



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας
«Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση»

Διπλωματική Εργασία

Χρήση μοριακών τεχνικών στον προσδιορισμό παθογόνων
μικροοργανισμών σε τρόφιμα

ΚΥΡΙΑΚΗ ΣΤΕΙΚΑΚΗ

Επιβλέπων καθηγητής: ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΜΠΑΚΕΑΣ

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας (Στειακάκη Κυριακή) 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.



Χρήση μοριακών τεχνικών στον προσδιορισμό παθογόνων
μικροοργανισμών σε τρόφιμα

ΚΥΡΙΑΚΗ ΣΤΕΙΑΚΑΚΗ

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ευάγγελος Μπακέας

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Κωνσταντίνος Τσιαφούλης

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

Ευχαριστίες

Όταν ξεκίνησα τη φοίτηση μου στο μεταπτυχιακό αυτό πρόγραμμα το Μάρτιο του 2021 ούτε η ίδια δεν μπορούσα να φανταστώ τι θα συνέβαινε όλα αυτά τα χρόνια. Από την εγκυμοσύνη σχεδόν ταυτόχρονα με την αρχή του προγράμματος, τις εξ αποστάσεως συναντήσεις κατά τη διάρκεια των εξαμήνων πάντα αγκαλιά με το γιό μου, τις εργαστηριακές ασκήσεις στην Πάτρα που ερχόμουν με το γιό μου έως και τη μεταμεσονύκτια συγγραφή αυτής εδώ της διατριβής έπειτα από πολλές ώρες δουλειάς. Ήταν πολλές οι φορές που πίστεψα ότι δεν θα μπορούσα να ολοκληρώσω τις σπουδές μου, αλλά πάντα αυτές τις στιγμές έπαιρνα θάρρος και κουράγιο από ανθρώπους που πίστεψαν σε εμένα και γινόμενι πιο δυνατή.

Σε όλους αυτούς τους ανθρώπους χρωστάω ένα τεράστιο ευχαριστώ που πίστεψαν σε εμένα. Είναι τόσοι πολλοί για να τους αναφέρω όλους και φοβάμαι ότι θα πλατειάσω πολύ, αλλά κάποιον αξίζουν να αναφερθούν. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και ένα μεγάλο Σ 'αγαπώ στον άντρα μου που ανέχτηκε τα νεύρα, την κούραση μου, την αυπνία μου και πάντα ήταν φάρος για μένα σε όλες τις εύκολες και δύσκολες στιγμές αυτών των χρόνων. Τους γονείς μου που από τη μέρα που γεννήθηκα πάντα με στήριζαν σε ότι και αν αποφάσιζα και αυτό έκαναν και τώρα, ιδιαίτερα στη μητέρα μου που άφηνε τα πάντα για να έρθει μαζί μου στην Πάτρα να προσέχει το γιο μου όσο παρακολουθούσα τις εργαστηριακές ασκήσεις, χωρίς εσένα δεν θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί. Στους φίλους μου, οι οποίοι ήξεραν με λίγες λέξεις να μου αναπτρώνουν το ηθικό. Και τέλος, το γιό μου, την αρχή των πάντων, που όσο και αν δυσκολεύτηκα από αυτόν έπαιρνα και το μεγαλύτερο θάρρος και κουράγιο για... λίγο ακόμα και φτάνουμε στο τέλος.

Δεν θα μπορούσα βεβαίως να παραλείψω και τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μπακέα Ευάγγελο για την συμπαράσταση και την καθοδήγησή του παρόλο που τον παίδεψα λιγάκι. Σας ευχαριστώ πολύ.

Και όπως είχε πει ο Νίκος Καζαντζάκης...

«Η φυγή δεν είναι νίκη...

Το όνειρο είναι τεμπελιά...

Μόνο το έργο μπορεί να χορτάσει την ψυχή και να σώσει τον κόσμο...»

«ΦΤΑΣΕ ΟΠΟΥ ΔΕΝ ΜΠΟΡΕΙΣ...»

Στο αίμα από το αίμα μου...
Στη σάρκα από τη σάρκα μου...
Στην αρχή των πάντων...
Στο γιο μου Αντώνη...

Περίληψη

Με τον όρο τρόφιμο ορίζεται οποιαδήποτε ουσία ή υλικό το οποίο είτε χρησιμοποιείται αυτούσιο είτε έπειτα από επεξεργασία για την διατροφή του ανθρώπου. Τα τρόφιμα διαχωρίζονται αρχικά σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα φυτικής και τα ζωικής προέλευσης. Στην κατηγορία των φυτικών τροφίμων περιλαμβάνονται οι καρποί, τα φύλλα κ.α και στα ζωικά, το κρέας, τα αυγά, το γάλα κ.α. Μπορούν ακόμα να διαχωριστούν με βάση την επεξεργασία τους ως νωπά, μεταποιημένα ή συντηρημένα τρόφιμα. Η ύπαρξη ή μη του κινδύνου για την δημόσια υγεία του ανθρώπου από την κατανάλωση ενός τροφίμου αναφέρεται στον όρο ασφάλεια τροφίμων. Η ασφάλεια τροφίμων αναφέρεται σε επιμόλυνση τροφίμων από τοξικές ουσίες, μικροοργανισμούς ή ύπαρξη ξένων σωμάτων. Οποιαδήποτε ασθένεια προκύπτει από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων καλείται τροφιμογενής ασθένεια ή λοίμωξη.

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί αύξηση της συχνότητας των τροφιμογενών ασθενειών σε παγκόσμιο επίπεδο που οφείλονται σε παθογόνους μικροοργανισμούς και γι' αυτό το λόγο έχει σχεδιαστεί η βελτίωση των συστημάτων ελέγχου τροφίμων για την ασφαλέστερη παραγωγή και διάθεση των τροφίμων καθώς και την μείωση των τροφολοιμώξεων. Παθογόνοι μικροοργανισμοί ονομάζονται όλοι οι μικροοργανισμοί οι οποίοι χρησιμοποιούνται ξενιστή έναν άλλο μικροοργανισμό όπου του προκαλεί αλλαγές στην ομοιόσταση του. Ανάμεσα στους κυριότερους παθογόνους μικροοργανισμούς βρίσκονται η *Listeria monocytogenes*, η *Salmonella spp.*, το *Campylobacter spp.* και ο *Staphylococcus aureus* οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν πολύ σοβαρές ασθένειες στον άνθρωπο και σε κάποιες περιπτώσεις και μη αναστρέψιμες. Για αυτούς του λόγους έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ανίχνευσης και καταμέτρησης μικροοργανισμών είτε αυτές βασίζονται σε κλασικές μεθόδους καλλιέργειας μικροοργανισμών σε θρεπτικά υποστρώματα είτε σε νέες μοριακές μεθόδους ταχείας και ορθής ανίχνευσης, όπως μέθοδοι ενίσχυσης με βάση το νουκλεϊκό οξύ, είτε ανοσολογικές μέθοδοι ή με βιοαισθητήρες. Όλες αυτές οι τεχνικές βοηθούν στην έγκαιρη ανίχνευση μικροβιακών φορτίων με αποτέλεσμα την έγκαιρη και αποτελεσματική πρόληψη των μολύνσεων άρα και την διασφάλιση της δημόσιας υγείας.

Λέξεις κλειδιά: Τρόφιμα, τροφολοιμώξη, τροφιμογενείς ασθένειες, ασφάλεια τροφίμων, βακτηριακή καλλιέργεια, μικροοργανισμός, παθογόνοι μικροοργανισμοί, μέθοδοι ανίχνευσης, μέθοδοι καταμέτρησης, μοριακός προσδιορισμός

Abstract

The term food is defined as any substance or material that is either used as is or after processing for human nutrition. Food is initially divided into two large categories, those of plant and animal origin. The category of plant foods includes fruits, leaves, etc. and those of animal origin include meat, eggs, milk, etc. They can also be divided based on their processing as fresh, processed or preserved foods. The existence or not of a risk to human public health from the consumption of a food is referred to as food safety. Food safety refers to the contamination of food by toxic substances, microorganisms or the presence of foreign bodies. Any disease resulting from the consumption of contaminated food is called a foodborne disease or infection. In recent years, there has been an increase in the frequency of foodborne diseases worldwide due to pathogenic microorganisms and for this reason, the improvement of food control systems has been planned for the safer production and distribution of food as well as the reduction of foodborne infections. Pathogenic microorganisms are all microorganisms that are used as a host for another microorganism and cause changes in its homeostasis. Among the main pathogenic microorganisms are *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* and *Staphylococcus aureus*, which can cause very serious diseases in humans and in some cases irreversible. For these reasons, methods for detecting and counting microorganisms have been developed, whether they are based on classical methods of culturing microorganisms on nutrient substrates or on new molecular methods of rapid and accurate detection, such as nucleic acid-based amplification methods, or immunological methods or biosensors. All these techniques help in the early detection of microbial loads, resulting in the timely and effective prevention of infections and thus ensuring public health.

Key words: Food, food contamination, foodborne diseases, food safety, bacterial culture, microorganism, pathogenic microorganisms, detection methods, counting methods, molecular identification

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	6
Abstract	7
Κατάλογος Εικόνων	9
Κατάλογος Πινάκων	10
Κατάλογος Σχεδιαγραμμάτων	11
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια	12
ΣΚΟΠΟΣ.....	14
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο - ΤΡΟΦΙΜΑ.....	16
1.1 Μικροοργανισμοί.....	17
1.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	24
1.3 Παγκόσμια δεδομένα νόσησης	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο - ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο - ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ	33
3.1 Ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβης βρόγχου (LAMP)	34
3.2 Απλή PCR	34
3.3 Multiplex PCR	35
3.4 Real-time PCR	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο - <i>Listeria monocytogenes</i>	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο – <i>Salmonella spp.</i>	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο - <i>Campylobacter spp.</i>	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο - <i>Staphylococcus aureus</i>	96
ΕΠΙΛΟΓΟΣ	106
Βιβλιογραφία	107

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Διάφοροι τύποι κόκκων (Adobe)	19
Εικόνα 2. Βάκιλοι (Bird, 2019).....	19
Εικόνα 3. Σπόρια (Team, 2023).....	20
Εικόνα 4. Δομή βακτηριακού κυττάρου (depositphotos).....	20
Εικόνα 5. Βήματα που απαιτούνται για τη μελέτη επιβάρυνσης τροφιμογενών λοιμώξεων (WHO, 2021)	29
Εικόνα 6. Αναμενόμενα χρόνια ζωής που χάνονται ανάλογα την ηλικία (WHO, 2021).....	29
Εικόνα 7. Καμπύλη ανάπτυξης βακτηρίων (Αρβανιτίδου-Βαγιωνά, 2017).....	32
Εικόνα 8. Απεικόνιση <i>Listeria monocytogenes</i> (Paul Sakkal, 2019).....	40
Εικόνα 9. Απεικόνιση τρυβλίου ALOA με χαρακτηριστικές αποικίες <i>Listeria monocytogenes</i> χρώματος μπλε - πράσινο με άλω γύρω από αυτές. (Boyer, 2021)	49
Εικόνα 10. Απεικόνιση τρυβλίου LP με χαρακτηριστικές αποικίες <i>Listeria monocytogenes</i> χρώματος μαύρου με άλω γύρω από αυτές (Labs)	50
Εικόνα 11. Διαδικασία ανίχνευσης <i>L.monocytogenes</i> με στρατηγική Amp-MBs-qPCR (Xuekun Bai, 2022)	55
Εικόνα 12. Απεικόνιση <i>Salmonella</i> spp. (Schell, 2020).....	61
Εικόνα 13. Απεικόνιση θετικών αποικιών <i>Salmonella</i> spp. σε τρυβλίο XLD. (Ltd).....	70
Εικόνα 14. Απεικόνιση θετικών αποικιών <i>Salmonella</i> spp. σε τρυβλίο Compass <i>Salmonella</i> . (EUROLAB).....	70
Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση τεχνικής PCR. (Nodali Ndraha, 2023)	74
Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής LAMP. (Nodali Ndraha, 2023).....	77
Εικόνα 17. Απεικόνιση <i>Campylobacter</i> spp. (Microbiology, 2019)	82
Εικόνα 18. Απεικόνιση θετικών αποικιών <i>Campylobacter</i> spp. σε τρυβλίο mCCD agar. (EOLabs)	89
Εικόνα 19. Απεικόνιση θετικών αποικιών <i>Campylobacter</i> spp. σε τρυβλίο Columbia blood agar. (LabM)	89
Εικόνα 20. Απεικόνιση <i>Staphylococcus aureus</i> . (Otter, 2012).....	97
Εικόνα 21. Απεικόνιση θετικών αποικιών <i>Staphylococcus aureus</i> σε τρυβλίο Baird Parker. (Hub)	101

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης μικροοργανισμών	21
Πίνακας 2. Μέθοδοι καταστροφής μικροοργανισμών	22
Πίνακας 3. Μέθοδοι αναστολής ή επιβράδυνσης δράσης μικροοργανισμών	23
Πίνακας 4. Εύρη τιμών pH που αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί.....	24
Πίνακας 5. Τα σημαντικότερα παθογόνα και οι ασθένειες που προκαλούν	25
Πίνακας 6. Πηγές προέλευσης, συμπτώματα και τρόφιμα με υψηλή επικινδυνότητα για εμφάνιση ασθενειών από μικροοργανισμούς.....	26
Πίνακας 7. Σύγκριση τεχνικών για ανίχνευση παθογόνων σε τρόφιμα.....	39
Πίνακας 8. Επικινδυνότητα νόσησης με λιστερίωση ανά 100.000 πληθυσμό ετησίως	41
Πίνακας 9. Τροφές με υψηλή και χαμηλή επικινδυνότητα μόλυνσης από το βακτήριο <i>Listeria monocytogenes</i>	42
Πίνακας 10. Αποδεκτά μικροβιολογικά όρια εμφάνισης <i>Listeria monocytogenes</i> ανά κατηγορία τροφίμου.....	43
Πίνακας 11. Συγκριτικές αντιδράσεις σε τρία είδη <i>Listeria</i>	49
Πίνακας 12. Γονίδια - στόχοι και εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της <i>Listeria monocytogenes</i> ορότυπου 4c	57
Πίνακας 13. Αποδεκτά μικροβιολογικά όρια παρουσίας <i>Salmonella</i> ανά κατηγορία τροφίμου	66
Πίνακας 14. Αποδεκτά μικροβιολογικά όρια παρουσίας <i>Salmonella</i> ανά κατηγορία τροφίμου και μέτρα αντιμετώπισης.....	67
Πίνακας 15. Αποδεκτά μικροβιολογικά όρια για <i>Campylobacter</i> spp. και μέτρα αντιμετώπισης	81
Πίνακας 16. Αποδεκτά μικροβιολογικά όρια για το <i>Staphylococcus aureus</i> θετικό στην πηκτάση ανά κατηγορία τροφίμου και μέτρα αντιμετώπισης	99

Κατάλογος Σχεδιαγραμμάτων

Σχεδιάγραμμα 1. Σχηματική απεικόνιση ανίχνευσης και καταμέτρησης <i>Listeria monocytogenes</i>	45
Σχεδιάγραμμα 2. Τρυβλίο Blood agar σχεδιασμένο για τη διαδικασία CAMP.....	46
Σχεδιάγραμμα 3. Τρυβλίο Blood agar μετά το πέρας της επώασης του	47
Σχεδιάγραμμα 4. Διαδικασία προσδιορισμού και επιβεβαίωσης <i>Listeria monocytogenes</i> ...	48
Σχεδιάγραμμα 5. Διαδικασία παρασκευής Amp - MB	53
Σχεδιάγραμμα 6. Γενικά βήματα ανίχνευσης <i>Salmonella</i> spp.	68
Σχεδιάγραμμα 7. Διαδικασία προσδιορισμού και επιβεβαίωσης <i>Salmonella</i> spp.	72
Σχεδιάγραμμα 8. Διαδικασία Α ανίχνευσης και επιβεβαίωσης <i>Campylobacter</i> spp.	84
Σχεδιάγραμμα 9. Διαδικασία Β ανίχνευσης και επιβεβαίωσης <i>Campylobacter</i> spp.....	86
Σχεδιάγραμμα 10. Διαδικασία Γ ανίχνευσης και επιβεβαίωσης <i>Campylobacter</i> spp.	88
Σχεδιάγραμμα 11. Διαδικασία καταμέτρησης και επιβεβαίωσης <i>Campylobacter</i> spp.	91
Σχεδιάγραμμα 12. Διαδικασία καταμέτρησης και επιβεβαίωσης <i>Staphylococcus aureus</i> ..	100

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ/ ΑΚΡΩΝΥΜΙΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΗΜΑΣΙΑ
PCR	Polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Ενζυμικός ανοσοπροσοφτικός προσδιορισμός
ΠΟΥ /WHO DAILYs	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας Χαμένα χρόνια υγιούς ζωής λόγω κακής υγείας και πρόωρου θανάτου
SEYLL	Standard expected years of life lost	Τυπικά αναμενόμενα χρόνια ζωής που χάθηκαν
ISO	International Organization for Standardization	Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης
CFU	Colony Forming Unit	Μονάδα σχηματισμού αποικιών
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	Ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόγχου
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
FIP	Forward inner primer	Μπροστά εκκινητής
BIP	Backward inner primer	Πίσω εκκινητής
LHF	Listeria Half Fraser	Μισή βάση ζωμού λιστέριας
FF	Full Fraser	Πλήρης ζωμός λιστέριας
ALOA	Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti	Θρεπτικό υπόστρωμα λιστέριας
LP	Listeria Palcam	Θρεπτικό υπόστρωμα λιστέριας
TSYEA	Tryptone Yeast Soya Extract Agar	Άγαρ εκχυλίσματος μαγιάς σόγιας τρυπτονίου
MS	Magnetic Separation	Μαγνητικός διαχωρισμός
MBs	Magnetic Beads	Μαγνητικά σφαιρίδια
Amp	Ampicillin	Αμπικιλίνη
BHI	Brain Heart Infusion	Ζωμός έγχυσης εγκεφαλικής καρδιάς
EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride	Υδροχλωρικό N- (3-διμεθυλαμινοπροπολ) –N' – αιθυλοκαρβοδιιμίδιο
NHSS	N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt	Άλας νατρίου N-υδροξυσουλφοηλεκτριμιδίου
MES		Ρυθμιστικό διάλυμα
HCl	Hydrochloric acid	Υδροχλωρικό οξύ
PBS		Αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	Βασικό εργαλείο αναζήτησης τοπικής ευθυγράμμισης
POT	Point-of-test	Συσκευή δοκιμής σημείου

LOD	Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης
BPW	Buffer Peptone Water	Ρυθμιστικό διάλυμα πεπτόνης
MKTT	Muller – Kauffmann tetrathionate – novobiocin broth	Εμπλουτιστικός ζωμός
RVS	Rappaport – Vassiliadis medium with soya	Εκλεκτικό υπόστρωμα με σόγια
XLD	Xylose Kysine Deoxycholate	Εκλεκτικό υπόστρωμα ξυλόζης δεοξυχλωρικής κυσίνης
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση γέλης παλμικού πεδίου
MLST	Multilocus sequence typing	Τυποποίηση αλληλουχίας πολλαπλών θέσεων
WGS	Whole Genome Sequencing	Αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	Συγκεντρωμένες σε τακτικά διαστήματα σύντομες παλινδρομικές επαναλήψεις
Cas	Capillary Electrophoresis	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση
CE		
Mag-Cds		
IMS	Immunomagnetic separation	Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός
mCCD	Modified charcoal cefoperazone deoxycholate	Τροποποιημένος άνθρακας δεοξυχολική κεφοπεραζόνη
BP	Baird Parker	Εκλεκτικό υπόστρωμα
FAS	Hexamethylenetetramine Carbon Nanosheets	Θεικό αμμώνιο σιδήρου (II)
HMT		Εξαμεθυλενοτετραμίνη
CNS		Νανόφυλλα άνθρακα
SPCE	Nitrogen-Phosphorus-Sulfur	Διάλυμα μελανού
NPS		Διάλυμα αζώτου, φωσφόρου και θείου
EDS		Υδροχλωρικό 1-αιθυλ-3-[3- διμεθυλαμινοπροπυλ] καρβοδιιμιδίου
SFPO		Τροφικές δηλητηριάσεις από σταφυλόκοκκο
PCA	Plate Count Agar	Άγαρ μέτρησης πλακών

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας ήταν η συγκριτική μελέτη κλασικών μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών σε σχέση με τις καινοτόμες και ολοένα αναπτυσσόμενες μοριακές μεθόδους ανίχνευσης. Οι νέες αυτές τεχνικές κρίνονται πλέον απαραίτητες έτσι ώστε να προφυλαχθεί η δημόσια υγεία και να αποφευχθούν ή έστω να μειωθούν οι τροφιμογενείς λοιμώξεις οι οποίες είναι αρκετά διαδεδομένες σε παγκόσμιο επίπεδο.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για την συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε εκτενής βιβλιογραφική μελέτη από επιστημονικές πηγές με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων Pubmed και Scopus καθώς και από διεθνή πρότυπα όπως το ISO, από δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και από τον Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2023. Για την έρευνα χρησιμοποιήθηκαν οι λέξεις – κλειδιά που έχουν αναφερθεί (τρόφιμα, τροφολοίμωξη, τροφιμογενείς ασθένειες, ασφάλεια τροφίμων, βακτηριακή καλλιέργεια, μικροοργανισμός, παθογόνοι μικροοργανισμοί, μέθοδοι ανίχνευσης, μέθοδοι καταμέτρησης, μοριακός προσδιορισμός) έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί μία πιο στοχευμένη αναζήτηση.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ευρεία κατανάλωση και η τεράστια παραγωγή τροφής ανά τον κόσμο καθώς και οι μέθοδοι συντήρησης των τροφίμων είναι δυνατό να οδηγήσουν σε αλλοιώσεις στα τρόφιμα οι οποίες προέρχονται αρκετές φορές από βακτηριακούς παράγοντες ή από ιούς, παράσιτα ή ακόμα και τοξίνες. Αυτοί οι παράγοντες συχνά οδηγούν σε λοιμώξεις που ονομάζονται τροφιμογενείς ή τροφολοιμώξεις. Ως παθογόνα ονομάζονται όλα τα μικρόβια τα οποία χρησιμοποιούν ως ξενιστή έναν άλλο οργανισμό όπου του προκαλεί αλλαγές στην ομοιόσταση του και μπορούν να προκαλέσουν νόσο. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς και ιούς.

Όταν ένα παθογόνο εισέλθει στον οργανισμό προκαλεί μόλυνση του και η εγκατάσταση του καθώς και ο πολλαπλασιασμός του επιφέρει τη λοίμωξη. Ένα παθογόνο μπορεί να εισέλθει στον οργανισμό μέσω της λήψης τροφής από ωμά ή κακώς μαγειρεμένα κρέατα, από λαχανικά τα οποία δεν έχουν πλυθεί επαρκώς ή ακόμα και από λάθη κατά την προετοιμασία του φαγητού όπως είναι ένα γυμνό μολυσμένο χέρι το οποίο έχει αμυχές. Για την αποφυγή της μόλυνσης από παθογόνους μικροοργανισμούς κρίνονται αναγκαίοι οι κανόνες υγιεινής και ασφάλειας από την παραγωγή τους έως και την κατανάλωση τους. Με την πάροδο των ετών για την ανίχνευση των παθογόνων έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι. Η πρώτη και η βάση όλων των τεχνικών είναι η κλασική μικροβιολογία και πιο συγκεκριμένα η καλλιέργεια τους. Εν συνεχεία αναπτύχθηκαν αρκετές τεχνικές όπως είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή ο ενζυμικός ανοσοπροσροφτικός προσδιορισμός (ELISA) καθώς και πλήθος πολλών άλλων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^Ο - ΤΡΟΦΙΜΑ

Ως τρόφιμα καλούνται όλα τα προϊόντα πρωτογενούς παραγωγής ή προϊόντα που προέρχονται από αυτά μετά από επεξεργασία τα οποία μπορεί να καταναλώσει ο άνθρωπος. Τα τρόφιμα όταν μεταβολισθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό παρέχουν σε αυτόν θρεπτικά συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα για την υγεία του. (Μπλούκας, 2004)

Τα προϊόντα της πρωτογενούς παραγωγής χαρακτηρίζονται ως ωμά ή φρέσκα τρόφιμα και διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

1. Γεωργία που προσφέρει τα φυτικά προϊόντα, όπως είναι τα δημητριακά, το σιτάρι, τα όσπρια. Τα φρούτα, τα λαχανικά, οι ξηροί καρποί, η ελιά, το μέλι και πλήθος άλλων.
2. Κτηνοτροφία που προσφέρει ζωικά προϊόντα, όπως είναι το κρέας, το γάλα, τα αυγά
3. Αλιεία όπου προσφέρονται αλιεύματα, όπως το χταπόδι, το καλαμάρι, η σουπιά, τα οστρακοειδή και άλλα.

