση μέσω σύνθεσης	Ανίχνευση πρωτονίων με χρήση ημιαγωγών, μη τροποποιημένα νουκλεοτίδια
Complete Genomics	50-150	3000	Αλληλούχηση μέσω λιγάσης	Χρήση DNA νανοσφαιριδίων (nanoballs)

Πίνακας 11. Οι κυριότερες πλατφόρμες αλληλούχησης NGS. Προσαρμοσμένος από Luthra et al., 2015.

4.4.3 Τρίτη γενιά μεθόδων αλληλούχησης

Η τρίτη γενιά μεθόδων αλληλούχησης αποτελεί μετεξέλιξη των μεθόδων της δεύτερης γενιάς και μπορεί να αποκωδικοποιήσει τάχιστα τμήματα μήκους δεκάδων χιλιάδων βάσεων. Βασικός εκπρόσωπος αυτών των μεθόδων είναι η αλληλούχηση μεμονωμένου μορίου σε πραγματικό χρόνο (Single Molecule Real Time sequencing, SMRT), η οποία προτάθηκε από την εταιρεία Pacific Biosciences. Η τεχνική αυτή κάνει χρήση μεμονωμένων θέσεων σύνθεσης DNA, που αντιστοιχούν σε μικροσκοπικά «πηγαδάκια», σε καθένα από τα οποία γίνεται πολυμερισμός διαφορετικά σημασμένων νουκλεοτιδίων από ένα μόριο πολυμεράσης. Η εκπομπή ακτινοβολίας που προκύπτει από την αντίδραση ανιχνεύεται σε πραγματικό χρόνο (Eid et al., 2009).

Η εταιρεία Oxford Nanopore Technologies έχει αναπτύξει τις πλατφόρμες GridION και MinION, οι οποίες αποτελούν άλλα παραδείγματα αλληλούχησης τρίτης γενιάς. Οι

πλατφόρμες αυτές βασίζονται στη χρήση πρωτεϊνικών νανοπόρων μέσω των οποίων μετακινούνται μόρια DNA και στη συνέχεια γίνεται καταγραφή των αλλαγών του ηλεκτρικού πεδίου που περιβάλλει τον πόρο (Jain et al., 2016). Η πλατφόρμα MinION μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές πεδίου, καθώς είναι φορητή και μπορεί να συνδεθεί εύκολα μέσω USB με υπολογιστή.

4.4.4 Εφαρμογές των μεθόδων αλληλούχησης επόμενης γενιάς στην ανίχνευση παθογόνων του γάλακτος

Η μέθοδοι αλληλούχησης επόμενης γενιάς μπορούν να βρουν εφαρμογή στην ανίχνευση των παθογόνων τροφίμων χάρη στο διαρκώς ελαττούμενο κόστος και στην ανάπτυξη νέων πιο εύχρηστων πρωτοκόλλων. Έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά τρία βασικά είδη προσεγγίσεων, η αλληλούχηση του πλήρους γονιδιώματος ενός απομονωμένου στελέχους (whole genome sequencing, WGS), η μεταγονιδιωματική αλληλούχηση, με την οποία αποκωδικοποιείται το γενετικό υλικό όλης της μικροβιακής κοινότητας και η στοχευμένη αλληλούχηση συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος με τη χρήση ειδικών εκκινητών, οι οποίοι ενισχύουν την περιοχή πριν τη διαδικασία της αλληλούχησης (αλληλούχηση αμπλικονίων).

Η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος προσφέρει μεγαλύτερο βάθος πληροφοριών εκτός από την ταυτοποίηση του είδους του μικροοργανισμού, όπως τις γενετικές αιτίες της μολυσματικότητας ή της επιβίωσης του μικροοργανισμού κατά τη διαδικασία επεξεργασίας ή διανομής του τροφίμου και την πιθανή ανθεκτικότητά του σε φάρμακα ή αντιβιοτικά. Παράλληλα, η μέθοδος WGS αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για αναδρομικές επιδημιολογικές αναλύσεις, όπως στην περίπτωση της ανίχνευσης του βακτηρίου *L. monocytogenes* (Law et al., 2015).

Η μεταγονιδιωματική αλληλούχηση χρησιμοποιείται επίσης για την εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με το γενετικό υλικό των μικροοργανισμών τροφίμων και επιτρέπει την ταυτοποίηση στελεχών (Grützke et al., 2021). Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μαζί με το γονιδίωμα των μικροοργανισμών αλληλουχείται και το γονιδίωμα του ξενιστή, το οποίο βρίσκεται σε περίσσεια. Για το λόγο αυτό, αυτού του είδους η αλληλούχηση συνήθως έπεται ενός σταδίου εμπλουτισμού του δείγματος με επώαση, σε συνδυασμό με υψηλό βάθος ανάλυσης, προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι τα αποτελέσματα θα είναι αντιπροσωπευτικά όλης της μικροβιακής κοινότητας. Παρόλα αυτά, θεωρείται ότι η μεταγονιδιωματική αλληλούχηση αποκαλύπτει την ποικιλότητα και τη σχετική αφθονία των μικροοργανισμών του

δείγματος με λιγότερο στρεβλό τρόπο από ότι η αλληλούχηση αμπλικονίων (Jagadeesan et al., 2019).

Η αλληλούχηση αμπλικονίων προϋποθέτει αρχικά την απομόνωση του ολικού DNA από το δείγμα και στη συνέχεια την ενίσχυση ειδικών γονιδίων-δεικτών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Συνηθέστερα χρησιμοποιείται το γονίδιο 16S rRNA για την ανίχνευση βακτηρίων και αρχαιοβακτηρίων, η ενδομεταγραφόμενη περιοχή ITS για τους μύκητες και το γονίδιο 18S rRNA για τους υπόλοιπους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Η μαζική παράλληλη αλληλούχηση αυτών των περιοχών οδηγεί στην ταυτοποίηση των μικροοργανισμών του δείγματος. Συγκρινόμενη με τη μεταγονιδιωματική προσέγγιση, η αλληλούχηση των αμπλικονίων είναι οικονομικότερη και η επεξεργασία των δεδομένων είναι απλούστερη και πιο εύκολο να τυποποιηθεί. Παράδειγμα εφαρμογής αυτής της μεθόδου αποτελεί η ανίχνευση 43 παθογόνων (βακτηρίων, μυκήτων, ιών και άλλων παρασίτων) σε δείγματα γάλακτος και άλλων ιστών από βοοειδή και άλλα μικρά μηρυκαστικά (Anis et al., 2018).

