



**Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας
Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση**

**Διπλωματική Εργασία
Μοριακές Μέθοδοι Ανίχνευσης Παθογόνων Στα Τρόφιμα**

ΙΦΙΓΕΝΕΙΑ ΣΜΑΡΝΑΚΗ

Επιβλέπων καθηγητής: ΣΟΥΛΤΑΝΑ ΜΑΡΚΟΠΟΥΛΟΥ

Πάτρα, Ιούνιος 2023

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή/της φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο/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 του/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 του/της συγγραφέα/δημιουργού. Ο/Η συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



« Μοριακές Μέθοδοι Ανίχνευσης Παθογόνων Στα Τρόφιμα »

«ΙΦΙΓΕΝΕΙΑ ΣΜΑΡΝΑΚΗ»

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας
Επιβλέπων Καθηγητής:
«Σουλτάνα Μαρκοπούλου»
«Μέλος ΣΕΠ ΕΑΠ»

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:
««Αικατερίνη Κωνσταντίνου »
«Μέλος ΣΕΠ ΕΑΠ »

Πάτρα, «Ιούνιος» «2023»

Περίληψη

Η τροφή και το νερό είναι οι βασικοί παράγοντες της ζωής. Με την κατανάλωση, όμως αυτών μπορεί ο άνθρωπος να οδηγηθεί σε λοιμώδεις καταστάσεις οι οποίες ονομάζονται τροφιμογενής ή υδατογενείς λοιμώξεις. Τα παθογόνα που μπορούν να προκαλέσουν αυτές τις μολύνσεις είναι παράσιτα, βακτήρια, ιοί, τοξίνες και κατάλοιπα από φάρμακα τα οποία μπορεί να έχει έρθει σε επαφή το τρόφιμο στην αρχική μορφή του. Τα συμπτώματα που προκαλούν αυτά τα παθογόνα είναι κυρίως γαστροεντερικές διαταραχές και πυρετός αλλά μπορούν να προκαλέσουν και πολύ πιο σοβαρά προβλήματα όπως νευρικές διαταραχές και επικίνδυνες επιπλοκές που μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και στο θάνατο. Τα παθογόνα μπορούν να προσβάλουν τον άνθρωπο μέσω την κατανάλωση ποικίλων τροφίμων όπως κακώς μαγειρεμένο κρέας, ωμά λαχανικά τα οποία δεν έχουν πλυθεί επαρκώς, θαλασσινά προϊόντα και έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα. Για την ανίχνευση αυτών των παθογόνων και γενικά των αιτιών που προκαλούν τροφιμογενείς λοιμώξεις, έχει αναπτυχθεί ένα αριθμός μοριακών μεθόδων ανά τα χρόνια, όπως η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) και μέθοδοι που στηρίζονται πάνω σε αυτή, ο Ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (ELISA) το στύπωμα κατά Western (Western Blot) και άλλες που προσφέρουν γρήγορη και αποτελεσματική ανίχνευση και ταυτοποίηση των παθογόνων όχι μόνο στα τρόφιμα αλλά και στα σκευή ή τα μηχανήματα τα οποία χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία τους όπως και σε δείγματα από ασθένειες. Το αποτέλεσμα της χρήσης των μοριακών τεχνικών είναι να γίνει η τροφή ασφαλέστερη για κατανάλωση αλλά και να κατανοήσουμε τη δράση των παθογόνων και ποια από αυτά είναι πιο επικίνδυνα για τον άνθρωπο. Επίσης, μας οδηγούν στην ανάγκη εύρεσης θεραπειών και τρόπων πρόληψης των τροφικών δηλητηριάσεων.

Λέξεις-Κλειδιά

Τροφιμογενής λοίμωξη, ασφάλεια τροφίμων, μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης, παθογόνα

Molecular Methods for the Detection of Pathogens in Food

Ifigeneia Smarnakis

Abstract

Food and water are the basic life factors. Although, by consuming of those two, humans can be led into pathogenic situations which are called foodborne and waterborne diseases. The pathogens which can cause such diseases can be parasites, bacteria, viruses, toxins or drug residues to which the food may be exposed in some cases. Those pathogens usually cause gastroenteric disturbances, fever, but also, they can be the reason for sever neurological situations and other side effects that can be fatal. Consumers can be infected by eating various foods like non-well-cooked meat, raw or not well washed vegetables, seafood and ready to eat meals. For the detection of those pathogens, a number of molecular methods of detection have been developed through the years, like Polymerase Chain Reaction (PCR) and its alternatives, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Western Blot and others, which offer fast and effective detection and identification of the such pathogens, not only in food but also in the equipment or machinery used to process it, as well as in samples from diseased human samples. As a results, the development of molecular methods, helps to make food safer for consumption but, also, provides information for the pathogen's action and which of them are more dangerous for humans. The methods, also, lead us to the need to find new treatments and ways to prevent food poisoning.

Keywords

Foodborne diseases, food safety, molecular methods of detection, pathogens

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	iv
Abstract.....	v
Κατάλογος εικόνων/πινάκων.....	viii
Συντομογραφίες.....	ix
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Παθογόνα.....	14
1.1.1 Salmonella.....	14
1.1.2 Νοροϊός (NoV).....	15
1.1.3 Escherichia Coli.....	16
1.1.4 Campylobacter.....	18
1.1.5 Clostridium.....	19
1.1.6 Staphylococcus aureus.....	21
1.1.7 Hepatitis A.....	22
1.1.8 Toxoplasma gondii.....	23
1.2 Νερό.....	25
1.2.1 Πρωτόζωα/Παράσιτα.....	26
1.2.2 Βακτήρια.....	26
1.2.3 Ιοί.....	27
1.3 Εξάρσεις (Outbreaks).....	28
1.3.1 1985.....	28
1.3.2 1994.....	28
1.3.3 2005.....	29
1.3.4 2008.....	29
1.3.5 2009.....	29
1.3.6 2010.....	30
1.3.7 2012.....	30
1.3.8 2015.....	30
1.3.9 2019.....	31
1.3.10 2021	31
1.3.11 2022.....	31
2. Σκοπός.....	33
3. Μεθοδολογία.....	33

4. PCR (polymerase chain reaction).....	34
4.1 Real time/Quantitative PCR.....	36
4.2 Multiplex PCR.....	37
4.3 Digital PCR.....	38
5. ELISA.....	39
3.1 Direct ELISA.....	41
3.2 Indirect ELISA.....	42
3.3 Sandwich ELISA.....	42
3.4 Competitive ELISA.....	43
6. NGS (Next Generation Sequencing).....	45
7. Western Blot.....	49
8. Τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων.....	51
8.1 LAMP.....	51
8.2 NASBA.....	52
9. DNA Microarrays.....	54
10. Επίλογος-Συμπεράσματα.....	57
Βιβλιογραφία.....	59

Κατάλογος Εικόνων / Πινάκων

Εικόνα 1 Επιδημιολογικός χάρτης τροφιμογενών και υδατογενών εξάρσεων στην Ελλάδα 2004-2020.....	σελ.11
Εικόνα 2 <i>Salmonella</i> κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	σελ.13
Εικόνα 3 Νοροϊός κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	σελ.14
Εικόνα 4 <i>Escherichia Coli</i>	σελ.16
Εικόνα 5 Καμπυλοβακτηρίδιο σε οπτικό μικροσκόπιο βαμμένο με χρώση gram	σελ.18
Εικόνα 6 Αποικία <i>C.botulinum</i> σε blood agar medium.....	σελ.19
Εικόνα 7 <i>S.aureus</i> κάτω από οπτικό μικροσκόπιο. Το χρώμα του είναι μωβ λόγω της χρώσης gram.....	σελ.20
Εικόνα 8 Ιός Ηπατίτιδα Α κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	σελ.21
Εικόνα 9 <i>Toxoplasma Gondii</i>	σελ.22
Εικόνα 10. Μικροσκοπική εικόνα παθογόνων.....	σελ.24
Εικόνα 11 Τα βήματα της PCR.....	σελ.33
Εικόνα 12 Γέλη Αγαρόζης.....	σελ.34
Εικόνα 13 Q1000+ REAL TIME PCR SYTEM, Wuhan Bonnin Technology Ltd, Laboratory Instruments Expert In China.....	σελ.35
Εικόνα 14 Βήματα Digital PCR.....	σελ.37
Εικόνα 15. ELISA, Παραγωγή έγχρωμου προϊόντος.....	σελ.39
Εικόνα 16 Τύποι ELISA.....	σελ.40
Εικόνα 17 Λειτουργία Sandwich ELISA.....	σελ.42
Εικόνα 18. Η τεχνική Sanger σε 7 βήματα.....	σελ.45
Εικόνα 19 Western Blot μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη.....	σελ.49
Εικόνα 20 LAMP - Loop-mediated isothermal amplification.....	σελ.51
Εικόνα 21 Μικροσυστοιχίες – οπτικό αποτέλεσμα πάνω σε γυαλί.....	σελ.53
Πίνακας i Τρόφιμα υπεύθυνα για τροφική δηλητηρίαση και τα παθογόνα που συχνά απομονώνονται από αυτά	σελ 12
Πίνακας ii Παθογόνα και υδατογενείς λοιμώξεις.....	σελ 26
Πίνακας iii Μέθοδοι και παθογόνα.....	σελ 55

Συντομογραφίες

Ab: αντίσωμα

Ag: αντιγόνο

AdV: αδενοϊός

BoNT: αλλαντοτοξίνη

dPCR: Digital PCR

E: ένζυμο

EAEC: εντεροσυσσωρευτική *E. coli*

EFSA: European Food Safety Authority

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EPEC: εντεροπαθογενείς *E. coli*

ETEC: εντεροτοξιγονική *E. Coli*

FDA: Food and Drug Administration

FERG: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group

FIP: fecal indicator bacteria

HAV: Hepatitis A

LAMP: Loop-mediated isothermal amplification

LT: Θερμικά Ασταθής Εντεροτοξίνη

mPCR: Multiplex PCR

NASBA: Nucleic acid sequence-based amplification

NGS: Next Generation Sequencing

NTS: Nontyphoidal Salmonella infections

PCR: Polymerase Chain Reaction

p-ELISA: paper-based ELISA

qPCR: Real-Time / Quantitative PCR

S: υπόστρωμα

SE: εντεροτοξίνη *S. aureus*

SEA: εντεροτοξίνης A του *S. Aureus*

ST: Θερμοσταθερή Εντεροτοξίνη

STEC/ EHEC: εντεροαιμορραγική *E. coli*

WB: Western Blot

WHO: World Health Organization

NoV: Norovirus

ΕΟΔΥ: Εθνικός Οργανισμός Υγείας

ΕΦΕΤ: Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων

1. Εισαγωγή

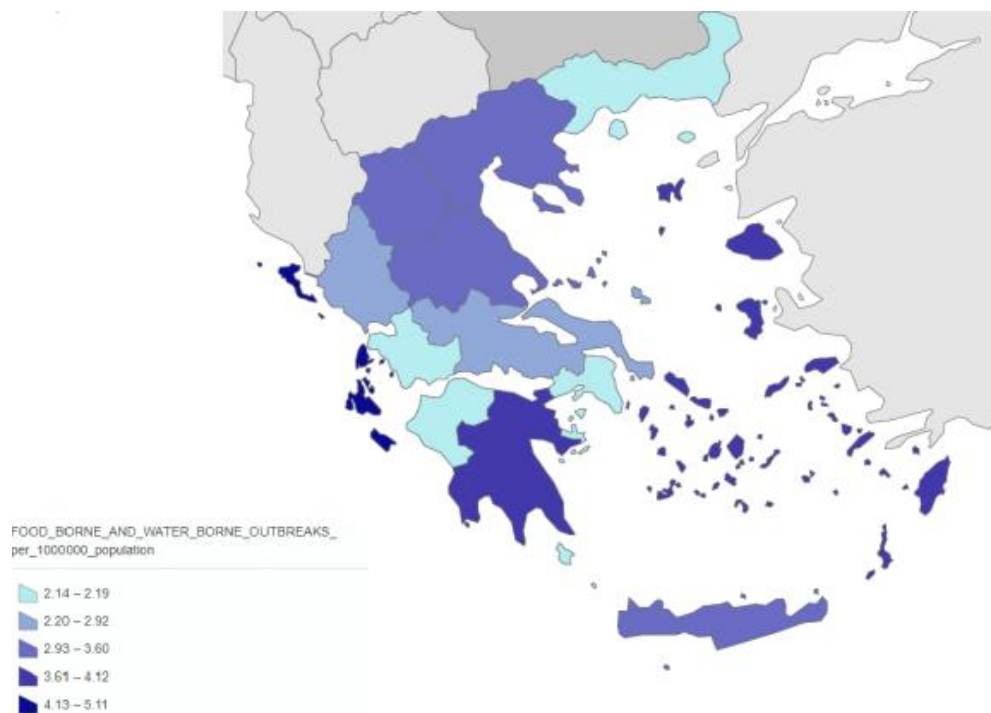
Η τροφή και το νερό είναι οι βασικοί παράγοντες για την επιβίωση ένας έμβιου οργανισμού. Μέσω όμως της τροφής, ένας άνθρωπος μπορεί να οδηγηθεί σε παθολογικές καταστάσεις με απρόβλεπτα αποτελέσματα για την υγεία. Για να αποφευχθούν τέτοιου είδους καταστάσεις έχουν αναπτυχθεί και συνεχίζουν να εξελίσσονται, εργαστηριακές μοριακές τεχνικές με σκοπό την ανίχνευση και την ταυτοποίηση παθογόνων κάθε τύπου σε προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από το κοινό, πριν ή μετά την επεξεργασία τους, στις συσκευασίες αυτών αλλά και στα παράγωγα της πέψης της τροφής. Επίσης, σε όλο τον κόσμο μπορούμε να συναντήσουμε οργανισμούς και νομοθεσίες, οι οποίοι φροντίζουν να διασφαλίσουν την ασφάλεια των τροφίμων. Κάποιοι από αυτούς είναι ο Οργανισμός Τροφίμων Και Φαρμάκων Στην Αμερική (FDA- Food and Drug Administration), η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA-European Food Safety Authority) και για την Ελλάδα ο ΕΦΕΤ (Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων). Η υπηρεσία FERG (Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group) του WHO (World Health Organization) δημοσίευσε το 2015 την πρώτη αναφορά η οποία αφορούσε τις τροφιμογενείς μολύνσεις σε παγκόσμιο επίπεδο, με αριθμό λοιμώξεων που άγγιζε τα 600 εκατομμύρια και αριθμό θανάτων 420.000 να έχουν σημειωθεί μόνο σε ένα χρόνο. Στις μετρήσεις αυτές τα νούμερα ανέβαζαν πάρα πολύ οι άνθρωποι οι οποίοι ανήκαν σε ευπαθείς ομάδες και ιδιαίτερα τα παιδιά κάτω των 5 ετών, όπως και οι κάτοικοι των αναπτυσσόμενων χωρών [1].

Ως τροφιμογενείς νόσοι ονομάζονται οι ασθένειες οι οποίες προκαλούνται από βακτήρια, ιούς, παράσιτα ή χημικές ουσίες που έχουν μολύνει ένα τρόφιμο . Σε βάθος χρόνων, έχουν σημειωθεί πάνω από 200 τέτοιου είδους ασθένειες προκαλούμενες από όλους τους προαναφερθέντες παράγοντες. Μεγάλο πρόβλημα αποτελούν οι τροφικές δηλητηριάσεις στις ομάδες των παιδιών κάτω των 5 ετών διότι 125.00 θάνατοι ετησίως αφορούν αυτά. Επίσης, στις αναπτυσσόμενες χώρες λόγω την κακής οικονομίας και των χαμηλών εισοδημάτων των κατοίκων, οι νόσοι τέτοιου είδους αποτελούν μείζον θέμα της δημόσιας υγείας [1]. Σύμφωνα με τον FDA, σαν έξαρση τροφιμογενών ασθενειών ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία δύο άνθρωποι και άνω, μολύνονται και νοσούν έχοντας καταναλώσει το ίδιο τρόφιμο [2].

Ένα τρόφιμο για να φτάσει στην κατανάλωση, θα πρέπει πρώτα να έχει περάσει από κάποια συγκεκριμένη επεξεργασία. Η μόλυνση του τροφίμου μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε στιγμή της επεξεργασίας, της παρασκευής ή της συσκευασίας του. Εάν το τρόφιμο μολυνθεί και καταναλωθεί, ο καταναλωτής οδηγείται σε παθολογικές καταστάσεις, με την πιο συνηθισμένη να είναι γαστρεντερολογική διαταραχή. Άλλου τύπου παθολογικές καταστάσεις που μπορεί να οδηγηθεί είναι νευρολογικές, γυναικολογικές, ανοσολογικές έως και σε καρκίνο [1].

Η *Salmonella*, το *Campylobacter* και η *E.Coli* αποτελούν τρία από τα κυριότερα παθογόνα που προκαλούν τροφική δηλητηρίαση στον άνθρωπο, με παρόμοια συμπτώματα όπως διάρροια, εμετό, πυρετό και πόνους στο στομάχι. Η *Listeria* αποτελεί απειλή για μια γυναίκα σε περίοδο εγκυμοσύνης διότι μπορεί να την οδηγήσει σε αποβολή του εμβρύου και επίσης μπορεί να αποβεί θανατηφόρα για άτομα πολύ μεγάλης ή πολύ μικρής ηλικίας. Το *Vibrio cholerae* μολύνει τον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης θαλασσινών, λαχανικών και άλλων τροφίμων προκαλώντας πόνο στο στομάχι, εμετό και διάρροια. Επίσης, ιοί και παράσιτα προκαλούν στον άνθρωπο έντονο εμετό, υδαρή διάρροια, πόνους στο στομάχι και άλλες επιπλοκές. Παράσιτα τέτοιου τύπου είναι το *Cryptosporidium* και ο *Echinococcus spp.* Τέλος ιοί οι οποίοι συχνά είναι υπαίτιοι για τις τροφιμογενείς νόσους στον άνθρωπο είναι ο *Norovirus* και ο ιός της ηπατίτιδας τύπου Α [1].

Σύμφωνα με τον Εθνικό Οργανισμό Υγείας (ΕΟΔΥ), στην Ελλάδα την περίοδο 2004 με 2020 σημειώθηκαν συνολικά 531 εξάρσεις οι οποίες οφειλόταν σε παθογόνα τα οποία μολύναν τον άνθρωπο μέσω της τροφής ή του νερού. Τα περισσότερα περιστατικά τροφιμογενών και υδατογενών εξάρσεων σημειώθηκαν, στο σύνολο, στα νησιά του Ιονίου πελάγους και τα λιγότερα περιστατικά σημειώθηκαν στην περιοχή της Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης (εικόνα 1) και τα συνηθέστερα παθογόνα τα οποία απομονώθηκαν ήταν *Salmonella spp.*, Hepatitis A virus, norovirus και rotavirus. Το 1,9% των περιπτώσεων είχαν άμεση σχέση με ταξίδια (νόσος των ταξιδιωτών), το 93% είχαν σχέση με την κατανάλωση μολυσμένου ή ακάθαρτου φαγητού και το 7% είχαν σχέση με την κατανάλωση μολυσμένου νερού. Τέλος τα συνηθέστερα μέσα διασποράς των παθογόνων ήταν τα αυγά, τα πουλερικά και τα γαλακτοκομικά [120].



Εικόνα 22 Επιδημιολογικός χάρτης τροφιμογενών και υδατογενών εξάρσεων στην Ελλάδα 2004-2020 [120]

Στον παρακάτω πίνακα i παραθέτοντας τα τρόφιμα τα οποία είναι οι κύριες αιτίες που οδηγούν σε τροφική δηλητηρίαση και τα παθογόνα που κυρίως ανιχνεύονται σε αυτά:

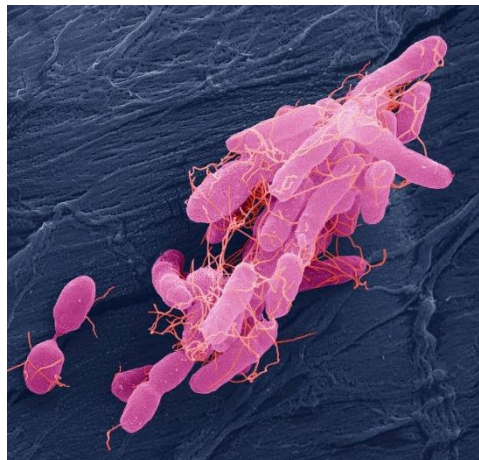
Πίνακας i Τρόφιμα υπεύθυνα για τροφική δηλητηρίαση και τα παθογόνα που συχνά απομονώνονται από αυτά
[1,3, 26, 37, 52, 54, 60, 90, 106, 122]

<u>Τρόφιμο</u>	<u>Παράγοντας μόλυνσης</u>
Αβγό (ωμό)	<i>Salmonella, E. coli, Listeria</i>
Κρέας χοιρινό-μοσχαρίσιο (ωμό ή κακώς μαγειρεμένο)	<i>Salmonella, Campylobacter, Listeria, Viruses, E. coli, Echinococcus,</i>
Πουλερικά (ωμό ή κακώς μαγειρεμένο)	<i>Campylobacter, Salmonella, Listeria, Viruses, Clostridium</i>
Γάλα (απαστερίωτο ή παστεριωμένο)	<i>Campylobacter, E. coli, Listeria, Salmonella, Staphylococcus</i>
Οστρακοειδή/ Μαλάκια	<i>Viruses (Norovirus, Hepatitis A), Bacterial toxins, Vibrio, Toxoplasma, Clostridium, Listeria</i>
Λαχανικά/ Φρούτα	<i>Salmonella, Toxoplasma, C. Botulinum, E. coli, Vibrio cholerae, Cryptosporidium, Staphylococcus</i>
Τρόφιμα με πολλά συστατικά και ready to eat προϊόντα (πχ. σοκολάτα, προϊόντα αρτοποιίας, γεύματα από μπουφέ, σάντουιτς κ.α.)	<i>Salmonella, norovirus, E. coli, Listeria, Echinococcus, Cyclospora, Cryptosporidium, Staphylococcus, Clostridium</i>

1.1 Παθογόνα

1.1.1 Salmonella

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα i, ο νούμερο ένα παθογόνος παράγοντας ο οποίος συναντάμε σε μολύνσεις, οι οποίες προέρχονται από όλα τα τρόφιμα είναι η *Salmonella*. Η *Salmonella* ανήκει στην οικογένεια των εντεροβακτηρίων και είναι ένας gram αρνητικός βάκιλος, προαιρετικά αναερόβιος (εικόνα 2) . Η παρουσία του βακτηρίου μετράει 139 χρόνια μιας και πρωτοταυτοποιήθηκε το 1884 [58].