Ως επεξεργασμένα τρόφιμα θεωρούνται αυτά που έχουν προκύψει από το συνδυασμό των πρωτογενών προϊόντων με άλλα συστατικά. Οι ιδιότητες τους διαφέρουν κατά πολύ από την αρχική πρώτη ύλη. Μερικά επεξεργασμένα τρόφιμα που είναι ευρέως γνωστά είναι:

1. Τα αλλαντικά
2. Κονσέρβες
3. Κατεψυγμένα τρόφιμα
4. Αφυδατωμένα τρόφιμα
5. Προϊόντα γάλακτος (τυριά, γιαούρτι)
6. Καπνιστά κρέατα
7. Καπνιστά ψάρια
8. Προϊόντα αρτοποιίας
9. Προϊόντα ζαχαροπλαστικής
10. Μαρμελάδες (Μπλούκας, 2004)

Για την επιβίωση του ανθρώπου είναι πρωταρχικής σημασίας η τροφή καθώς αποτελεί πηγή ενέργειας και δομικών στοιχείων. Τα τρόφιμα είναι αναγκαία για την ανάπτυξη του σώματος, την αντικατάσταση απωλειών, την παραγωγή ενέργειας και την καλή υγεία.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ολοένα και μεγαλύτερη αύξηση στην κατανάλωση μη κατάλληλων τροφίμων με τις κυριότερους παράγοντες αυτής της αύξησης να είναι οι εξής:

1. Βελτίωση των μεθόδων ανίχνευσης μολυσμένων τροφίμων
2. Καταγραφή των τροφικών προβλημάτων
3. Αύξηση του πληθυσμού και ο συγχρωτισμός του σε αστικά κέντρα
4. Αλλαγή διατροφικών συνηθειών
5. Αύξηση των κέντρων μαζικής εστίασης

Για να χαρακτηριστεί ένα τρόφιμο ασφαλές για κατανάλωση θα πρέπει να συμμορφώνεται με τρεις κανόνες:

1. Απουσία παθογόνων μικροβίων
2. Χαμηλό επίπεδο ανεπιθύμητων μικροβίων
3. Απουσία ουσιών που μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα στην υγεία του καταναλωτή ή να υπάρχουν σε επιτρεπτά από το νόμο όρια. (Ευθύμιος Γαλανός)

1.1 Μικροοργανισμοί

Ως μικροβιολογία καλείται η επιστήμη που μελετά τη δομή, τη μορφή, τη φυσιολογία, την αναπαραγωγή, την ταξινόμηση, την οικολογία και την κατανομή των μικροοργανισμών. Η μικροβιολογία τροφίμων είναι ένας κλάδος της μικροβιολογίας που συνδέεται με οποιοδήποτε τρόπο με τα τρόφιμα.

Τα τρόφιμα αρκετές φορές υπόκεινται ανεπιθύμητες αλλαγές στην σύσταση, στη δομή και στις ιδιότητες του από την δράση μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί δρουν είτε σε ομάδες είτε μεμονωμένα και διασπούν οργανικά υποστρώματα τα οποία αποτελούν τα συστατικά των τροφίμων. Η φθορά των τροφίμων εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες:

1. Τον τύπο του μικροοργανισμού (βακτήρια, μύκητες και ζύμες)
2. Τις συνθήκες του περιβάλλοντος (υγρασία, οξυγόνο, φως, θερμοκρασία)
3. Τις μεταβολές που υφίσταται το τρόφιμο
4. Μηχανικά αίτια (παραμόρφωση, θραύση)
5. Τη χημική σύσταση του τροφίμου
6. Τα παράσιτα
7. Τα έντομα
8. Τα τρωκτικά

Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών στα τρόφιμα είναι:

1. Η θερμοκρασία

2. Η ενεργότητα νερού
3. Το pH
4. Το οξυγόνο

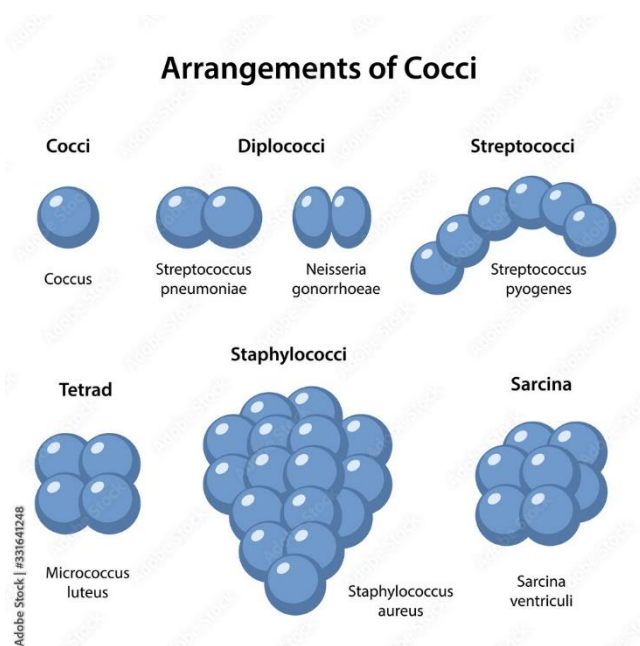
Για τη διασφάλιση της αποφυγής μόλυνσης των τροφίμων στις βιομηχανίες εφαρμόζονται αυστηρά πρωτόκολλα σε όλη τη διάρκεια της παραγωγής, από την πρώτη ύλη έως και το τελικό προϊόν. Τρόποι οι οποίοι δρουν ανασταλτικά για την ανάπτυξη τους είναι:

1. Απομάκρυνση μικροοργανισμών
 - i. Πλύσιμο πρώτης ύλης
 - ii. Φυγοκέντρωση
 - iii. Διήθηση (κυρίως σε ποτά)
 - iv. Απομάκρυνση μολυσμένων περιοχών τρόφιμου
2. Αναστολή ανάπτυξης μικροοργανισμών
 - i. Χρήση χαμηλών θερμοκρασιών (ψύξη ή κατάψυξη)
 - ii. Αφυδάτωση (με χρήση ζεστού αέρα, καπνισμό ή λυοφιλίωση)
 - iii. Ακτινοβολία (θερμική, υπεριώδης ή ιονίζουσα)
 - iv. Υψηλές θερμοκρασίες
 - v. Συντηρητικά (Βαφοπούλου-Μαστρογιαννάκη, 2003) (Μπλούκας, 2004)

Από τις τρεις κατηγορίες μικροοργανισμών που αναφέρθηκαν (ζύμες, μύκητες και βακτήρια), τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί που πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση. (Μπλούκας, 2004). Για τη μικροβιολογία θεωρούνται η σημαντικότερη κατηγορία μικροοργανισμών καθώς βρίσκονται παντού γύρω μας, μπορούν σε κατάλληλες συνθήκες να πολλαπλασιαστούν με γοργούς ρυθμούς και ορισμένα παθογόνα βακτήρια είναι εξαιρετικά επικίνδυνα για τον άνθρωπο. (Ευθύμιος Γαλανός)

Με βάση το σχήμα τους χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες:

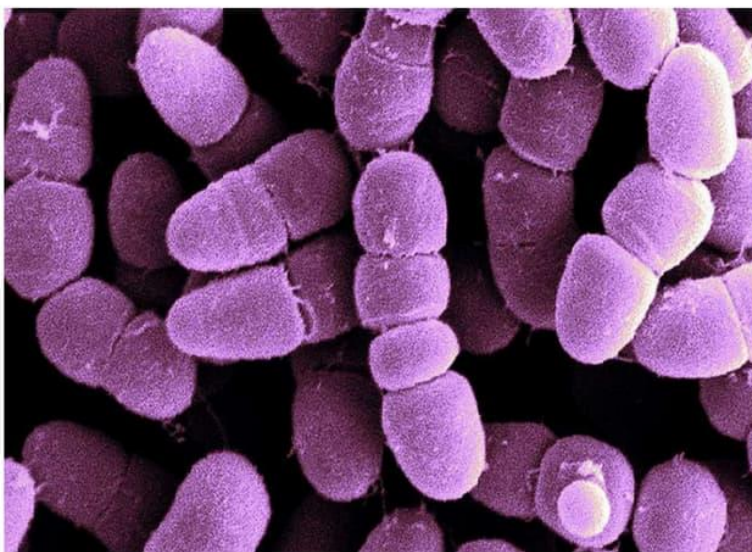
1. Τους κόκκους (**EIKONA 1**)
2. Τους βακίλους (**EIKONA 2**) και
3. Τα σπορογόνα, (**EIKONA 3**) τα οποία έχουν την ιδιότητα να δημιουργούν σπόρια, όταν βρίσκονται κάτω από δυσμενείς συνθήκες, τα οποία είναι ανθεκτικά στην θέρμανση, στην αφυδάτωση, την ψύξη κ.α (Μπλούκας, 2004)



Εικόνα 1. Διάφοροι τύποι κόκκων (Adobe)

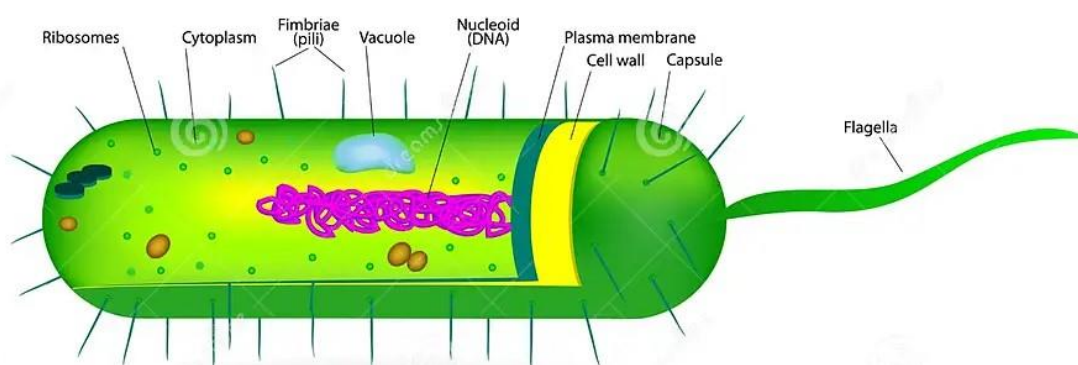


Εικόνα 2. Βάκιλοι (Bird, 2019)



Εικόνα 3. Σπόρια (Team, 2023)

Κάθε βακτήριο αποτελείται από ένα κύτταρο και το μέγεθος τους μπορεί να διαφέρει ώστε να γίνονται εμφανείς μόνο με μικροσκόπιο με μεγέθυνση x1000. (ΕΙΚΟΝΑ 4)



Εικόνα 4. Δομή βακτηριακού κυττάρου (depositphotos)

Κάθε βακτηριακό κύτταρο αποτελείται από (αριστερά προς δεξιά):

1. Ριβοσώματα (Ribosomes)
2. Κυτόπλασμα (Cytoplasm)
3. Βλεφαρίδες (Fimbriae – Pili)
4. Κυτταρικό κενό (Vacuole)
5. Γενετικό υλικό (Nucleoid DNA)
6. Πλασματική μεμβράνη (Plasma membrane)
7. Κυτταρικό τοίχωμα (Cell wall)
8. Κυτταρική μεμβράνη (Capsule)
9. Μαστίγια (Flagella)

Με βάση τις απαιτήσεις τους σε οξυγόνο τα βακτήρια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως:

1. Αερόβια (ανάπτυξη παρουσίας οξυγόνου)
2. Αναερόβια (ανάπτυξη απουσίας οξυγόνου)
3. Μερικώς αναερόβια (ανάπτυξη είτε με παρουσία είτε με απουσία οξυγόνου)
4. Μικροαερόφιλοι (ανάπτυξη με μικρή παρουσία οξυγόνου) (Μπλούκας, 2004)
(Καλογρίδου-Βασιλειάδου, 1999)

Με βάση τις θερμοκρασίες που αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε:

1. Θερμόφιλους
2. Μεσόφιλους
3. Ψυχρόφιλους
4. Ψυχρότροφους (ΠΙΝΑΚΑΣ 1) (Μπλούκας, 2004)

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ (°C)	
	ΕΛΑΧΙΣΤΗ	ΒΕΛΤΙΣΤΗ
Θερμόφιλοι	30-40	55-65
Μεσόφιλοι	5-10	30-40
Ψυχρόφιλοι	0-10	12-18
Ψυχρότροφοι	0-10	20-30

Πίνακας 1. Βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης μικροοργανισμών

Ο αριθμός καθώς και το είδος των μικροοργανισμών που δύναται να βρεθούν στα τρόφιμα εξαρτάται από τρεις κατηγορίες:

1. Την τήρηση των κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής τόσο κατά την επεξεργασία των πρώτων αλλά και των βοηθητικών πρώτων υλών, την συσκευασία, την αποθήκευσης του αλλά και τη μεταφορά τους
2. Την καταλληλότητα των υλικών και αντικειμένων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την συσκευασία τροφίμων
3. Τον αριθμό αλλά και το είδος των μικροοργανισμών των πρώτων και των βοηθητικών υλών που χρησιμοποιήθηκαν. (Καλογρίδου-Βασιλειάδου, 1999)

Μέθοδοι που μπορούν να καταστρέψουν τους μικροοργανισμούς παρουσιάζονται στον **ΠΙΝΑΚΑ 2.**

ΘΕΡΜΟΤΗΤΑ	Παστερίωση
	Αποστείρωση
	Κονσερβοποίηση
	Ασηπτική επεξεργασία
	Θερμική εξώθηση
	Μαγείρεμα υπό κενό (Sous vide)
ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΙΟΝΙΣΜΟΥ	
ΥΨΗΛΕΣ ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΕΣ ΠΙΕΣΕΙΣ	
ΜΗ ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ	Παλμικά ηλεκτρικά πεδία υψηλής τάσης
	Παλμικό φως υψηλής έντασης
	Παλλόμενα μαγνητικά πεδία
	Υπέρηχοι

Πίνακας 2. Μέθοδοι καταστροφής μικροοργανισμών

Μέθοδοι οι οποίοι είναι ικανοί να αναστείλουν ή να επιβραδύνουν τη δράση των μικροοργανισμών παρουσιάζονται στον **ΠΙΝΑΚΑ 3**.

ΧΑΜΗΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ	Ψύξη	
	Συντήρηση με ψύξη σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα	
	Συντήρηση σε ψύξη σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας	
	Κατάψυξη	
ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ	Συμπύκνωση	Με εξάτμιση
		Με κατάψυξη και απομάκρυνση παγοκρυστάλλων
		Με χρήση ημιπερατών μεμβρανών
	Αφυδάτωση	
	Λυοφιλίωση	
ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΑ		
ΖΥΜΩΣΕΙΣ		
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΕΜΠΟΔΙΩΝ		

Πίνακας 3. Μέθοδοι αναστολής ή επιβράδυνσης δράσης μικροοργανισμών

Στον **ΠΙΝΑΚΑ 4** θα αναφερθούν ενδεικτικά τιμές ή εύρη τιμών pH που επιτρέπουν στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

ΒΑΚΤΗΡΙΑ	pH
<i>Bacillus coagulans</i>	3.7
<i>Campylobacter jejuni</i>	5.3
<i>Clostridium perfringens</i>	4.5-5.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	4.4-9.1
<i>Escherichia coli</i>	4.0-8.7
<i>Lactic acid bacteria</i>	3.5
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.3
<i>Salmonella spp.</i>	3.8-4.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0

Πίνακας 4. Εύρη τιμών pH που αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί

1.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο από τις τροφές διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. Ενδογενείς, οι οποίοι προϋπάρχουν στα τρόφιμα από άρρωστα ζώα
2. Εξωγενείς, οι οποίοι εισέρχονται στα τρόφιμα από επιμολύνσεις οι οποίες προέρχονται από ανθρώπινο λάθος λόγω λάθος χειρισμών. (Χρυσανγή Γαρδέλη)

Σε οποιοδήποτε τρόφιμο φέρονται μικροοργανισμοί οι οποίοι είτε ωφελούν την υγεία του ανθρώπου με τις αλλαγές στην μικροχλωρίδα είτε μπορούν να προκαλέσουν τροφιμογενείς λοιμώξεις. Τα παθογόνα έχουν την ιδιότητα να προκαλούν ασθένειες με τρεις μηχανισμούς:

1. Κατάποση προσχηματισμένων τοξινών -μέθη (π.χ *Staphylococcus aureus*)
2. Παραγωγή τοξινών μέσω κατάποσης παθογόνων – τοξικότητα τροφής (π.χ *Clostridium perfringens*)
3. Εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου - λοίμωξη (π.χ *Salmonella*)

Τα πιο συνήθη συμπτώματα είναι αυτά της γαστρεντερίτιδας που συνοδεύονται με ναυτία, εμετό, διάρροια, κοιλιακό άλγος και σε κάποιες περιπτώσεις με πυρετό. Στις πιο σπάνιες περιπτώσεις προκαλούν εξωεντερικές λοιμώξεις και θάνατο κυρίως σε ομάδες υψηλού κινδύνου όπως είναι τα βρέφη, οι ηλικιωμένοι και οι ανασκατεσταλμένοι ασθενείς. (Patrícia Antunes, 2020).

Τα πιο γνωστά και τα πιο συνήθη βακτήρια που προκαλούν τις περισσότερες τροφιμογενείς λοιμώξεις είναι:

1. *Salmonella*
2. *Clostridium perfringens*
3. *Campylobacter spp*
4. *Staphylococcus aureus*
5. *Escherichia coli*
6. *Shigella spp.* (Luping Xu, 2021).

ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ
Σαλμονελλίωση	<i>Salmonella spp</i>
Σιγκέλλωση	<i>Shigella spp</i>
Καμπυλοβακτηρίωση	<i>Campylobacter jejuni</i>
Λιστερίωση	<i>Listeria monocytogenes</i>
Βρουκέλλωση ή μελλιταίος πυρετός	<i>Brucella spp</i>
Βοτουλισμός	<i>Clostridium botulinum</i>
Σταφυλοκοκκίαση	<i>Staphylococcus aureus</i>
Εντερίτιδα	<i>Clostridium perfringens</i>
Διάρροια	<i>Escherichia coli</i>

Πίνακας 5. Τα σημαντικότερα παθογόνα και οι ασθένειες που προκαλούν

Στον **ΠΙΝΑΚΑ 6** αναφέρονται ενδεικτικά τέσσερις παθογόνοι μικροοργανισμοί και αναφέρεται η πηγή προέλευσης τους, τα συμπτώματα που προκαλούν αν εκδηλωθεί ασθένεια και ποια τρόφιμα είναι περισσότερο επικίνδυνα σε περίπτωση μόλυνσης.

ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΠΗΓΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	ΤΡΟΦΙΜΑ
<i>Clostridium Perfringens</i>	Έδαφος, εντερικό σύστημα ζώων και ανθρώπων	Εμετός, διάρροια, κοιλόπονος, πονοκέφαλος	Λανθασμένος τρόπος μαγειρέματος πουλερικών και κρεάτων καθώς και σάλτσες ή σούπες που προέρχονται από αυτά
<i>Staphylococcus aureus</i>	Χέρια, στοματική και ρινική κοιλότητα, τραύματα, δέρμα ζώων	Ναυτία, εμετός, διάρροια, κοιλόπονος, πονοκέφαλος	Κοτόπουλο, γαλοπούλα, Κρέατα, γαλακτοκομικά προϊόντα, αυγά
<i>Salmonella spp</i>	Νερό, έδαφος, έντομα, πουλερικά, θηλαστικά, εντερικό σύστημα κυρίως των πουλερικών	Ναυτία, εμετός, διάρροια, κοιλόπονος, πονοκέφαλος	Πουλερικά, γαλοπούλα, αυγά, οστρακοειδή, κρέας
<i>Listeria monocytogenes</i>	Έδαφος, ζωοτροφές	Σηψαιμία, μηνιγγίτιδα, αποβολή εγκύων γυναικών	Νωπά γαλακτοκομικά προϊόντα, νωπά λαχανικά, νωπά ψάρια

Πίνακας 6. Πηγές προέλευσης, συμπτώματα και τρόφιμα με υψηλή επικινδυνότητα για εμφάνιση ασθενειών από μικροοργανισμούς

1.3 Παγκόσμια δεδομένα νόσησης

Οι παράγοντες που συμβάλουν στην επιβάρυνση της υγείας του πληθυσμού παγκοσμίως είναι:

1. Η αυξημένη ευαισθησία των ομάδων υψηλού κινδύνου όπου οδηγούν σε σοβαρές επιπλοκές της ασθένειας,
2. Η αυξημένη αντοχή στα αντιβιοτικά,
3. Διεθνές εμπόριο,
4. Οι μετακινήσεις – τουρισμός του πληθυσμού,
5. Οι νέες καταναλωτικές συνήθειες και

6. Οι αλλαγές που υπόκεινται τα παθογόνα στη λοιμογόνο δράση τους. (Eleonora Sarno, 2021).

Σύμφωνα με παγκόσμια δεδομένα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) 1 στους 10 ανθρώπου κάθε χρόνο νοσεί λόγω κατανάλωσης μολυσμένου τροφίμου, το οποίο αυτό μεταγράφεται σε περίπου 600 εκατομμύρια. Από αυτούς οι 420.000 καταλήγουν στο θάνατο. Στην Ευρώπη ο αριθμός των θανόντων ετησίως ανέρχεται στους 5.000. Ο ΠΟΥ αναφέρει ότι το 30% των τροφιμογενών θανάτων αφορά παιδιά κάτω των 5 ετών. (WHO, 2021). Τα πιο συνηθισμένα βακτηριακά παθογόνα που ευθύνονται για τις ασθένειες και αποτελούν απειλές είτε σε αναπτυγμένες, είτε σε αναπτυσσόμενες είτε σε υποανάπτυκτες χώρες, είναι η *Salmonella* και το *Campylobacter* το οποίο αποτελεί παράδειγμα σε χώρες αναπτυγμένες με κατά κεφαλήν υψηλό εισόδημα. (Patrícia Antunes, 2020).

Ο ΠΟΥ αναφέρει σε εγχειρίδιο που έχει δημοσιεύσει το 2021 ορισμένες προκλήσεις που καλούνται να φέρουν εις πέρας.

1. Πάνω από 250 ασθένειες οφείλονται σε βακτήρια, παράσιτα ή ιούς,
2. Μη αναφορά ασθενειών που οφείλονται σε τρόφιμα
3. Οι νοσούντες από χρόνιες παθήσεις δεν είναι εύκολο να αποδοθεί η ασθένεια τους σε τρόφιμα
4. Τα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια μπορεί να προκαλέσουν ασθένειες ακόμα και από το νερό, τα ζώα κ.α. (WHO, 2021)

Όλα τα τρόφιμα εν δυνάμει μπορούν να θεωρηθούν επικίνδυνα καθώς όλα μπορούν να μολυνθούν από παθογόνα βακτήρια. Κάποια εξ αυτών όμως θεωρούνται περισσότερο επικίνδυνα από κάποια άλλα όπως είναι τα ωμά ή μη μαγειρεμένα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (κρέας, αυγά, ψάρια, γάλα, πουλερικά, φυλλώδη λαχανικά), όπως επίσης και τρόφιμα που απαιτούν υψηλό επίπεδο χειρισμού. (Patrícia Antunes, 2020).

