



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

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΥΡΙΟΙ ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥΣ.**

Γεωργία Λυμπεράκου

Επιβλέπων καθηγητής
Κωνσταντίνος Σταθόπουλος

Πάτρα, Ιούνιος 2024

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



**ΚΥΡΙΟΙ ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥΣ.**

Γεωργία Λυμπεράκου

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων καθηγητής
Κωνσταντίνος Σταθόπουλος
Πανεπιστήμιο Πατρών

Συν-Επιβλέπων καθηγητής
Αυγέρης Μαργαρίτης
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Πάτρα, Ιούνιος 2024

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Όταν ξεκίνησα να φτιάχνω τη δομή της διπλωματικής μου εργασίας πίστευα ότι το πιο εύκολο μέρος αποτελούν «οι ευχαριστίες». Φτάνοντας λοιπόν στη παρούσα χρονική στιγμή λίγο πριν την υποβολή της εργασίας μου αντιλαμβάνομαι ότι τελικά το πιο δύσκολο μέρος αυτής της μελέτης αποτελεί αυτό το κομμάτι, το οποίο απορρέει από το γεγονός ότι γεννιούνται τόσα πολλά συναισθήματα. Χαράς για τις γνώσεις που έλαβα, ευγνωμοσύνη γιατί πλέον αντιλαμβάνομαι ότι σημασία δεν έχει μόνο το αποτέλεσμα αλλά και η πορεία που ακολούθησα για να είμαι εδώ σήμερα, μα και λύπη καθώς αυτό το «μαγικό ταξίδι» φτάνει στο τέλος του, ανοίγοντας μου παράλληλα νέους ορίζοντες.

Αρχικά θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον επιβλέποντα μου κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο για τη βοήθεια του στην εκπόνηση της διπλωματικής μου μελέτης, καθώς επίσης και να εκφράσω τη χαρά και την τιμή που είχα να τον έχω καθηγητή σε μια από τις θεματικές ενότητες του εν λόγω προγράμματος.

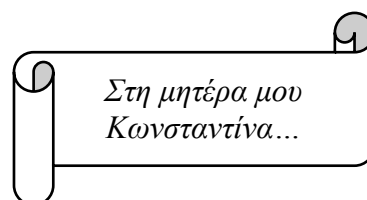
Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για τη στήριξη της καθώς και για τα εφόδια που μου έδωσε, προκειμένου να μπορέσω να εξελιχθώ και να μη σταματάω να προσπαθώ.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους «αφανείς ήρωες» και συνοδοιπόρους μου σε όλο αυτό το «μαγικό ταξίδι γνώσης» που ήταν δίπλα μου, ακόμα και στα πιο δύσκολα ήταν εκεί λέγοντας μου «Θα δεις όλα καλά θα πάνε...», που ακόμα και αν δε το πίστευα όπως τώρα, με βοηθούσε να ηρεμήσω και να σκεφτώ με πιο καθαρό μυαλό.

Σε όλους εσάς οφείλω ένα ΤΕΡΑΣΤΙΟ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΓΑΠΗ ΚΑΙ ΤΗ ΣΤΗΡΙΞΗ ΣΑΣ!

«...Το υπέρτατο αντικείμενο της ζωής είναι να ζεις.
Λίγοι άνθρωποι ζουν. Η αληθινή ζωή είναι μόνο να
συνειδητοποιεί κανείς τη δική του τελειότητα, να κάνει
κάθε όνειρο του πραγματικότητα...»

Όσκαρ Γουάιλντ



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιομηχανία τροφίμων αντιμετωπίζει σημαντικούς κινδύνους από παθογόνους μικροοργανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες στους καταναλωτές. Μερικοί από τους κυριότερους παθογόνους (βακτήρια, μύκητες, ιοί και κάποια παράσιτα) περιλαμβάνουν τη *Salmonella spp.*, τη *Listeria monocytogenes*, *E. coli* την ηπατίτιδα Α (HAV), το *Cyclospora cayetanensis*, τον *Aspergillus spp.*, κ.λπ. αντίστοιχα. Η μόλυνση αυτών των μικροοργανισμών στα τρόφιμα μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες για την υγεία του κοινού. Για την αντιμετώπιση αυτών των κινδύνων, χρησιμοποιούνται μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης, όπως η μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων (π.χ. PCR είναι μια αποτελεσματική τεχνική που βασίζεται στην ανίχνευση του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών και επιτρέπει την εκτέλεση γρήγορων και αξιόπιστων αναλύσεων), καλλιεργητικές μέθοδοι, ανοσολογικές μέθοδοι καθώς επίσης και πιο σύγχρονες όπως οι βιοαισθητήρες κ.λπ., που επιτρέπουν τον ακριβή και γρήγορο εντοπισμό των παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα τροφίμων. Η χρήση μοριακών μεθόδων ανίχνευσης στη βιομηχανία τροφίμων είναι κρίσιμη για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων και την προστασία της δημόσιας υγείας. Αυτές οι τεχνικές επιτρέπουν την έγκαιρη ανίχνευση μικροβιακών μολύνσεων και τη λήψη αποτελεσματικών μέτρων πρόληψης και ελέγχου. Συνολικά, οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης συμβάλλουν στην προστασία της δημόσιας υγείας και στη διασφάλιση της ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων που καταναλώνονται.

Λέξεις κλειδιά: τροφιμογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί, μοριακές μέθοδοι, τροφιμογενείς εξάρσεις, ασφάλεια τροφίμων

Main pathogenic micro-organisms in the food industry and molecular methods for their detection.

Georgia Lumperakou

ABSTRACT

The food industry faces significant risks from pathogens that can cause illness in consumers. Some of the main pathogens (bacteria, fungi, viruses and some parasites) include *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, Hepatitis A (HAV), *Cyclospora cayetanensis*, *Aspergillus* spp., etc. respectively. Contamination of these microorganisms in food can have serious health consequences for the public. To address these risks, molecular detection methods, such as nucleic acid amplification methods (e.g. PCR is an efficient technique based on the detection of the genetic material of micro-organisms and allows rapid and reliable analyses to be performed), culture methods, immunological methods as well as more modern methods such as biosensors, etc., are used to allow the accurate and rapid identification of pathogenic micro-organisms in food samples. The use of molecular detection methods in the food industry is crucial to ensure food safety and protect public health. These techniques allow early detection of microbial contamination and effective prevention and control measures. Overall, molecular detection methods contribute to protecting public health and ensuring the quality and safety of the food consumed.

Key words: foodborne pathogens, molecular methods, foodborne outbreaks, food safety

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|-----------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 6 |
| ABSTRACT..... | 7 |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ..... | 8 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ..... | 10 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ..... | 14 |
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ & ΑΚΡΩΝΥΜΑ..... | 15 |
| ΣΚΟΠΟΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ..... | 16 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΟΝΑ..... | 17 |
| 1.1 Παθογόνα Βακτήρια..... | 19 |
| 1.1.1 <i>Bacillus cereus</i> | 19 |
| 1.1.2 <i>Campylobacter jejuni</i> | 22 |
| 1.1.3 <i>Clostridium botulinum</i> | 24 |
| 1.1.4 <i>Clostridium perfringens</i> | 26 |
| 1.1.5 <i>Escherichia coli</i> | 28 |
| 1.1.6 <i>Listeria monocytogenes</i> | 30 |
| 1.1.7 <i>Salmonella spp</i> | 32 |
| 1.1.8 <i>Shigella spp</i> | 34 |
| 1.1.9 <i>Staphylococcus aureus</i> | 36 |
| 1.1.10 <i>Yersinia enterocolitida</i> | 38 |
| 1.2 Παθογόνοι Ιοί..... | 40 |
| 1.2.1 Ηπατίτιδα Α (HAV)..... | 41 |
| 1.2.2 Νοροϊός (NoV)..... | 43 |
| 1.3 Παθογόνα Παράσιτα..... | 45 |
| 1.3.1 <i>Cyclospora cayetanensis</i> | 45 |
| 1.3.2 <i>Toxoplasma gondii</i> | 48 |
| 1.3.3 <i>Trichinella spiralis</i> | 49 |
| 1.4 Παθογόνοι Μύκητες..... | 51 |
| 1.4.1 <i>Aspergillus flavus</i> | 54 |
| 1.4.2 <i>Penicillium spp</i> | 56 |
| 1.5 Τροφιμογενείς Εξάρσεις..... | 57 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι..... | 68 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 71 |
| 2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας..... | 73 |
| 2.2 Βιοχημική Μέθοδος Δοκιμής..... | 78 |
| 2.3 Ανοσολογικές Μέθοδοι..... | 80 |
| 2.3.1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay)..... | 80 |
| 2.3.1.1 Άμεση ELISA..... | 84 |
| 2.3.1.2 Έμμεση ELISA..... | 84 |
| 2.3.1.3 Sandwich ELISA..... | 85 |
| 2.3.1.4 Competitive ELISA..... | 86 |
| 2.3.2 Ανοσοδοκιμασία Πλευρικής Ροής..... | 87 |
| 2.3.3 Western Blot..... | 89 |
| 2.4 Μέθοδος Ενίσχυσης Νουκλεϊκών Οξέων..... | 93 |
| 2.4.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)..... | 95 |
| 2.4.2 Digital PCR (dPCR)..... | 100 |
| 2.4.3 Multiplex PCR (mPCR)..... | 103 |

| | |
|---|------------|
| 2.4.4 Nested PCR (nPCR)..... | 105 |
| 2.4.5 Real-time Quantitative PCR (RT-qPCR)..... | 107 |
| 2.4.6 Τεχνολογία Γονιδιακών Ανιχνευτών..... | 109 |
| 2.4.7 Τεχνολογία Γονιδιακών Τσιπ..... | 110 |
| 2.4.8 Μέθοδος βασισμένη σε συστοιχίες..... | 112 |
| 2.4.8.1 Μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων DNA..... | 112 |
| 2.5 Ισοθερμική Ενίσχυση..... | 115 |
| 2.5.1 Ισοθερμική Ενίσχυση μέσω Βρόγχου (LAMP)..... | 115 |
| 2.5.2 Ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος (NASBA)..... | 117 |
| 2.6 Βιοαισθητήρες..... | 118 |
| 2.6.1 Βιοαισθητήρας βασισμένος στα νανοϋλικά..... | 120 |
| 2.6.2 Βιοαισθητήρας βασισμένος στη μικρορευστολογία..... | 121 |
| 2.6.3 Βιοαισθητήρας με βάση τα απταμερή..... | 122 |
| 2.6.4 Φορητός οργανικός βιοαισθητήρας..... | 123 |
| 2.6.5 Βιοαισθητήρας με βάση το smartphone..... | 123 |
| 2.7 Μοριακή Διάγνωση με βάση το CRISPR-Cas..... | 124 |
| 2.8 Next Generation Sequencing (NGS)..... | 127 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II..... | 133 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ..... | 141 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 150 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

| | |
|---|----|
| EIKONA 1: Ράβδοι <i>B. cereus</i> | 20 |
| EIKONA 2: Δομή της αποσιπεπτιδικής τοξίνης <i>cereulide</i> | 21 |
| EIKONA 3: <i>C. jejuni</i> κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο..... | 22 |
| EIKONA 4: Σχηματισμός σπορίων <i>C. botulinum</i> | 24 |
| EIKONA 5: Συνοπτική παρουσίαση των παθήσεων που προκαλούνται από το <i>C. perfringens</i> | 27 |
| EIKONA 6: <i>E. coli</i> | 28 |
| EIKONA 7: <i>L. monocytogenes</i> , ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης..... | 30 |
| EIKONA 8: Το <i>L. monocytogenes</i> και οι σηματοδότες που διαθέτει..... | 31 |
| EIKONA 9: Χρώση κατά Gram της <i>S. typhimurium</i> | 32 |
| EIKONA 10: Εξιδρώματα κοπράνων σε ασθενή με <i>Shigella</i> , γνωστή και ως <i>Shigella dysenteriae</i> | 34 |
| EIKONA 11: Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας των μηχανισμών παθογένειας <i>dysenteriae</i> και <i>non dysenteriae</i> της <i>Shigella</i> | 36 |
| EIKONA 12: Χρώση Gram στελέχου του <i>S. aureus</i> | 36 |
| EIKONA 13: Χρώση Gram <i>Y. enterocolitida</i> | 39 |
| EIKONA 14: Απεικόνιση πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας Α..... | 42 |
| EIKONA 15: Κύκλος ζωής <i>C. cayetanensis</i> | 48 |
| EIKONA 16: Κύκλος ζωής του <i>T. gondii</i> . Κατά τη μόλυνση της τα αιλουροειδή αποβάλλουν στο περιβάλλον ωοκύστες μέσω των κοπράνων, εν συνεχεία οι ωοκύστες μολύνουν το νερό, τα φρούτα, τα λαχανικά, το έδαφος και μπορούν να προσληφθούν εύκολα τόσο από τον άνθρωπο όσο και από άλλους ξενιστές..... | 49 |
| EIKONA 17: <i>Trichinella spiralis</i> στο σκελετικό μυ..... | 50 |
| EIKONA 18: Μικρογραφία του μύκητα <i>Aspergillus</i> που παράγει την καρκινογόνο τοξίνη (αφλατοξίνη)..... | 55 |
| EIKONA 19: Χημική δομή ΟΤΑ..... | 57 |
| EIKONA 20: Μύκητας <i>Penicillium spp.</i> στο μικροσκόπιο..... | 57 |
| EIKONA 21: Κατανομή ασθενών με προσβολή από <i>Y. enterocolitida</i> ανά εβδομάδα εμφάνισης..... | 63 |
| EIKONA 22: Διάκριση μοριακών μεθόδων..... | 73 |
| EIKONA 23: Χρονοδιαγράμματα μεθόδων, παραδοσιακών και σύγχρονων..... | 77 |

| | |
|--|-----|
| EIKONA 24: Δοκιμή οξειδάσης, ένα σύμπλεγμα βιοχημικών δοκιμών που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της ικανότητας των βακτηρίων να σχηματίζουν ένζυμα οξειδάσης του κυτοχρώματος c..... | 79 |
| EIKONA 25: Φρεάτια ELISA..... | 82 |
| EIKONA 26: Τύποι ELISA..... | 84 |
| EIKONA 27: «Λειτουργία» έμμεσης ELISA..... | 85 |
| EIKONA 28: Διαγραμματική απεικόνιση sandwich ELISA. Με την προσθήκη υποστρώματος ενζύμου επιτυγχάνεται η ανάπτυξη χρώματος. Η απορρόφηση είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του αναλυτή..... | 86 |
| EIKONA 29: Στάδια competitive ELISA..... | 87 |
| EIKONA 30: Συσκευή ανοσοδοκιμασίας πλευρικής ροής. (α) Αποτελέσματα που προκύπτουν μετά την ανάλυση και (β) συσκευή LFIA..... | 88 |
| EIKONA 31: Ανοσολογικές μέθοδοι..... | 89 |
| EIKONA 32: Βήματα εργασίας της μεθόδου WB. Οι πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί αρχικά διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη (1) & (2). Εν συνεχεία, οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί μεταβιβάζονται σε μεμβράνη από νιτροκυτταρίνη ή PVDF (3). Έπειτα, λαμβάνει χώρα ο επωασμός της μεμβράνης με πρωτογενή και συζυγή δευτερογενή αντισώματα (5). Σε τελικό στάδιο, ανάλογα με το δευτερογενές αντίσωμα που έχει χρησιμοποιηθεί, η πρωτεΐνη-στόχος προσδιορίζεται με χρωματομετρικές ή φθορίζουσες τεχνικές..... | 93 |
| EIKONA 33: Σύστημα ηλεκτροφόρησης αгарόζης..... | 94 |
| EIKONA 34: Θερμοκρασιακά στάδια PCR και «εργαλεία» υλοποίησης της..... | 97 |
| EIKONA 35: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αгарόζης PCR προϊόντων του <i>C. perfringens</i> ... | 99 |
| EIKONA 36: Αρχή dPCR. Πραγματοποιείται διαίρεση του δείγματος σε ανεξάρτητα τμήματα με σκοπό το καθένα να περιέχει λίγες ή περισσότερες αλληλουχίες-στόχους. Η καταμέριση των αλληλουχιών-στόχων σε μέρη μπορεί να εκτιμηθεί προσεγγιστικά με την κατανομή Poisson. Κάθε τμήμα δρα ως ατομικός μικροαντιδραστήρας PCR, τα διαμερίσματα που εμπεριέχουν ενισχυθείσες αλληλουχίες-στόχους και καταγράφονται με φθορισμό. Η αναλογία των θετικών τμημάτων (παρουσία φθορισμού) προς το συνολικό αριθμό καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του εκάστοτε στόχου στο δείγμα..... | 101 |
| EIKONA 37: Σχηματική παρουσίαση εκλεκτικού εμπλουτισμού και προσδιορισμού φθορισμού του <i>S. typhimurium</i> | 102 |

| | |
|--|-----|
| EIKONA 38: Διάγραμμα διαδικασίας mPCR. (α) Το DNA μετουσιώνεται στους 95° C με σκοπό το σχηματισμό δυο μονόκλωνων αλυσίδων, (β) το DNA σχηματίζει ένα μονόκλωνο και ο εκκινητής πυκνώνεται εκ νέου στους 55° C και (γ) γίνεται επιμήκυνση του κλώνου και το DNA διπλασιάζεται στους 72° C. Ολόκληρη η διαδικασία τίθενται σε επανάληψη για 25-30 κύκλους..... | 105 |
| EIKONA 39: Nested Polymerase Chain Reaction (nPCR)..... | 106 |
| EIKONA 40: Ενίσχυση μήτρας DNA με qPCR και καταμέτρηση της ένδειξης φθορισμού σε πραγματικό χρόνο..... | 109 |
| EIKONA 41: Σχηματικό διάγραμμα GC. 1° Στάδιο: Συλλογή αρκετών μορίων ανιχνευτών, 2° στάδιο: Τοποθέτηση σε σταθερό φορέα και υβριδοποίηση με επισημασμένα μόρια και 3° στάδιο: Ανίχνευση έντασης σήματος υβριδισμού για κάθε μόριο ανιχνευτή..... | 111 |
| EIKONA 42: Σύνοψη της διαδικασίας μικροσυστοιχιών με σημεία (A) σε σχέση με μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων με υψηλή πυκνότητα (B). Δείγμα A: έλεγχος- δείγμα B: δοκιμή..... | 114 |
| EIKONA 43: Διαδικασία LAMP..... | 115 |
| EIKONA 44: Ροή εργασίας της μεθόδου LAMP για τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων..... | 117 |
| EIKONA 45: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου NASBA..... | 118 |
| EIKONA 46: Σχηματική απεικόνιση προσδιορισμού παθογόνων με χρήση βιοαισθητήρα..... | 120 |
| EIKONA 47: Νανοσωματίδια χρυσού για τον ταχύτατο προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών..... | 121 |
| EIKONA 48: Σχηματική απεικόνιση της αρχής προσδιορισμού του <i>S. aureus</i> με βιοαισθητήρα υψηλής απόδοσης..... | 123 |
| EIKONA 49: Στάδια εργασίας βιοαισθητήρα..... | 124 |
| EIKONA 50: CRISPR, μια τεχνολογία που χρησιμοποιούν οι ερευνητές με σκοπό την επιλεκτική τροποποίηση DNA ζώντων οργανισμών..... | 126 |
| EIKONA 51: Τεχνολογία ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων σε συνδυασμό με την τεχνική CRISPR για την επίτευξη προσδιορισμού παθογόνων μικροοργανισμών..... | 127 |
| EIKONA 52: Αλληλούχηση κατά Sanger. Σε κάθε κύκλο αντιδράσεων, το προϊόν που έχει ενισχυθεί τερματίζεται με την εισαγωγή φθορίζοντος επισημασμένου με φθορίζουσα σήμανση διδεοξυνουκλεοτιδίου (όπως απεικονίζεται με κίτρινο, μπλε, κόκκινο & πράσινο χρώμα) δημιουργώντας μια σκάλα προϊόντων με διαφορετικά μεγέθη..... | 130 |

| | |
|--|-----|
| ΕΙΚΟΝΑ 53: Στάδια εργασίας της μεθόδου NGS..... | 131 |
|--|-----|

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

| | |
|--|-----|
| ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Κατηγορίες τροφίμων και ποσοστά αναφοράς..... | 18 |
| ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Βιοχημικές διεργασίες..... | 78 |
| ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Ανοσοχρωματογραφικές ταινίες που διατίθενται στο εμπόριο και ο προσδιορισμός κάποιων επιβλαβών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών..... | 89 |
| ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Στόχος εκκινήτων στο εκάστοτε παθογόνο προσδιορισμού..... | 104 |

→ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....68

Στο παράρτημα Ι πραγματοποιείται μια σύνοψη των τροφιμογενών παθογόνων που μελετώνται στο 1^ο κεφάλαιο στην παρούσα εργασία, τα τρόφιμα τα οποία ενδείκνυται η εμφάνιση τους, καθώς επίσης και κάποια στατιστικά στοιχεία, στα οποία αναλύονται οι σημαντικότεροι παθογόνοι και το ποσοστό των τροφίμων που «ενοχοποιούνται».

→ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....133

Στο παράρτημα ΙΙ πραγματοποιείται η σύνοψη των μοριακών μεθόδων που αναφέρονται στο 2^ο κεφάλαιο της συγκεκριμένης μελέτης. Πιο συγκεκριμένα καταγράφονται οι μοριακές μέθοδοι και τα παθογόνα που ενδείκνυται να προσδιοριστούν βάσει των προαναφερθέντων μεθόδων, καθώς επίσης οι αρχές, τα πλεονεκτήματα και οι περιορισμοί που διαθέτει η εκάστοτε μοριακή μέθοδος προσδιορισμού.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΤΕΣ & ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ WHO (ή ΠΟΥ) | ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ World Health Organization | ΣΗΜΑΣΙΑ Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας |
|------------------------------|---|--|
| NARMS | National Antimicrobial Resistance Monitoring System | Εθνικό Σύστημα Παρακολούθησης Αντιμικροβιακής Αντίστασης |
| CDC | Center for Disease Control and Prevention | Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών |
| ΣΕ | | Σταφυλοκοκκικές Εντεροτοξίνες |
| FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations | Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων & Γεωργίας |
| FDA | Food and Drug Administration | Οργανισμός Τροφίμων & Φαρμάκων |
| IARC | International Agency for Research on Cancer | Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο |
| BoNT | Botulinum Toxin | Βοτουλινική Τοξίνη |
| MALDI TOF MS | Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization | Εκρόφηση/ιονισμός υποβοηθούμενη από μήτρα |
| VBNC | Viable But Non Culturable | Βιώσιμα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay | Βιοχημική Μέθοδος Προσδιορισμού, Παρουσία Αντιγόνου ή Αντισώματος σε ένα δείγμα |
| LFIA | Later Flow Immunoassay | Ανοσοδοκιμασία Πλευρικής Ροής |
| PVDF | Polyvinylidene Fluoride | Φθοριούχο Πολυβινυλιδένιο |
| SELEX | Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment | Συστηματική Εξέλιξη Προσθεμάτων με Εκθετικό Εμπλουτισμό |
| CRISPR | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats | Οικογένεια αλληλουχιών DNA που βρίσκονται στα γονιδιώματα των προκαρυωτικών οργανισμών (βακτήρια & αρχαία) |
| HACCP | Hazard Analysis and Critical Control Points | Ανάλυση Κινδύνων και Κρίσιμο Σημείο Ελέγχου |
| GMPs | Good Manufacturing Practice | Καλές Πρακτικές Παραγωγής |
| NASBA | Nucleic-Acid Sequence-Based Amplification | Τεχνική Ενίσχυσης με βάση την αλληλουχία Νουκλεϊκού Οξέος |
| LAMP | Loop Mediated Isothermal Amplification | Ισοθερμική Τεχνική Ενίσχυσης Νουκλεϊκών Οξέων |
| CDCP | Centers for Disease Control and Prevention | Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid | Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ |

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση των κυριότερων παθογόνων μικροοργανισμών που ενδείκνυται να επηρεάσουν τη βιομηχανία τροφίμων καθώς και οι μοριακές μέθοδοι που εφαρμόζονται για την ανίχνευση τους. Συγκεκριμένα, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να επιφέρουν ασθένειες μετά την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, οδηγώντας σε σοβαρά προβλήματα υγείας, καθώς επίσης και την εμφάνιση επιδημιών. Κατά συνέπεια, η κατανόηση των παθογόνων μικροοργανισμών που μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση των τροφίμων και η ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων ανίχνευσης είναι ζωτικής σημασίας για την διασφάλιση της δημοσίας υγείας.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για την υλοποίηση της εν λόγω μελέτης πραγματοποιήθηκε εκτενής βιβλιογραφική «έρευνα», μέσω επιστημονικών άρθρων από τη βάση δεδομένων PubMed, καθώς επίσης και από αξιόπιστες ιστοσελίδες (ΕΟΔΥ, WHO, USFDA κ.λπ.) τόσο σε εγχώριο όσο και σε διεθνές επίπεδο. Για τη συγκρότηση της τέθηκαν (βοηθητικά) ερωτήματα (π.χ. ποιοι είναι οι κύριοι τροφιμογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί; κ.λπ.) καθώς και λέξεις κλειδιά (παθογόνοι μικροοργανισμοί, ασφάλεια τροφίμων, μοριακές μέθοδοι, τροφιμογενείς εξάρσεις) προκειμένου να επιτευχθεί η ορθή διαδικτυακή αναζήτηση. Επιπρόσθετα, συντάχθηκαν στο τέλος κάθε κεφαλαίου παραρτήματα με σκοπό τη διευκόλυνση της κατανόησης του παρόντος θέματος από τον υποψήφιο αναγνώστη. Τα παραρτήματα αποτελούν μια σύνοψη του κύριου μέρους των κεφαλαίων 1 & 2, καθώς και κάποια συμπληρωματικά στοιχεία.

Κεφάλαιο 1^ο

ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΟΝΑ

Η συσχέτιση ανάμεσα στην κατανάλωση τροφίμων και των ανθρώπινων νόσων έχει αναγνωριστεί από πολλά χρόνια πριν και ο Ιπποκράτης (460 π.Χ.) υπήρξε εκείνος που ανέφερε ότι υπάρχει ισχυρή σχέση ανάμεσα στα τρόφιμα που καταναλώνονται και στις ανθρώπινες ασθένειες. Τα τροφιμογενή παθογόνα (π.χ. βακτήρια, ιοί, μύκητες και παράσιτα) αποτελούν βιολογικούς παράγοντες, οι οποίοι ενδέχεται να επιφέρουν ένα περιστατικό τροφιμογενούς νόσου. Ως εστία τροφιμογενούς ασθένειας καθορίζεται η εμφάνιση δυο ή και παραπάνω περιστατικών κοινής νόσου που οφείλεται στην κατανάλωση ίδιου τροφίμου.

Η εμφάνιση τροφιμογενούς νόσου συμβαίνει όταν ένα παθογόνο προσληφθεί μέσω κατανάλωσης των τροφίμων και εγκατασταθεί (και συνηθέστερα πολλαπλασιάζεται) στον ανθρώπινο ξενιστή. Επίσης, αυτό ενδέχεται να συμβεί ακόμα και όταν ένα τοξινογόνο παθογόνο εγκατασταθεί σε ένα τρόφιμο και παράγει μια τοξίνη, η οποία εν συνεχεία πρόκειται να προσληφθεί από τον ανθρώπινο ξενιστή. Μια τροφιμογενής νόσος διακρίνεται σε: α) τροφιμογενή λοίμωξη και β) τροφιμογενή δηλητηρίαση. Όσον αφορά τις τροφιμογενείς λοιμώξεις, παρόλο που συνήθως μεσολαβεί μια περίοδος επώασης, ο χρόνος από την κατανάλωση μέχρι την εκδήλωση των συμπτωμάτων είναι πολύ μεγαλύτερος συγκριτικά με αυτόν των τροφιμογενών λοιμώξεων.

Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 200 τροφιμογενείς ασθένειες, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους. Τα πιο κρίσιμα περιστατικά εμφανίζονται συνήθως σε ηλικιωμένους, σε άτομα πολύ νεαρών ηλικιών, σε άτομα που εκτίθενται σε υψηλή δόση του εκάστοτε παθογόνου μικροοργανισμού καθώς επίσης και σε άτομα με μειωμένη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Σύμφωνα με στοιχεία της ΕΕ αναφορικά με το έτος 2015, 26 κράτη-μέλη ανέφεραν σε συνολικό επίπεδο 4.362 τροφιμογενή περιστατικά. Συνολικά, τα εν λόγω περιστατικά επέφεραν 45.874 περιπτώσεις ασθενειών (περισσότερες από 209 συγκριτικά με 2014), 3.892 νοσηλείες και 17 θανάτους. Η πλειοψηφία των κρουσμάτων που αναφέρθηκαν το 2015 προκλήθηκαν κυρίως από βακτηριακούς παράγοντες καταλαμβάνοντας το 33,7% του συνόλου των κρουσμάτων, πιο συγκεκριμένα:

- *Salmonella spp.* 21,8% του συνόλου των κρουσμάτων και

- *Campylobacter spp.* 8,9% του συνόλου των κρουσμάτων.

Ορισμένα βακτήρια και μύκητες ενδέχεται να μπορούν να παράγουν τοξίνες. Σε αυτή τη περίπτωση η ταυτοποίηση του ίδιου του παθογόνου δεν αποτελεί ικανοποιητικό προληπτικό μέτρο όσον αφορά την ασφάλεια των τροφίμων. Κάποια από αυτά τα παθογόνα και οι τοξίνες τους είναι θερμοσταθερά, γεγονός που συνεπάγεται ότι η καταστροφή τους δεν είναι εφικτή με τις συνηθισμένες μεθόδους παρασκευής τροφίμων, π.χ. μαγείρεμα, κατάψυξη κ.λπ., με συνέπεια ο έλεγχος να καθίσταται ακόμη πιο πολύπλοκος. [94]

Αναμεσά στους ευκαρυωτικούς παθογόνους μικροοργανισμούς τροφίμων που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη τοξικότητα μετά τα μικροφύκη, τα οποία παράγουν τοξίνες, είναι οι μύκητες, οι οποίοι παράγουν μυκοτοξίνες. Παρά το γεγονός ότι οι τοξίνες που παράγονται από τα φύκια είναι πιο ισχυρές όσον αφορά τις επιπτώσεις τους, οι τροφικές δηλητηριάσεις που προέρχονται από τους προαναφερθείς παράγοντες αποτελούν σπάνιο φαινόμενο. Οι παθογόνοι μύκητες και τα παθογόνα βακτήρια αποτελούν μια από τις συχνότερες αιτίες αλλοιώσεων των τροφίμων. Οι κυριότεροι μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες είναι ο *Penicillium spp.* και ο *Aspergillus spp.*.

Οι βακτηριακές τοξίνες καταλαμβάνουν τη δεύτερη θέση ανάμεσα στους αιτιολογικούς παράγοντες αναφορικά με τις τροφιμογενείς και υδατογενείς εστίες και έχουν αναφερθεί στο 19,5% των συνολικών εστιών, σε άλλη περίπτωση οι ιοί, οι οποίοι αποτέλεσαν από τους πιο αναφερόμενους παράγοντες το 2014, το 2015 αντιστοιχούσαν στο 9,2% των συνολικών εστιών. Τα παράσιτα καθώς και άλλοι αιτιολογικοί παράγοντες καταγράφηκαν σε ένα ποσοστό μικρότερο του 3%.

| ΤΡΟΦΙΜΑ | ΠΟΣΟΣΤΟ |
|--|--|
| Αυγά και προϊόντα αυγών Χοιρινό κρέας | Αντιπροσωπεύουν το 10% όλων των περιστατικών |
| Κρέας κρεατοπαραγωγής | 9% |
| Τυρί | 8% |
| Ψαριά και προϊόντα ψαριών | 7% |
| Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα | 5% |
| Βοοειδές κρέας | 4% |
| Οστρακοειδή | 3% |

Πίνακας 1 Κατηγορίες τροφίμων και ποσοστά αναφοράς

Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα τα τρόφιμα που εμπλέκονται κυρίως είναι ζωικής προέλευσης. Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία του έτους 2015 η *Salmonella spp.* στα αυγά αποτέλεσε τον υψηλότερο αιτιολογικό παράγοντα αναφορικά με τα τροφιμογενή περιστατικά που είχαν καταγραφεί και ήταν ανάμεσα στους πιο κορυφαίους συνδυασμούς τροφίμων-παθογόνων, αναφορικά με το συνολικό αριθμό περιστατικών ασθένειας και νοσηλείας σε περιστατικά.

Στο παρόν κεφάλαιο μελετώνται οι κυριότεροι τροφιμογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί, οι ασθένειες που προκαλούν καθώς επίσης και κάποιες από τις πιο σημαντικές επιδημίες στις οποίες έχουν εμπλακεί. [25]

1.1 ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

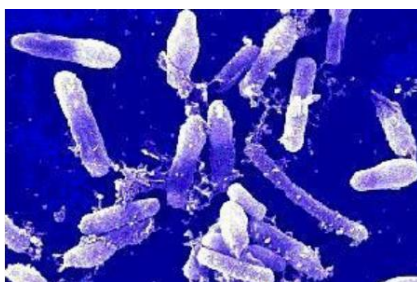
Τα βακτήρια αποτελούν μια από τις πιο κοινές αιτίες τροφιμογενών λοιμώξεων και εντοπίζονται σε πληθώρα σχημάτων, ειδών και ταυτόχρονα ανάλογων χαρακτηριστικών. Κάποια παθογόνα βακτήρια έχουν την ικανότητα να δημιουργούν σπόρους, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί στη θερμότητα, π.χ. *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* και *Clostridium perfringens*. Άλλα βακτήρια έχουν την ικανότητα παραγωγής τοξινών με αντοχή στη θερμότητα, π.χ. *Staphylococcus aureus* και *Clostridium botulinum*. Η πλειοψηφία των παθογόνων είναι μεσόφιλα με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης να κυμαίνεται από 20° C έως 45° C. Επιπρόσθετα, υπάρχουν τροφιμογενή παθογόνα όπως είναι η *Listeria monocytogenes* και η *Yersinia enterocolitida*, τα οποία είναι ψυχρότροφα, έχουν δηλαδή την ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασίες ψύξης. [25]

1.1.1 *Bacillus cereus*

Η οικογένεια *Bacillus cereus* αποτελείται από αρκετά είδη *Bacillus*, τα οποία εμφανίζουν υψηλό βαθμό φυλογενετικής συγγένειας. Στα επαρκώς μελετημένα μέλη αυτής της ομάδας ανήκουν ο *B. anthracis*, *B. cereus* και ο *B. thuringiensis*, τα οποία είναι τα πιο ευρέως γνωστά για το παθογενετικό δυναμικό τους. Στην παρούσα μελέτη θα γίνει αναφορά στον *B. cereus* και συγκεκριμένα σε ορισμένα στελέχη του που αναγνωρίζονται ως οι κύριοι παράγοντες τροφικής δηλητηρίασης.

Οι μικροοργανισμοί που απαρτίζουν την ομάδα *Bacillus cereus* είναι θετικά κατά Gram βακτήρια με χαμηλή περιεκτικότητα GC και ανήκουν στο φύλο *Firmicutes*. Στην

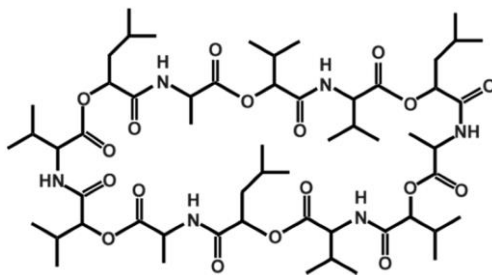
κατηγορία των σπορογόνων αερόβιων, προαιρετικά αναερόβιων, ραβδοειδών βακτηρίων απαρτίζεται τουλάχιστον από οχτώ συγγενικά είδη: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* και *B. toyonensis*, με μόνη εξαίρεση το *B. toyonensis*, το οποίο είναι το πιο αποκλίνον της εν λόγω ομάδας, με χρωμόσωμα 4,085 Mb, τα υπόλοιπα γονιδιώματα που ανήκουν στα είδη της ομάδας *B. cereus* είναι εξαιρετικά σταθερά, με το μέγεθος τους να κυμαίνεται από 5,2 έως 5,9 Mb καθώς επίσης και να εμφανίζουν κοινές γονιδιακές αλληλουχίες 16SrRNA.



Εικόνα 1 Ράβδοι *B. cereus* [97]

Ο προσδιορισμός αυτών των τύπων καθώς και ο καταμερισμός των εν λόγω στελεχών έχει βασιστεί σε φαινότυπους, καθώς επίσης και στην οικονομική και κλινική τους αξία η οποία συσχετίζεται με την περιεκτικότητα τους σε πλασμίδια. Στην περίπτωση που τα εμετικά στελέχη του *B. cereus* φέρουν το πλασμίδιο pCER270, το οποίο μπορεί να κωδικοποιεί ενζυμικά στοιχεία που είναι απαραίτητα για τη βιοσύνθεση της μη ριβοσωμικής τοξίνης *cereulide*.

Η πρώτη απομόνωση του *B. cereus* έγινε από τον αέρα σε ένα ποιμνιοστάσιο αγελάδων και καταγράφηκε σαν ένα άκρως ευκίνητο βακτήριο, το οποίο γενικότερα παρουσιάζεται ως μεμονωμένο κύτταρο, αλλά ενίοτε διαμορφώνει μακρύτερα νημάτια. Στον 20^ο αιώνα και συγκεκριμένα στο δεύτερο μισό του, ο *B. cereus* είχε αναγνωρισθεί ως κοινός παράγοντας μόλυνσης σε τρόφιμα υπαίτιος για δυο κατηγορίες δηλητηριάσεων την εμετική και τη διαρροϊκή. [51]



Εικόνα 2 Δομή της αποσιπεπτιδικής τοξίνης cereulide [50]

Ο *Bacillus cereus sensu stricto* είναι σε υψηλό βαθμό παθογόνος γεγονός που οδηγεί σε τροφική δηλητηρίαση αλλά και την εμφάνιση άλλων εντερικών ασθενειών. Το συγκεκριμένο στέλεχος είναι μια εξαιρετική πρόκληση που αφορά αρκετά τις βιομηχανίες τροφίμων, καθώς μπορεί πολύ εύκολα να διαδοθεί σε αρκετά τρόφιμα διαμέσου ζώων και καλλιεργούμενων φυτών.

Επιπρόσθετα η ικανότητα του να εκκρίνει σπόρια και βιοφίλμ χαρακτηρίζει τον *B. cereus* ως ένα αρκετά ανθεκτικό παθογόνο όσον αφορά της διαδικασίες απολύμανσης και καθαριότητας, καθώς και για τον προσδιορισμό τεχνολογικής φύσεως στα τρόφιμα.

Μελέτες εκτιμούν ότι το εν λόγω βακτήριο φέρει ευθύνη για περίπου το 1,4-12% όλων των περιπτώσεων που αφορούν τροφικές δηλητηριάσεις σε παγκόσμια εμβέλεια. Σύμφωνα με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, οι βακτηριακές τοξίνες (*Clostridium spp.*, *Staphylococcus aureus* και *B. cereus*) είναι αυτές που ευθύνονται για το 17,7% (2016) και το 15,9% (2019) όλων των περιπτώσεων που έχουν αναφερθεί και οφείλονται στα τρόφιμα.

Η νόσος η οποία εκδηλώνεται με εμετική μορφή και η τροφική δηλητηρίαση προκαλούνται από το θερμοσταθερό κυκλικό δωδεκαδακτυλοπενίδιο *cereulide* και εκδηλώνεται με συμπτώματα όπως η ναυτία και ο εμετός, σε μικρό χρονικό διάστημα, μόλις μισή ώρα μετά την κατανάλωση μολυσμένης τροφής. Παρόλα τα όσα αναφέρθηκαν υπάρχει και το ενδεχόμενο το οποίο αν και σπάνιο μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο λόγω ηπατικής ανεπάρκειας.

Ο διαρροϊκός τύπος οφείλεται κυρίως σε τροφικές λοιμώξεις που απαρτίζονται από εντεροπαθογόνα στελέχη. Οι εν λόγω λοιμώξεις είναι γνωστές και ως τοξικολογικές λοιμώξεις, γεγονός που οφείλεται στην παραγωγή τοξινών από βιώσιμα βακτήρια που εδράζουν στο ανθρώπινο έντερο. Τα βασικά συμπτώματα που παρουσιάζει ο ασθενής

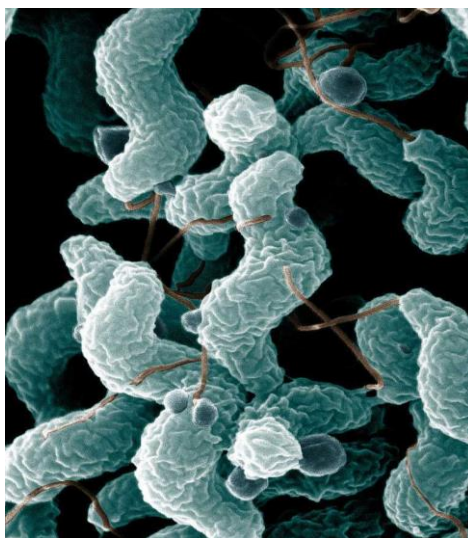
είναι η διάρροια και οι κράμπες στη κοιλιακή χώρα, οι οποίες εμφανίζονται σε χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από 8 έως 16 ώρες. Οι βασικότερες πρωτεϊνικές εντεροτοξίνες είναι: η απλή πρωτεϊνική κυτταροτοξίνη K (CytK), η τριμερής αιμολυσίνη BL (Hbl) καθώς και η μη αιμολυτική εντεροτοξίνη (Nhe). [95]

Όταν η εμετική τοξίνη (*cereulide*) παραχθεί στο τρόφιμο, επέρχεται εμετός μετά την κατανάλωση του τροφίμου που έχει μολυνθεί. Το διαρροϊκό σύνδρομο μπορεί να εμφανισθεί όταν παραχθούν εντεροτοξίνες στο έντερο, εφόσον πραγματοποιηθεί η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων από *B. cereus*. [22]

Στα τρόφιμα που ενοχοποιούνται ως φορείς του εν λόγω παθογόνου ανήκουν: το τηγανητό ή βραστό ρύζι, μαγειρεμένα κρέατα ή λαχανικά, ζυμαρικά, σάλτσα βανίλιας, γλυκά, σαλάτες, σούπες, παγωτά, βότανα και μπαχαρικά. [113]

1.1.2 *Campylobacter* spp.

Τα *Campylobacter* spp. είναι μέλη της οικογένειας *Campylobacteriaceae* και το *Campylobacter jejuni* αποτελεί μια από τις πιο συχνές αιτίες διαρροϊκής νόσου. Σύμφωνα με στοιχεία που προκύπτουν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), εκτιμάται ότι περίπου το 1% του πληθυσμού της Δυτικής Ευρώπης πρόκειται να μολυνθεί από καμπυλοβακτηρίδια κάθε χρόνο. [25]



Εικόνα 3 *C. jejuni* κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [55]

Το *C. jejuni* συναντάται σε όλη τη φύση, μπορεί να αποικίσει στα έντερα τόσο των πτηνών, όσο και των θηλαστικών, η μετάδοση του στον άνθρωπο μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω τροφίμων που έχουν μολυνθεί. Ο εν λόγω μικροοργανισμός

δρα εισβάλλοντας στο επιθηλιακό στρώμα και εκεί προσκολλάται πρώτα στα επιθηλιακά κύτταρα και στη συνέχεια διεισδύει μέσα από αυτά. Η διάρροια οφείλεται σε βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων. Ένα μέσο συνολικό μήκος γονιδιώματος εκτιμάται περίπου στο 1,686 Mb. Τα *Campylobacter spp.* είναι μικρά (πλάτος 0,2-0,9 μm και μήκος 0,2-0,5 μm), έχουν σπειροειδή μορφή, είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια και περιλαμβάνουν 18 είδη.

Επιπλέον, παρουσιάζουν αρκετές διαφορές συγκριτικά με άλλα παθογόνα που σχετίζονται με τροφιμογενείς νόσους. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι είναι μικροαερόφιλα και αναπτύσσονται καλύτερα σε ατμόσφαιρα που περιέχει περίπου 10% CO₂ και περίπου 5% O₂. Σε περιπτώσεις που αφορούν τον άνθρωπο τα συγκεκριμένα παθογόνα είδη παρουσιάζουν ένα μικρό θερμοκρασιακό εύρος, με μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 46° C και ελάχιστη τους 30° C. [25]

Το συγκεκριμένο παθογόνο, γενικά εμφανίζει μια αυτοπεριοριζόμενη κλινική ασθένεια, η οποία μπορεί να διαρκέσει από 5 έως 7 ημέρες. Η έναρξη των συμπτωμάτων συνήθως ξεκινάει από 2 έως 5 ημέρες εφόσον έχει προηγηθεί η κατανάλωση μολυσμένου τρόφιμου. [56]

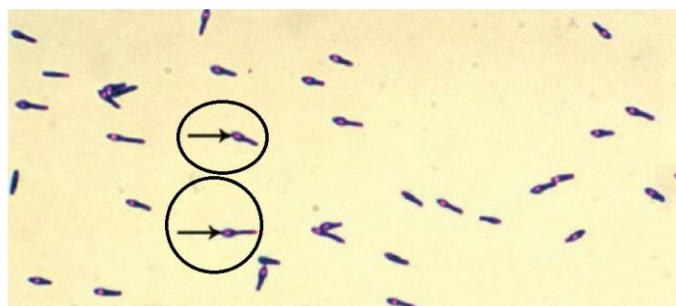
Το καμπυλοβακτηρίδιο μπορεί να μολύνει τα τρόφιμα με αρκετούς τρόπους. Αρκετά πουλερικά, αγελάδες καθώς και άλλα ζώα που δεν εμφανίζουν κάποια συμπτώματα ασθένειας φέρουν καμπυλοβακτηρίδιο. Η μετάδοση του καμπυλοβακτηριδίου ενδείκνυται από τη μεταφορά στα έντερα, το συκώτι καθώς και σε άλλα όργανα ζώων ακόμα και στα σημεία σφαγής του εκάστοτε ζώου. Το 2015, έλεγχοι που πραγματοποιήθηκαν από το Εθνικό Σύστημα Παρακολούθησης Μικροβιακής Αντοχής (NARMS) εντόπισαν καμπυλοβακτηρίδιο στο 24% ωμού κοτόπουλου που είχε αγορασθεί από τους εμπόρους. Επιπλέον, το γάλα αποτελεί μέσο μετάδοσης στη περίπτωση που η αγελάδα έχει μολυνθεί από καμπυλοβακτηρίδιο στο μαστό ή στην περίπτωση που το γάλα μολυνθεί με κοπριά. Για το λόγο αυτό η παστερίωση χρήζεται απαραίτητη έτσι ώστε το γάλα να καθίσταται ασφαλές για κατανάλωση.

Τα λαχανικά και τα φρούτα, η μόλυνση των οποίων ενδέχεται να γίνει μέσω επαφής με το χώμα ή το νερό, που μπορεί να περιέχει περιττώματα πουλιών, αγελάδων ή άλλων ζώων. Το καλό πλύσιμο των φρούτων και των λαχανικών είναι απαραίτητο για την πρόληψη από το συγκεκριμένο παθογόνο.

Για να νοσήσει ένας άνθρωπος από καμπυλοβακτηρίδιο χρειάζεται μια πολύ μικρή ποσότητα, π.χ., μια σταγόνα υγρού από ωμό κοτόπουλο, περιέχει αρκετά βακτήρια προκειμένου να μολυνθεί κάποιος. [34]

1.1.3 *Clostridium botulinum*

Το *Clostridium botulinum* (ή *C. botulinum*) είναι ένα ραβδοειδές βακτήριο. Το εν λόγω βακτήριο είναι αναερόβιο, δηλαδή ζει και αναπτύσσεται σε συνθήκες με χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Σε μη ευνοϊκές συνθήκες τα βακτήρια για να μπορέσουν να επιβιώσουν σχηματίζουν προστατευτικά σπόρια. [148]



Εικόνα 4 Σχηματισμός σπορίων *C. botulinum* [154]

Το σπόριο διαθέτει μια ισχυρή, στεγανή επίστρωση, η οποία περικλείει τα κύρια τμήματα του βακτηρίου και περιλαμβάνει στιβάδες με προστατευτικές μεμβράνες. Στο εσωτερικό των μεμβρανών και σε συνδυασμό με την καίρια επικάλυψη το ανενεργό βακτήριο ενδέχεται να επιβιώσει για χρόνια. Το *C. botulinum* αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για μια νόσο που καλείται αλλαντίαση.

Η αλλαντίαση αποτελεί μια επικίνδυνη για τη ζωή νόσο, η οποία μπορεί να προκληθεί από την κατανάλωση μιας δραστικής νευροτοξίνης, η παραγωγή της οποίας ενδείκνυται από την ανάπτυξη του βακτηρίου. Τα συμπτώματα της αλλαντίαςης εκδηλώνονται σε χρονικό διάστημα μεταξύ 12 έως 36 ωρών, μετά την πρόσληψη της εκάστοτε τροφής που περιέχει τη νευροτοξίνη. Παρόλα αυτά, έχουν καταγραφεί περιστατικά των οποίων τα συμπτώματα έχουν εκδηλωθεί σε διάστημα μεταξύ 4 ωρών έως και 8 ημερών. Όσο πιο νωρίς εμφανισθούν τα συμπτώματα τόσο πιο σοβαρή είναι η ασθένεια. Η εν λόγω τοξίνη αποτελεί μια από τις πιο γνωστές τοξικές ουσίες, όπου ακόμα και μικρές ποσότητες μπορούν να επιφέρουν ασθένεια ή ακόμα και θάνατο.

Παλαιότερα, η αλλαντίαση συσχετιζόταν πρωτίστως με τροφές σε κονσέρβα στο σπίτι. Τις τελευταίες δεκαετίες, οι αρρώστιες από αλλαντίαση έχουν συσχετισθεί με

τροφές, όπως η μη ψυχόμενες σπιτικές σάλτσες, το μέλι (βασική αιτία αλλαντίασης σε βρέφη), οι ψητές πατάτες που έχουν σφραγιστεί με αλουμινόχαρτο, το σκόρδο σε λάδι, καθώς επίσης και τα παραδοσιακά παρασκευασμένα αλμυρά ή «ζυμωμένα» ψάρια.

Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ευρέως διαδεδομένο σε παγκόσμιο επίπεδο τόσο στο έδαφος όσο και στα θαλάσσια ιζήματα, κυρίως ως σπόρια. Τα σπόρια απαντώνται οπουδήποτε. Γενικά, είναι ακίνδυνα, παρόλα αυτά μπορούν να γίνουν επικίνδυνα όταν αρχίσουν να αναπτύσσονται σε εν ενεργεία βακτήρια παράγοντας νευροτοξίνες.

Η νευροτοξίνη είναι μια βλαβερή χημική ουσία που επιδρά στο κεντρικό νευρικό σύστημα, καταστρέφοντας, παραλύοντας ή επηρεάζοντας δυσμενώς το νευρικό ιστό ή τα νευρά. Το *C. botulinum* έχει την ικανότητα παραγωγής επτά διαφορετικών τύπων νευροτοξινών, οι οποίες προσδιορίζονται με τα γράμματα Α έως Γ. Από τους επτά τύπους μόνο οι Α, Β, Ε και F προξενούν νόσο στον άνθρωπο.

Τα σπόρια του *C. botulinum* εντοπίζονται συνήθως στις επιφάνειες λαχανικών, φρούτων καθώς και στα θαλασσινά. Η ανάπτυξη του οργανισμού ευνοείται ιδανικά σε συνθήκες με χαμηλά επίπεδα οξυγόνου όπου και παράγονται τα σπόρια και οι τοξίνες. Παραδείγματος χάρη, τα πράσινα φασολάκια είναι ένα τρόφιμο με χαμηλό οξύ, στην περίπτωση που κονσερβοποιηθεί με ακατάλληλο τρόπο, τα βακτήρια του *C. botulinum* καθώς και άλλα βακτήρια που ενδείκνυται να υπάρχουν θα καταστραφούν από το βρασμό του τροφίμου. Παρόλα αυτά τα σπόρια του *C. botulinum* δε θα καταστραφούν. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διαδικασία κονσερβοποίησης να αφαιρεί ποσότητα οξυγόνου, με συνέπεια ένα περιβάλλον με χαμηλή ποσότητα οξυγόνου που θα επιτρέψει την ανάπτυξη των σπορίων στα ενεργά βακτήρια. Όταν τα βάζα αποθηκευτούν σε χώρους με θερμοκρασία δωματίου, τα σπόρια μπορούν να αναπτυχθούν και να παραχθεί η τοξίνη.

Ο σχηματισμός της τοξίνης ενδείκνυται όταν τα τρόφιμα υφίστανται λανθασμένη κατεργασία (κονσερβοποίηση) στο σπίτι. Το *C. botulinum* δεν αναπτύσσεται σε τιμές pH κάτω από 4,6, αυτό συνεπάγεται ότι τα όξινα τρόφιμα, π.χ. τα περισσότερα φρούτα, οι πίκλες και οι τομάτες, μπορούν να υποβάλλονται σε ασφαλή επεξεργασία σε κονσερβοποιητή με υδατόλουτρο. Όσον αφορά τα τρόφιμα με υψηλό pH (κρέατα και τα περισσότερα λαχανικά), η επεξεργασία τους θα πρέπει να γίνεται υπό πίεση, δηλαδή, θα πρέπει να χρησιμοποιείται χύτρα ταχύτητας, όπου φτάνει σε αρκετά υψηλές θερμοκρασίες προκειμένου να καταστρέψει τα σπόρια του *C. botulinum*. [148]

1.1.4 *Clostridium perfringens*

Το *Clostridium perfringens* αποτελεί έναν αναερόβιο θετικό κατά Gram βάκιλο, ο οποίος σχηματίζει σπόρια και αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα όσον αφορά τις οξείες γαστρεντερικές λοιμώξεις. Τα συμπτώματα τους κυμαίνονται από την εμφάνιση διάρροιας, νεκρωτική εντεροκολίτιδα και μυονέκρωση στον άνθρωπο. Το εν λόγω παθογόνο διαθέτει τοξίνες που ευθύνονται για την παθογένεια της νόσου, σχηματίζοντας ανθεκτικά σπόρια.

Η ανακάλυψη του *C. perfringens* έγινε για πρώτη φορά το 1891 από τον William H. Welch, MD στο νοσοκομείο Johns Hopkins ύστερα από αυτοψία που διενεργήθηκε σε έναν άνδρα 38 ετών. Η πρώτη ονομασία ήταν *Bacillus aerogenes capsulatus*. Στην συνέχεια έγινε γνωστό με το όνομα *Bacillus welchii*, όπου τελικά πηρέ και την τελική του ονομασία *Clostridium perfringens*, όπου στα λατινικά σημαίνει «διαρρηγνύεται».

Η διάκριση στηρίζεται στην παραγωγή των έξι κυριότερων τοξινών:

- α-τοξίνη (CPA),
- β-τοξίνη (CPB),
- έψιλον-τοξίνη (ETX),
- ιώτα-τοξίνη (ITX),
- εντεροτοξίνη (CPE) και
- τοξίνη τύπου νεκρωτικής εντερίτιδας B (NetB).

Τα σπόρια του *C. perfringens* έχουν την ικανότητα επιβίωσης σε φυσιολογικές συνθήκες μαγειρέματος.

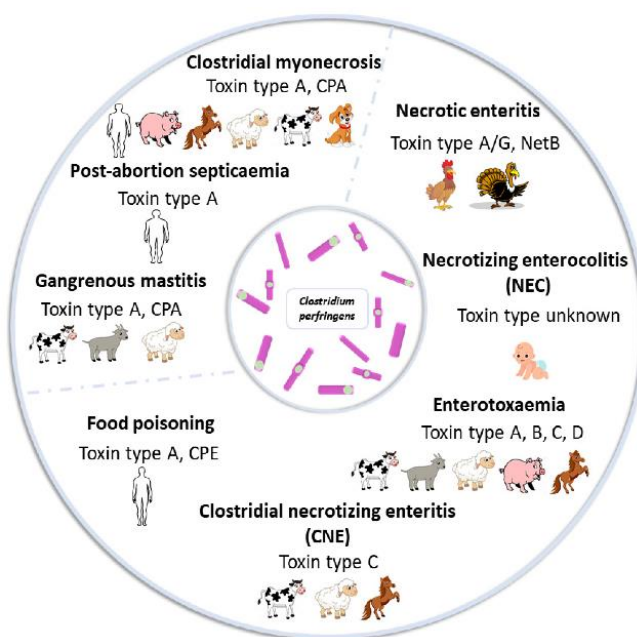
Πέραν των όσων έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής, το εν λόγω βακτήριο έχει την ικανότητα πολλαπλασιασμού ακόμα και σε τρόφιμα με μη κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης. Η πλειοψηφία των περιστατικών συγκαταλέγει τις ακατάλληλες ή ξαναζεσταμένες σάλτσες, τα πουλερικά ή γενικότερα τα κρέατα.

Είναι γνωστό ότι στις τοξίνες τύπου A και C οφείλονται οι ανθρώπινες νόσοι. Πιο συγκεκριμένα, ο τύπος A αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για την πλειοψηφία των τροφικών δηλητηριάσεων και των μη τροφικών διαρροϊκών νόσων που συσχετίζονται με το *C. perfringens*.

Σύμφωνα με στοιχεία που απορρέουν από το CDC, όσον αφορά τις επιδημίες τροφιμογενών λοιμώξεων, το *C. perfringens* καταλαμβάνει το 5% των επιδημιών, 10%

των νόσων και 4% των νοσηλειών. Ο υψηλότερος επιπολασμός παρατηρείται κυρίως στο ανδρικό φύλο (65%), με την πλειοψηφία των κρουσμάτων να βρίσκονται στο ηλικιακό εύρος μεταξύ 20 έως 49 ετών.