Εικόνα 23 *Salmonella* κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [75]

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος μετάδοσης και εξάπλωσης αυτού του παθογόνου είναι η κατάποση μολυσμένου φαγητού, όπως ωμά αυγά, ατελώς ψημένο κρέας, κυρίως κοτόπουλο, και ωμά λαχανικά [60]. Ετησίως σημειώνονται 2.8 δισεκατομμύρια περιπτώσεις διαρροϊκών παθήσεων λόγω μόλυνσης από Σαλμονέλα, όπως επίσης κατά προσέγγιση 600.000 περιπτώσεις θανάτων [61].

Ο άνθρωπος ο οποίος έχει μολυνθεί από κάποιον ορότυπο Σαλμονέλας μπορεί να παρουσιάσει

- 1) Τυφοειδή πυρετό ο οποίος προκαλείται από τη *S. Typhi*
- 2) Παρατυφοειδή πυρετό ο οποίος προκαλείται από τη *S. Paratyphi*
- 3) NTS (Nontyphoidal *Salmonella* infections) μη τυφοειδής μόλυνση που προκαλείται από τις *S. Typhimurium*, και *S. Enteritidis*, *S. Newport* και *S. Heidelberg*

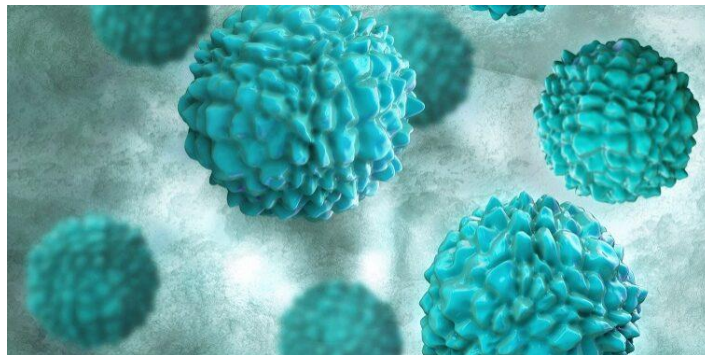
Οι δύο πρώτες μολυσματικοί νόσοι προκαλούν στον ασθενή γαστροεντερίτιδα και μπορούν επίσης να προκαλέσουν πολλές δυσάρεστες επιπλοκές όπως λευκοπενία, νευρολογικά προβλήματα και σηψαιμία. Επίσης είναι υπεύθυνες για τον μεγαλύτερο ποσοστό των θανάτων [62]. Για την αντιμετώπιση αυτών των παθολογικών καταστάσεων και την αποφυγή των έως και θανατηφόρων επιπλοκών χορηγούνται αντιβιοτικά όπως η κεφιζίμη, η χλωραμφενικόλη, η αμοξικιλίνη και άλλα [63].

Η NTS είναι μη θανατηφόρα για τον άνθρωπο, σε τεράστιο ποσοστό των προπτώσεων και τα συμπτώματά της είναι η γαστρεντερίτιδα και η βακτηραιμία. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά μόνο σε περίπτωση που ο ασθενής εμφανίσει κάποια επιπλοκή. Τέτοια αντιβιοτικά είναι η ιπροφλοξασίνη, η κεφτριαξόνης και η αμπικιλλίνη [62].

1.1.2 Νοροϊός (NoV)

Ένα ακόμα παθογόνο που κατέχει υψηλή θέση στο βάθρο των αιτιών των τροφιμογενών μολύνσεων είναι ο Νοροϊός (NoV).

Ο ανθρώπινος Νοροϊός (HNoV), ανήκει στην οικογένεια *Caliciviridae* και ταξινομείται σε γένος *Norovirus*. Οι HNoVs είναι μικροί σε μέγεθος, σε στρογγυλό σχήμα και φέρουν γραμμικό, μονόκλωνο RNA ως γενετικό υλικό (εικόνα 3). Υπάρχουν 7 γονότυποι του ιού, από τους οποίους οι 3 προσβάλλουν τον άνθρωπο και αυτοί είναι οι GI, GII και GIV [64].



Εικόνα 24 Νοροϊός κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [69]

Ο ιός ταυτοποιήθηκε αρχικά το 1972 αλλά η έρευνα για την ανακάλυψη αντιικού φαρμάκου έναντι αυτού καθυστέρησε να ξεκινήσει λόγω έλλειψης πόρων. Οι μολύνσεις από NoV, ετησίως, ανέρχονται στα 699 εκατομμύρια κατά προσέγγιση και οι θάνατοι που προκαλούνται από τον ιό είναι πάνω από 200.000 σε παγκόσμιο επίπεδο. Ο ιός μπορεί να μεταδοθεί πάρα πολύ ευκολά λόγω την υψηλής μεταδοτικότητας του, ακόμα και όταν βρίσκεται σε πολύ μικρό φορτίο, και η διασπορά του γίνεται από άνθρωπο σε άνθρωπο αλλά και από μολυσμένη τροφή και νερό [65]. Όσο αναφορά τη μετάδοση από μολυσμένη τροφή, αυτή μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε στιγμή της επεξεργασίας του τροφίμου, δηλαδή από τη συγκομιδή του μέχρι και τη συσκευασία του [64]. Προσβάλλει ανθρώπου όλων των ηλικιών αλλά

συνήθως, έντονα συμπτώματα συναντώνται σε παιδιά κάτω των 5 ετών, σε ενήλικες άνω των 65 ετών και σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα [66].

Τα συνηθέστερα συμπτώματα τα οποία εμφανίζουν οι νοσούντες είναι η διάρροια, η ναυτία, ο έμετος, ο πονοκέφαλος, το ρίγος, οι μυϊκοί πόνοι και κόπωση όλα συνοδευόμενα από χαμηλό πυρετό [67]. Ασθενείς οι οποίου νοσούν από NoV, αρχίζουν να παρουσιάζουν συμπτώματα γαστροεντερίτιδας 12 με 48 ώρες μετά την προσβολή τους από τον ιό και στις περιπτώσεις τις οποίες ο ασθενής δεν έχει κάποιο υποκείμενο νόσημα ή δεν ανήκει σε ευπαθή ομάδα, τότε η ανάρρωση του επέρχεται μετά από 1 με 3 ημέρες [64].

Η μελέτη για τα αντιικά φάρμακα κατά του NoV είναι συνεχής και εξελίσσεται [65], αλλά πάρα πολύ σημαντική είναι και η πρόληψη κατά του ιού. Η σωστή υγιεινή, δηλαδή το σχολαστικό πλύσιμο των χεριών και η απολύμανση των επιφανειών και των σκευών που έρχονται σε επαφή με την τροφή μπορούν να βοηθήσουν στον περιορισμό της εξάπλωσης του ιού [68]. Επίσης, η επεξεργασία των τροφίμων των οποίων η κατανάλωση μπορεί να οδηγήσει σε νόσηση από NoV, θα πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή, π.χ. τα οστρακοειδή θα πρέπει να μαγειρεύονται διεξοδικά και τα φρούτα και τα λαχανικά να πλένονται πολύ σχολαστικά [4].

1.1.3. Escherichia Coli



Εικόνα 25 Escherichia Coli [72]

Η *E.coli* είναι ένα gram αρνητικό βακτήριο, σε σχήμα ράβδου, προαιρετικά αναερόβιο το οποίο ανήκει στην οικογένεια των εντεροβακτηριδίων (εικόνα 4) [70] και αποτελεί έναν από του πιο συνηθισμένους παθογόνους παράγοντες οι οποίοι προκαλούν βακτηριακές λοιμώξεις στον άνθρωπο [71]. Το βακτήριο αυτό το συναντάμε στη φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντέρου στον άνθρωπο όπως και στη φύση. Η πρώτη αλληλούχηση του γενετικού υλικού του βακτηρίου έγινε το 1997, και από τότε έχουν αλληλουχηθεί πάνω από 4.800 γονιδιώματα των στελεχών του βακτηρίου [70]. Τα

πλασμίδια της *E.Coli* τα οποία σχετίζονται με τις τροφιμογενείς μολύνσεις στους

ανθρώπου είναι τα O157 και O104 και η μετάδοση και διασπορά τους είναι πολύ διαδεδομένη στον ανεπτυγμένο κόσμο. Τα είδη της *E.coli* τα οποία προκαλούν τροφιμογενείς δηλητηριάσεις είναι η εντεροπαθογενείς *E. coli* (EPEC), η *E. coli* που παράγει τοξίνες Shiga και η εντεροαιμορραγική *E. coli* (STEC/ EHEC), η *Shigella* και η εντεροδιηθητική *E. coli* (EIEC), Η εντεροσυσσωρευτική *E. coli* (EAEC) και τέλος η εντεροτοξιγονική *E. coli* (ETEC) [73]. Η μόλυνση από *E.coli* οδηγεί κατά προσέγγιση 2 εκατομμύρια ανθρώπους στο θάνατο ετησίως [70]. Η μετάδοση των πλασμιδίων της *E.coli* πραγματοποιείται μέσω μολυσμένου φαγητού ή νερού όπως μοσχαρίσιου κρέατος σε οποιοδήποτε στάδιο της επεξεργασίας του, γαλακτοκομικά προϊόντα, έτοιμα γεύματα ζωικής προέλευσης, αλλαντικά, φρούτα και λαχανικά, ωμή ζύμη που περιέχει αυγά κ.α. [74]

- 1) Το πλασμίδιο pEAF ανήκει στην EPEC. Η EPEC ή αλλιώς εντεροπαθογενείς *E.coli* η οποία παρουσιάζει ως συμπτώματά την υδαρή διάρροια, τον εμετό, τη ναυτία, τους πόνους στην κοιλιά και τον πυρετό. Συνήθως δεν χορηγείται θεραπεία στους ασθενείς διότι ο οργανισμός αναρρώνει γρήγορα, αλλά συνίσταται η καλή ενυδάτωση του οργανισμού για την αποφυγή τυχόν αφυδάτωσης.
- 2) Στον τύπο STEC/ EHEC συναντάμε τις τοξίνες οι οποίες κωδικοποιούν τα πλασμίδια O157, O6, O111, με σημαντικότερο τον ορότυπο O157:H7. Αυτός ο τύπος *E. coli*, προκαλείται από τη τοξίνη Shiga την οποία παράγει το βακτήριο (Stxs). Τα συμπτώματα που μπορεί να παρουσιαστούν είναι αιμορραγική κολίτιδα, υδαρής διάρροια, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, εμετός, κοιλιακές κράμπες και πυρετός. Για τη θεραπεία συνίσταται αντιβιοτικά και καλή ενυδάτωση του οργανισμού.
- 3) Στην EIEC/ *Shigella* έχουμε το μολυσματικό πλασμίδιο pINV το οποίο είναι μεγάλου μοριακού βάρους. Οι ορότυποι της Σιγκέλλας προκαλούν κολίτιδες και αιμολυτική ουραιμία. Επίσης παράγουν ενδοτοξίνες που προκαλούν ποικίλες επιπλοκές. Τα συμπτώματα που εμφανίζουν οι ασθενείς μπορούν να είναι από ελαφριάς μορφής υδαρή διάρροια μέχρι πολύ σοβαρή βακτηριακή δυσεντερία. Επιπλοκές που μπορεί να προκύψουν είναι πολύ σοβαρές όπως π.χ. διάτρηση εντέρου, περιτονίτιδα ή αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και υπάρχει πιθανότητα η νόσος να αποβεί θανατηφόρα.

- 4) Οι παράγοντες κωδικοποίησης προσκόλλησης pAA όπως και τοξίνες απαντώνται στην EAEC. Η EAEC προκαλεί την διάρροια των ταξιδιωτών και επίμονη διάρροια σε ανοσοκατεσταλμένα παιδιά στις ανεπτυγμένες χώρες. Για τη διάρροια των ταξιδιωτών χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά στα οποία όμως ανά τα χρόνια το παθογόνο γίνεται όλο και πιο ανθεκτικό.
- 5) Τέλος στην παράγονται δύο ειδών εντεροτοξίνες, η θερμικά ασταθής εντεροτοξίνη (LT) και η θερμοσταθερή εντεροτοξίνη (ST). Η εντεροτοξιγόνος *E.coli* προκαλεί διάρροια των ταξιδιωτών και επίσης προσβάλλει συχνά τα παιδιά στις αναπτυσσόμενες χώρες. Τα συμπτώματα είναι υδαρής διάρροια, πυρετός, εμετός και κράμπες στο στομάχι. Η ETEC έχει πολύ υψηλή μεταδοτικότητα και είναι πιθανό να προκαλέσει επιπλοκές σε μικρά παιδιά και ηλικιωμένους. Η θεραπεία με αντιβιοτικά είναι πολύ αποτελεσματική έναντι στη νόσο [73].

Η σωστή και σχολαστική προσωπική υγιεινή πριν την παρασκευή φαγητού και το σωστό μαγείρεμα την τροφής είναι παράγοντες που μπορούν να περιορίσουν την εξάπλωση του βακτηρίου [4].

1.1.4 Campylobacter

Τα καμπυλοβακτηρίδια είναι gram αρνητικά, σπειροειδή και λεπτά (εικόνα 5) μικροαερόφιλα βακτήρια. Στη φύση συναντώνται στο γαστρεντερικό σωλήνα διάφορων ζώων [77]. Έχουν καταγραφεί 17 είδη και 6 υποείδη καμπυλοβακτηρίου [1]. Η πρώτη μόλυνση η οποία οφειλόταν σε καμπυλοβακτηρίδιο έχει σημειωθεί σε ζώα φάρμας το 1913 αλλά η ταυτοποίηση του ως παθογόνος παράγοντας ο οποίος προκαλεί ασθένεια σε ανθρώπους έγινε στις αρχές του 1980, όπου απομονώθηκε από κόπρανα ασθενή. Σήμερα είναι μαζί με τη Σαλμονέλα και την *E.coli* από τα βακτήρια τα οποία προκαλούν βακτηριακές γαστροεντερίτιδες στον άνθρωπο σε παγκόσμιο επίπεδο [78]. Το *C. jejuni* είναι το συνηθέστερο στέλεχος που προκαλεί ασθένεια στον άνθρωπο [79].



Εικόνα 26 Καμπυλοβακτηρίδιο σε οπτικό μικροσκόπιο θαμμένο με χρώση gram [76]

Κάθε χρόνο, 1 στους 10 ανθρώπου νοσούν από Καμπυλοβακτηρίωση και 33 εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν από αυτή [1]. Το *Campylobacter* προσβάλλει τον άνθρωπο μέσω μολυσμένης τροφής και πολύ συχνά απομονώνεται από προϊόντα που προέρχονται από πουλερικά [80] ψημένα ή ωμά [105], χοιρινό και

μοσχάρισιο κρέας [78].

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το *C. jejuni* είναι ένα από τα κύρια στελέχη που προκαλούν ασθένεια στον άνθρωπο. Μαζί, συναντάμε και το *C. coli* το οποίο επίσης προκαλεί τροφιμογενή γαστροεντερίτιδα στους ασθενείς [78]. Η Καμπυλοβακτηρίωση συνήθως διαρκεί 2 με 5 ημέρες και η βασική κλινική της εικόνα παρουσιάζει διάρροια, πόνο στο στομάχι, πονοκέφαλο, ναυτία, πυρετό και εμετό με τα συμπτώματα να διαρκούν 3 με 6 ημέρες στις περισσότερες περιπτώσεις [1].

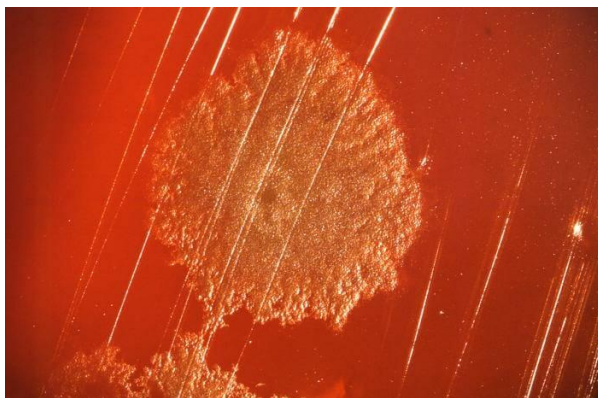
Η ανάρρωση του ασθενή μπορεί να επέλθει και χωρίς τη χορήγηση αντιβιοτικών αλλά συνίσταται η πρόσληψη πολλών υγρών για την αποφυγή αφυδάτωσης. Σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και σε άτομα που ανήκουν σε ευπαθείς ομάδες γίνεται χορήγηση αντιβιοτικών φαρμάκων. Επίσης και στην περίπτωση του καμπυρολοβακτηριδίου, πολύ σημαντικό για τον περιορισμό της εξάπλωσης του είναι η πρόληψη η οποία περιλαμβάνει πάρα πολύ καλό πλύσιμο χεριών και σκευών κατά την επεξεργασία και τη μαγειρική των τροφών, μετά τη χρήση της τουαλέτα ή την αλλαγής πάνας ενός μωρού, μετά τη διαχείριση των απορριμμάτων και τη φροντίδα ενός ασθενούς [4].

1.1.5 Clostridium

Τα κλωστρίδια είναι gram θετικά, αναερόβια βακτήρια, τα οποία σχηματίζουν ενδοσπόρια. Τα κλωστρίδια αποτελούν ένα από τα μεγαλύτερα γένη βακτηρίων διότι αποτελούνται, από κατά προσέγγιση, 180 διαφορετικά είδη [81]. Το πρώτο είδος κλωστριδίου τα οποίο ταυτοποιήθηκε ήταν το *C.difficile* το 1935 [82]. Τα δύο στελέχη

του *Clostridium* τα οποία σχετίζονται με τις τροφιμογενείς μολύνσεις σε ανθρώπου είναι τα *C. perfringens* και το *C. botulinum* [4].

- 1) *C. perfringens*: Το *C. perfringens* είναι ανάμεσα στα κορυφαία βακτήρια τα οποία προκαλούν τροφιμογενείς λοιμώξεις [4]. Ένα άνθρωπος μπορεί να μολυνθεί από το βακτήριο μετά από την κατανάλωση μολυσμένου κρέατος όρνιθας, γαλοπούλας, χοιρινού ή μοσχαρίσιου κρέατος ή από μολυσμένη σάλτσα [4]. Προκαλεί ποικίλες εντεροτοξικές παθήσεις στον άνθρωπο, λόγω των τοξινών των οποίων παράγει. Η μόλυνση από το συγκεκριμένο στέλεχος προκαλεί τροφική δηλητηρίαση όταν τα σπόρια τα οποία σχηματίζει το βακτήριο εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της τροφής [83], με συμπτώματα διάρροια και στομαχικές κράμπες για 6 με 24 ώρες μετά τη λοίμωξη. Όπως έχει αναφερθεί και για τα προηγούμενα βακτήρια, συνήθως δεν χορηγείται φαρμακευτική αγωγή με αντιβίωση αλλά συνίσταται η λήψη πολλών υγρών [4].