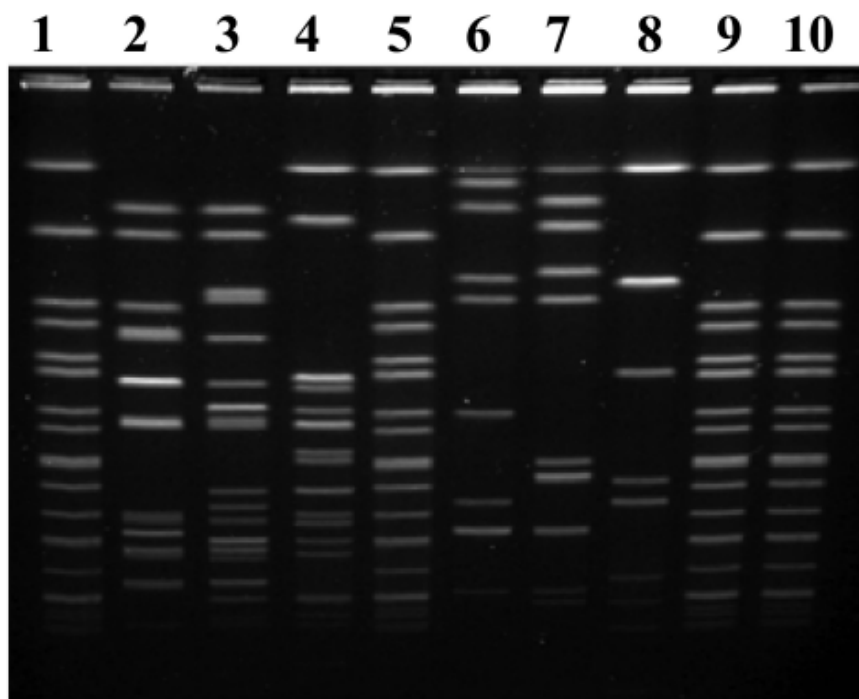
4.5 Ανίχνευση υποτύπων παθογόνων

Ο όρος «ανίχνευση υποτύπου» (subtyping) αναφέρεται στην ταυτοποίηση ενός απομονωμένου μικροοργανισμού σε επίπεδο χαμηλότερο του είδους. Η ανίχνευση υποτύπου μπορεί να γίνει με μεθόδους που στηρίζονται στο φαινότυπο του μικροοργανισμού ή με μοριακές μεθόδους, οι οποίες αναλύονται παρακάτω.

4.5.1 Ηλεκτροφόρηση σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο

Η ηλεκτροφόρηση σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο (pulse field gel electrophoresis, PFGE) διαχωρίζει μόρια DNA μεγάλου μοριακού βάρους, τα οποία δεν είναι δυνατόν να διαχωριστούν με τη συμβατική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης. Προκειμένου να διαπιστωθεί ο υποτύπος ενός μικροοργανισμού με τη μέθοδο αυτή, γίνεται απομόνωση του DNA και πέψη με κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση, έτσι ώστε να προκύψουν 8-25 ζώνες μεταξύ 40 και 600 kb. Το πρότυπο των ζωνών DNA που προκύπτει μετά την ηλεκτροφόρηση συγκρίνεται μεταξύ των μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί και με το αναμενόμενο πρότυπο από γνωστά στελέχη (Wiedmann, 2002). Συχνά, προκειμένου να γίνει διάκριση μεταξύ διαφορετικών στελεχών απαιτείται η πέψη με δύο περιοριστικές

ενδονουκλεάσες π.χ. τα στελέχη του βακτηρίου *Salmonella* ταυτοποιούνται με βάση το πρότυπο των ζωνών που προκύπτουν από πέψη με τα ένζυμα XbaI και BlnI (Εικόνα 39).



Εικόνα 39. Διάκριση των υποτύπων του βακτηρίου *Salmonella* με ηλεκτροφόρηση σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Οι διαδρομές 1, 5, 9 και 10 αντιστοιχούν στο πρότυπο δείγμα γνωστών μοριακών βαρών. Τα υπόλοιπα δείγματα αντιστοιχούν στο DNA στελεχών *Salmonella* έπειτα από πέψη με το ένζυμο XbaI (διαδρομές 2, 3 και 4) ή με το ένζυμο BlnI (διαδρομές 6, 7 και 8). Από Ribot et al., 2006.

Η ηλεκτροφόρηση σε εναλλασσόμενο πεδίο είναι ικανή να ταυτοποιήσει πολλά από τα παθογόνα των τροφίμων με μεγάλη διακριτική ικανότητα και για το λόγο αυτό θεωρείται ως μέθοδος επιλογής για τις υγειονομικές αρχές σε περίπτωση τροφιμογενούς επιδημίας. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η σωστή εφαρμογή της μεθόδου, η ανταλλαγή πληροφοριών και πρωτοκόλλων και η χρήση μιας κοινής βάσης δεδομένων με πρότυπα ηλεκτροφόρησης, έχει δημιουργηθεί ένα παγκόσμιο δίκτυο εργαστηρίων ελέγχου υποτύπων τροφιμογενών παθογόνων (PulseNet International, <https://pulsenetinternational.org/>). Παρά τα πλεονεκτήματα της μεθόδου, η ηλεκτροφόρηση σε εναλλασσόμενο πεδίο είναι πιθανόν να ανιχνεύσει και μικρές γενετικές διαφορές που δεν είναι πάντα επιδημιολογικά σημαντικές. Αντιστρόφως, η ταύτιση του υποτύπου δύο απομονωμένων στελεχών δεν αποδεικνύει κατ' ανάγκη σχέση αιτίου – αποτελέσματος. Άλλα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι είναι επίπονη, διαρκεί έως και 3 ημέρες μέχρι να ολοκληρωθεί και ορισμένα στελέχη δεν μπορούν να αναλυθούν γιατί το DNA τους αποικοδομείται κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης (Wiedmann, 2002).