Το κοινό μέσο μετάδοσης αποτελεί το ατελώς μαγειρεμένο βόειο κρέας και ακολουθούν τα πουλερικά. Περιστατικά εκδηλώνονται καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου, με υψηλότερα ποσοστά επιπολασμού τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο. Το συγκεκριμένο παθογόνο αποτελεί έναν από τους πέντε πιο συχνούς αιτιολογικούς παράγοντες για περιστατικά τροφιμογενών ασθενειών στις Ηνωμένες Πολιτείες, κατέχοντας τον υψηλότερο βαθμό επιπολασμού σε παγκόσμιο επίπεδο. [159]



Εικόνα 5 Συνοπτική παρουσίαση των παθήσεων που προκαλούνται από το *C. perfringens* [59]

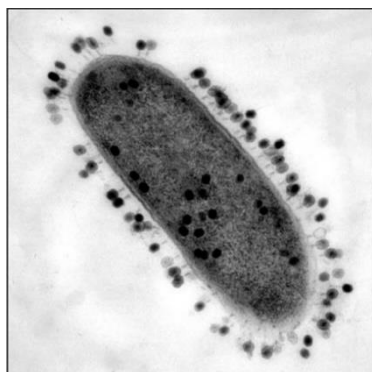
Η πλειοψηφία των ασθενών με τροφική δηλητηρίαση από *C. perfringens* εμφανίζουν συμπτώματα όπως, διάρροια και κράμπες στο στομάχι, απουσία εμετού. Συνήθως τα συμπτώματα εμφανίζονται σε διάστημα 6 έως 24 ωρών μετά την κατανάλωση των βακτηρίων. Η έναρξη των συμπτωμάτων μπορεί να είναι ξαφνική και συνήθως η διάρκεια τους είναι λιγότερη από 24 ώρες.

Τρόφιμα που μαγειρεύονται σε μεγάλες ποσότητες και δεν διατηρούνται στις σωστές θερμοκρασίες συνήθως είναι υπεύθυνα για εξάρσεις τροφικών δηλητηριάσεων από το εν λόγω βακτήριο. Άλλα τρόφιμα που ενοχοποιούνται και κατά συνέπεια αποτελούν αιτιολογικό παράγοντα για τροφική δηλητηρίαση από *C. perfringens* αποτελούν οι

σάλτσες, τα κρέατα (μοσχάρι και χοιρινό) και τα πουλερικά (γαλοπούλα και κοτόπουλο). [35]

1.1.5 *Escherichia coli*

Η *Escherichia coli* (ή *E. coli*) ανήκει στην κατηγορία των αρνητικών κατά Gram βάκιλων. Πέραν του γεγονότος ότι η *E. coli* αποτελεί σημαντικό μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, μπορεί να αποτελέσει αιτία για την εκδήλωση εντερικών και εξωεντερικών λοιμώξεων στον άνθρωπο. Έχουν ταυτοποιηθεί εκατοντάδες στελέχη *E. coli* με συνέπεια μια πληθώρα ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της ήπιας αυτοπεριοριζόμενης γαστρεντερίτιδας έως και νεφρικής ανεπάρκειας που οφείλεται σε σηπτικό σοκ. Η έντονη μολυσματική ικανότητα αποδίδει στην *E. coli* τη δυνατότητα αποφυγής της άμυνας του ξενιστή με συνέπεια την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αρκετά αντιβιοτικά. [103]



Εικόνα 6 *E. coli* [10]

Όπως ήδη έχει γίνει λόγος η *E. coli* αποτελεί μέρος της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας και δεν αποτελεί φορέα ιογένεσης σε αυτό το περιβάλλον. Στην περίπτωση που η *E. coli* βρίσκεται εντός του εντερικού σωλήνα, ελλοχεύει ο κίνδυνος λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος (UTI), πνευμονία, περιτονίτιδα κ.λπ.. Επιπρόσθετα το *E. coli* είναι εφικτό να ανιχνευθεί στο έδαφος, σε λαχανικά, στο νερό καθώς και σε ατελώς μαγειρεμένα κρέατα. Στην περίπτωση κατάποσης παθογόνων στελεχών μπορεί να οδηγήσουν στην εκδήλωση εντερικών ασθενειών στον άνθρωπο.

Η εντερική νόσος που προκαλείται από την *E. coli* μπορεί να προκληθεί από έναν από τους πέντε υπότυπους και μπορεί να αναγνωρισθεί σύμφωνα με τα αντιγόνα O και H. Το αντιγόνο O μπορεί να καθορίζεται από μια κατ' επανάληψη αλυσίδα

πολυσακχαριτών που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του λιποπολυσακχαρίτη (LPS), αντίστοιχα το *flagellum* καθορίζει το αντιγόνο H.

Οι νόσοι εντερικής φύσεως χαρακτηρίζονται από τον γενεσιουργό παράγοντα *E. coli*. Σε αυτές συγκαταλέγονται οι εντεροτοξικογόνες *Escherichia coli* (ETEC), οι εντεροαιμορραγικές *Escherichia coli* (EHEC), οι οποίες είναι ευρέως γνωστές ως *E. coli* που παράγει την τοξίνη *shiga* (STEC) και αναφέρονται ως EHEC/STEC, των εντεροπαθογόνων *Escherichia coli* (EPEC), των εντεροσυγκεντρωτικών *Escherichia coli* (EAEC) και των εντεροδιεισδυτικών *E. coli* (EIEC).

Συγκεκριμένα το ETEC μπορεί να προκαλέσει διάρροια υδαρούς μορφής. Εντοπίζεται κυρίως σε τρόφιμα και νερό σε περιοχές περιορισμένης υγιεινής. Εκτιμάται ότι για να προκληθεί νόσος σε ένα υγιές άτομο από το ETEC χρειάζεται να καταναλωθούν 100.000.000 οργανισμοί. Επιπρόσθετα, ο ETEC συμβάλλει στην αφυδατωτική διαρροϊκή νόσο των παιδιών και των βρεφών σε μέρη περιορισμένων πόρων. Τέλος, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους οργανισμούς στους οποίους οφείλεται η διάρροια των ταξιδιωτών.

Ο EPEC αποτελεί έναν από τους πρώτους παθότυπους *E.coli* που έχουν ταυτοποιηθεί ως ο παράγοντας που αιτιολογεί τη διάρροια υδατοειδούς μορφής, κυρίως σε βρέφη και παιδιά σε χώρες με μη επαρκής πόρους και είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση σε κατά διαστήματα επιδημικών εστιών. Η συγκεκριμένη διαρροϊκή ασθένεια τις περισσότερες φορές μεταδίδεται μέσω της κατάποσης, παρόλα αυτά μπορεί να μεταδοθεί και από άνθρωπο σε άνθρωπο.

Ο EAEC είναι ένας οργανισμός στον οποίο οφείλεται η οξεία και η χρόνια υδαρής διάρροια σε αρκετές περιοχές ανεξαρτήτως των πόρων που διαθέτουν.

Ο EHEC/STEC που παράγει την τοξίνη *Shiga* περιλαμβάνει έναν από τους πιο σημαντικούς ορότυπους O157:H7. Ο EHEC/STEC είναι υπαίτιος για διαρροϊκές επιδημίες μετά από κατανάλωση συγκεκριμένων μολυσμένων τροφίμων, λ.χ., μαρούλι, σπανάκι, φρούτα, ατελώς μαγειρεμένου βοδινού κρέατος κ.λπ.. Επιπρόσθετα ο EHEC/STEC ενοχοποιείται και για την κατανάλωση ωμών γαλακτοκομικών προϊόντων. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός συνήθως εντοπίζεται στο μοσχαρίσιο κιμά, ο οποίος ενδέχεται να μολυνθεί κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του. Αντίστοιχα, τα λαχανικά μπορούν να μολυνθούν όταν οι καλλιέργειες τους λιπαίνονται με κοπριά και περιέχει EHEC/STEC.

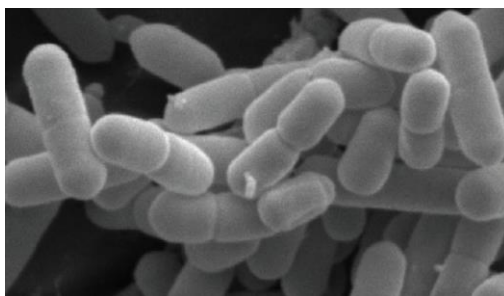
Η διάρροια που μπορεί να προκληθεί από *EIEC* δεν αποτελεί σύνηθες φαινόμενο. Η *EIEC* είναι στενά συνδεδεμένη με τη *Shigella* και συνήθως προκαλείται μετά από κατανάλωση μισοψημένων κρεάτων και μολυσμένων λαχανικών. [103]

Οι ασθενείς που μολύνονται από το *E. coli O157:H7*, φέρεται να είναι από σοβαρά έως και ασυμπτωματικοί. Παρόλα αυτά, λίγα είναι τα άτομα που μπορούν να εμφανίσουν θανατηφόρες επιπλοκές, όπως αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS).

Τα βοοειδή αποτελούν την κυριότερη πηγή μόλυνσης για το *E.coli O157:H7*. Η μόλυνση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της χρήσης των κοπράνων τους ως τροφή, που χρησιμοποιείται για λίπασμα. Παρόλο που έχει καταγραφεί μια διακύμανση ως προς την αποβολή του *E. coli O157:H7* αναφορικά με τα κόπρανα που ανέρχεται σε ποσοστό από 0 έως 80% αναμεσά στο πληθυσμό των βοοειδών, έχει επίσης τεκμηριωθεί ότι αποτελεί εποχιακό φαινόμενο, με υψηλότερα επίπεδα επιπολασμού τους καλοκαιρινούς μήνες. Η υψηλή θερμοκρασία φαίνεται να ευνοεί τη μετάδοση και την επιβίωση των βακτηρίων. [53]

1.1.6 *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά Gram, προαιρετικά ενδοκυτταρικό ραβδωτό βακτήριο, το οποίο είναι θετικό στην καταλάση και β-αιμολυτικό όταν αναπτυχθεί στο άγαρ αίματος. Στους παράγοντες που ευθύνονται για την μόλυνση από *L. monocytogenes* ανήκουν, μεταξύ άλλων, η ενδοκυτταρική κινητικότητα, μετά από τον πολυμερισμό της ¹ακτίνης και την ικανότητα του να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψυγείου, γεγονός που καθίσταται αρκετά δύσκολο από τις βιομηχανίες τροφίμων. Τα βακτήρια μπορούν να μεταδοθούν μέσω της κοπρανό-στοματικής οδού και συνήθως αφορά τρόφιμα όπως τα κρύα αλλαντικά και τα μη παστεριωμένα γαλακτοκομικά είδη. [127]



¹ Πρωτεΐνη ευκαρυωτικών κυττάρων.

Εικόνα 7 *L. monocytogenes*, ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης [154]

Η λιστερίωση, δηλαδή η λοίμωξη που προκαλείται από το *L. monocytogenes* εκδηλώνεται σε έναν υγιή ενήλικα ως σήψη, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, αυτόματη αποβολή καθώς και ως αυτοπεριοριζόμενη γαστρεντερίτιδα. Στις πληθυσμιακές ομάδες που εμφανίζεται υψηλό ποσοστό κινδύνου ανήκουν, τα βρέφη, οι έγκυες γυναίκες, οι ηλικιωμένοι και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες ψυγείου. Οι χαμηλές θερμοκρασίες ευνοούν την παραγωγή ενζύμων όπως είναι η RNA ελικάση, η οποία μπορεί να βελτιώσει την ενεργοποίηση και την περαιτέρω αναπαραγωγή του *L. monocytogenes* σε χαμηλές θερμοκρασίες. Επιπρόσθετα, είναι σημαντικό να αναφερθεί η ικανότητα του *L. monocytogenes* να παράγει βιοϋμένια, γεγονός που ενισχύει την επιβίωση του σε μη ευνοϊκά περιβάλλοντα. Επιπλέον, η *L. monocytogenes* κάνει χρήση των «σημαδούρων» της στις χαμηλές θερμοκρασίες, αποτελώντας έναν μηχανισμό που της προσδίδει την ικανότητα να εισχωρεί και να προσκολλάται στα εντερικά κύτταρα στο αρχικό στάδιο της μόλυνσης. Σε περίπτωση της έκθεσης του βακτηρίου σε υψηλές θερμοκρασίες οι σημαδούρες χάνονται. [127]

**Εικόνα 8** Το *L. monocytogenes* και οι σημαδούρες που διαθέτει [44]

Παρόλο που το *L. monocytogenes* δεν αποτελεί την πιο συχνή τροφιμογενή λοίμωξη, εντούτοις κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας και αυτό οφείλεται στους εξειδικευμένους παράγοντες ιογένεσης. Με τη πάροδο των χρόνων ο αριθμός των περιπτώσεων που αφορούν το *L. monocytogenes* έχει μειωθεί σε σημαντικό βαθμό, γεγονός που οφείλεται στη πρόληψη, την ανίχνευση και την ίαση. [127]

Η λιστερίωση παρουσιάζει μια σειρά συμπτωμάτων. Ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου, τα συμπτώματα μπορεί να διαρκέσουν από ημέρες έως αρκετές εβδομάδες. Τα ήπια συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν πυρετό, μυϊκούς πόνους, ναυτία, έμετο

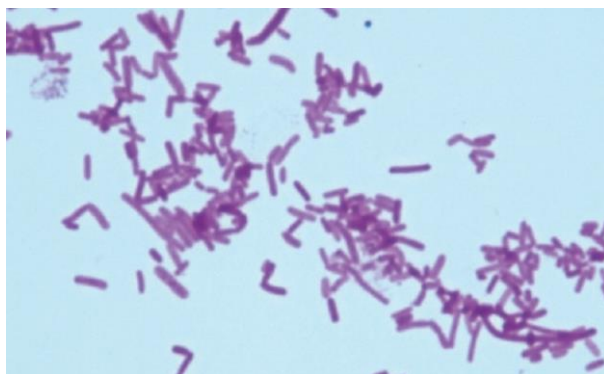
και διάρροια. Σε περιπτώσεις σοβαρής λιστερίωσης, τα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν πονοκέφαλο, δύσκαμπτο αυχένα, σύγχυση, απώλεια ισορροπίας και επιληπτικές κρίσεις. Για πολύ μικρά, ηλικιωμένα και ανοσοκατεσταλμένα άτομα, η λιστερίωση μπορεί να αποβεί μοιραία.

Τα άτομα που έχουν μολυνθεί από *L. monocytogenes* ενδέχεται να εμφανίσουν συμπτώματα μέσα σε διάστημα λίγων ωρών ή ακόμα και σε 3 ημέρες, εφόσον έχει προηγηθεί η κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου. Οι πιο κρίσιμες μορφές λιστερίωσης μπορεί να εμφανισθούν από 3 ημέρες έως και 5 μήνες.

Εξαιτίας τους εύρους της σοβαρότητας της νόσου, τα άτομα θα πρέπει να συμβουλευτούν την παροχή υγειονομικής περίθαλψης, στην περίπτωση που εμφανίσουν συμπτώματα τα οποία μοιάζουν με λοίμωξη από *L. monocytogenes*. [37]

1.1.7 *Salmonella* spp.

Τα βακτήριο της *Salmonella* spp. είναι αρνητικό κατά Gram ευκίνητο, και ανήκει στην οικογένεια *Enterbacteriaceae*. Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι «δημιουργός» υδρόθειου, όξινης, με εύκολη προσαρμοστικότητα, ενδοκυτταρικός μικροοργανισμός που μπορεί να προκαλέσει συνήθως γαστρεντερίτιδα σε παγκόσμιο επίπεδο καθώς επίσης και διασταυρούμενη μόλυνση ανάμεσα σε άνθρωπο-ζώο. [6]



Εικόνα 9 Χρώση κατά Gram της *S. typhimurium* [154]

Η *Salmonella* spp. πήρε το όνομα της από τον Αμερικανό βακτηριολόγο D.E. Salmon, ο οποίος απομόνωσε για πρώτη φορά το 1884 το βακτήριο από το έντερο ενός χοίρου. Αρκετά ζώα είναι γνωστοί φορείς του βακτηρίου *Salmonella* spp.. Κοινό ζωικό φορέα αποτελούν τα κοτόπουλα, τα οποία καταναλώνονται ενώ δεν είναι άρτια μαγειρεμένα, με αποτέλεσμα να προκαλούν *Salmonella enteritidis*, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε φλεγμονώδη διάρροια. Επιπρόσθετα από τα βακτήρια *Salmonella* spp. μπορούν να

προκληθούν εστιακές λοιμώξεις σε άτομα με ανοσοκαταστολή. Σε παγκόσμιο επίπεδο υπάρχουν συνολικά 2.500 οροβάρια *Salmonella spp.*.

Το γένος *Salmonella spp.* διακρίνεται σε δυο είδη: *Salmonella enterica* και *Salmonella bongori*. Το *S. enterica* περιλαμβάνει τα εξής υποείδη:

- *Enterica* (υποείδος I),
- *salamae* (υποείδος II),
- *arizonae* (υποείδος IIIa),
- *diarizonae* (υποείδος IIIb),
- *houtenae* (υποείδος IV) και
- *indica* (υποείδος VI).

Το υποείδος I περιλαμβάνει τους περισσότερους ορότυπους, τα οποία είναι από τα πιο σημαντικά για την παθοφυσιολογία του ανθρώπου. Αναμεσα στα πιο κοινά οροβαρίδια συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων, τα οροβαρίδια *Salmonella enteritidis* και *Salmonella typhimurium*. Τα ορόβαρια της *Salmonella enteritidis* οδηγούν σε μη τυφοειδή σαλμονέλα (NTS), η οποία ανιχνεύεται σε ένα ευρύ φάσμα, κυρίως στα σπονδυλωτά ανάμεσα τους και ο άνθρωπος. Τέλος, η *Salmonella typhimurium* μπορεί να οδηγήσει σε τυφοειδή σαλμονέλα, με συνέπεια την εκδήλωση τυφοειδούς και παρατυφοειδούς πυρετού, οι οποίοι συνδυάζονται για να σχηματίσουν εντερικό πυρετό. [6]

Η σαλμονέλωση είναι μια ασθένεια που προκαλείται από το βακτήριο *Salmonella spp.*. Σύμφωνα με τα στοιχεία που απορρέουν από τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC), η συγκεκριμένη ασθένεια προκαλεί περίπου 1,4 εκατομμύρια περιπτώσεις τροφιμογενών ασθενειών και περισσότερους από 400 θανάτους κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες.

Υπάρχουν περιπτώσεις ασθενών, όπου η σαλμονέλωση δεν εμφανίζει συμπτώματα, υπάρχουν επίσης και περιστατικά που εμφανίζουν διάρροια, πυρετό και κοιλιακές κράμπες σε χρονικό διάστημα 8 έως 72 ωρών από την κατάποση μολυσμένου τροφίμου. Επιπλέον συμπτώματα που ενδέχεται να εμφανιστούν είναι ναυτία, ρίγη, πονοκέφαλος και εμετός. Τα συμπτώματα συνήθως υποχωρούν σε διάστημα εντός 4 έως 7 ημερών. Οι περισσότεροι άνθρωποι αναρρώνουν από τη σαλμονέλα χωρίς ίαση και ενδεχομένως να μην επισκεφθούν και γιατρό.

Πέρα από τα κοτόπουλα που όπως ήδη έχει αναφερθεί μέχρι τώρα αποτελούν το κοινό μέσο μετάδοσης της συγκεκριμένης λοίμωξης, η μετάδοση μπορεί να επιτευχθεί γενικά

από οποιοδήποτε ωμό τρόφιμο ζωικής προέλευσης, λ.χ., γαλακτοκομικά προϊόντα, αυγά, θαλασσινά καθώς και ορισμένα φρούτα και λαχανικά που μπορεί να φέρουν το βακτήριο της *Salmonella spp.* [129]

1.1.8 *Shigella spp.*

Το γένος *Shigella spp.* αποτελεί μέλος της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* και διαθέτει τέσσερις οροομάδες: [25]

- Ορότυπος A: *Shigella dysenteriae* (12 ορότυποι),
- Ορότυπος B: *Shigella flexneri* (6 ορότυποι),
- Ορότυπος C: *Shigella boydii* (23 ορότυποι) και
- Ορότυπος D: *Shigella sonnei* (1 ορότυπος).

Η *Shigella sonnei* μπορεί να διαφοροποιηθεί από άλλους ορότυπους με την έκφραση της ²αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης, σε αντίθεση με τους ορότυπους A, B και C, οι οποίοι δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν με κανένα βιοχημικό δείκτη. [18]



Εικόνα 10 Εξιδρώματα κοπράνων σε ασθενή με *Shigella*, γνωστή και ως *Shigella dysenteriae* [19]

Οι *Shigella spp.* είναι προαιρετικά αναερόβιοι αρνητικοί κατά Gram ράβδοι. Η ανάπτυξη τους ενδείκνυται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 6 έως 48° C με ιδιαίτερη προτίμηση στους 37° C. Η ιδανική ανάπτυξη πραγματοποιείται σε τιμές pH που βρίσκονται μεταξύ 6,0 έως 8,0, παρόλα αυτά έχει αναφερθεί και η ανάπτυξη τους σε τιμές pH που βρίσκονται μεταξύ 4,8 έως 9,3.

Τα είδη *Shigella spp.* που συσχετίζονται άμεσα με το *E. coli*, όσον αφορά την ομοιότητα του DNA τους, διαθέτουν μερικά κοινά βιοχημικά γνωρίσματα, καθώς

² Ένζυμο που καταλύουν την αποκαρβοξυλίωση.

επίσης και την ικανότητα αντίδρασης σε μερικά κοινά αντισώματα, ωστόσο, παρόλες αυτές τις ομοιότητες, η διάκρισή τους είναι κλινικά σημαντική. [25]

Η σιγκέλλωση είναι τροφιμογενής ή κυματογενής και αποτελεί μια μορφή βακτηριακής διάρροιας, η οποία προέρχεται από αρνητικά κατά Gram βακτήρια του είδους *Shigella spp.*. Αποτελεί ένα συχνό φαινόμενο στις αναπτυσσόμενες χώρες και αυτό οφείλεται κυρίως σε τρόφιμα που έχουν μολυνθεί, σε ανθυγιεινές συνθήκες ή ακόμα και στην άμεση επαφή από άτομο σε άτομο. Η *Shigella spp.* μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη σε όλες τις ηλικίες. Παρόλα αυτά στις ομάδες υψηλού κίνδυνου ανήκουν οι πολύ νέοι, τα άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό και οι ηλικιωμένοι.

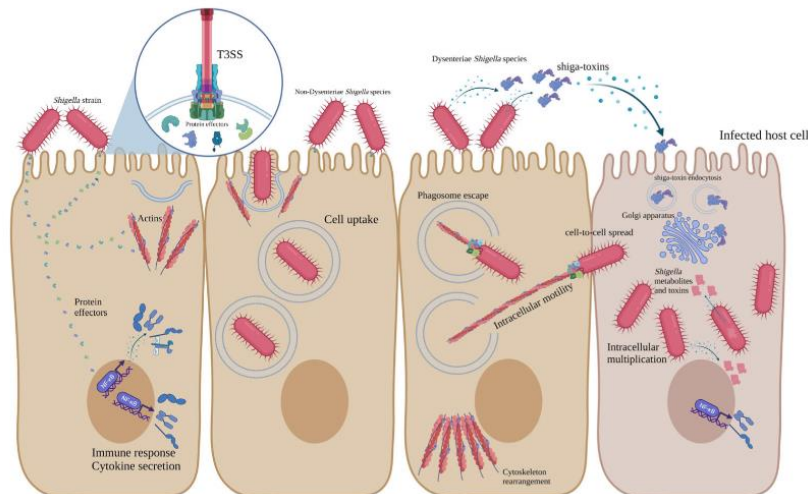
Γενικά, το είδος *Shigella spp.* φαίνεται να παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο οξύ που παράγει το στομάχι. Προκειμένου να προκληθεί η νόσος χρειάζονται ελάχιστοι οργανισμοί. Με την κατανάλωση του, πραγματοποιείται ο πολλαπλασιασμός στο λεπτό έντερο και εν συνεχεία εισέρχεται στο παχύ έντερο. Ακολουθεί στο παχύ έντερο η παραγωγή της εντεροτοξίνης *Shigella*.

Τα κλινικά συμπτώματα γίνονται αντιληπτά σε διάστημα εντός 12 ωρών ή ακόμα και 3 ημερών από τη στιγμή που έχει προηγηθεί η κατανάλωση του μέσω τροφής, με μέσο χρόνο επώασης 3 ημερών. Σε αυτά τα συμπτώματα ανήκουν ο υψηλός πυρετός, εμετός, διάχυτο κοιλιακό άλγος, ακολουθούμενο με αιματηρή βλεννώδη διάρροια.

Το εν λόγω παθογόνο βακτήριο έχει την ικανότητα να εξολοθρεύεται μόνο του σε χρονικό διάστημα 5 έως 7 ημέρες αφότου εκδηλωθούν τα πρώτα συμπτώματα.

Η *Shigella spp.* αποτελεί μια από τις πιο συχνές αιτίες διαρροϊκής νόσου σε ηλικιακές ομάδες παιδιών κάτω των πέντε ετών, στη Νοτιά Ασία και τη Σαχάρια Αφρική. Επιπλέον, η σιγκέλλωση αποτελεί συχνό φαινόμενο σε παιδικούς σταθμούς και χώρους φιλοξενίας στις Ηνωμένες Πολιτείες. [18]

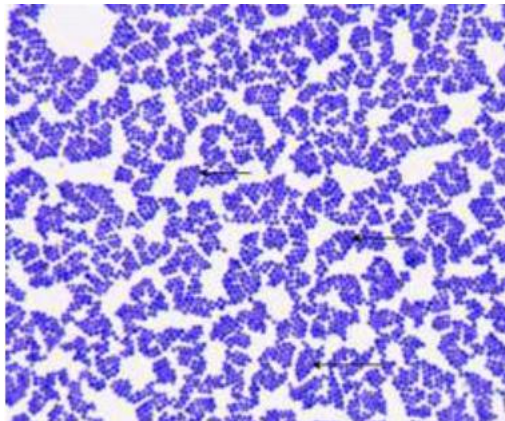
Αρκετά τρόφιμα μπορούν να μολυνθούν με *Shigella spp.*. Τα τρόφιμα στα οποία έχει εντοπιστεί το εν λόγω παθογόνο αποτελούν: οι γαρίδες, οι πατάτες, το κοτόπουλο, ο τόνος, τα ζυμαρικά, τα φρούτα, φέτες γαλοπούλας, φασόλια, μπάλες ρυζιού, ωμά στρείδια, αλλαντικά και γάλα. Η μόλυνση επιτυγχάνεται μέσω της κοπρανό-στοματικής οδού, αυτό συνεπάγεται ότι ένα τρόφιμο μπορεί αν έχει έρθει σε επαφή με μολυσμένο νερό ή να έχει υποστεί επεξεργασία υπό ανθυγιεινές συνθήκες. Κάθε τρόφιμο που υπόκειται σε κακό χειρισμό μπορεί να μολυνθεί και να μεταδώσει την ασθένεια. [132]



Εικόνα 11 Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας των μηχανισμών παθογένειας *dysenteriae* και *non dysenteriae* της *Shigella* [116]

1.1.9 *Staphylococcus aureus*

Οι *Staphylococcus aureus* είναι ακίνητοι, θετικοί κατά Gram κόκκοι, όπου μπορούν να εμφανιστούν μεμονωμένοι ή σε ζεύγη, σε τετράδες βραχείες αλυσίδες ή τις χαρακτηριστικές «σταφυλοειδείς» συστοιχίες. Οι σταφυλόκοκκοι προαιρετικοί αναερόβιοι, με μόνες εξαιρέσεις τους *S. saccharolyticus* και τον *S. aureus subsp. Anaerobius*, οι οποίοι αναπτύσσονται με μεγάλη ταχύτητα υπό αερόβιες συνθήκες.



Εικόνα 12 Χρώση Gram στελέχη του *S. aureus* [144]

Οι *Staphylococcus spp.* είναι αρκετά διαδεδομένοι στη φύση. Επίσης μπορούν να βρεθούν στο δέρμα και στους δερματικούς αδένες σε θηλαστικά και πτηνά. Εκτός σώματος ο *Staphylococcus aureus* μπορεί να επιζήσει για αρκετό χρονικό διάστημα σε ξηρές συνθήκες, γεγονός που τον καθιστά ένα από τα πιο ανθεκτικά παθογόνα καθώς έχει απομονωθεί από αρκετές περιβαλλοντικές πηγές μόλυνσης (αέρας, σκόνη, τα

λύματα και το νερό). Πέραν των περιβαλλοντικών πηγών που αναφέρθηκαν, πηγες μόλυνσης αποτελούν και ορισμένα τρόφιμα, λ.χ., μοσχαρίσιος κιμάς, χοιρινό λουκάνικο, κιμάς γαλοπούλας, μπριζόλες σολομού, γαρίδες, στρείδια, γάλα και σαλάτες τύπου *delicatessen*.

Η ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus*, εξαρτάται από το στέλεχος, με το εύρος των θερμοκρασιών να κυμαίνεται από 7° C έως 47,8° C, παράγοντας εντεροτοξίνες σε θερμοκρασιακό εύρος που κυμαίνεται από 10° C έως 46° C, αλλά επιθυμεί την ευνοϊκή θερμοκρασία μεταξύ 40° C και 45° C. Το βακτήριο μπορεί να αναπτυχθεί σε pH μεταξύ 4,5 και 9,3 με ιδανικότερο το pH μεταξύ 7,0 και 7,5. Επιπλέον, το εν λόγω παθογόνο παρουσιάζει ιδιαίτερη ανθεκτικότητα σε υψηλά ποσοστά αλατιού (>10% NaCl).

Για την παραγωγή εντεροτοξινών χρειάζεται ελάχιστο a_w (0,86), παρόλα αυτά η παραγωγή έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε a_w με τιμή 0,83.

Ο *Staphylococcus aureus* συνήθως προκαλεί λοιμώξεις που σχετίζονται με το δέρμα, όπως σπυράκια, κολπίτιδα καθώς και λοιμώξεις τραυμάτων μετεγχειρητικού σταδίου. Επιπρόσθετα, ενδείκνυται να αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα που συνδέεται με πιο σοβαρές λοιμώξεις όπως η βακτηριαιμία, πνευμονία, μηνιγγίτιδα κ.λπ.. Το σύνδρομο του τοξικού σοκ, αποτελεί μια κατάσταση που είναι παρόμοια με σηπτικό σοκ και απορρέει από την παραγωγή της τοξίνης 1 του συνδρόμου τοξικού σοκ, στην οποία έχει αποδοθεί η λοίμωξη από *S. aureus*. Ο άνθρωπος αποτελεί την κυριότερη «πηγή» για τον *S. aureus*.

Σημαντική πηγή μόλυνσης αποτελούν οι χειριστές τροφίμων, οι οποίοι φέρουν στα χεριά ή στη μύτη *S. aureus*, ο οποίος παράγει εντεροτοξίνη και θεωρείται η βασικότερη πηγή μόλυνσης των τροφίμων, μέσω αναπνευστικών εκκρίσεων ή χειρωνακτικής επαφής. Επιπρόσθετα, φορείς μετάδοσης του *S. aureus*, ενδείκνυται να είναι ο αέρας, η σκόνη καθώς και οι επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα. [12]

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων που σχετίζονται με περιστατικά τροφικής δηλητηρίασης προερχόμενη από σταφυλόκοκκο ανιχνεύεται κυρίως σε μόλυνση των τροφίμων κατά το στάδιο της προετοιμασίας εξαιτίας ανεπαρκούς ψύξης, μαγειρέματος, θέρμανσης ή ακόμα και στη μη ορθή προσωπική υγιεινή.

Μετά την κατανάλωση της εντεροτοξίνης, μεσολαβεί μια περίοδος επώασης λιγότερο των 6 έως 10 ωρών. Τα συμπτώματα εκδήλωσης μπορεί να περιλαμβάνουν εμετό,

ναυτία, πονοκέφαλο, ζάλη, ρίγη, κοιλιακές ή μυϊκές κράμπες, διάρροια που ενδέχεται να περιέχει αίμα, εφίδρωση και γενική αδυναμία.

Η ύπαρξη του *S. aureus* στα τρόφιμα δύναται να αποτελέσει κίνδυνο για τη δημοσία υγεία, εξαιτίας της ικανότητας του να παράγει εντεροτοξίνη καθώς και του κινδύνου της μετέπειτα τροφικής δηλητηρίασης.

Έχουν αναγνωρισθεί εννέα εντεροτοξίνες *S. aureus*, οι οποίες συμβολίζονται ως: A, B, C1, C2, C3, D, E, F και G. Οι τύποι A και D αποτελούν αιτιολογικό παράγοντα για την πλειοψηφία των κρουσμάτων. Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (ΣΕ) περιλαμβάνουν τις SEA και SEE, τις SEG έως SEI και τις SER έως SET οι οποίες ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια τοξινών, τις λεγόμενες πυρογενείς τοξίνες, οι οποίες έχουν την προνομιακή ικανότητα να ενεργούν ως υπεραντιγόνα, ενεργοποιώντας ένα αρκετά υψηλό ποσοστό T-κυττάρων. [25]

Όλες οι τοξίνες έχουν υπεραντιγονική ενεργότητα και μπορούν να κωδικοποιηθούν από επικουρικά γενετικά στοιχεία. Μεταξύ άλλων συγκαταλέγονται πλασμίδια, προφάγοι, νησίδες παθογένειας και γονιδιωματικές νησίδες. Οι ΣΕ αποτελούν κύρια αίτια τροφικής δηλητηρίασης, η οποία παρουσιάζεται από την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου. Η SEA αποτελεί έναν από τους συχνότερους αιτιολογικούς παράγοντες σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης σε παγκόσμιο επίπεδο. [12]

Η αδρανοποίηση τους καθίσταται εφικτή ιδιαίτερα με θερμότητα, αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι θερμοκρασίες που χρειάζονται προκειμένου να αδρανοποιηθούν είναι πιο υψηλές από αυτές που χρειάζονται για τη νέκρωση του οργανισμού. [25]

Συνήθως η ασθένεια είναι αυτοπεριοριζόμενη και υποχωρεί σε διάστημα εντός 24-48 ωρών από τη στιγμή της εκδήλωσης της. Κατά περιόδους φαίνεται αρκετά σοβαρή, δικαιολογώντας και τη νοσηλεία σε νοσοκομεία, κυρίως όταν πρόκειται για βρέφη ή άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. [12]

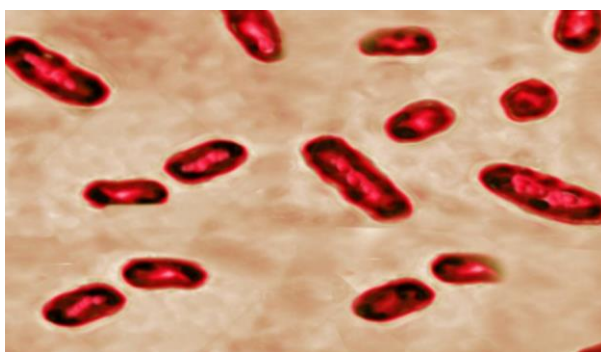
Σύμφωνα με στοιχεία που απορρέουν από το CDC εκτιμάται ότι στις ΗΠΑ η σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση (SFP) προκαλεί περίπου 241.188 περιστατικά, 1.064 νοσηλείες και 6 θανάτους ετησίως. [25]

1.1.10 *Yersinia enterocolitita*

Η *Yersinia enterocolitita* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο με σχήμα βάκιλου και είναι υπεύθυνο για τη μολυσματική ασθένεια που ονομάζεται γερσινίωση (yersiniosis).

Οι *Yersinia* μπορούν να διακριθούν ανάλογα με το φαινότυπο και τον ορότυπο τους. Σε φαινοτυπικό επίπεδο τα συγκεκριμένα «ζωύφια» διακρίνονται σε έξι βιοομάδες εκ των οποίων οι πέντε χαρακτηρίζονται ως παθογόνα. Ανάλογα με τον ορότυπο το συγκεκριμένο παθογόνο μπορεί να διακριθεί σε περισσότερες από 57 οροομάδες. Παρόλα αυτά μόνο κάποιες από αυτές είναι παθογόνες. Πιο συγκεκριμένα στους παθογόνους ορότυπους ανήκουν οι O:3 (βιοομάδα 4), O:5,27 (βιοομάδες 2 και 3), O:8 (βιοομάδα 1B) και O:9 (βιοομάδα 2), με τη πιο συχνή οροομάδα που έχει απομονωθεί από πληθυσμούς σε χώρες της Ευρώπης να είναι η O:3 και η O:9. Αντίστοιχα στις Ηνωμένες Πολιτείες η οροομάδα O:8 είναι αυτή με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης.

Η εν λόγω τροφιμογενής λοίμωξη μπορεί αρχικά να εκδηλωθεί ως οξεία διάρροια, μεσεντέριος αδενίτιδα, τελική ειλεΐτιδα και οξεία πυώδης αμυγδαλίτιδα. Σπανιότερα μπορεί να οδηγήσει και στη σήψη. Παρόλο που η πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι σπάνιες, οι μεγάλες επιδημίες αποτελούν συχνό φαινόμενο. Οι άνθρωποι μπορούν να νοσήσουν από *Yersinia* μετά από την μετάγγιση αίματος ή από την κατανάλωση τροφίμων. [20]



Εικόνα 13 Χρώση Gram *Y. enterocolitida* [25]

Το κύριο γνώρισμα της γερσινίας είναι ότι το άτομο δε σταματά να αποβάλλει τον εν λόγω μικροοργανισμό στα κόπρανα του για ένα χρονικό διάστημα σχεδόν 3 μηνών, μετά την υποχώρηση των συμπτωμάτων. Συμπερασματικά, προκύπτει ότι ο προσδιορισμός της *Yersinia* στα κόπρανα είναι σημαντικός. Το γένος *Yersinia* συγκαταλέγει 11 είδη, από τα οποία τα τρία είναι αυτά (*Yersinia pestis*, *Yersinia*

enterocolitida και *Yersinia pseudotuberculosis*) που ενοχοποιούνται για την πρόκληση ανθρώπινων λοιμώξεων.

Προκειμένου να υπάρχει μια ορθή ενημέρωση για τις λοιμώξεις που οφείλονται στο εν λόγω παθογόνο, ερευνητές απομόνωσαν από διαφορά ζώα την *Yersinia enterocolitida*.

Η μελέτη έδειξε ότι οι χοίροι αποτελούν την πιο κοινή πηγή, με το παθογόνο να έχει τη δυνατότητα εξάπλωσης από τον ένα χοίρο στον άλλο. Το εν λόγω μικρόβιο μπορεί να μολύνει και προϊόντα χοιρινού κρέατος, σε αυτά περιλαμβάνονται τα κομμάτια λαιμού, γλώσσας και άλλων κομματιών κρέατος που μπορεί να εξαπλωθεί με τη σφαγή. [20]

Η γερσινίωση είναι μια ασθένεια που συχνά προκαλείται από την πρόσληψη ωμού ή ελλιπώς μαγειρεμένου χοιρινού κρέατος, το οποίο έχει μολυνθεί με το εν λόγω βακτήριο. Το CDC υπολογίζει ότι το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο ευθύνεται για περίπου 117.00 νόσους, 640 νοσηλείες και 35 νεκρούς στις ΗΠΑ ετησίως. Τα παιδιά μολύνονται πιο συχνά από ότι οι ενήλικες, με τη μόλυνση να είναι πιο συνηθισμένη το χειμώνα.

Συνήθως τα συμπτώματα εμφανίζονται 4 έως 7 ημέρες από την έναρξη της έκθεσης και η διάρκεια τους μπορεί να κυμαίνεται από 1 έως 3 εβδομάδες ή να διαρκέσει και περισσότερο. Οι επιπλοκές που μπορεί να εμφανιστούν σπάνια, περιλαμβάνουν δερματικό εξάνθημα, πόνους στις αρθρώσεις ή ακόμα και εξάπλωση των βακτηρίων στην κυκλοφορία του αίματος. [33]

1.2 Παθογόνοι Ιοί

Οι ιοί είναι από τη φύση τους σωματιδιακοί και έχουν την ικανότητα αναπαραγωγής μόνο σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς. Ως εκ τούτου, είναι ανίκανοι να επιζήσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα έξω από τον ξενιστή. Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχουν περισσότερα από 100 είδη εντερικών ιών προκαλώντας, τροφιμογενείς ασθένειες. Οι πιο γνωστοί παθογόνοι ιοί που προκαλούνται από τρόφιμα είναι οι νοροϊοί και η ηπατίτιδα Α. Οι συγκεκριμένοι ιοί μπορούν να μεταδοθούν από κατηγορίες τροφίμων όπως: δίθυρα μαλάκια, μύδια, στρείδια, τα οποία είναι ιδιαιτέρως επιρρεπή στη διασπορά ιών. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι τα νερά στα οποία αναπτύσσονται υφίστανται ολοένα και περισσότερη μόλυνση από τα ανθρώπινα περιττώματα, ενίοτε από τις απορρίψεις των λυμάτων και άλλοτε από τους μολυσμένους αλιείς οστρακοειδών.

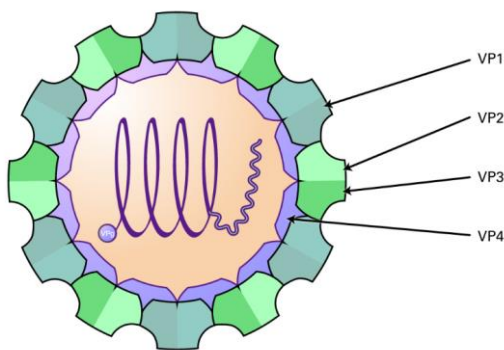
Τα οστρακοειδή μπορούν να συλλέγουν ιούς στο πλαίσιο της δραστηριότητάς τους και να τροφοδοτούνται με φίλτρο. Οι ιοί του ανθρώπου δε προσβάλλουν τα εν λόγω είδη, αλλά παραμένουν για ένα χρονικό διάστημα (ημερών ή εβδομάδων) στον πεπτικό σωλήνα των οστρακοειδών και σαφέστατα καθίσταται δύσκολη η απομάκρυνση τους συγκριτικά με τα βακτήρια στα πλαίσια της διαδικασίας καθαρισμού των οστρακοειδών. Συγκριτικά με άλλα θαλασσινά τα οστρακοειδή καταναλώνονται κατά βάση με τον πεπτικό τους σωλήνα στη θέση του, μπορούν επίσης να καταναλωθούν ωμά ή ελαφρώς μαγειρεμένα. Μια άλλη ιδιότητα των οστρακοειδών, σε σχέση με άλλα τρόφιμα είναι ότι μπορούν να προστατεύουν τους ιούς από τη θερμοαδρανοποίηση κατά το μαγείρεμα. [25]

1.2.1 Ηπατίτιδα Α (HAV)

Τα στελέχη του ιού της ηπατίτιδας Α είναι περιβαλλοντικά ανθεκτικοί οργανισμοί και η μετάδοση τους ενδείκνυται μέσω μολυσμένων τροφίμων, νερού καθώς και περιβαλλοντικών επιφανειών, π.χ. μολυσμένες επιφάνειες τραπεζιών, καθώς και από την άμεση ή έμμεση επαφή από το ένα άτομο σε άλλο άτομο. Η ηπατίτιδα Α δεν έχει την ικανότητα ανάπτυξης στο περιβάλλον, εντούτοις όμως οι οργανισμοί αυτοί εμφανίζουν μια εξαιρετική σταθερότητα σε ένα ευρύτερο πλαίσιο περιβαλλοντικών καταστάσεων, όπως η ξήρανση, η κατάψυξη, η θερμότητα και οι χημικές ουσίες.

Παρά το γεγονός ότι η ηπατίτιδα Α έχει ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά με άλλα γένη της οικογένειας των *Picornavirus*, έχει αρκετές διαφορές και για το λόγο αυτό ταξινομείται ως το ένα και μοναδικό είδος του γένους *Hepatovirus*. Διακρίνονται έξι γονότυποι της ηπατίτιδας Α (I-IV), όπως καθορίζονται και από την αλληλουχία RNA. Πιο συγκεκριμένα οι γονότυποι I, II και III περιλαμβάνουν στελέχη που συνδέονται με ανθρώπινες λοιμώξεις, με την πλειοψηφία των ανθρωπίνων στελεχών να εντάσσονται στους γονοτύπους I και III.

Ο ιός αποτελείται από μονόκλωνο θετικό RNA γονιδίωμα με περίπου 7,5 χιλιοβάσεις και είναι μη περιτυλιγμένος (δηλαδή απουσία φακέλου που περιέχει λιπίδια). Είναι υδρόφοβος ιός και το μέγεθος του κυμαίνεται από 22 έως 30 nm.



Εικόνα 14 Απεικόνιση πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας Α [71]

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα οι εν λόγω ιοί περιέχουν ένα εικοσαεδρικό καψίδιο, το οποίο αποτελείται από τέσσερις πρωτεΐνες:

- VP1-4 που περιβάλλουν το γονιδίωμα RNA, 6-10kb,
- VP1-3 που βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά του καψιδίου και η
- VP4 που εντοπίζεται εσωτερικά.

Το γονιδίωμα αποτελείται από ένα μόνο ORF, το οποίο κωδικοποιεί τρεις ομάδες πρωτεϊνών στην περιοχή P1, το οποίο με τη σειρά του κωδικοποιεί τα δομικά πολυπεπτίδια (L και VP1-3), καθώς επίσης και τις περιοχές P2 (2A, 2B και 2C) και P3 (3A, VPg, 3Cpro και RdRp), που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του. Επιπρόσθετα, ο ιός περιέχει μια μακρά UTR στο 5' άκρο του, το οποίο με τη σειρά του περιέχει μια εσωτερική θέση εισχώρησης στο ριβόσωμα, που καθιστά εφικτή την άμεση μετάφραση της πολυπρωτεΐνης. Επίσης διαθέτει και μια μικρότερη 3' UTR, η οποία είναι σημαντική για το σχηματισμό της αρνητικής αλυσίδας RNA. Όταν ο ιός προσκολληθεί στους υποδοχείς του ξενιστή και εισχωρήσει μέσω της ενδοκυττάρωσης, η πρωτεΐνη VP4 δημιουργεί έναν πόρο στην ενδοσωμική μεμβράνη του ξενιστή, αυτό επιτρέπει στο γονιδιωματικό RNA να εισχωρεί στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. [71]

Η μετάδοση του ιού της HAV μπορεί να συμβεί μέσω της κοπρανό-στοματικής οδού καθώς και μέσω διάφορων τροφίμων. Κάποια από αυτά τα τρόφιμα που ενδέχεται να μεταδίδουν τον ιό HAV μπορεί να είναι:

- Φρέσκα φρούτα και λαχανικά: Σε περίπτωση που δεν πλυθούν σωστά ή έρθουν σε επαφή με μολυσμένο νερό ενδέχεται να μεταδώσουν τον ιό.
- Κατεψυγμένος χυμός πορτοκαλιού: Αυτό μπορεί να συμβεί στην περίπτωση που δεν έχει υποστεί ορθή επεξεργασία προκειμένου να εξαλειφθεί ο ιός.

- Οστρακοειδή: Η μόλυνση τους μπορεί να προκληθεί από μολυσμένα νερά και να προκαλέσουν μόλυνση σε περίπτωση που καταναλωθούν ωμά ή ατελώς μαγειρεμένα. [131]

Η ενδημικότητα του ιού της HAV διαφέρει ανά περιοχή και χώρα. Κάποιες ευρωπαϊκές χώρες ενδέχεται να έχουν χαμηλή ενδημικότητα του εν λόγω ιού και αυτό οφείλεται στην υψηλή κάλυψη με εμβόλια ενάντια του ιού καθώς και στις καλές συνθήκες υγιεινής και διατροφής. Η μόλυνση από τον ιό HAV μπορεί να πραγματοποιηθεί σε οποιαδήποτε χώρα, ιδιαίτερα αν οι άνθρωποι έρθουν σε επαφή με μολυσμένη τροφή ή νερό.

Οι σαλάτες με πράσινα φύλλα, τα μούρα και τα δίθυρα μαλάκια -τα οποία καταναλώνονται συχνότερα χωρίς να έχουν υποστεί κάποια επεξεργασία- αποτελούν τις πιο κοινές τροφικές πηγές που σχετίζονται με περιστατικά HAV. Επιπρόσθετα, τα έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα, τα οποία μπορεί να έχουν μολυνθεί από τον χειριστή τροφίμων ή από κάποιο μολυσμένο συστατικό που έχει χρησιμοποιηθεί (π.χ. μούρα σε γλυκό), ενδέχεται να προκαλέσουν επιδημίες. [109]

Η εμφάνιση των συμπτωμάτων της HAV συνήθως συμβαίνει σε διάστημα 15 έως 50 ημερών αφότου έχει μολυνθεί το άτομο. Η εν λόγω ασθένεια μπορεί να χαρακτηριστεί από ηπία της οποίας η διάρκεια να κυμαίνεται από 1 έως 2 εβδομάδες ή σοβαρή ασθένεια και να διαρκέσει ακόμα και μήνες. Τα συμπτώματα που μπορεί να εμφανίσει ο ασθενής μπορεί να είναι: πυρετός, απώλεια όρεξης, κόπωση, ναυτία ή εμετός, διάρροια, κιτρίνισμα του δέρματος, σκουρόχρωμα ούρα ή ανοιχτόχρωμα κόπρανα. Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες άτομα με λοίμωξη από HAV δεν εμφανίζουν κανένα από τα προαναφερθέντα συμπτώματα, αυτό συμβαίνει κυρίως σε παιδιά. Οι επιπλοκές είναι σπάνιες, γενικότερα ενδέχεται να συμβούν σε ηλικιωμένους και άτομα με ηπατική ανεπάρκεια. [70]

1.2.2 Νοροϊοί

Μια άλλη κατηγορία ιών αποτελούν οι νοροϊοί, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την πλειοψηφία των περιπτώσεων σε παγκόσμιο επίπεδο που αφορούν σε οξεία ιογενή γαστρεντερίτιδα, καθώς καταγράφονται περίπου 5,4 εκατομμύρια περιστατικά τροφιμογενών ασθενειών στις ΗΠΑ. Σύμφωνα με στοιχεία που προκύπτουν από τον ΠΟΥ, ο νοροϊός αποτελεί πλέον την πρωταρχική αιτία οξείας γαστρεντερίτιδας σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών.

Οι νοροϊοί είναι μη περιτυλιγμένοι ιοί, οι οποίοι έχουν διάμετρο 30-35 nm και γονιδίωμα μονόκλωνου RNA, περίπου 7,5 kb. Οι συγκεκριμένοι ιοί εμφανίζουν εξαιρετική ποικιλομορφία έχουν ταξινομηθεί σε έξι ομάδες γονιδίων, εκ των οποίων μόνο τρεις είναι υπεύθυνες για τις ανθρώπινες λοιμώξεις. Μέσα σε αυτές τις γονιδιακές ομάδες μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί 30 γονότυποι. [25]

Οι νοροϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Caliciviridae*, το όνομα του οφείλεται στις κυπελλοειδείς κοιλότητες που διαθέτει και είναι στο καψίδιο μέσα από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Είναι ένας από τους κύριους παράγοντες των γαστρεντερικών λοιμώξεων παγκοσμίως και είναι γνωστός για την ικανότητά του να προκαλεί γρήγορη διάρροια και έμετο. [96]

Οι νεότερες διαγνωστικές βελτιώσεις επιτρέπουν στους ερευνητές να προσδιορίσουν τη μεγάλη συμβολή του άκρως μολυσματικού ιού RNA στην επίπτωση των τροφιμογενών νόσων, κυρίως ως αιτιολογικός παράγοντας πολυάριθμων περιστατικών που σχετίζονται με τροφιμογενείς ασθένειες σε χώρους με αρκετό κόσμο όπως νοσοκομεία, γηροκομεία, κρουαζιερόπλοια, κ.λπ.. Ο συνηθέστερος τρόπος μετάδοσης είναι μέσω της κοπρανό-στοματικής εξάπλωσης. Οι δυνατότητες του ιού να ανταποκρίνεται σε ένα εύρος θερμοκρασιών (από τους 60° C έως την κατάψυξη) και να παραμένει σε επιφάνειες του περιβάλλοντος και στα τρόφιμα που συντελούν στη ταχύρρυθμη διασπορά του, κυρίως μέσω δευτερογενούς εξάπλωσης (π.χ. μέσω χειριστών τροφίμων).

Η μόλυνση των τροφίμων μπορεί να γίνει μέσω μολυσμένου νερού ή κατά το στάδιο της προετοιμασίας του. Η προφύλαξη από την εν λόγω λοίμωξη είναι δυσχερής καθώς οι συγκεκριμένοι ιοί μπορούν να παραμείνουν στις επιφάνειες του περιβάλλοντος και σε διαφορά είδη διατροφής. Κατά την τελευταία δεκαετία η σύγκριση των αλληλουχιών του νοροϊού που συλλέχθηκαν παγκοσμίως έχει εγείρει την πιθανότητα ότι τα στελέχη του νοροϊού που σχετίζονται με την επιδημία μπορούν να μεταδοθούν μέσα από τρόφιμα που διατίθενται διεθνώς ή ακόμα και μέσω επαφής από άτομο σε άτομο, στην περίπτωση που οι ταξιδιώτες μεταφέρουν τον ιό. [25]

Ο νοροϊός αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες διάρροιας και εμετού, καθώς και τροφιμογενών λοιμώξεων παγκοσμίως. Είναι γνωστός για την εύκολη και ταχύτατη εξάπλωση του, καθώς επίσης και για το γεγονός ότι μπορεί να προκαλέσει ασθένεια σε όλες τις ηλικίες. Οι εξάρσεις νοροϊού συχνά εκδηλώνονται σε χώρους όπου οι

άνθρωποι έρχονται σε επαφή με κοινές επιφάνειες ή καταναλώνουν μολυσμένα τρόφιμα.

Τα πιο κοινά συμπτώματα νοροϊού περιλαμβάνουν: διάρροια, εμετό, ναυτία, πόνο στη στομαχική περιοχή, πυρετό, πονοκέφαλο και πόνοι στο σώμα.

Ο νοροϊός μπορεί να εκδηλωθεί με έντονα συμπτώματα όπως εμετό και διάρροια, τα οποία εμφανίζονται συνήθως μετά από 12 έως 48 ώρες μετά την έκθεση στον ιό. Τα συμπτώματα υποχωρούν υστέρα από 1 έως 3 ημέρες, ωστόσο συνεχίζουν να αποτελούν φορείς μετάδοσης. [39]

Τα περιστατικά νοροϊού μπορούν να προκληθούν από τρόφιμα που έχουν μολυνθεί στο αγρόκτημα ή στη πηγή, π.χ. τα στρείδια που έχουν συλλεχθεί από μολυσμένο νερό, φρούτα ή λαχανικά που ψεκάζονται με μολυσμένο νερό στα κτήματα. Τα τρόφιμα που συχνά αποτελούν αιτιολογικό παράγοντα είναι: τα φυλλώδη λαχανικά (κυρίως τα μαρούλι), φρέσκα φρούτα και τα οστρακοειδή (όπως στρείδια). [43]

1.3 Παθογόνα Παράσιτα

Τα παράσιτα είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί χωρίς σκληρό κυτταρικό τοίχωμα και διαθέτουν έναν οργανωμένο πυρήνα. Συγκριτικά με τα βακτήρια τα παράσιτα είναι μεγαλύτερα. Τα παράσιτα δεν πολλαπλασιάζονται στα τρόφιμα, παρά μόνο στους ξενιστές, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τους ιούς. Η μορφή μετάδοσης αυτών των οργανισμών καλείται κύστη. Συγκεκριμένα, τα παράσιτα είναι οργανισμοί που εξασφαλίζουν τροφή και προστασία μέσω άλλων ζωντανών οργανισμών, που είναι γνωστοί ως ξενιστές.

Η μετάδοση τους καθίσταται εφικτή από τα ζώα στον άνθρωπο ή και το αντίστροφο. Πλήθος παρασίτων έχουν αποδειχθεί ως ένας σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας τροφιμογενών και υδατογενών νόσων. Οι οργανισμοί αυτοί διαβιούν και πολλαπλασιάζονται εντός των ιστών και τα όργανα που ανήκουν σε μολυσμένους ξενιστές (ανθρώπων και ζώων), συχνά αποβάλλονται με τα κόπρανα. Σημαντικά τροφιμογενή παράσιτα που ευθύνονται για τροφιμογενείς λοιμώξεις αποτελούν το *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* και το *Trichinella spiralis*. [25]

1.3.1 *Cyclospora cayetanensis*

Τα *Cyclospora cayetanensis* είναι παράσιτα πρωτόζωα και ανήκουν στην οικογένεια των *Eimeriidae*. Ο χώρος που διαβιούν είναι το λεπτό έντερο, όπου και περνούν τα

ενδιάμεσα στάδια του βιολογικού τους κύκλου στο κυτταρόπλασμα των εντερικών κυττάρων. Το μέσο συνολικό μήκος του γονιδιώματος ανέρχεται στα 44,2991 Mb. [25]

Η ασθένεια που μπορεί να προκληθεί από το *Cyclospora cayetanensis* ονομάζεται κυκλοσπορίαση. [66]

Το *Cyclospora cayetanensis* αποτελεί ένα σπορογόνο πρωτοζωικό παράσιτο που προσβάλλει το ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου όπως ήδη έχει αναφερθεί. Έχει αναγνωρισθεί ως παθογόνο όπου η μετάδοση του μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο μέσω τροφίμων όσο και μέσω νερού και είναι ενδημικό στη πλειοψηφία των αναπτυσσόμενων χωρών. Επιπλέον αποτελεί σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα για διάρροιες ταξιδιωτών στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η λοίμωξη που προκαλείται από το εν λόγω παράσιτο, έχει συσχετιστεί με τα ακόλουθα, όπως είναι το σύνδρομο Guillain-Barre, το σύνδρομο αντιδραστικής αρθρίτιδας (ή σύνδρομο Reiter) και η ακανθώδης χολοκυστίτιδα. [135]

Το *Cyclospora cayetanensis*, αποτελεί ένα παθογόνο κοκκίδιο, που συναντάται στον άνθρωπο. Η κυκλοσπορίαση μπορεί να χαρακτηριστεί από ήπια έως με την εκδήλωση σοβαρής ναυτίας, κοιλιακές κράμπες, υδαρής διάρροια και ανορεξία. Οι τρόποι μετάδοσης δεν είναι ακόμα γνωστοί, παρόλα αυτά κυριότερη πιθανότητα φαίνεται να είναι η κοπρανό-στοματική οδός.

Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί ότι οι ωοκύστες στην απέκκριση τους από τα κόπρανα δεν σποροποιούνται και προκειμένου να καθίσταται εφικτή η μόλυνση χρειάζονται σποροποιημένες ωοκύστες. Πιο αναλυτικά, μια σποροποιημένη ωοκύστη μπορεί να διαθέτει δυο σποροκύστες και αντίστοιχα κάθε σποροκύστη να περιέχει δυο σποροζωίτες. Με την μετέπειτα αποβολή των ωοκύστεων, χρειάζονται 7 έως 15 ημέρες για την έναρξη της σπορογένεσης. Ο άνθρωπος αποτελεί το μοναδικό ξενιστή για αυτό το παράσιτο. [115]

Το συγκεκριμένο παράσιτο μπορεί να εντοπιστεί στο έδαφος, το νερό, τα τρόφιμα καθώς και σε επιφάνειες που έχουν μολυνθεί με περιττώματα από μολυσμένα ζώα ή ανθρώπους.