Ο ΠΟΥ έχει θέσει αρκετούς στόχους για να μπορέσει να περιορίσει τις τροφιμογενείς ασθένειες. Ο πρωταρχικός στόχος είναι να ταξινομηθούν οι ασθένειες με βάση τις επιπτώσεις που έχουν στην υγεία. Η ιεράρχηση θα γίνεται με βάση την επικινδυνότητα τους. Στη συνέχεια έχουν οριστεί δευτερεύοντες στόχοι που θα ολοκληρωθούν σταδιακά με τη σειρά που αναφέρονται.

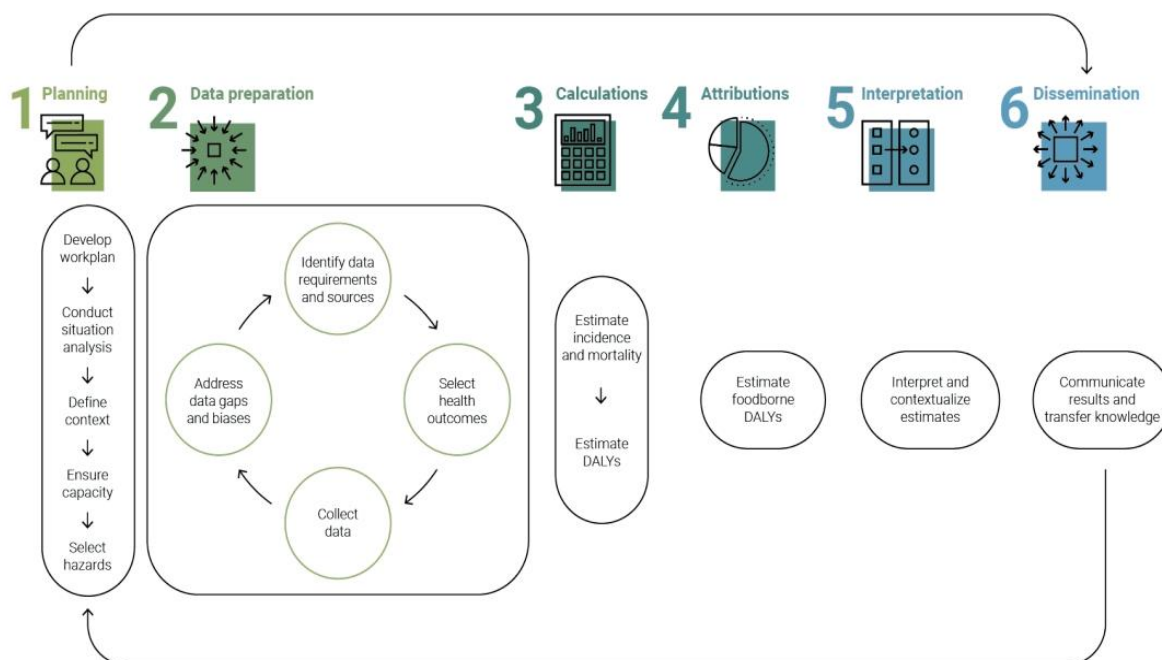
1. Αναζήτηση της σοβαρότητας της νόσου που προκλήθηκε από συγκεκριμένους κινδύνους σχετικά με τη συχνότητα εμφάνισης, τη θνησιμότητα, και τα DAILYs (μέτρηση των υγιών χρόνων ζωής που χάνονται λόγω ασθενειών ή κινδύνου) ανά ηλικία και φύλο.
2. Ανάπτυξη πλαισίου για τη συνεχή ενημέρωση των εκτιμήσεων και την ανάλυση των τάσεων
3. Παροχή μιας βάσης για την αξιολόγηση των παρεμβάσεων που αφορούν την ασφάλεια τροφίμων. (WHO, 2021)

Όλα τα παραπάνω αναμένονται να χρησιμεύσουν ώστε να τεθούν προτεραιότητες για την ασφάλεια των τροφίμων και να κατανεμηθούν οι κατάλληλοι πόροι σε προσπάθειες των κρατών για την διαχείριση των τροφιμογενών λοιμώξεων. (WHO, 2021)

Τα βήματα που απαιτούνται για την μελέτη επιβάρυνσης των τροφιμογενών λοιμώξεων είναι:

1. Προγραμματισμός, ο οποίος περιλαμβάνει τα εξής βήματα (με την ακόλουθη σειρά) :
 - i. Την ανάπτυξη σχεδίου εργασίας
 - ii. Την διεξαγωγή ανάλυσης της κατάστασης
 - iii. Τον καθορισμό πλαισίου
 - iv. Τη διασφάλιση της χωρητικότητας και
 - v. Την επιλογή του κινδύνου
2. Προετοιμασία δεδομένων, όπου τα βήματα αυτά είναι διαρκή και επαναλαμβανόμενα:
 - i. Προσδιορισμός δεδομένων και πηγών
 - ii. Επιλογή αποτελεσμάτων υγείας
 - iii. Συλλογή δεδομένων και
 - iv. Αντιμετώπιση των κενών και των δεδομένων
3. Υπολογισμός όπου αποτελείται από δύο βήματα με την ακόλουθη σειρά:
 - i. Εκτίμηση της επίπτωσης και της θνησιμότητας
 - ii. Εκτίμηση DALYs
 - iii. Αποδόσεις οι οποίες αφορούν την εκτίμηση των τροφιμογενών DALYs
 - iv. Ερμηνεία και προσαρμογή των εκτιμήσεων
 - v. Διάδοση και κοινοποίηση αποτελεσμάτων (WHO, 2021)

Τα ανωτέρω βήματα παρουσιάζονται στην **ΕΙΚΟΝΑ 5**.



Εικόνα 5. Βήματα που απαιτούνται για τη μελέτη επιβάρυνσης τροφιμογενών λοιμώξεων (WHO, 2021)

Στην **ΕΙΚΟΝΑ 6** αναφέρονται οι εκτιμήσεις του ΠΟΥ σύμφωνα με την ηλικία και τα αναμενόμενα χρόνια υγιούς ζωής που χάνονται έπειτα από την βακτηριακή μόλυνση. Στην εικόνα αυτή αντανακλάται το ιδανικό προσδόκιμο ζωής. Το SEYLL είναι τα αναμενόμενα χρόνια ζωής που χάνονται.

Age	SEYLL*	Age	SEYLL*	Age	SEYLL*	Age	SEYLL*	Age	SEYLL*	Age	SEYLL*	Age	SEYLL*	Age	SEYLL*
0	91.94	14	78.04	28	64.10	42	50.22	56	36.52	70	23.15	84	11.39	98	3.70
1	91.00	15	77.04	29	63.11	43	49.24	57	35.55	71	22.23	85	10.70	99	3.24
2	90.01	16	76.04	30	62.11	44	48.25	58	34.58	72	21.31	86	20.03	100	2.79
3	89.01	17	75.04	31	61.12	45	47.27	59	33.62	73	20.40	87	9.38	101	2.36
4	88.02	18	74.05	32	60.13	46	46.28	60	32.65	74	19.51	88	8.76	102	1.94
5	87.02	19	73.05	33	59.13	47	45.30	61	31.69	75	18.62	89	8.16	103	1.59
6	86.02	20	72.06	34	58.14	48	44.32	62	30.73	76	17.75	90	7.60	104	1.28
7	85.02	21	71.06	35	57.15	49	43.34	63	29.77	77	16.89	91	7.06	105	1.02
8	84.02	22	70.07	36	56.16	50	42.36	64	28.82	78	16.05	92	6.55		
9	83.03	23	69.07	37	55.17	51	41.38	65	27.86	79	15.22	93	6.07		
10	82.03	24	68.08	38	54.18	52	40.41	66	26.91	80	14.41	94	5.60		
11	81.03	25	67.08	39	53.19	53	39.43	67	25.96	81	13.63	95	5.13		
12	80.03	26	66.09	40	52.20	54	38.46	68	25.02	82	12.86	96	4.65		
13	79.03	27	65.09	41	51.21	55	37.49	69	24.08	83	12.11	97	4.18		

Εικόνα 6. Αναμενόμενα χρόνια ζωής που χάνονται ανάλογα την ηλικία (WHO, 2021)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο - ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Ο ιατρός και μικροβιολόγος Heinrich Hermann Robert Koch (1843-1910) όπου θεωρείται ο πατέρας της μικροβιολογίας – βακτηριολογίας είχε αναφέρει ότι η βακτηριακή καλλιέργεια είναι το θεμέλιο ολόκληρης της έρευνας για τις μολυσματικές ασθένειες. Οι τεχνικές που ανέπτυξε κατά την έρευνα του θεωρούνται τα βασικά εργαλεία σε όλους τους τομείς της ιατρικής. Ακόμα και σήμερα, παρόλο που οι μοριακές τεχνικές βρίσκονται σε πλήρη άνθιση και γρήγορη εξέλιξη η βακτηριακή καλλιέργεια δεν έχει εκλείψει.

Οι καλλιέργειες είναι ακόμα απαραίτητες στην μελέτη της λοιμογόνου δράσης, της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά καθώς και στην αλληλουχία του γονιδιώματος ούτως ώστε να διευκολύνεται η θεραπεία των ασθενειών που προκαλούνται από βακτήρια. (Jean-Christophe Lagier, 2015).

Στην αρχική εμφάνιση τους, οι συνθήκες καλλιέργειας (αερόβιες, αναερόβιες ή ημιαναερόβιες), οι χρόνοι επώσης (συνήθως από 24 έως 48 αλλά υπάρχουν και καλλιέργειες που απαιτούν πολύ περισσότερο χρόνο), τα θρεπτικά υποστρώματα, οι θερμοκρασίες (συνήθως από 25°C έως 45°C) ποίκιλλαν ανά ερευνητή και πραγματοποιούνταν οι δοκιμές εμπειρικά. Η βακτηριακή καλλιέργεια είναι τις περισσότερες φορές πιο δύσκολη, πιο χρονοβόρα και απαιτείται περισσότερη εκπαίδευση αναλυτή σε αντιδιαστολή με τις μοριακές τεχνικές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι αναλυτές που ειδικεύονται σε αυτές τις τεχνικές να μειώνονται συστηματικά τα τελευταία περίπου 40 χρόνια σε σύγκριση με το πλήθος των αναλυτών που υπήρχαν την δεκαετία του 1970. (Jean-Christophe Lagier, 2015)

Τα βακτήρια σχηματίζουν πολύ χαρακτηριστικές αποικίες στα θρεπτικά υποστρώματα όπου εξετάζεται η μορφή, το σχήμα, η οσμή, το χρώμα όπως και η παραγωγή θρεπτικών ουσιών. (Μπεζιρτζόγλου, 2005). Τα θρεπτικά υποστρώματα είναι ένας συνδυασμός ουσιών, σε υγρή, ημι-στερεή ή στερεή μορφή, που περιέχουν φυσικά και συνθετικά συστατικά όπου προορίζονται να υποστηρίξουν τον πολλαπλασιασμό, την αναγνώριση ή τη διατήρηση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών. (ISO I. S., 2014) Τα πρώτα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εκχυλίσματα καρδιάς, εγκεφάλου κ.α όπως και εκχυλίσματα ζύμης τα οποία χρησιμοποιούνται ως και σήμερα είτε αυτούσια είτε ως συστατικά πολλών μέσων καλλιέργειας. Άλλα συστατικά που χρησιμοποιούνται στα θρεπτικά υποστρώματα είναι οι πεπτόνες, το κρέας, η καζεΐνη, η σόγια καθώς και η ζελατίνη. Στη συνέχεια προστέθηκε η χρήση πηκτικών μέσων όπως το άγαρ και έτσι δημιουργήθηκαν τα στερεά θρεπτικά

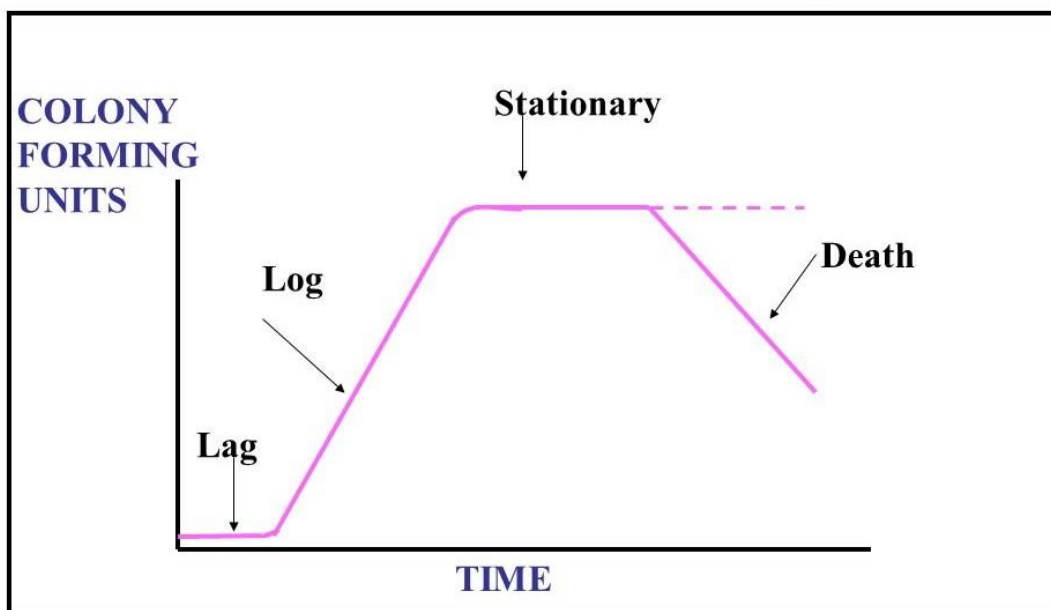
υποστρώματα τα οποία βοήθησαν στο να υπάρχει πιο καθαρή καλλιέργεια. Σε συνδυασμό με την εφεύρεση του τρυβλίου petri με πλαστικό καπάκι έτσι ώστε να μπορούν να παρατηρούνται ευκολότερα οι αποικίες και να αποφεύγονται οι πιθανές επιμολύνσεις (μόλυνση με άλλο είδος μικροβίου) ήταν μία πραγματική επανάσταση στην μικροβιολογία. (Jean-Christophe Lagier, 2015). Για τη βέλτιστη ανάγνωση των τρυβλίων petri χρησιμοποιούνται σε ορισμένες αναλύσεις είτε χρωμογόνα υποστρώματα είτε φθοριούχα όπου αυτά η ανάγνωση τους γίνεται με τη βοήθεια λάμπας UV. (ISO I. S., 2014) Ως αποικίες καλείται το άθροισμα των μικροβιακών κυττάρων και η μονάδα μέτρησης τους είναι το CFU (Colony Forming Unit) (Μπεζιρτζόγλου, 2005) που μπορεί είτε να αναφέρεται ανά petri είτε αν τετραγωνικό εκατοστό (cm^2). Οι αποικίες διαφέρουν στο σχήμα, στη χροιά και στη σύσταση τους στο θρεπτικό υλικό και με αυτό τον τρόπο γίνεται και ο διαχωρισμός τους. (Μπεζιρτζόγλου, 2005). Η μέθοδος αυτή χωρίζεται σε δύο στάδια, το προ-εμπλουτιστικό στάδιο όπου τα κύτταρα αναζωογονούνται και αυξάνεται η συγκέντρωση του παθογόνου στόχου και έπειτα πραγματοποιείται ο επιλεκτικός εμπλουτισμός για την ανίχνευση ενός συγκεκριμένου παθογόνου στα δείγματα. (Meera Probha Kabiraz, 2003). Σε αρκετές περιπτώσεις ανίχνευσης παθογόνων πραγματοποιούνται συμπληρωματικές αναλύσεις για την επιβεβαίωση τους όπως είναι το τεστ οξειδάσης για την *Salmonella*, το τεστ καταλάσης και η χρήση αιματούχων υποστρωμάτων για την *Listeria*. (Meera Probha Kabiraz, 2003)

Κάθε βακτηριακή καλλιέργεια διακρίνεται από τέσσερις φάσεις:

1. Φάση προσαρμογής, ξεκινάει με τον εμβολιασμό των κυττάρων σε υπόστρωμα έως ότου ξεκινήσει η αναπαραγωγή τους η οποία διαρκεί από 30 έως 180 λεπτά. Σε αυτό το διάστημα τα κύτταρα προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες του θρεπτικού υποστρώματος. Στη φάση αυτή συνδέονται τα ένζυμα και το νέο κυτταρόπλασμα αλλά δεν πολλαπλασιάζονται ακόμα και ο αριθμός του παραμένει σταθερό.
2. Λογαριθμική φάση, όπου τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με πολύ γρήγορους ρυθμούς. Η φάση αυτή ακόμα και αν οι συνθήκες (θερμοκρασία) είναι σε ιδανικό επίπεδο μετά από μερικές ώρες σταματάει λόγω του ότι συσσωρεύονται τα προϊόντα των κυττάρων καθώς και μειώνονται τα απαραίτητα συστατικά από το θρεπτικό υπόστρωμα που έχει χρησιμοποιηθεί.
3. Φάση στασιμότητας, στην οποία ναι μεν η αναπαραγωγή κυττάρων δεν σταματάει αλλά ο αριθμός των κυττάρων που παράγεται είναι ίσος με τον αριθμό των κυττάρων που πεθαίνουν. Άρα ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων μένει σταθερός.

4. Φάση θανάτου ή αυτόλυσης, στην οποία ο αριθμός των κυττάρων που πεθαίνουν είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται. (Ευθύμιος Γαλανός) (ΕΙΚΟΝΑ 7)

Καμπύλη ανάπτυξης βακτηρίων



Εικόνα 7. Καμπύλη ανάπτυξης βακτηρίων (Αρβανιτίδου-Βαγιωνά, 2017)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο - ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Οι παραδοσιακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό μικροοργανισμών μέσω καλλιέργειας είναι χρονοβόρες και απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτούν και μεγάλους χώρους και υποδομές. Παρόλο που είναι πιο ακριβείς και πιο ευαίσθητες σαν τεχνικές τείνουν να μην είναι πλέον κατάλληλες για τις σύγχρονες ανάγκες. Απαιτούνται, συνεπώς, καινοτόμες και ευέλικτες προσεγγίσεις που θα απαιτούν λιγότερους πόρους όπως χρόνο, χώρο και εξοπλισμό, με στόχο να αναβαθμίσουν την απόδοση και την ασφάλεια. Η χρήση καινοτόμων τεχνολογιών που να είναι εύχρηστες μπορούν να διευκολύνουν την εφαρμογή δοκιμών, επιτρέποντας στους χρήστες να επωφεληθούν από τα δεδομένα που συλλέγονται για να μειώσουν τους κινδύνους για τη δημόσια υγεία και την ασφάλεια. (Arun K. Bhunia, 2020). Οι τεχνικές που βασίζονται στην καλλιέργεια αποτελούν το βασικό εργαλείο για την ανάπτυξη οποιασδήποτε εναλλακτικής μεθόδου για τον εντοπισμό τροφιμογενών παθογόνων σε δείγματα τροφίμων με οικονομική αποδοτικότητα. Η διαδικασία αυτή είναι επιλεκτική και διακριτική, αποτρέποντας την ανάπτυξη περιττών μικροβίων, καθώς χρησιμοποιείται ένα εξειδικευμένο μέσο για τον εντοπισμό συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών. (Meera Probha Kabiraz, 2003). Οι μοριακές μέθοδοι ταχεία ανίχνευσης παθογόνων μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες:

1. Βασισμένες στο νουκλεϊκό οξύ:
 - i. Ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόγχου (LAMP)
 - ii. Απλή PCR
 - iii. Multiplex PCR
 - iv. Real-time PCR
2. Ανοσολογικές και ανοσοπροσοφητικές τεχνικές συνδεδεμένες με ένζυμα (ELISA)
3. Βασισμένες σε βιοαισθητήρες όπου είναι τα ηλεκτροχημικά και οι μικροσυστοιχίες DNA με βάση τη μάζα. (Neha Chauhan, 2024)

3.1 Ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβησης βρόγχου (LAMP)

Η μοριακή τεχνική ισόθερμης ενίσχυσης με μεσολάβησης βρόγχου (LAMP) παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 2000 ως μία νέα τεχνική που ενισχύει το DNA με υψηλή ειδικότητα, αποτελεσματικότητα αλλά και ταχύτητα. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται η DNA πολυμεράση και ακόμα τέσσερις εκκινητές που μπορούν να αναγνωρίσουν έξι αλληλουχίες στο DNA στόχο. Η ενίσχυση και η ανίχνευση της αλληλουχίας στόχου μπορεί να επιτευχθεί με μόνο ένα στάδιο καθώς επωάζεται το μείγμα εκκινητών σε θερμοκρασία 65°C. Απαιτούνται 4 ή 6 ανιχνευτές οι οποίοι αναγνωρίζουν 6 ή 8 ανεξάρτητες αλληλουχίες ώστε να επιτευχθεί η έναρξη της ενίσχυσης.

Το σετ των εκκινητών που χρησιμοποιούνται είναι:

- i. εξωτερικοί εκκινητές, F3 και B3
- ii. 2 εσωτερικοί εκκινητές, FIP (forward inner primer) και BIP (backward inner primer)
- iii. Εκκινητές βρόγχου (loop forward και loop backward)

Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τη βοήθεια της πολυμεράσης Bst, όπου πραγματοποιεί αυτοκυκλική μετατόπιση αλυσίδας της αλληλουχίας – στόχου. (Κόκκινος, 2024)

Ο κύκλος της αντίδρασης μπορεί να δώσει αντίγραφα στόχους σε 10^9 φορές σε λιγότερο από μία ώρα και αξιολογείται η παρουσία με την εμφάνιση ενός λευκού ιζήματος πυροφωσφορικού μαγνησίου ή με αλλαγή χρώματος σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί κάποιου είδους χρωστικής. Τα αποτελέσματα ανίχνευσης αναλύονται έπειτα είτε με ηλεκτροφόρηση, είτε με θολερότητα είτε με χρωματομέτρία. (Mengtao Chen, 2023)

Η τεχνική LAMP χρησιμοποιείται ως εναλλακτική της PCR καθώς είναι περισσότερο ανθεκτική στους αναστολείς και είναι ιδανική σε δείγματα που δεν απαιτείται εκχύλιση. (Ane Rivas-Macho U. E.-A.-d.-C., 2024)

Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ανίχνευση ιών, βακτηρίων, παρασίτων αλλά και σε άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς. (Mengtao Chen, 2023)

3.2 Απλή PCR

Η PCR είναι η παλαιότερη μοριακή μέθοδος ανίχνευσης, όπου ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis, που έχει ως βάση της το νουκλεϊκό οξύ όπου η αλληλουχία στην περιοχή δέσμευσης των εκκινητών (νουκλεϊκά υποστρώματα) ενός στόχου ενισχύεται εκθετικά. Η

αξιοπιστία της μεθόδου εξαρτάται από το πόσο καθαρό είναι το εκμαγείο καθώς και από την παρουσία επαρκών αριθμών στόχων. (Jin-Hee Kim, 2021) Χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα, με ταχεία ανίχνευση και ακριβή αποτελέσματα. (Mengtao Chen, 2023)

Για την να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της PCR εκτός από το αρχικό DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο, απαραίτητο θεωρείται και η DNA πολυμεράση, ένα ζεύγος εκκινητών, ένα μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων καθώς και ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Παρά τις αρκετές τροποποιήσεις που μπορούν να γίνουν υπάρχουν κάποια συγκεκριμένα στάδια που λαμβάνουν χώρα σε κάθε αντίδραση PCR:

1. Αποδιάταξη αρχικού δείγματος, θέρμανση μείγματος στους 95°C για 15 λεπτά για την επίτευξη αποδιάταξης του DNA από διπλή έλικα σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες
2. Υβριδίαση, η θερμοκρασία ρυθμίζεται από 50-70°C για 30-60 δευτερόλεπτα για να πραγματοποιηθεί πρόσδεση εκκινητών στο μονόκλωνο DNA-εκμαγείο στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας
3. Προέκταση ή επιμήκυνση, ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 72°C για 0,5-3 λεπτά, καθώς είναι η ιδανική θερμοκρασία για τη DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας
4. Αποδιάταξη προϊόντων, αύξηση θερμοκρασίας στους 95°C για 30-60 δευτερόλεπτα έτσι ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA που έχουν δημιουργηθεί να αποκοπούν και να χρησιμοποιούν ξανά ως νέα εκμαγεία για την επόμενο κύκλο. (Σκορίλας, 2020)

3.3 Multiplex PCR

Η πολλαπλή (multiplex) PCR δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ενίσχυσης πολλών διαφορετικών τμημάτων DNA. Για κάθε τμήμα DNA σχεδιάζεται διαφορετικό ζεύγος εκκινητών. (Σκορίλας, 2020). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ευρέως διαδεδομένη λόγω του μικρού κόστους, της ταχύτητας ανάλυσης, το χαμηλό κίνδυνο επιμόλυνσης καθώς και τις μειωμένες απαιτήσεις σε προσωπικό εργαστηρίου. Είναι κατάλληλη για ανίχνευση παθογόνων, για γενετικό έλεγχο όπως επίσης και για δημιουργία προφίλ γονιδιακής έκφρασης. (Deepraj Sarkar, 2024)

3.4 Real-time PCR

Η real-time PCR έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει πολλαπλά είδη από ένα μείγμα και να ποσοτικοποιεί τα προϊόντα της PCR τα οποία σχηματίζονται κατά την ενίσχυση τους. Θεωρείται μία αξιόπιστη μέθοδος με μεγάλη ευαισθησία, ειδικότητα αλλά και ταχύτητα.