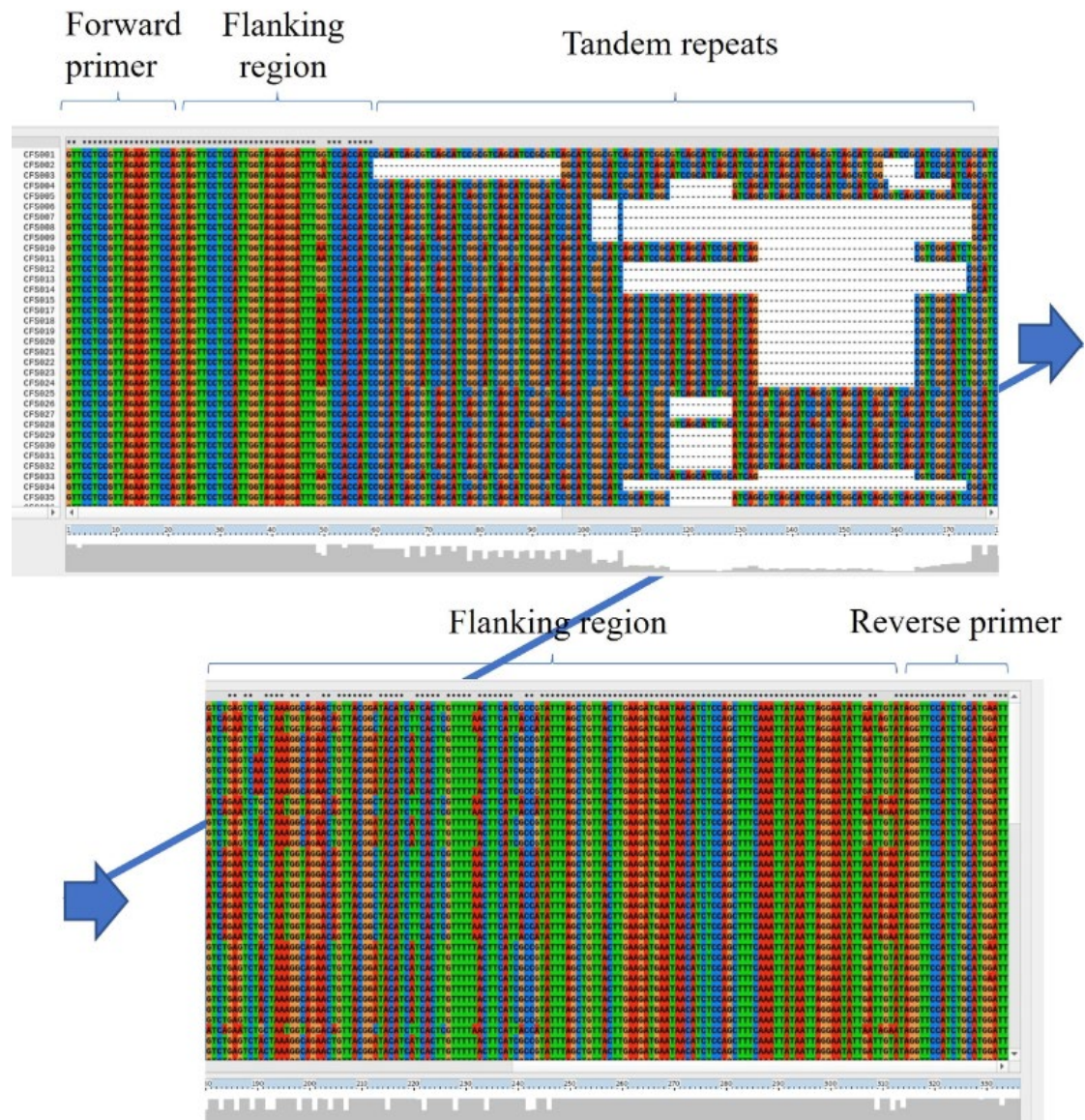
4.5.2 Καθορισμός ριβότυπου

Ο καθορισμός του ριβότυπου (ribotyping) είναι μια μέθοδος ανίχνευσης διαφορετικών υποτύπων μικροοργανισμών με μια διαδικασία που επίσης ξεκινάει με απομόνωση DNA και πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Στην περίπτωση αυτή, οι ζώνες που προκύπτουν διαχωρίζονται με κλασσική ηλεκτροφόρηση αгарόζης, καθώς έχουν μικρότερο μέγεθος (1-30 kb) και στη συνέχεια αναγνωρίζονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στα γονίδια που κωδικοποιούν το ριβοσωμικό RNA με χρήση ραδιενεργών ιχνηθετών. Το πρότυπο των ζωνών που χρησιμοποιείται δηλαδή για την ταυτοποίηση του υποτύπου σε αυτή την περίπτωση αντιστοιχεί σε ένα μέρος κι όχι στο σύνολο του γονιδιώματος (Wiedmann, 2002).

4.5.3 Ανάλυση του μεταβλητού αριθμού επαναλήψεων σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους

Η ανάλυση του μεταβλητού αριθμού επαναλήψεων σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους (multiple locus variable number of tandem repeats analysis, MLVA) είναι μια μέθοδος ταυτοποίησης υποτύπου που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, με την οποία ανιχνεύεται η ποικιλομορφία στον αριθμό των επαναλήψεων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA (variable number tandem repeats, VNTR). Ο αριθμός αυτών των επαναλήψεων είναι χαρακτηριστικός για κάθε στέλεχος μικροοργανισμού (**Εικόνα 40**).

Η διακριτική ικανότητα της μεθόδου θεωρείται αντίστοιχη των οροτύπων (ανίχνευση υποτύπων με χρήση αντισωμάτων) και επιπλέον μπορεί να γίνει ταυτόχρονη ανάλυση πολλών δειγμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα. Για το λόγο αυτό η μέθοδος MLVA προκρίνεται σε περιπτώσεις επιδημίας, ενώ ο καθορισμός του ριβότυπου και η ανάλυση με ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου εφαρμόζονται κυρίως σε μεμονωμένα δείγματα όπου υπάρχει ανάγκη διάκρισης σε επίπεδο χαμηλότερο του οροτύπου. Όπως συμβαίνει με τις περισσότερες μεθόδους ενίσχυσης γενετικών τόπων, η μέθοδος MLVA είναι γρήγορη και απαιτεί την ύπαρξη μικρής ποσότητας DNA, αλλά είναι ευαίσθητη σε αλλαγές αντιδραστηρίων και συνθηκών στον θερμοκυκλοποιητή και κατά την ηλεκτροφόρηση (Hyeon et al., 2020).



Εικόνα 40. Εφαρμογή της μεθόδου MLVA για το διαχωρισμό υποτύπων του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*. Παρουσιάζεται η στοίχιση των αλληλουχιών 35 στελεχών, όπου σημειώνονται οι περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών και η περιοχή με το μεταβλητό αριθμό επαναλήψεων της αλληλουχίας CATCGG. Από Andrews et al., 2023.

4.5.4 Ανάλυση αλληλουχιών σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους

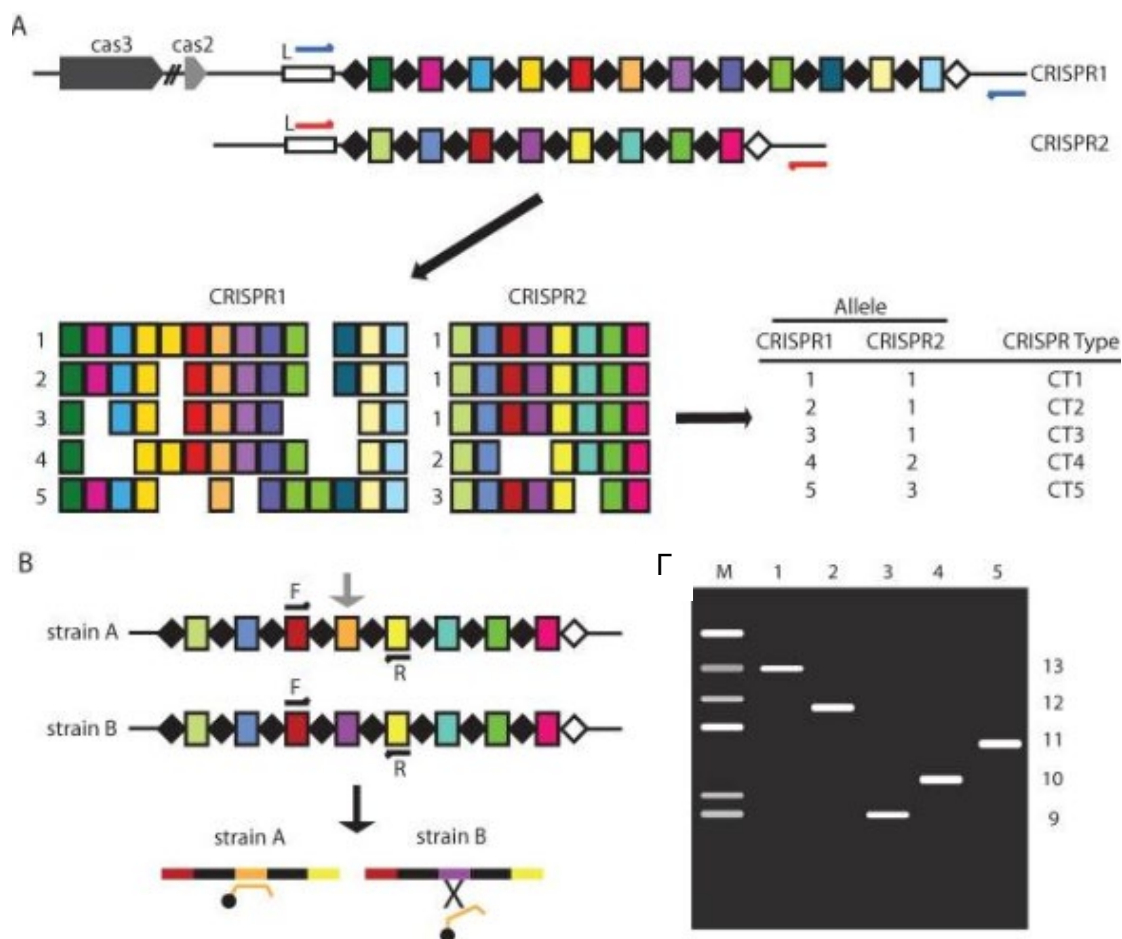
Η μέθοδος της ανάλυσης αλληλουχιών σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους (multilocus sequence typing, MLST) στηρίζεται στην ύπαρξη διαφορών στην αλληλουχία DNA μεταξύ επτά συντηρημένων γονιδίων, η οποία διαπιστώνεται συνήθως με τη μέθοδο αλληλούχησης Sanger. Κάθε βακτηριακός υπότυπος έχει ένα συγκεκριμένο προφίλ αλληλουχιών, που ονομάζεται τύπος αλληλουχίας (sequence type, ST). Με την εξέλιξη των μεθόδων αλληλούχησης, τα