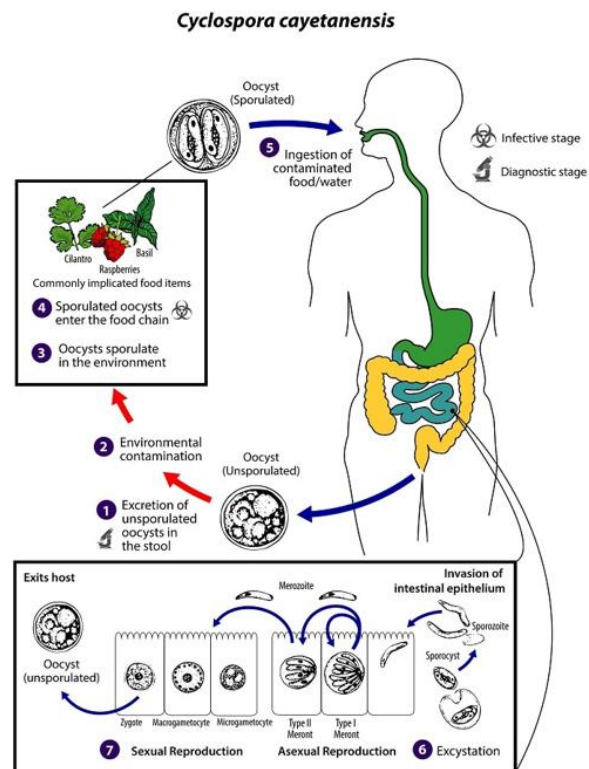
Οι άνθρωποι ενδέχεται να προσληφθούν από κυκλοσπορίαση μέσω κατανάλωσης τροφίμων ή νερού, τα οποία έχουν μολυνθεί με ωοκύστες, όπου είναι και το ανθεκτικό στο περιβάλλον στάδιο του οργανισμού και στη συνέχεια αποβάλλονται στα κόπρανα

του ξενιστή, τοποθετώντας στο στόμα οτιδήποτε έχει έρθει σε σωματική επαφή με περιττώματα ανθρώπου ή ζώου με κυκλοσπορίαση.

Η κυκλοσπορίαση μπορεί να είναι είτε συμπτωματική είτε ασυμπτωματική. Τα συμπτώματα που μπορεί να εκδηλώσει ο ασθενής περιλαμβάνουν: υδαρή διάρροια, κράμπες στο στομάχι, ελαφρύ πυρετό και στομαχικές διαταραχές.

Τα συμπτώματα συνήθως εμφανίζονται μετά από 2 έως 10 ημέρες, μετά την κατανάλωση των ωοκύστεων του εν λόγω παθογόνου. Η νόσος συνήθως υποχωρεί χωρίς ιατρική παρέμβαση σε χρονικό διάστημα 3 έως 4 ημερών. Στους υγιείς ανθρώπους τα συμπτώματα μπορεί να διαρκέσουν έως και 2 εβδομάδες. Άτομα που ανήκουν σε ευπαθείς ομάδες, π.χ. άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως άτομα που πάσχουν από HIV/AIDS η κυκλοσπορίαση μπορεί να είναι σοβαρή. [117]

Τις δυο τελευταίες δεκαετίες, ο υψηλός αριθμός τροφιμογενών περιστατικών έχει συνδεθεί με την κατανάλωση φρέσκων προϊόντων τα οποία καθίσταται δύσκολο να καθαριστούν με λεπτομερή τρόπο και καταναλώνονται χωρίς να έχουν υποστεί κάποια επεξεργασία. Τα περισσότερα περιστατικά κυκλοσπορίας, συνδέονται κυρίως με την κατανάλωση έτοιμων προς κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών. [66]



Εικόνα 15 Κύκλος ζωής *C. cayetanensis* [36]

1.3.2 Toxoplasma gondii

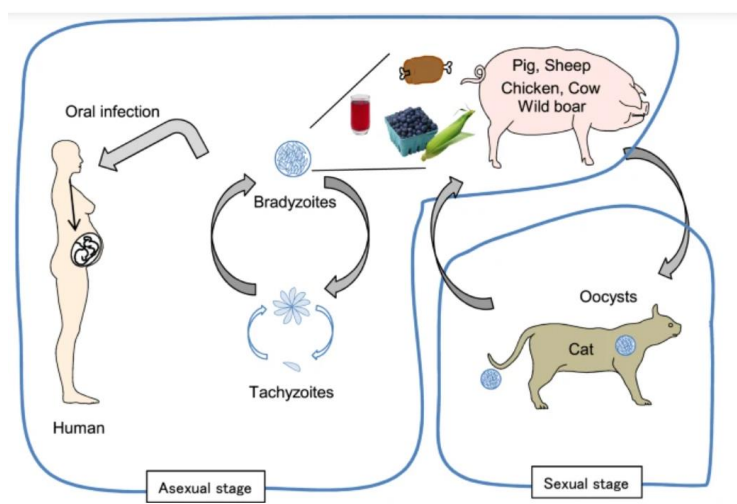
Το *Toxoplasma gondii* αποτελεί ένα πρωτοζωικό παράσιτο και είναι μέλος του φύλου *Apicomplexa*, αποτελεί ένα υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό παθογόνο και θεωρείται ως ο γενεσιουργός παράγοντας της τοξοπλάσμωσης στον ανθρώπινο οργανισμό.

Η «λειτουργία» του *T. gondii* έγκειται στο γεγονός ότι χρησιμοποιεί τις γάτες ως την κύρια αποθήκη και οποιοδήποτε θερμόαιμο ζώο ως μεσολαβητή ξενιστή. Το εν λόγω πρωτόζωο περιλαμβάνει τρεις κύκλους ζωής: ταχυζωίτες, βραδυζωίτες ή σποροζωίτες.

Στους σωματικούς ιστούς εμφανίζονται οι ταχυζωίτες και οι βραδυζωίτες. Οι ταχυζωίτες έχουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και καταστροφής των μολυσμένων κυττάρων του ξενιστή, ενώ οι βραδυζωίτες μπορούν και πολλαπλασιάζονται μέσα σε κύστες ιστών. Οι σποροζωίτες απεκκρίνονται, μέσα σε ωκύστες, στα περιττώματα της γάτας, όπου και σποροποιούνται σε ένα χρονικό διάστημα μετά από 1 έως 5 μέρες. Έχουν την δυνατότητα επιβίωσης για μήνες και παράλληλα αξιοποιώντας τη δυνατότητα τους να αντιστέκονται στα αντισηπτικά, στην ψύξη και την ξήρανση. Το μέσο ολικό μήκος του γονιδιώματος είναι 64,1936 Mb.

Στην περίπτωση των ανθρώπων, το *T. gondii* μπορεί να μεταδοθεί με διάφορους τρόπους: μέσω κατάποσης μολυσμένων τροφίμων ή νερού, που εμπεριέχει την ωοκύστη, μετάγγιση μολυσμένου αίματος, μεταμόσχευση οργάνων κ.λπ.. Οι μολύνσεις από *T. gondii* προέρχονται κυρίως από την κατανάλωση κύστεων από ωμό ή ελλιπώς μαγειρεμένο κρέας, με κυριότερες πηγές να αφορούν το χοιρινό και το μοσχαρίσιο κρέας.

Η τοξοπλάσμωση μπορεί να προέλθει από την κατανάλωση έως και 100 ιστικών κύστεων ή ωοκύστεων, με αποτέλεσμα τα τοιχώματα των κύστεων να διασπώνται και να απελευθερώνουν σποροζωίτες ή βραδυζωίτες. Οι οποίοι διέρχονται διαμέσου του εντερικού επιθήλιου και διαχέονται σε όλο το σώμα. Οι σποροζωίτες και οι βραδυζωίτες μετατρέπονται σε ταχυζωίτες και ξεκινούν τον πολλαπλασιασμό τους με ταχύτατους ενδοκυτταρικούς ρυθμούς. Στην περίπτωση θανάτου των κυττάρων του ξενιστή, οι ταχυζωίτες εισέρχονται σε γειτονικά κύτταρα και επαναλαμβάνουν τη διαδικασία πολλαπλασιασμού. Τα συμπτώματα της τοξοπλάσμωσης είναι ο πυρετός, ο μυϊκός πόνος και το οίδημα των λεμφαδένων, τα οποία ενδέχεται να διαρκούν για μεγάλο χρονικό διάστημα (παραπάνω από ένα μηνά). [25]

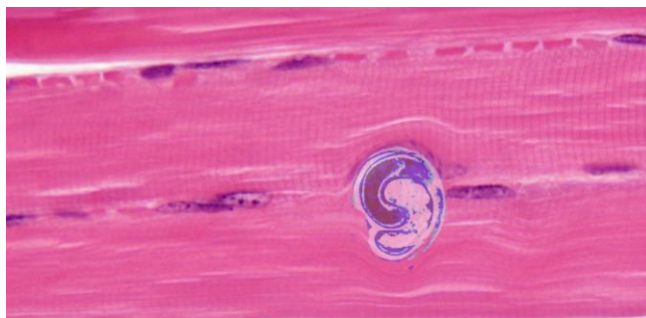


Εικόνα 16 Κύκλος ζωής του *T. gondii*. Κατά τη μόλυνση της τα αιλουροειδή αποβάλλουν στο περιβάλλον ωοκύστες μέσω των κοπράνων, εν συνεχεία οι ωοκύστες μολύνουν το νερό, τα φρούτα, τα λαχανικά, το έδαφος και μπορούν να προσληφθούν εύκολα τόσο από τον άνθρωπο όσο και από άλλους ξενιστές [54]

1.3.3 *Trichinella spiralis*

Η *Trichinella spiralis* είναι ένα νηματώδες παράσιτο (στρόγγυλο σκουλήκι) και έχει τη δυνατότητα να μολύνει ένα μεγάλο φάσμα από θηλαστικά. Στην κατηγορία αυτή

ανήκουν, οι χοίροι, τα άλογα, τα πτηνά και τα ερπετά. Παρόλα αυτά το συγκεκριμένο είδος παρασίτων μπορεί να προκαλέσει ασθένεια μόνο στον άνθρωπο.



Εικόνα 17 *Trichinella spiralis* στο σκελετικό μυ

Αυτό καθίσταται εφικτό μέσα από την κατανάλωση ακατάλληλα μαγειρεμένου ωμού χοιρινού, αλόγου ή άλλο είδος κρέατος προερχόμενο από οικόσιτα ζώα, καθώς επίσης και από κρέας άγριων ζώων, όπως είναι η αρκούδα. Αυτό έχει σαν συνέπεια οι άνθρωποι να αποκτούν τη μόλυνση. Επιπρόσθετα, ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι η απόκτηση της περιστασιακής νόσου μπορεί να είναι δυνατή με την κατανάλωση κρέατος από ερπετά, όπως σαύρες και χελώνες.

Η τριχινέλλωση απαντάται σε παγκόσμιο επίπεδο και κάθε χρόνο εκτιμάται ότι παρουσιάζονται περίπου 10.000 περιπτώσεις. Τα περιστατικά συνήθως εμφανίζονται σε ομάδες ανθρώπων, που έχει προηγηθεί η λήψη μολυσμένου κρέατος από το ίδιο ζώο. Μέχρι στιγμής έχουν προσδιοριστεί εννέα είδη τριχινέλλας και υπάρχουν αναφορές για δώδεκα γονότυπους. Το πιο συνηθισμένο είδος τριχινέλλας που ενοχοποιείται για τις ανθρώπινες ασθένειες φαίνεται να είναι το *Trichinella spiralis*. Σύμφωνα με στοιχεία που απορρέουν από τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDCP), έχουν προσδιοριστεί περίπου 400 περιστατικά τριχινέλλωσης, αναφορικά με τη δεκαετία του 1940. Πλέον ο αριθμός αυτός έχει μειωθεί, με αποτέλεσμα να καταγράφονται περίπου 20 περιπτώσεις ανά έτος. Στις ομάδες υψηλού κινδύνου ανήκουν οι θηρευτές και τα άτομα που καταναλώνουν άγριο κρέας.

Ο υψηλότερος αριθμός περιστατικών φαίνεται να καταγράφεται στην Κίνα, όπου η λήψη τροφής από χοίρους φαίνεται να είναι υψηλότερη παγκοσμίως. Επιπρόσθετα ως φορείς *Trichinella* έχουν αναγνωριστεί στην Αρκτική, οι πολικές αρκούδες, οι φώκιες και οι θαλάσσιοι ίπποι. Τα τελευταία έτη, οι προτιμήσεις των καταναλωτών για λήψη κρέατος χωρίς τη χρήση αντιβιοτικών έχει επιφέρει αύξηση της *Trichinella* στην Ευρώπη. [124]

Τα αρχικά συμπτώματα της τριχινέλλωσης περιλαμβάνουν: διάρροια, εμετό, πυρετό, ναυτία, κοιλιακούς πόνους, κόπωση τα οποία συνοδεύονται από πρήξιμο των ματιών, πονοκεφάλους, πόνο στις αρθρώσεις και στους μυς, αδυναμία και φαγούρα στο δέρμα. Σε κρίσιμες περιπτώσεις τα άτομα ενδέχεται να εκδηλώσουν δυσκολία στο συντονισμό και να έχουν καρδιακά και αναπνευστικά προβλήματα, γεγονός που μπορεί να επιφέρει και το θάνατο.

Τα συμπτώματα στη περιοχή της κοιλίας ενδέχεται να εμφανιστούν σε διάστημα εντός 1 έως 2 ημερών εφόσον έχει προηγηθεί η κατάποση μολυσμένου κρέατος. Επιπλέον συμπτώματα (μυϊκοί πόνοι, πρήξιμο ματιών) μπορεί να εμφανιστούν σε διάστημα από 2 έως 8 εβδομάδες μετά την μόλυνση. Τα συμπτώματα μπορεί να διαρκέσουν και μήνες. Τα ηπία περιστατικά μπορεί να θεωρηθούν ως γρίπη. [117]

1.3 Παθογόνοι Μύκητες

Οι μύκητες αποτελούν μια ομάδα ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, εκ των οποίων κάποιοι είναι σε θέση να προξενούν επιφανειακές, δερματικές ή ακόμα και συστηματικές ασθένειες.

Ως προς τη φυσιολογία τους οι μύκητες είναι ετερότροφοι και κυρίως αερόβιοι με ελάχιστες αναερόβιες δυνατότητες. Ως προς τη δομή τους οι μύκητες κατέχουν χιτινικά κυτταρικά τοιχώματα, πλασματικές μεμβράνες, οι οποίες εμπεριέχουν εργοστερόλη 80S rRNA και μικροσωλινίσκους, οι οποίοι αποτελούνται από τουμπουλίνη.

Οι μύκητες εμφανίζονται ως ζύμες, μούχλες ή ακόμα και ως συνδυασμός των δυο προαναφερθέντων μορφών. Οι ζύμες αποτελούν μικροσκοπικούς μύκητες, και απαρτίζονται από μοναχικά κύτταρα που διαιωνίζονται με εκβλάστηση. Αντίθετα οι μούχλες παρουσιάζονται σε μακρά νημάτια που αναφέρονται ως υφές, η ανάπτυξη των οποίων συνοδεύεται με ακραία επέκταση. [98]

Τόσο οι ζύμες όσο και οι μούχλες μπορούν να επιφέρουν σημαντικό βαθμό αποσύνθεσης και αλλοίωσης των τροφίμων. Έχουν την ικανότητα να εισβάλλουν και να αναπτύσσονται σχετικά σε οποιοδήποτε είδος τροφίμου οποιαδήποτε στιγμή, εισβάλλοντας σε καλλιέργειες όπως τα σιτηρά, οι ξηροί καρποί, τα φασόλια και τα φρούτα στους αγρούς. Επιπρόσθετα η ανάπτυξη μπορεί να πραγματοποιηθεί σε τρόφιμα καθώς και μείγματα τροφίμων που έχουν υποστεί επεξεργασία. Ο προσδιορισμός εσωτερικά ή εξωτερικά των τροφίμων εξαρτάται από πολλούς

παράγοντες, όπως, ο τύπος του τροφίμου, τους οργανισμούς που εμπλέκονται καθώς και το βαθμό αλλοίωσης. Το μολυσμένο τρόφιμο ενδέχεται να είναι ελαφρώς αλλοιωμένο ή να έχει αποσυντεθεί πλήρως, με την ανάπτυξη του να παρουσιάζεται με σάπιες κηλίδες ποικίλων μεγεθών και χρωμάτων, γλίτσα, αντιαισθητικές αποχρώσεις, λευκό βαμβακώδες μικκύλιο ή ακόμα και έντονη σποροποιητική μούχλα. Επίσης ενδέχεται να παράγονται μη φυσιολογικές οσμές και γεύσεις. Κατά περιόδους ένα τρόφιμο μπορεί να εμφανισθεί απαλλαγμένο από μούχλα, ωστόσο κατά την μυκητολογική έρευνα να διαπιστωθεί ότι είναι μουχλιασμένο.

Οι υφές ενδέχεται να είναι από ελάχιστα διαφραγμένες έως επαρκώς διαφραγμένες και κατέχουν κυμαινόμενο αριθμό πυρήνων. Οι μύκητες, ανεξάρτητα από το σχήμα ή το μέγεθός τους, είναι όλοι ετερότροφοι και πέπτουν την τροφή τους έξωθεν ελευθερώνοντας υδρολυτικά ένζυμα στο εγγύς περιβάλλον τους (απορροφητική διατροφή). [38]

Οι τροφιμογενείς μύκητες, δηλαδή οι μούχλες και οι ζυμομύκητες, οδηγούν σε σημαντική αλλοίωση των αποθηκευμένων τροφίμων, με συνέπεια υψηλές οικονομικές απώλειες. Οι μύκητες μπορούν να παράγουν μυκοτοξίνες. Οι μύκητες που σχετίζονται με την παραγωγή μυκοτοξινών «ενοχοποιούνται» για διάφορες οξείες και χρόνιες ασθένειες στον άνθρωπο. Τα τελευταία χρόνια έχουν προσδιοριστεί και προταθεί αρκετές καλλιέργειες που ενδείκνυται για να παράγουν βακτηριοσίνες ως βιοσυντηριτικά. Παρόλα αυτά η μελέτη που διεξάγεται όσον αφορά τους καταστολείς μυκήτων, σχετικά με την αλλοίωση τους στα τρόφιμα είναι αρκετά περιορισμένη. [134]

Οι μυκοτοξίνες είναι τοξικές ουσίες, οι οποίες παράγονται από ορισμένες μούχλες και εντοπίζονται κυρίως σε καλλιέργειες ξηρών καρπών και σιτηρών. Ωστόσο είναι γνωστό ότι υπάρχουν στο σέλινο, στο σταφυλοχυμό, στα μήλα καθώς και σε άλλα προϊόντα. Παρόλο που υπάρχουν αρκετές από αυτές, οι επιστήμονες δε σταματούν να ανακαλύπτουν νέες. Σύμφωνα με εκτιμήσεις που απορρέουν από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) των Ηνωμένων Εθνών, εκτιμά ότι το 25% των καλλιεργειών πλήττεται από μυκοτοξίνες, από τις οποίες πιο γνωστές είναι οι αφλατοξίνες. [149]

Η αφλατοξίνη είναι ένα σοβαρό καρκινογόνο δηλητήριο, το οποίο προέρχεται από κάποιους μύκητες πάνω ή μέσα σε τρόφιμα και ζωοτροφές, κυρίως στα φιστίκια και στο καλαμπόκι. Αποτελεί μια από τις πιο γνωστές μυκοτοξίνες παγκοσμίως. Οι

αφλατοξίνες έχουν συνδεθεί με διάφορες νόσους, όπως η αφλατοξίκωση στο ζωικό βασίλειο, τα οικόσιτα ζώα και τους ανθρώπους σε παγκόσμια κλίμακα. Πλήθος χωρών καταβάλλουν προσπάθειες όσον αφορά το περιορισμό της έκθεσης στην αφλατοξίνη, διεκπεραιώνοντας και παρακολουθώντας την ύπαρξη της σε τρόφιμα που πρόκειται να καταναλωθούν ως τρόφιμα ή ζωοτροφές. Ακόμα και σήμερα, η πρόληψη της αφλατοξίνης αποτελεί ένα από τα πιο δυσχερή τοξικολογικά θέματα. [149]

Πολύ λίγοι τροφιμογενείς μύκητες μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις στον άνθρωπο. Το πιο σημαντικό όπως ήδη έχει αναφερθεί είναι οι μυκοτοξίνες όπου παράγουν οι μύκητες και μολύνουν τα τρόφιμα, όπως είναι τα λαχανικά, παρά οι μύκητες. Αρκετοί παραγωγοί μυκοτοξινών δύναται να αποικίσουν τόσο σε συμβατικά όσο και σε βιολογικά λαχανικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ή ακόμα και στον αγρό. Οι διακυμάνσεις των ειδών που υπάρχουν δεν εξαρτώνται μόνο από το λαχανικό αλλά και από τις κλιματολογικές και αποθηκευτικές συνθήκες. [73]

Οι αφλατοξίνες αποτελούν μεταβολίτες που προέρχονται από τοξινογόνα είδη μούχλας, με κυριότερα τον *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* περιλαμβάνοντας περίπου 20 τοξικές οργανικές ενώσεις, η ανάπτυξη των οποίων ενδείκνυται στο έδαφος, τη σάπια βλάστηση, το σανό και τα σιτηρά. Ο ορός «αφλατοξίνη» προήλθε από την ονομασία *Aspergillus flavus*. Πήρε το όνομα του γύρω στο 1960, υστέρα από την ανακάλυψη ως αιτία μιας νόσου στη γαλοπούλα που ονομάστηκε νόσος-Χ της γαλοπούλας. Επίσης έχει παρατηρηθεί και ως αιτία καρκίνου στις πέστροφες ουράνιου τόξου, οι οποίες τρέφονται με γεύματα από βαμβακόσπορους και φιστίκια. Η διατροφική έκθεση σε αφλατοξίνες ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές καρκινογόνες και τοξικές επιπτώσεις τόσο σε ανθρώπους όσο και ζώα.

Οι αφλατοξίνες αποτελούν μια από τις κυριότερες ομάδες μυκοτοξινών. Η παραγωγή της αφλατοξίνης προκύπτει από τη δράση των μυκήτων κατά τη συγκομιδή, τη παραγωγή, την αποθήκευση και την επεξεργασία τροφίμων. Ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) εκτιμά ότι η επιμόλυνση των τροφίμων είναι αναπόφευκτη. Η έκθεση στην αφλατοξίνη ενδέχεται να επιφέρει οξεία ναυτία, κοιλιακό άλγος και σπασμούς καθώς και εμετό, ενώ η χρόνια έκθεση ενδέχεται να επιφέρει επιπλοκές όπως η τερατογένεση, ηπατοτοξικότητα και ανοσοτοξικότητα. Η αφλατοξίνη αποτελεί μια από τις βασικότερες αιτίες ηπατοκυτταρικού καρκινώματος στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Διάφοροι τύποι αφλατοξίνης, όπως είναι η αφλατοξίνη B1 (AFB1) και η αφλατοξίνη B2 (AFB2), μπορούν να παραχθούν τόσο από τον *A. Flavus* όσο και από τον *A. Parasiticus*. Η AFB1 θεωρείται ως η πιο ισχυρή αφλατοξίνη συγκριτικά με τις υπόλοιπες. Όσον αφορά την αφλατοξίνη M1 (AFM1) εντοπίζεται στο ζυμό ζύμωσης του *A. Parasiticus*. Επιπρόσθετα, η αφλατοξίνη M1 και M2 μπορούν να αναπτυχθούν στην περίπτωση που ένα μολυσμένο ήπαρ μεταβολίσει τις AFB1 και AFB2. Η μετάδοση της AFM1 μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω του γάλακτος. Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για το Καρκίνο η AFB1 και η AFM1 κατατάσσονται ως οι πιο καρκινογόνοι για τον άνθρωπο της ομάδας 1 και 2B. [48]

Η πλειοψηφία των μυκοτοξινών αποτελούν σταθερές ενώσεις, οι οποίες δεν καταστρέφονται κατά την επεξεργασία των τροφίμων καθώς και ούτε από το οικιακό μαγείρεμα. Παρόλο που κάποιοι οργανισμοί που τις σχηματίζουν ενδέχεται να επιβιώσουν από την προπαρασκευή των τροφίμων, η τοξίνη που ήδη έχει σχηματισθεί ενδέχεται να είναι ακόμα παρούσα. Κάποιες μούχλες και κάποιοι ζυμομύκητες που μεταδίδονται μέσω τροφίμων ενδέχεται να επιφέρουν αλλεργικές αντιδράσεις ή να προκαλέσουν λοιμώξεις. Παρόλα αυτά οι περισσότεροι μύκητες που μεταδίδονται με τα τρόφιμα δεν αποτελούν μολυσματικούς φορείς, ορισμένα από αυτά τα είδη ενδέχεται να επιφέρουν λοιμώξεις κυρίως σε ευπαθείς ομάδες, λόγω χάρη, ηλικιωμένοι, άτομα που έχουν προσβληθεί από τον ιό HIV κ.λπ.. [38]

1.4.1 *Aspergillus flavus*

Ο *Aspergillus flavus* αποτελεί έναν σαπροφυτικό μύκητα, ο οποίος τρέφεται με ζωικά και φυτικά υπολείμματα και αποτελεί ένα από τα πιο κοινά είδη *Aspergillus*, το οποίο μπορεί να επιμολύνει αρκετά είδη αρθρώπων.

Η πλειοψηφία των στελεχών του *Aspergillus flavus*, όπου αναγράφονται στη βιβλιογραφία έχουν τη δυνατότητα παραγωγής αφλατοξινών, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να προκαλέσουν αφλατοξίκωση. Ο συγκεκριμένος μύκητας διαθέτει επίσης και φυτοπαθογόνες ιδιότητες, μπορεί να επιμολύνει το καλαμπόκι, το βαμβάκι, τα φιστίκια και το ρύζι.

Εργαστηριακές καλλιέργειες *in vitro* του *Aspergillus flavus*, παρουσιάζουν δυο μορφότυπους, οι οποίοι ορίζονται από το μέγεθος των σκληρώτιων, δηλαδή, στον μορφότυπο L ανήκουν εκείνα που έχουν διάμετρο άνω των 400 μm και στον μορφότυπο S ανήκουν εκείνα με διάμετρο κάτω από 400 μm. Πέρα από τις διαφορές

που παρουσιάζουν ως προς το μέγεθος των σκληρώτιων, ο μορφότυπος S είναι κατά βάση τοξινογόνος, αυτό οφείλεται στην παραγωγή αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2. Ο μορφότυπος L μπορεί να κυμαίνεται από μη τοξικός έως τοξικός, αυτό συμβαίνει καθώς δεν είναι ικανός να συνθέτει όλους τους τύπους αφλατοξινών.

Ο μορφότυπος L είναι πιο πιθανό να εντοπισθεί σε καλλιέργειες όπως ο αραβόσιτος, σε αντίθεση με το μορφότυπο S, ο οποίος είναι πιο πιθανό να βρεθεί σε εδάφη με θερμοκρασίες επιφάνειας να ανέρχονται στους 30° C. Επίσης, τα γονιδιώματα του μορφότυπου S είναι μεγαλύτερα πάνω από ένα Mbp και μπορούν να κωδικοποιούν πάνω από 100 προβλεπόμενα γονίδια συγκριτικά με τον μορφότυπο L.

Οι πιο μελετημένες αφλατοξίνες είναι οι B1, B2, G1 και G2, με το B1 να αποτελεί το πιο τοξικό συγκριτικά με τις υπόλοιπες (B1> G1> B2>G2. Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Ερευνάς για τον Καρκίνο (IARC) οι αφλατοξίνες αποτελούν μέρος της ομάδας 1 κινδύνου για καρκινογένεσεις στον άνθρωπο. Αυτό οφείλεται κυρίως στην τοξικότητα, τη βιοσυσσώρευση και την θερμοσταθερότητα που διαθέτουν. Οι αφλατοξίνες προσδένονται στο DNA και προξενούν τη μετάβαση της γουανίνης σε θυμίνη προκαλώντας καρκίνο του ήπατος. Η διαδικασία σύνθεσης της αφλατοξίνης είναι περίπλοκη καθώς περιλαμβάνει τουλάχιστον 27 ενζυματικές αντιδράσεις. Ωστόσο, οι αφλατοξίνες εμπεριέχουν αμυντικά πλεονεκτήματα ενάντια των μυκητοφάγων όπως η μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster*. [14]



Εικόνα 18 Μικρογραφία του μύκητα *Aspergillus* που παράγει την καρκινογόνο τοξίνη (αφλατοξίνη)
[106]

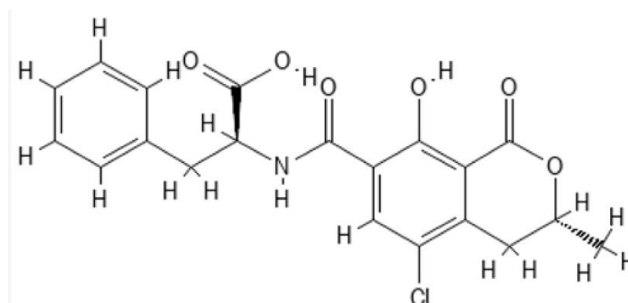
1.4.2 *Penicillium* spp.

Τα *Penicillium* spp. είναι μύκητες ποικιλόμορφοι, αρκετά γνωστοί και αναγνωρίζονται περίπου 350 είδη σε αυτό το γένος. Διαχωρίζεται σε 4 υπογένη: *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Furcatum* και *Biverticillium*. Η εμφάνιση τους είναι παγκόσμια και κατέχουν σπουδαίο ρόλο ως αποσυνθέτες οργανικών υλών, ωστόσο μπορούν να επιφέρουν καταστρεπτικές σήψεις στη βιομηχανία τροφίμων, όπου και παράγουν ένα εύρος μυκοτοξινών. Ως προς την ανθρώπινη υγεία, σπανίως σχετίζονται ως παθογόνα καθώς η ανάπτυξη τους είναι δύσκολη στους 37° C. Ο βασικότερος κίνδυνος ελλοχεύει με την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων από μυκοτοξίνες, που σχηματίζονται από ορισμένα είδη *Penicillium*. Ποικίλες μυκοτοξίνες ενδέχεται να εμφανισθούν σε τρόφιμα και ζωοτροφές που έχουν προσβληθεί από *Penicillium*, από τις οποίες η σημαντικότερη είναι η ωχρατοξίνη Α (OTA), για την οποία έχουν θεσπιστεί κανονισμοί σε αρκετές χώρες. [119]

Η OTA μπορεί να παραχθεί από αρκετά είδη *Aspergillus* και *Penicillium*. Αποτελεί μια κοινή μυκοτοξίνη, η οποία προσβάλλει τα τρόφιμα. Η μόλυνση των τροφίμων, π.χ., κόκκοι καφέ, δημητριακά και προϊόντα δημητριακών, κρασί και σταφυλοχυμός, μπαχαρικά και γλυκόριζα είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται σε παγκόσμιο επίπεδο. Ο σχηματισμός της OTA πραγματοποιείται κατά την αποθήκευση των καλλιεργειών και είναι ευρέως γνωστό ότι προκαλεί αρκετές τοξικές μεταβολές σε ζωικά είδη. Μια από τις πιο ευαίσθητες και σημαντικές επιδράσεις που μπορεί να προξενήσει αποτελεί η βλάβη των νεφρών, παρόλα αυτά η εν λόγω τοξίνη ενδέχεται να επιφέρει σημαντικές επιπτώσεις τόσο στην ανάπτυξη του εμβρύου όσο και στο ανοσοποιητικό σύστημα. [157]

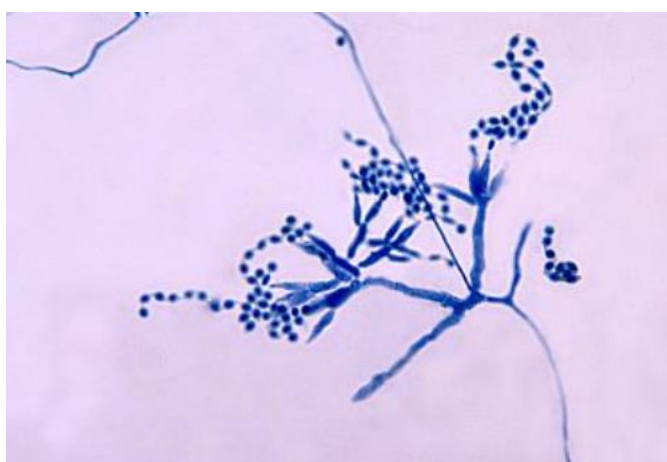
Εκτός από τη μεταφορά της από τις μουχλιασμένες ζωοτροφές, η OTA εντοπίζεται επιπρόσθετα στο χοιρινό κρέας, στα λουκάνικα και τα εντόσθια που περιέχουν χοιρινό αίμα. Όταν καταναλώνεται ως επιμολυντής τροφίμων, η OTA παρουσιάζει υψηλή ανθεκτικότητα στον άνθρωπο καθώς ο χρόνος ημιζωής στο αίμα ανέρχεται στις 35 ημέρες ύστερα από μια μόνο δόση. Το φαινόμενο αυτό καθιστά την εν λόγω τοξίνη μια από τις πιο συχνές μυκοτοξινικές επιμολύνσεις στο Καναδά, στις ΗΠΑ και στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η OTA δεν εναποτίθεται ούτε αποθηκεύεται στον οργανισμό, παρόλα αυτά η ανομοιόμορφη κατανομή της στον ανθρώπινο οργανισμό ενδέχεται να επιφέρει σοβαρή βλάβη στους νεφρούς. Η εν λόγω τοξίνη έχει ταξινομηθεί ως 2B

καρκινική ένωση, αποτελώντας πιθανότατα καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Επίσης, ήταν αναμεσά στις ισχυρότερες καρκινογόνες ενώσεις σε αρουραίους και ποντίκια. [120]



Εικόνα 19 Χημική δομή OTA [156]

Σύμφωνα με στοιχεία που απορρέουν από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια Τροφίμων, αρκετοί επιστήμονες υποστηρίζουν ότι η OTA ενδέχεται να αποτελεί καρκινογόνο στοιχείο για τους νεφρούς. [114]



Εικόνα 20 Μύκητας *Penicillium spp.* στο μικροσκόπιο [60]

1.5 Τροφιμογενείς Εξάρσεις

Οι τροφιμογενείς νόσοι, δηλαδή οι νόσοι που οφείλονται σε τρόφιμα που έχουν μολυνθεί, είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα προβλήματα που αφορούν το σύγχρονο κόσμο. Αυτές οι ασθένειες ενδέχεται να είναι από τη φύση τους τοξικές ή ακόμα και λοιμώξεις που προέρχονται από παράγοντες, οι οποίοι εισχωρούν στον οργανισμό μέσω κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων ή νερού. Το γεγονός αυτό εξαρτάται από χημικούς παράγοντες, δηλαδή τα φυτοφάρμακα και τα τοξικά μέταλλα ή βιολογικούς παράγοντες, δηλαδή, παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα τρόφιμα που έχουν

επιμολυνθεί από βιολογικούς παράγοντες αποτελούν τη βασική αιτία τροφιμογενών νόσων. Σύμφωνα με στοιχεία που έχουν καταγραφεί σε αρκετές χώρες, αναφέρεται ότι τα επακόλουθα που επιφέρουν ορισμένες από αυτές τις ασθένειες παρουσιάζουν υψηλή ύφεση τα τελευταία χρόνια. [110]

- *Bacillus cereus* (Βέλγιο, 2003)

Τον Αύγουστο του 2003, πέντε παιδιά μιας οικογένειας νοσήσαν μετά την κατάποση σαλάτας ζυμαρικών. Η σαλάτα είχε ετοιμασθεί την Παρασκευή και ένα μέρος της καταναλώθηκε σε πικνίκ την επόμενη μέρα, η υπόλοιπη αποθηκεύτηκε στο ψυγείο μέχρι το βράδυ της επόμενης Δευτέρας, όπου καταναλώθηκε από τα παιδιά. Η σαλάτα παρουσίαζε ασυνήθιστη γεύση και μυρωδιά και τρία από τα πέντε παιδιά κατανάλωσαν πολύ μικρή ποσότητα. Έξι ώρες μετά το γεύμα, το πιο μικρό παιδί (ηλικίας 7 ετών), ξεκίνησε να κάνει εμετό και παρουσίασε επίσης και αναπνευστική δυσχέρεια με συνέπεια να οδηγηθεί στο τμήμα επειγόντων περιστατικών, τοπικού νοσοκομείου. Κατά τη διάρκεια άφιξης στο νοσοκομείο ξεκίνησαν να κάνουν εμετό και τα υπόλοιπα παιδιά.

Η κλινική εικόνα των δυο παιδιών (ηλικίας 7 και 9 ετών) επιδεινώθηκε ραγδαία, με αποτέλεσμα τη διασωλήνωση τους. Στη συνέχεια όλα τα παιδιά μεταφέρθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο του Leuven. Κατά τη μεταφορά το κορίτσι παρουσίασε πνευμονική αιμορραγία με αποτέλεσμα κατά την άφιξη της στο Νοσοκομείο να βρίσκεται σε κώμα και να είναι ετοιμοθάνατη, όπου και κατέληξε 20 λεπτά αργότερα, 13 ώρες μετά από το γεύμα. Στη διαδικασία της νεκροψίας, εντοπίστηκε *B. cereus* στο έντερο καθώς επίσης και στο σπλήνα, ενδεχομένως λόγω μεταθανάτιας μετακίνησης του βακτηρίου.

Η βιοψία του ήπατος παρουσίασε εκτεταμένη και μικροαγγειακή πηκτική νέκρωση. Τα υπόλοιπα παιδιά προσβλήθηκαν και αυτά αλλά σε μικρότερο βαθμό και μπόρεσαν να φύγουν από το νοσοκομείο μετά από 8 ημέρες. Η δειγματοληψία που διενεργήθηκε σε έξι δείγματα τροφίμων καθώς και στον εμετό του ατόμου που απεβίωσε εντοπίστηκε *B. cereus*, με τον υψηλότερο αριθμό (107 έως 108 CFU/g) να βρίσκεται στη σαλάτα ζυμαρικών και ο χαμηλότερος στον εμετό ($2,0 \times 10^2$ CFU/g). [49]

- *Campylobacter jejuni* (Σουηδία, 2014)

Την Άνοιξη του 2014 και συγκεκριμένα τους μήνες Απρίλιο-Μάιο, εμφανίσθηκε μια επιδημία καμπυλοβακτηρίωσης, μετά από επίσκεψη τμήματος προσχολικής ηλικίας σε

γαλακτοκομική φάρμα στο νοτιοδυτικό σημείο της Σουηδίας. Στη διάρκεια της επίσκεψης προσφέρθηκε γεύμα στο οποίο περιλαμβάνονταν και μη παστεριωμένο γάλα. Διενεργήθηκαν μελέτες που αφορούσαν το σύνολο των συμμετεχόντων (n=30) μέσω διαδικτυακού ερωτηματολογίου που αφορούσε την επίσκεψη στο αγρόκτημα. Από τους 30 συμμετέχοντες οι 24 συμπλήρωσαν το ερωτηματολόγιο. Ανιχνευθήκαν 11 περιστατικά και στη συνέχεια απομονώθηκε *Campylobacter jejuni* από 8 άτομα. Επτά κρούσματα αφορούσαν παιδιά ηλικιών 2 έως 7 ετών. Ως αποτέλεσμα της ερευνάς στο αγρόκτημα, απομονώθηκε καμπυλοβακτηρίδιο από τα βοοειδή της φάρμας. Ο γονοτυπικός προσδιορισμός και η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος επιβεβαίωσαν ότι οι απομονώσεις του *Campylobacter jejuni* από τα βοοειδή και τον άνθρωπο ανήκαν σε ένα σύμπλεγμα. Αυτό είχε ως συνέπεια τα βοοειδή στο αγρόκτημα να θεωρούνται εστία μόλυνσης και ο πιο πιθανός τρόπος μετάδοσης να ήταν το μολυσμένο μη παστεριωμένο γάλα. [80]

- Clostridium Botulinum (ΗΠΑ, Οχάιο, 2015)

Η επιδημία αυτή εκδηλώθηκε στο Οχάιο των ΗΠΑ το 2015 αναμεσα σε άτομα που συμμετείχαν σε ένα γεύμα της εκκλησίας. Από τα 77 άτομα τα 29 που κατανάλωσαν τα γεύματα της γιορτής, παρουσίασαν συμπτώματα που συσχετιζόνταν με την αλλαντίαση. Από τα 29 κρούσματα, τα 19 επιβεβαιώθηκαν εργαστηριακά και τα υπόλοιπα 10 αποτέλεσαν πιθανές περιπτώσεις, αυτό συνέβη καθώς οι ασθενείς εκδήλωσαν συμπτώματα αλλαντίαςης, αλλά οι περιπτώσεις δεν επιβεβαιώθηκαν εργαστηριακά. Ένας ασθενής κατέληξε από αναπνευστική ανεπάρκεια λίγο μετά την είσοδο του στο νοσοκομείο. Στη συνέχεια διενεργήθηκαν εξετάσεις από τις οποίες προέκυψε ότι τα δείγματα ορού και κοπράνων ήταν θετικά για BoNT τύπου Α. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων ξεκίνησε κατά μέσο όρο ύστερα από δυο μέρες μετά την κατανάλωση του γεύματος. Στη συγκεκριμένη εκδήλωση υπήρχαν πάνω από 50 τρόφιμα. Οι ερωτηθέντες υπέδειξαν ως αιτιολογικό παράγοντα την πατατοσαλάτα.

Μέσα από την ιχνηλάτηση που διενεργήθηκε, όλα τα τρόφιμα είχαν απορριφθεί. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν από τον κάδο απορριμμάτων δώδεκα δείγματα τροφίμων, έξι από αυτά βρέθηκαν θετικά για BoNT τύπου Α, εκ των οποίων τα πέντε από αυτά περιείχαν πατατοσαλάτα και ένα περιείχε μακαρόνια με τυρί, τα οποία ενδέχεται να είχαν διασταυρωθεί κατά την απόρριψη τους. Η πατατοσαλάτα είχε παρασκευαστεί με σπιτικές κονσέρβες πατάτας οι οποίες είχαν κονσερβοποιηθεί με εφαρμογή

κονσερβοποιητή νερού που έβραζε. Η θερμοκρασία του νερού που βράζει δεν τίθεται επαρκής προκειμένου να καταστραφούν τα σπορία του *C. botulinum* και ενδεχομένως να υπήρχαν στις ωμές πατάτες. Επιπρόσθετα, στους κονσερβοποιητές πατάτας δεν είχε προηγηθεί θέρμανση πριν από την προετοιμασία της σαλάτας. [91]

- *Clostridium Perfringens* (Ελλάδα, 2019)

Σε εγχώριο επίπεδο, στις 27 Ιουνίου του 2019, ο ΕΟΔΥ έλαβε ενημέρωση για ένα σύνολο περιστατικών γαστρεντερίτιδας αναμεσά σε αθλητές τεσσάρων ομάδων από τις 47 ομάδες που συμμετείχαν στο Πανελλήνιο Πρωτάθλημα Χειροσφαίρισης Παιδιών. Ύστερα, από μια εξονυχιστική μελέτη, η οποία αφορούσε τα μέλη όλων των ομάδων, η τοπική αρχή δημόσιας υγείας επισκέφθηκε τα εστιατόρια όπου λάμβαναν χώρα τα κοινά γεύματα, συλλέγοντας στοιχεία αναφορικά με την προετοιμασία των γευμάτων καθώς επίσης και από τη συλλογή δειγμάτων από τα υπολείμματα. Τα δείγματα κοπράνων εξετάστηκαν για *Salmonella spp.* και *Shigella spp.*. Η κατανάλωση μοσχαρίσιου κιμά εμφάνισε υψηλή συσχέτιση αναφορικά με την εκδήλωση της νόσου. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ότι τα δείγματα από τα υπολείμματα κρέατος βρέθηκαν θετικά για το *C. perfringens*, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι το κρέας δεν είχε αποθηκευτεί και αναθερμανθεί σύμφωνα με το τρόπο που υποδεικνύεται. Τα δείγματα που αφορούσαν τα κόπρανα για *Salmonella spp.* και *Shigella spp.* ήταν αρνητικά. [100]

- *Escherichia coli* (Νέα Υόρκη, 2011)

Το 2011 εκδηλώθηκε μια επιδημία μόλυνσης από *E. coli O157:H7*, η οποία συνδέονταν με μείγμα που περιείχε βιολογικό σπανάκι και εαρινή σαλάτα, από την οποία προκλήθηκαν 33 περιστατικά σε πέντε πολιτείες σύμφωνα με στοιχεία του CDC. Η συγκεκριμένη έξαρση συσχετίστηκε με την πλειοψηφία των ασθενειών, γεγονός που συνδέεται με την κατανάλωση μολυσμένων λαχανικών, με εξαίρεση το μαρούλι Romaine, το οποίο έλαβε χώρα, σε οικιακό περιβάλλον. Επί του συνόλου καταγράφηκαν 13 περιπτώσεις νοσηλείας και 2 περιπτώσεις HUS. Η χρονική διάρκεια εκδήλωσης της νόσου πραγματοποιήθηκε στο διάστημα από τις 18 Οκτωβρίου του 2012 έως τις 12 Νοεμβρίου του 2012. Η πολιτεία της Νέας Υόρκης ανέφερε το υψηλότερο ποσοστό των κρουσμάτων, με τις ηλικίες να κυμαίνονται από 4 έως 64 έτη με διάμεση ηλικία τα 24 έτη. Τα επιδημιολογικά στοιχεία και οι εργαστηριακές αναλύσεις του βιολογικού σπανακιού καθώς και το μείγμα από την

εαρινή σαλάτα που είχε περισσέψει, αναγνωρίσαν τα φυλλώδη λαχανικά που παράγονται στη Μασαχουσέτη ως το βασικό μέσο για την έξαρση της επιδημίας. [32]

- *Listeria monocytogenes* (Πολιτείες ΗΠΑ, 2018)

Το 2011, εμφανίσθηκε μια επιδημία λιστερίωσης σε 28 διαφορετικές πολιτείες των ΗΠΑ. Η επιδημία αυτή προήλθε μέσα από την κατανάλωση μολυσμένων πεπονιών, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα να προσβληθούν 147 άτομα και 33 από αυτούς να πεθάνουν. Μέσα από τη διενέργεια εργαστηριακών αναλύσεων *L. monocytogenes* παρατηρήθηκε υψηλή ομοιότητα με τον υπότυπο των αποικιών του *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από δείγματα κομμένου πεπονιού σε συνδυασμό και με τη λήψη αίματος από τους νοσούντες. Ανάμεσα στα άτομα που είχαν προσβληθεί υπήρχε και μια έγκυος γυναίκα, η οποία μετά από λίγο απέβαλε. Παρόλα αυτά την ίδια χρονιά εμφανίσθηκε άλλη μια επιδημία, συνδεδεμένη με την κατανάλωση μαρούλι "romaine" σε 19 πολιτείες των ΗΠΑ. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα 84 άτομα να νοσήσουν και 15 από αυτά να πεθάνουν. Ο FDA υστέρησε από τη διενέργεια τυχαίου ελέγχου στην True Leaf Farms της Καλιφόρνια, έλαβε θετικά αποτελέσματα μέσω μικροβιολογικών αναλύσεων για το *L. monocytogenes*. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να ανακληθούν περίπου 30.000 κιλά συσκευασμένου και ψιλοκομμένου μαρουλιού romaine. [165]

- *Salmonella* spp.

Στις 27 Μαρτίου 2022, ο ΠΟΥ έλαβε γνώση για ευρέως γνωστή συστάδα *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (*S. Typhimurium*) με άγνωστη προέλευση. Κατά τη διεξαγωγή της μοριακής τυποποίησης επιβεβαιώθηκε η απομόνωση του παθογόνου βακτηρίου *S. Typhimurium* και σε συνδυασμό με τα επιδημιολογικά δεδομένα, η συγκεκριμένη έξαρση συσχετίστηκε με προϊόντα βέλγικης σοκολάτας. Το εν λόγω παθογόνο που ταιριάζει με τα περιστατικά της ανθρώπινης ασθένειας ανιχνεύθηκε σε δεξαμενή βουτυρογάλακτος σε εργοστάσιο στο Βέλγιο τον Δεκέμβριο του 2021 καθώς και τον Ιανουάριο του 2022. Από τις 25 Απριλίου 2022 αναφέρθηκαν συνολικά 151 περιστατικά, τα οποία συνδέονται με την κατανάλωση προϊόντων σοκολάτας. Η χρονική διάρκεια κατά την οποία εκδηλώθηκαν τα συμπτώματα κυμαίνεται από τις 21 Δεκεμβρίου 2021 έως τις 28 Μαρτίου 2022. Οι πληροφορίες που είναι διαθέσιμες αναφέρουν για 21 περιστατικά ότι παρουσίασαν αιματηρή διάρροια και εννέα από αυτούς νοσηλεύτηκαν. [155]

- *Shigella* spp. (Επαρχία Τιρόλου, 2008)

Στις 14 Ιουλίου του 2008, εκδηλώθηκε ένα σύμπλεγμα από 22 εργαστηριακά επιβεβαιωμένα περιστατικά λοίμωξης προερχομένη από *S. sonnei* στην επαρχία του Σάλτσμπουργκ. Η πλειοψηφία των κρουσμάτων συμμετείχαν σε μια εκδρομή νέων σε ένα χωριό στην επαρχία του Τιρόλου μεταξύ 7 έως και 9 Ιουλίου. Δυο περαστικά αναφέρθηκαν με διάρροια κατά την χρονική περίοδο από 8 και 12 Ιουλίου. Από τα 61 άτομα που συμμετείχαν στο ταξίδι, 42 άτομα πληρούσαν τα κριτήρια για περιστατικά της επιδημίας και 31 άτομα είχαν επιβεβαιωθεί εργαστηριακά. Η διεξαγωγή συνεντεύξεων μεταξύ των συμμετεχόντων κατέδειξε ως κύριο υπαίτιο την κατανάλωση σαλάτας. Επιπλέον, ένα από τα δυο άτομα του ξενώνα εντοπίστηκε θετικό για *S. sonnei*. Αναμεσά στα 42 περιστατικά, τα 34 από αυτά προκλήθηκαν από την κατανάλωση σαλάτας, καθώς η σπιτονοικοκυρά του ξενώνα, η οποία ήταν φορέας προετοιμάζε τη σαλάτα με γυμνά χεριά και ενδεχομένως να υπήρξε η πηγή μόλυνσης της σαλάτας. [78]

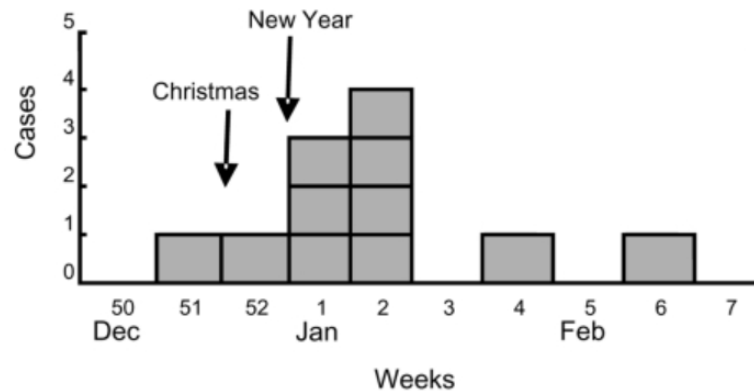
- *Staphylococcus aureus* (Ninh Binh, Βιετνάμ 2018)

Μια εκτεταμένη επιδημία τροφικής δηλητηρίασης έλαβε χώρα σε σχολική καντίνα στην επαρχία Ninh Binh του Βιετνάμ το 2018, με συνέπεια να νοσηλευτούν 352 μαθητές ηλικίας 6-10 ετών, εμφανίζοντας κλινικά συμπτώματα παρεμφερή της τροφικής δηλητηρίασης από σταφυλόκοκκο. Ύστερα από εργαστηριακή έρευνά που διενεργήθηκε για *S. aureus*, σε δυο είδη τροφίμων (τηγανητές γαρίδες και νήμα κοτόπουλου), εντοπίστηκαν σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (SEs). Στη συνέχεια ο *S. aureus* απομονώθηκε από δείγματα κοπράνων των νοσούντων, από δείγματα κοπράνων των υπάλληλων της κουζίνας και από κατεψυγμένο κοτόπουλο, παρόλα αυτά δεν ελήφθησαν δείγματα από τις επιφάνειες των χεριών των υπαλλήλων της κουζίνας, γεγονός που συνάδει ότι η αιτία της εν λόγω επιδημίας ήταν η μόλυνση του κρέατος από *S. aureus*. [84]

- *Yersinia Enterocolitida* (Νορβηγία, 2015)

Ένας κάτοικος της Νορβηγίας ορίστηκε ως περιστατικό-ασθενής με *Y. enterocolitica* O:9, η οποία απομονώθηκε από κόπρανα και αίμα. Η εκδήλωση της ασθένειας συνέβη στο χρονικό διάστημα μεταξύ 15 Δεκεμβρίου 2005 και 15 Φεβρουαρίου 2006. Η ανίχνευση των περιστατικών πραγματοποιήθηκε από το Εθνικό Σύστημα Επιτήρησης στο NIPH, το οποίο δέχεται αναφορές από εργαστηριακά επιβεβαιωμένα περιστατικά από εργαστήρια και κλινικούς γιατρούς από όλη τη χώρα. Υπήρξαν έντεκα περιστατικά

λοίμωξης προερχόμενης από *Y. enterocolitica* O:9, βιότυπος 2, τα οποία εντοπίστηκαν από τις 21 Δεκεμβρίου έως τις 6 Φεβρουαρίου 2006, όπως απεικονίζεται και στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 21 Κατανομή ασθενών με προσβολή από *Y. enterocolitida* ανά εβδομάδα εμφάνισης [63]

Οι ασθενείς κατοικούσαν σε δυο γειτονικούς νομούς στη νότια Νορβηγία, όλοι ήταν ενήλικες (διάμεση ηλικία 44 έτη) εκτός από ένα παιδί ηλικίας 10 ετών. Τα συμπτώματα που αναφέρθηκαν περιλάμβαναν διάρροια, πυρετό, κοιλιακό άλγος, εμετό και αρθραλγία. Η χρονική διάρκεια των συμπτωμάτων ήταν κατά μέσο όρο 14 ημέρες. Τέσσερα άτομα νοσηλεύθηκαν και δυο πέθαναν. Τα στελέχη της *Yersinia spp.* που απομονώθηκαν από τους ασθενείς χαρακτηρίστηκαν βιοτυπικά και φαινοτυπικά.

Επιπλέον, εξετάστηκαν όλα τα τρόφιμα που αποτελούσαν αιτιολογικό παράγοντα από το Νορβηγικό Κτηνιατρικό Ινστιτούτο. Η εργαστηριακή ανάλυση κατέδειξε την κατανάλωση προϊόντων χοιρινού κρέατος, τα οποία είχαν υποστεί επεξεργασία, τα οποία συσχετίστηκαν με μόλυνση από *Y. enterocolitica* O:9. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα στις 10 Φεβρουαρίου, οι αρχές δημόσιας υγείας και ασφάλειας τροφίμων να εκδώσουν δημόσια προειδοποίηση, στην οποία νουθετούσαν τον κόσμο να αποφύγει την κατανάλωση μοσχαρίσιου κρέατος. [63]

- Ηπατίτιδα Α (Βόρεια Καρολίνα, 2016)

Το έτος 2016 έλαβε χώρα μια πολυεθνική επιδημία ηπατίτιδας Α, η οποία συνδέθηκε με κατεψυγμένες φράουλες. Σύμφωνα με επιδημιολογικά στοιχεία καθώς και στοιχεία προέλευσης, οι εν λόγω κατεψυγμένες φράουλες από την Αίγυπτο φαίνεται να αποτέλεσαν αιτιολογικό παράγοντα για την εκδήλωση της επιδημίας. Η πλειοψηφία των ασθενών ανέφεραν ότι κατανάλωσαν smoothies που περιείχαν φράουλες σε χώρους του Tropical Smoothie Café σε περιοχές της Βορείας Καρολίνας, της

Βιρτζίνιας και της Δυτικής Βιρτζίνια. Στις 13 Δεκεμβρίου του 2016 αναφέρθηκαν 143 άτομα από εννέα πολιτείες. Από τα άτομα που αναφέρθηκαν 129 από αυτά ανέφεραν ότι είχαν πει smoothie στο Tropical Smoothie Café. Η ημερομηνία έναρξης της ασθένειας φαίνεται να ήταν στις 25 Οκτωβρίου του 2016, όπου 56 άτομα νοσηλεύτηκαν. Η έρευνα που διεξήχθη από τον FDA υπέδειξε ότι οι κατεψυγμένες φράουλες που είχαν σερβιρίστε στο εν λόγω καφέ προέρχονταν από την ICAPP, η οποία είχε εισαχθεί από την Αίγυπτο. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα στις 30 Οκτωβρίου του 2016 η ICAPP να ανακαλέσει όλες τις κατεψυγμένες φράουλες που έκανε εισαγωγή στις ΗΠΑ από την 1^η Ιανουάριου του 2016. Τέλος, ο FDA ανέφερε ότι η μόλυνση της ηπατίτιδας Α ανιχνεύθηκε σε αρκετά δείγματα κατεψυγμένης φράουλας του ICAPP. [2]

- Νοροϊός (Αγγλία, 2009)

Το 2009 μια επιδημία γαστρεντερίτιδας επηρέασε 240 άτομα, τα οποία είχαν γευματίσει σε ένα γκουρμέ εστιατόριο κατά το χρονικό διάστημα επτά εβδομάδων στην Αγγλία. Ύστερα από τη διεξαγωγή επιδημιολογικών, μικροβιολογικών και περιβαλλοντικών μελετών, προέκυψαν στοιχεία τα οποία έδειχναν υψηλό κίνδυνο για τη νόσο κυρίως για όσους κατανάλωναν από ένα ειδικό μενού γευσιγνωσίας. Το πιάτο που «ενοχοποιήθηκε» περιλάμβανε στρείδια, ζελέ από φρούτα του πάθους και λεβάντα. Δέκα θαμώνες και έξι άτομα από το προσωπικό είχαν επιβεβαιωθεί εργαστηριακά για λοίμωξη από νοροϊό. Οι θαμώνες μολυνθήκαν με αρκετά στελέχη νοροϊού, τα οποία ανήκουν σε ομάδες γονιδίων I και II, ένα «σχήμα» που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των επιδημιών που συνδέονται με μαλάκια οστρακοειδών. Ο συνεχής κίνδυνος από το γεύμα στο εν λόγω εστιατόριο μπορεί να προκλήθηκε από τη συνεχή μόλυνση της προμήθειας στρειδιών, είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με επιπλέον διασπορά διαμέσου μολυσμένων χειριστών τροφίμων ή του χώρου του εστιατορίου. Η βραδεία ενημέρωση των αρχών δημόσιας υγείας για την επιδημία ενδέχεται να συνετέλεσε στο εύρος και τη χρονική διάρκεια της επιδημίας. [138]

- Cyclospora Cayetanensis (Πενσυλβάνια, 2000)

Το έτος 2000, διεξήχθη μια ερευνά από το Τμήμα Δημόσιας Υγείας της Φιλαδέλφειας σε συνεργασία με το CDC, προκειμένου να εξετάσει μια εστία γαστρεντερικής ασθένειας που αναφέρθηκε στις 18 Ιουνίου στην Πενσυλβάνια, με συνολικά 83 συμμετέχοντες. Ύστερα από τη διενέργεια συνεντεύξεων με 79 από τους 83

παρευρισκόμενους, αναμεσά στους οποίους ήταν και μέλη της γαμήλιας δεξίωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 54 από αυτούς πληρούσαν τις προϋποθέσεις έτσι ώστε να θεωρηθούν περιπτώσεις ασθένειας. Στις 18 Ιουλίου το τοπικό τμήμα υγείας έλαβε ειδοποίηση για μια γυναικά στην τροφοδοσία, η οποία βρέθηκε θετική για κυκλοσπορίαση, πρόκειται για εργαστηριακά επιβεβαιωμένη διάγνωση που πραγματοποιήθηκε σε διάστημα οχτώ ημέρων μετά το γάμο. Επιπλέον, εμφανίστηκαν και άλλα δυο μέλη του προσωπικού της εστίασης, τα οποία παρουσίασαν γαστρεντερική νόσο έξι ημέρες μετά την γαμήλια δεξίωση.