Για να υπάρξουν επιτυχημένα αποτελέσματα το πρώτο βήμα που θα πρέπει να πραγματοποιηθεί είναι η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από τα τρόφιμα. Όλα τα εκχυλίσματα του DNA είναι απαραίτητο να είναι σωστής συγκέντρωσης αλλά και κατάλληλης καθαρότητας καθώς αποτελούν κρίσιμο παράγοντα στα τελικά αποτελέσματα. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε ανασταλτικές ουσίες καθώς έχουν τη δυνατότητα να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να ελεγχθεί η πιθανή αναστολή της PCR μέσω εσωτερικών ή εξωτερικών ελέγχων. (Kang, 2019)

Στον ΠΙΝΑΚΑ 7 παρουσιάζονται συγκριτικά τα πλεονεκτήματα, τα μειονεκτήματα καθώς και πιθανές βελτιώσεις των παραπάνω τεχνικών.

ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΒΕΛΤΙΩΣΕΙΣ
LAMP	Ενίσχυση και ανίχνευση μεγαλύτερων νουκλεϊκών οξέων	Πολλαπλοί εκκινητές	Βελτιστοποίηση συνθηκών αντίδρασης
	Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα	Η αλληλεπίδραση των εκκινητών ίσως οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα	Χρήση τεχνίτης νοημοσύνης για αξιολόγηση διαφορετικού χρώματος στην οπτική ανίχνευση
	Ανίχνευση σε λιγότερο από 1 ώρα	Σχηματισμός μη ειδικής ενίσχυσης και διμερισμός εκκινητή	Αυτοματοποιημένο όργανο που θα αντικαθιστά χειροκίνητες διαδικασίες

	Μεγαλύτερη ή ίδια ευαισθησία με συμβατική PCR ή qPCR	Η οπτική ανάλυση των προϊόντων μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα	
	Υψηλή απόδοση ενίσχυσης	Χρονοβόρα προετοιμασία δειγμάτων	
	Χαμηλό κόστος οργάνου θερμοκυκλοποίησης		
	Χαμηλό κόστος οργάνου ενίσχυσης		
	Γρήγορη και απλή διαδικασία		
	Φθηνότερες μέθοδοι		
Συμβατική PCR	Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα	Χρονοβόρα διαδικασία	Αυτοματοποιημένο όργανο που θα αντικαθιστά χειροκίνητες διαδικασίες
	Ταχύτερη από μέθοδο καλλιέργειας	Χειροκίνητες λειτουργίες και περίπλοκος εξοπλισμός	Σχεδιασμός αντιδραστηρίων που θα αποφεύγεται η επιμόλυνση και λιγότερο ευαίσθητα σε αναστολές
	Διάκριση μεταξύ βακτηριακών στελεχών του ίδιου είδους	Επιρρεπές σε αναστολές PCR	

	Μεγάλη γκάμα εμπορικών κιτ	Κίνδυνος επιμόλυνσης	
	Το λογισμικό σχεδίασης εκκινητών είναι διαθέσιμο χωρίς σύνδεση στο ιντερνέτ	Έλλειψη ποσοτικοποίησης δείγματος	
Multiplex PCR	Υψηλή ακρίβεια και ποσοτικοποίηση σε σύνθετα δείγματα	Υψηλό κόστος οργάνων	Βελτίωση και τυποποίηση των συνθηκών αντίδρασης, της προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης δεδομένων
	Πιο ακριβής από τη real-time PCR	Σύνδεση με την ποιότητα του δείγματος	
	Ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση παθογόνων	Απαιτείται θερμικός κυκλωτής	
	Υψηλή απόδοση λόγω λειτουργιών λογισμικού	Επιρρεπές σε αναστολές PCR	
		Ψευδώς θετικά αποτελέσματα	
		Πολύπλοκος σχεδιασμός των αραιώσεων	
Real-time PCR	Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα	Σύνδεση με την ποιότητα του δείγματος	Αυτοματοποιημένο όργανο που θα αντικαθιστά

			χειροκίνητες διαδικασίες
	Ταχύτερη από μέθοδο καλλιέργειας και συμβατικής PCR	Υψηλό κόστος οργάνου και αντιδραστηρίων	Σχεδιασμός αντιδραστηρίων που θα αποφεύγεται η επιμόλυνση και λιγότερο ευαίσθητα σε αναστολές
	Δεν απαιτείται άλλη διαδικασία μετά την ενίσχυση	Επιρρεπές σε αναστολές PCR	Σχεδιασμός πιο εύχρηστου οργάνου
	Παρακολούθηση ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο	Δημιουργία καμπύλης	
	Ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση παθογόνων	Εξειδικευμένο προσωπικό	
	Υψηλή απόδοση λόγω λειτουργιών λογισμικού		

Πίνακας 7. Σύγκριση τεχνικών για ανίχνευση παθογόνων σε τρόφιμα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο - *Listeria monocytogenes*

Είναι γνωστά αρκετά είδη *Listeria spp.* τα οποία είναι Gram (+) βακτήρια και ανήκουν στο γένος *Firmicutes*. Είναι αναερόβια βακτήρια και τα οποία είναι θετικά στην καταλάση και αρνητικά στην οξειδάση και έχουν βέλτιστη θερμοκρασία τους 37°C. (ΕΙΚΟΝΑ 8).

Υπάρχουν 20 διαφορετικά είδη *Listeria*, κάποια εξ αυτών είναι η *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri* κ.α. Από αυτά τ 20 είδη το πλέον επικίνδυνο για τον άνθρωπο είναι η *L.monocytogenes* ενώ για τα ζώα είναι η *L.ivanovii* που σπάνια συναντάται στον άνθρωπο. (Itumeleng Matle, 2020).

Η πρώτη αναφορά στο παθογόνο *Listeria monocytogenes* έγινε το 1910 από τον Σουηδό καθηγητή Gustav Hülphers (1884-1968) όταν απομόνωσε το παθογόνο από το ήπαρ ενός κουνελιού στην Σουηδία. Η αρχική ονομασία που του δόθηκε ήταν *Bacillus hepatis*. Στη συνέχεια το 1926 ο καθηγητής μικροβιολογίας και γενικός ιατρός Everitt George Dunne Murray (1890-1964) απομόνωσε ένα παρόμοιο βακτήριο από κουνέλια και ινδικά χοιρίδια κατά τη διάρκεια ερευνητικής διαδικασίας και το ονόμασε *Bacterium monocytogenes*. Την αμέσως επόμενη χρονιά το 1927 ο βακτηριολόγος Harvey Pirie (1878-1965) απομόνωσε ένα πανομοιότυπο βακτήριο από άγρια τρωκτικά (γερβίλους) και το ονόμασε *Listerellahepatolitica* προς τιμήν του χειρουργού Λόρδου Joseph Lister. Η τελική ονομασία του βακτηρίου που υπάρχει έως σήμερα δόθηκε το 1940 ως *Listeria monocytogenes*. (Itumeleng Matle, 2020)



Εικόνα 8. Απεικόνιση *Listeria monocytogenes* (Paul Sakkal, 2019)

Το Gram (+) βακτήριο *Listeria monocytogenes* είναι η αιτία της λοίμωξης που ονομάζεται λιστερίωση και πρόκειται για μία σοβαρή τροφογόνο λοίμωξη. Επηρεάζει κυρίως εγκυμονούσες γυναίκες και μπορεί να προκαλέσει μέχρι και αποβολή του κυήματος, σε ανασοκατασταλμένους ασθενείς, ηλικιωμένους καθώς και νεογνά ενδέχεται να επιφέρει από μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, σηψαιμία έως και θάνατο. Μία πρώτη εκδήλωση της νόσου έχει συμπτώματα παρόμοια με αυτά της γαστρεντερίτιδας. (José A. Vázquez-Boland, 2001). Το ποσοστό θνησιμότητας υπολογίστηκε το 1991 στο 24% ειδικά στις ευάλωτες ομάδες που προαναφέρθηκαν. (Peterkin, 1991). Στον **ΠΙΝΑΚΑ 8** παρουσιάζονται αποτελέσματα επικινδυνότητας ανά ομάδες πληθυσμού με στοιχεία που συλλέχθηκαν το 2003 ανά 100.000 άτομα πληθυσμού.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΑ 100.000 ΑΤΟΜΑ
Κανονικός πληθυσμός	0,7
Ηλικιωμένοι	2
Αλκοολικοί	5
Διαβητικοί	5
Έγκυες γυναίκες	12
Καρκινοπαθείς	15
Ασθενείς με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ)	50
Ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού	100
AIDS	6000
Λευχαιμία	1000

Πίνακας 8. Επικινδυνότητα νόσησης με λιστερίωση ανά 100.000 πληθυσμό ετησίως

Παρατηρείται στον **ΠΙΝΑΚΑ 8** ότι ένας καρκινοπαθής έχει 15 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να νοσήσει από λιστερίωση σε σχέση με τον κανονικό πληθυσμό αν καταναλώσει μολυσμένο τρόφιμο. Ιδιαίτερη αίσθηση προκαλεί το μεγάλο ποσοστό που διατρέχουν άτομα που νοσούν από λευχαιμία, έχουν 1000 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο.

Παραδείγματα τροφών τα οποία παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη επικινδυνότητα να είναι μολυσμένα από το βακτήριο *Listeria monocytogenes* παρουσιάζονται στον **ΠΙΝΑΚΑ 9**.

ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑ	ΜΙΚΡΟΤΕΡΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑ
Λουκάνικα	Μαγειρεμένο φαγητό
Ωμό κρέας	Παστεριωμένο γάλα και γιαούρτι
Σάντουιτς	Σκληρά τυριά
Μαρούλι	Καρότα
Ωμά Μανιτάρια	Μήλα
Νωπό γάλα	Σοκολάτα
Μαλακά και φρέσκα τυριά	Μαρμελάδα
Θαλασσινά	Μπισκότα
	Ντομάτα (χωρίς επεξεργασία)

Πίνακας 9. Τροφές με υψηλή και χαμηλή επικινδυνότητα μόλυνσης από το βακτήριο *Listeria monocytogenes*

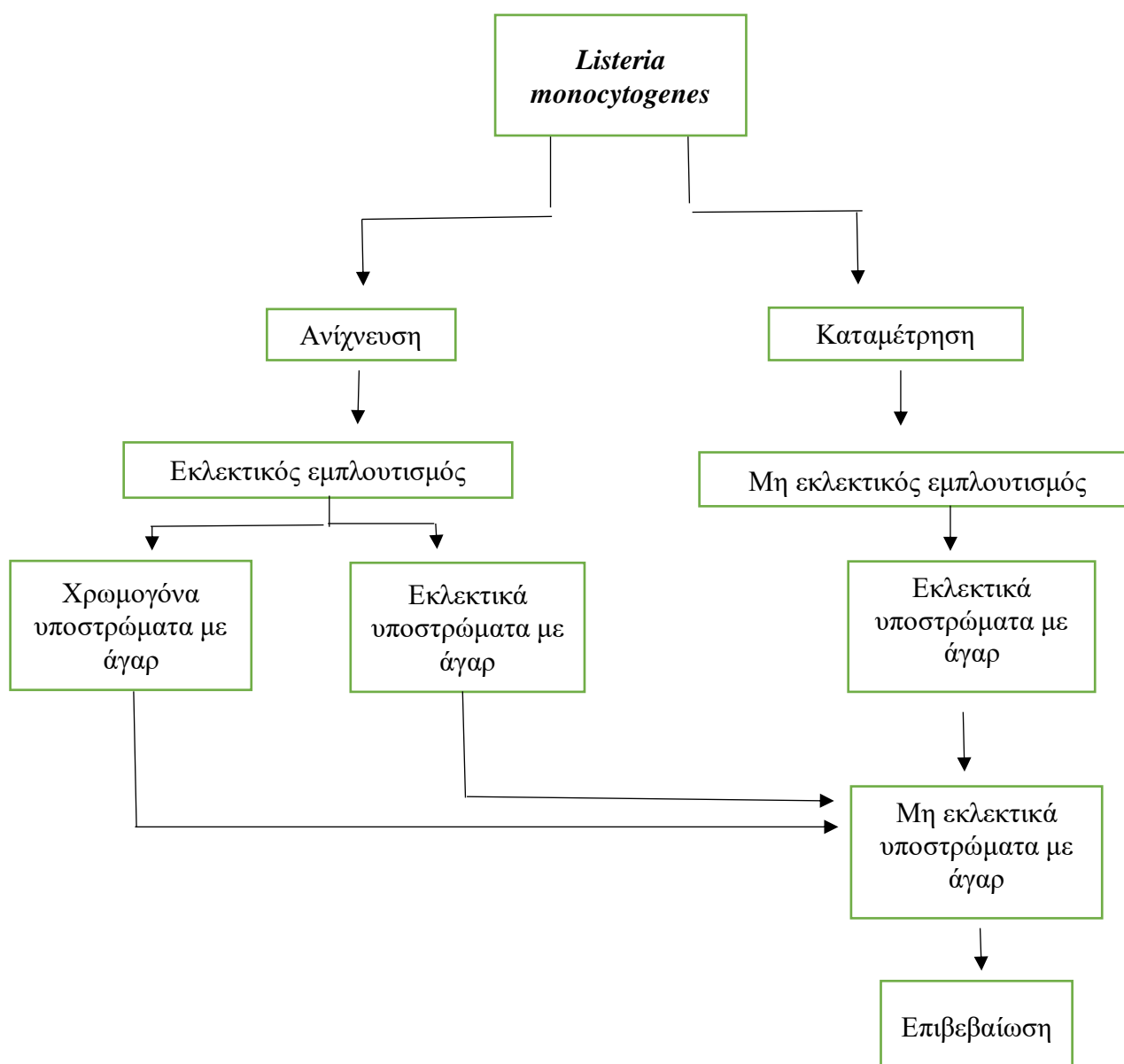
Η *Listeria monocytogenes* έχει την ιδιότητα να μπορεί να επιβιώνει και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του τροφίμου αλλά και κατά την αποθήκευση του όπου σε αυτό το στάδιο ενδέχεται να πολλαπλασιαστεί και ο πληθυσμός του. Αυτή η ιδιότητα του αποδίδεται στην έμφυτη δυνατότητα του να μπορεί να αντέχει σε δύσκολες και στρεσογόνες καταστάσεις. (Evangelia A. Zilelidou, 2018). Λόγω του υψηλού ποσοστού θνησιμότητας από τη νόσο της λιστερίωσης, οι κυβερνήσεις και οι οργανισμοί ασφάλειας τροφίμων ανά τον κόσμο έχουν θεσπίσει όρια όπως και σε πιο στάδιο πρέπει να εφαρμόζονται αυτά για τη μείωση του κινδύνου νόσησης. Πιο συγκεκριμένα για τα ελληνικά δεδομένα έχει εκδοθεί ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών

κριτηρίων για τα τρόφιμα όπου αναγράφεται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 στα μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα τα όρια ανά κατηγορία τροφίμου. Πιο αναλυτικά αναφέρονται όλα τα όρια στον **ΠΙΝΑΚΑ 10**.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ	ΟΡΙΟ	ΣΤΑΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ
Έτοιμα προς κατανάλωση για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	Απουσία σε 25g τροφίμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια συντήρησης τους
Έτοιμα προς κατανάλωση ικανά να αναπτύξουν <i>Listeria monocytogenes</i> διαφορετικά από αυτά που προορίζονται για βρέφη και ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	100cfu/g τροφίμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια συντήρησής τους
	Απουσία σε 25g τροφίμου	Πριν αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπευθύνου της επιχείρησης τροφίμων που παράχθηκε
Έτοιμα προς κατανάλωση μη ικανά να αναπτύξουν <i>Listeria monocytogenes</i> διαφορετικά από αυτά που προορίζονται για βρέφη και ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	100cfu/g τροφίμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια συντήρησης τους

Πίνακας 10. Αποδεκτά μικροβιολογικά όρια εμφάνισης *Listeria monocytogenes* ανά κατηγορία τροφίμου

Η ανίχνευση και η ταυτοποίηση της *Listeria monocytogenes* σε τρόφιμα ξεκίνησαν ακολουθώντας τις παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας με εμπλουτισμό σε εκλεκτικό υπόστρωμα και έπειτα επιβεβαίωση των τυχόν ύποπτων αποικιών λαμβάνοντας υπόψη την μορφολογία τους, τη φυσιολογία τους καθώς και τα βιοχημικά του χαρακτηριστικά. Η *Listeria monocytogenes* ανήκει στην κατηγορία των ράβδων που δεν σχηματίζει σπόρια και κινείται με χρήση μαστιγίων, και είναι όπως έχει προαναφερθεί Gram (+) βακτήριο και θετικό στην καταλάση. Κάθε αρνητικό αποτέλεσμα σε τρόφιμο μπορεί να επιβεβαιωθεί σε 3-4 ημέρες και για το θετικό αποτέλεσμα απαιτούνται από 5-7 ημέρες από την αρχή της ανάλυσης του δείγματος. (Rui Magalhães, 2014) (ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1)

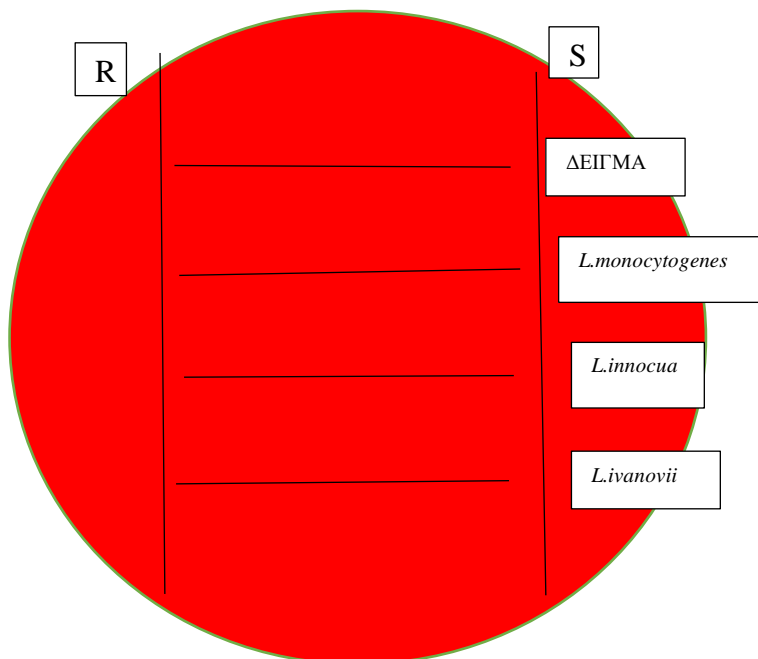


Σχεδιάγραμμα 1. Σχηματική απεικόνιση ανίχνευσης και καταμέτρησης *Listeria monocytogenes*

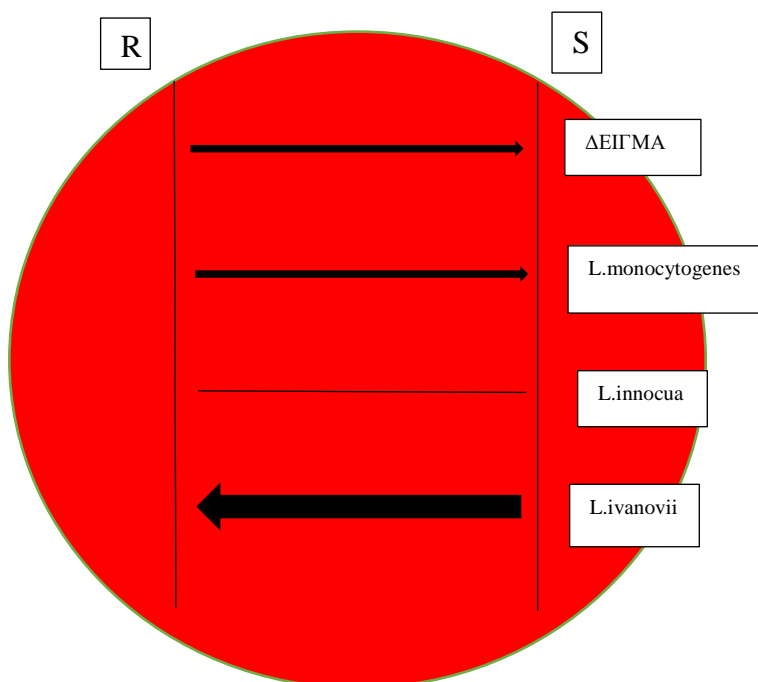
Πιο αναλυτικά, στη διαδικασία ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes* το αρχικό βήμα είναι η δειγματοληψία του τροφίμου όπου στη συνέχεια υποδειματίζεται μέρος του (συνήθως χρησιμοποιούνται είτε 25g ή 25mL τροφίμου ή 10g ή 10mL τροφίμου) και πραγματοποιείται ενοφθαλμισμός με εμπλουτιστικό μέσο (225g ή 225mL) το οποίο περιέχει τη μισή συγκέντρωση από ακριφλαβίνη και ναλιδιξικό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται και ως αραιωτικό μέσο (LHF – *Listeria* Half Fraser Broth). Στη συνέχεια τοποθετείται σε κλίβανο στους 30°C για 24 έως 26 ώρες. Μετά των πέρας των ωρών αυτών την δεύτερη ημέρα ακολουθεί ο δεύτερος ενοφθαλμισμός σε εμπλουτιστικό μέσο (FF- Full Fraser Broth) με πλήρη συγκέντρωση από ακριφλαβίνη και ναλιδιξικό οξύ με 0,1mL καλλιέργειας που λαμβάνεται από το πρώτο στάδιο. Τοποθετείται σε κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες. Σε αυτό το στάδιο με έναν κρικοφόρο στυλέο λαμβάνεται ποσότητα η οποία καλλιεργείται απευθείας σε τρυβλίο ALOA (Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti) και με διαφορετικό κρικοφόρο στυλέο πραγματοποιείται σπορά σε ένα ακόμα εκλεκτικό τριβλίο LP (*Listeria* Palcam) και τοποθετούνται και αυτά σε κλίβανο στους 37°C για 24 έως 26 ώρες. Την τρίτη ημέρα από το FF λαμβάνεται ποσότητα με κρικοφόρο στυλέο και καλλιεργείται σε τρυβλίο ALOA αλλά και σε τρυβλίο LP και τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37°C για 24 έως 26 ώρες. Τα τριβλία ALOA και LP από την δεύτερη ημέρα ελέγχονται για τυχόν πιθανές αποικίες που μπορεί να έχουν δημιουργηθεί χρώματος μπλε – πράσινο και μαύρου χρώματος αντίστοιχα με χαρακτηριστική άλω γύρω από αυτές. **(ΕΙΚΟΝΑ 9) (ΕΙΚΟΝΑ 10)**. Την τέταρτη ημέρα αφαιρούνται τα τριβλία ALOA και LP από τον κλίβανο και ελέγχονται για πιθανές αποικίες και αυτά χρώματος μπλε - πράσινο και μαύρου αντίστοιχα με άλω γύρω από αυτές και αν υπάρχουν προχωράει η διαδικασία με επιβεβαίωση τους.