Εικόνα 27 Αποικία *C. Botulinum* σε blood agar medium [86]

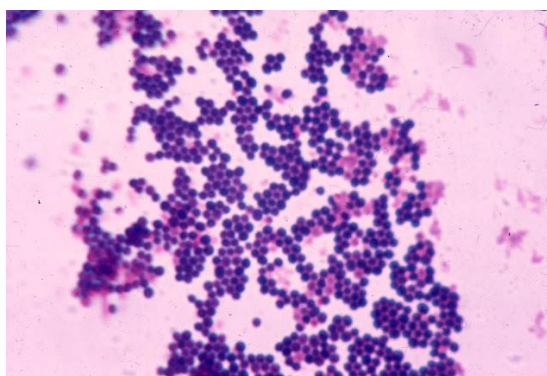
- 2) *C. Botulinum*: Το *C. Botulinum* (εικόνα 6) έχει την ικανότητα να εκκρίνει ισχυρές νευροτοξίνες και τα σπόρια του είναι πολύ ανθεκτικά. Τα σπόρια του *C. Botulinum* έχουν τη ικανότητα να επιβιώνουν σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης έως και για 6 μήνες [84]. Η ασθένεια η οποία προκαλεί η κατάποση των σπορίων ονομάζεται αλλαντίαση η οποία προκαλείται από την αλλαντοτοξίνη (BoNT). Τα σπόρια μπορούν να μολύνουν το τρόφιμο σε οποιαδήποτε στιγμή της επεξεργασίας του [83]. Μερικά από τα μέσα μετάδοσης του *C. Botulinum* είναι τα αλιευτικά προϊόντα, τα φαγητά που διατηρούνται σε κονσέρβες, τα διάφορα λάδια και οι σως που χρησιμοποιούνται σε εστιατόρια και γενικά σε κακώς συντηρημένο φαγητό [106]. Τα συμπτώματα της αλλαντίαςης διαφέρουν από άλλες τροφιμογενείς ασθένειες, μιας και οι τοξίνες επιτίθενται

στο νευρικό σύστημα και προκαλούν αδυναμία στους μύες που ελέγχουν τα μάτια, το στόμα και το λαιμό. Αυτή η μυϊκή αδυναμία είναι πιθανό να εξαπλωθεί και στο υπόλοιπο σώμα και, σε ορισμένες περιπτώσεις, να προκαλέσει μέχρι και θάνατο λόγω αδυναμίας αναπνοής του ασθενή [4]. Η θεραπεία της αλλαντίασης περιλαμβάνει χορήγηση αντιδότου, διαδικασίες απολύμανσης και σε περιπτώσεις εξάπλωσης της νόσου στον οργανισμό συνίσταται μηχανική υποστήριξη αναπνοής [85].

1.1.6 Staphylococcus aureus

Ο *S. aureus* ή αλλιώς χρυσίζον σταφυλόκοκκος είναι ένα gram θετικό βακτήριο, προαιρετικά αερόβιο το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί και απουσία οξυγόνου, [88] (εικόνα 7) και εντοπίζεται στο δέρμα, στο βλεννογόνο της μύτης και στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπινου οργανισμού χωρίς όμως να προκαλεί κάποιο σύμπτωμα [87]. Η πρώτη εμφάνιση του βακτηρίου έχει σημειωθεί στη δεκαετία 1860 [88]. Το πρώτο καταγεγραμμένο περιστατικό τροφιμογενούς λοίμωξης από *S. aureus* έγινε το 1884 και οφειλόταν σε κατανάλωση μολυσμένου τυριού αλλά η πρώτη φορά που όντως αποδείχτηκε εργαστηριακά ότι η τροφική δηλητηρίαση προήλθε από το συγκεκριμένο βακτήριο, ήταν το 1914 [89].

Η τροφιμογενής λοίμωξη από *S. aureus* συμβαίνει όταν ένας άνθρωπος καταναλώσει ένα τρόφιμο μολυσμένο από εντεροτοξίνες του βακτηρίου (SEs). Μέσα στις 2 με 8 ώρες από την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου ξεκινούν τα συμπτώματα τα οποία περιλαμβάνουν έντονο έμετο, στομαχικές κράμπες, ναυτία και πιθανή διάρροια. Τα



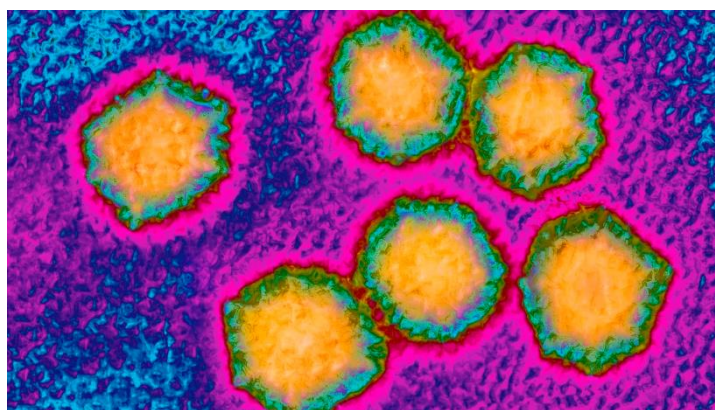
Εικόνα 28 *S.aureus* κάτω από οπτικό μικροσκόπιο. Το χρώμα του είναι μωβ λόγω της χρώσης gram [107]

συμπτώματα υποχωρούν μετά από 24 με 48 ώρες. Τα τρόφιμα που έχουν κατηγορηθεί για πρόκληση λοίμωξης από *S. aureus* είναι ζωικής προέλευσης, γαλακτοκομικά, λαχανικά, αρτοσκευάσματα και έτοιμες ζύμες και γεμίσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται σε σάντουιτς [90].

Η θεραπεία αυτής της τροφικής δηλητηρίασης δεν περιλαμβάνει αντιβιοτικά διότι δεν έχουν δράση απέναντι στις τοξίνες του σταφυλόκοκκου. Η πρόσληψη πολλών υγρών βοηθάει στη διατήρηση της ενυδάτωσης του οργανισμού [4].

1.1.7 Hepatitis A

Ο ιός της Ηπατίτιδας είναι ένα RNA ιός, μικρός στο μέγεθος (27nm), χωρίς εξωτερικό περίβλημα και σε εικοσαεδρικό σχήμα (εικόνα 8). Ανήκει στο γένος *Heppavirus* και είναι της οικογένειας *Picornaviridae*. Ο ορότυπος του ιού ο οποίος μολύνει τον άνθρωπο μέσω της τροφής είναι η Ηπατίτιδα Α (HAV) και περιεγράφηκε πρώτη φορά το 1973 [109].



Εικόνα 29 Ιός Ηπατίτιδα Α κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [111]

Η μετάδοση του ιού μέσω της τροφής, γίνεται όταν καταναλωθεί τροφή μολυσμένη από περιττώματα ανθρώπου ο οποίος νοσεί από τον ιό [110]. Ο ιός μπορεί να απομονωθεί από το αίμα ή από τα κόπρανα του μολυσμένου ανθρώπου και λόγω της υψηλής μολυσματικότητας της νόσου, η ηπατίτιδα Α μπορεί να μεταδοθεί ακόμα και αν υπάρχει σε πάρα πολύ μικρή ποσότητα [4].

Τα συνηθέστερα συμπτώματα της ασθένειας είναι κόπωση, πυρετός, κοιλιακοί πόνοι, ναυτία, εμετός και ίκτερος, τα οποία αρχίζουν να εμφανίζονται 2 με 6 εβδομάδες μετά την έκθεση του ανθρώπου στο παθογόνο. Μια σοβαρή επιπλοκή η οποία μπορεί να προκληθεί λόγω ηπατίτιδας Α είναι η ηπατική ανεπάρκεια, αλλά μια τέτοια κατάσταση προκύπτει μόνο σε ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από υποκείμενη ηπατική νόσο [110] γεγονός το οποίο ανταποκρίνεται στο 5% των περιπτώσεων [109]. Τα συμπτώματα συνήθως υποχωρούν μετά από 2 μήνες κατά προσέγγιση [110].

Η σημαντικότερη πρόληψη κατά της ΗΑΥ είναι ο εμβολιασμός του πληθυσμού ώστε ο οργανισμός να είναι έτοιμος να παράγει τα δικά του αντισώματα άμεσα για την αντιμετώπιση αυτού. Επίσης, η επιμελής καθαριότητα, τόσο η προσωπική όσο και στους χώρους, μπορεί να βοηθήσει στον περιορισμό εξάπλωσης της ηπατίτιδας Α [109].

1.1.8 Toxoplasma gondii

Το τοξόπλασμα *gondii* είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό ευκαρυωτικό πρωτόζωο το οποίο ανήκει στο φύλλο Apicomplexa της οικογένειας Sarcocystidae (εικόνα 9 [112]. Η ανακάλυψη του συγκεκριμένου παράσιτου πραγματοποιήθηκε περίπου 110 χρόνια πριν [113] και μολύνει ετησίως το 1/3 του πληθυσμού παγκοσμίως [112]. Το *T. gondii* έχει την ικανότητα να επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα παρασιτώντας στον ανθρώπινο οργανισμό και πολλές φορές η νόσηση είναι ασυμπτωματική [4].



Εικόνα 30 Toxoplasma Gondii [76]

Το *T. gondii* μπορεί να μολύνει τον άνθρωπο μέσω μολυσμένης τροφής, δηλαδή με την κατάποση μολυσμένου ή ατελώς μαγειρεμένου φαγητού, από την κατανάλωση αλιευτικών προϊόντων ή από μολυσμένα σκευή μαγειρικής [4]. Όπως

προαναφέρθηκε, ένας ασθενής μολυσμένος από τοξοπλάσμωση, μπορεί να μην εμφανίσει συμπτώματα ή να εμφανίσει συμπτώματα παρόμοια της κοινής γρίπης σε ελαφριά μορφή [114]. Βέβαια, σε περιπτώσεις ανοσοκατεσταλμένων ασθενών υπάρχει πιθανότητα να εμφανιστούν ορισμένα πολύ σοβαρά συμπτώματα και διάχυτες λοιμώξεις οι οποίες οδηγούν σε νευρολογικά προβλήματα [112]. Ένα ακόμα σοβαρό σύμπτωμα της τοξοπλάσμωσης αφορά τα μάτια στα οποία μπορεί να προκληθεί θαμπή όραση, ερυθρότητα και πόνος [4]. Η μόλυνση μιας γυναίκας σε περίοδο κύησης μπορεί να προκαλέσει στο έμβριο σοβαρά νευρολογικά και οφθαλμολογικά προβλήματα [115].

Σε περίπτωση υγιούς ανθρώπου, δεν χορηγείται θεραπεία για την τοξοπλάσμωση διότι τα συμπτώματα υποχωρούν μετά από λίγο καιρό. Σε περιπτώσεις γυναικών σε

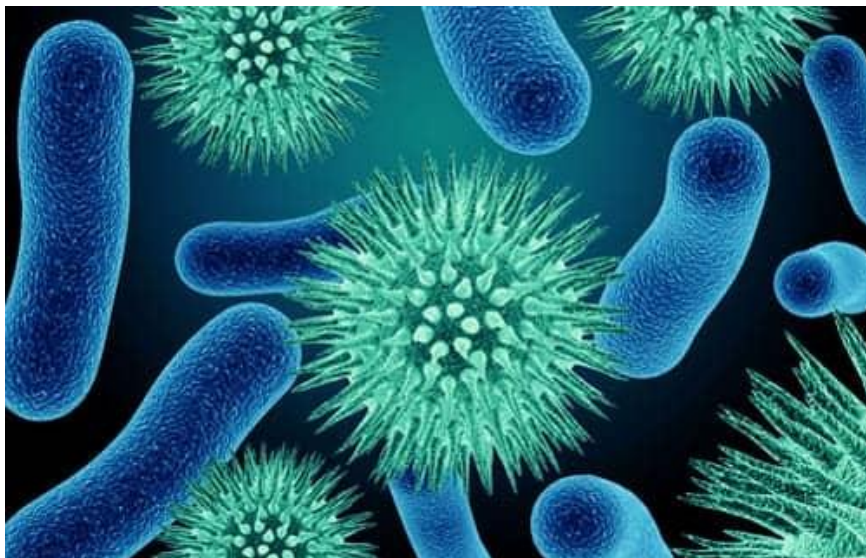
εγκυμοσύνη ή ανοσοκατεσταλμένων ασθενών η θεραπεία κρίνεται απαραίτητη. Όπως και σε κάθε ασθένεια, η πρόληψη παίζει πάρα πολύ σημαντικό ρόλο. Το σωστό μαγείρεμα των τροφών ζωικής προέλευσης όπως και η σωστή αποθήκευσή τους σε συνθήκες κατάψυξης και το επιμελές πλύσιμο των ωμών φρούτων και λαχανικών είναι μερικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να αποτρέψουν τη μόλυνση του ανθρώπου από το *T. gondii* [4].

1.2 Το νερό

Το νερό, όπως και η τροφή, είναι θεμέλιος λίθος της ζωής. Ομοίως όμως με την τροφή, το νερό αν καταναλωθεί ακάθαρτο ή μολυσμένο από κάποιο παθογόνο, μπορεί να οδηγήσει τον άνθρωπο σε παθολογικές καταστάσεις, έως και σε θάνατο.

Λοιμώξεις οι οποίες προκαλούνται από την κατάποση μολυσμένου ή ακάθαρτου νερού αποτελούν ένα παγκόσμιο πρόβλημα το οποίο δεν συναντάται μόνο στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπως θα ήταν πιο αναμενόμενο, αλλά και σε αναπτυγμένες οικονομικά χώρες [40]. Ορισμένες ασθένειες οι οποίες είναι αποτέλεσμα κατάποσης μολυσμένου ύδατος, ομοίως και με τις τροφιμογενείς, εκδηλώνονται με διαρροϊκές διαταραχές, οι οποίες είναι και η συχνότερα καταγεγραμμένες. Μάλιστα, σε καταγραφή του 2012, 1.5 εκατομμύρια θάνατοι σημειώθηκαν λόγω διαρροϊκής διαταραχής ως αποτέλεσμα πρόσληψης μολυσμένου νερού. Ασθένειες οι οποίες έχουν διασπαρθεί μέσω του μολυσμένου νερού είναι η σιγκέλλωση, η χολέρα, οι ηπατίτιδες Α και Ε, η πολιομυελίτιδα κ.α. [41].

Ως υδατογενής λοίμωξη ορίζεται η κατάσταση μόλυνσης του ανθρώπου από παθογόνα ή μικρόβια μετά από επαφή με ψυχαγωγικό ή πόσιμο νερό [57]. Τα παθογόνα τα οποία μολύνουν το νερό και κατ' επέκταση τον ανθρώπινο οργανισμό, μπορεί να ανήκουν στα πρωτόζωα, στα βακτήρια ή στους ιούς (εικόνα 10) ή με την ανίχνευσή τους να μπορεί αν επιτευχθεί με μοριακές τεχνικές.



Εικόνα 31. Μικροσκοπική εικόνα παθογόνων [56]

1.2.1 Πρωτόζωα/ Παράσιτα

Τα συχνότερα παράσιτα τα οποία προκαλούν υδατογενείς μολύνσεις είναι τα Κρυπτοσπορίδια, με συχνότερα να κάνουν την εμφάνισή τους το *Cryptosporidium parvum* και το *Cryptosporidium hominis*. Τα κρυπτοσπορίδια μπορούν να προκαλέσουν γαστροεντερικές παθήσεις. Η ανίχνευσή τους μπορεί να είναι δύσκολη διότι η ποσότητά τους στο νερό πιθανό να είναι πάρα πολύ μικρή [41]. Το παραπάνω γεγονός οδηγεί σε αχρηστία τις κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους και δημιουργεί την ανάγκη και την απαίτηση διαδικασιών με μεγαλύτερη εξειδίκευση και ευαισθησία. Η ανίχνευση του κρυπτοσποριδίου γίνεται με τη χρήση τεχνικών με βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR [43]. Επίσης η έμμεση και η sandwich ELISA δίνουν τη δυνατότητα ανίχνευσης του κρυπτοσποριδίου [45]

1.2.2 Βακτήρια

Η ασφάλεια του ύδατος αξιολογείται από την παράμετρο FIP (fecal indicator bacteria) η οποία μεταφράζεται σαν ανίχνευση και καταμέτρηση των κολοβακτηριδίων, της *Escherichia coli* ή του εντερόκοκκου. Το FIP είναι το χρυσό πρότυπο της ασφάλειας του νερού.

Η συνηθέστερη αιτία μόλυνσης του νερού από βακτήρια είναι τα κόπρανα ανθρώπων και ζώων που νοσούν από κάποια βακτηριακή λοίμωξη. Τα βακτήρια τα οποία έχουν εισέλθει στο νερό και το έχουν μολύνει, αν παραμείνουν μέσα για μεγάλο χρονικό διάστημα καταλήγουν να αραιώνονται μέσα σε αυτό με αποτέλεσμα οι πολύ χαμηλές τους ποσότητες να καθιστούν πολύ δύσκολο το έργο της ανίχνευσης και της ταυτοποίησης τους. Για αυτό το λόγο, για την ανίχνευση βακτηρίων χρησιμοποιούνται μοριακές τεχνικές στην ανίχνευση βακτηρίων στο νερό όπως η qPCR αλλά και η mPCR οι οποίες είναι τεχνικές γρήγορες και αποτελεσματικές, χωρίς την ανάγκη καλλιέργειας του βακτηρίου πρώτα, την αλληλούχηση νέας γενιάς- NGS για την ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων μέσα σε δείγμα νερού και τη μαζική και παράλληλη αλληλουχιών που προέρχονται από αμπλικόνια PCR κ.α. [44].

1.2.3 Ιοί

Ορισμένες χώρες αντλούν τα ύδατα τους από υπόγειες πηγές. Λόγω του ότι τα λύματα των πόλεων καταλήγουν στο έδαφος, το νερό το οποίο αντλείται από υπογείως πηγές είναι μολυσμένο από ιούς, καθιστώντας τους ιούς συχνή αιτία υδατογενούς λοίμωξης στον άνθρωπο.

Οι πιο συχνοί ιοί οι οποίοι προσβάλουν τον άνθρωπο μέσω της κατάποσης νερού είναι ο Νοροϊός (NoV), ο ιός της ηπατίτιδας Α (HAV) και ο Αδενοϊός (AdV). Αν και οι παραπάνω ιοί μπορούν να προκαλέσουν ποικιλία επικίνδυνων ασθενειών, οι ασθένειες οι οποίες μεταδίδονται μέσω του νερού είναι η ιογενής γαστρεντερίτιδα και η ηπατίτιδα. Η ανίχνευση των ιών στο νερό συχνότερα πραγματοποιείται με μεθόδους βασισμένες στη PCR [45].

Στον παρακάτω πίνακα ii παρουσιάζονται τα παθογόνα και οι υδατογενείς νόσοι που προκαλούν εάν προσβάλουν τον άνθρωπο:

Πίνακας iii Παθογόνα και υδατογενείς λοιμώξεις [59]

<u>Παθογόνο</u>	<u>Νόσος</u>
<i>Cryptosporidium</i>	Κρυπτοσποριδίωση
<i>Cyclospora spp.</i>	Κυκλοσποριδίωση
<i>Escherichia coli</i> - <i>Shiga toxin</i>	Επιλοκές π.χ. αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο
<i>Gardia</i>	Γαρδίαση
<i>Legionella</i>	Νόσος του λεγεωνάριου και Ποντικός πυρετός
<i>Naegleria fowleri</i>	Πρωτοπαθής Αμεβική Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα
<i>Norovirus</i>	Ιός Norwalk, καλυκοϊός, ιογενής γαστρεντερίτιδα
<i>Shigella</i>	Σιγκέλλωση

1.3 Εξάρσεις (Outbreaks)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ως έξαρση τροφιμογενούς νόσου ορίζεται η συνθήκη κατά την οποία δύο άνθρωποι και άνω, μολύνονται και νοσούν μετά την κατανάλωση του ίδιου τροφίμου [2]. Παρακάτω παρατίθενται μερικές εξάρσεις τροφιμογενών νόσων οι οποίες έχουν σημειωθεί τόσο στο παρελθόν όσο και σήμερα.

1.3.1 1985

Το 1985 σημειώθηκε μια έξαρση τροφιμογενούς νόσου η οποία οφειλόταν σε γλυκίσματα τα οποία περιείχαν σαν συστατικό παστεριωμένο γάλα χαμηλών λιπαρών του οποίου η παραγωγή και η εξαγωγή έγινε από ένα συγκεκριμένο εργοστάσιο στο Σικάγο της Αμερικής. Το βακτήριο το οποίο προκάλεσε την έξαρση ήταν η *Salmonella Typhimurium* [4]. Η *S. Typhimurium* είναι το νούμερο ένα βακτήριο που προκαλεί τροφική δηλητηρίαση στις Δυτικές χώρες [5]. Από τη μόλυνση προσβλήθηκαν πάνω από 150.000 άνθρωποι από τους οποίους 2.777 χρειάστηκαν νοσηλεία και 14 κατέληξαν [4].

1.3.2 1994

Το 1994 μια έξαρση έλαβε χώρα στο Ελ Πάσο του Τέξας, η οποία οφειλόταν αλλαντίαση (botulism), μια νόσο η οποία προκαλείται από το ακάθαρτο φαγητό.

Οι θαμώνες ενός εστιατορίου στην περιοχή, μετά από έρευνα, διαπιστώθηκε ότι κατανάλωσαν ένα ντιπ με βάση την πατάτα. Οι πατάτες οι οποίες είχαν χρησιμοποιηθεί για να την παρασκευάσει αυτό το ντιπ είχαν ψηθεί και αποθηκευτεί τυλιγμένες σε αλουμινόχαρτο για μεγάλο χρονικό διάστημα και σε μη κατάλληλη θερμοκρασία αποθήκευσης. Αυτό το γεγονός, είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή τοξινών αλλαντίασης τύπου Α οι οποίες ανιχνεύτηκαν στη συνέχεια σε όλους τους νοσούντες. 30 άνθρωποι μολύνθηκαν και 4 εξ' αυτών νοσηλεύτηκαν [6].