Μέσω της εξέτασης κοπράνων οι γιατροί αποκάλυψαν την παρουσία ωοκύστεων *Cyclospora*. Στη συνέχεια διενεργήθηκαν εξετάσεις στα τρόφιμα προκειμένου να προσδιοριστεί η αιτία της μόλυνσης. Ύστερα από μια πολυπαραγοντική ανάλυση, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γαμήλια τούρτα, η οποία είχε γέμιση κρέμας με σμέουρα, συνδεόταν άμεσα με τη νόσο. Εν συνεχεία διενεργήθηκαν αναλύσεις των υπολειμμάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ανίχνευση του παρασίτου.

Τα στοιχεία που προέκυψαν ήταν θετικά ως προς τη παρουσία του παρασίτου και μέσω επιπρόσθετων αναλύσεων προσδιορίστηκε ότι ο παθογόνος μικροοργανισμός ήταν το *C. cayetanensis*. Τα σμέουρα αποτελούσαν το μοναδικό προϊόν στο γαμήλιο γλυκό, για το λόγο αυτό ερωτήθηκαν όλοι οι διανομείς σμέουρων της εκάστοτε εταιρείας με σκοπό να προσδιοριστεί η προέλευση του μολυσμένου προϊόντος. Επιπρόσθετα, ο FDA σε συνεργασία με την κυβέρνηση της Γουατεμάλας πραγματοποιώντας επιθεώρηση σε κτήμα που ήταν ένας από τους προμηθευτές σμέουρων σε μια γαμήλια δεξίωση, η οποία έλαβε χώρα στη Γεωργία το Μάιο του 2000, γεγονός το οποίο συνδέθηκε με επιδημία κυκλοσπορίασης. [66]

- *Toxoplasma gondii*

Δυο περιστατικά οξείας τοξοπλάσμωσης που 8 ενήλικες νοσούντες στην Κορέα συσχετίστηκε με την κατανάλωση ωμού χοιρινού κρέατος. Στο πρώτο κρούσμα, τρεις νοσούντες παρουσίασαν μια πάθηση του οπίσθιου τμήματος του οφθαλμού (χοριοαμφιβληστροειδίτιδα) μέσα σε διάστημα 3 μηνών από την κατάποση γεύματος που περιείχε συκώτι από άγριο χοίρο και ωμό σπλήνα. Στο δεύτερο κρούσμα, οι πέντε από τους έντεκα στρατιώτες, οι οποίοι κατανάλωσαν γεύμα που περιείχε ωμό συκώτι

από οικόσιτο χοίρο παρουσίασαν λεμφαδενοπάθεια. Κατά την εξέταση των ασθενών εμφανίσθηκαν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων IgG *Toxoplasma gondii*. [42]

- *Trichinella Spirallis* (Ιαπωνία, 2016)

Το Δεκέμβριο του 2016, ένας υγιής άνδρας μεταφέρθηκε σε νοσοκομείο στην Ιαπωνία με συμπτώματα πυρετού, εξανθήματα, κακουχία και ηωσινοφιλία. Τις προηγούμενες μέρες είχε δειπνήσει μαζί με τέσσερις φίλους του σε ένα εστιατόριο στο Μίτο της Ιαπωνίας, είχαν καταναλώσει ένα πιάτο με κρέας αρκούδας και είχαν εμφανίσει όλοι κοινά συμπτώματα. Συνολικά, εντοπίστηκαν 32 περιστατικά που είχαν καταναλώσει κρέας αρκούδας και 28 από αυτούς είχαν αξιολογηθεί από τους αρμόδιους υγειονομικούς φορείς.

Στη συνέχεια από τους 28 ασθενείς που τέθηκαν σε αξιολόγηση, οι 21 είχαν συμπτώματα, τα οποία ήταν κοινά με αυτά της τριχινέλλωσης. Τα δείγματα ορού που συλλέχθηκαν από τους ασθενείς εξετάστηκαν εις τριπλούν για αντισώματα έναντι στην *Trichinella spp.*. Ως επιβεβαιωμένο κρούσμα για την εν λόγω νόσο ορίστηκε ένας ασθενής, ο οποίος είχε ιστορικό με κατανάλωση ωμού κρέατος αρκούδας και κλινικά συμπτώματα συμβατά με τριχινέλλωση. Το ηλικιακό εύρος βρίσκονταν μεταξύ 23 έως 58 ετών και η ενδιάμεση περίοδος επώασης ήταν 19 μέρες. Το σύνολο των ασθενών εκδήλωσαν εξανθήματα, πυρετό, μυαλγία, οίδημα προσώπου και περιφερικό οίδημα.

Ωστόσο, υπήρξαν και περιστατικά που εμφάνισαν διάρροια, επιπεφυκίτιδα καθώς και ραγοειδίτιδα κατά τη διάρκεια της επιδημίας.

Το κρέας αρκούδας προέρχονταν από μια καφέ αρκούδα (*Ursus arctos*), στο νομό Χοκάιντο το Νοέμβριο του 2016 και είχε χωριστεί σε τρία τμήματα, τα οποία συντηρήθηκαν σε ψυχή αποθήκη. Από τα τρία τμήματα τα δυο καταναλωθήκαν στη διάρκεια της επιδημίας και το πρώτο τμήμα μεταφέρθηκε σε ένα εστιατόριο στο Μίτο.

Στη συνέχεια το κρέας μαγειρέφθηκε, διατηρήθηκε και ξαναζεστάθηκε. Το βιομηχανικό πρότυπο της Ιαπωνίας καθορίζει τη θερμοκρασία αποθήκευσης ως όχι κάτω από το 0° C και της κατάψυξης ως <-20° C. Επιπλέον, το εν λόγω κρέας χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση της *Trichinella spp.* από το Εθνικό Ινστιτούτο Λοιμωδών Νοσημάτων στο Τόκιο της Ιαπωνίας. Υστέρα από τεχνητή χώνεψη του συγκεκριμένου κρέατος με διάλυμα πεψίνης καθώς και μικροσκοπική εξέταση του ιζήματος εντοπίστηκαν ενθυλακωμένες προνύμφες, με την πυκνότητα τους να ανέρχεται στις 84 προνύμφες/g. [143]

- *Aspergillus flavus* (Κέννα, 2004)

Τον Απρίλιο του 2004, εκδηλώθηκε μια από τις μεγαλύτερες επιδημίες αφλατοξίκωσης σε αγροτική περιοχή της Κέννας, με συνέπεια 317 περιστατικά και 125 θανάτους. Πηγή της επιδημίας αποτέλεσε ο μολυσμένος με αφλατοξίνη αραβόσιτος που είχε καλλιεργηθεί στο σπίτι. Στη συνέχεια διεξήχθησαν έρευνες με σκοπό την ακριβή εκτίμηση της μόλυνσης. Διερευνήθηκαν συνολικά 65 αγορές και 243 πωλητές του συγκεκριμένου προϊόντος και συλλέχθηκαν 350 προϊόντα αραβόσιτου από τις περιοχές που είχαν πληγεί. Το μεγαλύτερο ποσοστό των προϊόντων αραβόσιτου είχαν υψηλότερα επίπεδα σε αφλατοξίνες συγκριτικά με τα επιτρεπόμενα όρια στην Κέννα. Ο αραβόσιτος που είχε μολυνθεί αγοράστηκε από τοπικά αγροκτήματα και εισχώρησε στο σύστημα διανομής, με συνέπεια τη διάδοση της μόλυνσης. [86]

- *Penicillium* spp.

Αποτελεί μια από τις πρώτες αναφορές 114 περιστατικών τροφικής δηλητηρίασης, η οποία οφείλεται σε κατανάλωση αποξηραμένου μολυσμένου λωτού με *Penicillium cyclospium*. Τα κύρια συμπτώματα που εμφανίσθηκαν ήταν η διάρροια, η ζάλη και η γενική κακουχία, με χρονικό διάστημα επώασης από 2 έως 6 ώρες. Μέσα από εργαστηριακές αναλύσεις δεν ανιχνεύθηκαν εντεροπαθογόνοι μικροοργανισμοί, παθογόνοι κόκκοι και *Campylobacter jejuni*. Το πλήθος των μυκήτων που προσδιορίστηκαν στην επιφάνεια αποξηραμένου λωτού ανέρχονταν στα 49.000/g, 21,3 μεγαλύτερο ποσοστό από αυτό που επιτρέπεται σε αποξηραμένους λωτούς του εμπορίου. Το *Penicillium cyclospium* ήταν ο βασικότερος μύκητας. Σε αρκετούς νοσούντες προτού επέλθει ο θάνατος παρατηρήθηκαν διάρροια και σπασμοί. [67]

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

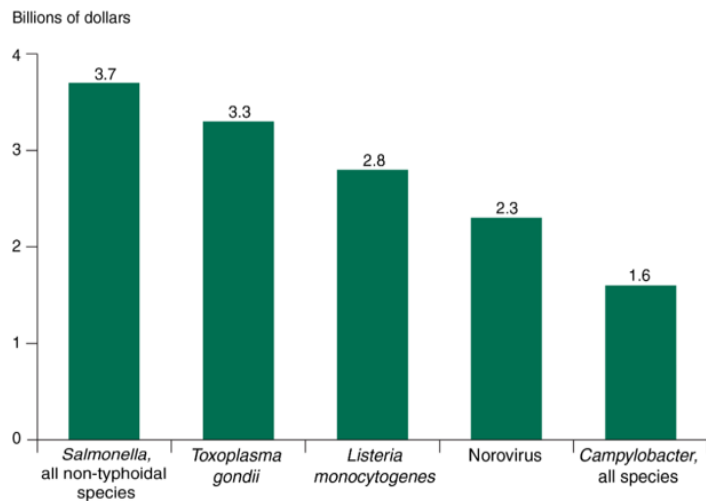
| ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ | ΤΡΟΦΙΜΑ | ³ ΤΟΞΙΝΕΣ |
|--------------------------------------|---|---|
| ΒΑΚΤΗΡΙΑ | | |
| <i>Bacillus cereus</i> | τηγανητό ή βραστό ρύζι, μαγειρεμένα κρέατα ή λαχανικά, ζυμαρικά, σάλτσα βανίλιας, γλυκά, σαλάτες, σούπες, παγωτά, βότανα και μπαχαρικά | cereulide, απλή πρωτεϊνική κυτταροτοξίνη K (CytK), τριμερής αιμολυσινή BL (Hbl) και η μη αιμολυτική εντεροτοξίνη (Nhe) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | ωμό κρέας, γαλακτοκομικά προϊόντα και πουλερικά | -- |
| <i>Clostridium botulinum</i> | κονσερβοποιημένα τρόφιμα, γάλα, παστά ψάρια και φρούτα | βοτουλινική τοξίνη (BoNT) |
| <i>Clostridium perfringens</i> | κρέατα και πουλερικά, σούπες και σάλτσες. Γενικότερα συνηθέστερες πηγές αποτελούν τα τρόφιμα που μαγειρεύονται σε μεγάλες ποσότητες και διατηρούνται σε ακατάλληλες θερμοκρασίες | α-τοξίνη (CPA) β-τοξίνη (CPB) έψιλον-τοξίνη (ETX) ιώτα-τοξίνη (ITX) εντεροτοξίνη (CPE) και τοξίνη τύπου νεκρωτικής εντερίτιδας B (NetB) Shiga (STEC) |
| ⁴ <i>Escherichia coli</i> | ωμό κρέας, μη παστεριωμένο γάλα, λαχανικά και φρούτα | |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | τρόφιμα που έχουν ψυχθεί, κρέας, πουλερικά, θαλασσινά, γαλακτοκομικά, μη παστεριωμένο γάλα καθώς και προϊόντα που έχουν παρασκευαστεί από μη παστεριωμένο γάλα και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα | -- |
| <i>Salmonella spp.</i> | αυγά, γαλακτοκομικά και θαλασσινά προϊόντα, πουλερικά και κρέας | -- |
| <i>Shigella spp.</i> | οι γαρίδες, οι πατάτες, το κοτόπουλο, ο τόνος, τα ζυμαρικά, τα φρούτα, φέτες γαλοπούλας, φασόλια, μπάλες ρυζιού, ωμά στρείδια, αλλαντικά και γάλα | τοξίνη <i>Shigella</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | μοσχαρίσιος κιμάς, χοιρινό λουκάνικο, κιμάς γαλοπούλας, μπριζόλες σολομού, γαρίδες, στρείδια, γάλα και σαλάτες τύπου delicatessen | Σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (SEs, SEA & SEE, SEG έως SEI και SER έως SET) |

³ Δεν εκκρίνουν όλοι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί τοξίνες.

⁴ EHEC/STEC.

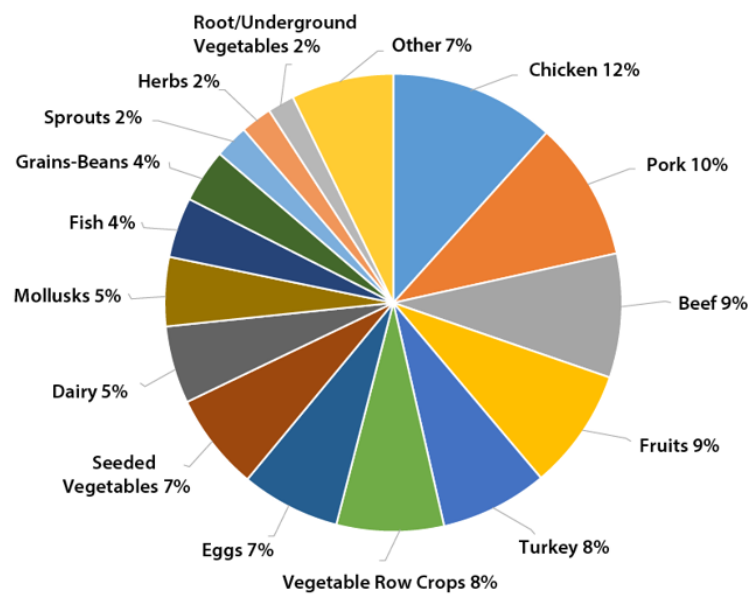
| | | |
|--------------------------------|--|--------------------|
| <i>Yersinia enterocolitida</i> | μη παστεριωμένο γάλα, στρείδια, ατελώς μαγειρεμένο χοιρινό κρέας | -- |
| ΙΟΙ | | |
| Ηπατίτιδα Α (HAV) | Νερό, οστρακοειδή, ωμά λαχανικά και φρούτα (λ.χ. μούρα) και οι σαλάτες | -- |
| Νοροϊός (NoV) | Λαχανικά, κρέας, πουλερικά, φρούτα και γαλακτοκομικά προϊόντα | -- |
| ΠΑΡΑΣΙΤΑ | | |
| <i>Cyclospora cayetanensis</i> | σμέουρα, βασιλικός, διάφορες ποικιλίες μαρουλιού, γενικότερα η μόλυνση ενδείκνυται μέσω της κατανάλωσης φρέσκων κυρίως τροφίμων που έχουν μολυνθεί από το εν λόγω παράσιτο | -- |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | ωμά ή ατελώς μαγειρεμένα κρέατα (κυρίως αρνί, χοιρινό ή άγρια θηράματα) και μη επεξεργασμένο νερό (από ποτάμια ή λίμνες) που ενδέχεται να περιέχουν το παράσιτο | -- |
| <i>Trichinella spiralis</i> | χοιρινό, αγριογούρουνο, αρκούδα, λύκο, φώκια ή θαλάσσιο ίππο, άλογο, τα οποία έχουν μολυνθεί με προνύμφες από το εν λόγω παράσιτο | -- |
| ΜΥΚΗΤΕΣ | | |
| <i>Aspergillus spp.</i> | ψωμί, μαρμελάδες, κέικ φρούτων, αποξηραμένα δημητριακά και φρούτα | Αφλατοξίνες (AFTs) |
| <i>Penicillium spp.</i> | φρέσκα φρούτα και τυριά | ωχρατοξίνη Α (OTA) |

Προσαρμοσμένο από [25, 46, 111, 112, 121, 117, 118, 140]



Τα 5 κορυφαία τροφιμογενή παθογόνα που κοστίζουν στην οικονομία των ΗΠΑ 14 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως. [145]

Πηγή: USDA, Economic Research Service



Στατιστική παρουσίαση τροφίμων (15), τα οποία αποτελούν αιτιολογικό παράγοντα για ασθένειες που προκλήθηκαν στο χρονικό διάστημα των ετών 2009-2018. [40]

Κεφάλαιο 2^ο**ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Τα τροφιμογενή παθογόνα αποτελούν μικροοργανισμούς (λ.χ. βακτήρια, μύκητες και ιοί) και κάποια παράσιτα, τα οποία μπορούν να μολύνουν τον άνθρωπο μέσω τροφής και νερού. Τροφιμογενή βακτήρια (*E.coli O157:H7*, *Salmonella enterica* κ.λπ.) αποτελούν βασικές αιτίες τροφιμογενών νόσων. Με την πάροδο των ετών, οι νόσοι που οφείλονται σε τροφιμογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς, καθίστανται δημόσιο πρόβλημα υγείας, επιφέροντας σε υψηλό ποσοστό νοσηρότητα και θνησιμότητα.

Η εκτίμηση της νόσου σε παγκόσμια κλίμακα, αναφορικά με τις τροφιμογενείς ασθένειες καθίσταται δύσκολο να υπολογισθεί, παρόλα αυτά φαίνεται ότι περίπου 1 στους 6 Αμερικανούς πολίτες των ΗΠΑ (ή 48 εκατομμύρια άτομα) νοσούν, 128.000 από αυτούς διακομίζονται στο νοσοκομείο και 3.000 άνθρωποι καταλήγουν κάθε χρόνο από τροφιμογενείς ασθένειες. Ένα ποσοστό αυτών των περιστατικών φέρεται να αποδίδεται στη μόλυνση πόσιμου νερού και τροφίμων. Παρόλο που υπάρχουν αρκετά παθογόνα τα οποία έχουν αναγνωρισθεί ότι προξενούν τροφιμογενείς ασθένειες, έχει διαπιστωθεί ότι είναι υπεύθυνοι για τη μεγάλη πλειοψηφία ασθενειών, νοσηλειών και θανάτων.

Τα υψηλά ποσοστά επιπολασμού αναφορικά με τις τροφιμογενείς ασθένειες σε πλήθος αναπτυσσόμενων χωρών υποδεικνύουν σημαντικά υποκείμενα ζητήματα ως προς την ασφάλεια των τροφίμων. Συνεπώς, καθίσταται μείζονος σημασίας ο προσδιορισμός τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών ώστε να μειωθεί η συχνότητα εκδήλωσης τροφιμογενών λοιμώξεων. [164]

Τα τρόφιμα που διαφεύγουν από την παρουσία επιβλαβών μολυσματικών ουσιών είναι υψίστης σημασίας για την ανθρώπινη ευημερία, ως απόρροια τόσο η ασφάλεια των τροφίμων όσο και η ανθρώπινη υγεία αποτελούν καίριες προτεραιότητες στην πλειοψηφία των χωρών. Η ορθή εκπαίδευση στον τομέα της υγείας, η δημοσιότητα, ο αποτελεσματικός έλεγχος ως προς τις εισαγωγές, η συνεχόμενη παρακολούθηση καθώς και η άρτια υγιεινή στους χώρους παραγωγής, πρέπει να συνοδεύονται από αποτελεσματικές διεργασίες ελέγχου των τροφίμων. Οι εκάστοτε διεργασίες θα πρέπει να μπορούν να προσδιορίσουν παθογόνους πριν ή λίγο μετά την εισδοχή τους στην

τροφική αλυσίδα, με σκοπό να απομονώνεται η μολυσματική πηγή προτού εξαπλωθεί περαιτέρω.

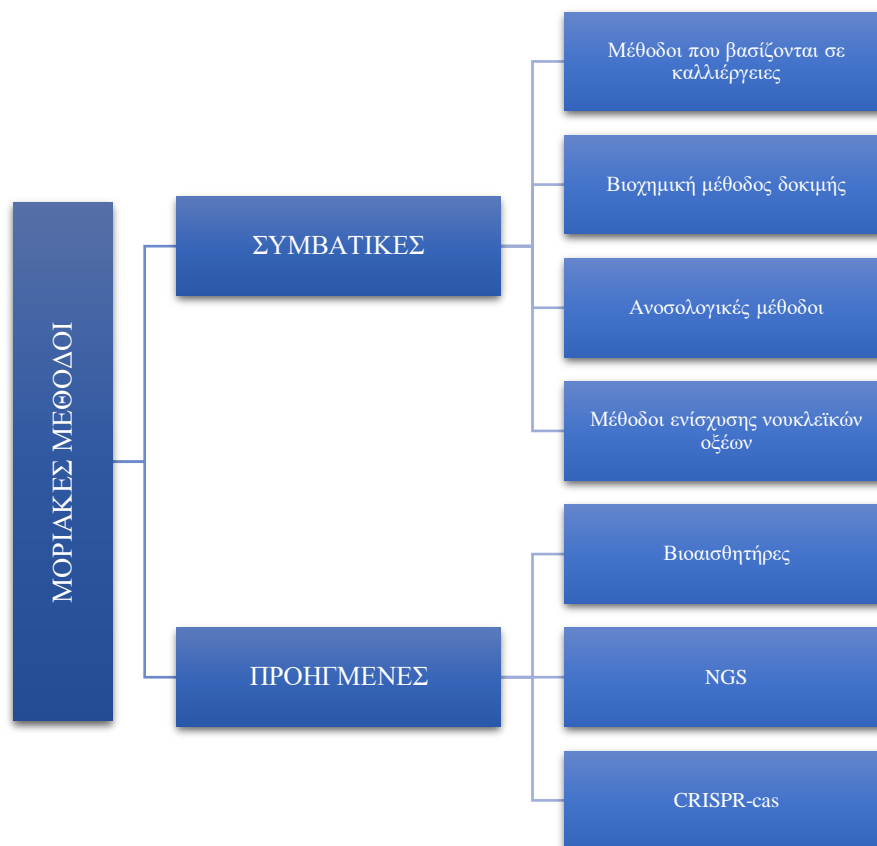
Οι παραδοσιακές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό στηρίζονται στη καλλιέργεια παθογόνων μικροοργανισμών με τη χρήση ειδικών μέσων, στην απομόνωση τους και μετέπειτα στη βιοχημική τους αναγνώριση και η χρονική τους διάρκεια κυμαίνεται από 5-7 μέρες, όπου μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα υφίσταται η περαιτέρω εξάπλωση των μικροοργανισμών, με συνέπεια να καθίσταται δυσχερής η επίβλεψη τους.

Επομένως, η ανάπτυξη και η χρήση καινοτόμων, εξειδικευμένων, απλών και συγχρόνως ευαίσθητων μεθόδων για το προσδιορισμό παθογόνων είναι αναγκαία για τις βιομηχανίες τροφίμων καθώς και από τους αρμόδιους φορείς, με στόχο την προστασία της υγείας και την ασφάλεια του καταναλωτή.

Πρόσφατα οι τεχνολογίες που έχουν αναπτυχθεί μπορούν να διακριθούν σε δυο κατηγορίες, τις μοριακές μεθόδους και τους βιοαισθητήρες, με τη δεύτερη κατηγορία να φέρει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μεθόδων, καθώς είναι πιο γρήγοροι, εύκολη στη χρήση, οικονομικοί και καταναλώνουν μικρότερα ποσά ενέργειας. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τους βιοαισθητήρες δεν είναι πάντοτε αξιόπιστα και ενδεχομένως να χρειαστεί η ανάπτυξη εξειδικευμένων βιοαισθητήρων για το εκάστοτε τρόφιμο. [163]

Οι εν λόγω μέθοδοι μπορούν να διακριθούν στις παρακάτω κατηγορίες: μέθοδοι με βάση τα νουκλεϊκά οξέα, ανοσολογικές μέθοδοι και μέθοδοι που βασίζονται στους βιοαισθητήρες. [164]

Το παρόν κεφάλαιο παραθέτει τις μοριακές μεθόδους (συμβατικές και σύγχρονες), αξιολογώντας την ικανότητα τους ως προς τον προσδιορισμό και την αναγνώριση παθογόνων μικροοργανισμών. [163]



Εικόνα 22 Διάκριση μοριακών μεθόδων

2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας

Η καλλιεργητική μέθοδος αποτελεί μια από τις παλαιότερες τεχνικές που πιστοποιεί την ύπαρξη τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα που έχουν μολυνθεί. Είναι μια μέθοδος διαδοχικού εμπλουτισμού που απαρτίζεται από επιλεκτικές και διαφοροποιημένες καλλιέργειες, με την επιβεβαίωση και ταξινόμηση του εκάστοτε στελέχους. Διακρίνεται σε δυο κατηγορίες:

- τον εκ των προτέρων εμπλουτισμό, ο οποίος επαναφέρει τα κύτταρα που έχουν υποστεί τραυματισμό, με συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης του παθογόνου-στόχου σε δείγματα τροφίμων και
- τον εκλεκτικό εμπλουτισμό, ο οποίος χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τη βελτίωση της ποσότητας ορισμένου παθογόνου σε δείγματα τροφίμων.

Οι συνθήκες καλλιέργειας καθορίζονται από διάφορα θρεπτικά στοιχεία στα μέσα, τη θερμοκρασία, την ατμόσφαιρα και το χρονικό διάστημα επώασης.

Η μέθοδος που είναι βασισμένη στη καλλιέργεια αποτελεί την κύρια μέθοδο για την ανάπτυξη κάθε εναλλακτικής μεθόδου για το προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων

μικροοργανισμών και είναι αποδοτικότερη οικονομικά. Όπως ήδη έχει αναφερθεί ο προσδιορισμός τροφιμογενών παθογόνων με μέσα που στηρίζονται στις καλλιέργειες είναι χαρακτηριστική και εκλεκτική, η οποία εξαλείφει την εξέλιξη των περιττών μικροβίων εφαρμόζοντας ένα διαφορετικό υπόστρωμα για το προσδιορισμό συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών, π.χ., το θρεπτικό μέσο Rogosa εφαρμόζεται με σκοπό τη διάκριση του γένους *Lactobacillus* από τα μη γαλακτικά βακτήρια. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς το οξικό νάτριο, το οξικό οξύ και οι επιλεκτικοί αναστολείς όπως η νιτρώδης πολυμυξίνη Β εξαλείφουν την εξέλιξη μη γαλακτικών βακτηρίων.

Η μέθοδος με βάση την καλλιέργεια επιδεικνύει μια πιο άμεση διάκριση με γνώμονα το χρώμα. Για παράδειγμα οι αποικίες μωβ ή μπλε χρώματος σε αγαρ Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) τεκμηριώνουν την ύπαρξη του παθογόνου *Yersinia enterocolitica*. Το βασικό μειονέκτημα της εν λόγω μεθόδου καθίσταται ο χρόνος που απαιτείται, γεγονός που οφείλεται στην αργή εξέλιξη των μικροβίων, καθώς μια καλλιέργεια μπορεί να διαρκεί από 18-24 ώρες έως και μέρες. [74]

Παρόλα αυτά, οι μέθοδοι καλλιέργειας παραμένουν στις πρώτες επιλογές και ενδεχομένως να χρειάζονται και από την νομοθεσία για το προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών σε εργαστήρια ελέγχου. Επιπρόσθετα, η εφαρμογή τους ενδείκνυται για το σχηματισμό ποσοτικών και ποιοτικών στοιχείων με γνώμονα τη καλλιέργεια αναφορικά με την ύπαρξη τροφιμογενών παθογόνων. Οι καλλιεργητικές μέθοδοι καθίσταται επιτυχείς όταν οι αναπτυξιακές απαιτήσεις των παθογόνων-στόχων είναι γνωστές, ενώ τα υποστρώματα καλλιέργειας εφαρμόζονται για τον εμπλουτισμό, την εκλεκτική απομόνωση ή το διαχωρισμό των παθογόνων-στόχων. Επιπλέον, οι καλλιέργειες δύναται να υπόκεινται σε ελέγχους όσον αφορά τα αποικιακά χαρακτηριστικά, αντιδράσεις χρώσης κατά Gram, βιοχημικός προσδιορισμός και MALDI TOF MS και αλληλουχία PCR για λόγους ταυτοποίησης.

Οι εν λόγω μέθοδοι δεν διαθέτουν υψηλή ευαισθησία, καθώς κάποιοι μικροοργανισμοί δεν είναι καλλιεργήσιμοι. Ορισμένοι καλλιεργήσιμοι μικροοργανισμοί (*S. typhi* και *E. coli*) ενδεχομένως να υπάρχουν ως VBNC. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υποεκτιμηθούν ή ακόμα και να μην προσδιοριστούν τροφιμογενή παθογόνα επιφέροντας αρκετούς κινδύνους. [8]

Για την επίτευξη της καλλιέργειας, της απομόνωσης, της καταμέτρησης και της ανάπτυξης ενός μικροβίου-στόχου, οι μέθοδοι που βασίζονται στη καλλιέργεια εφαρμόζουν εξειδικευμένα υγρά ή στερεά καλλιεργητικά μέσα, ενώ παράλληλα, εμποδίζουν το σχηματισμό επιπρόσθετων μικροβίων που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα. Ως προς τη διαδικασία ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών, εφαρμόζονται καλλιέργειες προ-εμπλουτισμού, επιλεκτικές καλλιέργειες εμπλουτισμού και επιλεκτικές μολύνσεις. Εν συνεχεία, εφαρμόζονται η βιοχημεία και η ορολογία προκειμένου να επικυρωθούν τα αποτελέσματα. Για την κατανόηση της καλλιέργειας τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, υπάρχει ένα ευρύ φάσμα προσεγγίσεων.

Μια από τις θεμελιώδεις μικροβιολογικές μεθόδους αποτελεί η καλλιέργεια βακτηρίων και μυκήτων *in vitro* σε θρεπτικά υλικά, γεγονός το οποίο οφείλεται στην απλότητα και ευθύτητα του προσδιορισμού τους. Με τη συγκεκριμένη προσέγγιση τα τροφιμογενή παθογόνα προσδιορίζονται όταν καλλιεργηθούν σε πλάκες άγαρ, μια διαδικασία η οποία ακολουθείται από επιμέρους ειδικές βιοχημικές και ορολογικές δοκιμές για την επιπλέον αναγνώριση των μικροοργανισμών.

Τα μέσα αγαρ αποτελούν το ιδανικό μέσο ως προς την καλλιέργεια των βακτηρίων, έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αποικιών στη περίπτωση που τα βακτήρια αναπτυχθούν σε αυτό το μέσο. Συγκριτικά με τα βακτήρια, οι μύκητες είναι πιο ποικιλόμορφοι και αντίστοιχα πιο φιλικοί στην καλλιέργεια. Όπως ήδη έχει αναφερθεί τα βακτήρια και οι μύκητες που προξενούν νοσήματα στον άνθρωπο διακρίνονται με βάση τη μορφολογία τους, τη μορφή των κυττάρων τους και την ικανότητα ανάπτυξης τους. Ως επακόλουθο από το πρωτοποριακό έργο του Robert Koch, έχουν οριστεί κάποια πρότυπα, τα οποία πρέπει να τηρούνται προκειμένου ένας παθογόνος μικροοργανισμός που προξενεί ασθένειες, που ενίοτε αναφέρεται και ως αξίωμα του Koch.

Έχουν αναπτυχθεί αρκετά φθορίζοντα/χρωμογόνα υλικά με σκοπό την αντικατάσταση των παραδοσιακών καλλιεργειών ώστε να καταργηθεί η υποχρέωση για υποκαλλιέργειες και βιοχημικές εξετάσεις για την μικροβιακή ταυτοποίηση. Αρκετοί μύκητες και βακτήρια εντοπίζονται σε πληθώρα δειγμάτων.

Οι εργαζόμενοι στο χώρο των εργαστηρίων, θα εξετάσουν τα συγκεκριμένα δείγματα, θα προσδιορίσουν, θα απομονώσουν και θα διακρίνουν τις βακτηριακές ή μυκητιασικές νόσους με βάση τις παραδοσιακές καλλιέργειες. Με εφαρμογή

φθοριογόνων/χρωμογόνων υλικών, χρειάζεται η εφαρμογή απειροελάχιστης ποσότητας του εκάστοτε υλικού προκειμένου να επιτευχθεί η αναγνώριση μούχλας και βακτηρίων. Τόσο για ένα ζυμό καλλιέργειας είτε για ένα μέσο αγαρ, η ύπαρξη μικροβίων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα από την εμφάνιση φθορισμού ή χρώματος.

Κατά τη διαδικασία της υδρόλυσης φθοριογόνου ή χρωμογόνου υποστρώματος από εξειδικευμένο ένζυμο που σχηματίζεται από τους μικροοργανισμούς, προκύπτει ένα φωτεινό ή έγχρωμο προϊόν.

Δεδομένου ότι η δράση αρκετών ενζύμων δεν είναι συγκεκριμένη για το είδος, ενδείκνυται η εφαρμογή παραγόντων διαλογής ή ενζυμικής ενεργότητας που είναι συμπληρωματική ή δευτερογενής της δράσης του ενζύμου με σκοπό τον προσδιορισμό του ενδιαφερόμενου είδους. Στα χρωμογόνα μέσα οι επιλεκτικοί παράγοντες (λ.χ. αντιβιοτικά) εφαρμόζονται για την παροχή τόσο θετικών όσο και αρνητικών επιλογών και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορούν να ενισχύουν το σχηματισμό βακτηρίων-στόχων αλλά και να ανακόπτουν το σχηματισμό μη βακτηριακών-στόχων στη μήτρα του εκάστοτε δείγματος. Η πλειοψηφία των ερευνών αναφορικά με τις χρωμογόνες ικανότητες των ενζύμων εστιάζεται στις βακτηριακές υδρολάσες (β-γλυκοσιδάση ή β-γαλακτοσιδάση). Σαν συνέπεια της αντίδρασης ανάμεσα στο χρωμογόνο υπόστρωμα και στο βακτηριακό ένζυμο είναι το ζωηρό χρώμα που αποκτά το υπόστρωμα. Οι αποικίες διαχωρίζονται ακόμη περισσότερο από την ύπαρξη του ενζύμου που προσδιορίζει συγκεκριμένα το υπόστρωμα.

Από μελέτες που διεξήχθησαν από το Τμήμα Ελέγχου Ασθενειών στο Παρίσι, το αγαρ Rambach (CHROMagar) και το μέσο SM-ID αποτέλεσαν τα πρώτα χρωμογόνα που εφαρμοσθήκαν για τον προσδιορισμό της μη τυφοειδούς σαλμονέλας το 1993. Πλέον στο εμπόριο διατίθενται πλήθος εμπορικών φθοριογόνων και χρωμογόνων μέσων, τα οποία μπορούν να εφαρμοσθούν για το προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών.

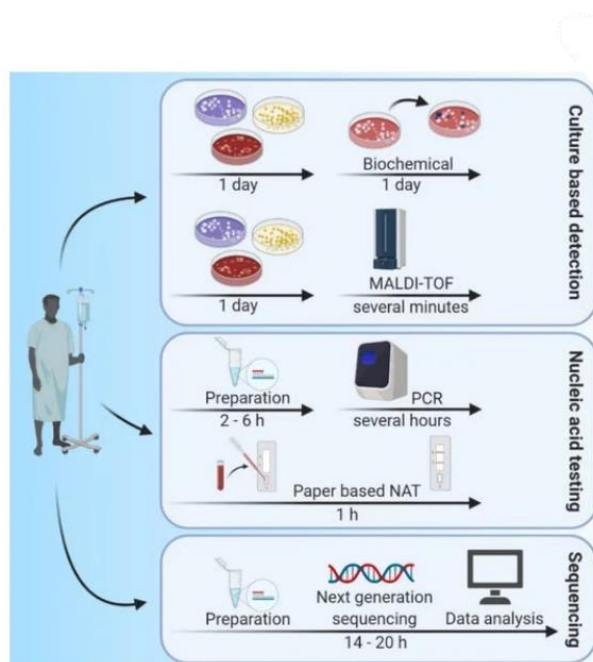
Στη πράξη, η καλλιεργητική μέθοδος συνεχίζει να είναι μια καθιερωμένη μέθοδος για τον έλεγχο της ζωτικότητας των παθογόνων. Παρόλα αυτά η δυνατότητα των μικροοργανισμών να εντοπίζουν βλάβες ή μια κατάσταση στην οποία είναι μεν βιώσιμοι αλλά δεν επιδέχονται καλλιέργεια μπορεί να επηρεαστεί σε σημαντικό βαθμό.

Τα βακτήρια μεταβαίνουν στη μη καλλιεργήσιμη κατάσταση στην περίπτωση που οι συνθήκες περιβάλλοντος είναι δυσμενείς, για το λόγο αυτό δεν ενδείκνυται η ανάπτυξη των βακτηρίων σε κανονικό θρεπτικό μέσο εξαιτίας της αδυναμίας τους για επιβίωση.

Ενδεχομένως να χρειαστεί αρκετός χρόνος, προκειμένου να αναπτυχθούν οι παθογόνοι και να σχηματίσουν ορατές αποικίες καθώς και να προστεθεί χρωμογόνο υπόστρωμα σε καλλιεργητικό διάλυμα, σε συνάρτηση:

- με τη ταχύτητα που αναπτύσσεται μια αποικία έως ότου σχηματίσει μια ορατή αποικία και
- με το χρόνο που απαιτείται, προκειμένου ένα ένζυμο να παράγει φθορισμό ή χρώμα, όταν προσδεθεί το χρωμογόνο υπόστρωμα.

Η συγκεκριμένη μέθοδος καλλιέργειας χρειάζεται αρκετό εξοπλισμό, προκειμένου να εξασφαλισθεί ότι οι καλλιέργειες θα αναπτυχθούν άρτια και ότι τα δεδομένα που θα προκύψουν μπορούν να ερμηνευθούν ορθά. Λοιποί παράμετροι που ενδέχεται να δυσχεραίνουν την απομόνωση παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα τροφίμων αποτελούν ο χαμηλός αριθμός παθογόνων μικροοργανισμών και η άνιση κατανομή τους. Οι μικροβιολόγοι έχουν εστιάσει σε άλλες μεθόδους ανεξάρτητες από τις καλλιεργητικές τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας της βραδείας και μειωμένης ακρίβειας για το προσδιορισμό των παθογόνων μικροοργανισμών. Παρά το μικρό κόστος, την ευαισθησία και την επιλεκτικότητα με χρωμογόνα, οι μέθοδοι που βασίζονται σε καλλιέργειες και αποικίες απαιτούν χρόνο και ενδέχεται να επιφέρουν μικροβιακές επιμολύνσεις, οι οποίες μπορούν να παρεμποδίσουν το σχηματισμό παθογόνων μικροοργανισμών. [52]



Εικόνα 23 Χρονοδιαγράμματα μεθόδων, παραδοσιακών και σύγχρονων [126]

2.2 Βιοχημική Μέθοδος Δοκιμής

Η βιοχημική δοκιμή αποτελεί μέθοδο που προάγει την ανάπτυξη, κατά την οποία οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως σήματα υποδηλώνουν την ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών και παρεμποδίζουν την εξέλιξη των ανταγωνιστικών μικροβίων. Ενίστε, συμπεριλαμβάνει μια τεχνική καλλιεργητικής μεθόδου, κατά την οποία το εκάστοτε παθογόνο εκκολάπτεται σε υγρό ή στερεό υπόστρωμα. Υπάρχουν αρκετές βιοχημικές διεργασίες που πιστοποιούν την ύπαρξη ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα και δείγματα αυτών, κάποιες από αυτές παραθετονται στο παρακάτω πίνακα.

| Βιοχημική δοκιμή | Χημικά χαρακτηριστικά | Χημική αντίδραση | Μέσο | Χρώμα |
|--------------------------------|--|---|---|-----------------------|
| Οξειδάση | Αναγνώριση του ενζύμου κυτοχρωμική οξειδάση | Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων | Άγαρ | Μωβ |
| Καταλάση | Αποτοξίνωση υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο | Φυσαλίδες οξυγόνου | Άγαρ αίματος | - |
| Παραγωγή ινδόλης | Αποικοδόμηση αμινοξέος τρυπτοφάνης και παραγωγή ινδόλης | Οξείδωση τρυπτοφάνης | Τρυπτοφά -νη | Ροζ, κόκκινο ή κεράσι |
| Δοκιμή κόκκινου μεθυλίου | Ζύμωση σακχάρου | Οξείδωση γλυκόζης | Κόκκινο μεθύλιο και ζωμός Voges-Proskauer (MR-VP) | Κόκκινο |
| Δοκιμασία Voges-Proskauer | Παραγωγή όξινου ή ουδέτερου τελικού προϊόντος | Ζύμωση σακχάρων μέσω της διόδου βουτανολιόλης | Κόκκινο μεθύλιο και ζωμός Voges-Proskauer (MR-VP) | Κόκκινο |
| Άγαρ σιδήρου με τριπλό σάκχαρο | Παραγωγή H ₂ S | Δραστηριότητα κυτοχρωμικής οξειδάσης | Τριπλό άγαρ σιδήρου με σάκχαρο | Κίτρινο |
| Πλάκες άγαρ αίματος | Παραγωγή αιμολυσινών | Δραστηριότητα αιμόλυσης | Άγαρ αίματος | Άχρωμο |
| Άγαρ άλατος μαννιτόλης | Σχηματισμός όξινων υποπροϊόντων | Ζύμωση μαννιτόλης | Mannitol salt άγαρ | Κίτρινο |

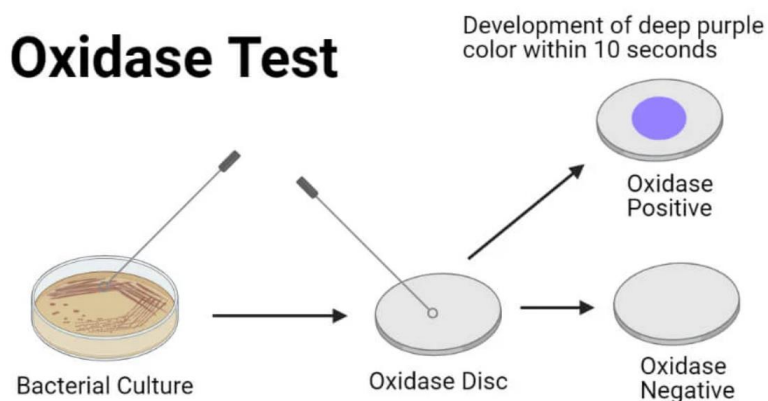
| | | | | |
|--------------------------------|--|----------------------------|---------------------------|---------|
| Δοκιμασία υδρόλυσης αμύλου | Σχηματισμός αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης | Υδρόλυση αμύλου σε σάκχαρο | Άμυλο άγαρ | Κίτρινο |
| Δοκιμασία υδρόλυσης γαλακτόζης | Παραγωγή γλυκόζης | Υδρόλυση γαλακτόζης | Μπλε μεθυλενίο -υ ηωσίνης | Πράσινο |
| Ζύμωση υδατανθράκων | Εκχύλιση λιπαρών οξέων | Ζύμωση μαννιτόλης | Πεπτόνη πρωτεόζης | Κίτρινο |
| Χρήση κιτρικών αλάτων | Εφαρμόζει πηγή κιτρικού άνθρακα | Ζύμωση κιτρικού άλατος | Κιτρικό άγαρ του Simmon | Μπλε |

Πίνακας 2 Βιοχημικές διεργασίες [74]

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB), που έχουν απομονωθεί από γαρίδες και ψαριά, ενδείκνυται με την ικανότητα παραγωγής ποικίλων ενζύμων, αμμωνίας, ινδόλης, αερίων και οξέων.

Επιπρόσθετα, πτητικές ενώσεις όπως τα λιπαρά οξέα, οι αλκοόλες, οι υδρογονάνθρακες, οι αρωματικές ενώσεις και οι κετόνες, εφαρμόζονται για το προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών. Η αξιολόγηση των πτητικών ενώσεων μπορεί να έχει άμεση εφαρμογή για το προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων.

Τέλος, πτητικές ενώσεις, όπως το οξικό οξύ και η αιθανόλη μπορούν να ανιχνεύσουν το παθογόνο βακτήριο *E. coli* και τον παθογόνο μύκητα *Aspergillus spp.* σε κονσερβοποιημένα τομάτα. [74]



Εικόνα 24 Δοκιμή οξειδάσης, ένα σύμπλεγμα βιοχημικών δοκιμών που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της ικανότητας των βακτηρίων να σχηματίζουν ένζυμα οξειδάσης του κυτοχρώματος c [15]

2.3 Ανοσολογικές Μέθοδοι

Η ανίχνευση των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών με τη χρήση ανοσολογικών μεθόδων στηρίζεται στην αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος, κατά την οποία ένα συγκεκριμένο αντιγόνο πρόκειται να συνδεθεί με ένα συγκεκριμένο αντίσωμα, μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό. [83]

Σε αυτή τη περίπτωση τα μονοκλωνικά αντισώματα εμφανίζουν υψηλότερο βαθμό καταλληλότητας συγκριτικά με τα πολυκλωνικά αντισώματα, ως προς την επιλογή ανίχνευσης των παθογόνων μικροοργανισμών, εξαιτίας της ειδικότητας, της αναπαραγωγιμότητας, της ευαισθησίας και της αξιοπιστίας της ανοσολογικής μεθόδου. Ως προς την εξειδίκευση και την ευαισθησία της εν λόγω μεθόδου, στηρίζονται στην επιτόπια θέση του αντισώματος που ενώνεται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Αποτελεί ταχύτατη και ισχυρή μέθοδο συγκριτικά με μεθόδους που στηρίζονται στην καλλιέργεια για τον προσδιορισμό παθογόνων καθώς επίσης και των τοξινών (π.χ. μυκοτοξίνες), η τοξίνη A, B και E του *C. perfringens*, οι τοξίνες του *C. botulinum*, οι εντεροτοξίνες του *E. coli* καθώς επίσης και οι εντεροτοξίνες A, B, C και E του *Staphylococcus aureus*. [74, 83]

Αυτό συμβαίνει καθώς μπορεί να ανιχνεύσει την πρωτεϊνική τοξίνη του εκάστοτε παθογόνου, μεταβολικές ουσίες (π.χ. πρωτεΐνες), γλυκοπρωτεΐνες καθώς και πολυσακχαρίτες οι οποίοι έχουν σχέση με την εξέλιξη του παθογόνου.

Παρόλα αυτά οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανοσολογία εμφανίζουν υψηλό κόστος, απαιτούν στάδια προ-εμπλουτισμού και ενδεχομένως να προκληθούν και ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας με άλλα αντιγόνα παθογόνων, με συνέπεια να μην μπορεί να ανιχνευθεί το κατεστραμμένο κύτταρο του παθογόνου. [74]

Η ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής, η ανοσοδοκιμασία συνδεδεμένη με ένζυμο (ELISA) και η μέθοδος western blot αποτελούν κάποιες από τις μεθόδους που στηρίζονται στην ανοσολογία, οι οποίες εφαρμόζονται πρόσφατα για τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων. [83]

2.3.1 Δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης συνδεδεμένη με ένζυμο (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

Η μέθοδος ELISA επινοήθηκε ταυτόχρονα από δυο ξεχωριστές ερευνητικές ομάδες, από τους επιστήμονες Van Weemen και Schuurs καθώς και από τους Engvall και Perlman. Η συγκεκριμένη μέθοδος εξελίχθηκε με την πραγματοποίηση μικρών αλλαγών στο ραδιοανοσολογικό προσδιορισμό (RIA), το οποίο επιτεύχθηκε με τη συνένωση επισημασμένων αντιγόνων και αντισωμάτων με την χρήση ενζύμων αντί για ραδιενεργό ιώδιο 125. Για πρώτη φορά η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε με σκοπό να προσδιοριστούν τα επίπεδα IgG σε ορό κουνελιών. Στο ίδιο έτος οι επιστήμονες κατάφεραν να πραγματοποιήσουν τον ποσοτικό προσδιορισμό της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης στα ούρα με τη χρήση υπεροξειδάσης του χρένου. Από τότε η μέθοδος ELISA έχει πλήθος εφαρμογών και αποτελεί μια από τις πλέον συνηθισμένες τεχνικές για διάγνωση και εργαστηριακή ερευνά σε παγκόσμια κλίμακα.

Την αρχική μεθοδολογία ELISA αποτελούσαν τα χρωμογόνα μόρια αναφοράς και τα υποστρώματα με σκοπό τη δημιουργία μια χρωματικής αλλαγής που ακολουθεί την ύπαρξη αντιγόνου.

Η πρόσφατη εξέλιξη που έλαβε χώρα το 2012, αφορά μια αρκετά ευαίσθητη μέθοδο ELISA στηριζόμενη στο ένζυμο που μπορεί να χειριστεί νανοσωματιδία σαν χρωμογόνους αναφέροντες. Η συγκεκριμένη τεχνική έχει τη δυνατότητα παραγωγής έγχρωμου σήματος, το οποίο είναι ορατό με γυμνό μάτι. Πιο συγκεκριμένα το μπλε χρώμα υποδεικνύει θετικά αποτελέσματα και το κόκκινο υποδεικνύει τα αρνητικά αποτελέσματα, παρόλα αυτά η εν λόγω τεχνική δύναται να προσδιορίσει την ύπαρξη ή όχι ενός αναλυτή και όχι τα επίπεδα συγκέντρωσης του.

Οι μέθοδοι ELISA πραγματοποιούνται σε πλάκες πολυστυρενίου. Συνήθως οι πλάκες αυτές είναι 96 κοιλοτήτων με επικάλυψη, δεσμεύοντας με ισχύ μια πρωτεΐνη. Ανάλογα με τους τύπους ELISA που εφαρμόζονται, η διαδικασία χρειάζεται ένα:

- πρώτο ή/και δεύτερο αντίσωμα ανίχνευσης,
- αντιγόνο,
- αντίσωμα/αντιγόνο για επικάλυψη,
- ρυθμιστικό διάλυμα,
- πλύση και ένα
- υπόστρωμα/χρωμογόνο.

Το πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιείται για ανίχνευση είναι ένα εξειδικευμένο αντίσωμα, το οποίο δεσμεύεται μόνο στην ενδιαφερόμενη πρωτεΐνη. Όσον αφορά το

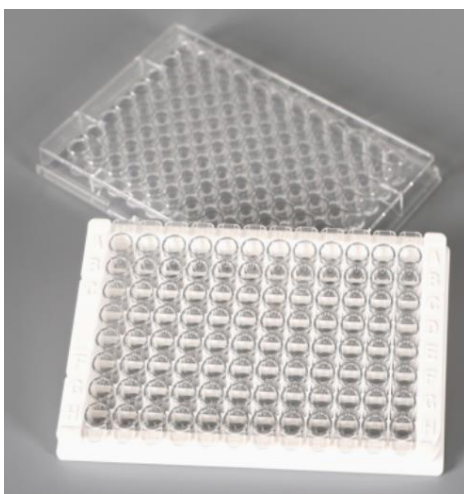
δευτερογενές αντίσωμα, προσδένεται σε δεύτερο συζευγμένο ενζυμικά αντίσωμα το οποίο με τη σειρά του προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα το οποίο δεν είναι συζευγμένο ενζυμικά.

Για την ολοκλήρωση μιας ανοσοδοκιμασίας ELISA υπάρχουν τέσσερα γενικά βασικά στάδια. Τα στάδια αυτά περιλαμβάνουν:

- Επικάλυψη (με αντιγόνο ή αντίσωμα),
- περίφραξη (συνήθως επιτυγχάνεται με τη προσθήκη αλβουμίνης ορού από βοοειδή BSA),
- προσδιορισμός και
- τελική ανάλυση

Ο προσδιορισμός επιτυγχάνεται με την πρόσθεση ενός υποστρώματος, το οποίο ενδείκνυται στη παραγωγή χρώματος. Υπάρχουν αρκετά υποστρώματα, τα οποία είναι διαθέσιμα για εφαρμογή στον προσδιορισμό ELISA. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα είναι η αλκαλική φωσφατάση (AP) και η υπεροξειδάση του χρένου (HRP). Η AP μπορεί να μετράει το κίτρινο χρώμα της νιτροφαινόλης ύστερα από περίοδο επώασης σε θερμοκρασίες δωματίου σε χρονικό διάστημα μεταξύ 15 λεπτών.

Στα προαναφερθέντα στάδια πραγματοποιείται εκπλύση της πλάκας με εφαρμογή ενός ρυθμιστικού διαλύματος, π.χ. ο φυσιολογικός ορός, ο οποίος έχει ρυθμιστεί με φωσφορικά άλατα (PBS) και μη ιοντικό απορρυπαντικό, προκειμένου να απομακρυνθεί το μη δεσμευμένο υλικό. Τα φρεάτια εκπλένονται δυο ή περισσότερες σε κάθε στάδιο, ανάλογα και με το πρωτόκολλο που ορίζεται.



Εικόνα 25 «Φρεάτια» ELISA [1]

Σε ένα κοινό πρωτόκολλο ELISA, μια κατά σειρά αραίωση συγκεντρώσεων κατατάσσονται στα φρεάτια της πλάκας. Αφού γίνει η μέτρηση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιείται ο σχεδιασμός μιας πρότυπης καμπύλης από τα στοιχεία που έχουν προκύψει από τις κατά σειρά συγκεντρώσεις στον άξονα x εφαρμόζοντας κλίμακα log και αντίστοιχα στον άξονα y εφαρμόζοντας τη γραμμική κλίμακα. [9]

Όπως ήδη έχει αναφερθεί η ELISA αποτελεί μια ανοσολογική τεχνική που προσδιορίζει σε δείγματα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος εφαρμόζοντας την ευαισθησία μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιεί:

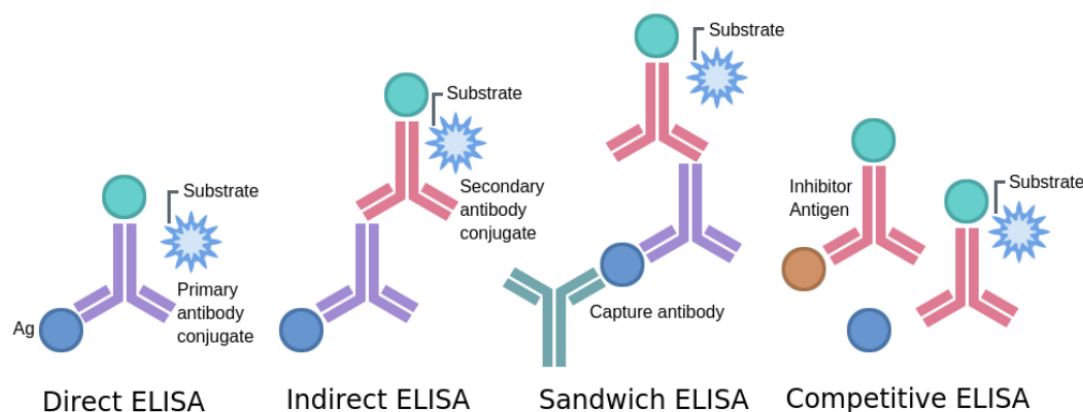
- μικρότιτλο ως στερεό φορέα,
- πέλματα,
- μεμβράνες,
- δείκτες εμβάπτισης,
- στερεές μήτρες και
- ρύγχη πιπέτας.

Τα πιο χρησιμοποιούμενα ένζυμα αποτελούν η β-γαλακτοσιδάση, η υπεροξειδάση και η αλκαλική φωσφατάση.

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την προσκόλληση των δειγμάτων ομοιοπολικά σε επιστρωμένες με αντιγόνο πλάκες μικροτιτλοδότησης σε αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα, τη χρησιμοποίηση αντισωμάτων κατά των παθογόνων αντιγόνων που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια καθώς και των προσδιορισμό συμπλόκων φθορισμού αντιγόνου-αντισώματος με τη βοήθεια υπεριώδους φωτός. Σε αυτή τη δοκιμασία μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη ή τοξική ουσία ενώνεται με το αντίστοιχο αντιγόνο, στη συνέχεια η δοκιμασία παράγει χρώματα τα οποία μπορούν να γίνουν αντιληπτά με γυμνό μάτι και κατ' επέκταση το μήκος κύματος των χρωμάτων να προσδιορισθεί από έναν αναγνώστη ELISA.