Οι ύποπτες αποικίες λαμβάνονται με κρικοφόρο στυλέο και καλλιεργούνται σε μη εκλεκτικό υπόστρωμα TSYEA (Tryptone Yeast Soya Extract Agar) που επιτρέπει στις απομονωμένες αποικίες να αναπτυχθούν και τοποθετείται το τρυβλίο σε κλίβανο στους 37°C για 18 έως 24 ώρες. Την πέμπτη ημέρα από το τριβλίο TSYEA πραγματοποιείται η διαδικασία της καταλάσης όπου σε αντικειμενοφόρο πλάκα διαλύεται μία αποικία με μία σταγόνα διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου και αν δημιουργηθούν φυσαλίδες αερίου τότε πρόκειται για μία

θετική αντίδραση. Έπειτα πραγματοποιείται η διαδικασία της χρώσης Gram όπου μικροσκοπικά ελέγχεται αν τα βακτήρια είναι θετικά (μπλε – ιώδες χρώμα) ή αρνητικά (ερυθρό χρώμα). Στην περίπτωση της *Listeria monocytogenes* είναι μπλε – ιώδες χρώμα δηλαδή θετικά. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η διαδικασία του CAMP για την ταυτοποίηση ποιου τύπου *Listeria* υπάρχει στο τρόφιμο. Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιείται τρυβλίο Blood Agar (κυρίως με αίμα από πρόβατο) όπου παράλληλα σε κάθετες γραμμές τοποθετείται *Staphylococcus aureus* και *Rhodococcus equi*. Κάθετα σε αυτές τις γραμμές τοποθετείται η αποικία *Listeria* που υπάρχει στο τριβλίο TSYEA, ένα πρότυπο στέλεχος *Listeria monocytogenes*, ένα πρότυπο στέλεχος *Listeria ivanovii*, και ένα πρότυπο στέλεχος *Listeria innocua* κ.α. (ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2). Το τρυβλίο Blood Agar τοποθετείται σε κλίβανο στους 37°C για 18 έως 24 ώρες. Την έκτη ημέρα αφαιρείται το τρυβλίο από τον κλίβανο και παρατηρείται πρώτα αν στην γραμμή με το δείγμα που αναλύεται έχει πραγματοποιηθεί αιμόλυση, όπου σε θετικό δείγμα είναι θετική, και έπειτα παρατηρείται αν έχει δημιουργηθεί στην ένωση του *Staphylococcus aureus* με το δείγμα τόξο όπου πάλι είναι θετική αντίδραση για τη *Listeria monocytogenes*. Σε περίπτωση που το δείγμα έχει δημιουργήσει τόξο με το *Rhodococcus equi* και έχει δημιουργηθεί και χοντρή γραμμή αιμόλυσης τότε πρόκειται για *Listeria ivanovii*, και αν δεν έχει δημιουργηθεί κανένα τόξο πρόκειται για *Listeria innocua*. (ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3)

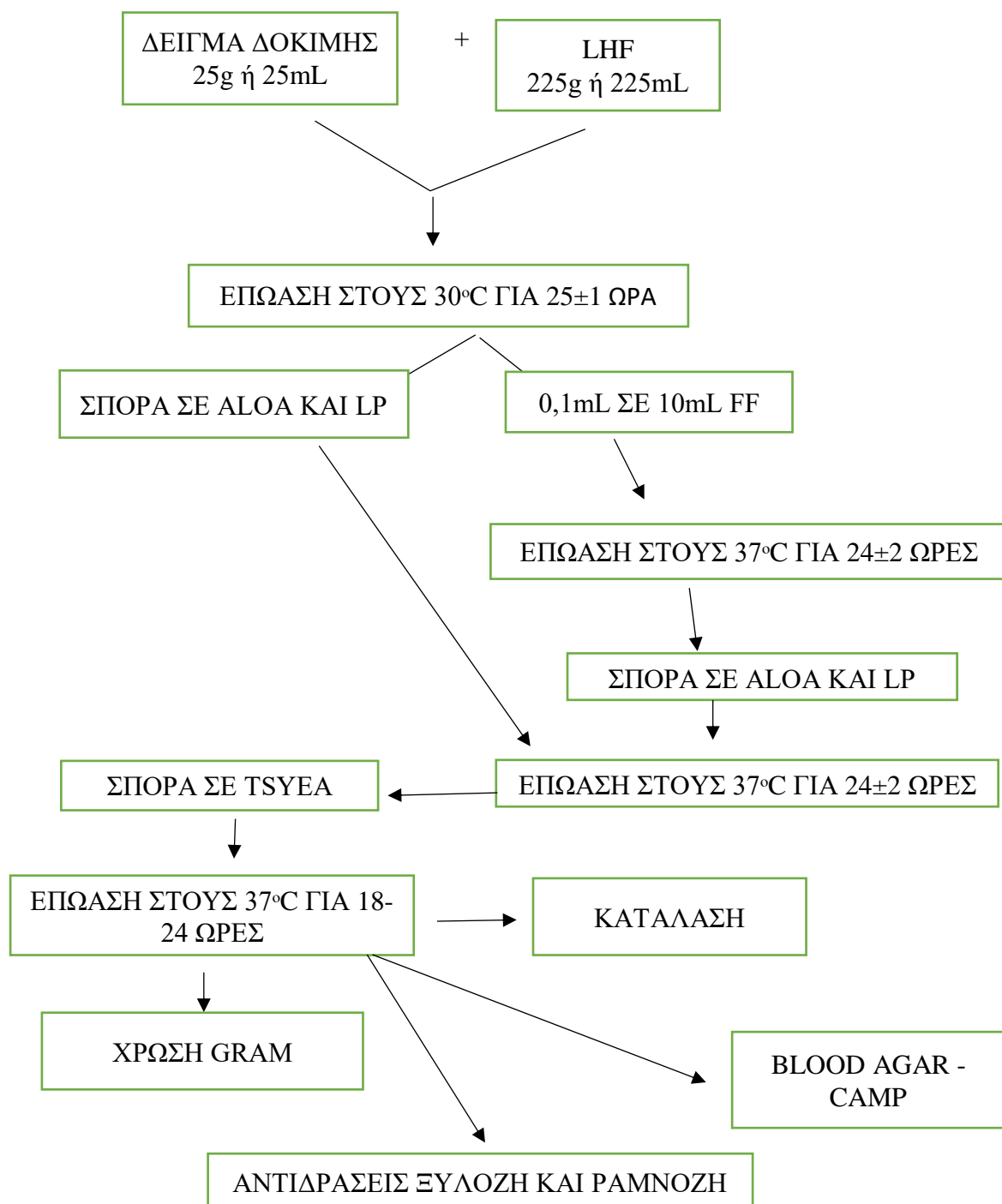


Σχεδιάγραμμα 2. Τρυβλίο Blood agar σχεδιασμένο για τη διαδικασία CAMP



Σχεδιάγραμμα 3. Τρυβλίο Blood agar μετά το πέρας της επώασης του

Τέλος, πραγματοποιείται και η διαδικασία αντίδραση της ραμνόζης και της ξυλόζης όπου για θετικό αποτέλεσμα σε *Listeria monocytogenes* θα πρέπει η ραμνόζη να είναι θετική και η ξυλόζη αρνητική. Για αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιούνται έτοιμα σωληνάκια με ραμνόζη και ξυλόζη το οποία είναι χρωμογόνα και αλλάζουν χρώμα ανάλογα αν είναι θετικά ή όχι. Ακόμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και έτοιμα kit του εμπορίου που διαθέτουν πολλές ακόμα αντιδράσεις ταυτοποίησης της *Listeria*. (ISO, 2017) Η διαδικασία προσδιορισμού συνοψίζεται στο **ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4**.



Σχεδιάγραμμα 4. Διαδικασία προσδιορισμού και επιβεβαίωσης *Listeria monocytogenes*

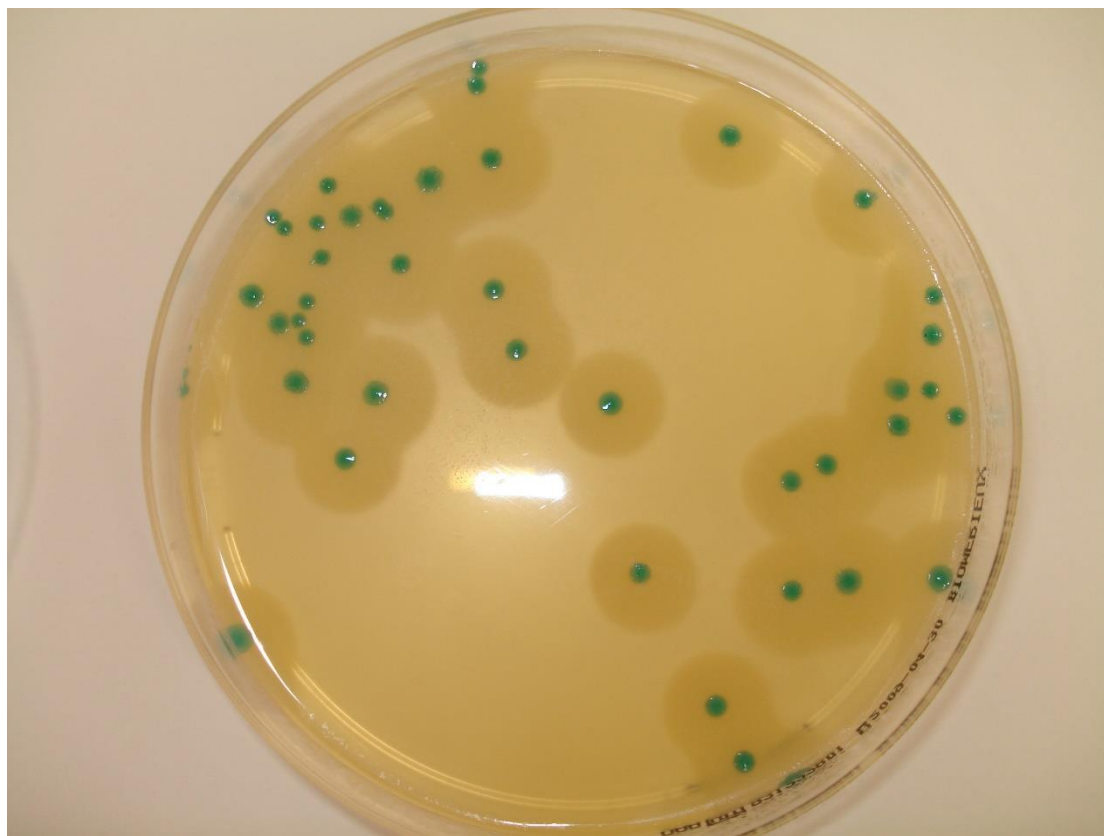
ΕΙΔΟΣ	ΑΙΜΟΛΥΣΗ	ΡΑΜΝΟΖΗ	ΞΥΛΟΖΗ	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+

Πίνακας 11. Συγκριτικές αντιδράσεις σε τρία είδη *Listeria*

(+) : Θετική αντίδραση

(-): Αρνητική αντίδραση

(V): Μεταβλητή αντίδραση



Εικόνα 9. Απεικόνιση τρυβλίου ALOA με χαρακτηριστικές αποικίες *Listeria monocytogenes* χρώματος μπλε - πράσινο με άλω γύρω από αυτές. (Boyer, 2021)



Εικόνα 10. Απεικόνιση τρυβλίου LP με χαρακτηριστικές αποικίες *Listeria monocytogenes* χρώματος μαύρου με άλω γύρω από αυτές (Labs)

Όπως έχει γίνει αντιληπτό από όλα τα παραπάνω που αναφέρθηκαν η κλασική μέθοδος ανίχνευσης της *L. monocytogenes* αποτελεί μία αρκετά χρονοβόρα διαδικασία που διαρκεί αρκετές ημέρες έως ότου ολοκληρωθεί και δοθεί θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα. Για το λόγο αυτό αναγνωρίστηκε η ανάγκη δημιουργίας νέων εναλλακτικών μεθόδων οι οποίες θα μπορούν αν ανιχνεύουν σε μικρότερο χρονικό διάστημα το μολυσμένο τρόφιμο αλλά με την ίδια ή παραπλήσια ευαισθησία.

Σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ορίζεται για τις εναλλακτικές μεθόδους ότι θα πρέπει να επικυρώνονται με βάση τον πρότυπο ISO 16140-2 και πάντα συγκριτικά με το πρότυπο ISO 11290-1 που αφορά την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* με την κλασική μέθοδο με καλλιέργεια.

Οι μέθοδοι προς επικύρωση θα πρέπει να πιστοποιούνται από ειδικό φορέα που πληρούν συγκεκριμένες απαιτήσεις και να πραγματοποιείται πλήρη επαναξιολόγηση κάθε 5 χρόνια. Οι φορείς επικύρωσης που πληρούν τα κριτήρια και τις προϋποθέσεις είναι τρεις η Afnor, η Microval η Nordval. Η χρήση διεθνών προτύπων αναφοράς είτε κλασικών μεθόδων είτε

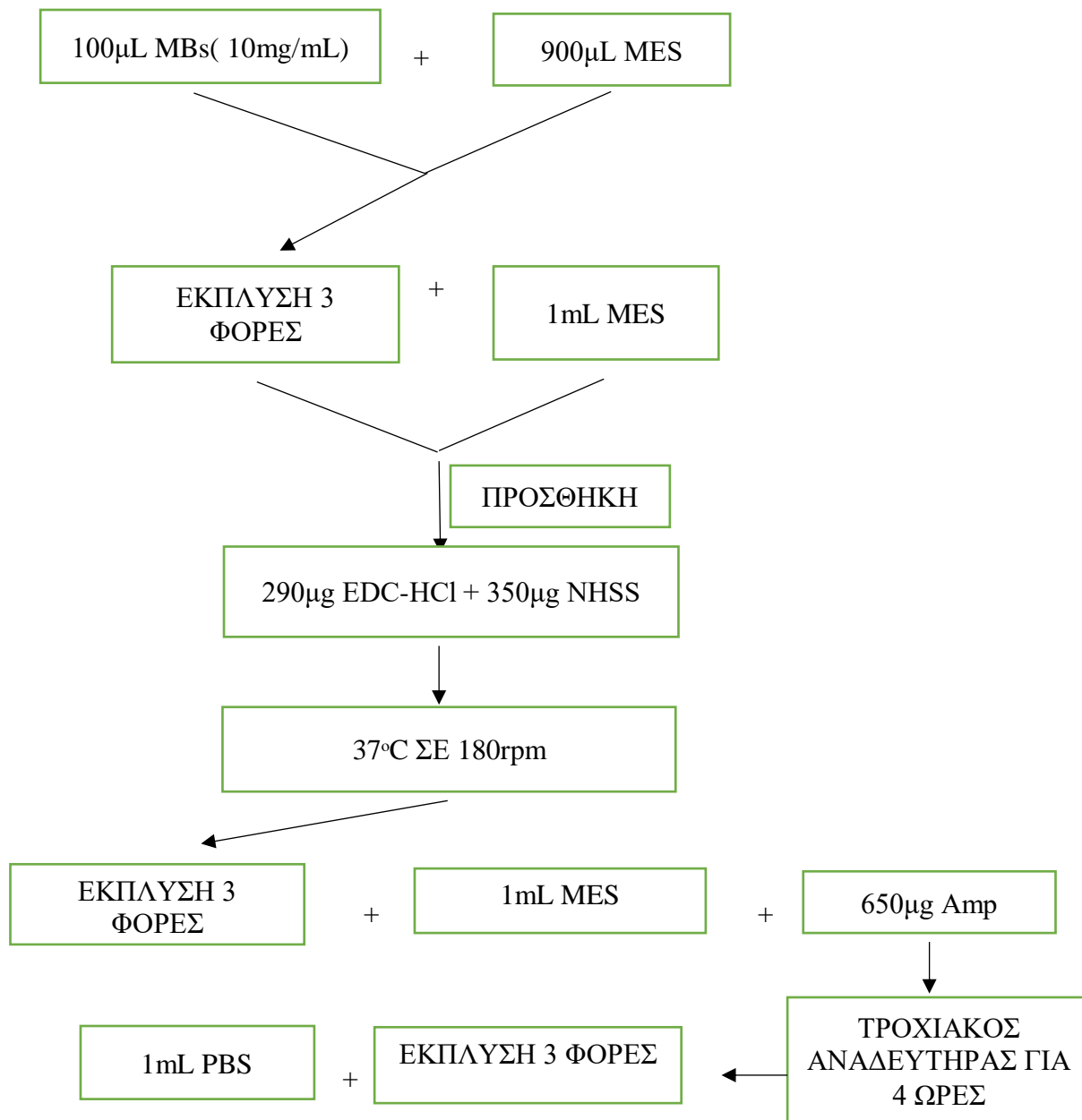
εναλλακτικών από τα διαπιστευμένα εργαστήρια αποτελεί μέσο ελέγχου της ασφάλειας των τροφίμων αλλά και διασφαλίζει αξιόπιστα αποτελέσματα. (Lucas Chikhi, 2024)

Για την ανίχνευση και καταμέτρηση της *Listeria monocytogenes* έχουν αναπτυχθεί κατά το πέρασμα των ετών αρκετές μοριακές τεχνικές οι οποίες θεωρούνται αξιόπιστες αλλά και πολύ πιο γρήγορες σε σχέση με την κλασική καλλιέργεια. Ενδεικτικά, μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί είναι με PCR πραγματικού χρόνου, multiplex PCR, με χρήση ηλεκτρικών βιοαισθητήρων βασισμένο σε LAMP και πολλούς ακόμα συνδυασμούς μεθόδων. Έχουν πραγματοποιηθεί ανά τον κόσμο αρκετές μελέτες και πειράματα εδώ και αρκετά χρόνια σε μεγάλη γκάμα τροφίμων, όπως γαλακτοκομικά, ψάρια, έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, κρέατα ωμά, γάλα, σόγια, θαλασσινά κ.α. Παρακάτω θα αναλυθούν ορισμένες μέθοδοι που έχουν δοκιμαστεί.

Το 2022 δημοσιεύτηκε μία μελέτη για ταχεία και ακριβής ανίχνευση της *L.monocytogenes* σε γάλα στην Κίνα η οποία χρησιμοποίησε συνδυασμό μαγνητικού διαχωρισμού με τη διαμεσολάβηση αντιβιοτικού αμπικιλίνης και ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο. Η μέθοδος αυτή έχει πλέον καθιερωθεί καθώς έχει πολύ υψηλή ειδικότητα και το όριο ανίχνευσης της είναι 10^2 cfu/mL όπου σε νωπό γάλα η συγκέντρωση αυτή είναι πολύ χαμηλή. Κατά τη διάρκεια της έρευνας απορρίφθηκε η μέθοδος της PCR με χρήση ηλεκτροφόρησης γέλης αгарόζης καθώς αρκετά συχνά οδηγεί σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μόλυνσης από νουκλεϊκό οξύ. Έτσι αναπτύχθηκε η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) με ανίχνευση φθορισμού όπου αποφεύγεται η διασταυρούμενη επιμόλυνση. Ο μαγνητικός διαχωρισμός (MS) χρησιμοποιήθηκε καθώς είναι η πιο κοινή μέθοδος προ επεξεργασίας τροφίμων και χρησιμοποιείται ευρέως στον διαχωρισμό και τη συγκέντρωση βακτηρίων λόγω της αντιπαρεμβατικής του ικανότητας, της ταχύτητας και της υψηλής απόδοσης που παρέχει. Αποτελεί μία τεχνολογία βιολογικού διαχωρισμού μέσω της αντίδρασης συγγένειας μεταξύ του τροποποιητή επιφάνειας των μαγνητικών σφαιριδίων (MBs) και πραγματοποιείται αποτελεσματικός εμπλουτισμός και διαχωρισμός των υπό μέτρηση στόχο μέσω της δράσης ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Η αμπικιλίνη (Amp) είναι ένα αντιβιοτικό β-λακτάμης και έχει ως πλεονεκτήματα την ισχυρή ικανότητα αναγνώρισης, την απλή προετοιμασία και τον εύκολο συνδυασμό της με πρωτεΐνες που δεσμεύουν την πενικιλίνη (PBPs) σε βακτηριακές κυτταρικές μεμβράνες. Γι' αυτούς τους λόγους χρησιμοποιείται ως μόρια αναγνώρισης που τροποποιείται στην επιφάνεια των

μαγνητικών σφαιριδίων για τον εντοπισμό και τη σύλληψη των βακτηρίων. (Xuekun Bai, 2022)

Την πρώτη ημέρα χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα στελέχη *Listeria monocytogenes* τα οποία καλλιεργήθηκαν σε εκλεκτικά υποστρώματα με άγαρ με σπορά και τοποθετήθηκαν στους 37°C για 18 ώρες. Την επόμενη ημέρα συλλέχθηκαν από τα τριβλία απομονωμένες αποικίες και καλλιεργήθηκαν σε εμπλουτιστικό μέσο ζωμού έγχυσης εγκεφαλικής καρδιάς (Brain heart infusion -BHI) και έπειτα τοποθετήθηκαν στους 37°C για 24 ώρες πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα με στροφές 180 rpm. Την τρίτη ημέρα πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις με τη βοήθεια αλατούχου φωσφορικού υποστρώματος. Για την παρασκευή Amp-MB χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση EDC/NHSS (Υδροχλωρικό N- (3-διμεθυλαμινοπροπολ) –N’ – αιθυλοκαρβοδιιμίδιο / άλας νατρίου N-υδροξυσουλφοηλεκτριμιδίου) το οποίο παρασκευάστηκε ως εξής: 100 μ L MBs των 10 mg/mL προστέθηκαν σε 900 μ L ρυθμιστικού διαλύματος MES και εκπλύθηκαν 3 φορές κάτω από το μαγνητικό πεδίο και έπειτα προστέθηκαν σε 1mL MES. Έπειτα προστέθηκαν στο εναιώρημα αυτό 290 μ g EDC-HCl και 350 μ g NHSS έτσι ώστε να ενεργοποιηθούν τα MBs (καρβοξυλιωμένα μαγνητικά σφαιρίδια) και τοποθετήθηκαν στους 37°C σε στροφές 180 rpm. Έγινε διαχωρισμός του μίγματος και εκπλύθηκε τρεις φορές και στη συνέχεια επανατοποθετήθηκε σε 1mL MES για να ολοκληρωθεί η ενεργοποίηση των MBs. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 650 μ g Amp και τοποθετήθηκαν σε τροχιακό αναδευτήρα για 4 ώρες. Με αυτό τον τρόπο σχηματίστηκαν Amp-MB τα οποία πρώτα εκπλύθηκαν τρεις φορές για να εξαλειφθεί η μη δεσμευμένη αμπικιλίνη και προστέθηκε 1 mL αλατούχου διαλύματος ρυθμισμένο με φωσφορικά (PBS. Η συγκέντρωση του τελικού προϊόντος ήταν 1 mg/mL. (ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5)



Σχεδιάγραμμα 5. Διαδικασία παρασκευής Amp - MB

Έπειτα από της διαδικασίες παρασκευής των Amp-MB και της απομόνωσης του πρότυπου στελέχους ξεκίνησε η διαδικασία διαχωρισμού Amp-MB και *L. monocytogenes*. Ελήφθησαν 100 μL πρότυπου στελέχους με συγκέντρωση $4,2 \times 10^5$ cfu/mL και 70μL Amp-MBs και προστέθηκαν σε 830μL (PBS) και τοποθετήθηκαν σε τροχιακό αναδευτήρα για 15 λεπτά στους 37°C με στροφές 180 rpm. Για την επιτυχή λήψη *L. monocytogenes*-Amp-MBS και υπερκειμένου έγινε μαγνητικός διαχωρισμός για 5 λεπτά μετά το τέλος της επώασης. Για να