1.3.3 2005

Το 2005 μια έξαρση η οποία οφειλόταν στο βακτήριο *Escherichia Coli* ξέσπασε στην Ουαλία. Η μόλυνση των καταναλωτών ξεκίνησε από ένα κρεοπωλείο το οποίο διένειμε φαγητό κυρίως σε σχολεία. Τα τρόφιμα φαίνεται πως μολύνθηκαν κατά τη συσκευασία τους διότι στο μηχάνημα συσκευασίας βρέθηκαν ίχνη αίματος το οποίο δεν καθαρίστηκαν πριν την προετοιμασία. 158 άνθρωποι νόσησαν από το μολυσμένο κρέας και ο μεγαλύτερος αριθμός των νοσούντων ήταν παιδιά, ένα από τα οποία έχασε τη ζωή του [7].

1.3.4 2008

Στις 16 Μαΐου του 2008 μια επιδημία βρουκέλλωσης ξέσπασε στο νησί της Θάσου στην Ανατολική Μακεδονία-Θράκη. Ένα ποσοστό των κατοίκων του νησιού, άνω της ηλικίας των 18 ετών, μέχρι τον Αύγουστο του ίδιου έτους παρουσίασε συμπτώματα όπως πυρετό, νυχτερινή εφίδρωση, αρθραλγία, πονοκέφαλο ή δυσφορία. Η πανδημία οφειλόταν στην κατανάλωση ωμού, μη θερμικά επεξεργασμένου τυριού από ένα συγκεκριμένο είδος αιγοπροβάτων που ζουν στο νησί, τα οποία ήταν μολυσμένα με *B. Melitensis*. Το μολυσμένο τρόφιμο καταναλώθηκε σε μεγάλη ποσότητα από τους κατοίκους του νησιού εν όψη την γιορτής του ορθόδοξου Πάσχα. Το παθογόνο απομονώθηκε από δείγματα αίματος των ασθενών. Για την αποφυγή μελλοντικής τροφιμογενούς λοίμωξης, ξεκίνησε στην περιοχή πρόγραμμα εμβολιασμού των ζώων φάρμας ενάντια στη *Brucella* [118].

1.3.5 2009

Τον Ιούνιο του 2009 στα Χανιά της Κρήτης, αναφέρθηκαν πολλές περιπτώσεις παιδιών από των οποίων τα κόπρανα απομονώθηκε το βακτήριο *Campylobacter jejuni*. 60 περιπτώσεις βρέθηκαν θετικές στο βακτήριο και όλα τα δείγματα τα οποία βρέθηκαν θετικά ανήκαν σε άτομα τα οποία διαμένουν στις αγροτικές περιοχές των Χανίων. Η αιτία της διασποράς του βακτηρίου ήταν το νερό της βρύσης, το οποίο καθιστά τη συγκεκριμένη επιδημία γαστροεντερίτιδας υδατογενή λοίμωξη.

1.3.6 2010

Το έτος 2010 μια επιδημία γαστροεντερίτιδας σημειώθηκε στο νησί Άγιος Ευστράτιος. 19 Φεβρουαρίου 2019 λίγες μέρες μετά τη γιορτή της καθαράς Δευτέρας, έγιναν πολλές αναφορές για ασθενείς με συμπτώματα γαστροεντερίτιδας. Όλοι οι ασθενείς είχαν καταναλώσει ποσότητες από θαλασσινά φαγητά. Η διάγνωση έδειξε πως η τροφιμογενής λοίμωξη οφειλόταν στο Νοροϊό. 181 άνθρωποι νόσησαν 64 εκ των οποίων με βαριά συμπτώματα της νόσου [95].

1.3.7 2012

Το Μάρτιο του 2012 μια τεράστιας έκτασης υδατογενής λοίμωξη εμφανίστηκε στην περιοχή της Ελασσόνας στη Θεσσαλία. Σε μια περίοδο έντονων βροχοπτώσεων, στις οποίες φαίνεται να οφείλεται και η μόλυνση των υδάτων, στα τοπικά νοσοκομεία σημειώθηκαν 3.600 περιστατικά γαστροεντερίτιδας. Όλοι οι ασθενείς είχαν καταναλώσει νερό από τις βρύσες των σπιτιών τους. Τα δείγματα νερού από τη δεξαμενή της περιοχής, μετά από εργαστηριακή έρευνα βρέθηκαν θετικά σε κρυπτοσπορίδιο και τα δείγματα των ασθενών βρέθηκαν θετικά σε στελέχη ροτοϊού. Η μόλυνση του νερού φαίνεται να οφείλεται στο ότι οι έντονες βροχοπτώσεις μετέφεραν μικροοργανισμούς από τα περιττώματα των ζώων παραγωγής μέσα στο νερό της περιοχής [117].

1.3.8 2015

Τον Αύγουστο το 2015 μια πανδημία Νοροϊού έκανε την εμφάνισή της στην περιοχή Κασσάνδρα της Χαλκιδικής. 7 άτομα βγήκαν θετικά στον NoV, περίπτωση όχι συνηθισμένη για τα Ελληνικά δεδομένα. Η λοίμωξη προήλθε από νερό βρύσης, προκαλώντας στους νοσούντες συμπτώματα γαστροεντερίτιδας. Τα δείγματα των ασθενών βγήκαν θετικά σε δύο στελέχη του ιού. Το νερό φαίνεται να μολύνθηκε από λύματα τα οποία εισήλθαν στην κυκλοφορία του νερού από μια ρωγμή στους σωλήνες ύδρευσης της περιοχής. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το ένα στέλεχος, το GI.P2_GI.2 δεν κάνει συχνά την εμφάνισή του στην Ευρώπη και μάλιστα ήταν η πρώτη φορά που καταγράφηκε στην Ελλάδα [116].

1.3.9 2019

Το 2019 στη βόρεια Ελλάδα σημειώθηκε μια έξαρση που οφειλόταν στο βακτήριο *C. perfringens* η οποία μάλιστα, ήταν η πρώτη έξαρση στην Ελλάδα που προήλθε από μόλυνση του συγκεκριμένου βακτηρίου. Στις 27 Ιουνίου 2019 πολύ συμμετέχοντες αθλητές και προπονητές σε ένα τουρνουά χάντμπολ, εμφάνισαν συμπτώματα γαστροεντερίτιδας η οποία μετά από έρευνα οφειλόταν σε κιμά ο οποίος ήταν κατεψυγμένος και δεν είχε προετοιμαστεί ορθά για τη σίτιση των παραβρισκόμενων. 71 άτομα νόσησαν από την τροφική δηλητηρίαση η οποία οφειλόταν στο *C. perfringens*, 64 εκ των οποίων ήταν νεαρά αγόρια - αθλητές ηλικίας από 9 έως 17 ετών [92].

1.3.10 2021

Τον Μάιο του 2021 σε ένα λύκειο Ελληνικού νησιού, προσωπικό και μαθητές εμφάνισαν συμπτώματα τροφικής δηλητηρίασης. 30 από τα 129 δείγματα ασθενών βρέθηκαν θετικά σε μόλυνση από το βακτήριο *C. perfringens*. Το σχολείο προμήθευε καθημερινά εταιρία catering και μετά την κατανάλωση μακαρονιών με κιμά ένα ποσοστό μαθητών αλλά και καθηγητών εμφάνισαν συμπτώματα διάρροιας, εμετού και στομαχόπνου τα οποία οδήγησαν στην περαιτέρω εξέταση του περιστατικού από τις υγειονομικές αρχές. 2 στα 3 δείγματα ασθενών τα οποία έφτασαν στο εργαστήριο βρέθηκαν θετικά στο βακτήριο [96].

1.3.11 2022

Από τις 17 Σεπτεμβρίου 2022 έως τις 19 Οκτωβρίου 2022 μια έξαρση Σαλμονέλλωσης από *S. Typhimurium* σημειώθηκε στη Σουηδία. Σε 20 από τις 21 περιοχές της Σουηδίας αναφέρθηκαν επιβεβαιωμένα κρούσματα και οι νοσούντες ήταν όλων των ηλικιών. Το μέσω διασποράς ήταν συσκευασμένες σαλάτες. 102 άτομα νόσησαν μετά από κατανάλωση των εν λόγω συσκευασμένων τροφίμων. Τα μολυσμένα προϊόντα αποσύρθηκαν από τα ράφια και η έξαρση τερματίστηκε άμεσα [8].

Όλες αυτές οι εξάρσεις θα μπορούσαν να έχουν αποφευχθεί, εάν η προετοιμασία, επεξεργασία και αποθήκευση των τροφίμων είχαν γίνει σωστά. Η αύξηση της κατανάλωσης γρήγορου φαγητού έχει οδηγήσει επίσης πολλές φορές σε τροφιμογενείς νόσους. Έτσι, έχουν προκύψει ανάγκες ανάπτυξης μεθόδων και τεχνικών για την ανίχνευση των παθογόνων παραγόντων που οδηγούν τους καταναλωτές σε παθολογικές καταστάσεις οι οποίες μπορεί να αποβούν και μοιραίες για ορισμένες ομάδες ανθρώπων. Αυτές είναι μοριακές τεχνικές υψηλής ευαισθησίας και ακρίβεια μερικές εκ των οποίων θα παρατεθούν στη συνέχεια.

2. Σκοπός

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η κατανόηση του πόσο σημαντική είναι η γρήγορη και αποτελεσματική ανίχνευση των παθογόνων παραγόντων οι οποίοι οδηγούν σε τροφιμογενείς λοιμώξεις, για την υγεία του ανθρώπου. Για την κατανόηση αυτού του ζητήματος παρατίθενται τόσο οι πιθανοί παθογόνοι παράγοντες όσο και οι μοριακές τεχνικές ανίχνευσης και ταυτοποίησης αυτών στα τρόφιμα και στα βιολογικά παράγωγα ενός ανθρώπου ο οποίος νοσεί από τροφιμογενή λοίμωξη.

3. Μεθοδολογία

Για την έρευνα των μοριακών τεχνικών και των δυνατοτήτων τους, χρησιμοποιήθηκαν επιστημονικά άρθρα αναρτημένα στο PubMed καθώς και οι επίσημες ιστοσελίδες οργανισμών υγείας και ασφάλειας τροφίμων τόσο της Ελλάδας όσο και του εξωτερικού. Οι λέξεις κλειδιά οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση των άρθρων είναι τροφιμογενής λοίμωξη (foodborne disease), ασφάλεια τροφίμων (food safety), μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης (molecular detection methods) και παθογόνα (pathogens).

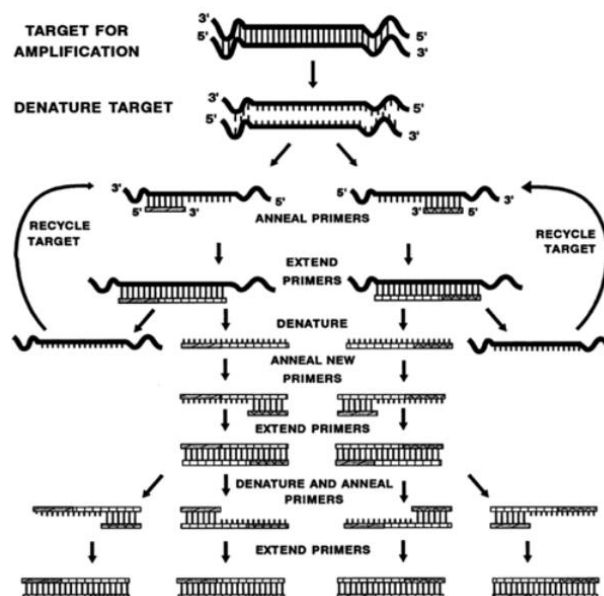
4. PCR - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR- Polymerase Chain Reaction) εμφανίστηκε αρχικά στα εργαστήρια στα τέλη του 1980 και άρχισε να χρησιμοποιείται στις αρχές του 1990. Η χρήση αυτής της τεχνικής, αρχικά, ήταν η ανίχνευση βακτηριακών αποικιών [9]. Η αρχή μεθόδου της PCR βασίζεται στον ταχύ πολλαπλασιασμό κάποιου μέρους ή ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδιώματος για ένα συγκεκριμένο παθογόνο [10].

Η μέθοδος βασίζεται πάνω σε τρία βασικά βήματα:

- 1- Αποδιάταξη, όπου το δίκλωνο DNA-στόχος μετουσιώνεται θερμικά και αποδιατάσσεται
- 2- Υβριδισμός, όπου πραγματοποιείται η προσθήκη εκκινητών στη μήτρα του DNA υπό συγκεκριμένη θερμοκρασία και τέλος
- 3- Επέκταση του DNA-στόχου. (εικόνα 11)

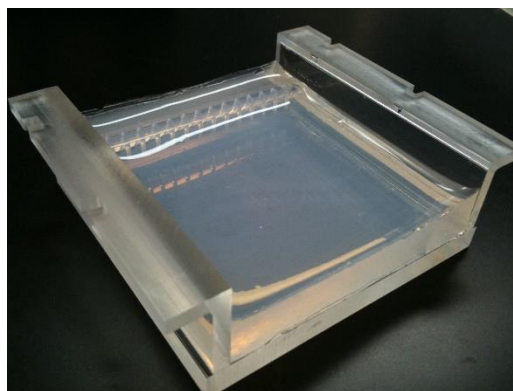
Μετά το τέλος της διαδικασίας, τα παράγωγα της PCR, μπορούν να ανιχνευτούν με έναν αριθμό τεχνικών. Η συνηθέστερη τεχνική είναι η ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης. [11]



Εικόνα 32 Τα βήματα της PCR [11]

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται στο εργαστήριο εδώ και πολλά χρόνια για την ταυτοποίηση των παραγώγων της PCR. Είναι μέθοδος η οποία δεν απαιτεί πολύ χρόνο είναι δεν έχει μεγάλο κόστος. Τα θραύσματα του DNA-παραγώγα της PCR κινούνται μέσα στο πήκτωμα αгарόζης της ηλεκτροφόρησης ανάλογα με το μέγεθός τους [12]. Τα θραύσματα DNA για τα οποία η γέλη αгарόζης (εικόνα 12) είναι καταλληλότερη είναι αυτά που κυμαίνονται από 100bp έως 25kb. Επίσης, η συγκέντρωση της αгарόζης εξαρτάται από τα μεγέθη των θραυσμάτων προς διαχωρισμό. Συνήθως, χρησιμοποιείται γέλη αгарόζης συγκέντρωσης 0,5-2% [13] .

Για να καταστούν ορατά τα θραύσματα του DNA μέσα στο πήκτωμα αгарόζης, προστίθενται ορισμένες χρωστικές. Η συνηθέστερη χρωστική η οποία χρησιμοποιείται στο εργαστήριο, είναι το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο όμως λόγω της τοξικότητάς του και της μεταλλαξιογένεσης την οποία μπορεί να προκαλέσει, έχει αρχίσει να αντικαθίσταται από πιο ασφαλείς χρωστικές όπως είναι, παραδείγματος χάριν, η SYBR® Green I η οποία είναι λιγότερο μεταλλαξιγόνα. [15]



Εικόνα 33. Γέλη Αγαρόζης [14]

Μόλις η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ολοκληρωθεί, το πήκτωμα αгарόζης θα εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV light), ώστε να γίνουν ορατές οι μπάντες των θραυσμάτων DNA. Στην εικόνα που θα μας δώσει το πήκτωμα αгарόζης στο UV light, θα παρατηρήσουμε πως τα μικρότερα σε μοριακό βάρος θραύσματα έχουν δείξει μεγαλύτερη κινητικότητα από αυτά μεγαλύτερου μοριακού βάρους [13].

Με βάση την κλασική PCR, έχουν αναπτυχθεί επιπλέον τεχνικές οι οποίες προσφέρουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ταυτοποίηση των στόχων. [11]

Τα είδη PCR τα οποία συναντάμε στην ανίχνευση παθογόνων σε τρόφιμα είναι η PCR πραγματικού χρόνου (real-time ή quantitative PCR), η Πολυπλεκτική PCR (Multiplex PCR) και η Ψηφιακή PCR (Digital PCR).

4.1 Real-Time ή Quantitative PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Η Real-Time ή Quantitative PCR (qPCR) είναι μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται πολύ στη βιολογία. Οι αρχικές χρήσεις της qPCR ήταν η ανίχνευση γονιδίων που ευθύνονται για τον καρκίνο του μαστού και για την ανάλυση δειγμάτων τα οποία προερχόταν από ασθενείς οι οποίοι νοσούσαν από HIV [16]. Η qPCR χρησιμοποιείται αρκετά στη διάγνωση τροφιμογενών μολύνσεων από διάφορα βακτήρια όπως είναι η *E. Coli* ή στελέχη της ψευδομονάδας σε κόπρανά. Η μέθοδος αυτή είναι γρηγορότερη και πιο ευαίσθητη σε σχέση με την κλασική PCR [17]. Αυτό συμβαίνει διότι αντίθετα με την κλασική μορφή της μεθόδου, η real-time PCR, δεν απαιτεί ούτε θερμοκυκλωτή αλλά ούτε και ηλεκτροφόρηση για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων, αλλά η ανάλυση των δειγμάτων γίνεται με ένα μόνο μηχάνημα (εικόνα 13). Η ανάλυση είναι αυτοματοποιημένη προσφέροντας ευαισθησία και όπως προαναφέρθηκε, ταχύτητα. Δύο ακόμα πλεονεκτήματα της qPCR είναι πως η ποσοτικοποίηση των προϊόντων γίνεται με μεγαλύτερη αναπαραγωγικότητα και η περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων δεν χρειάζεται με αποτέλεσμα να μειώνονται οι πιθανότητες σφάλματος από λάθος χειρισμό [18]. Βέβαια, αν και η τεχνική αυτή είναι ένα πολύ δυνατό εργαλείο στη διάγνωση, λόγω του ότι οι αναλύσεις δεν είναι τυποποιημένες, πολλές φορές προκύπτουν προβλήματα αναπαραγωγικότητας στα αποτελέσματα της τεχνικής [107].

Η πιο συχνή φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται στη real-time PCR, για την εκπομπή των σημάτων και την καταγραφή των αποτελεσμάτων είναι η SYBR Green, σε συνδυασμό με ανιχνευτές TaqMan και μοριακούς φάρους (beacons) [19].



Εικόνα 34 Q1000+ REAL TIME PCR SYSTEM, Wuhan Bonnin Technology Ltd, Laboratory Instruments Expert In China

Με τη χρήση της PCR πραγματικού χρόνου μπορεί να ανιχνευτεί ένας τεράστιος αριθμός παθογόνων τα οποία μολύνουν τρόφιμα. Μερικά από τα παθογόνα τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί είναι στελέχη *Salmonella* σε μαγειρεμένο χοιρινό κρέας, *Staphylococcus aureus*, στελέχη *Salmonella*, και *Shigella* σε νωπό χοιρινό κρέας όπως και *E. coli* σε διάφορα δείγματα [10]. Επίσης με τη χρήση της PCR πραγματικού χρόνου, υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσής και ιϊκού DNA όπως π.χ., της ηπατίτιδας Α (HAV) και του νοροϊού (NoV) [51]. Πρωτόκολλο qPCR έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των τριών κυρίων στελεχών του γένους *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus*) σε τρόφιμα τα οποία προέρχονται από τη θάλασσα, όπως είναι τα οστρακοειδή [54]. Η qPCR έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για την ανίχνευση του πρωτόζωου *Echinococcus multilocularis* χρησιμοποιώντας ως στόχους τα γονίδια *nad1* ή 12S rRNA του μικροοργανισμού [97].

4.2 Multiplex PCR (Πολυπλεκτική mPCR)

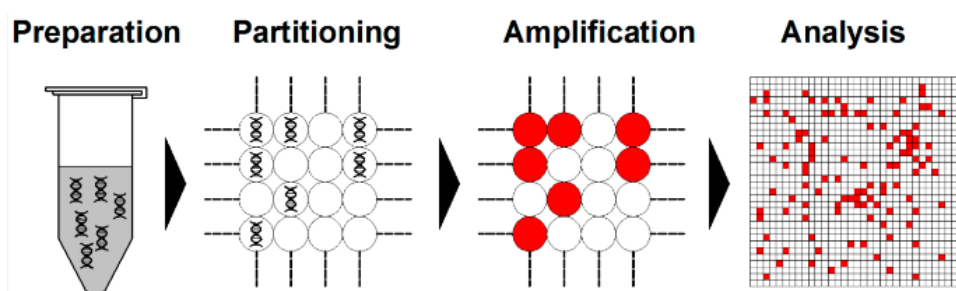
Η Multiplex PCR (mPCR) είναι μια τεχνική η οποία δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης πολλαπλών στόχων στο ίδιο δείγμα και έχει χρησιμοποιηθεί για πολλές κλινικές διαγνώσεις όπως για μυϊκές δυστροφίες, διαγνώσεις όγκων και ιατροδικαστικές διαγνώσεις. Με την περαιτέρω ανάπτυξη της τεχνικής, χρησιμοποιείται πλέον και στη διάγνωση παθογόνων που προκαλούν τροφιμογενείς λοιμώξεις [20]. Εκτός του ότι με τη συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να γίνει ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών παθογόνων, η μέθοδος προσφέρει εξειδίκευση, μεγάλη ευαισθησία όπως και ταχύτητα. Κατά τη μέθοδο, χρησιμοποιούνται πολλά ζευγάρια εκκινητών, τα οποία ενισχύουν ταυτόχρονα διαφορετικά θραύσματα DNA-στόχων. Συνήθως η mPCR χρησιμοποιείται ανίχνευση RNA και μεταλλάξεων [10]. Πρέπει να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις τις οποίες οι στόχοι της τεχνικής αυξηθούν πολύ σε έναν αριθμό, αρχίζουν να δημιουργούνται διμερή ανάμεσα στους εκκινητές με αποτέλεσμα η ροή ανίχνευσης της mPCR να μειώνεται [20].