Η ποσοτική ανίχνευση του πλήθους των παθογόνων σε δείγματα τροφίμων μπορεί να μετρηθεί από το πλήθος των απορροφήσεων, το οποίο είναι ανάλογο προς το πλήθος των παθογόνων μικροοργανισμών. Η μέθοδος ELISA εμφανίζει υψηλή ειδικότητα, είναι ταχύτατη, λιγότερο απαιτητική καθώς επίσης και ικανή να χρησιμοποιεί μεγάλο αριθμό δειγμάτων με σκοπό το προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών από ένα δείγμα τροφίμων. Παρόλα αυτά το όριο ευαισθησίας, η μεταβλητότητα του αντιγόνου

καθώς και η δυσκολία αναφορικά με τη μέτρηση της ενζυμικής ισχύος, αποτελούν ορισμένα από τα δυσμενή σημεία αυτής της μεθόδου. Η συγκεκριμένη μέθοδος απαιτεί την ελάχιστη ευαισθησία ενός συμβατικού φορέα όσον αφορά την παραγωγή αντιγόνων σε κυτταρικές επιφάνειες και την ανίχνευση τους. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι ELISA, όπως η έμμεση, η άμεση, σάντουιτς και η ανταγωνιστική ELISA. [74]



Εικόνα 26 Τύποι ELISA [130]

2.3.1.1 Άμεση ELISA

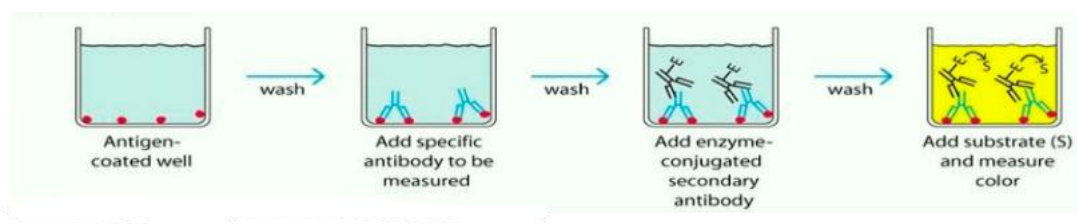
Η ELISA είναι μια τεχνική κατά την οποία τα καθαρισμένα και απομονωμένα δείγματα (αναλυτής) προσδένονται σε ένα «φρεάτιο» στερεής επιφάνειας και εν συνεχεία εισέρχονται στην ανάλυση πολυκλωνικά αντισώματα ενζυμικά επισημασμένα. Η εν λόγω μέθοδος ενδείκνυται για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε σκευάσματα παιδικών τροφών, με τη χρήση του αντισώματος MVK31 (IgG), το οποίο αναπτύχθηκε κατά του ημικαρβαζιδίου. [74]

2.3.1.2 Έμμεση ELISA

Η έμμεση ELISA αποτελεί μια μέθοδο που χρειάζεται ένα και μόνο αντίσωμα, το οποίο στρέφεται ενάντια σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο που έχει αδρανοποιηθεί σε μια επιφάνεια. Στη συνέχεια τα αντισώματα-στόχοι προσδένονται στα επικαλυπτόμενα αντιγόνα και τα μη δεσμευμένα αντισώματα εκπλένονται σε αυτή τη δοκιμή. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην έμμεση ELISA περιλαμβάνουν το ένζυμο αντι-ανοσοσφαιρίνη, ένζυμο υπεροξειδάσης και ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος.

Τα ρυθμιστικά υποστρώματα παράγουν χρώμα, το μήκος κύματος του χρώματος μπορεί να μετρηθεί με ένα φασματοφωτόμετρο, το οποίο είναι αντίστοιχο με το επίπεδο

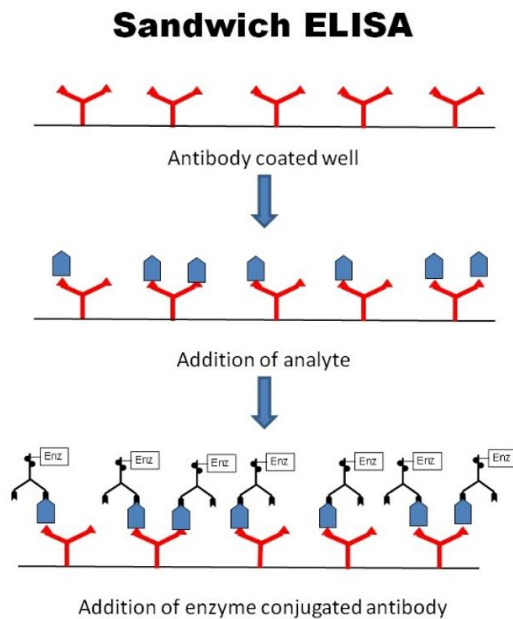
αντισωμάτων που προσδιορίζονται στο κάθε δείγμα. Η μέθοδος αυτή μπορεί να ανιχνεύσει τη *Salmonella enterica* σε τρόφιμα, κυρίως σε αυγά, γαλακτοκομικά προϊόντα, κοτόπουλο, στηριζόμενη στο μονοκλωνικό αντίσωμα 4E6F11, το οποίο προσδένεται σε συγκεκριμένου τύπου αντιγόνα. [74]



Εικόνα 27 «Λειτουργία» έμμεσης ELISA [47]

2.3.1.3 Sandwich ELISA

Η συνδεδεμένη ενζυμικά ανοσοπροσροφητική δοκιμή «sandwich» αποτελεί μια τεχνική που εφαρμόζει δυο αντισώματα ενάντια ενός μόνο αντιγόνου. Το πρώτο αντίσωμα εφαρμόζεται με σκοπό την αλληλεπίδραση με το μόριο-στόχο και το δεύτερο αντίσωμα σε συνδυασμό με ένα ένζυμο ορίζουν με ακρίβεια το μόριο-στόχο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη παραγωγή ενός «sandwich», όπως ένα σύμπλεγμα πρώτου αντισώματος μορίου-στόχου και δευτέρου αντισώματος. Ο χρωματικός σχηματισμός του μορίου-στόχου σε συνδυασμό με το ένζυμο-υπόστρωμα πιστοποιεί την ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα τροφίμων. Συγκριτικά με άλλες μεθόδους ELISA εμφανίζει την υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα. Η συγκεκριμένη δοκιμασία ενδείκνυται για τον προσδιορισμό *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, σε δείγματα τροφίμων όπως φρούτα, λαχανικά, κρέας και ρύζι. [74]



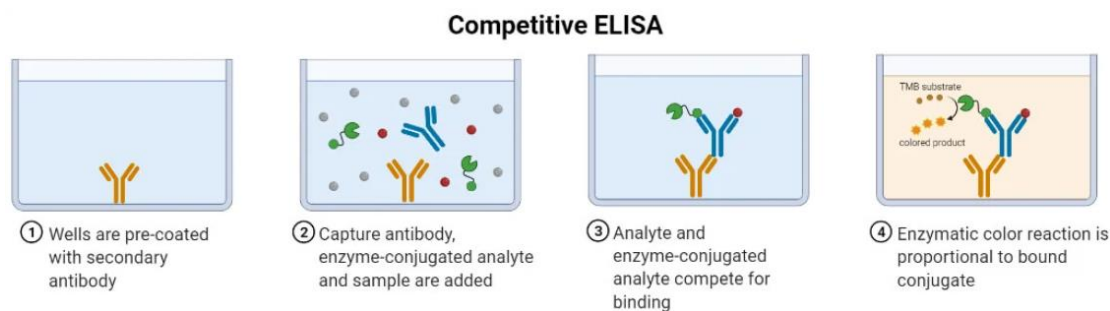
Εικόνα 28 Διαγραμματική απεικόνιση sandwich ELISA. Με την προσθήκη υποστρώματος ενζύμου επιτυγχάνεται η ανάπτυξη χρώματος. Η απορρόφηση είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του αναλυτή [45]

2.3.1.4 Ανταγωνιστική ELISA

Η ανταγωνιστική (ή συναγωνιστική) ανοσοπροσροφητική ενζυμική ανάλυση αποτελείται σε τρία βασικά τμήματα:

- ένα συγκεκριμένο αντίσωμα, το οποίο προσδένεται σε ένα αντιγόνο-στόχο,
- ένα ανταγωνιστικό αντιγόνο, το οποίο ανταγωνίζεται ως προς τη πρόσδεση στο συγκεκριμένο αντίσωμα και
- ένα τμήμα που μετατρέπει το σήμα που καθορίζει ποσοτικά την εκπομπή σήματος.

Η συγκεκριμένη δοκιμή λαμβάνει χώρα σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο ακολουθείται το πρωτόκολλο της έμμεσης ELISA, όπου παράγεται υψηλή άλλα ανειδίκευτη δέσμευση και στο δεύτερο στάδιο, τα ανταγωνιστικά αντιγόνα με αντισώματα που εφαρμόζουν σήμα. Εφαρμόζεται κυρίως για την ανάλυση παθογόνων στα τρόφιμα εξαιτίας του φθηνού κόστους, της μεγάλης απόδοσης, των άμεσων ενδείξεων και της εξαιρετικής εξειδίκευσης. Ένα παράδειγμα αναφορικά με την εφαρμογή της αποτελεί η ανίχνευση του παθογόνου *E. coli* O157:H7 στο γάλα. [74]



Εικόνα 29 Στάδια competitive ELISA [17]

2.3.2 Ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής (Later Flow Immunoassay, LFIA)

Οι ανοσοδοκιμασίες πλευρικής ροής (LFIA) αποτελούν ένα βασικό εργαλείο όσον αφορά την ταχύτατη διάγνωση. Οι συγκεκριμένες συσκευές δε χρειάζονται καταρτισμένη εκπαίδευση ή εξοπλισμό προκειμένου να λειτουργήσουν και να δώσουν αποτελέσματα σε χρονικό διάστημα λίγων λεπτών, αφότου εφαρμοσθεί το δείγμα. Είναι ιδανικό για πολλούς τύπους οικιακών δοκιμαστικών σετ, για υπηρεσίες με σκοπό την αντιμετώπιση έκτακτων συμβάντων καθώς και για κατασκευαστές και παραγωγούς τροφίμων, οι οποίοι αναζητούν ταχύτατη αξιολόγηση συγκεκριμένου δείγματος.

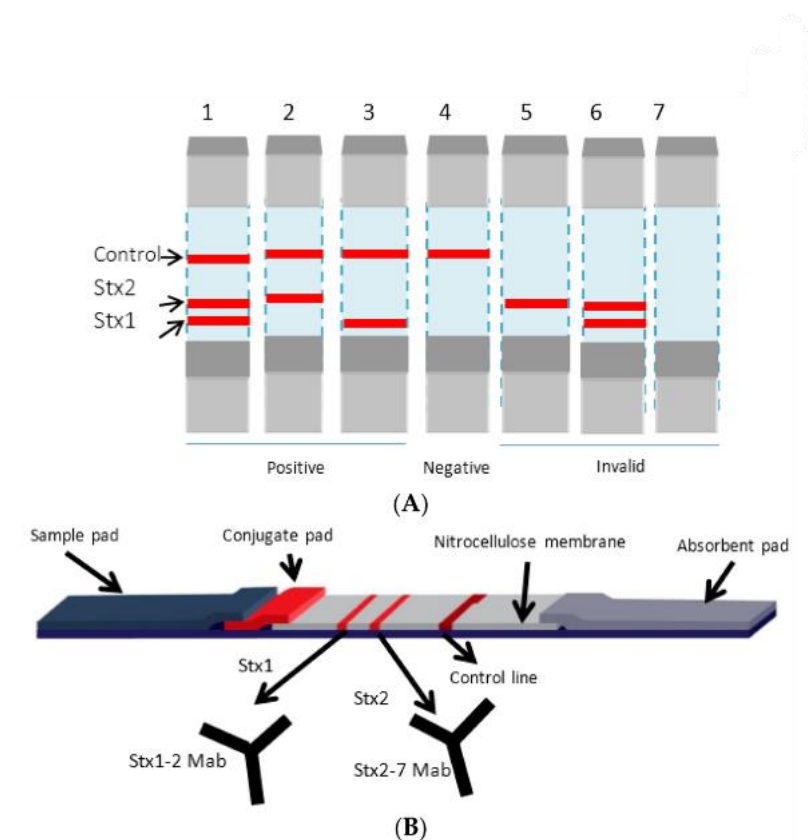
Οι LFIA στηρίζονται στην υψηλή ποιότητα μονοκλωνικών αντισωμάτων που μπορούν να αναγνωρίσουν τον ενδιαφερόμενο αναλυτή. Παρόλο που η τεχνολογία των μονοκλωνικών αντισωμάτων γίνεται ολοένα και πιο προσιτή στα μικρότερα εργαστήρια, έχει παρατηρηθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς το σχεδιασμό πρωτότυπων LFIA για ενδεχόμενη εμπορική χρήση. [41]

Οι LFIA όπως είναι οι ανοσοχρωματογραφικές ταινίες και η ράβδος στάθμης αναπτύχθηκαν για τον ταχύτατο προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Μια συσκευή ανοσοδοκιμασίας πλευρικής ροής αποτελείται από τέσσερα μέρη, τα οποία έχουν διαταχθεί σε τάξη σε ένα πλαστικό υπόστρωμα με ένα επίθεμα δείγματος να αρχίζει από τον πυθμένα, το οποίο ακολουθείται από συζευγμένο επίθεμα, μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τέλος ένα επίθεμα απορρόφησης.

Το υγρό του μείγματος μετακινείται κατά μήκος των τεσσάρων σημείων της LFIA, το οποίο επιτυγχάνεται μέσω της τριχοειδούς δράσης. Στη συνέχεια το υγρό του δείγματος θα συναντήσει και θα αναμιχθεί με το συζυγές, το οποίο ενδέχεται να είναι αντιγόνο ή αντίσωμα που έχει επισημανθεί με ένα σωματίδιο χρώματος, στο συζυγές επίθεμα, το οποίο στη συνέχεια περνά εντός των γραμμών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που έχει

αδρανοποιηθεί με αντίσωμα ή αντιγόνο. Η σύνδεση του χρωματισμένου σωματιδίου με το αντίσωμα ή το αντιγόνο που είναι αδρανοποιημένο στο σημείο δοκιμής είναι ανάλογη με τις ουσίες που αναλύονται και υπάρχουν στο δείγμα.

Ο προσδιορισμός τροφιμογενών παθογόνων με ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής εφαρμόζει κολλοειδές χρυσό, μονοδιασπαρμένο λάτεξ, φθορίζουσες ετικέτες και άνθρακα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανοσοχρωματογραφική ταινία που έχει αναπτυχθεί για την ανίχνευση του *E. coli* O157, σε δείγματα που είχαν εμπλουτιστεί και εφαρμόστηκαν κολλοειδή σωματίδια χρυσού σαν ετικέτα. [151]



Εικόνα 30 Συσκευή ανοσοδοκιμασίας πλευρικής ροής. (α) Αποτελέσματα που προκύπτουν μετά την ανάλυση και (β) συσκευή LFIA [151]

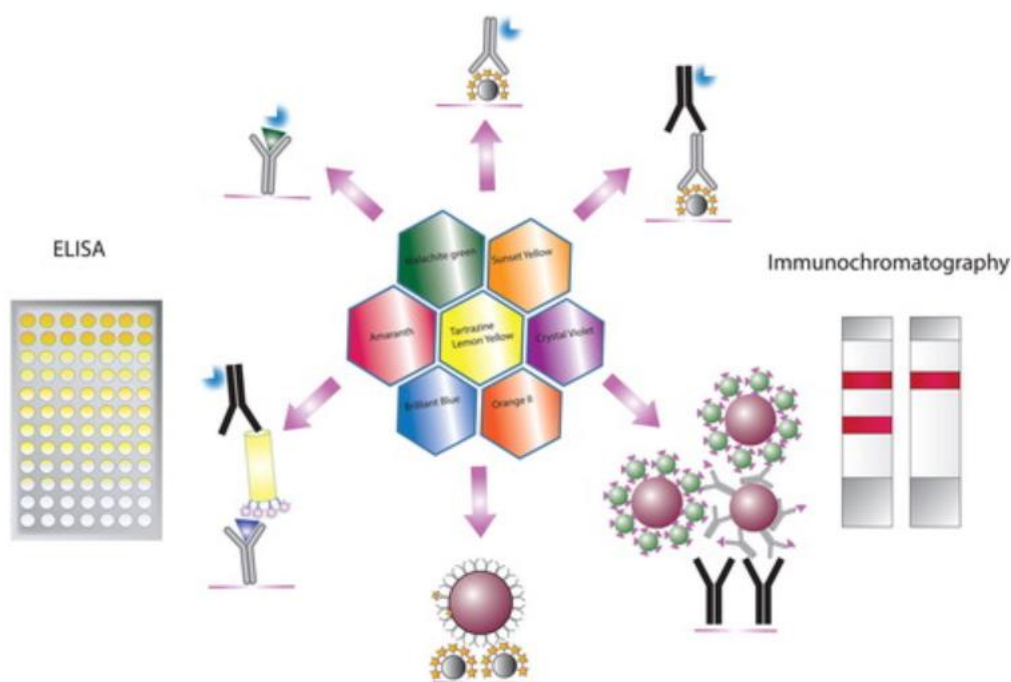
Η ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής ενδείκνυται και για τον προσδιορισμό άλλων τροφιμογενών παθογόνων όπως η *Salmonella spp.* και η *Listeria spp.*, καθώς επίσης και για τον προσδιορισμό τοξινών που μπορεί να επιφέρουν τροφιμογενείς νόσους, όπως η σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη B.

Στο παρακάτω πίνακα αναγράφονται κάποιες από τις εμπορικά διαθέσιμες ανοσοχρωματογραφικές δοκιμαστικές ταινίες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων.

| Ανοσοχρωματογραφική δοκιμαστική ταινία | Παθογόνος μικροοργανισμός |
|--|---|
| Reveal® (Neogen) | <i>Listeria spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> και <i>E. coli O157</i> |
| VIP® GOLD™ (Συστήματα BioControl) | <i>Listeria spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> και <i>E. coli</i> |
| Σύστημα πλευρικής ροής DuPont™ (DuPont Qualicon) | <i>Listeria spp.</i> |

Πίνακας 3 Ανοσοχρωματογραφικές ταινίες που διατίθενται στο εμπόριο και ο προσδιορισμός κάποιων επιβλαβών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών

Οι ανοσοδοκιμασίες πλευρικής ροής είναι γρήγορες και απλές. Παρόλα αυτά έχουν σχεδιαστεί για μεμονωμένες διεργασίες και όχι για υψηλό έλεγχο απόδοσης. [83]



Εικόνα 31 Ανοσολογικές μέθοδοι [24]

2.3.3 Western blot

Η μέθοδος Western Blot (WB) είναι μια εργαστηριακή μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση καθορισμένων πρωτεϊνών σε δείγματα από ιστούς ή αίμα. Η συγκεκριμένη μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση ηλεκτροφόρησης σε πήκτη,

προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του εκάστοτε δείγματος. Εν συνεχεία, οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε μεμβρανώδη επιφάνεια. Έπειτα η μεμβράνη «εκτίθεται» σε ένα αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη-στόχο. Η πρόσδεση του αντισώματος επιβεβαιώνεται με χρήση χημικής ή ραδιενεργού σήμανσης. [107]

Όσον αφορά τις αρχές τις μεθόδου συνοψίζονται ως προς την ίση φόρτωση πρωτεϊνών, τη διάκριση των πρωτεϊνών αναφορικά με το μοριακό βάρος, την ηλεκτροφορητική μετακίνηση σε μεμβράνες που πληρούν τις ανάλογες προϋποθέσεις και τον προσδιορισμό των αντισωμάτων. [62]

Ο προσδιορισμός με τη μέθοδο WB αποτελεί μια αξιοσημείωτη διεργασία για τον ανοσολογικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών και κυρίως των πρωτεϊνών με χαμηλά ποσοστά αφθονίας. Για πρώτη φορά η ηλεκτροφορητική και η μη ηλεκτροφορητική μετακίνηση των πρωτεϊνών σε μεμβράνες αποδόθηκε το 1979. [79]

Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί μια εξέλιξη της μεθόδου Southern blot που εφαρμόσθηκε για το προσδιορισμό ειδικών αλληλουχιών DNA αναμεσά σε τμήματα DNA που διακρίνονται μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πήκτη και την Northern blot η οποία αντίστοιχα εφαρμόσθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA καθώς και του μεγέθους του.

Οι επιστήμονες Towbin και Burnette όταν παρουσίασαν τις μελέτες τους, η ηλεκτροφορητική μετακίνηση διεξαγόταν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, όπου και παρέμειναν μέχρι την εμφάνιση των μεμβρανών PVDF. Οι συγκεκριμένες μεμβράνες φαίνεται να πλεονεκτούν συγκριτικά με τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, ως προς τη δυνατότητα συγκράτησης πρωτεϊνών, την αντοχή και την αποτελεσματικότητα. [62]

Το 1981 ο Burnette εφάρμοσε μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες πηκτές της SDS-PAGE (δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυλαμίδιου), γεγονός που συνέβαλε στη τελική ονομασία της εν λόγω μεθόδου σε western blot. Η ανοσοαποτύπωση ή πρωτεϊνική κηλίδωση αποτελεί ένα πολύτιμο μέσο για την πρωτεϊνική μελέτη. Κατά βάση η ηλεκτροφόρηση σε πήκτη εφαρμόζεται με σκοπό τη διάκριση μεταξύ των εγγενών ή αποδιαταγμένων πρωτεϊνών. Εν συνεχεία, οι πρωτεΐνες τοποθετούνται σε μεμβράνη για προσδιορισμό με εφαρμογή αντισωμάτων, εξειδικευμένων για την εκάστοτε πρωτεΐνη-στόχο.

Κατά την προετοιμασία του δείγματος η πρωτεΐνη θα υπολογισθεί από εκχυλίσματα καλλιέργειας ιστών ή από ολόκληρους ιστούς. Οι ιστοί και τα κύτταρα πρέπει να ψύχονται ταχύτατα με τη χρήση υγρού αζώτου, προκειμένου να αποτραπεί η διάσπαση των πρωτεϊνών από πρωτεάσες ή να έχουν συλλεχθεί και να λύνονται γρήγορα. Επιπρόσθετα, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι συνεχείς επαναλήψεις σε θερμοκρασίες κατάψυξης και απόψυξης ενδέχεται να επιφέρουν δυσμενή αποτελέσματα ως προς την ποιότητα των πρωτεϊνών και καλό είναι να αποφεύγονται.

Η προετοιμασία των πρωτεϊνών θα πρέπει να γίνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες με σκοπό να αποφευχθεί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Όσον αφορά τα μπουκάλια λύσης, πλήθος απορρυπαντικών, άλατα και ρυθμιστικά διαλύματα μπορούν να εφαρμοσθούν για τη λύση κυττάρων καθώς και για να διαλυθούν οι πρωτεΐνες με χρήση διαλυτών. Γενικότερα, υπάρχουν αρκετά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης, τα οποία επιλέγονται ανάλογα με την εκάστοτε πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Προκειμένου να αποφεύγεται η μετουσίωση πρωτεϊνών, στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης μπορούν να προσδεθούν αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών. Κάποιοι από αυτούς τους αναστολείς μπορούν να υπάρχουν σε μορφή δισκίου και μπορούν να διαλυθούν στο διάλυμα λύσης πριν από τη χρησιμοποίησή του.

Σημαντική παράμετρο αποτελεί το γεγονός ότι τα διαλύματα λύσης που εφαρμόζονται για την ετοιμασία των δειγμάτων για τη μέθοδο WB, ενδείκνυται να επιτρέπουν την αποτελεσματικότερη εκχύλιση των εκάστοτε πρωτεϊνών και να καθίσταται εφικτή η ταυτοποίηση τους από τους αντιορούς, καθώς επίσης και η σύγκριση και ποσοτικοποίηση αναφορικά με άλλα δείγματα στην επεξεργασία με WB, εξαρτώμενη από τα πρωτεϊνικά λυτικά που προδιαθετώνται για την ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συνολικής πρωτεΐνης ενδείκνυται να επιτευχθεί με τον υπολογισμό των δειγμάτων στα 280 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου με βασική παράμετρο το ρυθμιστικό διάλυμα να μην διαθέτει υλικά που απορροφώνται. Σε περιπτώσεις που ενδείκνυται η ύπαρξη απορροφητικών υλικών, μπορεί να εφαρμοσθεί μια δοκιμασία Bradford, κατά την οποία σχηματίζεται πρότυπη καμπύλη όσον αφορά τις άγνωστες συγκεντρώσεις του δείγματος.

Για τον ορθό διαχωρισμό καθίστανται σημαντικός ο ορισμός ιδανικής αναλογίας δισακρυλαμιδίου:ακρυλαμιδίου προτού λάβει χώρα η ηλεκτροφόρηση. Εν συνεχεία, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη. Η διάκριση των πρωτεϊνών

μπορεί να επιτευχθεί ανάλογα α) με το ισοηλεκτρικό φορτίο, β) το μοριακό βάρος, γ) το ηλεκτρικό φορτίο καθώς και με συνδυασμό αυτών.

Η διεργασία της SDS-PAGE στηρίζεται στα στοιχεία του SDS, το οποίο αποτελεί ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, καθώς οι πρωτεΐνες δεν διαθέτουν όλες ίδιο ηλεκτρικό φορτίο, το μείγμα εξετάζεται λεπτομερώς με SDS και κατ' αυτό το τρόπο οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται και φορτίζονται αρνητικά. Κατά συνέπεια αυτό συμβάλλει στη διάκριση των πρωτεϊνών με γνώμονα το μοριακό τους βάρος. Στην περίπτωση που εφαρμοσθεί τάση στο πήκτωμα, οι πρωτεΐνες μετακινούνται με αλλότροπες ταχύτητες και αυτό έχει ως συνέπεια τη διάκριση σε ζώνες στην κάθε λωρίδα.

Όταν τα δείγματα φορτωθούν στην πήκτη η μια λωρίδα θα πρέπει να διαθέτει ένα δείκτη όσον αφορά το μοριακό βάρος που εφαρμόζεται για την ανίχνευση της εκάστοτε πρωτεΐνης-στόχου. Η άλλη λωρίδα θα πρέπει να διαθέτει εσωτερικό έλεγχο με γνωστή συγκέντρωση και μοριακό βάρος με σκοπό να αποσαφηνιστεί εάν το πρωτογενές αντίσωμα φέρεται ως αποτελεσματικό.

Κατά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί μπορούν να μεταβιβαστούν από το πήκτωμα σε μια μεμβράνη από νιτροκυτταρίνη, η οποία χρησιμοποιείται σε αρκετά συχνό βαθμό. Η πιο συχνή διαδικασία μεταφοράς πρωτεϊνών από πήκτη σε μεμβράνη αποτελεί η ηλεκτροβελτίωση. Βασικά πλεονεκτήματα που διαθέτει αποτελούν η ταχύτητα και η αρτιότητα μετακίνησης. Η συγκεκριμένη διαδικασία κάνει χρήση ηλεκτρικού ρεύματος με σκοπό να «τραβάει» τις πρωτεΐνες από την πήκτη στη μεμβράνη. [72]

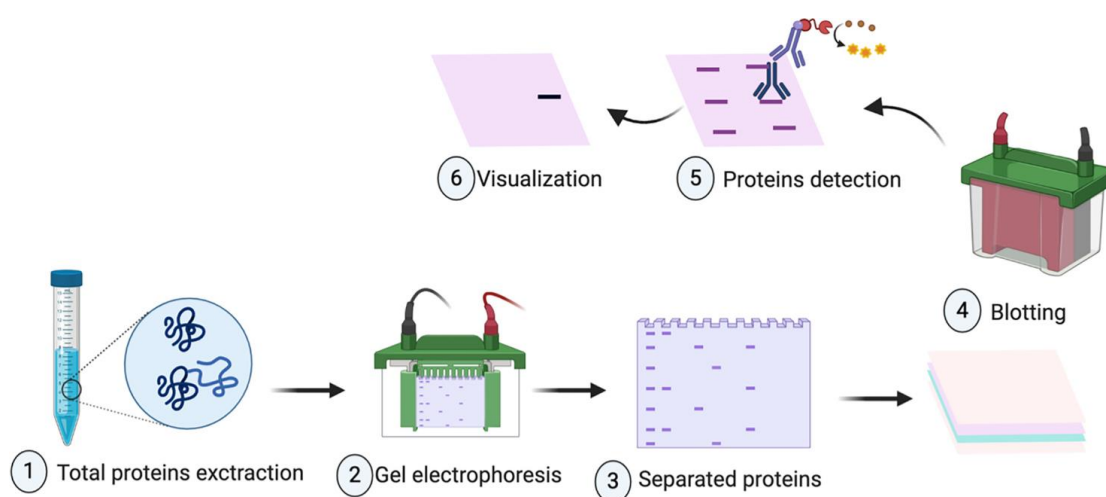
Όπως συμβαίνει και με άλλες μεθόδους ανοσοαποτύπωσης, τα αντισώματα κατέχουν έναν καίριο ρόλο στην WB, ο οποίος αποτελεί μια καλή διαβεβαίωση ως προς την εξειδίκευση, την επαναληψιμότητα και την εξειδίκευση της εν λόγω μεθόδου.

Η μέθοδος WB έχει χρησιμοποιηθεί για το προσδιορισμό παθογόνων βακτηρίων (π.χ. *Yersinia enterocolitida*), παθογόνων παράσιτων (π.χ. *Toxoplasma gondii*) και παθογόνων μυκήτων (π.χ. *Aspergillus spp.*). [99]

Σκοπός της WB ή ανοσοαποτύπωσης αποτελεί η εξακρίβωση μέσω ειδικού αντισώματος από συγκεκριμένο αντιγόνο από πολύπλοκο μείγμα πρωτεϊνών, το οποίο έχει διαιρεθεί σε πήκτη πολυακρυλαμίδιου και έχει σταθεροποιηθεί σε μεμβράνη.

Η ανοσοαποτύπωση διεξάγεται σε 6 στάδια:

- εκχύλιση και ποσοτικοποίηση των δειγμάτων πρωτεΐνης,
- λύση του πρωτεϊνικού δείγματος σε πήκτη SDS-PAGE,
- μεταβίβαση των πολυπεπτιδίων που έχουν διαχωρισθεί σε μεμβρανώδες υπόστρωμα,
- δέσμευση μη εξειδικευμένων σημείων σύνδεσης στη μεμβράνη,
- πρόσθεση αντισωμάτων και
- ανάλυση. [28]



Εικόνα 32 Βήματα εργασίας της μεθόδου WB. Οι πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί αρχικά διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη (1) & (2). Εν συνεχεία, οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί μεταβιβάζονται σε μεμβράνη από νιτροκυταρίνη ή PVDF (3). Έπειτα, λαμβάνει χώρα ο επωασμός της μεμβράνης με πρωτογενή και συζυγή δευτερογενή αντισώματα (5). Σε τελικό στάδιο, ανάλογα με το δευτερογενές αντίσωμα που έχει χρησιμοποιηθεί, η πρωτεΐνη-στόχος προσδιορίζεται με χρωματομετρικές ή φθορίζουσες τεχνικές [99]

2.4 Μέθοδοι Ενίσχυσης Νουκλεϊκών Οξέων

Η ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων αποτελεί μια μοριακή τεχνική που στηρίζεται στην ανίχνευση και το ποσοτικοποιημένο καθορισμό ειδικών γονιδιωματικών παθογόνων (DNA ή RNA). Πρόκειται για μια από τις καλύτερες μεθόδους συγκριτικά με άλλες συμβατικές μεθόδους προσδιορισμού τροφιμογενών παθογόνων. Αυτό οφείλεται:

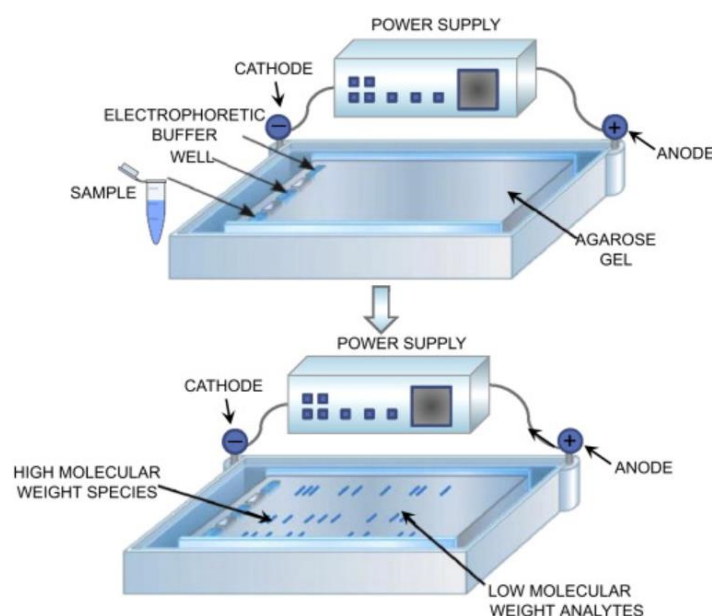
- στην ταχύτητα,
- στην ακρίβεια,
- στην ευαισθησία,
- τη δυνατότητα προσδιορισμού μικρών ποσοτήτων νουκλεϊκού οξέος-στόχου σε δείγματα τροφίμων,
- στην εξειδίκευση καθώς και

- στο μειωμένο κίνδυνο μόλυνσης.

Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου προβλέπει την ενίσχυση των γονιδιωμάτων από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπου εφαρμόζονται εξειδικευμένα σετ εκκινητών προκειμένου να γίνει η αντιγραφή με την τήρηση τριών θερμοκρασιακών σταδίων:

- αποδιάταξης,
- υβριδοποίησης και
- επιμήκυνσης με την εφαρμογή κατάλληλων ρυθμιστικών συστημάτων σε θερμοκυκλοποιητικά μηχανήματα.

Στη συνέχεια τα προϊόντα νουκλεϊκών οξέων ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αгарόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. [74]



Εικόνα 33 Σύστημα ηλεκτροφόρησης αгарόζης [5]

Πρώτο στάδιο για τις μεθόδους που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα αποτελεί η κατάλληλη επιλογή των εξειδικευμένων ακολουθιών που εφαρμόζονται για το προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών. Ένα διατηρημένο γονίδιο με καθορισμένες ακολουθίες εφαρμόζεται για να επιλεγεί η αλληλουχία-στόχος των παθογόνων. Οι ριβοσωμικές ακολουθίες εφαρμόζονται σε τεράστιο εύρος ως αλληλουχίες-στόχοι με σκοπό την εξέλιξη της αναγνώρισης. Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες περιέχουν:

- ένα οπερόνιο βακτηριακού ριβοσωμικού RNA (rRNA),
- ένα γονίδιο 16S rRNA,

- ένα γονίδιο 23S rRNA και μια
- διαγονιδιακή περιοχή (IGS).

Γενικότερα, το 16S rRNA γονίδιο είναι στόχος για τη μοριακή αναγνώριση βακτηρίων. Για τον προσδιορισμό ιών, αλληλουχία-στόχο αποτελεί το γονίδιο της πρωτεΐνης του περιβλήματος, το γονίδιο της DNA πολυμεράσης ή αντίστοιχα της RNA πολυμεράσης. Κάποιες φορές οι ιοί RNA είναι ευαίσθητοι στις μεταλλάξεις και δεν διαθέτουν διατηρημένες αλληλουχίες, οι οποίες αποτελούν πρόκληση για τον προσδιορισμό παθογόνων που μεταδίδονται με τα τρόφιμα.

Μια τεχνική με βάση τα νουκλεϊκά οξέα χρειάζεται την κατάλληλη επίβλεψη και ουσιαστική εποπτεία. Παρόλα αυτά υπάρχουν κάποιες δυσκολίες όσον αφορά αυτές τις μεθόδους, καθώς τα τροφικά σωματίδια εμποδίζουν την εν λόγω τεχνική και κατά αυτό το τρόπο δεν μπορεί να διαφοροποιηθεί το DNA από νεκρά ή ζωντανά κύτταρα. Προκειμένου να αποφευχθούν αυτές οι δυσχέρειες, χρειάζεται να αναπτυχθεί μια βασισμένη σε νουκλεϊκό οξύ μέθοδος, η οποία περιλαμβάνει τον καθαρισμό, την επίλυση των κυττάρων, την εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων, τις μη επιτυχημένες αντιδράσεις, τις μολύνσεις, τα ψευδώς θετικά σήματα καθώς και το ανταγωνιστικό DNA κυττάρων, που δεν είναι στόχοι. Επίσης σημαντική είναι η σχεδίαση εκκινητών που δεν ενισχύουν τις αλληλουχίες-μη στόχου.

Κάποιες από τις μεθόδους που βασίζονται στην ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων αποτελούν:

- αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR),
- «φωλιασμένη» PCR (nPCR),
- ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR),
- πολυπλεκτική (mPCR), κ.λπ. αναλύονται παρακάτω. [74]

2.4.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Στο τομέα των βιολογικών επιστημών έχουν σημειωθεί σημαντικά τεχνολογικά επιτεύγματα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν ο κλάδος της μικροβιολογίας, ο οποίος αναδιαμορφώθηκε με την εμφάνιση του μικροσκοπίου του Anton Van Leeuwenhoek, το οποίο έδωσε τη δυνατότητα στους ειδικούς για πρώτη φορά να παρατηρήσουν τους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Η ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια από τις εφευρέσεις που επέφεραν

αλλαγές στη πορεία της εξέλιξης της μοριακής επιστήμης, καθώς η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να καλύψει αναρίθμητους επιστημονικούς βιολογικούς τομείς. Η διαδικασία σε θεωρητικό υπόβαθρο είχε περιγραφεί από τον Kεppε και τους συναδέλφους του το 1971, εντούτοις χρειάστηκαν ακόμα 14 χρόνια προκειμένου να ολοκληρωθεί και να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί πειραματικά ολοκληρωμένη η διαδικασία της PCR από τον Kary Mullis το 1985, κατά τη διάρκεια της εργασίας του στην Cetus Corporation, όπου έλαβε και το Νόμπελ Χημείας το 1993. Η διαδικασία αυτοματοποίησης και τελειοποίησης της συγκεκριμένης τεχνικής συνεχίστηκε με την είσοδο μιας θερμικά σταθερής πολυμεράσης DNA, προερχόμενη από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, με αποτέλεσμα την ονομασία Taq DNA πολυμεράση. [90]

Η PCR αποτελεί μια εργαστηριακή μέθοδο με σκοπό την ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων, που εφαρμόζεται για τη μετουσίωση και την ανάλυση βραχέων τμημάτων αλληλουχιών δεοξυριβονουκλεϊνικού οξέος DNA ή ριβονουκλεϊνικού οξέος RNA, με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση. Η PCR είναι μια διαδικασία που επικεντρώνεται στοχευμένα σε ένα μικρό τμήμα DNA σε δοκιμαστικό σωλήνα. Η θερμική σταθερότητα που διαθέτει έχει την ικανότητα να αντέχει σε μεταβολές χημικών και φυσικών ιδιοτήτων σε υπερβολικές θερμοκρασίες που είναι μη αναστρέψιμες. Μετά από αρκετούς επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης και επαναδιάταξης στις διεργασίες PCR, το ένζυμο Taq πολυμεράση είναι προτιμότερο λόγω της θερμικής του ιδιότητας, γεγονός που επιτρέπει τη συνέχεια της διαδικασίας σύνθεσης του DNA ανεξάρτητα από την επίδραση των εκκινητών.

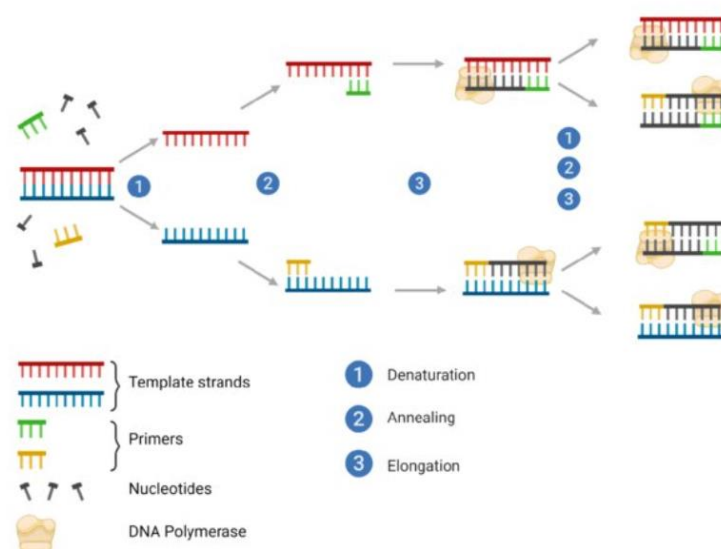
Οι διεργασίες της PCR ξεκινούν με τη λήψη ενός μικρού τμήματος DNA σε δοκιμαστικό σωλήνα. Η PCR αποτελείται από τρία θερμοκρασιακά στάδια: αποδιάταξη αρχικού δείγματος (ή μετουσίωση), υβριδοποίηση και επιμήκυνση.

Κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης, το DNA θερμαίνεται στους 95° C, προκειμένου να διασπαστούν οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων του δίκλωνου DNA.

Η υβριδοποίηση περιλαμβάνει τη ψύξη του αποδιαταγμένου DNA σε θερμοκρασιακό εύρος που κυμαίνεται από 37° C έως 72° C, γεγονός που επιτρέπει στους δεσμούς υδρογόνου να αναδιαμορφωθούν. Η υβριδοποίηση ιδανικά λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασίες από 55 έως 72° C. Η εν λόγω θερμοκρασία ορίζεται βάσει των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων των εκάστοτε εκκινητών που έχουν χρησιμοποιηθεί στο

διάλυμα. Το μήκος των εκκινητών κυμαίνεται από 20 έως 25 νουκλεοτίδια. Η υβριδοποίηση δίνει τη δυνατότητα στους εκκινητές να προσδεθούν στο μονόκλωνο DNA στις ανάλογες συμπληρωματικές τους θέσεις, οι οποίες ξεκινούν από το 3' άκρο του πρότυπου DNA. Εν συνεχεία, η πρόσδεση των εκκινητών στις αντίστοιχες θέσεις στο μονόκλωνο DNA παράγει δυο δίκλινα μόρια DNA.

Στο τέλος για να διασφαλιστεί η δραστικότητα της DNA πολυμεράσης, επιλέγεται η βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης από 75 έως 80° C, η οποία είναι η καταλληλότερη για την επαγόμενη ενζυμική αντιγραφή του DNA.



Εικόνα 34 Θερμοκρασιακά στάδια PCR και «εργαλεία» υλοποίησης της [147]

Έπειτα από 30-40 κύκλους, οι επαναληπτικοί κύκλοι τελικώς ελαττώνονται, εξαιτίας της μειωμένης δυνατότητας του αντιδραστήριου και άλλων συντελεστών που επιδρούν, π.χ. η συγκέντρωση μορίων πυροφοσφορικών, η υπέρμετρη ανόπτηση καθώς και η ύπαρξη ανασταλτικών παραγόντων PCR στο δείγμα. Οι πιο κοινοί αναστολείς της PCR, αποτελούν η πρωτεΐνωση K, η φαινόλη και το EDTA.

Η πρωτεΐνωση K έχει την ικανότητα να αποσυνθέτει την πολυμεράση Taq. Άλλες ουσίες που ενδείκνυται να επηρεάσουν αρνητικά της διεργασίες της PCR αποτελούν η ηπαρίνη, τα ιοντικά απορρυπαντικά, η αιμοσφαιρίνη, χρωστικές ουσίες όπως η κυανόλη ξυλενίου και χρωστικές βρωμοφαινόλης, ενδέχεται να επιφέρουν δυσκολίες στις αναλύσεις PCR. Προκειμένου να αποφευχθούν αυτά τα θέματα, τα μητρικά DNA δύναται να καθαρίζονται με διάλυση και καθίζηση σε αιθανόλη.

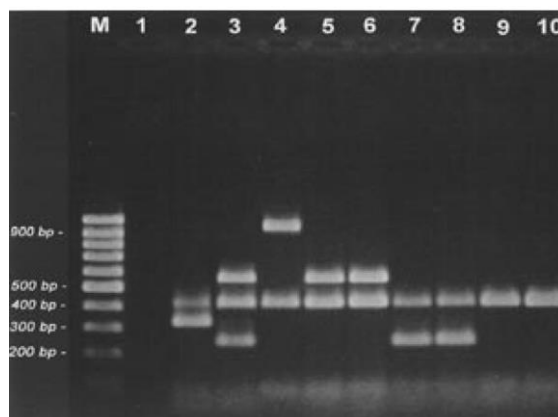
Ακολουθώντας τα παραπάνω στάδια της PCR, το επόμενο στάδιο είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης με εφαρμογή βρωμιούχου αιθιδίου. Μετά την ηλεκτροφόρηση η πήκτη εξετάζεται σε υπεριώδες φώς. Ένα σημαντικό σημείο σε αυτό το σκέλος της μεθόδου προϋποθέτει την εξακρίβωση της εξειδίκευσης των προϊόντων μέσω της μεταφοράς σε φίλτρο καθώς και τη χρήση κάποιου ανιχνευτή, όπως το Southern blot για τον υβριδισμό και τέλος απομακρύνεται η ενδυνάμωση των διμερών εκκινητών.

Η PCR έχει τη δυνατότητα να παράγει αποδοτικά προϊόντα ενδυνάμωσης ύστερα από έκφραση και κλωνοποίηση, εξαιτίας της ύπαρξης σημείων περιορισμού στα τελικά άκρα. [76]

Για κάθε γονίδιο σχεδιάζονται ειδικοί εκκινητές. Για αναγνώριση των αποτελεσμάτων PCR εφαρμόζεται ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης και εν συνεχεία ο χρωματισμός με βρωμιούχο αιθίδιο όπως ήδη έχει αναφερθεί. Από την εφεύρεση της PCR και έπειτα έχουν αναδειχθεί αρκετές παραλλαγές της, στις οποίες έχουν αποδοθεί ονόματα βάσει του τροποποιημένου πρωτοκόλλου της αρχικής PCR. Ένα από τα κυρία πλεονεκτήματα της PCR είναι η ταχύτητα και η ευαισθησία της. Πλέον η PCR μπορεί να λαμβάνει αποτελέσματα σε χρονικό διάστημα 30 λεπτών και η διαφοροποίηση ανάμεσα στα στελέχη να καθίσταται αρκετά εύκολη καθώς εφαρμόζονται πολλά ζεύγη εκκινητών. [122]

Η ανάλυση των προϊόντων PCR διακρίνεται σε δυο κυρίες μεθόδους απεικόνισης: α) χρωματισμός του προϊόντος που έχει ενισχυθεί με χημική χρωστική όπως είναι το βρωμιούχο αιθίδιο ή β) επισήμανση των εκκινητών PCR ή των νουκλεοτιδίων με φθοριοφόρες χρωστικές ουσίες, προτού γίνει η ενίσχυση της PCR.

Η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος καθώς και η πιο εύκολη είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης, η οποία έχει τη δυνατότητα να διαχωρίζει τα προϊόντα του DNA ανάλογα με το φορτίο και το μέγεθος. Παράλληλα υπάρχει ένα προκαθορισμένο σύνολο από προϊόντα DNA γνωστών μεγεθών, όπου εκτελούνται ταυτόχρονα στο πήκτωμα ως συμβατικοί μοριακοί δείκτες, οι οποίοι καθίστανται βοηθητικοί στον ορισμό με ακρίβεια του μεγέθους του εκάστοτε προϊόντος.



Εικόνα 35 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αгарόζης PCR προϊόντων του *C. perfringens* [75]

Η PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί με εφαρμογή μητρικού DNA από οποιοδήποτε ιστό και οργανισμό, όπως δέρμα, τρίχες, περιφερικό αίμα, μικρόβια και σάλιο. Κάθε διεργασία PCR χρειάζεται την παρουσία μητρικού DNA, εκκινητών, νουκλεοτιδίων και DNA πολυμεράσης.

Η DNA πολυμεράση αποτελεί το βασικό ένζυμο, το οποίο συνδέει τα μεμονωμένα νουκλεοτίδια μεταξύ τους προκειμένου να δημιουργηθεί το προϊόν PCR. Τα νουκλεοτίδια αποτελούν τις τέσσερις βάσεις: αδενίνη(A), θυμίνη(T), γουανίνη(G) και κυτοσίνη(C), που βρίσκονται στο DNA και αποτελούν δομικά συστατικά που εφαρμόζονται από την DNA πολυμεράση με σκοπό το σχηματισμό του PCR προϊόντος που προκύπτει. Ο ρόλος των εκκινητών στην αντίδραση είναι να καθορίζουν με ακρίβεια το προϊόν DNA που θα ενισχυθεί.

Τα συστατικά που αναφέρθηκαν αναμειγνύονται σε πλάκα 96 κοιλοτήτων ή δοκιμαστικό σωλήνα, στη συνέχεια τοποθετούνται σε μηχανήμα που επιτρέπει την κατ' επανάληψη ενίσχυση του DNA σε τρεις βασικούς θερμοκρασιακούς κύκλους. Το συγκεκριμένο μηχανήμα ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής. Πρόκειται για ένα μηχανήμα το οποίο διαθέτει ένα θερμικό μπλοκ με τρύπες μέσα στο οποίο γίνεται η εισαγωγή των δοκιμαστικών σωληναρίων ή αντίστοιχα των πλακών που εμπεριέχεται το μείγμα αντίδρασης. Το μηχανήμα μπορεί να αυξομειώνει τη θερμοκρασία σε ακριβή και προγραμματισμένα από πριν βήματα. Με κάθε επανάληψη των προαναφερθέντων θερμοκρασιακών βημάτων ο αριθμός των μορίων DNA που αντιγράφονται διπλασιάζεται. [61]

Η μέθοδος PCR έχει αναδειχθεί σε μια ιδιαίτερα υποσχόμενη τεχνική ανίχνευσης, όσον αφορά τα γονίδια παθογόνων μικροοργανισμών, παρόλα αυτά υπάρχουν και ορισμένα

μειονεκτήματα που επιβάλλουν απαραίτητη την εξέλιξη νέων μεθόδων. Οι δυσχέρειες αυτές είναι μεταξύ άλλων η εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων και η λύση των κυττάρων, η διασταυρούμενη μόλυνση και οι ανεπιτυχείς αντιδράσεις εξαιτίας της παρουσίας παραγόντων που μπορούν να την αναστείλουν όπως ήδη έχει αναφερθεί. Οι τεχνικές PCR δεν έχουν τη δυνατότητα διάκρισης ανάμεσα σε ζωντανά και νεκρά κύτταρα. Ένα από τα βασικότερα μειονεκτήματα της PCR είναι ότι ενέχουν οι κίνδυνοι παραγωγής ψευδώς θετικών σημάτων, εξαιτίας της σύνδεσης σε μη εξειδικευμένες δίκλωνες ακολουθίες DNA.

Για το λόγο αυτό είναι αρκετά σημαντικό να διατίθενται άρτια σχεδιασμένοι εκκινητές, οι οποίοι δεν θα ενισχύουν αλληλουχίες που δεν είναι στόχοι. [122]

Η PCR έχει εφαρμοσθεί για τον προσδιορισμό πολυάριθμων τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών, π.χ., *Shigella spp.*, *Escherichia coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.* και *Staphylococcus aureus*. [83]

2.4.2 Ψηφιακή PCR (digital PCR, dPCR)

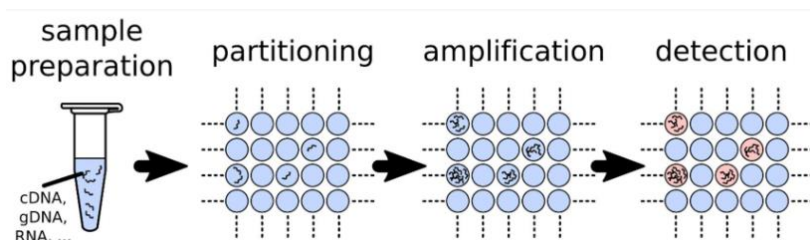
Για πρώτη φορά, ο ορός "ψηφιακή PCR" διατυπώθηκε σε ερευνά των Vogelstein και Kinzler το 1999, κατά την οποία περιγραφθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός σχετικά με τις μεταλλάξεις ras σε δείγμα, με την κατάτμηση του για τη διεξαγωγή μιας σειράς PCR σε μικροπλάκες 384 οπών. Ο τίτλος "ψηφιακή PCR" ήταν χαρακτηριστικός, καθώς απέδιδε τόσο τη φύση της συγκεκριμένης αντίδρασης όσο και το πνεύμα της εποχής και επικράτησε αμέσως. Παρόλα αυτά η μέθοδος που περιγραφηκε δεν ήταν καινούργια, καθώς την προηγούμενη δεκαετία είχε εφαρμοσθεί με τους τίτλους "limiting dilution PCR" ή "single molecule PCR". [102]

Η ακριβής ποσοτικοποίηση με dPCR στηρίζεται στο φαινόμενο της τυχαίας κατανομής των μορίων σε πλήθος τμημάτων ακολουθώντας την κατανομή Poisson. Το κάθε τμήμα μπορεί να λειτουργεί ως ένας μικρός ατομικός αντιδραστήρας PCR. Τα τμήματα που διαθέτουν ενισχυμένες ακολουθίες στόχων μπορούν να ανιχνευθούν με φθορισμό. Το εύρος των θετικών τμημάτων PCR είναι αρκετό έτσι ώστε να καθίσταται εφικτός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης μιας αλληλουχίας-στόχου χωρίς να χρειάζεται βαθμονόμηση. [123]

Η dPCR αποτελεί μια επαναστατική μέθοδο ως προς τον σαφή ποσοτικό προσδιορισμό νουκλεϊκών οξέων. Η συγκεκριμένη μέθοδος πλέον έχει επεκταθεί σε παγκόσμια κλίμακα, λόγω της εξειδίκευσης και της υψηλής ευαισθησίας που διαθέτει.

Η dPCR αποτελεί την τρίτη γενιά PCR, η οποία καθιστά εφικτό το ποσοτικό προσδιορισμό σε υψηλό βαθμό, το οποίο επιτυγχάνεται μέσω της κατάτμησης της αντίδρασης. Η ακρίβεια και η υψηλή ευαισθησία στο μοριακό προσδιορισμό καθιστούν την εν λόγω τεχνολογία ικανή για χρήσεις όπως ο προσδιορισμός, σπάνιων μεταλλάξεων, αποτυπωμάτων DNA καθώς και αυξομειώσεις του αριθμού από τα αντίγραφα που προκύπτουν.

Στην εν λόγω μέθοδο, ο «μηχανισμός» PCR του DNA ή αντίστοιχα του RNA κλασματοποιείται σε τμήματα ίσου όγκου (nano- και pico- λίτρων), στα οποία η κατανομή των μορίων είναι τυχαία. Κάθε τμήμα μπορεί να διαθέτει από μηδέν, ένα ή πλήθος μορίων. Μετά την ενδυνάμωση, πραγματοποιείται καταμέτρηση της απορρόφησης σε κάθε τμήμα. Η αντίδραση που δεν διαθέτει μόριο-στόχο προσδιορίζεται ως μηδέν, ενώ η αντίδραση που διαθέτει ένα μόριο-στόχο προσδιορίζεται ως ένα. Τα πρώτα αντίγραφα καθώς και η πυκνότητα του DNA-στόχου μπορούν να υπολογιστούν με τη στατιστική Poisson και βάσει του αριθμού των PCR θετικών αντιδράσεων. Στην περίπτωση που το δείγμα ανάλυσης παρουσιάζει χαμηλή πυκνότητα DNA-στοχου και οι μικρές αντιδράσεις είναι σχετικά υψηλές, η καταμέτρηση τους οφείλει να είναι μόνο μηδέν ή ένα. Σε αυτή τη περίπτωση, το πλήθος των τμημάτων που παρουσιάζουν υψηλό φθορισμό είναι ίσος με το πλήθος των μορίων DNA-στοχου. Ωστόσο, ενεδρεύει η περίπτωση ένα τμήμα να διαθέτει περισσότερα του ενός μορίου-στόχου, των οποίων η καταμέτρηση είναι απαραίτητο να επιδιορθωθεί με τη στατιστική Poisson. [92]



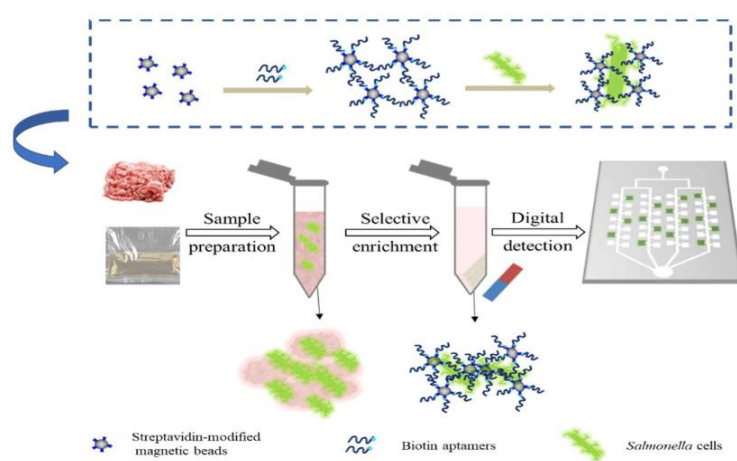
Εικόνα 36 Αρχή dPCR. Πραγματοποιείται διαίρεση του δείγματος σε ανεξάρτητα τμήματα με σκοπό το καθένα να περιέχει λίγες ή περισσότερες αλληλουχίες-στόχους. Η καταμέριση των αλληλουχιών-στόχων σε μέρη μπορεί να εκτιμηθεί προσεγγιστικά με την κατανομή Poisson. Κάθε τμήμα δρα ως ατομικός μικροαντιδραστήρας PCR, τα διαμερίσματα που εμπεριέχουν ενισχυθείσες αλληλουχίες-στόχους και καταγράφονται με φθορισμό. Η αναλογία των θετικών τμημάτων (παρουσία φθορισμού)

προς το συνολικό αριθμό καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του εκάστοτε στόχου στο δείγμα [123]

Η dPCR μπορεί να συλλεγεί σήματα φθορισμού μέσω της επιτυχούς καταμέτρησης του τελικού σημείου, εφαρμόζοντας το πλήθος των θετικών διαχωρισμών επί το σύνολο προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση του στόχου. Η συγκεκριμένη μέθοδος σε αντίθεση με άλλες μεθόδους (π.χ. qPCR) δε βασίζεται σε καμπύλες βαθμονόμησης ως προς τη ποσοτικοποίηση του δείγματος. [123]

Ο προσδιορισμός ενδυναμωμένου σήματος στον εκάστοτε μικρό αντιδραστήρα μπορεί να πραγματοποιείται μέσα από εξειδικευμένες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες-ανιχνευτές (λ.χ. TaqMan probes). Οι εξειδικευμένες πλατφόρμες που εφαρμόζονται στη dPCR, προκειμένου να καθίσταται εφικτός ο διαμερισμός του δείγματος, χρησιμοποιούν: α) την τεχνολογία της μικρορευστονικής (microfluidics) ή β) την τεχνολογία μικροσταγονιδίων-γαλακτωμάτων. [136]

Η τεχνολογία της μικρορευστονικής λαμβάνει ιδιαίτερη προσοχή και συχνά εφαρμόζεται για βιολογικούς προσδιορισμούς. Διαθέτει σημαντικά πλεονεκτήματα αναμεσα στα οποία συγκαταλέγονται η χαμηλή κατανάλωση αντιδραστηρίων, το μικρό μέγεθος, η υψηλή απόδοση της αντίδρασης, η χαμηλή δαπάνη καθώς και η επιτόπια διάγνωση. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι τα μικρής ρευστότητας τσιπ ενδείκνυνται για το συνδυασμό και με άλλες μεθόδους πέραν της προαναφερθείσας.