δεδομένα που απαιτούνται για την ανάλυση MLST μπορούν να εξαχθούν και από την αλληλούχηση ολόκληρου γονιδιώματος με μεθόδους βιοπληροφορικής. Για το βακτήριο *Salmonella* χρησιμοποιούνται οι γενετικοί τόποι *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *thrA*, *sucA* και *purE* και η ανάλυση μπορεί να γίνει με χρήση διαδικτυακής εφαρμογής εισάγοντας τις αλληλουχίες των παραπάνω γονιδίων (Tang et al., 2019).

Η συγκεκριμένη μέθοδος πλεονεκτεί ως προς την ταχύτητα σε σχέση με τις μεθόδους που βασίζονται στη σύγκριση του πρότυπου ζωνών σε ηλεκτροφόρηση, αλλά μειονεκτεί ως προς τη διακριτική ικανότητα διαφορετικών υποτύπων.

4.5.5 Ανίχνευση υποτύπων με χρήση των επαναλήψεων CRISPR

Οι επαναλήψεις CRISPR (clustered regular interspaced short palindromic repeats) είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο DNA βακτηρίων, που δρουν ενάντια σε εισερχόμενα ξένα μόρια DNA, όπως το DNA βακτηριοφάγων και πλασμιδίων. Η ανάλυση των ενδιάμεσων αλληλουχιών μεταξύ των επαναλήψεων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του βακτηριακού υποτύπου τόσο σε θετικά όσο και σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Shariat & Dudley, 2014). Η ανάλυση της αλληλουχίας και ο καθορισμός του υποτύπου CRISPR μπορεί να γίνει με αλληλούχηση, με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο ή με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ανάλυση των αποτελεσμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (**Εικόνα 41**). Στην πρώτη περίπτωση, γίνεται αλληλούχηση όλης της περιοχής και καθορίζεται τόσο ο αριθμός των επαναλήψεων CRISPR, όσο και η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων των ενδιάμεσων περιοχών (**Εικόνα 41Α**). Στη δεύτερη περίπτωση, ο ιχνηθέτης της αντίδρασης σχεδιάζεται με τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδοποιείται πάνω σε μια περιοχή που διαφοροποιεί δύο στελέχη. Εφόσον η περιοχή είναι παρούσα, η ανάλυση δίνει σήμα, ενώ στην αντίθετη περίπτωση δεν ανιχνεύεται φθορισμός (**Εικόνα 41Β**). Τέλος, μπορεί να γίνει ανίχνευση του διαφορετικού αριθμού των επαναλήψεων CRISPR με βάση το μέγεθος της αντίστοιχης ζώνης DNA σε πήκτωμα αгарόζης (**Εικόνα 41Γ**).



Εικόνα 41. Ανίχνευση βακτηριακών υποτύπων με τη μέθοδο CRISPR. Από Shariat & Dudley, 2014.

Παραλλαγή της παραπάνω μεθοδολογίας αποτελεί η ανάλυση CRISPR-MVLST, η οποία συνδυάζει τη μέθοδο ανίχνευσης υποτύπων CRISPR με ταυτόχρονη ανάλυση αλληλουχιών σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους λοιμογονικότητας (multi-virulence-locus sequence typing, MVLST). Στην περίπτωση του βακτηρίου *Salmonella* αναλύονται τα γονίδια λοιμογονικότητας *fimH* και *sseL*. Σε μελέτη που έγινε με 400 απομονωμένα στελέχη, η μέθοδος CRISPR-MVLST ήταν ικανή να διακρίνει τους διαφορετικούς υπότυπους με ευαισθησία αντίστοιχη της μεθόδου με ηλεκτροφόρηση σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Shariat et al., 2013).

ΕΠΙΛΟΓΟΣ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η γρήγορη και υψηλής ευαισθησίας ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών του γάλακτος αποτελεί αναγκαία συνθήκη για την αποφυγή τροφιμογενών λοιμώξεων, ειδικά σε ευαίσθητες ομάδες πληθυσμών μικρής ηλικίας. Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για δεκαετίες, βασίζονται στην καλλιέργεια των παθογόνων σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα. Παρόλο που αυτές οι μέθοδοι είναι απλές και σχετικά χαμηλού κόστους, συνήθως είναι χρονοβόρες και δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε μικροοργανισμούς που δεν καλλιεργούνται στο εργαστήριο. Επιπλέον, συχνά αδυνατούν να διακρίνουν τους μικροοργανισμούς σε επίπεδο στελέχους.

Η ανάγκη για την ύπαρξη γρήγορων, ευαίσθητων μεθόδων ανίχνευσης υψηλής ακρίβειας οδήγησε στην ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων. Οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων αποτελούν μια αξιόπιστη εναλλακτική στις παραδοσιακές τεχνικές λόγω της υψηλής ευαισθησίας, εξειδίκευσης και της ακρίβειας των αποτελεσμάτων τους. Παρόλα αυτά, οι περισσότερες από αυτές προϋποθέτουν την ύπαρξη εκπαιδευμένου προσωπικού και μηχανημάτων και αντιδραστηρίων υψηλού κόστους, γεγονός που περιορίζει την εφαρμογή τους.