Με αυτή τη μέθοδος μπορούν να ανιχνευτούν ποικίλοι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να μολύνουν τα τρόφιμα. Μερικοί από αυτούς είναι η *S. enterica*, η *L. monocytogenes*, η *Shigella flexneri* και η *E.coli* [20]. Η mPCR έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και τη διαφοροποίηση των *Campylobacter jejuni* και *Arcobacter butzleri* σε μια ποικιλία τροφίμων όπως παράγωγα χοιρινού ή όρνιθας, σε ωμά φρούτα

και λαχανικά και σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση [50]. Επίσης, η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση και του ολικού και του τοξικογόνου *V. cholerae* σε ψάρια και άλλα αλιευτικά προϊόντα [54].

4.3 Digital PCR (Ψηφιακή PCR ή dPCR)

Η τεχνική Digital PCR, dPCR ή ψηφιακή PCR περιεγράφηκε πρώτη φορά το 1999 από τους Kinzler και Vogelstein [98], και από τότε χρησιμοποιείται σε σημαντικό βαθμό για την ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων [99]. Η dPCR λειτουργεί παρόμοια με την κλασική PCR, δηλαδή χρησιμοποιείται για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, αλλά σε αυτή την τεχνική το δείγμα προς εξέταση κατανέμεται σε μεμονωμένα μόρια και μετά πραγματοποιείται η ενίσχυση δίνοντας σήμα για την ανάλυση της φύσης του μορίου-στόχου (ποιοτική) (εικόνα 14) [108]. Η ποσοτική ανάλυση γίνεται με τη χρήση της κατανομής Poisson [98]. Η κατανομή Poisson χρησιμοποιείται στη στατιστική για να βρει την πιθανότητα ενός συμβάντος σε συνάρτηση με ένα διάστημα χρόνου, απόστασης, περιοχής ή όγκου [101]. Στην dPCR, το δείγμα προς ανάλυση χρησιμοποιείται στη μέγιστη δυνατή αραιώσή του. Η διαφορά της τεχνικής αυτής από τη qPCR, είναι ότι το σήμα που δίνει είναι γραμμικό, επιτρέποντας την ανίχνευση πολύ σπάνιων μεταλλάξεων [99]. Οι εμπορικές πλατφόρμες οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των δειγμάτων, έχουν είτε χωριστά φρεάτια για τις αντιδράσεις, είτε διαχωρίζουν τα δείγματα με σταγονίδια νερού σε λάδι [100].



Εικόνα 35 Βήματα Digital PCR [108]

Η dPCR παρουσιάζει πολύ μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια. Τα πρωτόκολλα της μπορούν να σχεδιαστούν με τη χρήση των ίδιων αντιδραστηρίων και επίσης τα ποσοστά των ψευδώς αληθών αποτελεσμάτων είναι πολύ χαμηλά. Τέλος η dPCR δεν απαιτεί standards και δείγματα αναφοράς για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Όλα αυτά την καθιστούν καταλληλότερη από την real-time PCR για την ανάλυση των

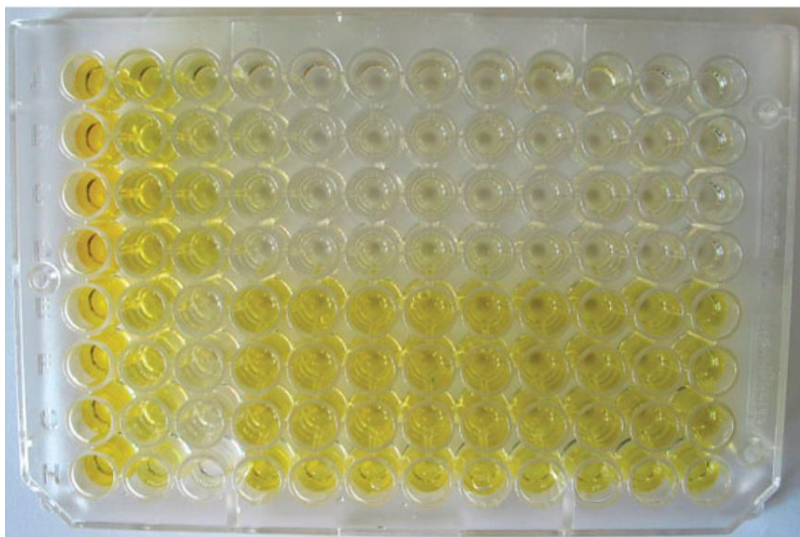
δειγμάτων. Βέβαια η τεχνική παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα, όπως, το ότι ένα δείγμα με πολύ μεγάλο φορτίο νουκλεϊκών οξέων μπορεί να κορεσθεί και να μην επιτρέψει την ανάλυση του, για αυτό το λόγο θα πρέπει να γίνεται σωστή αραίωση. Επίσης η επιλογή της κατάλληλης πλατφόρμας για την ανάλυση έχει πολύ μεγάλη σημασία στην έκβασή της. Το σημαντικότερο όμως, μειονέκτημα της τεχνικής, είναι το μεγάλο κόστος της [99].

Η dPCR έχει χρησιμοποιηθεί σαν συμπληρωματική τεχνική για την επιβεβαίωση αποτελεσμάτων σε μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε με χρήση qPCR, για την ανίχνευση του *Toxoplasma gondii* σε αλιευτικά προϊόντα τα οποία προέρχονται από τη θάλασσα της Μεσογείου [102]. Άλλη μια εφαρμογή της Digital PCR έχει πραγματοποιηθεί σε δείγματα πουλερικών τα οποία λήφθηκαν από σγαφείο. Τα δείγματα εξετάστηκαν για το βακτήριο *C. jejuni* [103]. Ένα ακόμα πρωτόκολλο το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση παθογόνων σε τρόφιμα με τη χρήση της ψηφιακής PCR είναι η απομόνωση *S.typhimorium* από κιμά χοιρινού κρέατος αγορασμένου από super market. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκαν απταμεροί, τα οποία είναι μονόκλωνα DNA ή RNA τα οποία συνδέονται με συγκεκριμένους στόχους αναδιπλώνοντας σε τρισδιάστατες δομές και πολλές φορές παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των αντισωμάτων όπως π.χ. το χαμηλότερο κόστος [104].

5. ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Η μέθοδος ELISA (Ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός) έκανε την αρχική της εμφάνιση το 1941 και το 1960 χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για τη μέτρηση των επιπέδων ινσουλίνης στο αίμα ασθενών [21].

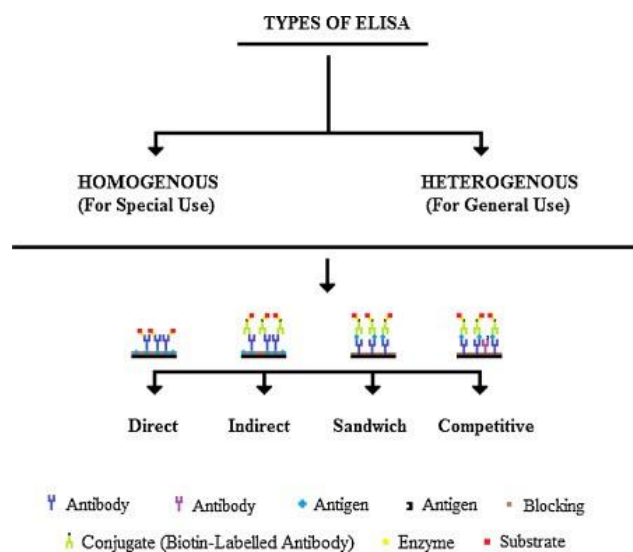
Η τεχνική ELISA ή αλλιώς Ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός, είναι μια γρήγορη και εύχρηστη ποσοτική μέθοδος ανίχνευσης μονόκλωνων ή δίκλωνων αντιγόνων (ag) σε μικρή ποσότητα μέσα σε ένα δείγμα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένζυμα ως αντιδραστήρια για την ποσοτικοποίηση μιας πρωτεΐνης ή κάποιου άλλου αντιγόνου. Κατά τη διαδικασία της ELISA, ένα ένζυμο (E) αντιδρά με ένα άχρωμο υπόστρωμα (S) και παράγει έγχρωμο προϊόν. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, είναι συνδεδεμένο με ομοιοπολικούς δεσμούς με ένα ειδικό αντίσωμα (ab), το οποίο αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Εάν το αντιγόνο αυτό υπάρχει στο προς εξέταση δείγμα, το σύμπλοκο αντισώματος- ενζύμου θα δεσμευτεί σε αυτό, στη συνέχεια της διαδικασίας θα γίνει η προσθήκη υποστρώματος, με αποτέλεσμα να επέλθει κατάλυση της αντίδραση από το ένζυμο και τέλος θα παραχθεί το έγχρωμο προϊόν (εικόνα 15). [22]



Εικόνα 36. ELISA, Παραγωγή έγχρωμου προϊόντος [94]

Υπάρχουν τέσσερα διαφορετικά ήδη ELISA (εικόνα 16) και χωρίζονται σε ομογενούς ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας και ετερογενούς ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας. Τα είδη ομογενούς ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας, συνήθως χρησιμοποιούνται για τη ανάλυση

δειγμάτων σε μικρές ποσότητες αλλά το κόστος τους είναι αρκετά μεγάλο χωρίς μάλιστα να προσφέρουν μεγάλη ευαισθησία αλλά το πλεονέκτημά του είναι η ευκολία στην εκτέλεσή. Τα είδη της ετερογενούς ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας χρησιμοποιούνται συχνότερα και είναι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τις προαναφερθείσες. Αντίθετα με τις ομογενείς, οι ετερογενείς οι μέθοδοι έχουν στο πρωτόκολλό τους και ένα στάδιο έκπλυσης ώστε να διαχωριστεί το δεσμευμένο αντιγόνο από το ελεύθερο μετά την αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος.



Εικόνα 37 Τύποι ELISA [22]

Παρακάτω θα παρατεθούν πιο αναλυτικά τα είδη της ELISA:

5.1 Άμεση ELISA (direct)

Η άμεση ELISA αναπτύχθηκε το 1971 και αποτελεί τη βάση για τους υπόλοιπους τύπους της μεθόδου. Αυτός ο τύπος ELISA χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιγόνων μεγάλου μοριακού βάρους.

Η πλάκα καλύπτεται από ag ή ab. Ένα επισημασμένο ab ή ag καθιστά δυνατή τη μέτρηση. Γίνεται έκπλυση για να αφαιρεθούν τα ελεύθερα ag ή ab και προστίθεται το

κατάλληλο υπόστρωμα ώστε να επέλθει η αλλαγή χρώματος η οποία αλλαγή στο τέλος μετράται για να γίνει ο προσδιορισμός ag ή ab.

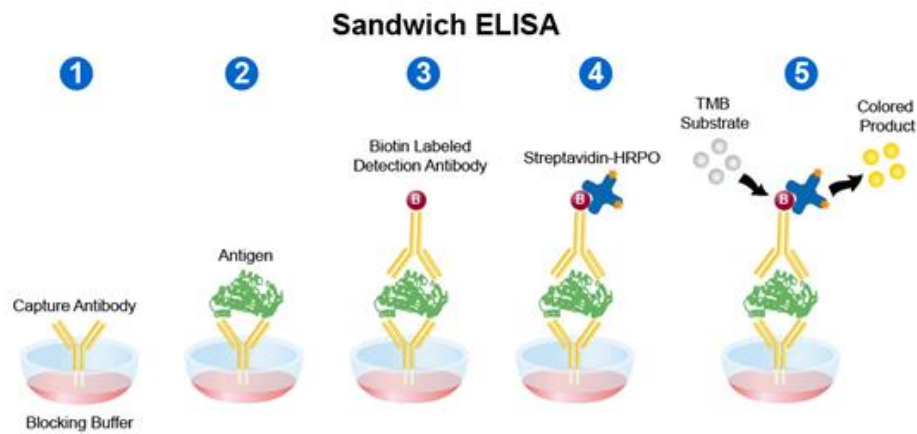
5.2 Έμμεση ELISA (indirect)

Η έμμεση ELISA χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1978, για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης IgG σε χοίρους. Το όνομα της προκύπτει από τον τρόπο λειτουργίας της. Αυτό που καθορίζει και διαχωρίζει το ag δεν είναι το πρωτεύον ab αλλά ένα άλλο ειδικό ab. Ο προς εξέταση ορός τοποθετείται σε φρεάτια επικαλυμμένα με ag και ξεκινά η επώαση. Τα ab και τα ag σχηματίζουν σύμπλοκο ag-ab και στη συνέχεια προστίθεται το δεύτερο ab το οποίο είναι επισημασμένο με ένζυμο, ώστε να γίνει ορατό το σύμπλοκο. Στη συνέχεια προστίθεται το υπόστρωμα για την παραγωγή χρώματος και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης. Ανάμεσα στα στάδια γίνονται πλύσεις [22].

Η άμεση και η έμμεση ELISA έχουν χρησιμοποιηθεί για ανάλυση δειγμάτων παιδικού φαγητού και αβγών για να την ανίχνευση υπολειμμάτων αντιβιοτικών νιτροφουρανίου, αντιβιοτικό το οποίο στο παρελθόν χρησιμοποιούταν στην κτηνοτροφία και από το 1995 έχει απαγορευτεί λόγω του ότι υπήρξε ανησυχία ότι τα υπολείμματά του μπορεί να είναι καρκινογόνα [38]. Επίσης η indirect ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση *L.monocytogenes* και *E.coli* σε λαχανικά [52].

5.3 Διπλή ELISA (sandwich)

Αυτού του τύπου η ELISA χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1977. Τα φρεάτια είναι καλυμμένα με δεσμευμένα ab. Προστίθεται στα φρεάτια το δείγμα προς εξέταση και ακολουθεί επώαση και στη συνέχεια πλύση. Με το πλύσιμο αφαιρούνται τα μη δεσμευμένα ag. Τα δεσμευμένα από τα ab αντιγόνα δεν μπορούν να αφαιρεθούν. Στη συνέχεια τα επισημασμένα με ένζυμο ab προστίθενται στα φρεάτια και επωάζονται. Ακολουθεί πλύση. Τέλος προστίθεται το υπόστρωμα ώστε να παραχθεί το έγχρωμο προϊόν για να δούμε την ύπαρξη θετικού ή αρνητικού αποτελέσματος και να γίνει ο προσδιορισμός. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται sandwich (εικόνα 17) διότι η σχετική πρωτεΐνη υπάρχει ανάμεσα σε δύο μόρια αντισώματος. Η διπλή ELISA είναι 2 με 5 φορές πιο ευαίσθητη από ότι οι υπόλοιποι τύποι [22].



Εικόνα 38. Λειτουργία Sandwich ELISA [123]

Η χρήση της sandwich ELISA, είναι πολύ συχνή για ανίχνευση παθογόνων και τοξινών σε τρόφιμα. Η μέθοδος εξασφαλίζει γρήγορη ανίχνευση των παθογόνων ή των τοξινών.

Ένα πρωτόκολλο που έχει αναπτυχθεί για την ασφάλεια τροφίμων είναι για την ανίχνευση *Salmonella Enteritidis* σε δείγμα γάλακτος χρησιμοποιώντας ως πρωτογενές αντίσωμα SE-Nb9 και την υπεροξειδάση χέρνου-Nb1 ως μέσο ανίχνευσης του υποστρώματος [37].

Μερικά ακόμα παραδείγματα είναι η ανίχνευση του παθογόνου *Vibrio parahaemolyticus* σε θαλασσινά. Για τη συγκεκριμένη ανίχνευση χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα κατά της αιμολυσίνης που σχετίζεται με την TDH (TRH) του παθογόνου *Vibrio parahaemolyticus* [25]

Τέλος η χρήση της τεχνικής είναι ευρέως διαδεδομένη για την ανίχνευση τοξινών σε τρόφιμα όπως την τοξίνη του *Clostridium perfringens* α, β, και ε, εντεροτοξίνες της *Escherichia coli*, και τοξίνες που προκαλούν αλλαντίαση [26] όπως και *L.monocytogenes* σε ποικίλα τρόφιμα [52].

5.4 Ανταγωνιστική ELISA (competitive)

Αυτός ο τύπος ELISA χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1976. Η επιφάνεια των φρεατίων επικαλύπτεται με ag ειδικό για ab ή με ab ειδικό για ag. Το δείγμα προς εξέταση και το συνασμένο με ένζυμο ag ή ab τοποθετούνται διαδοχικά στα φρεάτια. Τα συνασμένα ή όχι ag ή ab ανταγωνίζονται μεταξύ τους για να συνδεθούν με το ab ή το ag μέσα στα φρεάτια. Ακολουθεί πλύσιμο και προσθήκη υποστρώματος ώστε να γίνει η παραγωγή έγχρωμου προϊόντος και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης.

Στις τεχνικές ELISA όταν η ποσότητα του ag ή του ab που αναλύεται στο δείγμα είναι χαμηλή, παρατηρείται υψηλή απορρόφηση, ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις αυτών παρατηρείται το αντίθετο [22].

Η συγκεκριμένη τεχνική, χρησιμοποιείται τη βιομηχανία τροφίμων για την ανίχνευση αλλεργιογόνων στα τρόφιμα. Τα αλλεργιογόνα μπορούν να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις με απρόβλεπτα αποτελέσματα στους καταναλωτές.

Προϊόντα τα οποία βρίσκονται θετικά σε παρουσία αλλεργιογόνων ανακαλούνται από τα ράφια. Τα συχνότερα είδη είναι το γάλα, τα αυγά, τα φιστίκια και η σόγια [24].

Η έμμεση ανταγωνιστική ELISA έχει βρει εφαρμογή και στον εντοπισμό υπολειμμάτων αντιβιοτικών σε μοσχάρι κρέας ή σε κοτόπουλο. Τέτοια αντιβιοτικά είναι η τετρακυκλίνη και η σιπροφλοξασίνη [53].

Τα kit ELISA που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αλλεργιογόνων σε κάθε περίπτωση πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά διότι σε ένα τρόφιμο με διάφορα συστατικά π.χ. έναν ξηρό καρπό με επικάλυψη σοκολάτας, μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα [24].

Πέραν των kit ELISA τα οποία χρησιμοποιούνται εργαστηριακά και με επιτυχία ανιχνεύουν και ταυτοποιούν τα παθογόνα με βάση τα αντιγόνα και τα αντισώματα, από το 2010 έχει αναπτυχθεί μια καινοτόμα μέθοδος η paper-based ELISA (p-ELISA). Η μέθοδος χρησιμοποιείται σαν ένα γρήγορος και οικονομικός τρόπος ανίχνευσης, χρειάζεται μόνο 5μL δείγματος και 3 ώρες επώασης ώστε να δώσει ένα αποτέλεσμα. Ένα παράδειγμα εφαρμογής της p-ELISA είναι η ανίχνευση της *E.coli* O157: H7, ένα από τα συνηθέστερα βακτήρια τα οποία προκαλούν τροφιμογενείς λοιμώξεις παγκοσμίως, σε αναπτυσσόμενες χώρες όπου η πρόσβαση σε εργαστηριακό περιβάλλον δεν είναι πάντα εφικτή [121].