Εικόνα 37 Σχηματική παρουσίαση εκλεκτικού εμπλουτισμού και προσδιορισμού φθορισμού του *S. typhimurium* [141]

Η τεχνολογία μικροσταγονιδίων-γαλακτωμάτων (droplet digital PCR, ddPCR) αποτελεί ένα διφασικό σύστημα το οποίο συνδυάζει νερό και έλαιο (water-oil

emulsion), μέσα στο οποίο σχηματίζονται σταγονίδια τα οποία περιβάλλονται από έλαιο. Τα εν λόγω σταγονίδια (ή μικκύλια) μπορούν να σχηματίσουν πλήθος μικρών αντιδραστηρίων με σκοπό να πραγματοποιηθεί η dPCR. Το εύρος αυτών των αντιδράσεων κυμαίνεται σε μονάδες των pico-λίτρων. [136]

Λόγω της υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης που διαθέτει η dPCR έχει εφαρμοσθεί για τον προσδιορισμό αρκετών παθογόνων μικροοργανισμών στη βιομηχανία τροφίμων.

Αλλά παραδείγματα αποτελούν η ανίχνευση του παθογόνου *E. coli* που παράγει την τοξίνη *Shiga* σε είδη βόειου κρέατος με τη χρήση ddPCR. [31]

2.4.3 Πολυπλεκτική PCR (multiplex PCR, mPCR)

Η πολλαπλή PCR (mPCR) αποτελεί την ενίσχυση ενός ή περισσότερων τμημάτων DNA σε κάθε αντίδραση με πολυάριθμες εφαρμογές. Στη περίπτωση που εφαρμόζεται παραπάνω από ένα σετ εκκινητών για κάθε σωληνάριο αντίδρασης, το σύνολο του αριθμού των σωληναρίων για κάθε πείραμα ενδέχεται να μειωθεί, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ακριβών αντιδραστηρίων καθώς και τη μείωση των πιθανών μολύνσεων. Με την mPCR επιτρέπεται η εξέταση του ενδιαφερόμενου γονιδίου και διασφαλίζεται ότι η διαδικασία ενίσχυσης συνεχίζεται όπως είναι αναμενόμενο με εφαρμογή ενός συνόλου εκκινητών για τον έλεγχο του γονιδιώματος. [29]

Συγκριτικά με την απλή PCR, η mPCR προσφέρει πιο γρήγορη ανίχνευση. Αυτό επιτυγχάνεται εξαιτίας της ταυτόχρονης ενίσχυσης πολλαπλών γονιδιακών στόχων. Η αρχή της mPCR είναι παρεμφερής με τη απλή PCR. Παρόλα αυτά στη mPCR εφαρμόζονται διαφόρων τύπων σύνολα εξειδικευμένων εκκινητών σε αντίθεση με τη συμβατική PCR, όπου εφαρμόζεται μόνο ένα σύνολο εξειδικευμένων εκκινητών. Η σχεδίαση των εκκινητών αποτελεί έναν αρκετά σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη της mPCR, διότι τα σύνολα των εκκινητών θα πρέπει να έχουν μια κοινή θερμοκρασία ανόπτησης, με σκοπό μια επιτυχής διεργασία mPCR. Σημαντική είναι επίσης και η συγκέντρωση των εκκινητών στη δοκιμασία της mPCR. Αυτό απορρέει κυρίως από το γεγονός ότι ενδεχομένως να παρουσιαστεί κάποια διάδραση ανάμεσα στα πολλαπλά σετ εκκινητών στην mPCR, η οποία μπορεί να καταλήγει σε διμερή εκκινητών, αυτό συνεπάγεται ότι η συγκέντρωση των εκκινητών ενδεχομένως να χρειαστεί προσαρμογή προκειμένου να επιτευχθεί η παραγωγή αξιόλογων PCR προϊόντων. Κάποιοι άλλοι σημαντικοί παράγοντες για δοκιμασία mPCR με επιτυχή

αποτελέσματα αποτελούν οι συγκεντρώσεις των ρυθμιστικών διαλυμάτων PCR, οι θερμοκρασίες του κύκλου, η Taq DNA πολυμεράση, η ισορροπία ανάμεσα στις συγκεντρώσεις χλωριούχου μαγνησίου και δεοξυνουκλεοτιδίων καθώς και οι ποσότητες του μητρικού DNA.

Παλαιότερα, η mPCR είχε εφαρμοσθεί για τον προσδιορισμό δυο έως τριών παθογόνων μικροοργανισμών. Πλέον, η mPCR είναι πιο εξελιγμένη και έχει τη δυνατότητα να προσδιορίσει από πέντε ή περισσότερα παθογόνα μαζί. Ερευνητές έχουν εφαρμόσει mPCR για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πέντε τροφιμογενών παθογόνων χρησιμοποιώντας πέντε ζεύγη εκκινητών τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

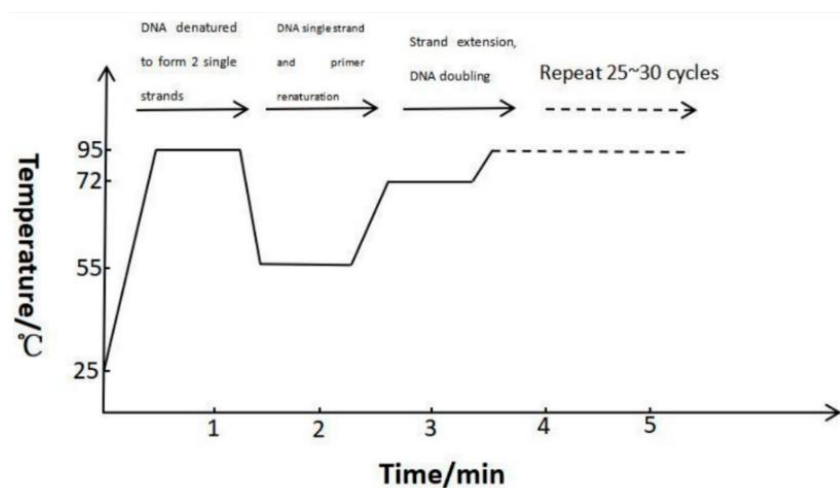
| Παθογόνος μικροοργανισμός | Στόχος εκκινητών |
|-------------------------------|---|
| <i>Salmonella enteritidis</i> | πρωτεΐνη εισβολής (invA), |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 16S r DNA |
| <i>Shigella flexneri</i> | το πλασμιδιακό αντιγόνο εισβολής H (ipaH) |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | λιστεριολυσίνη O (hlyA) |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | γονίδιο intimin (eaeA) |

Πίνακας 4 Στόχος εκκινητών στο εκάστοτε παθογόνο προσδιορισμού

Άλλες ερευνητικές ομάδες κατάφεραν να αναπτύξουν μια καινούρια διεργασία mPCR η οποία μπορεί να προσδιορίσει έως και έξι είδη *Listeria spp.*, την ίδια χρονική στιγμή σε ένα μόλις σωληνάριο με λεπτομερή ακρίβεια. Τα είδη *Listeria spp.* που κατάφεραν να τακτοποιηθούν αποτελούν η *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri* και η *Listeria monocytogenes*. [83]

Βασική προϋπόθεση της mPCR αποτελούν οι εκκινητές, οι οποίοι κατευθύνουν στην ενδυνάμωση μοναδικών τμημάτων του DNA. Αυτό συμβαίνει τόσο σε ζεύγη μεμονωμένα όσο και σε συνδυασμό με πολλούς εκκινητές, κάτω από ένα συνεχόμενο σύνολο των συνθηκών αντίδρασης. Η mPCR έχει εξελιχθεί σε μια ταχύτατη και βολική διεργασία τόσο στο ερευνητικό όσο και στο κλινικό εργαστήριο.

Ο βέλτιστος συνδυασμός συγκέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος και θερμοκρασίας ανόπτησης κρίνεται απαραίτητος στην mPCR, με σκοπό τη λήψη εξειδικευμένων προϊόντων ενδυνάμωσης. Η συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου θα πρέπει να είναι ανάλογη ποσοτικά μόνο με τα dNTP και αντίστοιχα απαραίτητη είναι η προσαρμογή της συγκέντρωσης των εκκινητών για την κάθε αλληλουχία-στόχο. [93]



Εικόνα 38 Διάγραμμα διαδικασίας mPCR. (α) Το DNA μετουσιώνεται στους 95° C με σκοπό το σχηματισμό δυο μονόκλωνων αλυσίδων, (β) το DNA σχηματίζει ένα μονόκλωνο και ο εκκινητής πυκνώνεται εκ νέου στους 55° C και (γ) γίνεται επιμήκυνση του κλώνου και το DNA διπλασιάζεται στους 72° C. Ολόκληρη η διαδικασία τίθενται σε επανάληψη για 25-30 κύκλους [163]

Άλλες εφαρμογές της mPCR αποτελούν ο προσδιορισμός παθογόνων μυκήτων όπως είναι ο *Aspergillus spp.* από ένα παραδοσιακό τρόφιμο σόγιας στην Κορέα. Στο συγκεκριμένο προσδιορισμό εφαρμόστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές, με σκοπό την επίτευξη της διάκρισης ανάμεσα σε μύκητες που παράγουν αφλατοξίνη και μη αφλατοξίνη. Η mPCR έχει εφαρμοσθεί και για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό *Fusarium*, *Aspergillus* και *Penicillium* σε σκόνη σπόρων αραβόσιτου που έχει μολυνθεί. [8]

2.4.4 «Φωλιασμένη» PCR (nested PCR, nPCR)

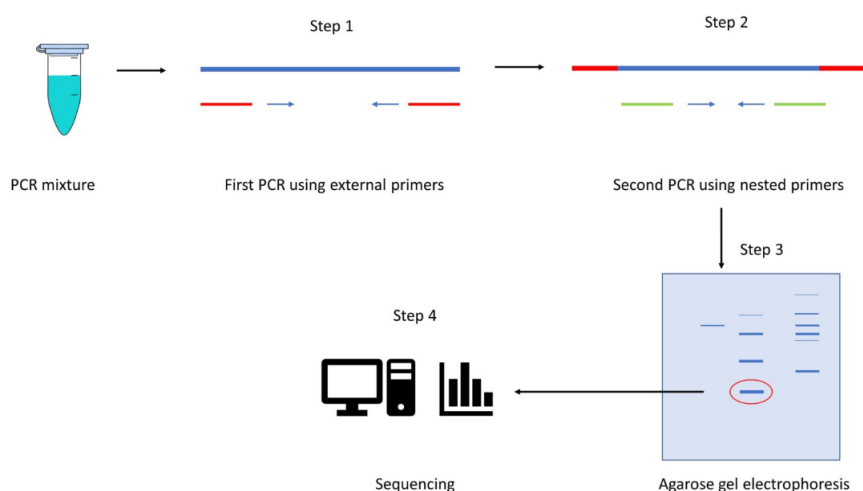
Στη τεχνική της εσωτερικής PCR (nPCR) εφαρμόζονται δυο ζεύγη εκκινητών, ένα ζεύγος εσωτερικών εκκινητών και ένα ζεύγος εξωτερικών εκκινητών. [136]

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται σε περιπτώσεις που είναι απαραίτητη η υψηλή ευαισθησία ή ακόμα και η ειδικότητα της PCR, π.χ. όταν γίνεται ενίσχυση σε ένα συγκεκριμένο τμήμα μιας πολυμορφικής γονιδιακής οικογένειας ή στην περίπτωση ενίσχυσης ενός αντιγράφου cDNA από ένα mRNA που ανιχνεύεται σε μικρή συγκέντρωση σε ένα δείγμα κλινικού ενδιαφέροντος στο οποίο εμπεριέχεται ένας ετερογενής πληθυσμός κυτταρικών ειδών. Η nPCR αποτελείται από δυο διαδοχικές αντιδράσεις ενισχύσεις. Η καθεμία από αυτές εφαρμόζει διαφορετικό ζεύγος εκκινητών, όπως ήδη έχει αναφερθεί. Το προϊόν που προκύπτει από τη πρώτη αντίδραση εφαρμόζεται ως πρότυπο για τη δεύτερη αντίδραση PCR. Η δεύτερη

αντίδραση εκκινείται από ολιγονουκλεοτιδία τα οποία είναι τοποθετημένα εντός του πρώτου ζεύγους των εκκινητών. Με την εφαρμογή δυο ζευγών ολιγονουκλεοτιδίων επιτυγχάνεται η εκτέλεση υψηλότερου αριθμού κύκλων, με συνέπεια την αύξηση της ευαισθησίας. Η καλύτερη ειδικότητα της αντίδρασης απορρέει από τη σύνδεση δυο ξεχωριστών εκκινητών με κοινό πρότυπο-στόχο. Η nPCR αποτελεί μια αποτελεσματική τεχνική για την ενδυνάμωση των τμημάτων εκτεταμένου μεγέθους προτύπων, παρόλα αυτά κρίνεται απαραίτητη η γνώση αναφορικά με την ακολουθία του στόχου. [64]

Επιπρόσθετα, ενδείκνυται η χρήση εξωτερικού ζεύγους εκκινητών και ενός μόνο εσωτερικού εκκινητή, ο οποίος θα σχηματίσει ζευγάρι με κάποιον από τους εξωτερικούς εκκινητές. Μετά το πέρας των αρχικών κύκλων θα πρέπει να ακολουθήσει η διάλυση του μείγματος, προκειμένου να μειωθεί η συγκέντρωση των εξωτερικών εκκινητών και έπειτα να γίνει προσθήκη του ζεύγους των εσωτερικών εκκινητών. [136]

Η nPCR είναι απαραίτητη σε περιπτώσεις με υψηλή ευαισθησία προκειμένου να εξαλειφθούν ψευδώς θετικά περιστατικά. Αποτελεί συνδυασμό δυο τεχνικών PCR. Σε πρώτο στάδιο γίνεται ενίσχυση του τμήματος DNA-στόχου από ένα δείγμα με την αρχική σειρά εκκινητών και στο δεύτερο στάδιο, η δεύτερη σειρά εκκινητών εφαρμόζεται για την ακολουθία στο 3' άκρο του αρχικού εκκινητή, διορθώνοντας το πρώτο στάδιο του προϊόντος PCR. [74]



Εικόνα 39 Nested Polymerase Chain Reaction (nPCR) [77]

2.4.5 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time Quantitative PCR, RT-qPCR)

Η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR) αποτελεί μια εξελιγμένη αντίδραση η οποία στηρίζεται σε PCR που ενδυναμώνει και ποσοτικοποιεί με σκοπό τον προσδιορισμό του DNA-στόχου. Η εν λόγω μέθοδος εφαρμόζει φθορίζουσες ουσίες και ανιχνευτές DNA προκειμένου να μετρηθούν τα ενισχυμένα προϊόντα. Αποτελεί μια ταχύτατη και αξιόπιστη τεχνική καθώς δεν τίθενται ζητήματα για μετέπειτα επεξεργασία, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου και κόπου αναφορικά με το προσδιορισμό των παθογόνων. [74]

Η RT-qPCR παρουσιάζει μια βασική διαφορά συγκριτικά με την συμβατική PCR, αυτό απορρέει από το γεγονός ότι η RT-qPCR δεν χρειάζεται ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αгарόζης για τον προσδιορισμό των προϊόντων PCR. Η RT-qPCR μπορεί να επιβλέπει συνεχώς τα προϊόντα PCR που σχηματίζονται καθ' όλη τη διαδικασία της αντίδρασης μέσω της μέτρησης του φθοριζόμενου σήματος.

Το φθορίζον σήμα παράγεται από εξειδικευμένους με διπλή επισημάνση ανιχνευτές ή παρεμβολόμενες χρωστικές. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη ως προς τη ποσότητα των PCR αμπλικονίων.

Υπάρχει ιδιαίτερη ανάπτυξη αναφορικά με τα συστήματα φθορισμού για RT-qPCR. Κάποια από τα συστήματα φθορισμού που εφαρμόζονται πιο συχνά αποτελούν η SYBR green I, οι ανιχνευτές TaqMan και οι μοριακοί φάροι (ή beacons). Το SYBR green I αποτελεί μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία δεσμεύει δίκλωνο DNA (ή dsDNA). Η προαναφερθείσα χρωστική έχει την ικανότητα εκπομπής μικρού βαθμού φθορισμό και σε αυτή τη περίπτωση το σήμα φθορισμού ενδυναμώνεται όταν δεσμευθεί στη μικρή αύλακα της διπλής έλικας του DNA.

Οι ανιχνευτές TaqMan και οι μοριακοί φάροι αποτελούν συνηθισμένες εναλλακτικές του SYBR green I. Οι ανιχνευτές TaqMan είναι ολιγονουκλεοτίδια που εμπεριέχουν ως χρωστική αναφοράς ένα φθοριοφόρο στο 5' άκρο και στο 3' άκρο τη χρωστική απόσβεσης. Οι εν λόγω ανιχνευτές είναι επίσης γνωστοί και ως ανιχνευτές διπλής χρωστικής. Οι χρωστικές (αναφοράς και απόσβεσης) είναι κοντά η μια στην άλλη, γεγονός το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα να εμποδίζεται ο εκπεμπόμενος φθορισμός της χρωστικής αναφοράς. Ο ανιχνευτής TaqMan είναι συμπληρωματικός ως προς μια νουκλεοτιδική αλληλουχία, η οποία ορίζεται με σαφήνεια.

Οι μοριακοί φάροι αποτελούν ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές με διάπλαση στελέχους/φουρκέτας και βρόγχου, όπου η ακολουθία είναι συμπληρωματική προς μια

ακολουθία-στόχο και βρίσκεται σε ένα μέρος του βρόγχου και το στέλεχος σχηματίζεται με ανόπτηση ανάμεσα σε δυο συμπληρωματικές αλληλουχίες βραχιόνων. Ο μοριακός φάρος δημιουργεί ένα σήμα φθορισμού κατά τη διάρκεια υβριδισμού του ανιχνευτή με τη νουκλεοτιδική ακολουθία στο αμπλικόνιο, η οποία είναι συμπληρωματική.

Η RT-qPCR έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό αρκετών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών όπως ο *Staphylococcus aureus* σε νωπό γάλα, η *Salmonella spp.* σε φρεσκοκομμένα λαχανικά και φρούτα, στελέχη *E. coli* που παράγουν τοξίνη *Shiga* καθώς και για αλλά τροφιμογενή παθογόνα που αποτελούν κίνδυνο για τη δημοσιότητα υγείας.

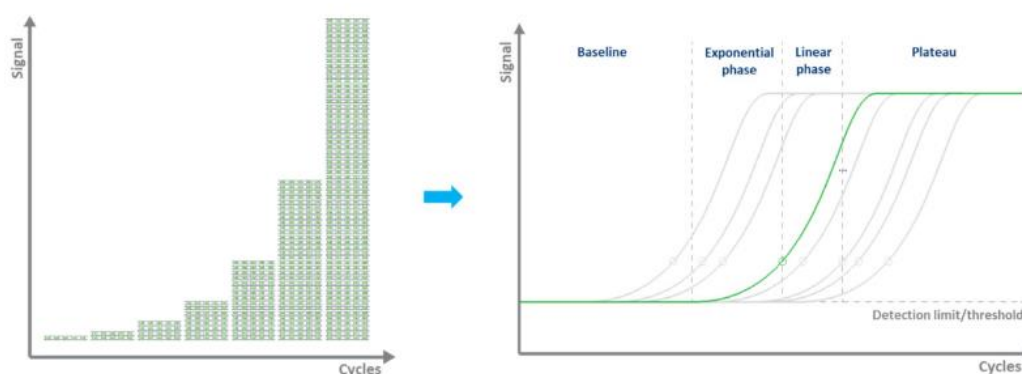
Αναμεσα στα συστήματα φθορισμού που αναφέρθηκαν το SYBR Green I αποτελεί το πιο οικονομικό και απλό σε χρήση συγκριτικά με τους ανιχνευτές TaqMan και τους μοριακούς φάρους. Πέραν της απλής χρήσης του SYBR Green I, ένα άλλο πλεονέκτημα που διαθέτει είναι ότι η καμπύλη τήξης του DNA ενδείκνυται να σχηματιστεί μετά τη PCR σε συνδυασμό με τον υπολογισμό της θερμοκρασίας τήξης (T_m) των προϊόντων που έχουν ενισχυθεί. Αυτό χρειάζεται με σκοπό να διαφέρουν τα προϊόντα-στόχοι από τη δημιουργία διμερών εκκινητών. Συγκριτικά με τα αμπλικόνια τα προϊόντα των διμερών εκκινητών έχουν μικρότερες τιμές T_m .

Το SYBR Green I δεν διαθέτει εξειδίκευση και μπορεί να συνδέεται σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA, με αποτέλεσμα να μπορεί να εφαρμοσθεί για το προσδιορισμό προϊόντων PCR. Παρόλα αυτά η χρωστική SYBR Green I συνδέεται και σε αλλά μη εξειδικευμένα προϊόντα αντίδρασης, ανάμεσα στα οποία περιλαμβάνονται και διμερή εκκινητών. Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι η RT-qPCR με βάση τον ανιχνευτή TaqMan εμφανίζει υψηλότερη ευαισθησία συγκριτικά με την RT-qPCR με βάση το SYBR Green I ή αντίστοιχα τους μοριακούς φάρους.

Η RT-qPCR αποτελεί μια ευαίσθητη μέθοδο και δεν απαιτεί επεξεργασία μετά την PCR, γεγονός το οποίο ενέχει χαμηλό κίνδυνο διασταυρούμενων μολύνσεων.

Η mPCR καθώς και η συμβατική PCR, είναι απαραίτητη η ανάλυση σε πήκτωμα αгарόζης για να προσδιοριστούν τα προϊόντα PCR, μια διαδικασία επίπονη και χρονοβόρα, συνεπώς δεν ενδείκνυται για αναλύσεις μεγάλων αποδόσεων και η αυτοματοποίηση τους καθίσταται δύσκολη.

Τα πλεονεκτήματα που διαθέτει η RT-qPCR, οδήγησαν στην ανάπτυξη εμπορικών κιτ με σκοπό την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων όπως η *Salmonella* spp., η *Listeria monocytogenes*, η *E. coli* O157:H7 και το *Campylobacter jejuni*. Κάποια από αυτά τα εμπορικά κιτ αποτελούν *Salmonella* BAX™ PCR (DuPont Qualicon), το TaqMan® *Listeria monocytogenes* Detection Kit (Applied Biosystems), το *E. coli* O157 BAX® PCR (DuPont Qualicon) και το ADIAFOOD *Campylobacter* JCL qPCR commercial kit (AES Chemunex), αντίστοιχα. [83]



Εικόνα 40 Ενίσχυση μήτρας DNA με qPCR και καταμέτρηση της ένδειξης φθορισμού σε πραγματικό χρόνο [108]

2.4.6 Τεχνολογία γονιδιακών ανιχνευτών (Gene Probe Technology)

Η τεχνολογία γονιδιακών ανιχνευτών για πρώτη φορά προτάθηκε πριν από περίπου 45 χρόνια. Η συγκεκριμένη τεχνολογία εξαρτάται από την ισχύ δημιουργίας ενός ανιχνευτή εφαρμόζοντας την ακολουθία DNA από ένα γνωστό γονίδιο. Όταν αυτή η ακολουθία έρθει σε επαφή με αποδιαταγμένο μονόκλωνο γονιδιωματικό DNA και εφόσον οι βάσεις και των δυο είναι εντελώς συνδεδεμένες, συμπληρώνονται και σχηματίζουν μια διπλή αλυσίδα και κατά αυτό το τρόπο παρουσιάζουν ότι το γονιδιωματικό DNA που παρατηρείται εμπεριέχει μια γνωστή αλληλουχία γονιδίου.

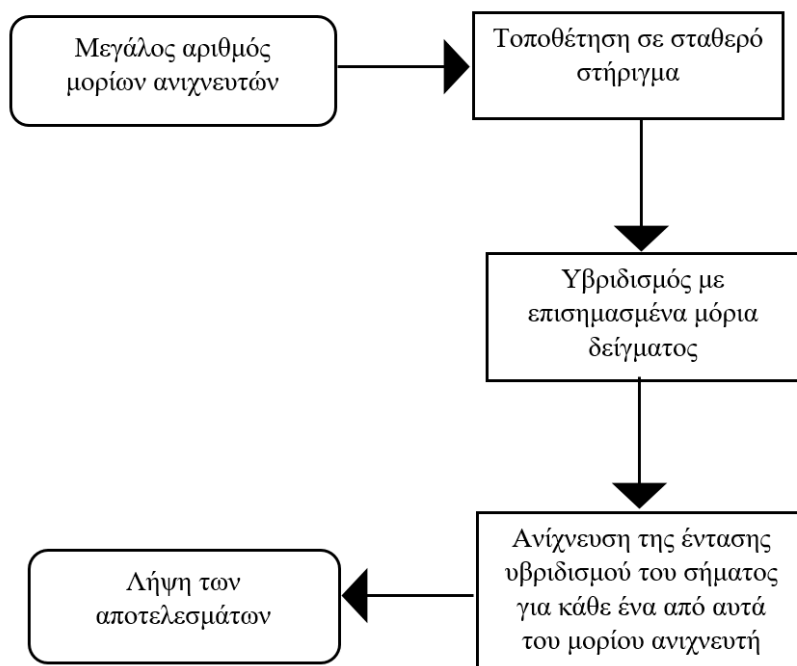
Μια μονή συμπληρωματική αλυσίδα μπορεί να ενσωματωθεί σε μια διπλή αλυσίδα κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Ο εν λόγω συνδυασμός είναι εξειδικευμένος και συντελείται με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων, όχι μόνο ανάμεσα σε DNA και DNA αλλά και ανάμεσα σε DNA και RNA. Υπάρχουν δυο βασικές προϋποθέσεις για το προσδιορισμό γονιδίων: α) εξειδικευμένος ανιχνευτής DNA και β) το βασικό γονιδιωματικό DNA. Όταν αυτά τα δυο αποδιαταχθούν σε μια μόνο αλυσίδα, επέρχεται μοριακός υβριδισμός.

Η εν λόγω τεχνολογία εφαρμόζεται για γνωρίσματα της αποδιάταξης των γονιδίων και της επανάληψης με σκοπό τη σύγκριση και τη μελέτη γονιδιακών ακολουθιών σε τρόφιμα, με στόχο την ασφάλεια τους. Στη παρούσα τεχνολογία εφαρμόζονται κατά κύριο λόγο δυο μέθοδοι: ο ετερογενής υβριδισμός και ο υβριδισμός σε φάση, οι οποίες στηρίζονται σε γονιδιακούς ανιχνευτές με σκοπό τον προσδιορισμό της *Salmonella spp.*, του *Staphylococcus aureus*, καθώς και άλλων παθογόνων που είναι επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία, με σκοπό να μπορεί να κριθεί εάν η ποιότητα του εκάστοτε τροφίμου τεκμηριώνει τα πρότυπα των αρμόδιων φορέων.

Στην περίπτωση που η συγκεκριμένη τεχνολογία εφαρμοσθεί συνδυαστικά με PCR, ενδέχεται να προσδιορίσει αρκετά είδη παθογόνων σε ίδιο χρονικό διάστημα. Παρόλα αυτά, ο μη εξειδικευμένος ανιχνευτής φθορισμού ενδέχεται να αντιδρά με σύνθετα στοιχεία που ενδεχομένως υπάρχουν στα τρόφιμα, με συνέπεια τη παρουσία μη ακριβών αποτελεσμάτων. Ο περιορισμός αυτός ενδέχεται να ξεπεραστεί, επιλέγοντας βιολογικά μόρια με υψηλή εξειδίκευση. [163]

2.4.7 Τεχνολογία γονιδιακών τσιπ (Gene Chip Technology)

Για πρώτη φορά η τεχνολογία γονιδιακών τσιπ (GC) προτάθηκε για βιολογικό προσδιορισμό πριν από περίπου 30 χρόνια. Η συγκεκριμένη τεχνολογία εφαρμόζει την αρχή υβριδισμού των νουκλεϊκών οξέων για τον προσδιορισμό γονιδιακού δείγματος. Τεράστιος αριθμός από θραύσματα DNA ή RNA υβριδοποιούνται σε επιφάνεια ενός στερεού φορέα, μέσω σύζευξης των βάσεων. Στη συνέχεια το σύμβολο υβριδοποίησης και η ένταση προσδιορίζονται από ειδικό σύστημα σάρωσης, με αποτέλεσμα τη λήψη γονιδιακών πληροφοριών του δείγματος.



Εικόνα 41 Σχηματικό διάγραμμα GC. 1^ο Στάδιο: Συλλογή αρκετών μορίων ανιχνευτών, 2^ο στάδιο: Τοποθέτηση σε σταθερό φορέα και υβριδοποίηση με επισημασμένα μόρια και 3^ο στάδιο: Ανίχνευση έντασης σήματος υβριδισμού για κάθε μόριο ανιχνευτή [163]

Το GC λειτουργεί σταθεροποιώντας το μόριο του ανιχνευτή στην επιφάνεια του τσιπ και εν συνεχεία υβριδοποιείται με το σηματοδοτούμενο μόριο του εκάστοτε δείγματος. Τα δεδομένα του δείγματος, έχουν ληφθεί με τη συστηματική παρατήρηση της δύναμης του συμβόλου υβριδισμού για την κατηγοριοποίηση βακτηριακών ειδών. Η έρευνα αναφορικά με τον προσδιορισμό των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών τα τελευταία χρόνια έχει παρουσιάσει τεράστια αύξηση. Η GC είναι από τις πρώτες που έχουν αναπτυχθεί, η πρώτη σε ανάπτυξη και έρευνα καθώς και η πιο εφαρμοζόμενη τεχνολογία όσον αφορά τη τεχνολογία των βιοτσίπ. Ως προς τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων η εν λόγω τεχνολογία ενδείκνυται για την αποτελεσματική διάκριση ζωντανών βακτηρίων.

Ερευνητές έχουν πετύχει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό επτά παθογόνων στελεχών, π.χ. *Shigella spp.* με τη τεχνολογία γονιδιακού τσιπ 16S rDNA. Παρόλα αυτά υπάρχει σημαντικό μειονέκτημα όσον αφορά τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, των οποίων η εμφάνιση τους είναι πολύ εύκολη κατά την πραγματοποίηση αρκετών προσδιορισμών σε πραγματικά δείγματα. Άλλες ομάδες ερευνητών έχουν εφαρμόσει την συγκεκριμένη τεχνολογία προκειμένου να πραγματοποιηθεί διεξοδική σύγκριση ως προς τις αλληλουχίες του ολικού γονιδιώματος σε 11 είδη *Campylobacter jejuni*, από όπου και

έλαβαν σαφείς δείκτες, ως προς τη παθογένεια του *Campylobacter jejuni*, οι οποίοι επαληθεύουν άρτια τα βιολογικά γνωρίσματα των στελεχών.

Η τεχνολογία GC αποτελεί μια ευαίσθητη και εξειδικευμένη μοριακή τεχνολογία, η οποία μπορεί να παρατηρεί δείγματα υψηλής απόδοσης και να προσδιορίζει αρκετούς παθογόνους μικροοργανισμούς στον ίδιο χρόνο. Ως προς τη χρήση της η τεχνολογία είναι απλή και μπορεί να παράγει ταχύτητα και λεπτομερή αποτελέσματα. Παρόλα αυτά ο εξοπλισμός έχει υψηλό κόστος και χρειάζεται άρτιο επίπεδο δεξιοτήτων για την ορθή λειτουργία του.

Η διαδικασία προετοιμασίας GC και υβριδισμού για τον προσδιορισμό μικρού αριθμού παθογόνων μικροοργανισμών απαιτεί χρόνο, υψηλό κόστος και διαθέτει χαμηλά επίπεδα επαναληψιμότητας. Ωστόσο, οι βιομηχανίες τροφίμων οφείλουν να επεκτείνουν τις πιθανότητες χρήσεις της συγκεκριμένης τεχνολογίας μέσα από την τεχνολογική έρευνα και την ανάπτυξη, διασφαλίζοντας κατ' αυτό το τρόπο την ασφάλεια της παραγωγής και της επεξεργασίας από δυο σκοπιές, του προσδιορισμού παθογόνων μικροοργανισμών και τον προσδιορισμό πρώτων υλών στα τρόφιμα. [163]

2.4.8 Μέθοδος βασισμένη σε συστοιχίες

Μια μέθοδος συστοιχίας προσδιορίζει το παθογόνο με τις ακολουθίες DNA, πρωτεΐνες με *in situ* και *ex-situ* σχηματισμό βιομορίων στη στερεή επιφάνεια υποστρώματος και μεταγραφές RNA. Αναγνωρίζει τη διάδραση ανάμεσα στο στόχο και τον ανιχνευτή, η οποία αφορά τη χωρική σάφωση της μικροσυστοιχίας. Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών είναι σημαντική καθώς διαθέτει πλεονεκτήματα όπως, η ταχύτητα, η ευαισθησία, η απόδοση και η υψηλή ακρίβεια. Οι συστοιχίες που έχουν ως βάση το DNA (μικροσυστοιχίες) καθώς και οι άλλες τεχνολογίες που στηρίζονται σε συστοιχίες αξιοποιούνται για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα τροφίμων. [74]

2.4.8.1 Μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων DNA

Η πρόοδος που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια αναφορικά με τεχνολογία ανίχνευσης αρκετών γονιδίων περιλαμβάνει την τεχνολογία μικροσυστοιχιών. Αρχικά οι μικροσυστοιχίες εφαρμόστηκαν για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης. Παρόλα αυτά η ολιγονουκλεοτιδική μικροσυστοιχία DNA εφαρμόζεται ευρέως στο τομέα ανίχνευσης τροφιμογενών παθογόνων. Οι μικροσυστοιχίες αποτελούνται από πλάκες

γυαλιού ή τσιπς τα οποία επικαλύπτονται με εκατοντάδες εξειδικευμένους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές.

Οι συγκεκριμένοι ανιχνευτές αποτελούν χημικά συντιθέμενες συνοπτικές αλληλουχίες το εύρος των οποίων κυμαίνεται από 25 έως 80 bp. Κάθε ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής μπορεί να στοχεύσει ένα συγκεκριμένο σημείο μιας γονιδιακής αλληλουχίας. Στη συγκεκριμένη μέθοδο στα δείγματα κομματιών νουκλεϊκού οξέος (DNA, cDNA ή mRNA) γίνεται επισήμανση με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες και στη συνέχεια διάσπαση των δεσμών με σκοπό τη δημιουργία μονόκλωνων θραυσμάτων.

Στη συνέχεια τα μονόκλωνα θραύσματα που προέκυψαν και βρίσκονται διατεταγμένα στην ίδια σειρά θα υβριδοποιηθούν μέσω της σύνδεσης τους με τους αντίστοιχους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές.

Η λήψη των αποτελεσμάτων γίνεται με την οπτικοποίηση του σήματος φθορισμού, το οποίο παράγεται από το σύστημα ανιχνευτή-δείγματος. Η συγκέντρωση κάθε συμασμένου κομματιού νουκλεϊκού οξέος είναι ανάλογη με την ένταση φθορισμού.

Η πρώτη αναφορά προσδιορισμού από ολιγονουκλεοτιδική μικροσυστοιχία DNA αφορούσε τους παθογόνους ορότυπους της *E. coli* και της *Shigella*. Ο προσδιορισμός συγκεκριμένου ορότυπου κρίνεται απαραίτητος ειδικά για παθογόνους μικροοργανισμούς όπως το *E. coli* που εμφανίζουν διαφορετικούς ορότυπους με διαφορετικό βαθμό παθογένειας, από στέλεχος που δεν προκαλεί βλάβες (*E. coli* K-12) έως στελέχη όπως το *E. coli* O157:H7, το οποίο μπορεί να επιφέρει ακόμη και το θάνατο.

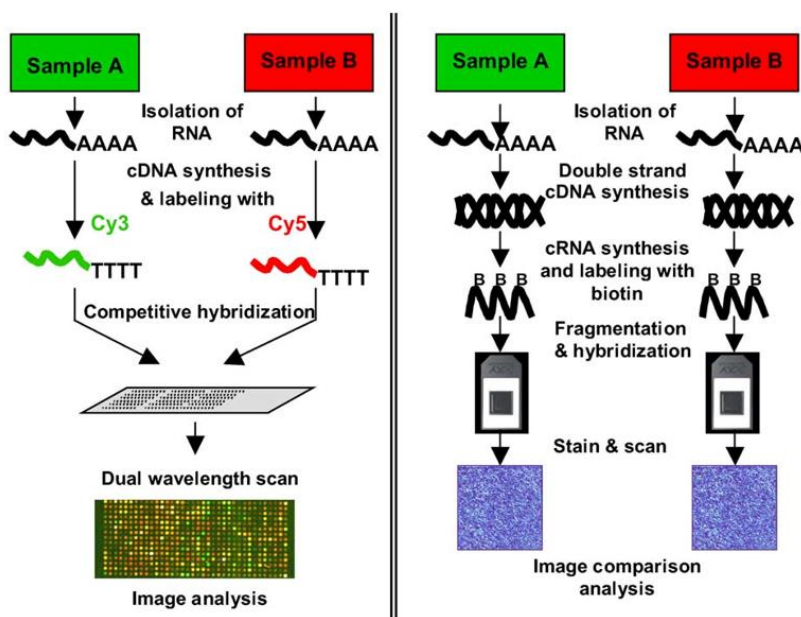
Επιπρόσθετα, μια ομάδα ερευνητών (Wang et al. 2007) ανέπτυξαν μια ανάλυση μικροσυστοιχίας, η οποία επιτρέπει το προσδιορισμό και την αναγνώριση 22 τροφιμογενών παθογόνων, π.χ. *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* και *Staphylococcus aureus*.

Οι μικροσυστοιχίες DNA είναι διαθέσιμες στο εμπόριο. Ωστόσο, η πλειοψηφία αυτών έχουν δημιουργηθεί με την ανάλογη ακρίβεια για εφαρμογή σε μελέτες ανάλυσης αναφορικά με τη γονιδιακή έκφραση. Οι *in situ* συστοιχίες που υπάρχουν στο εμπόριο είναι μικροσυστοιχίες με υψηλή πυκνότητα, όπου σύντομοι σε διάρκεια ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές αυξομειώνονται από 20 έως 25 bp και συγκροτούνται κατευθείαν στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας. Επιπρόσθετα, υπάρχουν αρκετοί

ανιχνευτές σε κάθε στόχο για υψηλότερη ευαισθησία, ακρίβεια και ειδικότητα. Οι μικροσυστοιχίες με υψηλή πυκνότητα χρίζουν ειδικής κατασκευής και έχουν γενικά υψηλό κόστος.

Η πλειοψηφία των εμπορικών μικροσυστοιχιών δεν ενδείκνυται για εξειδικευμένες εφαρμογές, όπως είναι η μικροβιακή ανάλυση τροφίμων. Αυτό συμβαίνει επειδή η συστοιχία που κυμαίνεται από χαμηλή έως μέση πυκνότητα θα αποτελέσει κατάλληλη πλατφόρμα μικροσυστοιχιών παρέχοντας αξιόπιστα αποτελέσματα χωρίς την εφαρμογή σύνθετου εξοπλισμού. Για το λόγο αυτό διατίθενται από το Τμήμα Βιοπόρων του Seibersdorf καθώς και από άλλους οργανισμούς προσαρμοσμένες μικροσυστοιχίες. Οι συγκεκριμένες μικροσυστοιχίες είναι λιγότερο δαπανηρές συγκριτικά με τις εμπορικές, εμφανίζουν υψηλή ειδικότητα και είναι ευαίσθητες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η StaphyChips®, η ανάπτυξη της οποίας έγινε από την Affymetrix σε συνεργασία με την Advanced Array Technology. Η συγκεκριμένη μικροσυστοιχία έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης συνολικά 15 ειδών σταφυλόκοκκου.

Γενικότερα, η μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων DNA ενδείκνυται για την ταυτόχρονη ακριβή αναγνώριση αρκετών βακτηριακών τροφιμογενών παθογόνων, είναι ικανή για την ανάλυση υψηλής απόδοσης και υπάρχει η δυνατότητα της αυτοματοποίησής της. [83]



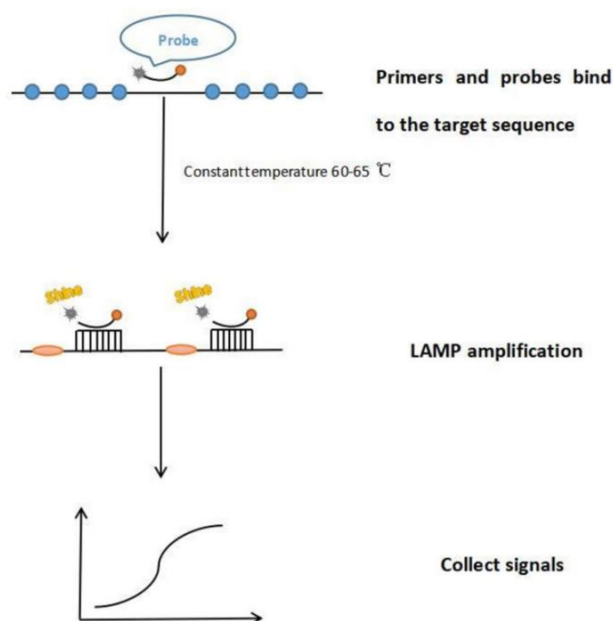
Εικόνα 42 Σύνοψη της διαδικασίας μικροσυστοιχιών με σημεία (A) σε σχέση με μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων με υψηλή πυκνότητα (B). Δείγμα A: έλεγχος- δείγμα B: δοκιμή [89]

2.5 Ισοθερμική Ενίσχυση

Η ισοθερμική ενίσχυση είναι μια καινούρια μέθοδος ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, η οποία έχει τη δυνατότητα παροχής γρήγορων, ευαίσθητων δοκιμών με υψηλή ακρίβεια και ειδικότητα σχετικά με τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Ένα από τα πλεονεκτήματα της ισοθερμικής ενίσχυσης είναι ότι δεν απαιτείται ακριβός και εξειδικευμένος εξοπλισμός, γεγονός που καθιστά την εν λόγω μέθοδο ελκυστική από αρκετές βιομηχανίες τροφίμων. Στις βασικές τεχνολογίες ισοθερμικής ενίσχυσης περιλαμβάνονται η ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος (NASBA) και η ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου (LAMP). [163]

2.5.1 Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)

Οι Notomi et al. (2000) ανέφεραν για πρώτη φορά τη μοριακή τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος, η οποία καλείται ισοθερμική ενίσχυση με τη βοήθεια βρόγχου (LAMP). Πρόκειται για ένα σύνολο τεσσάρων ή έξι διαροποιημένων εκκινήτων, οι οποίοι δεσμεύονται σε έξι ή οχτώ διαφορετικά τμήματα στο γονίδιο-στόχο με αποτέλεσμα την υψηλή του εξειδίκευση. Το σύνολο των αντιδράσεων μπορούν να πραγματοποιηθούν υπό ισόθερμες συνθήκες με θερμοκρασιακό εύρος από 60° C έως 65° C. Δεν χρειάζεται ηλεκτροφόρηση μετά τον εμπλουτισμό, καθώς ο προσδιορισμός επιτυγχάνεται με γυμνό μάτι.



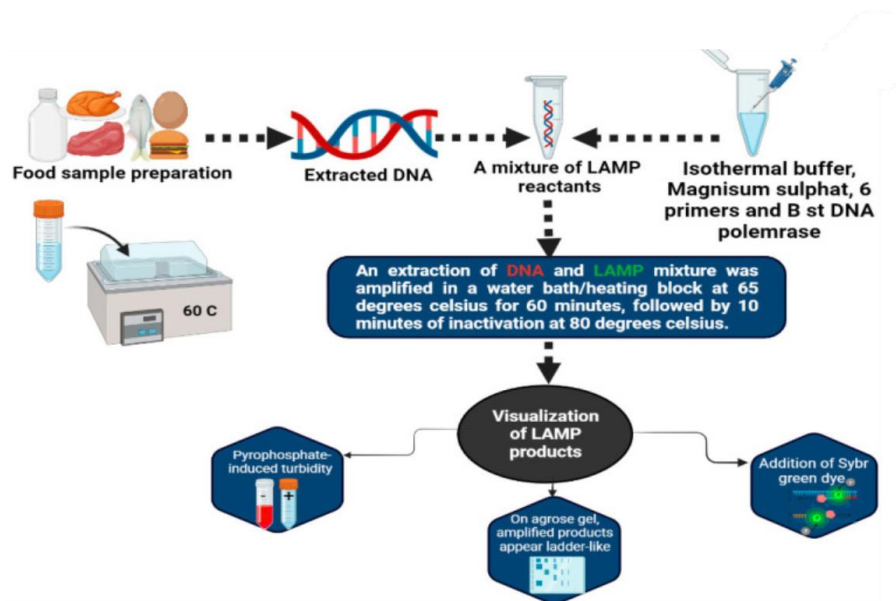
Εικόνα 43 Διαδικασία LAMP [163]

Η πρώτη εφαρμογή της LAMP ως προς την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων ήταν ο προσδιορισμός του *stxA2* σε κύτταρα *E. coli O157:H7*. Οι ήπιες προϋποθέσεις διαπερατότητας σε συνδυασμό με τη χαμηλή ισοθερμική θερμοκρασία που εφαρμόζονται στη *in situ* LAMP είναι λιγότερο επιβλαβείς από εκείνες που μπορεί να προκληθούν από την *in situ* PCR.

Ερευνητές εφάρμοσαν τη μέθοδο LAMP για τον προσδιορισμό συχνών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Η LAMP εμφανίζει εξαιρετική ευαισθησία και ταχύτητα, καθώς έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης ενός μόνο αντιγράφου από ένα γονίδιο σε χρονικό διάστημα εντός 30 λεπτών.

Οι ευνοϊκές συνθήκες αντίδρασης προσδιορίστηκαν στους 65° C για χρονικό διάστημα 45 λεπτών, με όριο προσδιορισμού ως 1 pg DNA/σωλήνα και 100 CFU/αντίδραση. Η εφαρμογή της μεθόδου LAMP έχει χρησιμοποιηθεί για το προσδιορισμό 214 τροφιμογενών στελεχών *Salmonella spp.*. Η εφαρμογή επιτεύχθηκε με τη χρήση ταχύτατης διαδικασίας καθώς και εύκολης τεκμηρίωσης των αποτελεσμάτων. Η ειδικότητα της δοκιμής LAMP ανέρχονταν στο 97,7% (209/214). Η υψηλή ειδικότητα προήλθε όταν η ανάλυση LAMP εφαρμόστηκε σε 39 στελέχη, όπου δεν παρατηρήθηκε ψευδής θετική ενίσχυση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η εν λόγω δοκιμασία να αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο ως προς τη γρήγορη ανίχνευση για στελέχη *Salmonella spp.*.

Γενικότερα, η μέθοδος LAMP, αποτελεί μια σχετικά εύκολη μέθοδο για τον προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών. Συγκριτικά με τη συμβατική τεχνολογία PCR η μέθοδος LAMP είναι 1-2 φορές πιο ευαίσθητη. Η δοκιμή μπορεί να πραγματοποιηθεί σε χρονικό διάστημα από 30 έως 60 λεπτά. Ο σχεδιασμός των εκκινητών καθίσταται δαπανηρός και δυσχερής. Το μέγεθος μιας αλληλουχίας που ενισχύεται δεν ενδείκνυται να ξεπερνά τα 300 bp. Η μη εξειδικευμένη αντιστοίχιση αναμεσα στους εκκινητές βρόγχου θα έχει ως επακόλουθο ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η διασταυρούμενη μόλυνση ενδείκνυται στη περίπτωση που δεν ληφθούν προφυλάξεις για την αποφυγή της. [163]



Εικόνα 44 Ροή εργασίας της μεθόδου LAMP για τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων [52]

2.5.2 Ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, NASBA)

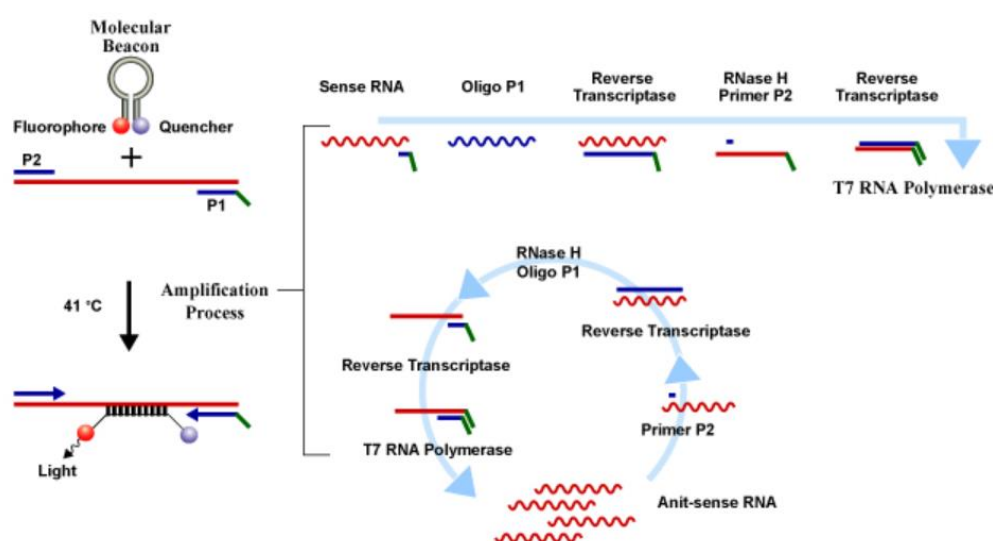
Συγκριτικά με την συμβατική PCR που προσδιορίζει DNA, η μέθοδος NASBA στηρίζεται στην ισοθερμική ενδυνάμωση του RNA σε έναν οργανισμό-στόχο. Δεν είναι απαραίτητη η χρήση εξοπλισμού θερμικής ανακύκλωσης. Η μέθοδος NASBA διαθέτει έναν εκκινητή, ο οποίος προσκολλάται στην αλληλουχία RNA-στόχο και παράγει μια αλυσίδα cDNA με αντίστροφη μεταγραφάση. Στη συνέχεια η RNάσηH χρησιμοποιείται για την πέψη του μητρικού RNA και το cDNA προσκολλάται σε ένα δεύτερο εκκινητή με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης. Επιπλέον, η πολυμεράση T7RNA εφαρμόζεται για τη παραγωγή RNA μεταγράφων με τη διαδικασία ενίσχυσης.

Η NASBA είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον προσδιορισμό RNA ών και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι εφαρμόζεται RNA πολυμεράση για να ενισχυθεί το RNA χωρίς να απαιτείται μετατροπή σε cDNA. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει αποδειχθεί εξειδικευμένη, ταχύτατη και ευαίσθητη ως προς την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων.

Η NASBA αποτελεί ένα ευαίσθητο ενισχυτικό σύστημα, το οποίο στηρίζεται στη μεταγραφή χρησιμοποιώντας μια σειρά από τρία ένζυμα που έχουν ως βασικό προϊόν ενίσχυσης μονόκλωνο RNA και αποκλειστικά κατασκευασμένο για το προσδιορισμό

RNA. Συγκριτικά με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), η NASBA αποτελεί ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο σε κλινική εφαρμογή για τον προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών, ωστόσο δεν είναι σε εξέλιξη η χρήση της στην ανάλυση τροφίμων.

Αυτό καθίσταται δυσάρεστο, διότι η μέθοδος αυτή έχει τη δυνατότητα προσδιορισμού ζωντανών κυττάρων μέσω επιλεγμένης ενδυνάμωσης του αγγελιαφόρου RNA και μάλιστα σε υπόστρωμα γονιδιωματικού DNA, κάτι που δεν κατέχει η PCR. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί μη αναμενόμενη ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA με τη μέθοδο NASBA. [163]



Εικόνα 45 Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου NASBA [105]

2.6 Βιοαισθητήρες

Ο βιοαισθητήρας αποτελεί μια συσκευή ανάλυσης, η οποία έχει σχεδιαστεί με σκοπό τον προσδιορισμό αναλυτών (παθογόνων-στόχων), με τη βοήθεια βιολογικών στοιχείων ανίχνευσης για ειδικό, υπολογίσιμο σήμα και ένα φυσικό μετασχηματιστή, ο ρόλος του οποίου είναι να αποθηκεύει, να ενδυναμώνει, να διαχειρίζεται και να επεξεργάζεται το σήμα. Μια εύκολη, χαμηλού κόστους, ταχύτατη και ιδιαιτέρως επιλεκτική για τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων αποτελεί η μέθοδος προσδιορισμού με χάντρες βιοαισθητήρα, συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους, οι οποίες χρειάζονται περισσότερο χρόνο, έχουν χαμηλή ανίχνευση και εξειδίκευση. Η μέθοδος βιοαισθητήρα είναι ιδανική για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό

ζωντανών αλλά μη καλλιεργήσιμων (Viable but nonculturable, VBNC) παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα τροφίμων.

Οι βιοϋποδοχείς αποτελούν τα βιολογικά στοιχεία που προσδιορίζουν το εκάστοτε τροφιμογενές παθογόνο και μπορεί να είναι:

- αντισώματα,
- ένζυμα,
- απταμερή,
- αντιμικροβιακά πεπτίδια,
- βακτηριοφάγοι,
- βιομιμητικοί,
- κυτταρικοί,
- ιστικοί και
- ανιχνευτές νουκλεϊκών οξέων.

Εν συνεχεία, αδρανοποιούνται στην επιφάνεια του μετασχηματιστή, με σκοπό την αλληλεπίδραση τους με τα επιλεκτικά μόρια των αναλυτών. Ο βιοαισθητήρας μπορεί να τοποθετηθεί σε μια στηριζόμενη μήτρα, στην οποία προσαρτώνται βιοϋποδοχείς για τον προσδιορισμό των εκάστοτε αναλυτών.

Οι μήτρες στήριξης που χρησιμοποιούνται πιο συχνά αποτελούν:

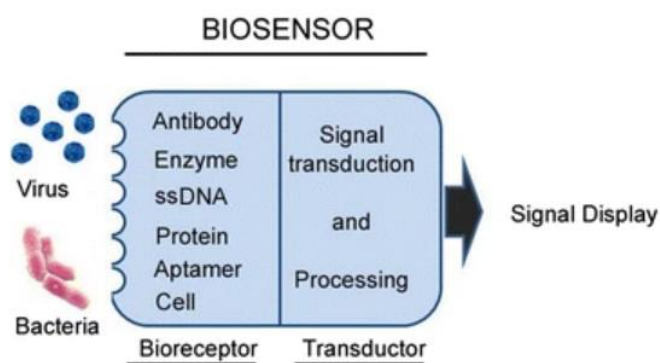
- το χαρτί,
- η πάστα άνθρακα,
- ο γραφίτης,
- το ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE),
- το οξειδίο του κασσίτερου ινδίου (ITO) και
- τα ηλεκτρόδια που εκτυπώνονται με οθόνη (SPE), στα οποία κριτήριο επιλογής αποτελεί ο αναλυτής και ο μηχανισμός του μετασχηματιστή.

Η ικανότητα ενός βιοαισθητήρα σχετίζεται με το υλικό, το σχεδιασμό και τον τρόπο που έχει κατασκευαστεί το πεδίο της μήτρας του αισθητήρα. Ο μετασχηματιστής αποτελεί ένα στοιχείο προσδιορισμού ενός βιοαισθητήρα που αλλάζει τα σήματα ενός στοιχείου αναγνώρισης σε υπολογίσιμη μορφή. Το σήμα μπορεί να υπολογισθεί με άμεσο ή έμμεσο τρόπο. Ο άμεσος προσδιορισμός περιλαμβάνει την ταυτοποίηση του στόχου από ένα μόνο ligand (π.χ. αντίσωμα) και ο έμμεσος προσδιορισμός περιλαμβάνει την ταυτοποίηση ενός στόχου από διπλό ligand, όπου το αρχικό ligand προσδένεται στην επιφάνεια του αισθητήρα με σκοπό να καταλάβει τον αναλυτή και

έπειτα το δεύτερο ligand δημιουργεί το σήμα. Οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το είδος του μετασχηματιστή σήματος, οπτικούς, ηλεκτροχημικούς και τους πιεζοηλεκτρικούς βιοαισθητήρες.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί οι βιοαισθητήρες εφαρμόζονται με σκοπό τον ταχύτατο και εξειδικευμένο προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων. Παρόλα αυτά όπως συμβαίνει και με άλλες μεθόδους, οι βιοαισθητήρες διαθέτουν κάποιους περιορισμούς αναφορικά με την οργανολογία, το υψηλό κόστος, την αναπαραγωγιμότητα και τη σταθερότητα.

Οι βιοαισθητήρες με βάση τα νανοϋλικά, τη ρευστομηχανική, τα απταμερή, τα smartphone και οι φορητοί ενόργανοι βιοαισθητήρες είναι ευαίσθητοι ταχύτατοι και καινοτόμοι για επιτόπιες συσκευές και διαθέτουν πρόσβαση στον τελικό αποδέκτη για τον προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών. [74]

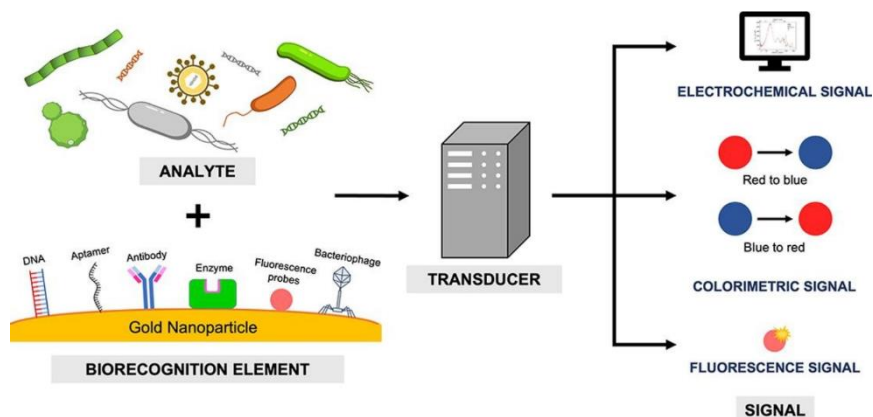


Εικόνα 46 Σχηματική απεικόνιση προσδιορισμού παθογόνων με χρήση βιοαισθητήρα [150]

2.6.1 Βιοαισθητήρας βασισμένος σε νανοϋλικά

Ο βιοαισθητήρας με βάση τα νανοϋλικά αποτελεί έναν καινοτόμο βιοαισθητήρα με οπτικές, ηλεκτρικές, θερμικές και μηχανικές δυνατότητες, που έχει σχεδιαστεί ως μια πλατφόρμα ανίχνευσης για το προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα. Διαθέτει ταχύτατο, μεταφερόμενο, ευαίσθητο και απευθείας επιτόπιο προσδιορισμό του παθογόνου-στόχου. Οι κατηγορίες των νανοϋλικών που εφαρμόζονται στον εν λόγω βιοαισθητήρα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα. Κάποιες κατηγορίες νανοϋλικών αποτελούν τα μεταλλικά (χρυσός, αργυρός, πλατίνα και παλλάδιο), τα νανοϋλικά από οξείδια μετάλλων (οξείδιο του ερίου και οξείδιο του χαλκού), πολυμερή νανοϋλικά και νανοϋλικά άνθρακα.