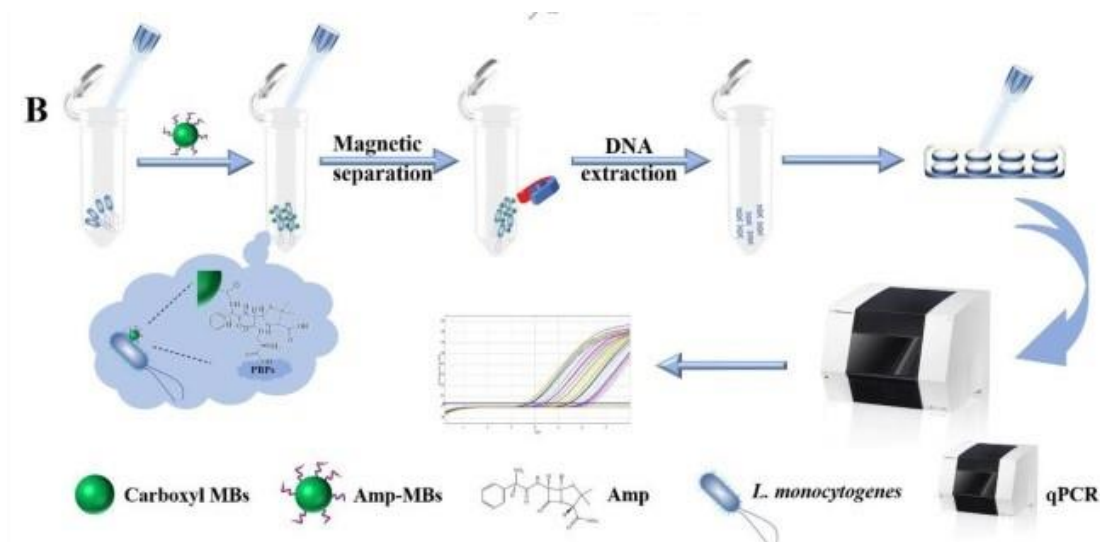
επιτευχθεί η λήψη του DNA της *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε μέθοδος βρασμού νερού όπου στο εναιώρημα προστέθηκαν 200 μL αποστειρωμένου νερού και τοποθετήθηκαν σε βραστό νερό για 20 λεπτά και αμέσως μετά το πέρας των λεπτών στους 4°C για 5 λεπτά. Έγινε μαγνητικός διαχωρισμός και το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε στις 9600 στροφές για 5 λεπτά και έπειτα συλλέχθηκε το υπερκείμενο αυτού. Οι ειδικοί εκκινιτές που σχεδιάστηκαν, δοκιμάστηκε η ειδικότητα τους μέσω του αλγόριθμου BLAST στη βάση δεδομένων του NCBI για την ενίσχυση της qPCR με ακολουθία 5'-3- είναι:

- F: AAACCTTCGGCGCAATCAGTG
- R: GCGCTTGCAACTGCTCTTTTA

Η ειδικότητα των εκκινητών ελέγχθηκε και με τη δοκιμασία PCR. Το γονίδιο – στόχος που κωδικοποιεί την λιστεριοσίνη είναι το *hly* με μήκος 143 bp και είναι το μοναδικό που εμφανίζει θετικά σήματα μόνο για τη *L. monocytogenes*. Για την ενίσχυση της qPCR χρησιμοποιήθηκαν 20 μL συνολικός όγκος όλων των αντιδραστηρίων που σε αυτά συμπεριλαμβάνονται 10 μL qPCR SYBR Green Master Mix, 6,25 μL ddH₂O, 2 μL εκμαγείου DNA, 0,3125 μM ειδικών εκκινητών. Εν συνεχεία η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι σύμφωνα με τα βασικά βήματα της qPCR.

1. Μετουσίωση στους 95°C για 3 λεπτά
2. 40 κύκλοι, συμπεριλαμβανομένης της μετουσίωσης στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα
3. Υβριδίαση στους $52,3^\circ\text{C}$ για 30 δευτερόλεπτα
4. Τα προϊόντα ενίσχυσης αναλύθηκαν με αύξηση της θερμοκρασίας τήξης
5. Θέρμανσης της καμπύλης τήξης στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, μείωση στους 60°C για 1 λεπτό και σταδιακή αύξηση στους 95°C
6. Αποδιάταξη προϊόντων για 30 δευτερόλεπτα στους 95°C .

Τα σήματα φθορισμού που συλλέχθηκαν υποβλήθηκαν σε επεξεργασία μέσω προγράμματος. Για την ανίχνευση δείγματος γάλακτος πραγματοποιήθηκε αραίωση του 10 φορές και έπειτα λαμβάνεται ποσότητα 100 μL και 100 μL από *L. monocytogenes*-Amp-MBs και προστίθενται όλα μαζί σε 730 μL αποστειρωμένου PBS και αναμιγνύονται πολύ καλά. Στη συνέχεια επώαση για 15 λεπτά και έπειτα μαγνητικός διαχωρισμός για να προχωρήσει μετά η εκχύλιση DNA και η ενίσχυση της qPCR. Για να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα της μεθόδου για τη *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκαν και άλλα πρότυπα στελέχη *Listeria* όπως η *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* και η *L. innocua*. (Xuekun Bai, 2022) **(ΕΙΚΟΝΑ 11)**



Εικόνα 11. Διαδικασία ανίχνευσης *L.monocytogenes* με στρατιγική Amp-MBs-qPCR
(Xuekun Bai, 2022)

Σε μία άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2021 στην Κίνα έγινε η προσπάθεια ταυτοποίησης της *L. monocytogenes* με real-time PCR και συγκεκριμένα για τον ορότυπο 4c. Όσο αφορά τους ορότυπους της *L. monocytogenes* με βάση τα σωματικά και μαστιγικά του αντιγόνα έχουν ταξινομηθεί σε 14 ορότυπους οι οποίοι κατηγοριοποιούνται σε 5 ακόμα υποομάδες. Οι υποομάδες αυτές είναι:

1. 1/2a-3a
2. 1/2c-3c
3. 4b-4d-43
4. 1/2b-3b-7 και
5. 4a-4c

Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στους ορότυπους 1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b πολύ λιγότερο στους υπόλοιπους. Όμως, τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η πιθανότητα στελεχών ορότυπου 4c σε υδρόβια προϊόντα. Και ενώ για τους υπόλοιπους ορότυπους έχουν περιγραφεί αρκετοί μοριακοί στόχοι για την ανίχνευση με PCR για τον ορότυπο 4c δεν υπήρχε κάποια μελέτη στο παρελθόν. Έτσι, λόγω αυτών των δεδομένων και με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων του Εθνικού Κέντρου Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας (NCBI) και τη συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση ελήφθησαν νέοι μοριακοί στόχοι ειδικοί για τον ορότυπο 4c για τη μέθοδο real-time PCR. (Fan Li, 2021)

Η αρχική διεργασία περιλάμβανε τη λήψη αλληλουχιών γονιδιώματος, από τη βάση δεδομένων NCBI Genome, *Listeria* στο σύνολο τους 160 στις οποίες συμπεριλήφθηκαν και 12 ορότυποι *L.monocytogenes* και 14 άλλα είδη *Listeria*. Ελέγχθηκαν τα γονίδια που ταίριαζαν στις γονιδιωματικές αλληλουχίες ορότυπου 4c όπου έχει 100% παρουσία σε στελέχη *L.monocytogenes* ορότυπου 4c και απουσία σε άλλα στελέχη *Listeria*. Και τέλος με το πρόγραμμα BLAST ελέγχθηκαν για να εξασφαλιστεί η εξειδίκευση τους. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν 195 πρότυπα στελέχη *Listeria* εκ των οποίων τα 177 ήταν *L.monocytogenes* που ανήκαν σε 12 διαφορετικούς ορότυπους. Τα πρότυπα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε εμπλουτιστικό μέσο BHI στους 37°C σε τροχιακό αναδευτήρα σε στροφές 180 rpm. Για να γίνει γνωστή η ακριβής συγκέντρωση των πρότυπων στελεχών πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις και ακολουθήθηκε η διαδικασία της κλασικής καλλιέργειας σε τριβλία με εκλεκτικό υπόστρωμα. Έπειτα λήφθηκε 1 mL από τα εναιωρήματα της κάθε καλλιέργειας και χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή DNA χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό kit αίματος και ιστών με την ονομασία DNeasy και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Έπειτα, δημιουργήθηκε σετ εκκινητών το οποίο σχεδιάστηκε με το λογισμικό Oligo 7.0 και δίδονται στον ΠΙΝΑΚΑ 12.

(Ane Rivas-Macho U. E.-A.-d.-C., 2024)

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΜΗΚΟΣ ΑΚΟΛΥΘΙ ΑΣ /bp	ΕΚΚΙΝΗΤ ΗΣ	ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ 5'-3'	ΜΗΚΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ /bp	ΕΙΔΙΚΟ ΤΗΤΑ ΟΡΟΤΥ ΠΟΥ
<i>SLCC237</i> <i>6_00063</i>	1119	4c-1-293F	ATTAGAGCC ACGAAACAG	293	-
<i>SLCC237</i> <i>6_00062</i>	1614	4c-1-293R	TAACTCCGC TTGATAAAC	524	+
		4c-2-524F	ATAGCCCAG AAGGACAAG		
<i>SLCC237</i> <i>6_00822</i>	369	4c-2-524R	CGCATTCTCA TCATTATCTA C	274	+

		4c-3-274F	CAACAGAAC TAGAAATCC CCAC		
--	--	-----------	--------------------------------	--	--

Πίνακας 12. Γονίδια - στόχοι και εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* ορότυπου 4c

Από τις τρεις υποψήφιες αλληλουχίες που επιλέχθηκαν για να σχεδιαστούν τα σετ εκκινητών οι δύο από τους τρεις στόχους εμφάνισαν 100% συνεκτικότητα για τα στελέχη *L.monocytogenes* ορότυπο 4c.

Το μίγμα PCR 20 μ L που υπάρχει στο kit εμπορίου περιέχει 10 μ L μείγματος 2 x Taq Master, 0,5 μ L από τον κάθε εκκινητή, 2 μ L πρότυπου DNA-στόχου και 7,5 μ L απιονισμένο νερό. Η διαδικασία της real-time PCR που ακολουθήθηκε για τα γονίδια-στόχους έχει ως εξής:

1. Αποδιάταξη αρχικού δείγματος στους 95°C για 10 λεπτά
2. Μετουσίωση για 35 κύκλους στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
3. Υβριδίαση στους 55°C για 30 δευτερόλεπτα
4. Επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

Μετά το πέρας της ενίσχυσης PCR τα προϊόντα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση γέλης αгарόζης 1,5% και η οπτικοποίηση τους έγινε με χρώση GoldView στο υπεριώδες φως.

Για την διαδικασία real-time PCR για την ανίχνευση της *L.monocytogenes* ορότυπου 4c ο συνολικός όγκος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 25 μ L όπου συμπεριλαμβάνονται 12,5 μ L TB Green Premix Ex Taq, 1 μ L εκκινητών προς τα εμπρός και αντίστροφα, 8,5 μ L αποστειρωμένο νερό και 2 μ L βακτηριακού γονιδιωματικού DNA που χρησιμοποιείται ως πρότυπο. Η διαδικασία της real-time PCR που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

1. Μετουσίωση DNA στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
2. 40 κύκλοι μετουσίωσης στους 95°C για 5 δευτερόλεπτα
3. Υβριδίαση στους 55°C για 60 δευτερόλεπτα

Ως αρνητικός μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο νερό για να διασφαλιστεί η απουσία μολυσματικού παράγοντα. Η ενίσχυση PCR έγινε εις τριπλούν με παράλληλη ανάλυση.

Για να επιτευχθεί η τελική επικύρωση της μεθόδου καθώς και η ακρίβεια της τεχνικής real-time PCR συλλέχθηκαν 23 δείγματα από τις τοπικές αγορές της πόλης Guangzhou της Κίνας. Στην αρχή ελέγχθηκαν τα δείγματα με την κλασική μέθοδο καλλιέργειας και μόνο ένα από τα 23 ήταν θετικό στην *L.monocytogenes* ορότυπο 4c. Το δείγμα αυτό ταυτοποιήθηκε και με την

μέθοδο real-time PCR ενώ όλα τα υπόλοιπα βγήκαν αρνητικά. Το θετικό ποσοστό ανίχνευσης σύμφωνα με τη μελέτη ανέρχεται στο 7,92%. (Fan Li, 2021)

Πολύ πρόσφατα τον Σεπτέμβριο του 2024 δημοσιεύθηκε μία μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στην Ισπανία που χρησιμοποίησε την τεχνική ισοθερμικής ενίσχυσης μέσω βρόγχου (LAMP) ως εναλλακτική επιλογή της ενίσχυσης PCR, η οποία είναι πιο ανεκτική στους αναστολείς και συμβατή για δείγματα που δεν πραγματοποιείται εκχύλιση. Ακόμη είναι πολύ ευκολότερη να πραγματοποιηθεί επιτόπου σε κρίσιμα σημεία ελέγχου σε εργοστάσια τροφίμων από ότι η ενίσχυση PCR. Η θερμοκρασία που απαιτείται για τη μέθοδο LAMP είναι σταθερή περίπου 65°C και αυτό την καθιστά απλούστερη σε συσκευές δοκιμής σημείου (point-of-test POT). Ακόμα, τα προϊόντα ενίσχυσης της μεθόδου LAMP μπορούν να ανιχνευθούν με ηλεκτροχημική μεταγωγή με τη χρήση ενός παρεμβαλλόμενου οξειδοαναγωγικού ενεργού μορίου. Ο συνδυασμός αυτός σε συνδυασμό με τις συσκευές POT διευκολύνει τις ανάγκες ανίχνευσης της *L.monocytogenes* κυρίως στα εργοστάσια. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες έχουν ως πλεονεκτήματα την υψηλή ευαισθησία, τα γρήγορα αποτελέσματα, τα χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης καθώς και την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών δειγμάτων. Στην μελέτη αυτή στόχος ήταν η ανίχνευσης 1 cfu/25g *L.monocytogenes* σε τρόφιμα. (Ane Rivas-Macho U. E.-A.-d.-C., 2024)

Για τις ανάγκες της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα στελέχη μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένου και της *L.monocytogenes* διαφόρων ορότυπων. Τα πρότυπα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες. Η εξαγωγή του DNA από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν πραγματοποιήθηκε με kit του εμπορίου που ονομάζεται Quick-DNA Fungal / Bacterial Microprep και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε καθαρή καλλιέργεια στελέχους *L.monocytogenes* ορότυπου 4b και κατάλληλη αραιωμένο έως ότου φτάσει στο επιθυμητό όριο ανίχνευσης (LOD). Τα δείγματα τροφίμων τα προμηθεύτηκαν από τοπικό σούπερ μάρκετ και ήταν γαλακτοκομικά προϊόντα, καπνιστός σολομός, πατέ, ζαμπόν, έτοιμα σάντουιτς, γάλα σε σκόνη, χούμους και μαρούλι. Τα δείγματα αυτά ελέγχθηκαν με τη μέθοδο εκχύλισης για να επιβεβαιωθεί η απουσία *L.monocytogenes* στα τρόφιμα. Πρότυπο στέλεχος *L.monocytogenes* με συγκέντρωση 1cfu/mL εμβολιάστηκε στα δείγματα τροφίμων που αγοράστηκαν. Έπειτα ζυγίστηκαν 25 g τροφίμου και προστέθηκαν σε αυτά 225 mL εμπλουτιστικό μέσο LHF, ομογενοποιήθηκε το δείγμα και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες.

Για το σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό PrimerExplorerv5 και επιλέχθηκαν οι βέλτιστοι με βάση κριτηρίων ειδικότητας και ευαισθησίας και επιλέχθηκε το γονίδιο *iap* το οποίο κωδικοποιεί την εξωκυτταρική πρωτεΐνη p60 της *L.monocytogenes* η οποία είναι απαραίτητη για τη διαίρεση και τη βιωσιμότητα των βακτηρίων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

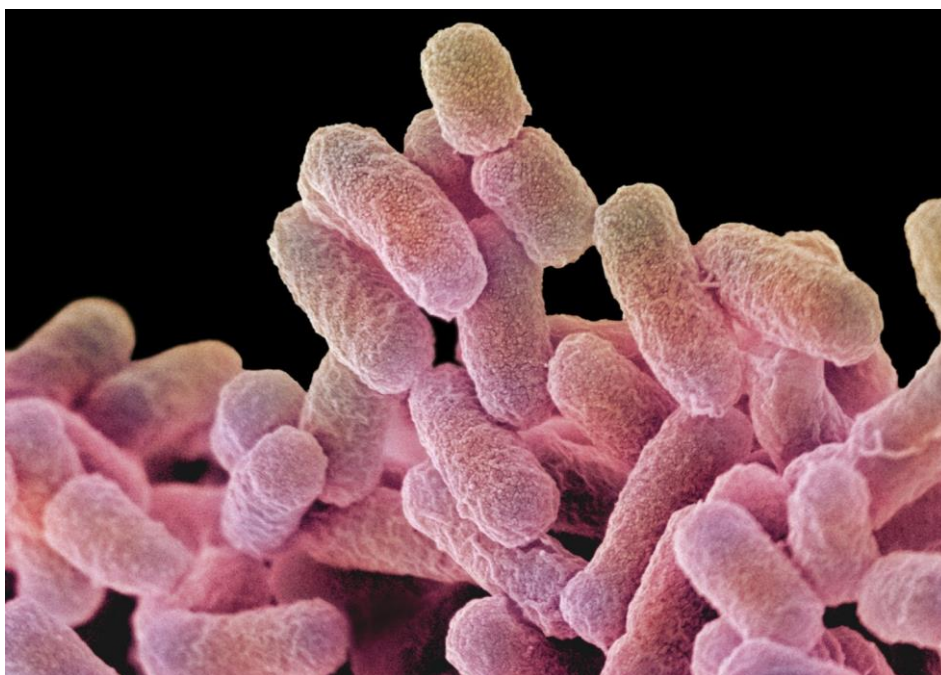
- FIP: 5'-CCG CCT TTG ATT GAC GTA ATA ATA CGC GCA ACT TGG TTA AAC G-3'
- BIP: 5'-GTT GAA TCA ACC GAA TCT AAT GGC ACC GTT AAC GAA ACC AGT T-3'
- Loop-F: 5'-TGT TAT CAA CAC CAG CGC-3'
- Loop-B: 5'-GGA ACA AAA TTA CTT ACA ACG ACG G-3
- F3: 5'-GCT GCT GAA AAA ACA GAG AA-3'
- B3: 5'-TGC TTG CTA CTT TGT CAG TT-3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης LAMP ήταν 25 μ L και αποτελούνταν από 4 μ L εκκινητών FIP και BIP 1,6 μ M, εκκινητών Loop-F και Loop-B 0,8 μ M, εκκινητών F3 και B3 0,2 μ M, 2,5 ρυθμιστικού διαλύματος 10X Bst Large, 1 μ L MgSO₄ 100 mM, 3,5 μ L μίγματος από το διάλυμα dNTP, 5 μ L Bst μεγάλου 8 U/ μ L, 1 μ L βηταΐνη 5 M και 2,5–5 μ L δείγματος. Έπειτα προστέθηκε 1 μ L καλσεΐνης, 625 μ M όπου συνδέεται με την ανίχνευση του πυροφωσφορικού παραπροϊόντος που παράγεται κατά τη διάρκεια της ισοθερμικής αντίδρασης και αφαιρεί τα ιόντα μαγνησίου για να γίνει εκπομπή του φθορισμού και αποτέλεσμα αυτού η παραγωγή φωσφορικού μαγγανίου που σχηματίζει ίζημα καθιστώντας το ικανό να ανιχνευθεί και οπτικά με αλλαγή χρώματος στο τελικό σημείο της αντίδρασης. Η χρωστική ουσία που χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα τροφίμων ήταν το μπλε του μεθυλενίου (Methyl Blue) το οποίο είναι γνωστό ότι δεν αναστέλλει την ενίσχυση του DNA. Η ενίσχυση LAMP πραγματοποιήθηκε στους 63°C για 40 λεπτά και το σήμα φθορισμού ελέγχονταν από θερμοκυκλωτή σε διαστήματα 60 δευτερολέπτων. Με την ανάλυση LAMP επιτεύχθηκε η ανίχνευση όλων των μολυσμένων τροφίμων με *L.monocytogenes* εκτός ενός και έγινε και παράλληλη επαλήθευση με τη μέθοδο αναφοράς με τα ίδια αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν και 100% ειδικότητας στα πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για όλους τους ορότυπους και με LOD 1 cfu/g με δυνατότητα έκδοσης αποτελέσματος σε λιγότερο

από μία ώρα έπειτα από τον εμπλουτισμό που πραγματοποιήθηκε για 24 ώρες. (Ane Rivas-Macho U. E.-A.-d.-C., 2024)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο – *Salmonella* spp.