6. NGS -Next Generation Sequencing

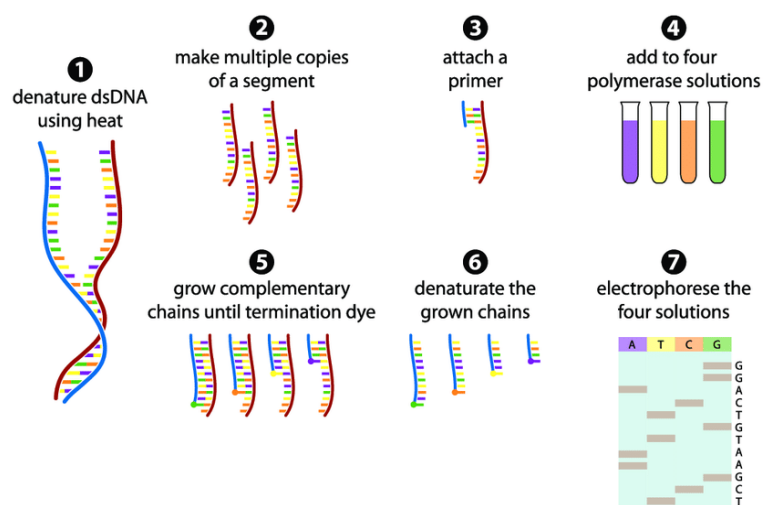
Το 1977 ο Frederick Sanger έκανε μια καινοτόμα δημοσίευση παρουσιάζοντας για πρώτη φορά την τεχνική αλληλούχησης νουκλεϊκών οξέων. Η πρώτη εφαρμογή προσδιορισμού αλληλουχίας DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης και η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο του φθορισμού. Οι περισσότερες βελτιώσεις πάνω στην τεχνική αυτή έγιναν κατά τη διάρκεια του Human Genom Project (HGP) από το 1990 και για ακόμα 13 χρόνια. Το 2001 δημοσιεύτηκαν τα πρώτα αποτελέσματα αυτής της προσπάθειας και το 2004 δημοσιεύτηκε ολοκληρωμένη η ακολουθία του DNA (WGS). Μετά το HGP και την εξέλιξη αυτής της τεχνολογίας έχουμε την άφιξη της αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS). Στόχος των πιο εξελιγμένων τεχνικών είναι η μείωση του κόστους, μιας και μέχρι τότε το κόστος για την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος ήταν απαγορευτικό όπως και η μείωση του χρόνου και του κόπου. Σήμερα υπάρχουν 4 γενιές με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Αξίζει να σημειωθεί το ότι στη 2^η γενιά το κόστος ήταν πέντε φορές μικρότερο και η παραγωγή πέντε φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την 1^η γενιά.

Η κάθε γενιά αλληλούχησης νουκλεϊκών οξέων έχει τα δικά της χαρακτηριστικά

- 1^η γενιά αλληλούχησης: Τεμαχισμένες ακολουθίες παράγονται είτε με ενζυματική επένδυση από έναν εκκινητή που υβριδοποιείται σε μια δεξαμενή μορίων μήτρας και τερματίζει με την εισαγωγή συγκεκριμένων βάσεων T, C, G ή A, είτε με τον τρόπο της μεθόδου κατά Maxam και Gilbert. Ο διαχωρισμός γίνεται με ηλεκτροφόρηση και τα προϊόντα φαίνονται με ραδιενεργή επισήμανση σε φιλμ ή με φθορίζουσες χρωστικές.
- 2^η γενιά αλληλούχησης: Δημιουργούνται μεμονωμένα κλωνικά εκμαγεία DNA και αναλύονται όλα παράλληλα με χρήση μικρορευστών. Πραγματοποιούνται αντιδράσεις προσδιορισμού αλληλουχίας σε κύκλους, με προσθήκη βάσεων και απεικόνιση. Για τον προσδιορισμό των αλληλουχιών χρησιμοποιούνται συνεχόμενες εικόνες. Η οπτικοποίηση των βάσεων γίνεται με χημειοφωτοδιάγεια, φθορισμό ή με αλλαγές στο pH. Βασικό χαρακτηριστικό της δεύτερης γενιάς, είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν παράλληλα πολλά

κλωνικά πρότυπα για τον προσδιορισμό μιας αλληλουχίας DNA χρησιμοποιώντας ενζυματική αντιγραφή.

- 2.5^η γενιά αλληλούχησης: Αυτή η γενιά αναφέρεται και ως 3^η αλλά μοιράζεται χαρακτηριστικά της 2^{ης} γενιάς, όπως τα όργανα και την αλληλούχηση με την βοήθεια ενζύμων. Η διαφορά είναι ότι το ενζυματικό σύστημα πολυμεράσης τοποθετείται στον πυθμένα τον φρεατίων της πλάκας. Επίσης η οπτικοποίηση γίνεται με φθορίζουσα χρωστική.
 - 3^η γενιά αλληλούχησης: Η τρίτη γενιά ορίζεται από την άμεση ανάγνωση μεμονωμένων μορίων. Ακόμη, δεν χρησιμοποιείται ενζυματικό σύστημα αντιγραφής για την αναγνώριση της αλληλουχίας
 - 4^η γενιά αλληλούχησης: Είναι ακόμα σε πειραματικό στάδιο. Σε κάθε γενιά αλληλούχησης χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές. Μια από τις τεχνικές αυτές είναι η αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS) και ανήκει στην πρώτη γενιά. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται και για κλινική έρευνα και για κλινική θεραπεία.
- [2]



Εικόνα 39. Η τεχνική Sanger σε 7 βήματα [93]

Η τεχνική αυτή στηρίζεται πάνω στις μεθόδους Sanger και Maxam-Gilbert που αποτελούν του θεμέλιους λίθους στην αλληλούχηση του DNA. Συγκεκριμένα, η μέθοδος Sanger (εικόνα 12) χρησιμοποιεί συγκεκριμένα νουκλεοτίδια, τα οποία ονομάζονται διδεοξύ νουκλεοτίδια, για τον τερματισμό τις αλυσίδας. Αυτά τα νουκλεοτίδια στερούνται 3-υδροξυλομάδας. Έτσι, στον τερματισμό της αναπτυσσόμενης αλυσίδας δεν μπορεί να δημιουργηθεί φωσφοδιεστερικός δεσμός από την DNA πολυμεράση. Γίνεται ραδιενεργή επισήμανση ή επισήμανση με φθορισμό για να γίνει ανίχνευση και προσδιορισμός της αλληλουχίας σε πήκτωμα γέλης. Η μέθοδος Maxam-Gilbert στηρίζεται στη χημική τροποποίηση του DNA σε συγκεκριμένα τμήματα. Η χημεία της αρχικής μεθόδου Maxam-Gilbert έχει τροποποιηθεί και χρησιμοποιείται για την εξάλειψη τοξικών αντιδραστηρίων.

Όπως αναφέρθηκε η NGS στηρίζεται στις παραπάνω αρχές μεθόδων. Στην ουσία είναι μια εξελιγμένη μέθοδο Sanger αλλά με τη χρήση επαναχρησιμοποιήσιμων τριχοειδών και με τη χρήση ηλεκτροκινητικής. Αυτές οι δύο τροποποιήσεις έχουν αυξήσει την ταχύτητα και την ευκολία της μεθόδου και έχουν ρίξει το κόστος της. [28]

Η NGS χρησιμοποιείται στην κλινική μικροβιολογία ως μέθοδο διάγνωσης, αλλά όχι σε επίπεδο ρουτίνας. Η μέθοδος αλληλούχησης νέας γενιάς δίνει την δυνατότητα ανίχνευσης διάφορων τύπων μικροοργανισμών που μπορούν να υπάρχουν σε ένα δείγμα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να ταυτοποιηθούν ταυτόχρονα. Ένα παράδειγμα χρήσης της NGS στην κλινική μικροβιολογία είναι η ανακάλυψη το ότι το μικροβίωμα του εντέρου παίζει ρόλο σε αλλεργικές παθήσεις, φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου ακόμη και σε πνευματικές παθήσεις. [29]

Στην ασφάλεια τροφίμων, η NGS χρησιμοποιείται για ωμά φρούτα και λαχανικά τα οποία, τα οποία στις σημερινές συνθήκες ζωής, είναι εύκολο να μολυνθούν από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, και από το νερό με αποτέλεσμα να οδηγήσουν σε outbreaks.

Η NGS σαν τεχνική, προσφέρει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης τεράστιου αριθμού ιικών παθογόνων διότι μπορεί ταυτόχρονα να συγκρίνει πολλές αλληλουχίες δειγμάτων με αυτές που υπάρχουν στη βάση δεδομένων της. Αυτό το γεγονός της καθιστά ένα πολλά υποσχόμενο και πολύτιμο εργαλείο για την ασφάλεια των τροφίμων. Βέβαια, λόγω των ανασταλτικών ουσιών οι οποίες πιθανό να περιέχονται σε δείγματα τροφίμων, η τεχνική χρειάζεται βελτιώσεις στο συγκεκριμένο θέμα [30].

Γενικά η NGS είναι δυνατό να εμφανίσει ορισμένα σφάλματα τα οποία είναι αποτέλεσμα των μοτίβων της ακολουθίας του DNA [122].

Η πρώτη εφαρμογή της NGS για την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος ενός βακτηρίου τα οποίο προκάλεσε πανδημία ήταν για την ταυτοποίηση της *Listeria*. Άλλα παθογόνα που έχουν ταυτοποιηθεί με τη χρήση NGS είναι η *Salmonella enterica* και η Shiga toxin της *E. coli* O104:H4 [122].

Με την αλληλούχηση νέας γενιάς είμαστε, επίσης, σε θέση να ανιχνεύσουμε ιικό γενετικό υλικό από ποικίλους ιούς όπως τον Νοροϊό (NoV), τον ανθρώπινο Αδενοϊό (HAdV) και τον ιό της ηπατίτιδας Ε (HEV), οι οποίοι μπορούν να μολύνουν τον άνθρωπο και να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση με απρόβλεπτες συνέπειες.

Το γενετικό υλικό των ιών μπορεί αν ανιχνευτεί και με qPCR, τα τελευταία χρόνια προτιμάται η NGS διότι η πρώτη είναι πιθανό σε ορισμένα δείγματα να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα [30].

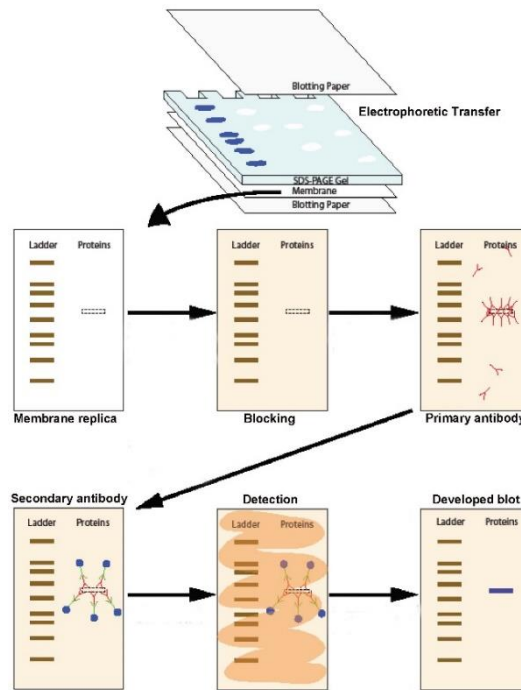
7. Western Blot

Η τεχνική Western Blot (WB) ή αλλιώς ανοσοστόψωμα πρωτεΐνης, περιεγράφηκε πρώτη φορά το 1979 από τους H. Towbin, Th. Staehelin και J. Gordon. Έκτοτε, έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων της τεχνικής, πάνω από 19.000 ανθρώπινες πρωτεΐνες-στόχοι [31].

Η αρχική χρήση της τεχνικής ήταν να παρέχει απάντηση στο ερώτημα, εάν σε ένα δείγμα υπάρχει ή όχι κάποια πρωτεΐνη [34].

Όπως αναφέρεται και στην ονομασία της τεχνικής, η χρήση της είναι ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της τεχνικής είναι πως παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και φυσικών αλλά και μετουσιωμένων πρωτεϊνών [32].

Κατά την τεχνική ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία: οι προς εξέταση πρωτεΐνες διαχωρίζονται από το δείγμα με ηλεκτροφόρηση (SAGE-PAGE) και στη συνέχεια μεταφέρονται από το πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης σε μεμβράνη στύψωσης η οποία είναι από νιτροκυτταρίνη ή από PVDF [32] (εικόνα 19). Η μεταφορά των μπορεί να γίνει είτε με υγρό σύστημα, το οποίο χρησιμοποιείτε κυρίως για τη μεταφορά μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεϊνών, είτε με ημίξηρο για μικρότερες πρωτεΐνες. Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ακολουθεί η χρώση αυτής με χρωστικές όπως η Coomassie R-250, Ponceau S, Amido Black κ.α. [31]. Είναι πολύ σημαντικό, να μην γίνει πρόσληψη κάποιου μη ειδικού πρωτογενούς ή δευτερογενούς αντισώματος από τη μεμβράνη. Ο αποκλεισμός αυτός μπορεί να επιτευχθεί με τη προσθήκη αλβουμίνης από ορό βοοειδών. Η μεμβράνη με το στύψωμα, επώάζεται με πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο δεσμεύεται με την πρωτεΐνη-στόχο, είτε όλη τη νύχτα στους 4°C είτε 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις επέλθει η επώαση, γίνεται έκπλυση ώστε να πραγματοποιηθεί απομάκρυνση του μη δεσμευμένου πρωτογενούς αντισώματος και συνέχεια γίνεται προσθήκη δευτερογενούς αντισώματος το οποίο είναι σημασμένο με ένα ένζυμο αναφοράς συζευγμένο με κάποιο χρωμογόνο ή φθορίζον υπόστρωμα ώστε να μπορεί στη συνέχεια να ανιχνευθεί και να απεικονιστεί. Η ανίχνευση των αποτελεσμάτων, μετά την επώαση, πραγματοποιείται είτε με χρωματομετρία, είτε με φθορισμό είναι με φωτάλγεια ανάλογα με το σημασμένο ένζυμο του δευτερογενούς αντισώματος το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί [32].



Εικόνα 40. Western Bot μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη [39]

Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα την τεχνικής WB έναντι της τεχνικής ELISA, όπως προαναφέρθηκε, είναι πως η πρώτη έχει την δυνατότητα ανίχνευσης πρωτεϊνών όχι μόνο φυσικών αλλά και μετουσιωμένων [33]. Επίσης η WB έχει την ικανότητα να ανιχνεύει ισόμορφα των ίδιων πρωτεϊνών με πολύ μικρή διαφορά μεγέθους [32]

Για να μπορέσει να είναι αποτελεσματική η WB, ο προσεκτικός σχεδιασμός της και η σωστή τεχνογνωσία είναι εξέχουσας σημασίας. Αυτό συμβαίνει διότι και η μικρότερη αλλαγή σε κάποιο αντιδραστήριο μπορεί να οδηγήσει σε κάποιο σφάλμα ή σε παρερμηνεία των αποτελεσμάτων [34].

Ένα εύκολο πρωτόκολλο WB έχει δημιουργηθεί για την ανίχνευση της εντεροτοξίνης A του *Staphylococcus aureus* (SEA) στα τρόφιμα. Η SEA προκαλεί στον άνθρωπο γαστροεντερίτιδα, μια κοινή τροφική ασθένεια. Η εντεροτοξίνη A του *St. Aureus* εντοπίζεται και σε τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία οπότε οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται. Η τεχνική WB έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει και μετουσιωμένες πρωτεΐνες και αυτό την καθιστά καταλληλότερη άλλων (πχ. της ELISA) για τη ανίχνευση και τον προσδιορισμό της SEA [33]. Η WB επίσης έχει χρησιμοποιηθεί σε δείγματα χοίρων ελευθέρως βοσκής, για την ανίχνευση *T. gondii* το οποίο θα μπορούσε να μεταδοθεί στους ανθρώπους [124]. Τρόφιμα που μπορούν να εκλεχθούν με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο είναι τα μανιτάρια, το γάλα και το κρέας. [33].

8. Τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων

Οι τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για τη διάγνωση [35]. Η ισοθερμική ενίσχυση είναι ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση παθογόνων σε τρόφιμα διότι παρέχει ευαισθησία, ταχύτητα ανίχνευσης, ακρίβεια και ειδικότητα. Ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα των ισοθερμικών τεχνικών είναι ότι δεν απαιτούν πολύ ακριβό και εξειδικευμένο εξοπλισμό, πράγμα που καθιστά τις τεχνικές καλή επιλογή για τη βιομηχανία τροφίμων [10]. Οι τεχνικές αυτές είναι βασισμένες στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) και μας βοηθούν στην ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε δείγμα [35].

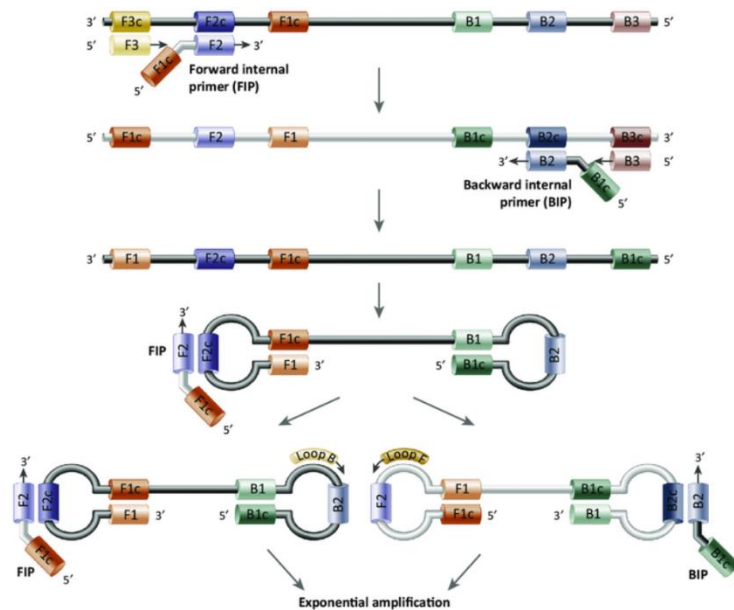
Οι δύο κύριες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται είναι η ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMP- Loop-mediated isothermal amplification) και η ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος (NASBA- Nucleic acid sequence-based amplification), τις οποίες και θα αναλύσουμε παρακάτω.

8.1 LAMP - Loop-mediated isothermal amplification

Η LAMP είναι μια τεχνική που αναπτύχθηκε το 2000. Η τεχνική είναι γρήγορη, ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει πολύ συγκεκριμένα παθογόνα που προσβάλουν τρόφιμα και κατ' επέκταση τον άνθρωπο [36].

Η μέθοδος LAMP βασίζεται στη σύνθεση DNA με μετατόπιση κλώνου η οποία εκτελείτε από μια DNA-πολυμεράση και από 2 εσωτερικούς και 2 εξωτερικούς εκκινητές. Στα πρώτα στάδια χρησιμοποιούνται όλοι οι εσωτερικοί και εξωτερικοί εκκινητές αλλά στην πορεία της τεχνικής θα χρησιμοποιηθούν μόνο οι 2 εσωτερικοί εκκινητές για τη σύνθεση του DNA-κλώνου (εικόνα 20). Όλη η διαδικασία διεξάγεται κάτω από ισοθερμικές συνθήκες 60-65°C και κατά την ανίχνευση των αποτελεσμάτων δεν απαιτείται ηλεκτροφόρηση διότι μπορεί να γίνει με γυμνό μάτι.

Η LAMP παρέχει τη δυνατότητα ενίσχυσης 10⁹ αντιγράφων ανά ώρα και με μεγάλη εξειδίκευση. Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής εξαρτάται από το μέγεθος του DNA-στόχου, το οποίο θα πρέπει αν είναι μικρότερο των 300bp. Ένας ακόμα παράγοντας είναι η επιλογή της κατάλληλης DNA-πολυμεράσης με την Bst DNA πολυμεράση την καταλληλότερη για μεγάλα θραύσματα DNA (65°C για 1 ώρα) και την BcaBest DNA πολυμεράση για στόχους μικρότερους των 10⁻²³ mole [35].



Εικόνα 41. LAMP - Loop-mediated isothermal amplification

Μια πρώτη εφαρμογή της LAMP στην ασφάλεια τροφίμων, ήταν η ανίχνευση του γονιδίου *stxA₂* της *Escherichia coli* [6].

Επίσης, η μέθοδος LAMP έχει χρησιμοποιηθεί για τη γρήγορη ανίχνευση στελεχών σαλμονέλας σε τρόφιμα με ιδανικές συνθήκες σε θερμοκρασία 65°C σε 45 λεπτά. Αυτό το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αναπτύχθηκε το 2010 και πραγματοποιήθηκε σε 214 στελέχη σαλμονέλας που προσβάλλουν τα τρόφιμα. Η ειδικότητα της μεθόδου ανήλθε στο 97.7% έναντι της PCR που η ειδικότητά της ανήλθε στο 91.6% [9]. Τέλος άλλο ένα παράδειγμα χρήσης της LAMP για τον εντοπισμό παθογόνων σε τρόφιμα, είναι η ανίχνευση των *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus* σε γαρίδες, οστρακοειδή και σε άλλα αλιευτικά προϊόντα [54].