Η *Listeria monocytogenes* και η *Salmonella enterica* αποτελούν μερικά από τα τροφιμογενή παθογόνα που έχουν προσδιορισθεί με νανόφυλλο μέταλλο-οργανικό πλαίσιο (MOF-NSs), στο οποίο το DNA-έχει επισημανθεί με φθορισμό. [74]



Εικόνα 47 Νανοδομημένα χρυσά για τον ταχύτατο προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών [69]

2.6.2 Βιοαισθητήρας βασισμένος στη μικρορευστολογία

Ο βιοαισθητήρας με βάση τη μικρορευστολογία ή σύστημα συνολικής μικροανάλυσης (micro total analysis system - mTAS) ή εργαστήριο σε ένα τσιπ (lab-on-a-chip - LOC), αποτελεί έναν προηγμένο βιοαισθητήρα, ο οποίος είναι επαναλήψιμος, ελεγχόμενος και προσαρμόζεται στην κλίμακα προσδιορισμού των εκάστοτε τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Η συγκεκριμένη κατηγορία βιοαισθητήρων διαθέτουν:

- μια μικροαντλία,
- έναν μικροαναμικτήρα,
- μια μικροβαλβίδα και
- τα εξαρτήματα του ανιχνευτή με σκοπό την παραγωγή σήματος.

Αυτός ο βιοαισθητήρας περιλαμβάνει μικροκανάλια ρευστού τα οποία ρυθμίζουν τη ροή του ρευστού με βάση τη δύναμη και την πίεση για τη συλλογή δειγμάτων, την ανάμειξη, το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών σε μόλις ένα τσιπ.

Για παράδειγμα το τροφιμογενές παθογόνο *Salmonella spp.* προσδιορίζεται με τη χρήση συσκευών μικρορευστικού βιοαισθητήρα από τα πτηνοτροφικά προϊόντα, όπου τρία μικροκανάλια υποδεικνύουν τρεις ζώνες εστίασης για τη συλλογή των δειγμάτων και τρεις ζώνες προσδιορισμού παθογόνων μικροοργανισμών. Τα πτηνοτροφικά δείγματα διοχετεύονται στον βιοαισθητήρα διάμεσου μιας υποδοχής αντιγόνου. Τα

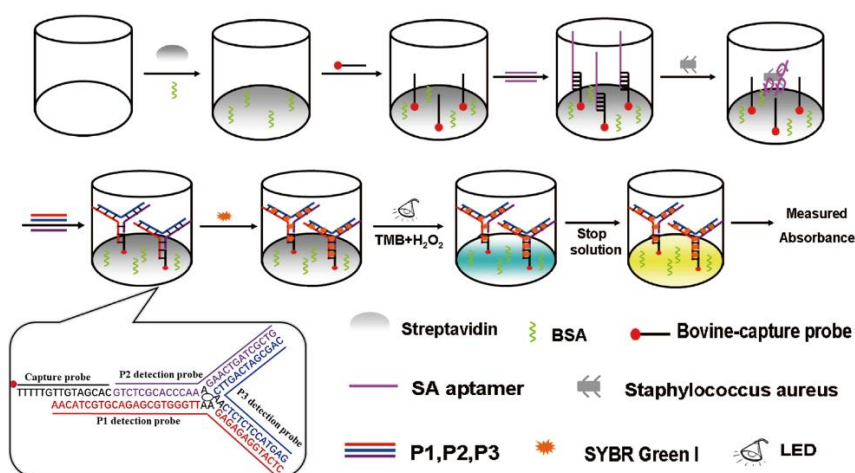
παθογόνα συγκεντρώνονται στο επίκεντρο του μικροκαναλιού και συμπιέζονται προς την περιοχή προσδιορισμού με ισχύ διηλεκτροφόρησης. [74]

2.6.3 Βιοαισθητήρας με βάση τα απταμερή

Οι βιοαισθητήρες στηριζόμενοι στα απταμερή εφαρμόζουν απταμερή (δηλαδή μόρια DNA ή RNA) ως παράγοντες ανίχνευσης. Στηρίζονται στην ηλεκτροχημική, μαζική και οπτική μετατροπή, κατά την οποία τα απταμερή προσδένουν στόχους όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, πεπτίδια, λιπίδια, τοξίνες, μέταλλα ιόντων και κύτταρα με υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση. Η συστηματοποιημένη ανάπτυξη των προσδετών με εκθετική πορεία εμπλουτισμού (SELEX) «διαλέγει» τα ολιγονουκλεοτίδια για τα απταμερή.

Η διαδικασία SELEX περιλαμβάνει δυο στάδια. Αρχικά, η PCR θα ενισχύσει τα αληθινά ολιγονουκλεοτίδια στην κατάλληλη περιεκτικότητα και σε δεύτερο στάδιο τα προϊόντα που έχουν ενισχυθεί εκκολάπτονται με καθορισμένο στόχο. Η συγκεκριμένη μέθοδος διαθέτει απταμερή υψηλής συνάφειας και ειδικότητας για τα μόρια-στόχους. Κάποια από τα πλεονεκτήματα για τους βιοαισθητήρες με βάση τα απταμερή αποτελούν η ταχύτητα, η ευκολία σύνθεσης, η σταθερότητα του σε όξινες και βασικές συνθήκες, η ειδικότητα και η συνάφεια για το προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων, καθώς και το χαμηλό του κόστος.

Για παράδειγμα τα νανοσωματίδια μετασχηματισμού (UCNPs) και τα μαγνητικά νανοσωματίδια με γνώμονα το Aptamer μπορούν να προσδιορίσουν *E. coli* σε δείγματα από χοιρινό κρέας. Ο τρόπος λειτουργίας έγκειται στο γεγονός ότι το σύστημα συζυγίας MNPs-cDNA-UCNPs-απταμερών προσδιορίζει το προαναφερθέν παθογόνο μέσω εκπομπών φθορισμού, με το όριο ανίχνευσης να ανέρχεται στα 10 CFU/mL. [74]



Εικόνα 48 Σχηματική απεικόνιση της αρχής προσδιορισμού του *S. aureus* με βιοαισθητήρα υψηλής απόδοσης [160]

2.6.4 Φορητός οργανικός βιοαισθητήρας

Ένας φορητός οργανικός βιοαισθητήρας αποτελεί μια συσκευή μικρού βάρους, χαμηλού μεγέθους και έγκυρη ως προς την αντιστοίχιση της διεπαφής. Ο εν λόγω βιοαισθητήρας υπολογίζει το ηλεκτρικό σήμα στο χώρο του επωαζόμενου παθογόνου.

Η θερμοκρασία του εκάστοτε παθογόνου-στόχου καθώς και η ηλεκτρική ρύθμιση διέπονται από έναν ανιχνευτή, ο οποίος ρυθμίζεται από τη θερμοκρασία. Ο φορητός βιοαισθητήρας αποτελεί μια ταχύτατη, οικονομική, έγκυρη και απευθείας συσκευή προσδιορισμού για τροφιμογενή παθογόνα. Για παράδειγμα, για τον προσδιορισμό του *Staphylococcus aureus* εφαρμόζεται ένας μετρητής γλυκόζης (PGM) με τη βοήθεια φορητού βιοαισθητήρα σε δείγματα τροφίμων με το όριο 2 CFU/mL, αντίστοιχα για τον προσδιορισμό του *E. coli* O157:H7, εφαρμόζεται φορητός βιοαισθητήρας που έχει ως βάση ποτενσιόμετρο, όπου μετρά αναλυτικά τα στοιχεία μέσω της εφαρμογής ιοντοευαίσθητου ηλεκτρικού πεδίου. [74]

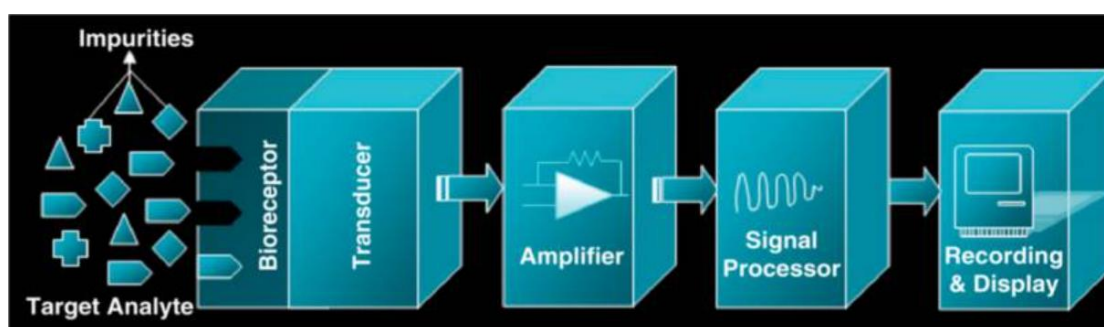
2.6.5 Βιοαισθητήρας με βάση το smartphone

Ένας βιοαισθητήρας που είναι βασισμένος σε smartphone και στηρίζεται σε έναν αισθητήρα οπτικής απεικόνισης συναρτάται από έναν αισθητήρα μικροεικόνας από την κάμερα του smartphone για την εικονική αποτύπωση του εκάστοτε τροφιμογενούς παθογόνου. Το σύστημα λειτουργίας του διαθέτει μια φωτογραφική μηχανή με υψηλή αισθητηριακή μικροποιότητα, συστήματα λειτουργίας που αφορούν την κίνηση,

στοιχεία επικοινωνίας και εσωτερική μνήμη, και σύστημα γεωγραφικού στίγματος GPS για το φορητό προσδιορισμό των παθογόνων σε τρόφιμα.

Ο εν λόγω βιοαισθητήρας έχει την ικανότητα ανάπτυξης τριών πτυχών προσδιορισμού: μικροσκοπική παρουσίαση, χρωματομετρική και φωταύγεια μέσω συστημάτων προσδιορισμού smartphone. Οι βιοαισθητήρες που στηρίζονται σε smartphone, αποτελούν μια από τις πιο καινοτόμες κατηγορίες βιοαισθητήρων. Αυτό οφείλεται στην απλότητα, στην ταχύτατη επιλογή, στην φορητότητα καθώς και στο μικρό μέγεθος και χαμηλό κόστος που διαθέτουν.

Για παράδειγμα ένας φορητός αμπερομετρικός βιοαισθητήρας με βάση το smartphone μπορεί να προσδιορίσει τον ιό της ηπατίτιδας Β. Παρόλα αυτά, η διαμόρφωση βέλτιστων συνθηκών αποτελεί μια πρόκληση για τους βιοαισθητήρες με βάση τα smartphone. [74]



Εικόνα 49 Στάδια εργασίας βιοαισθητήρα [47]

2.7 Μοριακή Διάγνωση με βάση το CRISPR/Cas

Το 1987, το CRISPR εντοπίστηκε σε βακτηριακό γονιδίωμα και η Cas το 2002. Μεταγενέστερα τεκμηριώθηκε ότι το σύστημα CRISPR-Cas αποτελεί ένα αμυντικό προσαρμοστικό σύστημα, το οποίο κατευθύνεται από RNA και δύνανται να αντιστέκεται σε ιούς, πλασμίδια καθώς και άλλα γενετικά στοιχεία που θέλουν να εισχωρήσουν. Η ανοσοποιητική τους λειτουργία διακρίνεται σε τρία στάδια: προσαρμοστικότητα, έκθεση και παρέμβαση.

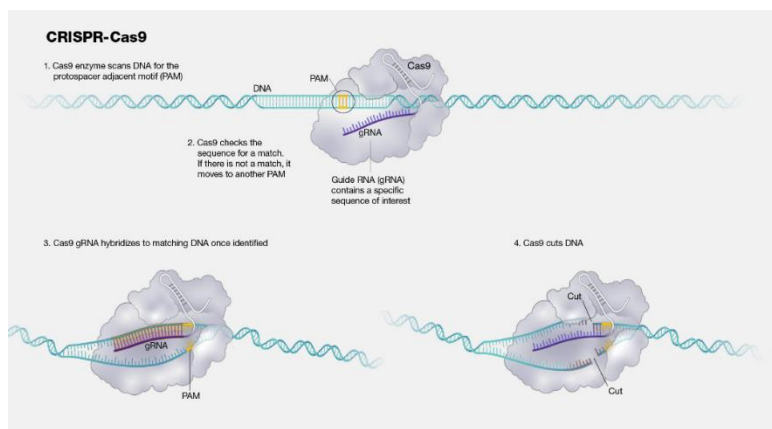
Αρχικά, σε επίπεδο προσαρμογής, το Cas εντοπίζει και δεσμεύει τμήματα ξένων νουκλεϊκών οξέων, αποκτώντας καινούριες ακολουθίες διαστήματος ενσωματώνοντας στη δική του διάταξη CRISPR με σκοπό το σχηματισμό ανοσολογικής μνήμης. Στο επίπεδο της έκφρασης, τα ξένα νουκλεϊκά οξέα εισχωρούν εκ νέου. Η ανάλογη

ακολουθία διαστήματος στη διάταξη CRISPR θα μεταγραφεί με σκοπό την παραγωγή του πρόδρομου του CRISPR RNA (crRNA) και υπόκεινται σε επεξεργασία με σκοπό τη λήψη μικρού, ώριμου crRNA, το οποίο φέρει μια συντηρητική ακολουθία επανάληψης και μια ακολουθία διαστήματος. Το crRNA ενδείκνυται να αλληλοεπιδράσει περισσότερο με μια ή παραπάνω Cas που εφαρμόζονται για τη δημιουργία του συμπλόκου RNP (ριβονουκλεοπρωτεΐνη). Στο τρίτο επίπεδο παρεμβολής, οι Cas εντοπίζουν το στοχοποιημένο νουκλεϊκό οξύ διαμέσου του crRNA και διαμεσολαβούν για την ειδική καταστροφή του νουκλεϊκού οξέος που έχει εισβάλλει. [87]

Το ένζυμο Cas από τα αρχαία και τα βακτήρια διασπά τα νουκλεϊκά οξέα προερχόμενα από εισβολείς ιούς, αποτελώντας ένα είδος άμυνας και αποτελούν το βασικό στοιχείο των συστημάτων με γνώμονα το CRISPR-Cas. Το σύστημα με γνώμονα το CRISPR-Cas, εφαρμόσθηκε για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων, προκαλώντας υψηλό ενδιαφέρον. Επιπρόσθετα, έχει εφαρμοσθεί με σκοπό την αλλαγή του RNA καθώς και των γονιδιωμάτων. Τα συστήματα CRISPR-Cas διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: την κατηγορία 1 και την κατηγορία 2, περιλαμβάνοντας 6 τύπους και 33 υπότυπους. [74]

Τα συστήματα που ανήκουν στην κατηγορία 1 περιλαμβάνουν σύνθετους επενεργητές που απαρτίζονται από πολυάριθμες πρωτεΐνες Cas, οι οποίες επιτελούν αρκετές λειτουργίες όταν λειτουργεί και το σύστημα. Τα συστήματα που ανήκουν στην κατηγορία 2 διαθέτουν μια μόνο πρωτεΐνη σύνδεσης την crRNA. Στην τάξη 1 ανήκουν οι τύποι I, III και IV και αντίστοιχα στην τάξη 2 οι τύποι II, V και VI. Τα συστήματα της τάξης 2 έχουν μελετηθεί και εφαρμοσθεί εκτενέστερα συγκριτικά με τα συστήματα της τάξης 1, το οποίο απορρέει από το γεγονός ότι τα συστήματα της τάξης 2 διαθέτουν ιδιότητες από μια μόνο πρωτεΐνη που ενεργοποιεί αρκετές περιοχές. [161]

Στο σύστημα της κατηγορίας 2 ανήκουν τα Cas9, Cas12, Cas13 και Cas14, τα οποία αποτελούν τη πιο συχνή «εργαλειοθήκη» για το προσδιορισμό νουκλεϊκών οξέων. Στην πλειοψηφία των μελετών, η πρωτεΐνη CRISPR είναι η Cas9, η οποία φαίνεται να έχει τη δυνατότητα να συνδυαστεί και με άλλες τεχνικές με σκοπό το σχηματισμό πολύπλευρων τεχνικών με σκοπό το προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών. Παρ' όλα αυτά, η ιδιαίτερη επισήμανση στα δείγματα σε κάθε περίπτωση είναι απαραίτητη για τη δήλωση της ένδειξης του προσδιορισμού. [74]



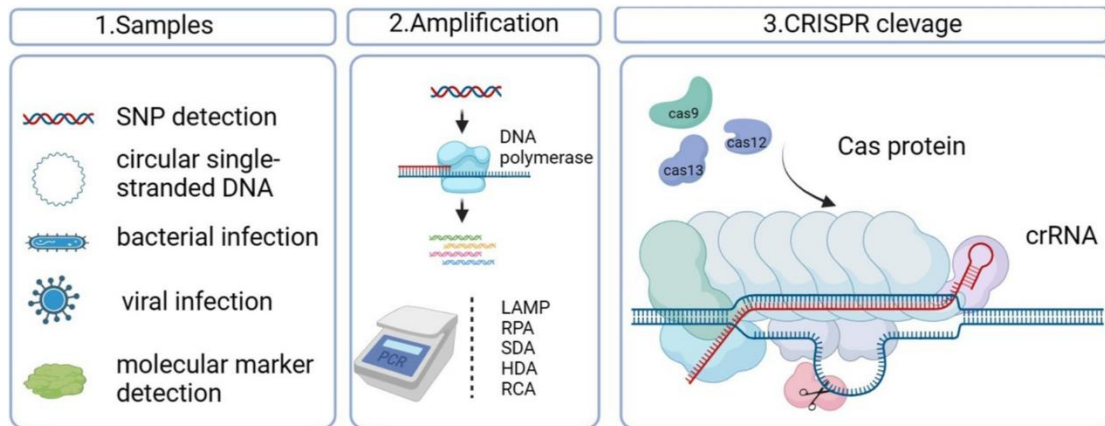
Εικόνα 50 CRISPR, μια τεχνολογία που χρησιμοποιούν οι ερευνητές με σκοπό την επιλεκτική τροποποίηση DNA ζώντων οργανισμών [139]

Το Cas12 μπορεί να στοχοποιεί άμεσα dsDNA δίχως να υφίσταται επιπλέον επεξεργασία της ενισχυμένης αλληλουχίας εντούτοις, το μοντέλο PAM (Protospacer-adjacent motif) είναι αναγκαίο κατά τη στοχοποίηση νουκλεϊκών οξέων.

Το Cas13 είναι το SHERLOCK (Specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking) που χρησιμοποιεί την τεχνολογία RPA (Recombinase polymerase amplification) για τον εντοπισμό συγκεκριμένων νουκλεϊκών οξέων σε σύντομο χρονικό διάστημα (5 λεπτά). Ωστόσο, τα βασικά μειονεκτήματα αυτής της διαδικασίας αποτελούν, η ενίσχυση των δειγμάτων κατά την αναγνώριση που αυξάνει την περίπλοκη ποσοτική ανάλυση και η βέλτιστη λειτουργία όλων των ενεργειών κατά τη διαδικασία αναγνώρισης που χρήζει ειδικής βιολογικής γνώσης.

Οι πρωτεΐνες Cas14 είναι αποδοτικές για τη στοχοποιημένη σχάση μονόκλωνου DNA (ssDNA) δίχως να εμπλέκεται ένα PAM για την ενεργοποίηση. Η Cas14 κατέδειξε μικρότερη ανθεκτικότητα σε αναντιστοιχία νουκλεοτιδικών βάσεων ανάμεσα στον στόχο και το crRNA συγκριτικά με την Cas12, με αποτέλεσμα να είναι ένα αποδοτικό μέσο για την ιδιαίτερα ακριβή αναγνώριση SNPs.

Οι προηγμένες μέθοδοι που εφαρμόζονται με τον συνδυασμό των πρωτεϊνών Cas με άλλες μεθόδους, όπως η ισοθερμική ενίσχυση, η πλευρική ροή, οι βιοαισθητήρες κ.λπ., αποκτούν ολοένα και περισσότερη δημοτικότητα για τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων. [74]



Εικόνα 51 Τεχνολογία ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων σε συνδυασμό με την τεχνική CRISPR για την επίτευξη προσδιορισμού παθογόνων μικροοργανισμών [162]

Η μέθοδος αναγνώρισης παθογόνων που στηρίζεται σε ομαδικές και τακτικά διατεταγμένες εν συντομία παλίνδρομες επαναλήψεις (CRISPRs) καθώς και στο συμπλόκου πρωτεΐνης που συσχετίζεται με την CRISPR/Cas διαθέτει υψηλή εξειδίκευση, ευαισθησία και ευκολία στον προσδιορισμό και ενδείκνυται και για πρακτικές χρήσεις. [161]

2.8 Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)

Ο Robert Holley το 1965, παρουσίασε την αλληλουχία του πρώτου tRNA (αναφορικά με την αλανίνη), για την οποία του απονεμήθηκε βραβείο Νόμπελ το 1986. Η ερευνητική ομάδα του Holley όρισε με ακρίβεια τη διάρθρωση του tRNA εφαρμόζοντας δυο ριβονουκλεάσες προκειμένου να επιτευχθεί η διάσπαση του μορίου tRNA σε τμήματα.

Το 1972 ο Walter Fiers υπήρξε ο πρώτος που κατόρθωσε να επιτύχει την αλληλούχηση DNA ενός ολόκληρου γονιδίου (πρόκειται για το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του βακτηριοφάγου MS2), εφαρμόζοντας RNAses, προκειμένου να πεμφθεί ο RNA ιός. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός με εφαρμογή χρωματογραφίας και ηλεκτροφόρησης.

Η αλληλούχηση Sanger αποτέλεσε μια από τις πιο διαδεδομένες χρησιμοποιούμενες μορφές αλληλούχησης για περισσότερα από 30 χρόνια.

Προκειμένου να επιτευχθεί η αλληλούχηση Sanger χρειάζονται:

- ένα μονόκλωνο πρότυπο DNA,
- ένας εκκινητής DNA,
- DNA πολυμεράση,
- dNTPs και
- ddNTPs τα οποία οδηγούν στο τερματισμό της επέκτασης του DNA.

Το δείγμα DNA διακρίνεται σε τέσσερις αντιδράσεις, στις οποίες γίνεται προσθήκη ενός μόνο από τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτίδια.

Λόγω του ότι η αλληλουχία Sanger δεν είχε αυτοματοποιηθεί, απαιτούσε αρκετό χρόνο. Το 1987, οι Michael Hunk Hunkapiller και Leroy Hood κατάφεραν να αυτοματοποιήσουν την διαδικασία Sanger sequencing, με την προσθήκη δυο σημαντικών βελτιώσεων. Τα θραύσματα DNA επισημαίνονταν με φθορισμό αντί για ραδιενεργά μόρια και επίσης ήταν εφικτή η ανάλυση των στοιχείων στον υπολογιστή. [133]

▪ Αλληλούχηση κατά Maxam-Gilbert (First Generation Sequencing)

Το DNA (δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ) συγκροτείται από τέσσερις αζωτούχες βάσεις, οι οποίες μπορούν και κωδικοποιούν πληροφορίες, προσφέροντας το σχήμα του κυττάρου και επιδρούν στη φυσιολογία. Η ορθή λειτουργία των κυττάρων χρειάζεται την ανάλογη μεταγραφή του DNA και την μετάφραση σε πρωτεΐνες. Μεταλλάξεις ή αλλοιώσεις οποιουδήποτε είδους ως προς την αλληλουχία του DNA στο γονιδίωμα θα μπορούσαν να επιφέρουν κυτταρικά ελαττώματα ή νόσους. Οι πρώτες ενέργειες ως προς τον προσδιορισμό, την ταυτοποίηση και την ορθή διάταξη των βάσεων που εντοπίζονται σε ένα μέρος του DNA, περιγράφονται ως αλληλούχηση 1^{ης} γενιάς, περιλαμβάνοντας την εφαρμογή χημικών ουσιών με σκοπό το διαχωρισμό των βάσεων εντός ενός μορίου DNA ή την εφαρμογή νουκλεοτιδίων που οδηγούν στο τερματισμό της αλυσίδας, η οποία ακολουθείται από μη αυτόματο διαχωρισμό των τμημάτων που σχηματίζονται μέσω της ηλεκτροφόρησης.

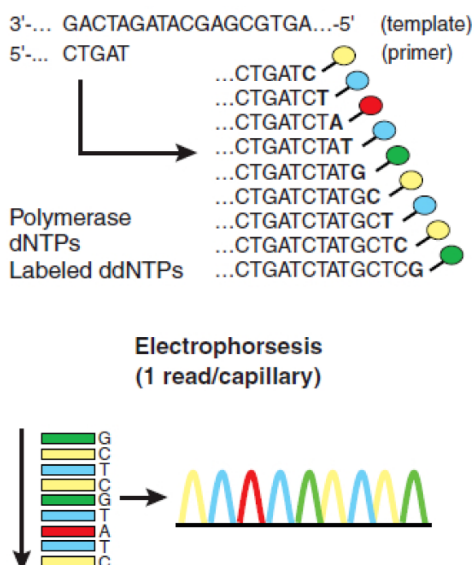
Η αλληλούχηση κατά Maxam και Gilbert, η οποία καλείται και τεχνική μερικής χημικής αποικοδόμησης κάνει χρήση χημικών ουσιών, οι οποίες έχουν ως στόχο μεμονωμένες, συγκεκριμένες πυριμιδίνες ή πουρίνες, με σκοπό να διασπαστεί ο ραδιοσημασμένος σκελετός του DNA σε κομμάτια. Σε αυτή τη περίπτωση γίνεται επισήμανση του DNA με τη χρήση ραδιενεργού ³²P στο άκρο 5I. Εν συνεχεία, εφαρμόζονται εξειδικευμένες χημικές ουσίες την αλλαγή των νουκλεοτιδίων, λ.χ., η

υδραζίνη απομακρύνει την αζωτούχο βάση από την θυμίνη και την κυτοσίνη, αλλά σε υψηλές τιμές αλάτων διασπά την κυτοσίνη.

▪ Sanger Sequencing

Η μέθοδος Sanger, η εισαγωγή της οποίας έγινε αργότερα εφαρμόζει διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs). Τα ddNTPs αποτελούν χημική τροποποίηση dNTPs που δεν διαθέτουν υδροξυλομάδα. Αυτό συμβαίνει τόσο στη θέση 2' όσο και στη θέση 3', η επέκταση τους τερματίζεται όταν πραγματοποιηθεί και η ενσωμάτωση τους. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρειάζεται ένα μονόκλωνο DNA (ssDNA) και έναν ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή μικρής διάρκειας. Η προσθήκη κάθε ddNTP στην εκάστοτε αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα τμήμα συγκέντρωσης των dNTPs με την παρουσία τμήματος Klenow με σκοπό το σχηματισμό της αλυσίδας που είναι συμπληρωματική. Η ενσωμάτωση ενός ddNTP από την πολυμεράση επιφέρει τον τερματισμό της αλυσίδας. Λαμβάνουν χώρα τέσσερις αντιδράσεις που δημιουργούν κομμάτια διαφορετικού μεγέθους, με το καθένα από τα οποία να οδηγείται στο ανάλογο ddNTP που εφαρμόζεται. Αρχικά, η εκτέλεση της εν λόγω τεχνικής πραγματοποιούνταν με τη χρήση ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων, με την πρόοδο της σήμανσης φθορισμού, πλέον καθίσταται εφικτός ο φθορομετρικός προσδιορισμός. Το μέγεθος που επιτρέπει την ανάγνωση με εφαρμογή της εν λόγω τεχνικής είναι μικρότερο από μια χιλιοβάση (1kb), το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αλληλούχηση μικρής επίδοσης.

Για να επιτευχθεί η αλληλουχία πιο μεγάλων τμημάτων ή ολόκληρου γονιδιώματος, το DNA θα πρέπει να διαιρεθεί, να κλωνοποιηθεί και να αλληλουχηθεί. [7]



Εικόνα 52 Αλληλούχηση κατά Sanger. Σε κάθε κύκλο αντιδράσεων, το προϊόν που έχει ενισχυθεί τερματίζεται με την εισαγωγή φθορίζοντος επισημασμένου με φθορίζουσα σήμανση διδεοξυνουκλεοτιδίου (όπως απεικονίζεται με κίτρινο, μπλε, κόκκινο & πράσινο χρώμα) δημιουργώντας μια σκάλα προϊόντων με διαφορετικά μεγέθη [85]

▪ Δεύτερη γενιά (Second Generation Sequencing)

Το 1996, οι Mathias Uhlen, Pål Nyfén και Mostafa Ronaghi επέφεραν μια καινοτόμα τεχνική αλληλούχησης, η οποία καλείται «πυροακολουθία». Η συγκεκριμένη αυτοματοποιημένη τεχνολογία στηρίζεται στον υπολογισμό της φωταύγειας που δημιουργείται κατά τη διάρκεια σχηματισμού πυροφωσφορικών αλάτων κατά την τεχνολογία αλληλούχησης δια μέσου σύνθεσης. Κατατάσσεται ως αλληλούχηση υψηλής απόδοσης. Αργότερα, η εφαρμογή της εν λόγω τεχνολογίας πραγματοποιήθηκε σε ένα αυτοματοποιημένο σύστημα, το σύστημα 454, το οποίο αποτέλεσε την πρώτη πλατφόρμα αλληλούχησης NGS που κυκλοφόρησε στο εμπόριο.

Άλλες επίσης σημαντικές πλατφόρμες που στηρίζονται σε διαφορετικές τεχνολογίες περιλαμβάνουν την "sequencing-by-ligation" του συστήματος SOLiD που εισήχθη το 2007 καθώς και το Ion Torrent της Life Technologies το 2011. Το Ion Torrent εφαρμόζει τεχνολογία "sequencing-by-synthesis" που προσδιορίζει ιόντα υδρογόνου κατά τη σύνθεση νέου DNA.

▪ Νανοπόρος της Οξφόρδης

Τα συστήματα που παράγει η Oxford Nanopore Technologies, όπως το GridION, το MinION και το Flongle, αποτελούν φορητές συσκευές που εφαρμόζονται για την αλληλούχηση DNA και RNA. Η πρώτη εμφάνιση του GridION έγινε το 2012 και

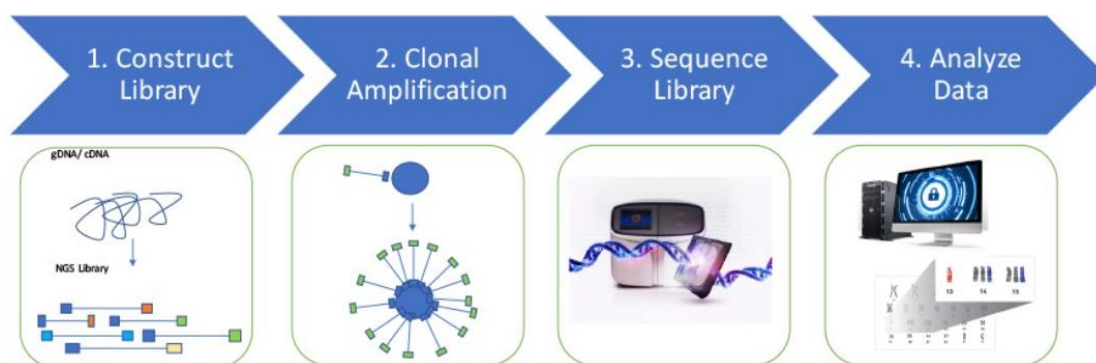
βασίζεται στον προσδιορισμό αλλαγών της ηλεκτρικής αγωγιμότητας που επιφέρουν οι αλυσίδες DNA διασχίζοντας βιολογικούς νανοπόρους, με σκοπό τον προσδιορισμό της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων.

▪ Human Genome Project

Το Human Genome Project αποτελεί μια διεθνή προσπάθεια έρευνας, με σκοπό την ανάλυση της αλληλουχίας DNA σε ολόκληρο το ανθρώπινο γονιδίωμα, η διάρκεια της οποίας ήταν 13 χρόνια και ολοκληρώθηκε το 2003, με εκτίμηση κόστους που ξεπερνούσε τα 300 εκατομμύρια δολάρια. Πλέον, η αλληλουχία σε ένα ολόκληρο ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να επιτευχθεί σε διάστημα εντός μιας ημέρας, με οικονομική επιβάρυνση λιγότερο από 1000 δολάρια. [133]

Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) αποτελεί μια τεχνολογία με σκοπό τον καθορισμό της ακολουθίας DNA ή RNA, προκειμένου να μελετηθεί η γενετική ποικιλία που συσχετίζεται με νόσους καθώς και με άλλα βιολογικά γεγονότα. Η εν λόγω μέθοδος τέθηκε σε εμπορική ισχύ το 2005. Η αρχική της ονομασία ήταν "μαζική παράλληλη αλληλούχηση", καθώς μπορούσε να γίνει αλληλούχηση αρκετών αλυσίδων DNA την ίδια χρονική στιγμή, αντί για μια τη φορά, όπως γίνεται με την αλληλούχηση της μεθόδου κατά Sanger.

Η απόδοση, η εξειδίκευση καθώς και η ταχύτητα που διαθέτει η NGS έχουν επιφέρει επανάσταση στον τομέα των γενετικών αναλύσεων, επιτρέποντας καινοτόμες χρήσεις στην κλινική και γονιδιωματική έρευνα καθώς επίσης και σε άλλους τομείς επιστημών (γεωργικές, εγκληματολογικές, περιβαλλοντικές κ.λπ.).



Εικόνα 53 Στάδια εργασίας της μεθόδου NGS [88]

Τα βασικά στάδια για την προετοιμασία του εκάστοτε δείγματος για ανάλυση (DNA ή RNA) είναι τα εξής:

- κατακερματισμός των αλληλουχιών στόχων σε επιθυμητό μέγεθος,
- μετασχηματισμός του στόχου σε δίκλωνο DNA,
- σύνδεση ολιγονουκλεοτιδίων καθορισμένης αλληλουχίας στις άκρες των κατακερματισμένων τμημάτων του στόχου και
- ποσοτική αξιολόγηση τελικού προϊόντος της βιβλιοθήκης για αλληλούχηση.

Το μέγεθος των τμημάτων DNA-στόχου στην τελική βιβλιοθήκη αποτελεί βασική παράμετρο για την κατασκευή βιβλιοθηκών NGS. Τρεις προσεγγίσεις είναι διαθέσιμες για τον κατακερματισμό των αλυσίδων νουκλεϊνικών οξέων: φυσική, ενζυμική και χημική. Ο κατακερματισμός του DNA γίνεται συνήθως με φυσικές μεθόδους (π.χ. ακουστική διάτμηση και ηχητικός καθαρισμός) ή ενζυματικές μεθόδους (π.χ. μη ειδικές κοκτέιλ ενδονουκλεάσης και αντιδράσεις σήμανσης με τρανσποζάση). [68]

Η NGS αποτελεί μια προσαρμόσιμη τεχνολογία, η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ανίχνευση ιών, βακτηρίων, μυκήτων, παρασίτων, γενικότερα για ζωικούς φορείς και ανθρώπινους ξενιστές. [65]

Με εφαρμογή της μεθόδου NGS ενδείκνυται η αλληλούχηση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος εντός μιας ημέρας. Ως επί το πλείστον, η NGS φαίνεται να αποτελεί αντικαταστάτη της συμβατικής αλληλούχησης κατά Sanger. [23]

Οι καινοτομίες που έχουν καταγραφεί στις μεθοδολογίες αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS), μπορούν να καθιστούν τον προσδιορισμό τροφιμογενών λοιμώξεων πιο λεπτομερή συγκριτικά με τις μεθόδους που εφαρμόζονται σήμερα. Σημαντικό πλεονέκτημα της εν λόγω μεθόδου αποτελεί η δυνατότητα της να προσδιορίζει πλήθος πιθανών μολυσματικών παραγόντων και ασθενειών, καθώς επίσης και να ανιχνεύει τόσο καλλιεργήσιμα όσο και μη καλλιεργήσιμα είδη, χωρίς να απαιτείται στοχευμένη μελέτη. Οι μελέτες στο κλάδο της μικροβιολογίας τροφίμων φαίνεται πως εφαρμόζουν όλο και περισσότερο την NGS, με την πλειοψηφία από αυτές να εστιάζουν στην αλληλούχηση του ολικού γονιδιώματος (WGS). [52]

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

| ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ | ΜΟΡΙΑΚΗ/-ΕΣ ΜΕΘΟΔΟΣ/-ΟΙ | ΠΗΓΗ/-ΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ |
|--------------------------------|---|--|
| ΒΑΚΤΗΡΙΑ | | |
| <i>Bacillus cereus</i> | mPCR, LFIA, RT-qPCR, sandwich ELISA & βιοαισθητήρες | Φρούτα, λαχανικά, κρέας, αυγά & γαλακτοκομικά προϊόντα |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | RT-qPCR, GC, PCR & DNA microarray | Πουλερικά, γαλακτοκομικά προϊόντα & ωμό κρέας |
| <i>Clostridium botulinum</i> | Μέθοδοι καλλιέργειας, RT-qPCR, ELISA, LAMP & βιοαισθητήρες | Κονσερβοποιημένα τρόφιμα, γάλα, παστά ψάρια & φρούτα |
| <i>Clostridium perfringens</i> | | |
| <i>Escherichia coli</i> | PCR, dPCR, LFIA, ELISA, mPCR, RT-qPCR, CRISPR/cas, LAMP, βιοχημική μέθοδος δοκιμής, DNA microarray, competitive ELISA & βιοαισθητήρες με βάση τα απταμερή (SELEX) | Φρούτα, λαχανικά, μη παστεριωμένο γάλα & ωμό κρέας |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | PCR, RT-qPCR, LFIA, mPCR, DNA microarray, CRISPR/cas, LFIA, βιοαισθητήρας βασισμένος σε νανοϋλικά & LAMP | Κρέας, πουλερικά, γαλακτοκομικά προϊόντα, μη παστεριωμένο γάλα (& προϊόντα που έχουν παρασκευαστεί) & θαλασσινά |
| <i>Salmonella spp.</i> | PCR, RT-qPCR, nPCR, mPCR, CRISPR/cas, LAMP, DNA microarray, LFIA & βιοαισθητήρες | Κρέας, αυγά, πουλερικά, θαλασσινά και γαλακτοκομικά προϊόντα |
| <i>Shigella spp.</i> | ELISA, PCR, RT-qPCR, mPCR & βιοαισθητήρες με βάση τα απταμερή (SELEX) | Γάλα, κρέας, θαλασσινά & μπλε τυρί |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | PCR, RT-qPCR, CRISPR/cas, βιοαισθητήρες με βάση τα απταμερή (SELEX), LAMP, ELISA, gene probe technology, LFIA & sandwich ELISA | Μοσχαρίσιος κιμάς, χοιρινό λουκάνικο, γαρίδες, στρείδια, γάλα, σαλάτες (αυγού, τόνου, μακαρόνια, πατάτες), προϊόντα αρτοποιίας (εκλέρ σοκολάτας, πίτες με κρεμά) |
| <i>Yersinia enterocolitida</i> | RT-qPCR, western blot, nPCR & PCR | Βραστά αυγά, τυρί cottage, τόφου, παστεριωμένο γάλα & βραστά ψάρια |
| ΙΟΙ | | |
| Ηπατίτιδα Α (HAV) | ELISA, LAMP & βιοαισθητήρες | Ωμά οστρακοειδή, κατεψυγμένα μούρα & προϊόντα κρέατος |

| | | |
|--------------------------------|--|---|
| Νοροϊός (NoV) | RT-qPCR, Μέθοδος βασισμένη στην ανοσοδοκιμασία (LFIA), βιοαισθητήρες με βάση τα απταμερή (SELEX) | Κρέας, πουλερικά, φρούτα, λαχανικά & προϊόντα γάλακτος |
| ΠΑΡΑΣΙΤΑ | | |
| <i>Cyclospora cayetanensis</i> | RT-qPCR | Φρέσκα προϊόντα (αρακάς, σμέουρα, βασιλικός, μαρούλι romaine κ.λπ.) |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | RT-qPCR, PCR, NGS & western blot | Ωμό ή ελλειπώς μαγειρεμένο κρέας (κυρίως χοιρινό και μοσχάρι) κρέας |
| <i>Trichinella spiralis</i> | PCR, ELISA, LAMP, RT-qPCR | Κρέας άγριων ζώων, ωμό χοιρινό & είδη οικοσίτων ζώων |
| ΜΥΚΗΤΕΣ | | |
| <i>Aspergillus spp.</i> | PCR, mPCR, NASBA, βιοχημική μέθοδος δοκιμής, western blot & βιοαισθητήρες | Ψωμί, μαρμελάδες, κέικ φρούτων & δημητριακά |
| <i>Penicillium spp.</i> | PCR, mPCR | Τυριά, δημητριακά, ψωμί, κονσέρβες, παστά, σκόνη σπόρων αραβόσιτου, ορισμένα φρούτα & παλαιωμένα ζαμπόν |

Προσαρμοσμένο από: [4, 13, 21, 58, 70, 81, 82, 112, 118, 128, 137, 140, 163]

| ΜΕΘΟΔΟΣ | ΟΜΑΔΕΣ -ΣΤΟΧΟΙ | ΑΡΧΗ | ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ | ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ |
|----------------------------------|-------------------------|--|---|--|
| ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ | Βακτήρια, μύκητες & ιοί | Εφαρμογή μέσω καλλιέργειας που διαθέτουν τις απαραίτητες αναπτυξιακές προδιαγραφές για τους μικροοργανισμούς-στόχους | <ul style="list-style-type: none"> υψηλά ποσοστά επιτυχίας για καλλιέργησιμα παθογόνα οικονομικά αποδοτικό χρήση για συγκεκριμένες μικροβιακές ομάδες & την διαφοροποίησή τους η χρήση των μικροβιακών καλλιεργειών ενδείκνυται και για μεταγενέστερες διεργασίες ή άλλες εφαρμογές | <ul style="list-style-type: none"> χαμηλή ευαισθησία ορισμένες καλλιέργειες απαιτούν περισσότερο χρόνο ακατάλληλες για την ταχύτατη ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών επίπονες διαδικασίες |
| ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΗΣ | Βακτήρια, μύκητες & ιοί | Αποτελεί μέθοδο που προάγει την ανάπτυξη των εκάστοτε μικροοργανισμών που τίθενται προς ανάλυση μέσω των ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως σήματα, υποδηλώνοντας την | <ul style="list-style-type: none"> Χαμηλό κόστος, Βελτίωση ακρίβειας αγνώστου δείγματος | <ul style="list-style-type: none"> Επίπονη & χρονοβόρα μέθοδος, Δυσκολία προσδιορισμού (ιδίως για τους μικροοργανισμούς που είναι |

| | | ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών. | | δύσκολα καλλιεργήσιμοι) |
|----------------------|-----------------------------------|---|---|--|
| ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ | | | | |
| ELISA | Βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Η ELISA βασίζεται σε αντισώματα με σκοπό τον προσδιορισμό αντιγόνου-στόχου, μέσω της εφαρμογής συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος. | <ul style="list-style-type: none"> ■ απλή διαδικασία ■ υψηλή εξειδίκευση & ευαισθησία ■ εύκολη εκτέλεση ■ υψηλή απόδοση ■ ενδείκνυται η ταυτόχρονη ανάλυση χωρίς την περίπλοκη προεπεξεργασία δείγματος ■ ασφαλής & φιλική προς το περιβάλλον ■ δεν χρειάζονται μεγάλες ποσότητες οργανικού διαλύτη και ραδιενεργές ουσίες | <ul style="list-style-type: none"> ■ δαπανηρή προετοιμασία όσον αφορά το αντίσωμα ■ ακριβά μέσα καλλιέργειας ■ υψηλές πιθανότητες για ψευδώς θετικά/αρνητικά αποτελέσματα ■ η ελλιπής δέσμευση του αδρανοποιημένου αντιγόνου μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή αποτελέσματα ■ αστάθεια αντισώματος ■ χρειάζεται ψυχρή μεταφορά και αποθήκευση καθώς το αντίσωμα είναι πρωτεΐνη |
| LFIA | Βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Οι LFIA βασίζονται στην υψηλή ποιότητα μονοκλωνικών αντισωμάτων που μπορούν να αναγνωρίσουν τον ενδιαφερόμενο αναλυτή. | <ul style="list-style-type: none"> ■ Ανάλυση σε ένα βήμα, ■ Δεν απαιτεί ειδικές δεξιότητες ή όργανα για την επίτευξη του αποτελέσματος, ■ Ποιοτικές αναλύσεις & ■ Απλός προσδιορισμός | <ul style="list-style-type: none"> ■ Χαμηλή ανάλυση, ■ Μη εφικτός έλεγχος του ρυθμού ροής και ■ Χρήση μεγάλου όγκου αντιδραστηρίων |
| Western blot | βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Η WB εφαρμόζεται για το διαχωρισμό και την έρευνα των πρωτεϊνών. Πρόκειται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτη. Εν συνεχεία, τα αποτελέσματα μεταφέρονται σε μια μεμβράνη, σχηματίζοντας μια ζώνη για την εκάστοτε πρωτεΐνη ανάλυσης. | <ul style="list-style-type: none"> ■ Ικανότητα ανίχνευσης επιπέδων πρωτεΐνης σε δείγματα πικτογραμμάτων ■ Ευαισθησία & ειδικότητα ■ Η ειδικότητα αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος | <ul style="list-style-type: none"> ■ Διαδικασία που απαιτεί χρόνο, ανισορροπίες που μπορεί να συμβούν ενδέχεται να επιφέρουν αλλοιώσεις στα αποτελέσματα ■ Το δευτερογενές αντίσωμα μπορεί να αντιδράσει με μη επιδιωκόμενη πρωτεΐνη με συνέπεια την επισήμανση |

| | | | | <p>λανθασμένης πρωτεΐνης</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ο ελλιπής χρόνος μεταφοράς μπορεί να οδηγήσει στην μη ορθή μεταφορά πρωτεϊνών με συνέπεια τις λανθασμένες ζώνες ή απουσία αυτών ▪ Άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό ▪ Ημιοσοτική μέθοδος, δεν είναι εφικτή η ακριβής προσέγγιση μοριακού βάρους της πρωτεΐνης ▪ Η διαθεσιμότητα πρωτογενών αντισωμάτων είναι βασική παράμετρος για την εν λόγω μέθοδο. |
|------------------------------------|-----------------------------------|--|---|---|
| ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ | | | | |
| PCR | Βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Εφαρμογή εκκινητών με στόχο το μικροβιακό DNA. Όταν ο στόχος είναι παρών ενισχύεται εκθετικά | <ul style="list-style-type: none"> ▪ υψηλή ευαισθησία & ειδικότητα ▪ αξιοπιστία & ευρεία χρήση ▪ δυνατότητα αυτοματοποίησης ▪ εφαρμογή για την ανίχνευση αρκετών μικροβιακών ομάδων σε μια μόνο αντίδραση | <ul style="list-style-type: none"> ▪ ο σχεδιασμός των εκκινητών είναι αρκετά σημαντικός ▪ δύσκολη εφαρμογή ως προς τη διαφοροποίηση ανάμεσα σε βιώσιμα & μη βιώσιμα κύτταρα ▪ ευαισθησία στη μόλυνση με αποτέλεσμα να μπορεί να επιφέρει ψευδή θετικά αποτελέσματα ▪ ευαισθησία σε αναστολείς, οι οποίοι ενδεχομένως να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα |
| dPCR | βακτήρια, μύκητες, | Το σύστημα αντίδρασης PCR χωρίζεται σε τμήματα μικρότερου όγκου. Μετά την | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Δεν απαιτείται πρότυπη καμπύλη, ▪ Υψηλή ευαισθησία, | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Υψηλό κόστος & ▪ περιορισμένο δυναμικό πεδίο |

| | | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|---|---|--|
| | παράσιτα & ιοί | ενίσχυση το πλήθος των θετικών και αρνητικών αντιδράσεων υπολογίζεται με σκοπό τη λήψη του αριθμού αντιγράφων των δειγμάτων. | <ul style="list-style-type: none"> ■ απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός & ■ Υψηλή ανθεκτικότητα στους παρεμποδιστές της PCR. | |
| mPCR | βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Η τεχνική αυτή εφαρμόζει περισσότερα από ένα ζεύγη εκκινητών στην ίδια αντίδραση, επιτρέποντας την παράλληλη ενίσχυση σε διαφορετικές αλληλουχίες DNA. | <ul style="list-style-type: none"> ■ Πολλές πληροφορίες με μικρή ποσότητα δείγματος, ■ Εξοικονόμηση χρόνου, ■ Οικονομικό -χρήση λιγότερων dNTPs, ενζύμων & άλλων αναλώσιμων, ■ Χαμηλά ποσοστά σφαλμάτων και ■ Ακρίβεια | <ul style="list-style-type: none"> ■ χαμηλή απόδοση ενίσχυσης, ■ μη σταθερή απόδοση σε διαφορετικά πρότυπα και ■ αυτό-αναστολή ανάμεσα σε διαφορετικά σύνολα εκκινητών |
| nPCR | βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Η nPCR περιλαμβάνει δυο διαδοχικές αντιδράσεις ενίσχυσης, κατά τις οποίες κάθε μια εφαρμόζει ένα διαφορετικό ζεύγος εκκινητών. Το προϊόν που προκύπτει από την πρώτη αντίδραση χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη δεύτερη αντίδραση PCR, η προετοιμασία της οποίας πραγματοποιείται με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία τοποθετούνται στο εσωτερικό του πρώτου ζεύγους εκκινητών. | <ul style="list-style-type: none"> ■ ιδανική για το προσδιορισμό γονιδίων που υπάρχουν σε χαμηλή αφθονία και ■ ιδανική για μελέτες καρκινωμάτων και ιογενών λοιμώξεων. | <ul style="list-style-type: none"> ■ κίνδυνος επιμόλυνσης λόγω μεταφοράς προϊόντων μεταξύ των δυο αντιδράσεων. |
| RT-qPCR | βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Η εν λόγω μέθοδος στηρίζεται στην ενεργότητα της 5' → 3' εξωνουκλεάσης της πολυμεράσης Taq και σε διπλά ολιγονουκλεοτίδια-ιχνηθέτες, τα οποία έχουν επισημανθεί, εκπέμποντας σήμα φθορισμού μόνο όταν ανοικοδομηθούν. | <ul style="list-style-type: none"> ■ ακρίβεια, ■ ευαισθησία, ■ δεν χρειάζεται η ανάλυση σε πηκτή, η ανάλυση επιτυγχάνεται με την καμπύλη τήξης, ■ ποσοτική ανάλυση, ■ γρήγορη μέθοδος & ■ λιγότερο πολύπλοκη | <ul style="list-style-type: none"> ■ ξεχωριστές αντιδράσεις εκκίνησης για κάθε στόχο & ■ δεν καθίσταται εφικτή η επιστροφή στο ίδιο παρασκεύασμα καθώς και η ενδυνάμωση άλλων στόχων σε μετέπειτα στάδιο |
| Gene Probe Technology | βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Ο σχεδιασμός των ανιχνευτών θα πρέπει να είναι συμπληρωματικός σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του εκάστοτε στόχου (DNA ή RNA). Οι ανιχνευτές | <ul style="list-style-type: none"> ■ ειδικότητα, ■ ευαισθησία & ■ γρήγορα αποτελέσματα | <ul style="list-style-type: none"> ■ κόστος & ■ τεχνική πολυπλοκότητα |

| | | | | |
|----------------|-----------------------------------|--|---|---|
| | | επισημαίνονται με φθορίζουσες ουσίες και υβριδοποιούνται με το συμπληρωματικό τους DNA ή RNA στο δείγμα. | | |
| GC | βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Η συγκεκριμένη τεχνολογία εφαρμόζει την αρχή υβριδισμού των νουκλεϊκών οξέων για τον προσδιορισμό γονιδιακού δείγματος. | <ul style="list-style-type: none"> Ευαισθησία & εξειδίκευση | <ul style="list-style-type: none"> χρόνος, υψηλό κόστος & χαμηλά επίπεδα επαναληψιμότητας |
| DNA microarray | βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Συμπληρωματικές αλληλουχίες θα συνδεθούν μεταξύ τους, τα μόρια DNA κόβονται με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών-σε αυτά τα θραύσματα πρόκειται να συνδεθούν φθορίζοντες δείκτες. Εν συνεχεία, αυτά αντιδρούν με τους ανιχνευτές τσιπ DNA. | <ul style="list-style-type: none"> Υψηλή απόδοση, Ακριβής αναγνώριση & Ανάλυση υψηλής απόδοσης | <ul style="list-style-type: none"> Χρόνος & Υψηλό κόστος, |

ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ

| | | | | |
|-------|-----------------------------------|---|---|---|
| LAMP | Βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Στη αντίδραση LAMP τα πρότυπα ενισχύονται σε σταθερή θερμοκρασία διαμέσου των επαναλαμβανόμενων εκτελέσεων ανάμεσα σε δυο είδη αντίδρασης που συμβαίνουν στις περιοχές των βρόγχων. | <ul style="list-style-type: none"> Ταχύτατος προσδιορισμός προϊόντων με εφαρμογή διαφόρων μεθόδων Η ενίσχυση DNA που πραγματοποιείται με PCR οδηγεί σε ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των προς ανάλυση προϊόντων. | <ul style="list-style-type: none"> Υψηλό κόστος σχεδιασμού εκκινητών & Ο μη εξειδικευμένος σχεδιασμός ανάμεσα στους εκκινητές ενδέχεται να επιφέρει ψευδώς θετικά αποτελέσματα |
| NASBA | βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Η εν λόγω μέθοδος αποτελεί μια ευαίσθητη τεχνική με βάση την ισοθερμική μεταγραφή, η οποία αποτελεί κατάλληλο εργαλείο για την ερευνά του RNA. | <ul style="list-style-type: none"> Δυνατότητα προσδιορισμού ζωντανών κυττάρων, ευαισθησία | <ul style="list-style-type: none"> η εξειδίκευση των αντιδράσεων βασίζεται σε θερμοφιλά ένζυμα & το μήκος της αλληλουχίας -στόχου θα πρέπει να ανέρχεται ανάμεσα στα 120-250 νουκλεοτίδια, καθώς μεγαλύτερες ή μικρότερες αλληλουχίες ενδέχεται να ενισχυθούν λιγότερο αποτελεσματικά |

ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

| | | | | |
|---|-----------------------------------|---|--|--|
| Βιοαισθητήρας βασισμένος στα νανοϋλικά | | Ο υπολογισμός στηρίζεται στη χρονική εξάρτηση της αγωγιμότητας των ιόντων διαμέσου νονοκαναλιών που σχηματίζονται από πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα κ.λπ.. | | |
| Βιοαισθητήρας βασισμένος στη μικρορευστολογία | βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Ο βιοαισθητήρας με βάση τη μικρορευστολογία ή σύστημα συνολικής μικροανάλυσης (micro total analysis system - mTAS) ή εργαστήριο σε ένα τσιπ (lab-on-a-chip - LOC), και αποτελεί έναν προηγμένο βιοαισθητήρα, ο οποίος είναι επαναλήψιμος, ελεγχόμενος και προσαρμόζεται στην κλίμακα προσδιορισμού των εκάστοτε τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. | <ul style="list-style-type: none"> ■ ευαισθησία, ■ ταχύτητα, ■ καινοτομία όσον αφορά τις επιτόπιες συσκευές & πρόσβαση στον τελικό αποδέκτη | <ul style="list-style-type: none"> ■ οργανολογία, ■ υψηλό κόστος, ■ σταθερότητα & αναπαραγωγιμότητα |
| Βιοαισθητήρας με βάση τα απταμερή | | Στηρίζονται στην ηλεκτροχημική, μαζική και οπτική μετατροπή, κατά την οποία τα απταμερή προσδένουν στόχους όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, πεπτίδια, λιπίδια, τοξίνες, μέταλλα ιόντων και κύτταρα με υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση. | | |
| Φορητός οργανικός βιοαισθητήρας | | Ο εν λόγω βιοαισθητήρας υπολογίζει το ηλεκτρικό σήμα στο χώρο του επωαζόμενου παθογόνου. | | |
| Βιοαισθητήρας με βάση το smartphone | | Ένας βιοαισθητήρας που είναι βασισμένος σε smartphone και στηρίζεται σε έναν αισθητήρα οπτικής απεικόνισης συναρτάται από έναν αισθητήρα μικροεικόνας από την κάμερα του smartphone για την εικονική αποτύπωση του εκάστοτε τροφιμογενούς παθογόνου. | | |
| CRISPR/Cas | Βακτήρια & ιοί | Η αρχή του συστήματος CRISPR/Cas βασίζεται στο | <ul style="list-style-type: none"> ■ ακρίβεια, ■ ευκολία χρήσης, ■ χαμηλό κόστος | <ul style="list-style-type: none"> ■ περιορισμένη αποτελεσματικότητα |

| | | | | |
|-----|-----------------------------------|---|---|--|
| | | φυσιολογικό αμυντικό μηχανισμό των βακτηρίων έναντι εισβολέων όπως ιοί και πλασμίδια. | <ul style="list-style-type: none"> πολύ λειτουργικότητα & εφαρμογές στη θεραπευτική | <p>σε ορισμένους οργανισμούς & εμφάνιση μη επιθυμητών αποτελεσμάτων,</p> |
| NGS | Βακτήρια, μύκητες, παράσιτα & ιοί | Στόχος η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος ή δείκτες όπως το 16S rRNA και ITS. | <ul style="list-style-type: none"> αξιόπιστα αποτελέσματα και πλέον η χρήση της είναι ευρύτατη, κατάλληλο για την ανίχνευση όλων των ομάδων παθογόνων μικροοργανισμών με σπάνιες εξαιρέσεις, ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, προβλεπόμενοι χρόνοι απόδοσης τεράστιος όγκος δεδομένων, συνεχόμενη βελτίωση στις παροχές και στις πλατφόρμες | <ul style="list-style-type: none"> συγκριτικά με άλλες μεθόδους διαθέτει υψηλό κόστος άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό τα στοιχεία που προκύπτουν είναι ανάλογα με τη βάση των δεδομένων αναφοράς |

Προσαρμοσμένο από: [11, 16, 26, 27, 30, 101, 125, 136]

Κεφάλαιο 3^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στη βιομηχανία υπογραμμίζει τη σημασία της συνεχούς παρακολούθησης και ανίχνευσης τους με σκοπό τη διασφάλιση της ασφάλειας τροφίμων. Οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης προσφέρουν υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια στον εντοπισμό των παθογόνων μικροοργανισμών, καθιστώντας τις αποτελεσματικές για τη βιομηχανία τροφίμων. Η συνεχής έρευνα και ανάπτυξη νέων μοριακών μεθόδων ανίχνευσης είναι κρίσιμη για τη βελτίωση της απόδοσης και της ταχύτητας προσδιορισμού παθογόνων μικροοργανισμών. Η εφαρμογή αυστηρών προτύπων ασφάλειας τροφίμων και η χρήση προηγμένων τεχνολογιών προσδιορισμού βοηθούν τις επιχειρήσεις να συμμορφωθούν με τους κανονισμούς και να διατηρήσουν την εμπιστοσύνη των καταναλωτών.