Κατά την επιλογή και την εφαρμογή μιας μοριακής μεθόδου ανίχνευσης πρέπει να ληφθούν υπόψη πολλές παράμετροι, όπως η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος, η επεξεργασία των νουκλεϊκών οξέων που αποτελούν στόχο και ο τρόπος ανίχνευσης του σήματος της αντίδρασης. Αυτά τα στάδια είναι κρίσιμα για την επιτυχή ανίχνευση, καθώς επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα, την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου. Η προετοιμασία του δείγματος συνήθως περιλαμβάνει φυγοκέντρηση ή/και μαγνητικό διαχωρισμό. Και οι δύο διαδικασίες επιτυγχάνουν το διαχωρισμό των παθογόνων από τα υπόλοιπα συστατικά, αλλά ταυτόχρονα επιμηκύνουν το χρόνο της μεθόδου και συντελούν σε μερική απώλεια των προς ανίχνευση παθογόνων, συνεπώς αποτελεί ζητούμενο η ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών μεθόδων προεπεξεργασίας του δείγματος στο μέλλον.

Οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης στηρίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων, επομένως η απομόνωσή τους αποτελεί επίσης έναν κρίσιμο παράγοντα για την επιτυχία της μεθόδου. Η συνήθης απομόνωση νουκλεϊκών οξέων περιλαμβάνει βράσιμο, έκλουση με κατάλληλους διαλύτες, χρήση μικρο-κολώνας χρωματογραφίας ή μαγνητικών σφαιριδίων. Η χρήση μικρο-κολώνας αποτελεί την πλέον συνήθη επιλογή λόγω του σχετικά χαμηλού κόστους και της

υψηλής καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων που προκύπτουν, αλλά είναι δύσκολη η εφαρμογή της σε μεγάλη κλίμακα. Η χρήση μαγνητικών σφαιριδίων αντιθέτως μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλη κλίμακα, αλλά συνεπάγεται αυξημένο κόστος αντιδραστηρίων.

Ο τρόπος ανίχνευσης του σήματος της μεθόδου μπορεί να περιλαμβάνει ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου, χρήση φθορισμού, ηλεκτροχημικών ή φωτομετρικών μεθόδων ανάλυσης. Η ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλές μοριακές μεθόδους, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της δυνατότητας καταγραφής του σήματος σε πραγματικό χρόνο.

Οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων που βασίζονται στην τεχνολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αποτελούν σήμερα την πιο δοκιμασμένη επιλογή, ειδικά για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών παθογόνων σε μία αντίδραση. Παρόλα αυτά, δεν μπορούν να εφαρμοστούν εκτός εργαστηρίου καθώς απαιτούν πολύπλοκη προετοιμασία δείγματος και χρήση θερμοκυκλοποιητή. Παραλλαγές της μεθόδου PCR που περιλαμβάνουν ανοσομαγνητικό διαχωρισμό, τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ή χρήση του συστήματος CRISPR/Cas βελτιώνουν το επίπεδο της ευαισθησίας και της ειδικότητας, αλλά απαιτούν εργαστηριακό προσωπικό υψηλής εξειδίκευσης. Η ποσοτική μέθοδος της RT-PCR διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα, αλλά απαιτεί τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς και μειονεκτεί όταν χρησιμοποιείται μη ειδική φθορίζουσα χρωστική που προσδένεται στο DNA. Η χρήση ειδικών ιχνηθετών βελτιώνει την εξειδίκευση της μεθόδου, αλλά αυξάνει το κόστος και την πολυπλοκότητα. Η μέθοδος της ψηφιακής PCR απαιτεί την εύρεση της κατάλληλης αραίωσης για την απόκτηση αξιόπιστων δεδομένων και τη χρήση μηχανημάτων υψηλού κόστους από προσωπικό υψηλής κατάρτισης, όπως και οι μέθοδοι αλληλούχησης επόμενης γενιάς. Αντιθέτως, η εφαρμογή των ισοθερμικών μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων προσφέρει μια απλούστερη εναλλακτική, καθώς δεν προϋποθέτει τη χρήση θερμοκυκλοποιητή αλλά μιας απλής συσκευής θερμοστατικής ρύθμισης της θερμοκρασίας. Από όλες τις ισοθερμικές μεθόδους, η μέθοδος LAMP έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτερα. Η μέθοδος LAMP έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ενίσχυσης, ευαισθησία και εξειδίκευση από την απλή PCR λόγω του μεγαλύτερου αριθμού των εκκινητών και επηρεάζεται λιγότερο από τα υπόλοιπα συστατικά του γάλακτος. Παρόλα αυτά, η αυξημένη ευαισθησία της μεθόδου αυξάνει την πιθανότητα ψευδώς θετικού αποτελέσματος λόγω αερομεταφερόμενης μόλυνσης του δείγματος και ο σχεδιασμός των εκκινητών είναι πολύπλοκος για μη καταρτισμένα άτομα. Επιπλέον, οι περισσότερες από τις ισοθερμικές μεθόδους δεν έχουν επικυρωθεί για όλα τα παθογόνα του γάλακτος.

Συμπερασματικά, η ιδανική μέθοδος ανίχνευσης των παθογόνων του γάλακτος είναι απλή, γρήγορη, ακριβής, ευαίσθητη, με υψηλή εξειδίκευση και χαμηλό κόστος εξοπλισμού και αναλωσίμων. Οι μοριακές μέθοδοι προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με παλαιότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους, αλλά η χρήση τους, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες, παραμένει περιορισμένη. Η βελτιστοποίηση κάθε βήματος στην εφαρμογή των μεθόδων αυτών θα συνεισφέρει στην ευρύτερη χρήση τους από τη βιομηχανία τροφίμων και από τους ελεγκτικούς μηχανισμούς, με στόχο τη διαφύλαξη της δημόσιας υγείας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AbdelHameed, K.G. (2016). Detection of *Prototheca zopfii* in raw milk and cheese with special reference to their antibiogram. *Journal for Food Safety*, 36, 214–219.
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42. doi:10.1042/BIO20200034
- Ahmed, A.M. & Shimamoto T. (2014). Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. *International Journal for Food Microbiology*, 168–169, 57–62.
- Ali, M. M., Li, F., Zhang, Z., Zhang, K., Kang, D.-K., Ankrum, J. A., Lem X.C. & Zhao, W. (2014). Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chemical Society Reviews*, 43(10), 3324.
- Allmann, M., Höfelein, C., Köppel, E., Lüthy, J., Meyer, R., Niederhauser, C., Wegmüller, B., & Candrian U. (1995). Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. *Research in Microbiology*, 146(1), 85-97.
- Almeida, C., Azevedo, N.F., Fernandes, R.M., Keevil, C.W. & Vieira, M.J. (2010). Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Salmonella* spp. in a broad spectrum of samples. *Applied Environmental Microbiology*, 76(13), 4476-4485.
- Almeida, C., Sousa, J.M., Rocha, R., Cerqueira, L., Fanning, S., Azevedo, N.F. & Vieira, M.J. (2013). Detection of *Escherichia coli* O157 by Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA-FISH) and comparison to a standard culture method. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 6293–6300.
- Amann, R. & Fuchs, B.M. (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 339-348.
- Amann, R.I., Krumholz, L. & Stahl, D.A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 172, 762-770.
- Andrews, N., McCabe, E., Wall, P., Buckley, J.F. & Fanning, S. (2023). Validating the utility of Multilocus Variable Number Tandem-repeat Analysis (MLVA) as a subtyping strategy to