8.2 NASBA- Nucleic acid sequence-based amplification

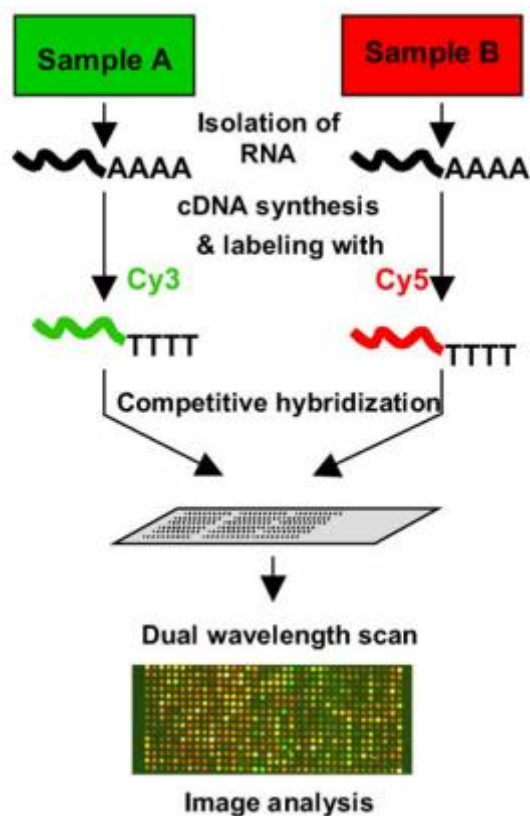
Η ενίσχυση με βάση την ακολουθία των νουκλεϊκών οξέων (NASBA) είναι μια τεχνική προγενέστερη της LAMP, η οποία αναπτύχθηκε στην αρχή του 1990. Η NASBA λειτουργεί ενισχύοντας νουκλεϊκά οξέα κάτω από ισοθερμικές συνθήκες. Μια από τις διαφορές της από την PCR είναι πως η δεύτερη χρειάζεται θερμοκυκλωτή. Η τεχνική κυρίως χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μονόκλωνου RNA που μετά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφάσης μετατρέπεται σε cDNA. Η διαδικασία πραγματοποιείται με τη χρήση δύο ειδικών εκκινητών και τριών ενζύμων στους 41°C

περίπου. Τα αμπλικόνια της NASBA, τέλος, ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης.

Στη ασφάλεια τροφίμων , χρησιμοποιείται η NASBA πραγματικού χρόνου (real-time NASBA), για την ανίχνευση παθογόνων όπως η *Salmonella enterica*, το *Vibrio cholerae*, ο *Staphylococcus aureus*, το *Campylobacter jejuni*, και το *Campylobacter coli*. Επίσης χρησιμοποιείται για την ανίχνευση RNA παθογόνων [36].

9. DNA Microarrays

Οι μικροσυστοιχίες - microarrays, άρχισαν να εμφανίζονται και να εφαρμόζονται το 1995. Η πρώτη μικροσυστοιχία χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της γονιδιακής έκφρασης πολλών γονιδίων ταυτόχρονα. Η πρώτη αυτή μικροσυστοιχία, κατασκευάστηκε πάνω σε πάνω σε μια γυάλινη διαφάνεια μικροσκοπίου, με τη βοήθεια ενός ρομποτικού εκτυπωτή. Η αρχικές χρήσεις στην κλινική ανάλυση ήταν η διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης των διαφορετικών τύπων καρκίνου ώστε να δοθούν προγνωστικές πληροφορίες, ο εντοπισμός μεταλλάξεων στο ανθρώπινο DNA και η πραγματοποίηση συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού βάσει συστοιχιών, το οποίο είναι ένα εργαλείο που βοηθά στον έλεγχο παραλλαγών αριθμού αντιγράφων σε ολόκληρο το γονιδίωμα.



Εικόνα 42. Μικροσυστοιχίες – οπτικό αποτέλεσμα πάνω σε γυαλί [47]

Η αρχική μορφή των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν στις μικροσυστοιχίες ήταν cDNAs και η ανίχνευση γινόταν πάνω σε γυαλί, αλλά στην πορεία της εξέλιξης της τεχνικής, άρχισαν να χρησιμοποιούνται βραχέα ολιγονουκλεοτίδια [46] 15-30 βάσεων, και δεν χρησιμοποιούταν γυαλί αλλά αντικειμενοφόρος πλάκα πυριτίου. Η διαδικασία

αυτή ονομάζεται φωτολιθογραφία [57]. Τα βραχεία ολιγονουκλεοτίδια προσφέρουν μια μεγαλύτερη εξειδίκευση στη μέθοδο [46].

Οι μικροσυστοιχίες είναι μέθοδος ημιποσοτική και ευαίσθητη [47]. Μερικά από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης δειγμάτων παράλληλα με άλλα δείγματα προς εξέταση [48]. Η τεχνική, λοιπόν, μπορεί να ανιχνεύσει και να μελετήσει παράλληλα χιλιάδες ή και δεκάδες χιλιάδες γονίδια πάνω σε μία επιφάνεια 1-2cm². Η ανίχνευση μπορεί να γίνει είτε για αλληλουχίες DNA ή RNA πάνω σε γυάλινο μέσω ή σε διαφάνεια πυριτίου [57]. Είναι επίσης, μέθοδος σχεδόν αποκλειστικά αυτοματοποιημένη γεγονός το οποίο καθιστά ελάχιστα τα σφάλματα από λάθος ανθρώπινο χειρισμό και ενισχύει την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου [47]. Πλέον η τεχνική χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του προφίλ γονιδιακής έκφρασης, για αλληλούχηση DNA, για διάγνωση ασθενειών και για τη δημιουργία γονότυπων.

Ο συνδυασμός της mPCR και των DNA μικροσυστοιχιών παρέχει ένα πολύ δυνατό εργαλείο στη διάγνωση, διότι χρησιμοποιείται ευρέως για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση βακτηριών παθογόνων σε δείγματα.

Πέραν των προτερημάτων της τεχνικής, παρουσιάζονται και ορισμένα μειονεκτήματα όπως το μεγάλο κόστος της μεθόδου, το ότι τα υλικά είναι πολύ εύθραυστα και το η τεχνική έχει χαμηλή δυνατότητα ανίχνευσης με αποτέλεσμα ενώ μπορεί να αναλύσει παράλληλα δείγματα, ο αριθμός αυτών δεν μπορεί να είναι μεγάλος [48].

Η ανίχνευση γονιδίων των διάφορων παθογόνων με χρήση μικροσυστοιχιών γίνεται σε παράγωγα mPCR. Με τη μέθοδο microarrays έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα μολυσμένων τροφίμων 15 διαφορετικά στελέχη *Salmonella*, *Shigella* αλλά και *E. coli* [49].

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας iii), παρατίθενται οι τεχνικές οι οποίες αναλύθηκαν παραπάνω όπως και τα παθογόνα τα οποία, σύμφωνα με την βιβλιογραφία η οποία χρησιμοποιήθηκε, μπορούν να ανιχνευθούν αλλά και να ταυτοποιηθούν με τις μοριακές αυτές τεχνικές:

Πίνακας ivi Μέθοδοι και παθογόνα

<u>Τεχνική</u>	<u>Παθογόνο</u>
qPCR/real-time PCR	<i>Salmonella spp</i> , <i>St.aureus</i> , <i>Shigella spp</i> , <i>E.coli</i> , HAV, NoV, <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>
Multiplex PCR	<i>S.enterica</i> , <i>L.monocytogenes</i> , <i>S.flexneri</i> , <i>E.coli</i> , <i>C.jejuni</i> , <i>A.butzleri</i> , <i>Pseudomonas spp</i>
Digital PCR	<i>T. gondii</i> , <i>c.jejuni</i> , <i>Styphimorium</i>
Direct ELISA	Antibiotic residues
Indirect ELISA	Antibiotic residues, <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i>
Sandwich ELISA	<i>S.enteritis</i> , <i>V.parahaemolyticus</i> , <i>Cl.perfringens</i> , <i>E.coli</i> , <i>L.monocytogenes</i>
Competitive ELISA	Allergens, Antibiotic residues
NGS-next generation sequencing	HEV, NoV, HAdV, <i>S. enterica</i> , <i>Listeria</i> , <i>Ecoli</i>
Western Blot	SEA
LAMP- Loop-mediated isothermal amplification	<i>Salmonella spp</i> , <i>E. coli</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>
NASBA- Nucleic acid sequence-based amplification	<i>S.enterica</i> , <i>V.cholerae</i> , <i>St.aureus</i> , <i>C.jejuni</i> , <i>E.coli</i> ,, pathogens' RNA
DNA Microarrays	<i>Salmonella spp</i> , <i>Shigella spp</i> , <i>E. coli</i>

10.Επίλογος-Συμπεράσματα

Η ασφάλεια των τροφίμων και του νερού είναι αυτή η οποία μπορεί να εξασφαλίσει ότι ο άνθρωπος μπορεί να καταναλώσει άφοβα τα απαραίτητα για την επιβίωση του στοιχεία. Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί ανά τα χρόνια είναι πολλές και παρέχουν τεράστιες δυνατότητες στην ανίχνευση και την ταυτοποίηση παθογόνων που μπορούν να προκαλέσουν τροφιμογενείς και υδατογενείς λοιμώξεις. Οι μέθοδοι οι οποίες στηρίζονται στις αρχές της PCR κυρίως η real-time PCR χρησιμοποιούνται ευρέως και σε επίπεδο ρουτίνας για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση παθογόνων σε τρόφιμα και σε δείγματα ασθενών. Η ELISA, με τα kit τα οποία παρέχονται, δίνει τη δυνατότητα γρήγορης και εύκολης ανίχνευσης. Η NGS και οι μικροσυντοιχίες μας έχουν δώσει σημαντικά στοιχεία για τις αλληλουχίες DNA και RNA των παθογόνων και θεωρούνται πολλά υποσχόμενες τεχνικές για το μέλλον. Οι μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων παρέχουν γρήγορη και ευαίσθητη ανάλυση και η Western Blot μας προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης μέχρι και αποδιατεγμένων πρωτεϊνών.

Οι παραπάνω μέθοδοι προσφέρουν ένα μεγάλο φάσμα δυνατοτήτων όπως είναι η ανίχνευση, η ταυτοποίηση, η ικανότητα να κατανοήσουμε την δομή και τη μεταδοτικότητα των παθογόνων αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο σε περιβάλλον εργαστηρίου και ορισμένες από αυτές μπορούν να εκτελεστούν μόνο από εξειδικευμένο αναλυτή. Οι τροφιμογενείς και υδατογενείς λοιμώξεις όμως, πλήττουν όχι μόνο τις ανεπτυγμένες αλλά πλήττουν και σε μεγάλο βαθμό τις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου πολλές φορές η πρόσβαση σε καθαρό νερό και τροφή δεν είναι εφικτή και η πρόσβαση σε εργαστήριο είναι ακόμα δυσκολότερη. Σαν αποτέλεσμα όλων αυτών, έχει γεννηθεί η ανάγκη ανάπτυξης απλούστερων μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων οι οποίες θα δίνουν τη δυνατότητα να εφαρμοστούν εκτός περιβάλλοντος εργαστηρίου, ακόμα και σε οικιακό περιβάλλον. Τέτοιες μέθοδοι θα είναι εύκολα προσβάσιμοι στο κοινό ενδιαφέροντος και δεν θα χρειάζονται ειδικά εκπαιδευμένους αναλυτές για το χειρισμό τους. Επίσης το κόστος τους θα πρέπει να είναι μικρό. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η paper based ELISA η οποία αναφέρθηκε παραπάνω και έχει δώσει τη δυνατότητα πρώτης ανίχνευσης παθογόνων με πάρα πολύ μικρό κόστος και με μικρή ποσότητα δείγματος.

Στο μέλλον ευελπιστούμε και περιμένουμε να αναπτυχθούν ακόμα πιο ευαίσθητες μέθοδοι, πολύ πιο γρήγορες, με μικρότερο κόστος, μεγαλύτερο φάσμα ανιχνεύσεις, οι οποίες θα επιτρέπουν ακόμα και σε ένα ελάχιστο δείγμα τροφής, νερού ή δείγματος ασθενή να οδηγούν στη γρήγορη και έγκυρη διάγνωση.

Η καλύτερη λύση, βέβαια για την αποφυγή των εξάρσεων τροφιμογενούς ή υδατογενούς φύσης, είναι η πρόληψη και για αυτό το λόγο θα πρέπει τα τρόφιμα προς κατανάλωση, από την αρχή ακόμα την επεξεργασίας τους, να πληρούν όλες τις υγειονομικές προϋποθέσεις, ο χειρισμός τους να γίνεται βάση των οδηγιών υγείας οι οποίοι προβλέπονται από το εκάστοτε νομοθετικό πλαίσιο, σε απόλυτα καθαρά μηχανήματα και με σωστή αποθήκευση ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες έκθεσης των καταναλωτών σε παθογόνα. Επίσης η προσωπική υγιεινή του καθενός ατόμου, και πολύ περισσότερο των ανθρώπων οι οποίοι εργάζονται στη βιομηχανία τα εστίασης είναι σημαντικός ανασταλτικός παράγοντας στον περιορισμό διασποράς τροφιμογενών παθογόνων.

Βιβλιογραφία

- [1] <https://www.who.int/>
- [2] <https://www.fda.gov/>
- [3] <https://www.efsa.europa.eu/en>
- [4] <https://www.cdc.gov/>
- [5] Chapter 6 - Noise and Stochasticity in Gene Expression: A Pathogenic Fate Determinant, Mikkel Girke Jørgensen, Renske van Raaphorst, Jan-Willem Veening, [Methods in Microbiology Volume 40](#), 2013, Pages 157-175
- [6] A large outbreak of botulism: the hazardous baked potato, [F J Angulo 1](#), [J Getz](#), [J P Taylor](#), [K A Hendricks](#), [C L Hatheway](#), [S S Barth](#), [H M Solomon](#), [A E Larson](#), [E A Johnson](#), [L N Nickey](#), [A A Ries](#), 1998 Jul;178(1):172-7.doi: 10.1086/515615.
- [7] http://news.bbc.co.uk/2/hi/uk_news/wales/south_east/6983113.stm
- [8] <https://www.foodsafetynews.com/2022/11/salad-behind-swedish-salmonella-outbreak/>
- [9] Molecular Methods for Identification and Detection of Bacterial Food Pathogens, NANCY P. RIJSENS and LIEVE M.F. HERMAN, RIJSENS & HERMAN:JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 85, NO. 4, 2002
- [10] Molecular Methods for Identification and Quantification of Foodborne Pathogens, Min Zhang , Jiajia Wu , Zhaoai Shi 1 , Aocheng Cao , Wensheng Fang , Dongdong Yan, Qiuxia Wang 1,2 and Yuan Li, 26 November 2022)
- [11] Nucleic Acid-based Biotechnologies for Food-borne Pathogen Detection Using Routine Time-intensive Culture-based Methods and Fast Molecular Diagnostics, Amira Souii1,2,* , Manel Ben M'hadheb-Gharbi2 , and Jawhar Gharbi, Food Sci. Biotechnol. 25(1): 11-20 (2016)
- [12] Agarose gel electrophoresis to assess PCR product yield: comparison with spectrophotometry, fluorometry and qPCR, Patrick Wittmeier, Susanne Hummel, BioTechniques 72: 155–158 (April 2022) 10.2144/btn-2021-0094)

- [13] Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments, Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C., Kim, Y.H. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. J. Vis. Exp. (62), e3923 10.3791/3923, DOI : 10.3791/3923 (2012).
- [14] - Picture 2. <https://www.writework.com/essay/introductory-gel-electrophoresis>
- [15] (Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis, Alicia M Haines 1, Shanan S Tobe, Hilton J Kobus, Adrian Linacre ,2015 Mar;36(6):941-4.doi: 10.1002/elps.201400496. Epub 2015 Feb 23.)
- [16] Real Time Quantitative PCR, Christian A. Heid, 1 Junko Stevens, 2 Kenneth J. Livak, 2 and P. Mickey Williams , September 6, 2012
- [17] Duplex Real-Time SYBR Green PCR Assays for Detection of 17 Species of Food- or Waterborne Pathogens in Stools, Hiroshi Fukushima,* Yoshie Tsunomori, and Ryotaro Seki, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2003, p. 5134–5146)
- [18] Rapid Detection of Escherichia coli O157:H7 with Multiplex Real-Time PCR Assays, Narayanan Jothikumar† and Mansel W. Griffiths*, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, June 2002, p. 3169–3171
- [19] Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations Jodi Woan-Fei Law, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Kok-Gan Chan and Learn-Han Lee1, 12 January 2015.
- [20] A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens, ing Tao, Wanwan Liu, Wei Ding, Rong Han, Qiang Shen, Yu Xia, Yahan Zhang, and Wanping Sun, 2020 Mar;85(3):744-754.doi: 10.1111/1750-3841.15033. Epub 2020 Jan 30
- [21] DirectELISA, Alice V Lin, Methods Mol Biol. 2015;1318:61-7.doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5_6
- [22] Biochemistry: A Short Course Third Edition by John L. Tymoczko (Author), Jeremy M. Berg (Author), Lubert Stryer (Author) page127-128
- [23] A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA Suleyman Aydin* Firat University, School

of Medicine, Department of Medical Biochemistry (Firat Hormones Research Group),
23119 Elazig, Turkey

[24] Undeclared Food Allergens and Gluten in Commercial Food Products Analyzed by ELISA, ANDREW B. DO, SEFAT E. KHUDA, and GIRDHARI M. SHARMA1 U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, 8301 Muirkirk Rd, Laurel, MD 20708, DO ET AL.: JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 101, NO. 1, 2018)

[25] Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood, Ballamoole Krishna Kumar 1 , Pendru Raghunath 1 , Devananda Devegowda, Vijay Kumar Deekshit, Moleyur Nagarajappa Venugopal, Iddya Karunasagar, Indrani Karunasagar * Department of Fishery Microbiology, Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, College of Fisheries, Mangalore 575 002, India, International Journal of Food Microbiology Volume 145, Issue 1, 31 January 2011, Pages 244-249).

[26] *Clostridium perfringens* toxin types from wild-caught Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), determined by PCR and ELISA, A Aschfalk 1, W Müller, Can J Microbiol. 2002 Apr;48(4):365-8.doi: 10.1139/w02-015.

[27] DNA sequencing - spanning the generations N Biotechnol Steven McGinn 1, Ivo Glynn Gut . 2013 May 25;30(4):366-72. doi: 10.1016/j.nbt.2012.11.012. Epub 2012 Nov 16.

[28] Bayley H. Sequencing single molecules of DNA. Current Opinion in Chemical Biology 2006;10(6):628–37.

[29] Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory Stefan A Boers 1, Ruud Jansen 2, John P Hays 3 Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019 Jun;38(6):1059-1070. doi: 10.1007/s10096-019-03520-3. Epub 2019 Mar 5.

[30] NGS Techniques Reveal a High Diversity of RNA Viral Pathogens and Papillomaviruses in Fresh Produce and Irrigation Water, Marta Itarte 1,2 , Sandra Martínez-Puchol 1,2 , Eva Forés 1,2, Ayalkibet Hundesa 1,2, Natàlia Timoneda 3 ,

Sílvia Bofill-Mas 1,2, Rosina Girones 1,2,* and Marta Rusiñol 4, 2021 Aug 6;10(8):1820.doi: 10.3390/foods10081820.

[31] Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research, Habeebunnisa Begum, Periyasamy Murugesan& Anjana Devi Tangutur, 1 Jul 2022<https://doi.org/10.2144/btn-2022-0003>

[32] Applications of western blot technique: From bench to bedside, Gholam Hossein Meftahi1 | Zahra Bahari2 | Ali Zarei Mahmoudabadi3 | Maryam Iman4 | Zohreh Jangravi, DOI: 10.1002/bmb.21516, 30 March 2021

[33] Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting, Avraham Rasooly , Rebekah S. Rasooly, International Journal of Food Microbiology 41 (1998) 205–212


[34] A systematic approach to quantitative Western blot analysis, Lakshmi Pillai-Kastoori* , Amy R. Schutz-Geschwender, Jeff A. Harford, LI-COR Biosciences, 4647 Superior Street, Lincoln, NE, 68504, USA, 15 March 2020, 113608

[35] Loop-mediated isothermal amplification of DNA, T Notomi 1, H Okayama, H Masubuchi, T Yonekawa, K Watanabe, N Amino, T Hase, 2000 Jun 15;28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.

[36] Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations Jodi Woan-Fei Law, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Kok-Gan Chan and Learn-Han Lee1, 12 January 2015).

[37] Development of nanobody-horseradish peroxidase-based sandwich ELISA to detect Salmonella Enteritidis in milk and in vivo colonization in chicken, Kui Gu, Zengxu Song, Changyu Zhou, Peng Ma, Chao Li, Qizhong Lu, Ziwei Liao, Zheren Huang, Yizhi Tang, Hao Li, Yu Zhao, Wenjun Yan, Changwei Lei & Hongning WangPublished: 31 March 2022

[38] ELISA for semicarbazide and its application for screening in food contamination, M Vass, I Diblikova, I Cernoch, M Franek, 2008 Feb 4;608(1):86-94.doi: 10.1016/j.aca. 2007.11.052. Epub 2007 Dec 15.

[39]  picture 7 https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Cell_and_Molecular_Biology/Book%3A_Investigati

ons_in_Molecular_Cell_Biology_(O'Connor)/15%3A_Western_blot/15.04%3A_We
stern_blot_involves_many_steps

[40] Emerging biosensor platforms for the assessment of water-borne pathogens, Nishant Kumar 1, Yuan Hu, Suman Singh, Boris Mizaikoff , 2018 Jan 15;143(2):359-373.doi: 10.1039/c7an00983f.