Με αυτές τις προοπτικές και την κατάλληλη χρήση μοριακών μεθόδων ανίχνευσης, η βιομηχανία τροφίμων μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα και την ασφάλεια των προϊόντων της, προστατεύοντας τους καταναλωτές καθώς και την καλή φήμη της εκάστοτε επιχείρησης.

Η ανίχνευση και η πρόληψη των παθογόνων μικροοργανισμών στη βιομηχανία τροφίμων είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία της δημόσιας υγείας και την εξασφάλιση της ασφάλειας των καταναλωτών. Οι μοριακές μέθοδοι προσδιορισμού παρέχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, καθιστώντας τις κατάλληλες για την έγκαιρη ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα. Η συνεχής εξέλιξη των μοριακών τεχνολογιών θα οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων και βελτιωμένων μεθόδων προσδιορισμού, με μεγαλύτερη ακρίβεια και ταχύτητα. Η εφαρμογή αυτών των μοριακών μεθόδων στη βιομηχανία τροφίμων απαιτεί συνεχή εκπαίδευση και επιμόρφωση του προσωπικού, καθώς και επενδύσεις σε εξοπλισμό και υποδομές.

Η βιομηχανία τροφίμων θα πρέπει να λάβει ορισμένες σημαντικές πρωτοβουλίες προκειμένου να διασφαλιστεί η ποιότητα και η ασφάλεια των προϊόντων της. Η εφαρμογή συστημάτων διαχείρισης και ασφάλειας τροφίμων (Food Safety Management Systems), οι εταιρείες οφείλουν να εφαρμόζουν συστήματα όπως το Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) για να επιτευχθεί ο έλεγχος των κινδύνων και τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων σε όλα τα στάδια της

παραγωγικής διαδικασίας. Η εφαρμογή καλών πρακτικών κατασκευής (Good Manufacturing Practices-GMPs). Η τήρηση καλών πρακτικών κατασκευής είναι ουσιώδης για την πρόληψη της μόλυνσης των τροφίμων από παθογόνους μικροοργανισμούς και υποβάθμιση της ποιότητας των προϊόντων. Η επένδυση στην εκπαιδευτική κατάρτιση, το προσωπικό θα πρέπει να εκπαιδεύεται συνεχώς για τις βέλτιστες πρακτικές στην υγιεινή, τον έλεγχο ποιότητας και τη διαχείριση κινδύνων. Η βιομηχανία τροφίμων πρέπει να συνεργάζεται στενά με τις αρχές ρύθμισης για την εφαρμογή και τη συμμόρφωση με τους κανονισμούς ασφάλειας τροφίμων. Με αυτούς τους τρόπους η βιομηχανία τροφίμων μπορεί να εξασφαλίσει την παραγωγή υψηλής ποιότητας και ασφαλών προϊόντων που πληρούν τις ανάγκες και τις προσδοκίες των καταναλωτών. [3]

Ο έγκαιρος προσδιορισμός των τροφιμογενών παθογόνων είναι ζωτικής σημασίας προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια στα τρόφιμα και να αποφευχθούν τροφικές δηλητηριάσεις. Οι συμβατικές μέθοδοι που αναφέρθηκαν στηρίζονται αποκλειστικά στο χώρο του εργαστηρίου. Το μείζον θέμα που προκύπτει από την χρήση συμβατικών μεθόδων αποτελεί ο χρόνος που απαιτείται, οι κίνδυνοι επιμόλυνσης, οι υψηλοί πόροι καθώς και το άρτια εξειδικευμένο εργατικό δυναμικό που χρειάζεται για τη λήψη ορθών αποτελεσμάτων. Πέραν των μειονεκτημάτων που φέρουν οι συμβατικές μέθοδοι διαθέτουν και πλεονεκτήματα αναφορικά με την ταχύτατη ανταπόκριση, ανάλυση και το χαμηλό κόστος. Τόσο οι συμβατικές όσο και οι προηγμένες μέθοδοι φέρουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, αυτό συνεπάγεται με το γεγονός ότι κατά την επιλογή της εκάστοτε μεθόδου, η επιλογή της θα πρέπει να διαθέτει ακρίβεια, αξιοπιστία, να είναι οικονομικά αποδοτική και επιλεκτική ως προς ένα συγκεκριμένο παθογόνο τροφίμων, καθώς και να είναι ταχύτατη με σκοπό τη λήψη ορθών αποτελεσμάτων.

Πέραν αυτών που αναφέρθηκαν παραπάνω, ως προς την εφαρμογή τους σε βιομηχανικό επίπεδο υπάρχουν κάποιες παράμετροι, όπως η γρήγορη, αξιόπιστη διεργασία που αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων. Επιπρόσθετα, η εφαρμογή εκσυγχρονισμένων συσκευών που αποσκοπούν στο προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων στηρίζεται στον εκάστοτε τύπο τροφίμου καθώς και στα συστατικά τα οποία αποτελείται (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη και φυτικές ίνες). Για το λόγο αυτό χρειάζονται εξειδικευμένες μέθοδοι ως προς την προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση, προκειμένου να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των παθογόνων

μικροοργανισμών. Για τη δημιουργία μεθόδων, η μελλοντική ερευνά που θα διεξαχθεί θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα μειονεκτήματα που έχουν ως τώρα αναφερθεί ως μια από τις σημαντικές παραμέτρους με σκοπό την επίτευξη ολοκληρωμένου προσδιορισμού των τροφιμογενών παθογόνων, καθώς επίσης και να ληφθούν υπόψη πιθανά χαρακτηριστικά όπως η ακρίβεια, η επικύρωση, η αξιοπιστία, η αποδοτικότητα της εκάστοτε μεθόδου, η φιλικότητα προς το περιβάλλον καθώς και η εφαρμογή της σε εμπορική κλίμακα προκειμένου να επιτευχθεί μια αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού. [74]

Οι συμβατικές μέθοδοι που βασίζονται στην καλλιέργεια μικροοργανισμών αναφορικά με τον προσδιορισμό τους αποτελούν επιλεκτικές μεθόδους και καθίστανται αρκετά χρονοβόρες. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί ταχύτατες μέθοδοι ανίχνευσης, με σκοπό να εξαλειφθούν τα όρια των συμβατικών μεθόδων προσδιορισμού. Οι γρήγορες μέθοδοι είναι απαραίτητες για τον ταχύτατο προσδιορισμό των τροφιμογενών παθογόνων, με σκοπό να προληφθούν τα περιστατικά τροφιμογενών νόσων και κατ' επέκταση των εκάστοτε παθογόνων μικροοργανισμών. Συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους, οι μέθοδοι ταχύτατου προσδιορισμού γενικότερα είναι πιο ευαίσθητες, εξειδικευμένες, χρονικά αποδοτικότερες, αξιόπιστες και εξοικονομούν ενέργεια.

Οι μέθοδοι νουκλεϊκών οξέων που αναφέρθηκαν, διαθέτουν υψηλή ευαισθησία και εφαρμόζονται σε ευρεία κλίμακα για τον προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, παρόλα αυτά οι εν λόγω μέθοδοι απαιτούν άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό καθώς και εξειδικευμένα όργανα. Εναλλακτικές μέθοδοι νουκλεϊκών οξέων που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων καθώς και των τοξινών που ενδεχομένως κάποιοι από τους προαναφερθείς μικροοργανισμούς εκκρίνουν αποτελούν οι μέθοδοι NASBA και LAMP. Οι εν λόγω μέθοδοι είναι εξειδικευμένες, ευαίσθητες και οικονομικά αποδοτικότερες, δεν χρειάζονται σύστημα θερμοκυκλοφορίας, γεγονός που τις καθιστά χρήσιμες κυρίως σε χώρους με μη υψηλούς πόρους.

Επιπρόσθετα, αρκετές μέθοδοι που βασίζονται σε βιοαισθητήρες παρουσιάστηκαν πρόσφατα και εφαρμόστηκαν στον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων, γεγονός το οποίο οφείλεται στην ταχύτητα και στην οικονομική τους απόδοση. Οι μέθοδοι που βασίζονται στους βιοαισθητήρες είναι εύχρηστες και δεν χρειάζονται εκπαιδευμένο δυναμικό. Οι εν λόγω μέθοδοι που βασίζονται στους βιοαισθητήρες μπορούν να

εφαρμοσθούν για τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων χωρίς να απαιτείται προ-εμπλουτισμός δείγματος.

Παρόλα αυτά η βελτίωση αναφορικά με τη ανίχνευση τροφικών μητρών κρίνεται απαραίτητη για τον επιτόπιο προσδιορισμό των εν λόγω μεθόδων. Οι ανοσολογικές μέθοδοι (ELISA, ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής και western blot) εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό παθογόνων βακτηρίων και των τοξινών τους. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανοσολογία καθίστανται λειτουργικά καλύτερες με την απουσία μορίων που παρεμβαίνουν στα δείγματα (π.χ. DNA ή πρωτεΐνες, μη στοχευμένα κύτταρα κ.λπ.).

Ο συνδυασμός αρκετών ταχύτατων μεθόδων με σκοπό τον προσδιορισμό του εκάστοτε παθογόνου καθίσταται εφικτός και αυτό διότι η εφαρμογή μιας μεθόδου ενδεχομένως να μην είναι αρκετή για επιβεβαίωση του προς ανίχνευση παθογόνου. Παρόλα αυτά, χρειάζονται αρκετές έρευνες αναφορικά με την επίδραση που μπορεί να έχει ο συνδυασμός ταχέων μεθόδων όσον αφορά τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων, με σκοπό την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών και ακριβέστερων μεθόδων προσδιορισμού. [83]

Όπως ήδη έχει αναφερθεί μέχρι τώρα, οι μέθοδοι καλλιέργειας είναι αρκετά χρονοβόρες, σε περίπτωση που «συμμαχήσουν» με άλλες τεχνικές όπως η MALDI TOF MS καθώς και με μεθόδους που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα (π.χ. PCR), καθίστανται αποτελεσματικές για τον ταχύτατο προσδιορισμό των τροφιμογενών παθογόνων. Αντίστοιχα, οι μέθοδοι με βάση τα νουκλεϊκά οξέα (π.χ. RT-qPCR) αν συνδυαστούν με μεθόδους αλληλούχησης, εφαρμόζονται ευρύτατα από τις προσεγγίσεις που βασίζονται στην ανοσοδοκιμασία και στην NGS για τον προσδιορισμό παθογόνων. Οι μέθοδοι που στηρίζονται NGS (όπως η μεταγονιδιωματική) διαθέτουν μια ολοκληρωμένη γνώση όσον αφορά το γονότυπο, την ποικιλομορφία καθώς και τις δραστηριότητες των τροφιμογενών παθογόνων, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα επίβλεψης, ανίχνευσης, ελέγχου (στην τροφική αλυσίδα) καθώς επίσης και την ταυτοποίηση τους.

Οι εν λόγω προσεγγίσεις αποτελούν ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για τον έγκαιρο προσδιορισμό και τη διαχείριση των εκάστοτε επιδημιών από τροφιμογενή παθογόνα, παρέχοντας κατ' αυτό το τρόπο δημόσια υγεία και ασφάλεια. Οι μελλοντικές καθώς και οι τρέχουσες προσεγγίσεις θα πρέπει να εστιάσουν στην διασφάλιση της χρήσης

διαθέσιμων μέσων για την καταπολέμηση των τροφιμογενών παθογόνων διαμέσου της επιμόρφωσης των υπαλλήλων για την επίβλεψη και προστασία των τροφίμων με την εφαρμογή αυτών των μεθόδων. Επιπλέον, θα πρέπει να διενεργηθούν περαιτέρω έρευνες για την εξέλιξη αποδοτικότερων πρακτικών (όπως η αξιοποίηση των βακτηριοφάγων για τον περιορισμό και την απομάκρυνση των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. [8]

Πέραν της παραδοσιακής μεθόδου προσδιορισμού τροφιμογενών παθογόνων, η οποία είναι αρκετά ευαίσθητη, συχνά απαιτεί και πολύ χρόνο για πρακτική εφαρμογή και η ολοκλήρωση της ανέρχεται από διάστημα μερικών ημερών έως και μιας εβδομάδας, για το λόγο αυτό χρειάζονται νέες μέθοδοι προκειμένου να ξεπεραστεί ο εν λόγω περιορισμός. Παρόλα αυτά, η πλειοψηφία των μεθόδων αυτών χρήζουν βελτιώσεις αναφορικά με την ευαισθησία, την επιλεκτικότητα, την ακρίβεια προκειμένου να ενδείκνυται η εφαρμογή τους για πρακτικό σκοπό.

Από τις κατηγορίες των μοριακών μεθόδων που αναλυθήκαν στην παρούσα μελέτη, οι μέθοδοι που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα για τον προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών και κατ' επέκταση των τοξινών που κάποιοι από αυτούς εκκρίνουν, διαθέτουν υψηλή ευαισθησία και απαιτούν λιγότερο χρόνο συγκριτικά με τις παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης που στηρίζονται σε καλλιέργειες. Παρόλα αυτά η πλειοψηφία αυτών των μεθόδων χρειάζονται εκπαιδευμένο δυναμικό και όργανα υψηλού κόστους, γεγονός που συνεπάγεται στον περιορισμό της εφαρμογής τους σε «πραγματικό περιβάλλον». Ο ταχύτατος προσδιορισμός των επιζήμιων για την κοινωνία τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών στην τροφική αλυσίδα αποτελεί ένα σημαντικό εναρκτήριο βήμα, με σκοπό να επιτευχθεί ο έλεγχος των εκάστοτε παθογόνων και κατ' επέκταση η εξάλειψή τους.

Η εφαρμογή της μοριακής τεχνολογίας για την ανίχνευση των πιο κοινών τροφιμογενών παθογόνων μετρά περίπου 50 χρόνια. Παρόλο που μπορεί να προσδιορίσει ταχύτατα συγκεκριμένα είδη παθογόνων μικροοργανισμών που ενδεχομένως ανιχνεύονται σε χαμηλά επίπεδα στα τρόφιμα ο εξοπλισμός που απαιτείται για την υλοποίηση των δοκίμων ενδέχεται να έχει υψηλό κόστος, όπως οι μέθοδοι mPCR και RT-qPCR, οι οποίες χρειάζονται υψηλά επίπεδα επιχειρησιακών δεξιοτήτων. Μέθοδοι όπως η LAMP, είναι ταχύτερες συγκριτικά με άλλες μοριακές μεθόδους ως προς το λεπτομερή και αξιόπιστο προσδιορισμό. Η ευαισθησία και η

ακρίβεια αναφορικά με την ταχύτατη ανίχνευση των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών θα παρουσιάσει σημαντική βελτίωση και το κόστος προσδιορισμού θα μειωθεί, γεγονός που συνεπάγεται ότι η χρήση τους θα πραγματοποιείται τακτικά στα πλαίσια υλοποίησης ενός προγράμματος ελέγχου τροφιμογενών παθογόνων.

Τα τελευταία έτη, έχουν αναπτυχθεί νέες διαγνωστικές τεχνικές, όπως οι βιοαισθητήρες, με σκοπό την εξάλειψη (ή μείωση) των συμβατικών μεθόδων προσδιορισμού παθογόνων. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα που προκύπτουν από τους βιοαισθητήρες ενδεχομένως να είναι ψευδώς αρνητικά με εφαρμογή φάγων ή πλασμιδίων ξενιστών, φαινόμενο το οποίο απορρέει από το γεγονός ότι είτε να μπορεί να είναι αρκετά εξειδικευμένα είτε αρκετά εκτενή.

Εντούτοις, μια μέθοδος που να συνδυάζει την αξιοπιστία, την ακρίβεια, την ταχύτητα, την ευαισθησία, να είναι οικονομικά αποδοτική καθώς και απλή θα αποτελέσει τη «χρυσή τομή». Η μέθοδος «χρυσής τομής» όπως αναφέρθηκε θα προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα στη βιομηχανία τροφίμων και κατ' επέκταση και σε άλλους τομείς.

Επιπρόσθετα, η ροπή προς διάφορες μεθόδους θα οδηγήσει στην παραγωγή νέων συσκευών ή μεθόδων με σκοπό να ενισχυθούν τα πλεονεκτήματα των μεθόδων ταχύτατου προσδιορισμού.

Η συγκεκριμένη μελέτη παρέχει πληροφορίες για την επιπρόσθετη διερεύνηση του προσδιορισμού και της ταυτοποίησης και άλλων τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών, τεχνικές που έχουν δυνατότητες ανάπτυξης για την επίτευξη του εν λόγω σκοπού. Παρόλα αυτά δεν έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι υψηλής απόδοσης, χαμηλής εξειδίκευσης και οικονομικά αποδοτικότερες για αρκετά από τα συνηθισμένα τροφιμογενή παθογόνα. Η βελτίωση των μοριακών μεθόδων είναι αρκετά σημαντική προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος που ελλοχεύει για την ανθρώπινη υγεία. Εν κατακλείδι, υπάρχουν αρκετές χρήσεις στον τομέα του αυτοματοποιημένου και ταχύτατου προσδιορισμού τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών, γεγονός που οφείλεται στην ευρεία εφαρμογή καθώς και στις υψηλές δυνατότητες των εν λόγω μεθόδων με περισσότερες ευκαιρίες για επιπρόσθετη ανάπτυξη στο μέλλον. [163]

Πέραν των βελτιώσεων που πραγματοποιούνται με σκοπό την ασφάλεια του καταναλωτή και κατ' επέκταση της δημόσιας υγείας, σημαντικό παράγοντα εξέτασης αποτελούν και οι παράγοντες που συμβάλλουν στην ύφεση των τροφιμογενών νοσημάτων. Πιο συγκεκριμένα τα τελευταία χρόνια διαδραματίζονται «γεγονότα», τα

οποία μπορούν τα αιτιολογήσουν σε σημαντικό βαθμό την αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης τροφιμογενών νόσων. Κάποιες από αυτές τις αλλαγές αποτελούν: οι αλλαγές ως προς τις γεωπονικές διαδικασίες και η εφαρμογή χημικών ουσιών με σκοπό τη βελτίωση σε ποσοτικό και ποιοτικό επίπεδο αναφορικά με την παραγωγή, η εισχώρηση νέων τεχνικών όσον αφορά την εκτροφή των ζώων καθώς και οι αλλαγές στην κτηνοτροφία με σκοπό την αύξηση της παραγωγής. Επιπρόσθετα, οι αλλαγές που συμβαίνουν στις ενέργειες συσκευασίας και επεξεργασίας τροφίμων, οι αλλαγές στον τρόπο ζωής παγκοσμίως καθώς και η συχνή κατανάλωση τροφίμων πέραν του οικιακού περιβάλλοντος. Τέλος, σημαντικό ρολό διαδραματίζουν και οι κλιματικές αλλαγές όπως το φαινόμενο της υπερθέρμανσης και γενικότερα οι αλλαγές που μπορεί να προκληθούν από αυτό. [146]

Ο καταναλωτής επίσης διαθέτει σημαντικό ρολό στη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων και της ποιότητας τους. Ορισμένα από τα βήματα που μπορεί να ακολουθήσει ο καταναλωτής αποτελούν η επιλογή προϊόντων από αξιόπιστες και γνωστές εταιρείες που τηρούν υψηλά πρότυπα ασφαλείας και ποιότητας.

Επιπρόσθετα ο καταναλωτής θα πρέπει να ελέγχει τις ημερομηνίες λήξης και τις συσκευασίες τροφίμων πριν την αγορά τους και να παρακολουθεί τυχόν προειδοποιήσεις σχετικά με την ασφάλεια.

Ο καταναλωτής θα πρέπει να αποθηκεύει και να προετοιμάζει τα τρόφιμα σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στη συσκευασία, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος μόλυνσης. Η ορθή υγιεινή είναι ζωτικής σημασίας, καθώς ο εκάστοτε αγοραστής θα πρέπει να τηρεί υψηλά πρότυπα υγιεινής κατά την προετοιμασία και την κατανάλωση των τροφίμων, όπως το πλύσιμο των χεριών πριν το φαγητό και η χρήση καθαρών εργαλείων και επιφανειών.

Πιο συγκεκριμένα τα ωμά τρόφιμα θα πρέπει να διατηρούνται σε ξεχωριστά δοχεία από τα μαγειρεμένα καθώς επίσης και η χρήση εργαλείων (π.χ. ξυλά κοπής, μαχαιριά) θα πρέπει να είναι διαφορετικά από αυτά που θα χρησιμοποιηθούν για τα ωμά από αυτά που θα εφαρμοσθούν στα μαγειρεμένα. Η μεταφορά των τροφίμων θα πρέπει να γίνεται με ασφάλεια. Τα τρόφιμα δεν θα πρέπει να εκτίθενται κατά τη μεταφορά τους στον ήλιο, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στη διατήρηση των σωστών θερμοκρασιών καθώς επίσης τόσο η προστασία των τροφίμων όσο και ο χώρος της κουζίνας θα πρέπει να προστατεύονται από έντομα, κατοικίδια και άλλα ζώα. Σημαντική παράμετρο

αποτελεί το άρτιο μαγείρεμα, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για ζωικά προϊόντα (π.χ. αυγά, πουλερικά, κρέας, θαλασσινά κ.λπ.). Η αναθέρμανση των φαγητών θα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη σχολαστικότητα πριν από το σερβίρισμα τους. Το μαγειρεμένο φαγητό σε θερμοκρασία δωματίου καλό είναι να μην παραμένει εκτός ψυγείου για περισσότερες από δυο ώρες. Σημαντική είναι επίσης η έγκαιρη τοποθέτηση στο ψυγείο ευαίσθητων στη ζεστή καθώς και μαγειρεμένων τροφίμων σε θερμοκρασία κάτω των 5° C. Η κατανάλωση του περισσευούμενου φαγητού ενδείκνυται να πραγματοποιείται εντός 24 ωρών και αντίστοιχα των φρούτων και λαχανικών εντός 3 ημέρων. Τέλος και σημαντικότερο μετρώ αποτελούν η τήρηση των κανόνων προσωπικής υγιεινής, το πλύσιμο των χεριών πριν το χειρισμό των τροφίμων και μετά την τουαλέτα και επίσης η επιμελής απολύμανση των επιφανειών και του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την επεξεργασία τροφίμων. [142]

Τα τροφιμογενή παθογόνα αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για την κοινωνία, καθώς αποτελούν αιτιολογικό παράγοντα για την πλειοψηφία των ασθενειών, νοσηλειών καθώς και θανάτων ετησίως. Πέραν των βλαβερών επιπτώσεων τους στην ανθρώπινη υγεία, οι εν λόγω μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες, ιοί και μια σειρά παράσιτων) εκπροσωπούν και ένα αξιοσημείωτο οικονομικό κόστος για τις βιομηχανίες τροφίμων με τη χρήση και τη συνεχή παρακολούθηση επιμορφωτικών σεμιναρίων υγιεινής και ασφάλειας τροφίμων και των προϊόντων που έχουν ανακληθεί. Η εξέλιξη των γνώσεων που διατίθενται μέχρι σήμερα αναφορικά με την επεξεργασία τροφίμων και με τα προβλήματα που απορρέουν από παράγοντες που σχετίζονται με τροφιμογενή παθογόνα (π.χ. αντοχή στα αντιμικροβιακά φάρμακα, απόκτηση παραγόντων ιογένεσης, η επιβίωση και η παραμονή τους σε χώρους επεξεργασίας κ.λπ.) καθίσταται ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων μεθόδων. [57]

Το σύστημα CRISPR/Cas πέραν του γεγονότος ότι αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την γονιδιακή επεξεργασία, είναι και μια ισχυρή τεχνολογία διάγνωσης. Αυτό απορρέει από το γεγονός ότι έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που στοχεύουν το DNA με εφαρμογή των ικανοτήτων αναγνώρισης και διαχωρισμού του CRISPR/Cas9, CRISPR/Cas9 με σκοπό τη μοριακή διάγνωση. Συγκριτικά με το CRISPR/Cas9, το CRISPR/Cas12 και το CRISPR/Cas13 έχουν χρησιμοποιηθεί για βιοανίχνευση εξαιτίας της δυνατότητας τους για διακοπή, προσφέροντας κατ' αυτό το τρόπο μια νέα εποχή στη μοριακή διάγνωση.

Παρόλο που η τεχνική προσδιορισμού παθογόνων που στηρίζεται στο εν λόγω σύστημα και φέρει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως το χαμηλό κόστος, η ταχεία ανίχνευση, η ευρύτατη εφαρμογή, εντούτοις υπάρχουν ακόμα αρκετοί τομείς, οι οποίοι χρήζουν βελτιώσεις, προτού γίνει δεκτή η αποδοχή σε πολυπλοκότερα περιβάλλοντα.

Για παράδειγμα, η εύρεση πιο αποτελεσματικών μεθόδων ως προς την αρχική επεξεργασία των εκάστοτε δειγμάτων, η απλοποίηση στα στάδια εξαγωγής νουκλεϊκών οξέων, να καθίσταται εφικτός ο πολλαπλός προσδιορισμός καθώς και η ποσοτικοποίηση αρκετών παθογόνων, καθώς επίσης και να αποφεύγεται η μόλυνση κατά το στάδιο στο οποίο θα επιδράσει η πρωτεΐνη Cas. Γενικότερα, μια μέθοδος προσδιορισμού παθογόνων που έχει ως γνώμονα το σύστημα CRISPR/Cas, αποτελεί ένα καινοτόμο μέσο για τις μοριακές τεχνικές προσδιορισμού αναφορικά με τους παθογόνους μικροοργανισμούς, φέροντας αποτελέσματα και για το λόγο αυτό αναπτύσσεται με ταχύτατους ρυθμούς. Μελλοντικά προβλέπεται ότι η τεχνολογία που βασίζεται στο σύστημα CRISPR/Cas θα αποτελέσει εργαλείο ευρείας εφαρμογής ως προς το προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών *in vitro*. [161]

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 96 Λοιπόν Elisa Πλάκες, υψηλής ποιότητας από Yongyue στο bossgoo.com. (n.d.). Retrieved from gr.bossgoo.com website: <https://gr.bossgoo.com/product-detail/96-well-elisa-strip-plates-from-62171880.html>
2. 2016 - Multistate outbreak of hepatitis A linked to frozen strawberries (Final Update) | Hepatitis A Outbreaks | Outbreaks | Division of Viral Hepatitis | CDC. (2019, June 12). Retrieved from www.cdc.gov website: <https://www.cdc.gov/hepatitis/outbreaks/2016/hav-strawberries.htm>
3. A. SZCZYRBA. (2023). Good Manufacturing Practices for Quality and Safety Management in the Food Industry. *Materials Research Proceedings*. <https://doi.org/10.21741/9781644902691-34>
4. About Cyclosporiasis - Minnesota Dept. of Health. (n.d.). Retrieved from www.health.state.mn.us website: <https://www.health.state.mn.us/diseases/cyclosporiasis/basics.html>
5. Agarose Gel Electrophoresis - an overview | ScienceDirect Topics. (n.d.). Retrieved from www.sciencedirect.com website: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/agarose-gel-electrophoresis>
6. Ajmera, A., & Shabbir, N. (2023, August 8). Salmonella. Retrieved from PubMed website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555892/>
7. Akintunde, O., Tucker, T., & Carabetta, V. J. (2023). The evolution of next-generation sequencing technologies. *ArXiv*, arXiv:2305.08724v1. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10246072/>
8. Aladhadh, M. (2023). A Review of Modern Methods for the Detection of Foodborne Pathogens. *Microorganisms*, 11(5), 1111. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051111>
9. Alhajj, M., Farhana, A., & Zubair, M. (2023, April 23). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Retrieved from PubMed website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
10. American Society for Microbiology. (2011). FAQ: E. Coli: Good, Bad, & Deadly: “What is true for E. coli is true for the elephant.” In *PubMed*. Washington (DC): American Society for Microbiology. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562895/>

11. Antibodies, Proteins, Kits and Reagents for Life Science | Abcam. (n.d.). Retrieved from [www.abcam.com](https://www.abcam.com/en-gr/technical-resources/guides/elisa-guide/what-is-an-elisa) website: <https://www.abcam.com/en-gr/technical-resources/guides/elisa-guide/what-is-an-elisa>
12. Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751–1773. <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>
13. Arida, J., Shipley, A., & Almeria, S. (2023). Molecular Detection of Cyclospora cayetanensis in Two Main Types of Farm Soil Using Real-Time PCR Assays and Method Modification for Commercial Potting Mix. *Microorganisms*, 11(6), 1506. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061506>
14. Arreguin-Perez, C. A., Miranda-Miranda, E., Folch-Mallol, J. L., & Cossío-Bayúgar, R. (2023). Identification of Virulence Factors in Entomopathogenic Aspergillus flavus Isolated from Naturally Infected Rhipicephalus microplus. *Microorganisms*, 11(8), 2107. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082107>
15. Aryal, S. (2018a, June 27). Oxidase Test- Principle, Procedure and Results. Retrieved from Microbe Notes website: <https://microbenotes.com/oxidase-test-principle-procedure-and-results/>
16. Aryal, S. (2018b, September 6). Real Time PCR- Principle, Process, Markers, Advantages, Applications | Molecular Biology / Genetics | Microbe Notes. Retrieved from Microbe Notes website: <https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/>
17. Aryal, S. (2020, January 9). Competitive ELISA Protocol and Animation. Retrieved from Microbe Notes website: <https://microbenotes.com/competitive-elisa-protocol-and-animation/>
18. Aslam, A., & Okafor, C. N. (2022a). Shigella (Shigellosis). Retrieved from PubMed website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482337/>
19. Aslam, A., & Okafor, C. N. (2022b, August 8). [Figure, This photomicrograph revealed stool exudates...]. Retrieved from [www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482337/figure/article-28966.image.f1/) website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482337/figure/article-28966.image.f1/>
20. Aziz, M., & Yelamanchili, V. S. (2021, July 25). [Figure, Gram stain-yersinia. Image courtesy O.Chaigasame]. Retrieved from [www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499837/figure/article-31453.image.f1/) website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499837/figure/article-31453.image.f1/>
21. Barlow, A., Roy, K., Hawkins, K., Ankarah, A. A., & Rosenthal, B. (2021). A

- review of testing and assurance methods for *Trichinella* surveillance programs. *Food and Waterborne Parasitology*, 24, e00129. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2021.e00129>
22. BC Centre for Disease Control. (2019). *Bacillus cereus*. Retrieved from Bccdc.ca website: <http://www.bccdc.ca/health-info/diseases-conditions/bacillus-cereus>
 23. Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What Is next Generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition*, 98(6), 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
 24. Berlina, A. N., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2019). ELISA and Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Food Colorants: State of the Art. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 49(3), 209–223. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1503942>
 25. Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3), 529–563. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>
 26. Biochemical Test Notes. (n.d.). Retrieved from Microbe Notes website: <https://microbenotes.com/category/biochemical-test/>
 27. Biochemical Testing - an overview | ScienceDirect Topics. (2016). Retrieved from Sciencedirect.com website: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/biochemical-testing>
 28. Blancher, C., & Jones, A. (2019). SDS-PAGE and Western Blotting Techniques. *Metastasis Research Protocols*, 57, 145–162. <https://doi.org/10.1385/1-59259-136-1:145>
 29. Burgart, L. J., Robinson, R. A., Heller, M. J., Wilke, W. W., Iakoubova, O. K., & Cheville, J. C. (1992). Multiplex polymerase chain reaction. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 5(3), 320–323. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1323106/>
 30. Bustin, S. A., & Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 15(3), 155–166. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2291693/>
 31. Capobianco, J. A., Clark, M., Cariou, A., Leveau, A., Pierre, S., Fratamico, P., ... Armstrong, C. M. (2020). Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in beef products using droplet digital PCR. *International Journal of Food*

- Microbiology*, 319, 108499. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108499>
32. Carstens, C. K., Salazar, J. K., & Darkoh, C. (2019). Multistate Outbreaks of Foodborne Illness in the United States Associated With Fresh Produce From 2010 to 2017. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02667>
33. CDC. (2016, October 24). *Yersinia enterocolitica* (Yersiniosis) . Retrieved from CDC website: <https://www.cdc.gov/yersinia/index.html>
34. CDC. (2019). Questions and Answers . Retrieved from CDC website: <https://www.cdc.gov/campylobacter/faq.html>
35. CDC. (2021, May 18). *Clostridium Perfringens* Food Poisoning. Retrieved from Centers for Disease Control and Prevention website: <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/clostridium-perfringens.html#symptoms>
36. CDC - DPDx - Cyclosporiasis. (2019). Retrieved from <https://www.cdc.gov/dpdx/cyclosporiasis/index.html>
37. Center for Food Safety and Applied Nutrition. (2019a, March 29). *Listeria* (Listeriosis). Retrieved from U.S. Food and Drug Administration website: <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/listeria-listeriosis>
38. Center for Food Safety and Applied Nutrition. (2020a). BAM Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins. *FDA*. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>
39. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *Norovirus*. Retrieved from CDC website: <https://www.cdc.gov/norovirus/about/symptoms.html>
40. Centers for Disease Control and Prevention. (2020, June 25). CDC and Food Safety. Retrieved from Centers for Disease Control and Prevention website: <https://www.cdc.gov/foodsafety/cdc-and-food-safety.html>
41. Ching, K. H. (2015). Lateral Flow Immunoassay. *Methods in Molecular Biology*, 127–137. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_13
42. Choi, W., Nam, H., Kwak, N., Huh, W., Kim, Y., Kang, M., ... Dubey, J. P. (1997). Foodborne Outbreaks of Human Toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 175(5), 1280–1282. <https://doi.org/10.1086/593702>
43. Common Settings of Norovirus Outbreaks. (2023, May 10). Retrieved from Centers for Disease Control and Prevention website: <https://www.cdc.gov/norovirus/outbreaks/common-settings.html>

44. Compliant Detection of *Listeria monocytogenes* in Food &. (n.d.). Retrieved from www.rapidmicrobiology.com website:
<https://www.rapidmicrobiology.com/news/compliant-detection-of-listeria-monocytogenes-in-food-environmental-samples>
45. Cox, K. L., Viswanath Devanarayan, Aidas Kriauciunas, Manetta, J., Chahrzad Montrose, & Sitta Sittampalam. (2019, July 8). Figure 1: [Diagram of a sandwich ELISA...]. Retrieved from Nih.gov website:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/figure/immunometh.F1/>
46. *Cyclospora cayetanensis* - an overview | ScienceDirect Topics. (n.d.). Retrieved from www.sciencedirect.com website:
<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/cyclospora-cayetanensis>
47. Detection Methodologies for Pathogen and Toxins: A Review. (2017). *Sensors*, 17(8), 1885. <https://doi.org/10.3390/s17081885>
48. Dhakal, A., & Sbar, E. (2020). Aflatoxin Toxicity. Retrieved from PubMed website:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557781/>
49. Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., ... Mahillon, J. (2005). Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus*-Associated Food Poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 4277–4279. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4277-4279.2005>
50. Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märklbauer, E., & Granum, P. E. (2021). The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*, 13(2), 98. <https://doi.org/10.3390/toxins13020098>
51. Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>
52. Elbehiry, A., Abalkhail, A., Marzouk, E., Elmanssury, A. E., Almuzaini, A. M., Alfheaid, H., ... Abu-Okail, A. (2023). An Overview of the Public Health Challenges in Diagnosing and Controlling Human Foodborne Pathogens. *Vaccines*, 11(4), 725. <https://doi.org/10.3390/vaccines11040725>
53. Fatima, R., & Aziz, M. (2019, February). Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* (EHEC). Retrieved from Nih.gov website:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519509/>

54. Fig. 1: Toxoplasmosis and the life cycle of *T. gondii*. | Experimental & Molecular Medicine. (n.d.). *Www.nature.com*. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/s12276-019-0353-9/figures/1>
55. Fischer, G. H., Hashmi, M. F., & Paterek, E. (2024, January 10). [Figure, A scanning electron microscope-derived image...]. Retrieved from [www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537033/figure/article-18790.image.f1/) website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537033/figure/article-18790.image.f1/>
56. Fitzgerald, C. (2015). *Campylobacter*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.03.001>
57. Foodborne Pathogens and Food Safety. (2022). In A. A. Lourenco, C. Burgess, & T. Ells (Eds.), *www.mdpi.com*. MDPI - Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Retrieved from <https://www.mdpi.com/books/reprint/5715-foodborne-pathogens-and-food-safety>
58. Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., & Korkeala, H. (2006). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 47(3), 315–329. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2006.00095.x>
59. Fu, Y., Alenezi, T., & Sun, X. (2022). *Clostridium perfringens*-Induced Necrotic Diseases: An Overview. *Immuno*, 2(2), 387–407. <https://doi.org/10.3390/immuno2020024>
60. Fungal Spores Affect Kids' Risk for Allergies. (2015, May 28). Retrieved from National Institutes of Health (NIH) website: <https://www.nih.gov/news-events/nih-research-matters/fungal-spores-affect-kids-risk-allergies>
61. Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
62. Gavini, K., & Parameshwaran, K. (2023, April 14). Western Blot (Protein Immunoblot). Retrieved from PubMed website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542290/>
63. Grahek-Ogden, D., Schimmer, B., Cudjoe, K. S., Nygård, K., & Kapperud, G. (2007). Outbreak of *Yersinia enterocolitica* Serogroup O:9 Infection and Processed Pork, Norway. *Emerging Infectious Diseases*, 13(5), 754–756. <https://doi.org/10.3201/eid1305.061062>
64. Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR).

- Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), pdb.prot095182.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>
65. Gwinn, M., MacCannell, D., & Armstrong, G. L. (2019). Next-Generation Sequencing of Infectious Pathogens. *JAMA*, 321(9), 893–894.
<https://doi.org/10.1001/jama.2018.21669>
66. Hadjilouka, A., & Tsaltas, D. (2020). Cyclospora Cayetanensis—Major Outbreaks from Ready to Eat Fresh Fruits and Vegetables. *Foods*, 9(11), 1703.
<https://doi.org/10.3390/foods9111703>
67. He, S., Jiu, Y., Bian, H., Huang, J., Ye, S., Lan, Z., & Xin, Y. (1992). An outbreak of poisoning from Penicillium cyclopium contaminated dried persimmon. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 5(2), 115–124. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1642784/>
68. Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., & Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTechniques*, 56(2).
<https://doi.org/10.2144/000114133>
69. Hegde, M., Pai, P., Shetty, M. G., & Babitha, K. S. (2022). Gold nanoparticle based biosensors for rapid pathogen detection: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 18, 100756.
<https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100756>
70. Hepatitis A (Foodborne). (n.d.). Retrieved from www.cdph.ca.gov website:
[https://www.cdph.ca.gov/Programs/CID/DCDC/Pages/Hepatitis-A-\(Foodborne\).aspx](https://www.cdph.ca.gov/Programs/CID/DCDC/Pages/Hepatitis-A-(Foodborne).aspx)
71. Hepatitis Viruses | LSBio. (n.d.). Retrieved from www.lsbio.com website:
<https://www.lsbio.com/research-areas/infectious-disease/hepatitis#hepatitis-a>
72. Jensen, E. C. (2012). The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 295(3), 369–371.
<https://doi.org/10.1002/ar.22424>
73. Johannessen, G. S., & Torp, M. (2005, January 1). 10 - Improving the safety of organic vegetables (W. Jongen, Ed.). Retrieved from ScienceDirect website:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9781855739567500103>
74. Kabiraz, M. P., Majumdar, P. R., Mahmud, M. M. C., Bhowmik, S., & Ali, A. (2023). Conventional and advanced detection techniques of foodborne pathogens:

- A comprehensive review. *Heliyon*, 9(4), e15482. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15482>
75. Kalender, H., HB, E., Cetinkaya, B., Muz, A., Arslan, N., & Kılıc, A. (2012). Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR. *Veterinární Medicína*, 50(No. 10), 439–442. <https://doi.org/10.17221/5646-vetmed>
 76. Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2023, March 6). Polymerase Chain Reaction (PCR). Retrieved from PubMed website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
 77. Khisti, M. (2021, July 31). Nested Polymerase Chain Reaction (nPCR). Retrieved from The Science Bistro website: <https://thesciencebistro.com/nested-polymerase-chain-reaction-npcr/>
 78. Kuo, H.-W., Kasper, S., Jelovcan, S., Höger, G., Lederer, I., König, C., ... Schmid, D. (2009). A food-borne outbreak of *Shigella sonnei* gastroenteritis, Austria, 2008. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 121(3-4), 157–163. <https://doi.org/10.1007/s00508-008-1141-7>
 79. Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2015). Western Blotting: An Introduction. *Methods in Molecular Biology*, 1312, 17–30. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_5
 80. Lahti, E., Rehn, M., Ockborn, G., Hansson, I., Ågren, J., Engvall, E. O., & Jernberg, C. (2017). Outbreak of Campylobacteriosis Following a Dairy Farm Visit: Confirmation by Genotyping. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(6), 326–332. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2257>
 81. Lambertz, S. T., Nilsson, C., Hallanvuo, S., & Lindblad, M. (2008). Real-Time PCR Method for Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 6060–6067. <https://doi.org/10.1128/aem.00405-08>
 82. Lars Hagsholm Pedersen, Pernille Skouboe, Boysen, M., Soule, J., & Rossen, L. (1997). Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 35(2), 169–177. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(96\)01216-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01216-0)
 83. Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications,

- advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5(770). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>
84. Le, H. H. T., Dalsgaard, A., Andersen, P. S., Nguyen, H. M., Ta, Y. T., & Nguyen, T. T. (2021). Large-Scale *Staphylococcus aureus* Foodborne Disease Poisoning Outbreak among Primary School Children. *Microbiology Research*, 12(1), 43–52. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12010005>
 85. Leong, I. U. S., Skinner, J. R., & Love, D. R. (2014). Application of Massively Parallel Sequencing in the Clinical Diagnostic Testing of Inherited Cardiac Conditions. *Medical Sciences*, 2(2), 98–126. <https://doi.org/10.3390/medsci2020098>
 86. Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., ... Rubin, C. (2005). Aflatoxin Contamination of Commercial Maize Products during an Outbreak of Acute Aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, 113(12), 1763–1767. <https://doi.org/10.1289/ehp.7998>
 87. Li, X., Zhong, J., Li, H., Qiao, Y., Mao, X., Fan, H., ... Li, J. (2023). Advances in the application of CRISPR-Cas technology in rapid detection of pathogen nucleic acid. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1260883>
 88. Life Technologies - US. (n.d.). Retrieved from www.thermofisher.com website: <https://www.thermofisher.com/>
 89. Liu-Stratton, Y., Roy, S., & Sen, C. K. (2004). DNA microarray technology in nutraceutical and food safety. *Toxicology Letters*, 150(1), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.08.009>
 90. Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63(63). <https://doi.org/10.3791/3998>
 91. Lúquez, C., Edwards, L., Griffin, C., & Sobel, J. (2021). Foodborne Botulism Outbreaks in the United States, 2001–2017. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713101>
 92. Mao, X., Liu, C., Tong, H., Chen, Y., & Liu, K. (2019). Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *American Journal of Translational Research*, 11(12), 7209–7222. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6943456/>

93. Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47–51. <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>
94. Martinović, T., Andjelković, U., Gajdošik, M. Š., Rešetar, D., & Josić, D. (2016). Foodborne pathogens and their toxins. *Journal of Proteomics*, 147, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.029>
95. Märklbauer, E., & Granum, P. E. (2021). Bacillus cereus Toxins. *Toxins*, 13(5), 295. <https://doi.org/10.3390/toxins13050295>
96. Mattison, K. (2011, January 1). Chapter 1 - Norovirus as a Foodborne Disease Hazard (S. L. Taylor, Ed.). Retrieved from ScienceDirect website: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123859891000016?via%3Dihub>
97. McDowell, R. H., Sands, E. M., & Friedman, H. (2021, September 16). [Figure, B. Cereus rods. Contributed by Frederick C. Michel, ASM]. Retrieved from [www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/figure/article-18086.image.f1/) website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/figure/article-18086.image.f1/>
98. McGinnis, M. R., & Tying, S. K. (1996). Introduction to Mycology. Retrieved from Nih.gov website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8125/>
99. Meftahi, G. H., Bahari, Z., Zarei Mahmoudabadi, A., Iman, M., & Jangravi, Z. (2021). Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(4). <https://doi.org/10.1002/bmb.21516>
100. Mellou, K., Kyritsi, M., Chrysostomou, A., Sideroglou, T., Georgakopoulou, T., & Hadjichristodoulou, C. (2019). Clostridium perfringens Foodborne Outbreak during an Athletic Event in Northern Greece, June 2019. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(20). <https://doi.org/10.3390/ijerph16203967>
101. Mestrovic, T. (2017, May 26). DNA microarray. Retrieved from News-Medical.net website: <https://www.news-medical.net/life-sciences/DNA-microarray.aspx>
102. Morley, A. A. (2014). Digital PCR: A brief history. *Biomolecular Detection and Quantification*, 1(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.06.001>
103. Mueller, M., & Tainter, C. R. (2023). Escherichia Coli Infection. Retrieved

- from PubMed website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
104. Muhammad Aziz, & Waheed, A. (2019, June 4). *Yersinia Enterocolitica*. Retrieved from Nih.gov website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499837/>
105. NASBA Technology: An overview. (n.d.). Retrieved from www.premierbiosoft.com website: https://www.premierbiosoft.com/tech_notes/NASBA.html
106. National Cancer Institute. (2015). Aflatoxins. Retrieved from National Cancer Institute website: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/substances/aflatoxins>
107. National Human Genome Research Institute. (2023). Western Blot. Retrieved from Genome.gov website: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Western-Blot>
108. Neidler, S. (2017, March). What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR? Retrieved from www.enzolifesciences.com website: <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr?/>
109. Nemes, K., Persson, S., & Simonsson, M. (2023). Hepatitis A Virus and Hepatitis E Virus as Food- and Waterborne Pathogens—Transmission Routes and Methods for Detection in Food. *Viruses*, 15(8), 1725. <https://doi.org/10.3390/v15081725>
110. Notermans, S., & Hoogenboom-Verdegaal, A. (1992). Existing and emerging foodborne diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 15(3-4), 197–205. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90049-9](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90049-9)
111. Nutrition, C. for F. S. and A. (2019b). Hepatitis A Virus (HAV). *FDA*. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/hepatitis-virus-hav>
112. Nutrition, C. for F. S. and A. (2019c). Listeria from Food Safety for Moms to Be. *FDA*. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/health-educators/listeria-food-safety-moms-be>
113. Nutrition, C. for F. S. and A. (2020b). BAM Chapter 14: *Bacillus cereus*. *FDA*. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-14-bacillus-cereus>
114. Ochratoxin A in food: public health risks assessed. (2020, May 13). Retrieved

- from European Food Safety Authority website:
<https://www.efsa.europa.eu/en/news/ochratoxin-food-public-health-risks-assessed>
115. Ortega, Y. R., Sterling, C. R., & Gilman, R. H. (1998, January 1). *Cyclospora cayetanensis* (S. Tzipori, Ed.). Retrieved from ScienceDirect website:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065308X08601281?via%3Dihub>
116. Pakbin, B., Brück, W. M., & Brück, T. B. (2023). Molecular Mechanisms of Shigella Pathogenesis; Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2448. <https://doi.org/10.3390/ijms24032448>
117. Parasites and Foodborne Illness | Food Safety and Inspection Service. (2023). Retrieved from Usda.gov website: <https://www.fsis.usda.gov/food-safety/foodborne-illness-and-disease/pathogens/parasites-and-foodborne-illness#4>
118. Penicillium - an overview | ScienceDirect Topics. (n.d.). Retrieved from www.sciencedirect.com website: <https://www.sciencedirect.com/topics/food-science/penicillium>
119. Perrone, G., & Susca, A. (2016). Penicillium Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods in Molecular Biology*, 107–119. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_5
120. Petzinger, E., & Ziegler, K. (2000). *Ochratoxin A from a toxicological perspective*. 23(2), 91–98. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2000.00244.x>
121. Prevent Illness from C. perfringens. (2017, November 22). Retrieved from FoodSafety.gov website: <https://www.foodsafety.gov/blog/prevent-illness-c-perfringens>
122. Priyanka, B., Patil, R. K., & Dwarakanath, S. (2016). A review on detection methods used for foodborne pathogens. *The Indian Journal of Medical Research*, 144(3), 327–338. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.198677>
123. Quan, P.-L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/s18041271>
124. Rawla, P., & Sharma, S. (2019, November 13). Trichinella Spiralis (Trichinellosis). Retrieved from Nih.gov website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538511/>
125. Reaz Mohammad Mazumdar, Chowdhury, A., Bin, S., B. Dhaka, & Md., F. (2012). *NUCLEIC ACID SEQUENCE BASED AMPLIFICATION (NASBA)-*

PROSPECTS AND APPLICATIONS.

126. Rentschler, S., Kaiser, L., & Deigner, H.-P. (2021). Emerging Options for the Diagnosis of Bacterial Infections and the Characterization of Antimicrobial Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 456. <https://doi.org/10.3390/ijms22010456>
127. Rogalla, D., & Bomar, P. A. (2019, April 3). *Listeria Monocytogenes*. Retrieved from Nih.gov website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534838/>
128. Roshan Kumar Sharma, Jalalpure, S. S., Pathak, S., Ganapathy, S., Mickaël Desvaux, Roy, S., & Hegde, S. (2024). Molecular detection of *Listeria monocytogenes* from different dairy and street food sources in North Karnataka, India. *Journal of Infection and Public Health*. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2024.02.014>
129. Salmonella Questions and Answers | Food Safety and Inspection Service. (2012). Retrieved from Usda.gov website: <https://www.fsis.usda.gov/food-safety/foodborne-illness-and-disease/illnesses-and-pathogens/salmonella-questions-and-answers>
130. Sandwich ELISA: Overview & Applications. (n.d.). Retrieved from www.excedr.com website: <https://www.excedr.com/resources/sandwich-elisa>
131. Sattar, S. A., Jason, T., Bidawid, S., & Farber, J. (2000). Foodborne spread of hepatitis A: Recent studies on virus survival, transfer and inactivation. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*, 11(3), 159–163. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2094762/>
132. Schneider, K. R., Goodrich, R. M., Mahovic, M. J., & Shukla, R. (2019). Preventing Foodborne Illness: Shigellosis. *EDIS*, 2005(12). <https://doi.org/10.32473/edis-fs128-2005>
133. Schroeder, K. (2022, April 19). A History of Sequencing. Retrieved from Front Line Genomics website: <https://frontlinegenomics.com/a-history-of-sequencing/>
134. Schwenninger, S. M., Meile, L., & Lacroix, C. (2011, January 1). 2 - Antifungal lactic acid bacteria and propionibacteria for food biopreservation (C. Lacroix, Ed.). Retrieved from ScienceDirect website: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B97818456966696500029>
135. Shields, J. M., & Olson, B. H. (2003). *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasitic coccidian. *International Journal for Parasitology*, 33(4), 371–

391. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00268-0)
136. Σκορίλας, Α. (2020). *Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική, Βασικές Αρχές* (1η ed.). Broken Hill Publishers Ltd.
137. Slana, I., Bier, N., Bartosova, B., Marucci, G., Possenti, A., Mayer-Scholl, A., ... Lalle, M. (2021). Molecular Methods for the Detection of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Fresh Produce: An Extensive Review. *Microorganisms*, 9(1), 167. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010167>
138. SMITH, A. J., MCCARTHY, N., SALDANA, L., IHEKWEAZU, C., MCPHEDRAN, K., ADAK, G. K., ... O'MOORE, É. (2011). A large foodborne outbreak of norovirus in diners at a restaurant in England between January and February 2009. *Epidemiology and Infection*, 140(9), 1695–1701. <https://doi.org/10.1017/s0950268811002305>
139. Smith, M. (2023). CRISPR. Retrieved from Genome.gov website: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/CRISPR>
140. Sreedharan, A., Jones, C., & Schneider, K. R. (2012). Preventing Foodborne Illness: Yersiniosis. *EDIS*, 2012(8). <https://doi.org/10.32473/edis-fs193-2012>
141. Suo, Y., Yin, W., Zhu, Q., Wu, W., Cao, W., & Mu, Y. (2022). A Specific and Sensitive Aptamer-Based Digital PCR Chip for *Salmonella typhimurium* Detection. *Biosensors*, 12(7), 458. <https://doi.org/10.3390/bios12070458>
142. Συστάσεις του ΕΟΔΥ για πρόληψη τροφιμογενών/υδατογενών νοσημάτων σε περίπτωση συγχρωτισμού πλημυροπαθών σε χώρους φιλοξενίας - Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. (2023, September 11). Retrieved from Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας website: <https://eody.gov.gr/systaseis-toy-eody-gia-prolipsi-trofimogenon-ydatogenon-nosimatou-se-periptosi-syngchrotismoy-plimmyropathon-se-choroys-filoxenias/>
143. Tada, K., Suzuki, H., Sato, Y., Morishima, Y., Nagano, I., Ishioka, H., & Gomi, H. (2018). Outbreak of *Trichinella* T9 Infections Associated with Consumption of Bear Meat, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 24(8), 1532–1535. <https://doi.org/10.3201/eid2408.172117>
144. Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2019, March 27). [Figure, Gram stain of *Staphylococcus aureus*. Contributed by Scott Jones, MD]. Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/figure/article-29453.image.f1/>

145. Top 5 foodborne pathogens cost the U.S. economy \$14 billion each year. (n.d.). Retrieved from [www.ers.usda.gov](https://www.ers.usda.gov/data-products/chart-gallery/gallery/chart-detail/?chartId=78325) website: <https://www.ers.usda.gov/data-products/chart-gallery/gallery/chart-detail/?chartId=78325>
146. Τροφιμογενή Νοσήματα. (n.d.). Retrieved from Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας website: <https://eody.gov.gr/cat-disease/trofimogeni-nosimata/>
147. Tytgat, O. (2022). Bringing Science to the Scene: Novel strategies for portable DNA profiling. Retrieved January 2022, from Researchgate website: https://www.researchgate.net/publication/362991666_Bringing_Science_to_the_Scene_Novel_strategies_for_portable_DNA_profiling#fullTextFileContent
148. USDA. (2012). Clostridium botulinum & Botulism | Food Safety and Inspection Service. Retrieved from [Usda.gov](https://www.fsis.usda.gov/food-safety/foodborne-illness-and-disease/pathogens/clostridium-botulinum) website: <https://www.fsis.usda.gov/food-safety/foodborne-illness-and-disease/pathogens/clostridium-botulinum>
149. USDA. (2013, August 22). Molds on Food: Are They Dangerous? | Food Safety and Inspection Service. Retrieved from www.fsis.usda.gov website: <https://www.fsis.usda.gov/food-safety/safe-food-handling-and-preparation/food-safety-basics/molds-food-are-they-dangerous>
150. Vidic, J., Manzano, M., Chang, C.-M., & Jaffrezic-Renault, N. (2017). Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. *Veterinary Research*, 48(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0418-5>
151. Wang, J., Katani, R., Li, L., Hegde, N., Roberts, E., Kapur, V., & DebRoy, C. (2016). Rapid Detection of Escherichia coli O157 and Shiga Toxins by Lateral Flow Immunoassays. *Toxins*, 8(4), 92. <https://doi.org/10.3390/toxins8040092>
152. Weiman, S., & Fox, J. (2015a). Figure 3. Scanning electron micrograph of *Listeria monocytogenes*. Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519801/figure/fig3/>
153. Weiman, S., & Fox, J. (2015b). Figure 4. Clostridium botulinum exemplifying spore formation. Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519801/figure/fig4/>
154. Weiman, S., & Fox, J. (2015c). Figure 5. Gram stain of *Salmonella typhimurium*. Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519801/figure/fig5/>
155. WHO. (2022, April 27). Multi-country outbreak of *Salmonella* Typhimurium linked to chocolate products – Europe and the United States of America. Retrieved

from www.who.int website: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON369>

156. Więckowska, M., Szelenberger, R., Niemcewicz, M., Harmata, P., Poplawski, T., & Bijak, M. (2023). Ochratoxin A-The Current Knowledge Concerning Hepatotoxicity, Mode of Action and Possible Prevention. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(18), 6617. <https://doi.org/10.3390/molecules28186617>
157. World Health Organization. (2023, October 2). Mycotoxins. Retrieved from Who.int website: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
158. Wu, S., Duan, N., Gu, H., Hao, L., Ye, H., Gong, W., & Wang, Z. (2016). A Review of the Methods for Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxins. *Toxins*, 8(7), 176. <https://doi.org/10.3390/toxins8070176>
159. Yao, P., & Annamaraju, P. (2023, August 8). Clostridium Perfringens. Retrieved from PubMed website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559049/>
160. Yu, T., Xu, H., Zhao, Y., Han, Y., Zhang, Y., Zhang, J., ... Ge, J. (2020). Aptamer based high throughput colorimetric biosensor for detection of staphylococcus aureus. *Scientific Reports*, 10(1), 9190. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66105-7>
161. Yuan, B., Yuan, C., Li, L., Long, M., & Chen, Z. (2022). Application of the CRISPR/Cas System in Pathogen Detection: A Review. *Molecules*, 27(20), 6999. <https://doi.org/10.3390/molecules27206999>
162. Zeng, D., Jiao, J., & Mo, T. (2024). Combination of nucleic acid amplification and CRISPR/Cas technology in pathogen detection. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1355234>
163. Zhang, M., Wu, J., Shi, Z., Cao, A., Fang, W., Yan, D., ... Li, Y. (2022). *Molecular Methods for Identification and Quantification of Foodborne Pathogens*. 27(23), 8262–8262. <https://doi.org/10.3390/molecules27238262>
164. Zhao, X., Lin, C.-W., Wang, J., & Oh, D. H. (2014). Advances in Rapid Detection Methods for Foodborne Pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 297–312. <https://doi.org/10.4014/jmb.1310.10013>
165. Zhu, Q., Gooneratne, R., & Hussain, M. (2017). Listeria monocytogenes in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods*, 6(3), 21. <https://doi.org/10.3390/foods6030021>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

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