- monitor *Listeria monocytogenes* in-built food processing environments. *Journal of Food Protection*, 86, 100147.
- Anis, E., Hawkins, I.K., Ilha, M.R.S., Woldemeskel, M.W., Saliki, J.T. & Wilkes, R.P. (2018). Evaluation of targeted next-generation sequencing for detection of bovine pathogens in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 56, 10.1128.
- Bai, Y., Cui, Y., Suo, Y., Shi, C., Wang, D. & Shi, X. (2019). A rapid method for detection of *Salmonella* in milk based on extraction of mRNA using magnetic capture probes and RT-qPCR. *Frontiers in Microbiology*, 10, 770.
- Bai, X., Wang, Z., Li, W., Xiao, F., Huang, J., Xu, Q. & Xu, H. (2022). Rapid and accurate detection for *Listeria monocytogenes* in milk using ampicillin-mediated magnetic separation coupled with quantitative real-time PCR. *Microchemical Journal*, 183, 108063.
- Basanisi, M.G., La Bella, G., Nobili, G., Raele, D.A., Cafiero, M.A., Coppola, R., Damato, A.M., Fraccalvieri, R., Sottili, R. & La Salandra, G. (2022). Detection of *Coxiella burnetti* DNA in sheep and goat milk and dairy products by droplet digital PCR in south Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 366, 109583.
- Becherer, L., Borst, N., Bakheit, M., Frischmann, S., Zengerle, R. & von Stetten, F. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Analytical Methods*, 12, 717-746.
- Bosward, K.L., House, J.K., Deveridge, A., Mathews, K. & Sheehy, P.A. (2016). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 2142-2150.
- Bu, Y., Qiao, W., Zhai, Z., Liu, T., Gong, P., Zhang, L., Hao, Y. & Yi, H. (2022). Establishment and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Pseudomonas fluorescens* in raw milk. *Frontiers in Microbiology*, 12, 810511.
- Carter, L., Garner, L., Smoot, J., Li, Y., Zhou, Q., Saveson, C., Sasso, J., Gregg, A., Soares, D., Beskid, T., Jervey, S. & Liu, C. (2020). Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. *ACS Central Science*, 6, 591-605.
- Chang, C-C., Chen, C-C., Shih-Chung, W, Lu, H-H., Liang, Y-H. & Lin, C-W. (2012). Diagnostic devices for isothermal nucleic acid amplification. *Sensors*, 12(6), 8319-8337.

- Charlarmroj, R., Makornwattana, M., Phuengwas, S., Meerak, J., Pichpol, D. & Karoonuthaisiri, N. (2019). DNA-based bead array technology for simultaneous identification of eleven foodborne pathogens in chicken meat. *Food Control*, 101, 81-88.
- Chen, K., Ma, B., Li, J., Chen, E., Xu, Y., Yu, X. et al. (2021). A rapid and sensitive europium nanoparticle-based lateral flow immunoassay combined with recombinase polymerase amplification for simultaneous detection of three food-borne pathogens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 4574.
- Choi, S-H. & Lee, S-B. (2011). Real time reverse transcriptase-PCR to detect viable Enterobacteriaceae in milk. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 31, 851-857.
- Claeys, W.L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck K. & Dierick K. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 31, 251e262.
- Claeys, W.L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K. et al. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: an evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, 42, 188–201.
- Cleven, B.E.E., Palka-Santini, M., Gielen, J., Meembor, S., Krönke M. & Krut, O. (2006). Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 2389-2397.
- Collins, F.S., Morgan, M. & Patrinos, A. (2003). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*, 300, 286–290.
- Costard, S., Espejo, L., Groenendaal, H., & Zagmutt, F. J. (2017). Outbreak-related disease burden associated with consumption of unpasteurized cow's milk and cheese, United States, 2009-2014. *Emerging Infectious Diseases*, 23, 957–996.
- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.-L., Barbier, G. & Le Blay, G. (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal for Food Microbiology*, 151, 247–251.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S. & Pace, N.R. (1989). Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, 243, 1360-1363.
- Ding, T., Suo, Y., Zhang, Z., Liu, D., Ye, X., Chen, S. & Zhao, Y. (2017). A multiplex RT-PCR assay for *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection in raw milk with pre-enrichment. *Frontiers in Microbiology*, 8, 989.

- Drabik, A., Bodzoń-Kuśakowska, A. & Silberring, A. (2016). Chapter 7: Gel electrophoresis. In *Proteomic profiling and analytical chemistry, 2nd Edition* (pp. 115-143).
- EC (European Commission). 2005. On strategy for setting microbiological criteria for food stuffs in community legislation. Ανακτήθηκε από https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/biosafety_fh_microbio_criteria-discussion_paper_en.pdf στις 21/11/2023.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., et al. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, 323, 133-138.
- Fang, Z., Zhou, X., Wang, X. & Shi, X. (2023). Development of a 3-plex droplet digital PCR for identification and absolute quantification of *Salmonella* and its two important serovars in various food samples. *Food Control*, 145, 109465.
- Faye, B. & Konuspayeva, G. (2012). The sustainability challenge to the dairy sector – the growing importance of non-cattle milk production worldwide. *International Dairy Journal*, 24, 50–56.
- Fusco, V. & Quero, G.M. (2014). Culture-dependent and culture-independent nucleic-acid-based methods used in the microbial safety assessment of milk and dairy products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 493-537.
- Gao, Y., Li, C., Wang, Y. & Yu, X. (2023). Functional rolling circle amplification-based sensitive determination and low-speed centrifugation-based isolation of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Analytical Science and Technology*, 14, 45.
- Giannino, M.L., Aliprandi, M., Feligini, M., Vanoni, L., Brasca, M. & Fracchetti, F. (2009). A DNA array based assay for the characterization of microbial community in raw milk. *Journal of Microbiological Methods*, 78, 181-188.
- Gordon, I. (2014). Chapter 9: Minerals and vitamins in milk and dairy products. In A. Kanekanian (Ed.), *Milk and dairy products as functional foods* (pp. 289-313). John Wiley and Sons, Ltd.
- Gore, H.M., Wakeman, C.A. & Hull, R.M. (2003). Real-time molecular beacon NASBA reveals *hblC* expression from *Bacillus* spp. in milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(2), 386-390.
- Grant, I.R., Ball, H.J. & Rowe, M.T. (1998). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3153-3158.
- Grützke, J., Gwida, M., Deneke, C., Brendebach, H., Projahn, M., Schattschneider, A., Hofreuter, D., El-Ashker, M., Malorny, B. & Al Dahouk, S. (2021). Direct identification and molecular

characterization of zoonotic hazards in raw milk by metagenomics using *Brucella* as a model pathogen. *Microbial Genomics*, 7, 000552.

Gunasekera, T.S., Veal, D.A. & Attfield, P.V. (2003). Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbial and somatic cell analyses of milk. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 269-279.

Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., Lake, R.J., Praet, N. et al. World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. (2015) World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS Medicine*, 12(12):e1001923.

He, G., Xu, D., Qin, H., Yang, S. & Xing, D. (2015). In vivo cell characteristic extraction and identification by photoacoustic flow cytography. *Biomedical Optics Express*, 6, 3748–3756.

Hennechart-Collette, C., Gonzalez, G., Fourniol, L., Fraisse, A., Beck, C., Moutailler, S., Bournez, L., Dheilly, N.M., Lacour, S.A., Lecollinet, S., Martin-Latil, S. & Perelle, S. (2022). Method for tick-borne encephalitis virus detection in raw milk products. *Food Microbiology*, 104, 104003.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*, 10, 413-417.