[41] Food-borne and water-borne diseases under climate change in low- and middle-income countries: further efforts needed for reducing environmental health exposure risks, Guéladio Cissé, 2019 Jun;194:181-188. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.03.012. Epub 2019 Apr 1.

[42] A review of Cryptosporidium spp. and their detection in water, Eman M Hassan 1, Banu Örmeci 1, Maria C DeRosa 2, Brent R Dixon 3, Syed A Sattar 4, Asma Iqbal, Water SciTechnol. 2021 Jan;83(1):1-25. doi: 10.2166/wst.2020.515.

[43] Biology, epidemiology and diagnostics of pathogenic waterborne protozoan parasites, Agata Leońska-Duniec 1, Małgorzata Adamska, Wiad Parazytol. 2010;56(2):125-32.

[44] Recent developments in detection and enumeration of waterborne bacteria: a retrospective minireview, Rehan A Deshmukh 1, Kopal Joshi 1, Sunil Bhand 2, Utpal Roy 1, Microbiologyopen. 2016 Dec;5(6):901-922.doi: 10.1002/mbo3.383. Epub 2016 Jul 10.

[45] Aptamer-based approaches for the detection of waterborne pathogens, Archana Vishwakarma1 & Roshni Lal1 & Mohandass Ramya, International Microbiology (2021) 24:125–140

[46] DNA Microarray-Based Diagnostics, Mahsa Gharibi Marzancola , Abootaleb Sedighi , and Paul C. H. Li, Methods Mol Biol. 2016;1368:161-78.doi: 10.1007/978-1-4939-3136-1_12.

[47] DNA microarray technology in nutraceutical and food safety, Yiwen Liu-Stratton, Sashwati Roy, Chandan K. Sen, Toxicol Lett. 2004 Apr 15;150(1):29-42. doi: 10.1016/j.toxlet.2003.08.009

[48] Establishment and Application of a Visual DNA Microarray for the Detection of Food-borne Pathogens, Yongjin Li, Anal Sci. 2016;32(2):215-8. doi: 10.2116/analsci.32.215.

[49] Application of DNA microarray technology for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens, M. Kostrzynska and A. Bachand, Can JMicrobiol. 2006 Jan;52(1):1-8.doi: 10.1139/w05-105.

[50] Multiplex PCR detection of Campylobacter jejuni and Arcobacter butzleri in food products, D. K. Winters* and M. F. Slavik, Molecular and Cellular Probes (2000) 14, 95–99 doi:10.1006/mcpr.2000.0290

[51] Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis A virus in food samples, L Moreno 1, R Aznar 2, G Sánchez 3, Int J Food Microbiol. 2015 May18;201:1-6. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.012. Epub 2015 Feb 16.

[52] Listeria monocytogenes: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays, Leonardo Lopes-Luz, Marcelo Mendonça, Matheus Bernardes Fogaça, André Kipnis, Arun K. Bhunia & Samira Bühner-Sékula, Critical Reviews in Microbiology, 24 Apr 2021

[53] Tetracycline and ciprofloxacin multiresidues in beef and chicken meat samples using indirect competitive ELISA, Akram Baghani 1, Alireza Mesdaghinia 2 3, Mahsa Rafieiyan 1, Mohammad Mahdi Soltan Dallal 4 5, Masoumeh Douraghi, J Immunoassay Immunochem. 2019;40(3):328-342.

doi: 10.1080/15321819.2019.1597735.

[54] Vibrio species involved in seafood-borne outbreaks (Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus and V. vulnificus): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products, Maryse Bonnin-Jusserand 1 2 3 4 5, Stéphanie Copin 6, Cédric Le Bris 1, Thomas Brauge 6, Mélanie Gay 6, Anne Brisaboïs 6, Thierry Grard 1, Graziella Midelet-Bourdin 6 Epub 2017 Nov 13.

[55] Expanding the MDx toolbox for filarial diagnosis and surveillance, Andy Alhassan, Zhiru Li, Catherine B Poole, Clotilde K S Carlow, May 2015

[56] <https://rtmagazine.com/products-treatment/monitoring-treatment/therapy-devices/fighting-waterborne-pathogens-protect-ventilated-patients/>

- [57] DNA microarrays in medical practice, Timothy J Aitman, MRC clinical scientist, (Published 15 September 2001), Science, medicine, and the future
- [58] Salmonellosis Including Enteric Fever, Farah Naz Qamar 1, Wajid Hussain 2, Sonia Qureshi 2, *Pediatr Clin North Am.* 2022 Feb;69(1):65-77. doi: 10.1016/j.pcl.2021.09.007.
- [59] <https://www.health.state.mn.us/diseases/waterborne/basics.html>
- [60] Source attribution of human salmonellosis: an overview of methods and estimates, Sara M Pires 1, Antonio R Vieira, Tine Hald, Dana Cole, *Foodborne Pathog Dis* 2014 Sep;11(9):667-76.doi: 10.1089/fpd.2014.1744. Epub 2014 Jun 2.
- [61] Bula-Rudas FJ, Rathore MH, Maraqa NF. Salmonella infections in childhood. *Adv Pediatr* 2015;62:29–58.
- [62] Salmonella infection – prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review , Abraham Majak Gut,1 Todor Vasiljevic,1 Thomas Yeager2 and Osaana N. Donkor, *Microbiology* 2018;164:1327–1344
- [63] Kumar P, Kumar R. Enteric Fever. *Indian J Pediatr* 2017;84:227– 230
- [64] Norovirus: The Burden of the Unknown, Walter Randazzo*,† , Doris H. D’Souza‡ , Gloria Sanchez, Epub 2018 May 21.
- [65] Norovirus antivirals: Where are we now?, Natalie E. Netzler | Daniel Enosi Tuipulotu | Peter A. White, 2019 May;39(3):860-886. doi: 10.1002/med.21545. Epub 2018 Dec 25.
- [66] Norovirus Infections and Disease in Lower-Middle- and Low-Income Countries, 1997–2018, Janet Mans, 10 April 2019
- [67] Global burden of norovirus and prospects for vaccine development, Lopman, B., Atmar, R., Baric, R., Estes, M., Hall, A., Iturriza-Gómara, M., et al. (2015). . Centers for Disease Control and Prevention.
- [68] Norovirus Gastroenteritis Outbreaks, Genomic Diversity and Evolution: An Overview, M K Khan 1, M M Alam, 2021 Jul;30(3):863-873.
- [69] <https://www.nfid.org/infectious-disease/norovirus/>

- [70] Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications-a review, J Jang 1, H-G Hur 2, M J Sadowsky 1 3, M N Byappanahalli 4, T Yan 5, S Ishii, 2017 Sep;123(3):570-581. doi: 10.1111/jam.13468. Epub 2017 Jul 3.
- [71] Escherichia coli in Europe: an overview, Nerino Allocati 1, Michele Masulli, Mikhail F Alexeyev, Carmine Di Ilio , 2013 Nov 25;10(12):6235-54.,
- [72] https://thinking.is.ed.ac.uk/melissa/wpcontent/uploads/sites/4/2016/07/IMG_2843.jpg
- [73] Current pathogenic Escherichia coli foodborne outbreak cases and therapy development, Shih-Chun Yang 1, Chih-Hung Lin 2, Ibrahim A Aljuffali 3, Jia-You Fang, 2017 Aug;199(6):811-825.doi: 10.1007/s00203-017-1393-y. Epub 2017 Jun 9.
- [74] Escherichia coli O157, Hugh Pennington, 2010 Oct 23;376(9750):1428-35.
doi: 10.1016/S0140-6736(10)60963-4.
- [75] <https://pixels.com/featured/1-salmonella-bacteria-steve-gschmeissner.html>
- [76] <https://www.fightbac.org/food-poisoning/foodborne-pathogens/>
- [77] Campylobacter virulence and survival factors, Declan J Bolton, 2015 Jun;48:99-108. doi: 10.1016/j.fm.2014.11.017. Epub 2014 Dec 25.
- [78] Pathogenomics of Emerging Campylobacter Species, Daniela Costa 1 2, Gregorio Iraola, 2019 Jul 3;32(4):e00072-18. doi: 10.1128/CMR.00072-18. Print 2019 Sep 18.
- [79] Campylobacter, Collette Fitzgerald, 2015 Jun;35(2):289-98.doi: 10.1016/j.cll.2015.03.001.
- [80] Campylobacter Virulence Factors and Molecular Host-Pathogen Interactions, Nicole Tegtmeyer 1, Irshad Sharafutdinov 1, Aileen Harrer 1, Delara Soltan Esmaeili 1, Bodo Linz 1, Steffen Backert, 2021;431:169-202. doi: 10.1007/978-3-030-65481-8_7.
- [81] Physiology and Sporulation in Clostridium, Peter Dürre, 2014 Aug;2(4):TBS-0010-2012. doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0010-2012.
- [82] Clostridium difficile infection: Early history, diagnosis and molecular strain typing methods,C Rodriguez 1, J Van Broeck 2, B Taminiau 3, M Delmée 2, G Daube, 2016 Aug;97:59-78. doi: 10.1016/j.micpath.2016.05.018. Epub 2016 May 26.

- [83] Sporulation and Germination in Clostridial Pathogens, Aimee Shen 1, Adrienne N Edwards 2, Mahfuzur R Sarker 3 4, Daniel Paredes-Sabja, 2019 Nov;7(6):10.1128/microbiolspec.GPP3-0017-2018.doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0017-2018.
- [84] High prevalence of Clostridium botulinum in vegetarian sausages, Noora Pernu 1, Riikka Keto-Timonen 1, Miia Lindström 2, Hannu Korkeala, 2020 Oct;91:103512. doi: 10.1016/j.fm.2020.103512. Epub 2020 Apr 18.
- [85] Foodborne Botulism: Clinical Diagnosis and Medical Treatment, Davide Lonati 1, Azzurra Schicchi 1, Marta Crevani 1, Eleonora Buscaglia 1, Giulia Scaravaggi 1, Francesca Maida 1, Marco Cirronis 1, Valeria Margherita Petrolini 1, Carlo Alessandro Locatelli , 2020 Aug 7;12(8):509.doi: 10.3390/toxins12080509.
- [86] <https://paramedicsworld.com/clostridium-botulinum/morphology-culture-characteristics-of-clostridium-botulinum/medical-paramedical-studynotes>
- [87] Differential expression and roles of Staphylococcus aureus virulence determinants during colonization and disease, Amy Jenkins 1, Binh An Diep, Thuy T Mai 2, Nhung H Vo 2, Paul Warrenner 1, Joann Suzich 1, C Kendall Stover 1, Bret R Sellman, 2015 Feb 17;6(1):e02272-14. doi: 10.1128/mBio.02272-14.
- [88] Analysis of Transcription of the Staphylococcus aureus Aerobic Class Ib and Anaerobic Class III Ribonucleotide Reductase Genes in Response to Oxygen, Mahmud Masalha, Ilya Borovok, Rachel Schreiber, Yair Aharonowitz, and Gerald Cohen, 2001 Dec; 183(24): 7260–7272
- [88] <https://protomag.com/infectious-disease/a-brief-history-of-staph/>
- [89] Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation, Jacques-Antoine Hennekinne, Marie-Laure De Buyser & Sylviane Dragacci, 2012 Jul;36(4):815-36. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x. Epub 2011 Nov 8.
- [90] Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins, María Ángeles Argudín, María Carmen Mendoza and María Rosario Rodicio, Toxins 2010, 2, 1751-1773; doi:10.3390/toxins2071751

- [91] Cryptosporidium pathogenicity and virulence, Maha Bouzid 1, Paul R Hunter, Rachel M Chalmers, Kevin M Tyler, 2013 Jan;26(1):115-34. doi: 10.1128/CMR.00076-12.
- [92] Clostridium perfringens Foodborne Outbreak during an Athletic Event in Northern Greece, June 2019, Kassiani Mellou 1,*, Maria Kyritsi 2,3 , Anthi Chrysostomou 1 , Theologia Sideroglou 1 , Theano Georgakopoulou 1 and Christos Hadjichristodoulou, 2019 Oct 17;16(20):3967. doi: 10.3390/ijerph16203967.
- [93] https://www.researchgate.net/figure/The-Sanger-sequencing-method-in-7-steps-1-The-dsDNA-fragment-is-denatured-into-two_fig2_234248746
- [94] https://www.researchgate.net/figure/Illustration-of-an-enzyme-linked-immunosorbent-assay-ELISA-plate-after-the-completion_fig4_38070939
- [95] A gastroenteritis outbreak caused by noroviruses in Greece, Apostolos Vantarakis 1, Kassiani Mellou, Georgia Spala, Petros Kokkinos, Yiannis Alamanos, 2011 Aug;8(8):3468-78.doi: 10.3390/ijerph8083468. Epub 2011 Aug 22.
- [96] A Point Source Gastroenteritis Outbreak in a High School Putatively Due to Clostridium perfringens: Timely Investigation Is Everything, Sofia Papanikou 1 2, Theologia Sideroglou 2, Anthi Chrysostomou 2, Maria A Kyritsi 3 4, Stelios Spaniolas 5, Dimitrios Bouboulis 5, Varvara A Mouchtouri 3 4, Kassiani Mellou 2, 2023 Feb;20(2):41-46. doi: 10.1089/fpd.2022.0057. Epub 2023 Jan 31.
- [97] Detection of Cyclospora cayetanensis, Echinococcus multilocularis, Toxocara spp. and microsporidia in fresh produce using molecular methods: – A review, B. Bartosova a,c,*, B. Koudela b , I. Slana , 2021 Apr 26;23:e00124. doi: 10.1016/j.fawpar.2021.e00124. eCollection 2021 Jun.
- [98] Digital PCR: A brief history, Alexander A Morley , 2014 Aug 15;1(1):1-2. doi: 10.1016/j.bdq.2014.06.001. eCollection 2014 Sep.
- [99] Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections, E Pomari 1, C Piubelli 2, F Perandin 2, Z Bisoffi
- [100] Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology, Jane Kuypers 1, Keith R Jerome, 2017 Jun;55(6):1621-1628. doi: 10.1128/JCM.00211-17. Epub 2017 Mar 15.

- [101] Use of the Poisson Distribution Is a Helpful Tool That Is Underused in Nursing Practice, Patricia A Zrelak, 2022 Jul-Sep;37(3):E54-E57. doi: 10.1097/NCQ.0000000000000612. Epub 2021 Dec 20.
- [102] Toxoplasma gondii in edible fishes captured in the Mediterranean basin, Anna Maria Fausta Marino 1, Renato Paolo Giunta 1, Antonio Salvaggio 1, Annamaria Castello 1, Tiziana Alfonzetti 1, Antonio Barbagallo 1, Alessandra Aparo 1, Fabrizio Scalzo 1, Stefano Reale 1, Wilma Buffolano 2, Maurizio Percipalle, 2019 Nov;66(7):826-834. doi: 10.1111/ zph.12630. Epub 2019 Jul 6.
- [103] New Approaches on Quantification of Campylobacter jejuni in Poultry Samples: The Use of Digital PCR and Real-time PCR against the ISO Standard Plate Count Method, Bojan Papić 1, Mateja Pate 1, Urška Henigman 2, Urška Zajc 1, Igor Gruntar 1, Majda Biasizzo 2, Matjaž Ocepek 1, Darja Kušar, 2017 Mar 2;8:331. doi: 10.3389/fmicb.2017.00331. eCollection 2017.
- [104] A Specific and Sensitive Aptamer-Based Digital PCR Chip for Salmonella typhimurium Detection, Yuanjie Suo 1, Weihong Yin 2, Qiangyuan Zhu 1, Wenshuai Wu 2, Wenjian Cao 1, Ying Mu , 2022 Jun 26;12(7):458. doi: 10.3390/bios12070458.
- [105] Antimicrobial Resistance of Campylobacter in Broiler Chicken Along the Food Chain in Canada, Ousmane Dramé 1 2, Daniel Leclair 1, E Jane Parmley 3, Anne Deckert 3, Blaise Ouattara 1, Danielle Daignault 4, André Ravel, 2020 Aug;17(8):512-520. doi: 10.1089/fpd.2019.2752. Epub 2020 Mar 4.
- [106] Food-borne botulism in Argentina, Victoria Rebagliati 1, Romina Philippi, Mariela Tornese, Analía Paiva, Laura Rossi, Alcides Troncoso, 2009 May 1;3(4):250-4. doi: 10.3855/jidc.120.
- [107] Real-time polymerase chain reaction, Jochen Wilhelm 1, Alfred Pingoud, 2003 Nov 7;4(11):1120-8. doi: 10.1002/cbic.200300662.
- [108] Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation, Yiqi Cao 1, Miao Yu 1, Guihua Dong 1, Bing Chen 1, Baiyu Zhang., 2020 Feb 6;25(3):706. doi: 10.3390/molecules25030706.

- [109] Hepatitis A: Epidemiology, Natural History, Unusual Clinical Manifestations, and Prevention, Ameer Abutaleb 1, Shyam Kottlil, 2020 Jun;49(2):191-199. doi: 10.1016/j.gtc.2020.01.002. Epub 2020 Mar 29.
- [110] Hepatitis A, Kathleen A Linder, Preeti N Malani, 2017 Dec 19;318(23):2393. doi: 10.1001/jama.2017.17244.
- [111] <https://www.axios.com/2019/08/03/hepatitis-a-cases-florida-spike-2034>
- [112] Toxoplasma gondii, Sebastian Lourido, 2019 Nov;35(11):944-945. doi: 10.1016/j.pt.2019.07.001. Epub 2019 Jul 22.
- [113] Mechanisms of Human Innate Immune Evasion by Toxoplasma gondii, Tatiane S Lima 1, Melissa B Lodoen, 2019 Apr 16;9:103. doi: 10.3389/fcimb.2019.00103. eCollection 2019.
- [114] Toxoplasma gondii, Joshua A Kochanowsky 1, Anita A Koshy, 2018 Jul 23;28(14):R770-R771. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.035.
- [115] Toxoplasmosis in pregnancy: prevention, screening, and treatment, Caroline Paquet 1, Mark H Yudin; Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada, 2013 Jan;35(1):78-81. doi: 10.1016/s1701-2163(15)31053-7.
- [116] Norovirus waterborne outbreak in Chalkidiki, Greece, 2015: detection of GI.P2_GI.2 and GII.P16_GII.13 unusual strains, K Tryfinopoulou 1, M Kyritsi 2, K Mellou 1, F Kolokythopoulou 2, V A Mouchtouri 2, M Potamiti-Komi 1, A Lamprou 1, Th Georgakopoulou 1, C Hadjichristodoulou, 2019 Jan;147:e227. doi: 10.1017/S0950268819000852.
- [117] A large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and management, K Mellou 1, A Katsioulis, M Potamiti-Komi, S Pournaras, M Kyritsi, A Katsiaflaka, A Kallimani, P Kokkinos, E Petinaki, T Sideroglou, T Georgakopoulou, A Vantarakis, C Hadjichristodoulou 2014 Jan;142(1):40-50. doi: 10.1017/S0950268813000939. Epub 2013 Apr 30.
- [118] Outbreak investigation of brucellosis in Thassos, Greece, 2008, I Karagiannis 1, K Mellou 1, K Gkolfinopoulou 1, GDouglas 1, G Theocharopoulos 1, D Vourvidis

2 , D Ellinas 3 , M Sotolidou 3 , T Papadimitriou 1 , R Vorou, 2012 Mar 15;17(11):20116.

[119] A waterborne *Campylobacter jejuni* outbreak on a Greek island, I Karagiannis 1, T Sideroglou, K Gkolfinopoulou, A Tsouri, D Lampousaki, E N Velonakis, E V Scoulica, K Mellou, T Panagiotopoulos, S Bonovas, 2010 Dec;138(12):1726-34. doi: 10.1017/S0950268810002116. Epub 2010 Sep 14.

[120] https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2021/11/epidemiological-data-for-fwd-outbreaks_greece_2004-2020.pdf

[121] Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid *Escherichia coli* O157:H7 detection, Bo Pang 1, Chao Zhao 1, Li Li 1, Xiuling Song 2, Kun Xu 1, Juan Wang 1, Yushen Liu 1, Kaiyue Fu 1, Hao Bao 1, Dandan Song 1, Xiangjun Meng 1, Xiaofeng Qu 1, Zhuping Zhang 3, Juan Li 4, 2018 Feb 1;542:58-62. doi: 10.1016/j.ab.2017.11.010. Epub 2017 Nov 20.

[122] Genomic Epidemiology: Whole-Genome-Sequencing-Powered Surveillance and Outbreak Investigation of Foodborne Bacterial Pathogens, Xiangyu Deng 1, Henk C den Bakker 2, Rene S Hendriksen, 2016;7:353-74. doi: 10.1146/annurev-food-041715-033259. Epub 2016 Jan 11.

[123] <https://www.leinco.com/sandwich-elisa-protocol/>

[124] Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-range pigs in northern Peru, Carlos Alonso Flores 1, Juan Jimenez 2, Luis A Gomez-Puerta 3, Claudia Palacios 1, Seth E O'Neal 4, Claudio Muro 5, Armando E Gonzalez 6, Robert H Gilman 7, Maritza Calderón , 2021 Jan;23:100533. doi: 10.1016/j.vprsr.2021.100533. Epub 2021 Jan 18.