Η *Salmonella* spp. αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1884 από τον Theobald Smith και ονομάστηκε *Salmonella choleraesuis*. (Siti Nur Hazwani Oslan, 2024). Η *Salmonella* είναι ένας Gram (-) βάκιλος ο οποίο αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παθογόνους μικροοργανισμούς που προκαλεί πολύ σοβαρές λοιμώξεις στον ανθρώπινο οργανισμό. (ΕΙΚΟΝΑ 12). Συναντάται στο περιβάλλον και εξαπλώνονται με ταχείς ρυθμούς στον άνθρωπο και στα ζώα με αποτέλεσμα σοβαρές τροφολοιμώξεις. Μπορεί να χαρακτηριστεί από αυξημένη αντοχή σε αρκετούς αντιμικροβιακούς παράγοντες και αυτό την καθιστά σοβαρή απειλή για την δημόσια υγεία. (Linlin Xiao, 2024). Εντοπίζεται κυρίως σε έντερα ζώων, κυρίως κοτόπουλων, χοίρων και βοοειδών αλλά και σε άγρια ζώα όπως πουλιά, ερπετά και τρωκτικά. Η μετάδοση της στον άνθρωπο πραγματοποιείται είτε του στόματος. Είτε μέσω της επαφής με μολυσμένα ζώα ή των κοπράνων τους είτε μέσω μολυσμένων τροφίμων ή υδάτων. (Siti Nur Hazwani Oslan, Rapid and sensitive detection of *Salmonella* in agro-Food and environmental samples: A review of advances in rapid tests and biosensors, 2024). Η ορολογική του ταυτοποίηση βασίζεται στη μεθοδολογία White-Kauffmann-Le Minor που χρησιμοποιείται παγκοσμίως με χρήση τριών αντιγόνων, το αντιγόνο H (μαστιγωτό), το αντιγόνο O (σωματικό) και το αντιγόνο Vi (καψικό). (Siti Nur Hazwani Oslan, 2024)



Εικόνα 12. Απεικόνιση *Salmonella* spp. (Schell, 2020)

Στα πτηνά η *Salmonella spp.* μπορεί να προκαλέσει την ασθένεια pullorum που έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη όρεξη για φαγητό και διάρροια σε νεοσσούς και υψηλή θνησιμότητα την πρώτη εβδομάδα ζωής. Στις μονάδες εκτροφής χοίρων προσβάλλονται κυρίως τα μικρά χοιρίδια και προκαλούν την ασθένεια παρατύφη των χοίρων που οδηγεί σε σηψαιμία, νεκρωτική εντερίτιδα και σε ορισμένες περιπτώσεις και εγκεφαλίτιδα. (Boyan Guo, 2024). Στον άνθρωπο σε περίπτωση κατανάλωσης μολυσμένου τρόφιμου με συγκέντρωση $10^5 - 10^6$ CFU προκύπτει τροφική δηλητηρίαση λόγω των τοξινών που παράγονται με συμπτώματα όπως πυρετός, γαστρεντερίτιδα, τύφο και παρατύφο. (Siti Nur Hazwani Oslan, Rapid and sensitive detection of Salmonella in agro-Food and environmental samples: A review of advances in rapid tests and biosensors, 2024)

Μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί πάνω από 2.600 ορότυποι *Salmonella* που έχουν την δυνατότητα να προκαλέσουν διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ ανθρώπων και ζώων με τους δύο πιο διαδεδομένους ορότυπους παγκοσμίως να είναι η *Salmonella typhimurium* που προκαλεί τον τυφοειδή πυρετό και η *Salmonella enterica enteritidis* που προκαλεί τον μη τυφοειδή πυρετό. (Boyan Guo, 2024)

Ο ΠΟΥ σε δημοσίευση του αναφέρει ότι οι λοιμώξεις που προκαλούνται από *Salmonella* σε τρόφιμα είναι υπεύθυνες για την απώλεια συνολικά 6,43 εκατομμυρίων ετών ζωής παγκοσμίως, που το κατατάσσει στην πρώτη θέση σε σύγκριση με οποιοδήποτε άλλο παθογόνο. (Cesare, 2018). Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων ανακοίνωσε το 2021 για τα 27 κράτη μέλη της Ε.Ε 60.500 κρούσματα μολύνσεων από *Salmonella*. (Yue Huo, 2023). Ακόμα, παγκοσμίως εκτιμάται ότι κάθε χρόνια η *Salmonella* προκαλεί κατά προσέγγιση 100 εκατομμύρια κρούσματα γαστρεντερίτιδας και πάνω από 100.000 θανάτους. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Κίνα από το 2015 έως το 2023 συλλέχθηκαν συνολικά 1945 δείγματα τροφίμων από σούπερ μάρκετ, λαϊκές αγορές, εστιατόρια καθώς και ηλεκτρονικά καταστήματα τροφίμων τα οποία ελέγχθηκαν για παρουσία *Salmonella*. Από τα δείγματα αυτά ανιχνεύθηκαν 90 στελέχη *Salmonella* με ποσοστό ανίχνευσης 4,63% (90/1945). Πιο συγκεκριμένα το ποσοστό ανίχνευσης στο ωμό ζωικό κρέας ανέρχονταν στο 8,93% (35/392) και στο ωμό κρέας πουλερικών στο 8,54% (33/363) όπου ήταν και τα υψηλότερα ποσοστά. Άλλες κατηγορίες τροφίμων που ανιχνεύτηκε *Salmonella* ήταν το χύμα μαγειρεμένο κρέας με ποσοστό 5,0% (4/80), κρύα πιάτα κινέζικης κουζίνας με ποσοστό 1,82% (9/494) και τέλος ωμό κρέας με καρυκεύματα με ποσοστό ανίχνευσης 7,14% (6/84). Στο σύνολο τους ανιχνεύθηκαν 24 διαφορετικοί ορότυποι *Salmonella* με την *Salmonella Typhimurium* να

καταλαμβάνει την πρώτη θέση με ποσοστό 17,78% (16/90) και να ακολουθεί η *Salmonella Enteritidis* με ποσοστό 16,67% (15/90) και η *Salmonella* *Risson* με ποσοστό 13,33% (12/90). (Deshun Xu, 2024).

Σε μία ακόμα μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε άλλη επαρχία της Κίνας μεταξύ των ετών 2010-2019 από το Εθνικό Δίκτυο Επιτήρησης Τροφιμογενών Ασθενειών καταγράφηκαν 1450 προσβεβλημένοι ασθενείς από *Salmonella* όπου οι 353 νοσηλεύτηκαν χωρίς θανατηφόρες συνέπειες. Η μόλυνση προκλήθηκε στο μεγαλύτερο της ποσοστό από εργοστάσια ή καταστήματα αρτοποιίας σε ποσοστό 41,8% (606/1450) και έπειτα από μαγειρεμένο φαγητό σε σπίτια και σε φορτηγά μεταφοράς τροφίμων. Οι αιτίες που διαπιστώθηκαν ήταν κυρίως δύο, η διασταυρούμενη επιμόλυνση και οι λάθος θερμοκρασίες αποθήκευσης των τροφίμων. (Liang Sun, 2021)

Λαμβάνοντας υπόψιν το μεγάλο ποσοστό κρουσμάτων παγκοσμίως και κυβερνήσεις και οι οργανισμοί ασφάλειας τροφίμων έχουν θεσπίσει όρια τα οποία οι εκάστοτε εταιρίες παραγωγής τροφίμων είναι υποχρεωμένες να τηρούν. Στην χώρα μας έχει εκδοθεί ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα όπου αναγράφεται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 στα μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα το όρια ανά κατηγορία τρόφιμου. Πιο αναλυτικά αναφέρονται όλα τα όρια στον **ΠΙΝΑΚΑ 13** και **ΠΙΝΑΚΑ 14**.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ	ΟΡΙΟ	ΣΤΑΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ
Κιμάς και παρασκευάσματα κρέατος που προορίζονται να καταναλωθούν ωμά	Απουσία σε 25g τροφίμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Κιμάς και παρασκευάσματα κρέατος από κρέας ειδών εκτός από πουλερικών που προορίζονται να καταναλωθούν μαγειρεμένα	Απουσία σε 25g τροφίμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

Κιμάς και παρασκευάσματα κρέατος από κρέας πουλερικών που προορίζονται να καταναλωθούν μαγειρεμένα	Απουσία σε 10g τροφίμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Μηχανικώς διαχωρισμένο κρέας (ΜΔΚ)	Απουσία σε 10g τροφίμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Προϊόντα κρέατος που προορίζονται να καταναλωθούν ωμά, εξαιρουμένων των προϊόντων για τα οποία η διαδικασία παρασκευής ή η σύνθεση του προϊόντος θα εξαλείψει τον κίνδυνο σαλμονέλλας	Απουσία σε 25g τροφίμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Προϊόντα κρέατος από κρέας πουλερικών που προορίζονται να καταναλωθούν μαγειρεμένα	Απουσία σε 25g τροφίμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Ζελατίνη και κολλαγόνο	Απουσία σε 25g τροφίμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Τυριά, βούτυρο και κρέμα από νωπό γάλα ή από γάλα που έχει υποστεί επεξεργασία σε	Απουσία σε 25g τροφίμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους

θερμοκρασία χαμηλότερη από της παστερίωσης		
Σκόνη γάλακτος και σκόνη ορού γάλακτος	Απουσία σε 25g τρόφιμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Παγωτό, εξαιρουμένων των προϊόντων για τα οποία η διαδικασία παρασκευής ή η σύνθεση του προϊόντος θα εξαλείψει τον κίνδυνο σαλμονέλλας	Απουσία σε 25g τρόφιμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Προϊόντα αυγών, εξαιρουμένων των προϊόντων για τα οποία η διαδικασία παρασκευής ή η σύνθεση του προϊόντος θα εξαλείψει τον κίνδυνο σαλμονέλλας	Απουσία σε 25g τρόφιμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση που περιέχουν ωμό αυγό, εξαιρουμένων των προϊόντων για τα οποία η διαδικασία παρασκευής ή η σύνθεση του προϊόντος θα εξαλείψει τον κίνδυνο σαλμονέλλας	Απουσία σε 25g τρόφιμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Βρασμένα μαλακόστρακα και μαλάκια	Απουσία σε 25g τρόφιμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους

Ζώντα δίθυρα μαλάκια και ζώντα εχινόδερμα, χιτωνόζωα και γαστερόποδα	Απουσία σε 25g τρόφιμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Σπόροι με φύτρο (έτοιμοι για κατανάλωση)	Απουσία σε 25g τρόφιμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Κομμένα φρούτα και λαχανικά (έτοιμα για κατανάλωση)	Απουσία σε 25g τρόφιμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Μη παστεριωμένοι χυμοί φρούτων και λαχανικών (έτοιμοι για κατανάλωση)	Απουσία σε 25g τρόφιμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους
Παρασκευάσματα για βρέφη σε σκόνη ή τρόφιμα που προορίζονται για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς σε σκόνη για βρέφη ηλικίας κάτω των έξι μηνών	Απουσία σε 25g τρόφιμου	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησης τους

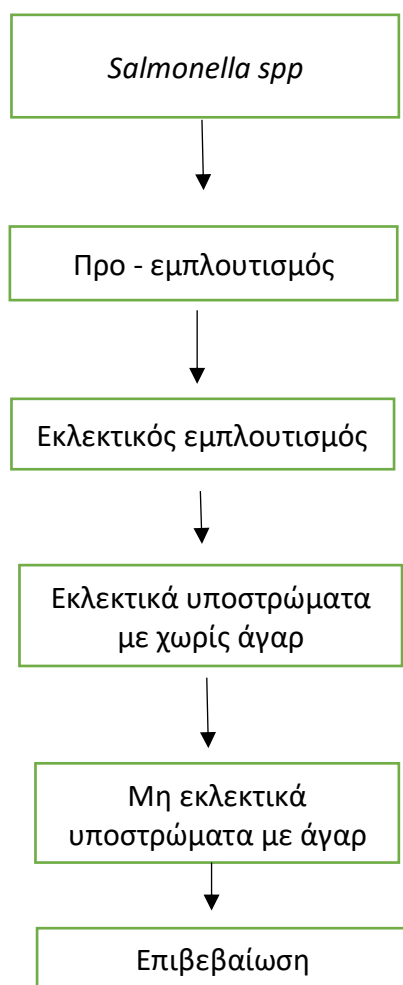
Πίνακας 13. Αποδεκτά μικροβιολογικά όρια παρουσίας *Salmonella* ανά κατηγορία τρόφιμου

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ	ΟΡΙΟ	ΣΤΑΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ	ΜΕΤΡΑ ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΜΗ ΙΚΑΝΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ
Σφάγια βοοειδών, προβάτων, αιγών και αλόγων	Απουσία στην επιφάνεια που υποβάλλεται σε έλεγχο ανά σφάγιο	Σφάγια μετά τον καθαρισμό αλλά πριν την ψύξη	Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή, επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας και της καταγωγής των ζώων
Σφάγια χοίρων	Απουσία στην επιφάνεια που υποβάλλεται σε έλεγχο ανά σφάγιο	Σφάγια μετά τον καθαρισμό αλλά πριν την ψύξη	Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή, επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας και της καταγωγής των ζώων και των μέτρων βιοασφάλειας στις εκμεταλλεύσεις καταγωγής
Σφάγια πουλερικών από κοτόπουλα πάχυνσης και από γαλοπούλες	Απουσία στην επιφάνεια που υποβάλλεται σε έλεγχο ανά σφάγιο	Σφάγια μετά την ψύξη	Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή, επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας και της καταγωγής των ζώων και των μέτρων βιοασφάλειας στις εκμεταλλεύσεις καταγωγής

Πίνακας 14. Αποδεκτά μικροβιολογικά όρια παρουσίας *Salmonella* ανά κατηγορία τροφίμου
και μέτρα αντιμετώπισης

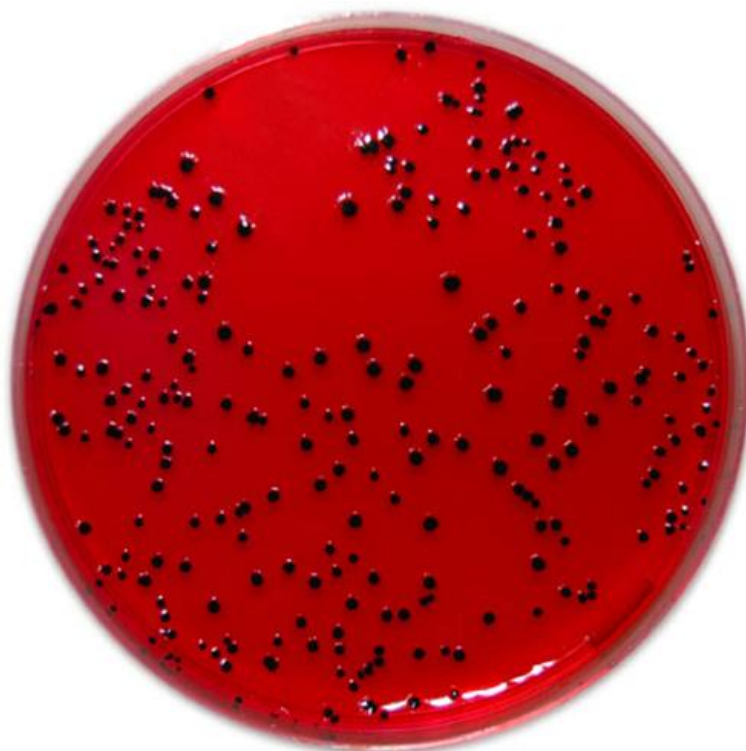
Παρατηρείτε στον ΠΙΝΑΚΑ 12 και ΠΙΝΑΚΑ 13 ότι συγκριτικά με τα όρια στην *Listeria monocytogenes* στην περίπτωση της *Salmonella spp.* είναι αρκετές περισσότερες κατηγορίες τροφίμων και υποκατηγορίες αυτών. Αυτό οφείλεται στην μεγάλη επικινδυνότητα της νόσου. Για την ανίχνευση της *Salmonella* η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν της καλλιέργειας το οποίο χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα. Το πρότυπο αυτό απαιτεί αρκετές ημέρες αλλά και πολλές διεργασίες. Από τη δειγματοληψία του δείγματος έως και την επιβεβαίωση του θετικού δείγματος απαιτείται το πέρας των 7 ημέρων. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για ανίχνευση πολύ μικρών συγκεντρώσεων καθώς η *Salmonella* μπορεί να προκαλέσει ασθένεια και σε συγκεντρώσει από 1 – 10 CFU ανά 25g δείγματος. (L. M. Bradford, 2024)

Τα γενικά βήματα που ακολουθούνται στην ανίχνευση της *Salmonella spp* παρουσιάζονται στο ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6.

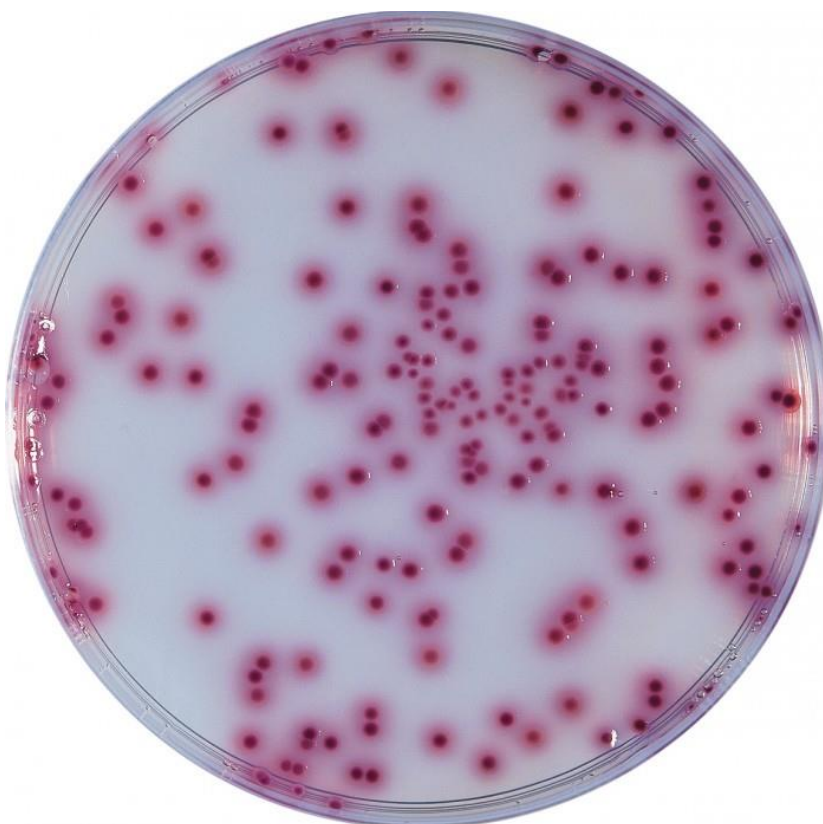


Σχεδιάγραμμα 6. Γενικά βήματα ανίχνευσης *Salmonella spp.*

Πιο αναλυτικά, στη διαδικασία ανίχνευσης της *Salmonella spp* το αρχικό βήμα είναι η δειγματοληψία του τροφίμου όπου στη συνέχεια υποδειματίζεται μέρος του (συνήθως χρησιμοποιούνται είτε 25 g ή 25 mL τρόφιμου ή 10 g ή 10 mL τρόφιμου) και σε αυτά προστίθεται 225 g ή 90 g αντίστοιχα προεμλουτιστικό μέσο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος το BPW. (Buffer Peptone Water) και ομογενοποιούνται για 3 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37°C για 16 – 20 ώρες. Την δεύτερη ημέρα αφαιρούνται από τον κλίβανο και λαμβάνεται ποσότητα 1mL όπου εμβολιάζεται σε 10mL εκλεκτικό μέσο που ονομάζεται MKTTn Broth (Muller – Kauffmann tetrathionate – novobiocin broth) και 0,1mL σε 10mL RVS Broth (Rappaport – Vassiliadis medium with soya). Το MKTTn τοποθετείται σε κλίβανο στους 37°C για 21-27 ώρες και το RVS στους 41,5°C για 21-27 ώρες. Την τρίτη ημέρα αφαιρούνται από τους δύο κλιβάνους τα θρεπτικά μέσα και από το κάθε ένα λαμβάνονται 10 μl με κρυκοφόρο στυλεό ίσης χωρητικότητας και πραγματοποιείται σπορά σε δύο διαφορετικά εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα το XLD (Xyloze Lysine Deoxycholate) και το Compass Salmonella και έπειτα τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37±°C για 21-27 ώρες. Την τέταρτη ημέρα αφαιρούνται από τον κλίβανο και ελέγχονται για τυχόν θετικές αποικίες. Στην περίπτωση του XLD οι αποικίες απεικονίζονται με μαύρο χρώμα και μία απαλή διάφανη ζώνη (**EIKONA 13**) περιμετρικά από αυτές και για το Compass Salmonella το χαρακτηριστικό χρώμα της *Salmonella* είναι το κόκκινο – μωβ (magenta) (**EIKONA 14**).

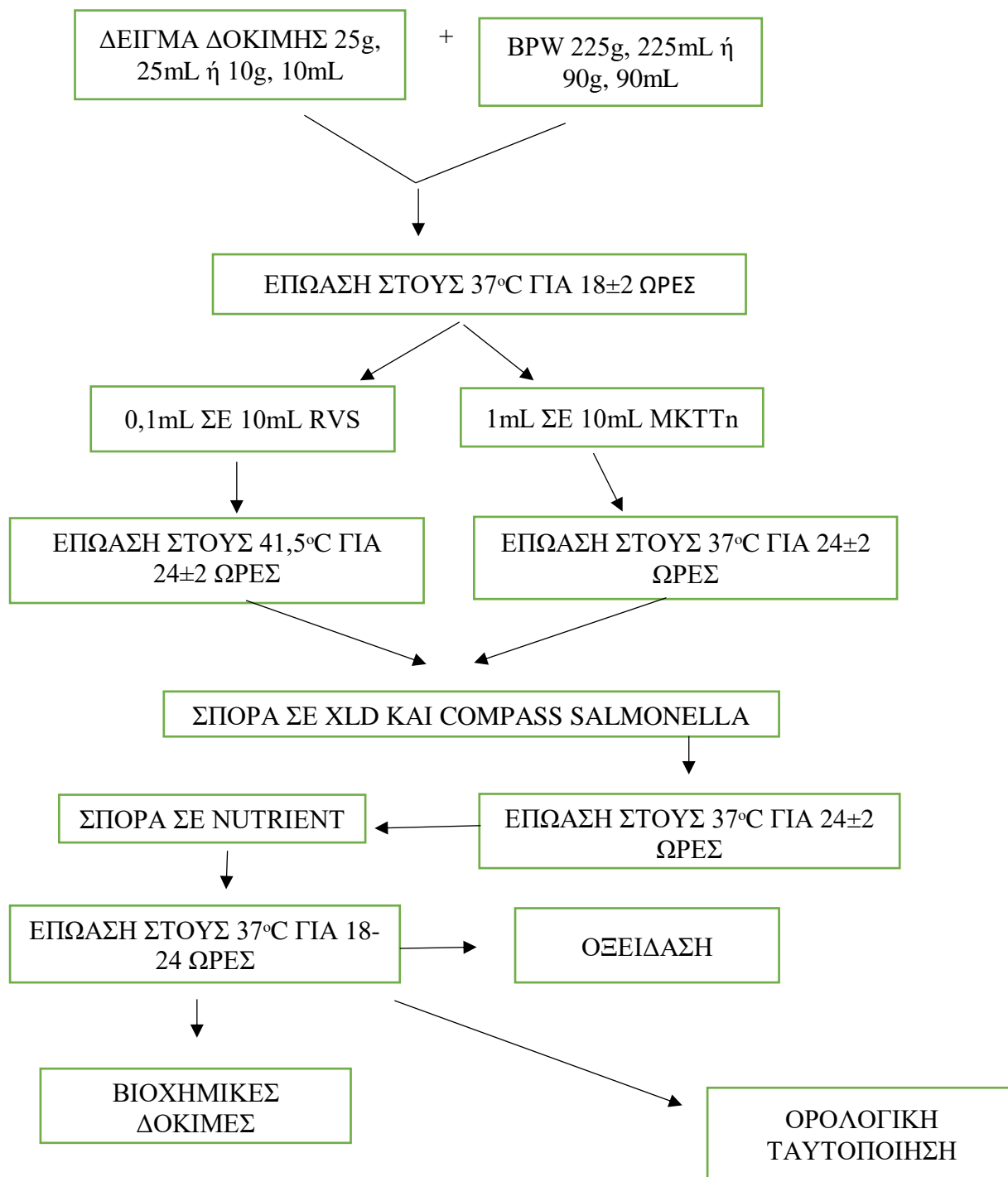


Εικόνα 13. Απεικόνιση θετικών αποικιών *Salmonella spp.* σε τρυβλίο XLD. (*Ltd*)



Εικόνα 14. Απεικόνιση θετικών αποικιών *Salmonella spp.* σε τρυβλίο Compass Salmonella. (*EUROLAB*)

Στη συνέχεια απομονώνεται καθαρή αποικία και πραγματοποιείται σπορά σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα που ονομάζεται NUTRIENT και τοποθετείται στους 37°C για 21-27 ώρες. Την επόμενη ημέρα (πέμπτη) αφαιρείται από τον κλίβανο και ξεκινάει η διαδικασία των βιοχημικών δοκιμών ταυτοποίησης. Αρχικά πραγματοποιείται η αντίδραση της οξειδάσης όπου σε περίπτωση θετικού δείγματος είναι αρνητική. Στην συνέχεια πραγματοποιείται η αντίδραση της λυσίνης η οποία αναμένεται να είναι θετική και προαιρετικά και άλλες ακόμα αντιδράσεις όπως είναι η β-γαλακτοσιδάση που αναμένεται να είναι αρνητική. Στο εμπόριο υπάρχουν έτοιμα kit διαφόρων αντιδράσεων που ανάλογα την θετική ή αρνητική τους αντίδραση δημιουργούν ένα προφίλ όπου μέσω προγράμματος της εκάστοτε εταιρείας παραγωγής επαληθεύεται ποιο παθογόνο υπάρχει στο εκάστοτε αναλυθέν δείγμα. Τέλος, πραγματοποιείται η ορολογική ταυτοποίηση για να γίνει γνωστή η κατηγορία *Salmonella* (*Typhi*, *Paratyphi* κ.α) που έχει αναπτυχθεί στο τρόφιμο. Πραγματοποιείται με τους αντί-ορούς O, Vi και H. Σε αντικειμενοφόρο πλάκα προστίθεται μία σταγόνα αντί- ορού και αναμιγνύεται με μία αποικία η οποία λαμβάνεται από το τρυβλίο NUTRIENT. Σε περίπτωση κροκίδωσης του διαλύματος τότε πρόκειται για θετική αντίδραση. (ISO 2. , 2017) Παρακάτω απεικονίζεται σε σχεδιάγραμμα η διαδικασία προσδιορισμού της *Salmonella*. (ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7)



Σχεδιάγραμμα 7. Διαδικασία προσδιορισμού και επιβεβαίωσης *Salmonella* spp.