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. & Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'–3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7276–7280.

Hsu, S.C. & Tsen, H.Y. (2001) PCR primers designed from malic acid dehydrogenase gene and their use for detection of *Escherichia coli* in water and milk samples. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 1–11.

Hu, T., Chitnis, N., Monos, D. & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82, 801-811.

Hu, J., Huang, R., Sun, Y., Wei, X., Wang, Y., Jiang, C., Geng, Y., Sun, X., Jing, J., Gao, H., Wang, Z. & Dong, C. (2019). Sensitive and rapid visual detection of *Salmonella typhimurium* in milk based on recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks. *Journal of Microbiological Methods*, 158, 25-32.

- Huang, M., Liu, S., Xu, Y., Li, A., Wu, W., Liang, M., Niu, G., Wang, Z. & Wang, T. (2022). CRISPR/Cas12a technology combined with RPA for rapid and portable SFTSV detection. *Frontiers in Microbiology*, 13, 754995.
- Hunter, D.M. & Lim, D.V. (2010). Rapid detection and identification of bacterial pathogens by using an ATP bioluminescence immunoassay. *Journal of Food Protection*, 73, 739-746.
- Hyeon, J.-Y., Seo, K.-H., Chon, J.-W., Bae, D., Jeong, D. & Song, K.-Y. (2020). Accurate and rapid methods for detecting *Salmonella* spp. using polymerase chain reaction and aptamer assay from dairy products: a review. *Journal of Dairy Science and Biotechnology*, 38, 169-188.
- Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, M.W., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., Chaffron, S. et al. (2019). The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. *Food Microbiology*, 79, 96-115.
- Jain, M., Olsen, H.E., Paten, B. & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17, 239.
- Jiang, Y., Li, S., Qiu, Z., Le, T., Zou, S. & Cao, X. (2019). Rolling circle amplification and its application in microfluidic systems for *Escherichia coli* O157:H7 detections. *Journal of Food Safety*, 39, e12671.
- Kang, Y., Kang, C.-S. & Kim, C. (2019). History of nucleotide sequencing technologies: Advances in exploring nucleotide sequences from Mendel to the 21st century. *Horticultural Science and Technology*, 37, 549-558.
- Kapoor, S., Goel, A.D. & Jain, V. (2023). Milk-borne diseases through the lens of one health. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1041051.
- Khan, J.A., Rathore, R.S., Ahmad, I., Gill, R., Husain, F.M., Arshad, M., Alam, P., Albalawi, T. et al. (2022). Assessment of foodborne bacterial pathogens in buffalo raw milk using polymerase chain reaction based assay. *Foodborne Pathogens and Disease*, 19, 750-757.
- Law, J.W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan K.-G. & Lee, L.H. (2015). An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Frontiers in Microbiology*, 6:1227.
- Lei, S., Chen, S. & Zhong, Q. (2021). Digital PCR for accurate quantification of pathogens: Principles, applications, challenges and future prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 184, 750-759.

- Levy, S.E. & Myers, R.M. (2016). Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17, 95-115.
- Li, R., Wang, J., Sun, X., Liu, L., Wang, J. & Yuan, W. (2021). Direct and rapid detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk samples by Recombinase Polymerase Amplification assays. *Frontiers Cell Infectious Microbiology*, 11, 639083.
- Liu, J., Zhan, Z., Liang, T., Xie, G., Aguilar, Z.P. & Xu, H. (2020). Dual-signal amplification strategy: Universal asymmetric tailing-PCR triggered rolling circle amplification assay for fluorescent detection of *Cronobacter* spp. in milk. *Journal of Dairy Science*, 103, 3055–3065.
- Liu, L., Zhao, G., Li, X., Xu, Z., Lei, H. & Shen, X. (2022). Development of rapid and easy detection of *Salmonella* in food matrices using RPA-CRISPR/Cas12a method. *LWT*, 162, 113443.
- Liu, N., Zou, D., Dong, D., Yang, Z., Ao, D., Liu, W. & Huang, L. (2017). Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus*. *Scientific Reports*, 7, 45601.
- Luthra, R., Chen, H., Roy-Chowdhuri, S. & Singh, R.R. (2015). Next-Generation Sequencing in clinical molecular diagnostics of cancer: Advantages and Challenges. *Cancers (Basel)*, 7, 2023-2036.
- Martín, M.C., Martínez, N., del Rio, B., Ladero, V., Fernández, M. & Alvarez, M.A. (2010). A novel real-time polymerase chain reaction-based method for the detection and quantification of lactose-fermenting *Enterobacteriaceae* in the dairy and other food industries. *Journal of Dairy Science*, 93, 860-867.
- Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 74, 560-564.
- Mercanoglu Taban, B., Ben, U. & Aytac, S.A. (2009). Rapid detection of *Salmonella* in milk by combined immunomagnetic separation-polymerase chain reaction assay. *Journal of Dairy Science*, 92, 2382-2388.
- Murphy, S.C. & Boor, K.J. (2000). Sources and causes of high bacteria counts in raw milk: an abbreviated review. *Dairy, Food, Environmental Sanitation*, 20, 1–4.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Aroca, M.J. & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231-250.

- Ndraha, N., Lin, H.Y., Wang, C.Y., Hsiao, H.I. & Lin, H.J. (2023). Rapid detection methods for foodborne pathogens based on nucleic acid amplification: Recent advances, remaining challenges, and possible opportunities. *Food Chemistry (Oxf)*, 7, 100183.
- Noppakudritidej, P., Charlermroj, R., Makornwattana, M., Kaew-amdee, S., Waditee-Sirisattha, R., Vilaivan, T., Praneenarat, T. & Karoonuthaisiri, N. (2023). Development of peptide nucleic acid-based bead array technology for *Bacillus cereus* detection. *Scientific Reports*, 13, 12482.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63.
- Oliveira, B.B., Veigas, B. & Baptista, P.V. (2021). Isothermal amplification of nucleic acids: the race for the next “gold standard”. *Frontiers in Sensors*, 2, 752600.
- Oliver, J.D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 415-425.
- Öngör, H., Çetinkaya, B., Açıık, M.N., Karahan, M. & Bulut, H. (2004). Detection of *Chlamydophila abortus* in ovine milk by immunomagnetic separation–polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 51, 43-45.
- Porcellato, D., Narvhus, J. & Skeie, S.B. (2016). Detection and quantification of *Bacillus cereus* group in milk by droplet digital PCR. *Journal of Microbiology Methods*, 127, 1-6.
- Prasad, M.C.B., Milton, A.A.P., Menon, V.K., Ghatak, S., Srinivas, K., Momin, K.M., Vineesha, S.L., Das, S., Sen, A., Latha, C., Sunil, B. & Jolly, D. (2023). Saltatory rolling circle amplification assay for simple and visual detection of *Listeria monocytogenes* in milk and milk products. *International Dairy Journal*, 137, 105498.
- Pryor, R.J. & Wittwer, C.T. (2006). Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Methods in Molecular Biology*, 336, 19-32.
- Qin, H., Shi, X., Yu, L., Li, K., Wang, J., Chen, J., Yang, F., Xu, H. & Xu, H. (2020). Multiplex real-time PCR coupled with sodium dodecyl sulphate and propidium monoazide for the simultaneous detection of viable *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in milk. *International Dairy Journal*, 108, 104739.
- Rajapaksha, P., Elbourne, A., Gangadoo, S., Brown, R., Cozzolino, D. & Chapman, J. (2019). *Analyst*, 144, 396-411.

- Rames, E.K. & MacDonald, J. (2019). Rapid assessment of viral water quality using a novel recombinase polymerase amplification test for human adenovirus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 8115-8125.
- Rasooly, A. & Herold, K.E. (2008). Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5, 531-550.
- Robinson, T.J., Scheftel, J.M. & Smith, K.E. (2014). Raw milk consumption among patients with non-outbreak-related enteric infections, Minnesota, USA, 2001–2010. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 38–44.
- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B. & Barrett, T.J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3, 59-67.
- Ricci, A., Koutsoumanis, K.P., Nørrung, B. et al. EFSA panel on biological hazards. (2015). Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA Journal*, 13, 3940, 95 pp.
- Rodríguez-Lázaro, D., Lloyd, J., Herrewegh, A., Ikonopoulou, J., D'Agostino, M., Pla, M. & Cook, N. (2004). A molecular beacon-based real-time NASBA assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 119–126.
- Rohde, A., Hammerl, J.A., Appel, B., Dieckmann, R. & Al Dahouk, S. (2015). FISHing for bacteria in food - A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria? *Food Microbiology*, 46, 395-407.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K. et al. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17, 37–45.
- Roy, D., Ye, A., Moughan, P.J. & Singh, H. (2020). Composition, structure, and digestive dynamics of milk from different species—a review. *Frontiers in Nutrition*, 7, 577759.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350–1354.

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463-5467.
- Shariat, N. & Dudley, E.G. (2014). CRISPRs: Molecular signatures used for pathogen subtyping. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 430-439.
- Shariat, N., Sandt, C.H., DiMarzio, M.J., Barrangou, R. & Dudley, E.G. (2013). CRISPR-MVLST subtyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Heidelberg and application in identifying outbreak isolates. *BMC Microbiology*, 13, 254.
- Shen, C-H. (2019). Chapter 9: Amplification of Nucleic Acids. In *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 215-247). Academic Press.
- Shome, B.R., Das Mitra, S., Bhuvana, M., Krithiga, N., Velu, D., Shome, R., Isloor, S., Barbuddhe, S.B. & Rahman, H. (2011). Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 1349-1356.
- Sint, D., Raso, L. & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 898-905.
- Soroka, M., Wasowicz, B. & Rymaszewska, A. (2021). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): The better sibling of PCR? *Cells*, 10(8), 1931.
- Srimongkol, G., Ditmangklo, B., Choopara, I., Thaniyavarn, J., Dean, D., Kokpol, S., Vilaivan, T. & Somboonna, N. (2020). Rapid colorimetric loop-mediated isothermal amplification for hypersensitive point-of-care *Staphylococcus aureus* enterotoxin A gene detection in milk and pork products. *Scientific Reports*, 10, 7768.
- Sudhakaran, A.V. & Santosh, A. (2020). Approaches for detection of dairy microorganisms: An update. In Minj J., Sudhakaran A.V., Kumari A. (Eds.), *Dairy processing: Advanced research to applications* (pp 217-242). Springer. doi: 10.1007/978-981-15-2608-4
- Tang, S., Orsi, R.H., Luo, H., Ge, C., Zhang, G., Baker, R.C., Stevenson, A. & Wiedmann M. (2019). Assessment and comparison of molecular subtyping and characterization methods for *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1591.
- Tao, Y., Yun, J., Wang, J., Xu, P., Li, C., Liu, H., Lan, Y., Pan, J. & Du, W. (2020). High-performance detection of *Mycobacterium bovis* in milk using digital LAMP. *Food Chemistry*, 327, 126945.

- Taylor, E.V., Herman, K.M., Ailes, E.C., Fitzgerald, C., Yoder, J.S., Mahon, B.E. & Tauxe, R.V. (2013). Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997–2008. *Epidemiology and Infection*, 141, 987–996.
- Tian, Y., Liu, T., Liu, C., Xu, Q., Fang, S., Wu, Y., Wu, M. & Liu, Q. (2021). An ultrasensitive and contamination-free on-site nucleic acid detection platform for *Listeria monocytogenes* based on the CRISPR-Cas12a system combined with recombinase polymerase amplification. *LWT*, 152, 112166.
- Tyagi, S. & Kramer, F.R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 14, 303–308.
- Uyttendaele, M., Schukink, R., van Gemen, B. & Debevere, J. (1994). Development of NASBA, a nucleic acid amplification system, for identification of *Listeria monocytogenes* and comparison to ELISA and a modified FDA method. *International Journal of Food Microbiology*, 27, 77–89.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K. & Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, 28, 232–254.
- Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., Uyttendaele, M. & Herman, L. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*, 50, 32–44.
- Vilaivan, T. & Srisuwannaket, C. (2006). Hybridization of pyrrolidinyl peptide nucleic acids and DNA: selectivity, base-pairing specificity, and direction of binding. *Organic Letters*, 8, 1897–1900.
- Wang, Z., Cai, R., Gao, Z., Yuan, Y. & Yue, T. (2020). Immunomagnetic separation: An effective pretreatment technology for isolation and enrichment in food microorganisms detection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3802–3824.
- Wiedmann, M. (2002). Subtyping of bacterial foodborne pathogens. *Nutrition Reviews*, 60, 201–208.
- Wood, S.A., Smith, K.F., Banks, J.C., Tremblay, L.A., Rhodes, L., Mountfort, D., Cary, S.C. & Pochon, X. (2013). Molecular genetic tools for environmental monitoring of New Zealand's aquatic habitats, past, present and the future. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 47(1), 90–119.

- Xu, J., Ma., J., Li, Y., Kang, L., Yuan, B., Li, S., Chao, J., Wang, L., Wang, J, Su, S. & Yuan, Y. (2022). A general RPA-CRISPR/Cas12a sensing platform for *Brucella* spp. detection in blood and milk samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 364, 131864.
- Yan, B., Zhao, F., Bi, Y., Xiang, L. & Jiang, Y. (2009). Detection of viable *Listeria monocytogenes* in dairy products by real time reverse-transcription PCR. 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. doi: 10.1109/ICBBE.2009.5162613
- Yang, Q., Zhang, Y., Li, S., Lu, X., Yuan, Y. & Zhang, W. (2019). Saltatory rolling circle amplification for sensitive visual detection of *Staphylococcus aureus* in milk. *Journal of Dairy Science*, 102(11), 9702-9710.
- Yang, W., Song, X., Wang, J., Li, Z., Ji, M. & Li, Y. (2014). Detection methods for milk pathogenic bacteria by loop-mediated isothermal amplification. *BioScience Trends*, 8(6), 316-321.
- Zastempowska, E., Grajewski, J. & Twaruzek, M. (2016). Food-borne pathogens and contaminants in raw milk – a review. *Annals of Animal Science*, 16(3), 623-639.
- Zhang, L., Wei, Q., Han, Q., Che, Q., Tai, W., Zhang, J., Song, Y. & Xia, X. (2018). Detection of *Shigella* in milk and clinical samples by magnetic immunocaptured-loop-mediated isothermal amplification assay. *Frontiers in Microbiology*, 9, 94.
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M. & Neužil, P. (2020). PCR past, present and future. *Biotechniques*, 69, 317-325.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.