Για την γρηγορότερη ανίχνευση της *Salmonella* spp. έχουν δημιουργηθεί εναλλακτικές μέθοδοι όπως είναι:

1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2. Ηλεκτροφόρηση γέλης παλμικού πεδίου (PFGE)
3. Ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόγχου (LAMP)
4. Τυποποίηση αλληλουχίας πολλαπλών θέσεων (MLST)
5. Φασματομετρία μάζας
6. Αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS)

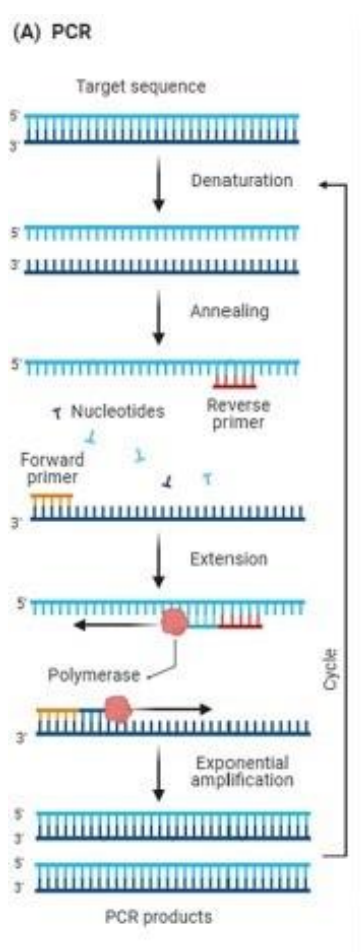
Παρόλο την ανάπτυξη αρκετών ταχύτερων μεθόδων σε σχέση με την κλασική καλλιέργεια ακόμα χρησιμοποιείται ως αρχικό στάδιο ο εμπλουτισμός με θρεπτικό υλικό και επώαση για 18 ώρες για να μπορέσει να επιτευχθεί η συγκέντρωση 1 cfu/25g τροφίμου. (Siti Nur Hazwani Oslan, 2024). Ακόμα, με την μέθοδο της καλλιέργειας δεν είναι δυνατό η ληφθούν επαρκείς πληροφορίες για τη διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών *Salmonella* όπως επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις δεν υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης ορισμένων παθογόνων δεν μπορούν να διακριθούν μεταξύ βιώσιμων καλλιεργήσιμων κυττάρων και μη. (Nodali Ndraha, 2023)

Το Δεκέμβριο του 2023 μία ομάδα επιστημόνων θέλησε να πραγματοποιήσει μία ολοκληρωμένη επισκόπηση των πρόσφατων εξελίξεων στις μεθόδους που βασίζονται στην ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων και που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για την ανίχνευση παθογόνων στα τρόφιμα. Μερικές από τις τεχνικές που μελετήθηκαν ήταν αναλυτικά οι εξής:

5.1 Συμβατική PCR

Η τεχνική της συμβατικής PCR περιλαμβάνει 3 στάδια σε κάθε της κύκλο, την μετουσίωση όπου οι κλώνοι DNA διαχωρίζονται σε θερμοκρασία 95°C στη συνέχεια υβριδοποίηση όπου οι εκκινητές DNA προσκολλώνται σε αλληλουχίες-στόχους σε θερμοκρασία 50-70°C και τέλος η επέκταση όπου με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης προστίθενται νουκλεοτίδια στους εκκινητές σε θερμοκρασία 72°C. (EIKONA 15). Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται για 20-40 κύκλους. Σε κάθε κύκλο προκύπτει διπλάσιο τμήμα DNA στόχος και έτσι επιτυγχάνεται η εκθετική ενίσχυση. Η χρήση της συμβατικής PCR έχει λάβει εφαρμογή σε πλήθος τροφίμων όπως είναι τα θαλασσινά, το γάλα, τα αυγά και πιο πρόσφατα σε λαχανικά. Το LOD της μεθόδου σύμφωνα με πειραματικές διαδικασίες σε μαρούλι, κόλιανδρο φράουλα και βατόμουρο για τη *Salmonella spp.* είναι 1-10 cfu/mL έπειτα από 24 ώρες παραμονής σε εμπλουτιστικό μέσο. Σε δείγματα αυγών ήταν 10⁴ cfu/mL έπειτα από 2 ώρες παραμονής σε εμπλουτιστικό μέσο, ενώ αν η παραμονή σε εμπλουτιστικό μέσο διαρκούσε 6 ώρες θα μπορούσε να είναι 10 cfu/mL και για 10-12 ώρες θα ήταν 1 cfu/mL. Ο αρχικός όμως

εμπλουτισμός του δείγματος δεν είναι πάντα ιδανικός και έτσι έχει γίνει η προσπάθεια σχεδιασμού μεθόδων χωρίς εμπλουτισμό ή με μείωση του χρόνου εμπλουτισμού με τη βοήθεια τεχνικών διαχωρισμού με βάση την ηλεκτροφόρηση, με τεχνολογίες που βασίζονται σε νανοϋλικά και CRISPR/Cas. Παραδείγματος χάριν σε μία έρευνα του 2022 συνδυάστηκε PCR με χρήση μαγνητικών κουκκίδων νανοάνθρακα (Mag-Cds) και με τεχνική ηλεκτροκινητικού διαχωρισμού που ονομάζεται τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE). Σε αυτή την έρευνα χρησιμοποιήθηκαν τα Mag-Cds για τη δέσμευση βακτηριακών κυττάρων πριν την εκχύλιση του DNA και το CE βοήθησε στην ανάλυση του αντιβιοτικού αμπλικόνιο. Αποδείχτηκε ότι με το συνδυασμό αυτό είναι εφικτή η ανίχνευση της *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *E.coli* 0157:H7 σε δείγματα γάλακτος με συγκέντρωση 10cfu/mL χωρίς εμπλουτισμό των δειγμάτων.



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση τεχνικής PCR. (Nodali Ndraha, 2023)

5.2 Real-time PCR

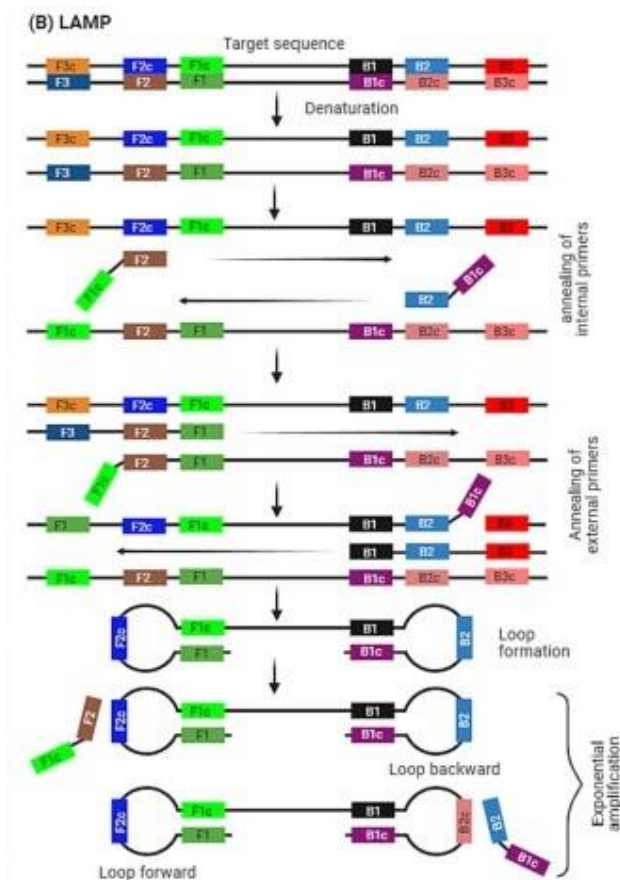
Η real-time PCR η οποία είναι γνωστή και ως qPCR χρησιμοποιεί φθορίζουσες χρωστικές ουσίες όπως SYBR Green οι οποίες δίνουν σήμα κατά τη διάρκεια της αύξησης του καθώς συσσωρεύεται το ενισχυμένο DNA. Η χρήση της είναι κυρίως για ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση σε διάφορα τρόφιμα όπως αυγά, κρέας, θαλασσινά και φρέσκα λαχανικά. Αποδείχτηκε σε έρευνα του 2020 ότι η μέθοδος αυτή μπορεί να ανίχνευση *Salmonella spp.* σε συγκέντρωση 1cfu/25g τρόφιμο έπειτα από εμπλουτισμό 18 ωρών για τρόφιμα όπως χοιρινό και βόειο κρέας καθώς και για κοτόπουλο. Για τη βέλτιστη απόδοση της τεχνικής qPCR έχει γίνει προσπάθεια βελτίωσης της προ επεξεργασίας και της προετοιμασίας του δείγματος όπου πραγματοποιείται βακτηριακή απομόνωση και συγκέντρωση DNA και βακτηριών. Έχει επιτευχθεί στο παρελθόν ανίχνευση *Salmonella Typhimurium* το συνδυασμό qPCR με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό (IMS-qPCR) και μάλιστα με όριο ανίχνευσης σε φρέσκα μήλα τη συγκέντρωση $1,8 \times 10^2$ cfu/mL χωρίς την απαίτηση εμπλουτισμού του δείγματος. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν υπάρξει και σε άλλες έρευνες σε δείγματα μαρουλιού, δημητριακών ρυζιού, σε γάλα σκόνη και νωπό γάλα. Σε περίπτωση συνδυασμού qPCR με διήθηση δείγματος και συγκέντρωση DNA πριν την εκχύλιση του DNA τα αποτελέσματα ήταν 1 cfu/25g για δείγματα μαρουλιού και λάχανου και 10 cfu/mL για δείγματα βόειου κρέατος χωρίς να έχει προηγηθεί εμπλουτισμός δείγματος.

5.3 Digital PCR

Για την ενίσχυση Digital PCR το δείγμα DNA απαιτείται να κατανεμηθεί σε πολυάριθμες μεμονωμένες αντιδράσεις όπως κάθε αντίδραση αναλύεται ξεχωριστά για την ενίσχυση του DNA στόχου. Η κάθε μεμονωμένη αντίδραση περιλαμβάνει τρία βήματα. Αρχικά, τον καταμερισμό του δείγματος, την εκτέλεση της ενίσχυσης PCR σε κάθε μεμονωμένη αντίδραση και τέλος την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Για την έκδοση παρουσίας ή απουσίας του DNA στόχου πραγματοποιείται καταμέτρηση των θετικών αντιδράσεων. Είναι μία τεχνική με πολύ μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια συγκριτικά με τις παραδοσιακές ποσοτικές μεθόδους PCR. Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης του δείγματος ακολουθείται η στατιστική ανάλυση Poisson στην ενίσχυση Digital PCR. Βάση μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί θεωρείται ιδανική για χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης παθογόνων σε θαλασσινά και χυμούς φρούτων.

5.4 Ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόγχου (LAMP)

Η τεχνική LAMP όπως έχει ήδη προαναφερθεί αποτελείται από 2 εσωτερικούς εκκινητές, FIP και BIP και από 2 εξωτερικούς εκκινητές F3 και B3. Η θερμοκρασία που απαιτείται για αυτή την τεχνική είναι σταθερή και κυμαίνεται μεταξύ 60-65°C και ολοκληρώνεται η ενίσχυση σε χρόνο 30-60 λεπτά. (ΕΙΚΟΝΑ 16). Η τεχνική αυτή σε συνδυασμό με φθορισμό έχουν τις περισσότερες φορές ως απαίτηση την προ επεξεργασία του δείγματος πριν από την ενίσχυση DNA. Η άμεση αναγνώριση του θετικού ή του αρνητικού δείγματος βοηθάει στην επιτόπια ανίχνευση της *Salmonella* η οποία για δείγματα κοτόπουλου και χοιρινού κρέατος παρατηρείται θολότητα και χρωματομετρικές αλλαγές κατά τη διαδικασία ενίσχυσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι η μέθοδος LAMP παρουσιάζει πανομοιότυπο αν όχι και καλύτερο αποτέλεσμα κάποιες φορές σε σύγκριση με την PCR. Συγκριτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2021 αναφέρει ότι και οι δύο αυτές μέθοδοι ανίχνευσαν *Salmonella* σε κρέας κοτόπουλου σε συγκέντρωση 10cfu/g χωρίς εμπλουτισμό δείγματος το οποίο θεωρείται πολύ μικρό όριο ανίχνευσης. Ένας άλλος συνδυασμός που πραγματοποιήθηκε μαζί με την τεχνική LAMP ήταν με την ανάλυση πλευρικής ροής (LFA) η οποία έδωσε όριο ανίχνευσης τα 4,2cfu/g χωρίς να γίνει προηγουμένως εμπλουτισμός δείγματος. Η τεχνική LAMP τείνει να προωθηθεί για εργαλείο επιτόπιας ανίχνευσης παθογόνων. (Nodali Ndraha, 2023)



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής LAMP. (Nodali Ndraha, 2023)

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Νότια Κορέα το 2023 από επιστήμονες αναλύει την ταχεία και επιτόπια ανίχνευση της *Salmonella Typhimurim* σε δείγματα τροφίμων με χρήση συστήματος υπερταχείας PCR και συσκευής μικρορευστοποίησης που μπορεί να προσδιορίσει τα γονίδια-στόχους μέσω της ανάλυσης καμπύλης τήξης σε λιγότερο από 20 λεπτά. (Eiseul Kim, 2023)

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 81 πρότυπα στελέχη *Salmonella* εκ των οποίων τα 21 στελέχη θεωρούνται στόχοι και τα 6 από αυτά ήταν η *Salmonella Typhimurium* και 16 άλλα παθογόνα βακτήρια. Πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός των πρότυπων στελεχών σε ζωμό τρυπτονικής σόγιας (Tryptic soy broth) στους 37°C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της εκχύλισης του γονιδιωματικού DNA, στο καλλιεργημένο δείγμα έγινε φυγοκέντρηση σε στροφές 12.000 rpm στους 4°C για 10 λεπτά. Το DNA των πρότυπων στελεχών εκχυλίστηκε τη βοήθεια του DNeasy kit Blood & Tissue και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια από τη βάση δεδομένων GenBank ελήφθησαν τα γονίδια-στόχοι που για τη *Salmonella Typhimurium* ήταν το PSLT015 και

ελέγχθηκε η ειδικότητα του με τη χρήση του εργαλείου BLAST. Έπειτα σχεδιάστηκαν οι εκκινητές με το λογισμικό Primer Designer και ήταν οι εξής:

- F: CGG CGG TAA TAC GAT GAA CT
- R: CTT GCT GTC AGT GCT GTC TT

Μετά το σχεδιασμό των εκκινητών ακολουθήσε η διαδικασία ενίσχυσης Real-time PCR με μικρορευστοποιημένο τσιπ PCR όπου το μίγμα PCR περιείχε 20ng γονιδιωματικού DNA, 5 μ L Ssofast EvaGreen SuperMix. 500 nM από κάθε εκκινητή και το υπόλοιπο ήταν αποστειρωμένο νερό. Αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο νερό και ως θετικός τα πρότυπα στελέχη. Το πρόγραμμα της υπερταχείας ενίσχυσης PCR ξεκινούσε με αποδιάταξη προϊόντων στους 95°C για 5 λεπτά, και έπειτα 40 κύκλοι στους 95°C για 5 δευτερόλεπτα ο κάθε κύκλος, υβριδοποίηση στους 60°C για 5 δευτερόλεπτα και τέλος επέκταση στους 72°C για 5 δευτερόλεπτα. Για την επιβεβαίωση της μεθόδου αγοράστηκαν δείγματα αυγών από τοπική αγορά της Νότιας Κορέας και στη συνέχεια μολύνθηκαν με πρότυπο στέλεχος συγκέντρωσης 1 cfu/g εφόσον πρώτα είχε επιβεβαιωθεί η απουσία *Salmonella Typhimurium*. Χρησιμοποιήθηκαν 25g δείγματος και ομογενοποιήθηκαν με 225 mL με BPW και επωάστηκαν στους 37°C για 3 ώρες. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μη επιμολυσμένο δείγμα αυγού. Έπειτα ελήφθη 1 μ L εμπλουτισμένου δείγματος και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση γονιδιωματικού DNA με τη χρήση DNeasy kit Blood & Tissue. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η διαδικασία ενίσχυσης ίδια με αυτή που έχει περιγράψει παραπάνω για τα πρότυπα στελέχη. Οι ενισχύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και τα αποτελέσματα της αναλύθηκαν με το λογισμικό Generecorder. Η μελέτη αυτή είχε 100% ευαισθησία καθώς όλα τα δείγματα αυγού ανακτήθηκαν επιτυχώς. Παρόμοιες μελέτες πραγματοποιήθηκαν και σε δείγματα μοσχαρίσιου και χοιρινού κρέατος, πάπιας και κοτόπουλων από την ίδια ομάδα επιστημόνων και αυτά με τη σειρά τους έδωσαν 100% ακρίβεια στην ανίχνευση τους. (Eiseul Kim, 2023)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο - *Campylobacter spp.*

Ο όρος *Campylobacter* προέρχεται από δύο ελληνικές λέξεις το «Kampylos» και το «baktron» δηλαδή κυρτά και σε ραβδοειδούς σχήματος βακτήρια. Είναι ένας Gram (-) βάκιλος καμπυλωτός με χαρακτηριστική περιστροφική κίνηση. (Yagya Adhikari, 2025)(**EIKONA 17**). Το *Campylobacter* ανήκει στην οικογένεια *Campylobacteraceae*, στην τάξη *Campylobacterales* και στην κατηγορία *Epsilonproteobacteria*. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης της κυμαίνεται από 37 έως 42°C. (Marcela Soto-Beltrán, 2022)

Το *Campylobacter* κατατάσσεται στην κατηγορία των θερμοφίλων παθογόνων βακτηρίων με υψηλή ζωονοσογόνο δράση, που ως αποτέλεσμα έχει την ασθένεια της καμπυλοβακτηρίωσης. Δύο από τα είδη της που θεωρούνται και τα πλέον σημαντικά για τη δημόσια υγεία είναι το *Campylobacter coli* και το *Campylobacter jejuni*. Τα τελευταία χρόνια τείνουν να ξεπερνούν σε αριθμό λοιμώξεων την *Salmonella* αλλά το ποσοστό θνησιμότητας βρίσκεται ακόμα σε χαμηλό επίπεδο σε ενήλικα άτομα και η ασθένεια επιλύεται χωρίς αντιβιοτική θεραπεία. (Emmanuel O. Njoga, 2023)

Στον άνθρωπο η μετάδοση πραγματοποιείται μέσω του στόματος με κατανάλωση μολυσμένων ωμών ή λάθος μαγειρεμένων φαγητών, πουλερικών, γαλακτοκομικών προϊόντων, μη επεξεργασμένου νερού, μη παστεριωμένου γάλακτος κ.α. (Yagya Adhikari, 2025). Η λοίμωξη της καμπυλοβακτηρίωσης έχει ως συμπτώματα αυτά της γαστρεντερίτιδας αλλά με υψηλή συχνότητα διάρροιας όπου αυτό την καθιστά σε πολύ σημαντική. (Natasia Rebekka Thornval, 2021) Σε πιο σοβαρές επιπλοκές της νόσου μπορεί να προκαλέσει στον άνθρωπο:

1. το σύνδρομο Guillain-Barre, μία εκφυλιστική αυτοάνοση διαταραχή με μυϊκή αδυναμία, απώλεια αίσθησης στα πόδια και στα χέρια και δυσκολία στην κατάποση και την αναπνοή,
2. το σύνδρομο Reiter, μία αυτοάνοση κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ασύμμετρη ολιγοαρθρίτιδα στα κάτω άκρα,
3. το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, μία διαταραχή του γαστρεντερικού σωλήνα που χαρακτηρίζεται από έντονες κράμπες, κοιλιακό άλγος, φούσκωμα και διάρροια ή δυσκοιλιότητα και
4. φλεγμονώδεις ασθένειες του εντέρου, που έχει τη δυνατότητα να οδηγήσει σε στένωση των εντέρων (Emmanuel O. Njoga, 2023)

Στα κρεοπαραγωγικά ζώα (πρόβατα, κότες κ.α) το *Campylobacter spp.* οδηγεί σε περίπτωση εγκυμοσύνης σε άμβλωση αλλά και έπειτα να προκαλέσει προβλήματα υπογονιμότητας, ενώ σε ζώα συντροφιάς (σκύλοι, γάτες) προκαλεί γαστρεντερίτιδα αλλά μερικές φορές είναι μόνο ασυμπτωματικοί φορείς που μπορούν να μεταδώσουν στους ιδιοκτήτες τους τη νόσο. (Emmanuel O. Njoga, 2023)

Το 2008 διεξάχθηκε μία έρευνα σε όλη την ΕΕ η οποία έδειξε μεγάλο ποσοστό επιπολασμού *Campylobacter* στα κοτόπουλα κρεοπαραγωγής. Η έρευνα αυτή έδειξε την ανάγκη για περαιτέρω δεδομένα και έτσι πραγματοποιήθηκε μία ακόμα έρευνα στην Ιρλανδία κατά τα έτη 2017-2018 όπου συλλέγονταν κάθε μήνα δείγματα από 3 μονάδες επεξεργασίας κοτόπουλων κρεοπαραγωγής και από 358 παρτίδες όπου από κάθε παρτίδα συλλέχθηκαν επιπλέον 5 δείγματα δέρματος λαιμών. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι από τα δέρματα λαιμών (1790) το 53% ήταν θετικά στο *Campylobacter* και στα δείγματα από τις παρτίδες το 66% ήταν θετικά. Μια σημαντική παρατήρηση αυτής της έρευνας ήταν η εποχική διακύμανση, καθώς παρατηρήθηκε ότι τους θερινούς μήνες το ποσοστό θετικότητας ήταν υψηλότερο σε σχέση με τους χειμερινούς μήνες. (Emmanuel O. Njoga, 2023)

Σύμφωνα με επίσημα στοιχεία των ΗΠΑ, της Ευρώπης και της Αυστραλίας για το έτος 2019 η ετήσια επίπτωση καμπυλοβακτηρίωσης έχει αυξηθεί 19,5, 64,9 και 130 περιπτώσεις αντίστοιχα ανά 100.000 πληθυσμό στις προαναφερθείσες χώρες. (Lisa M. Harrison, 2022). Σύμφωνα με στοιχεία του FoodNet (Σύστημα επιτήρησης τροφίμων) το 2022 το *Campylobacter spp.* ήταν η κύρια αιτία τροφιμογενών λοιμώξεων στους ανθρώπους με 19,2 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό. Πιο συγκεκριμένα, στις ΗΠΑ υπήρξαν 9.751 ασθενείς από τους οποίους οι 1.937 νοσηλεύτηκαν και από αυτούς υπήρξαν 42 θάνατοι. Το 2019 στις ΗΠΑ οι τροφιμογενείς λοιμώξεις με αιτία το *Campylobacter spp.* αποδόθηκαν σε ποσοστό πάνω του 70%. (Yagya Adhikari, 2025)

Εκτός από τις σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων, σημαντικό πλήγμα θεωρείται και το οικονομικό κόστος. Το 2020 το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής δημοσίευσε ότι λόγω των μολυσμένων προϊόντων πουλερικών που δεν δόθηκαν για πώληση το οικονομικό κόστος ξεπερνούσε τα 6,9 δισεκατομμύρια δολάρια. (Marcela Soto-Beltrán, 2022)

Μέχρι το 2017 δεν υπήρχαν συγκεκριμένα όρια για την ανίχνευση του *Campylobacter spp.* στον Κανονισμό 2073/2005, όμως λόγω της σημαντικότητας του αποφασίστηκε τροποποίηση του κανονισμού και θεσπίστηκαν αυστηρά όρια και ως προς τη δειγματοληψία αλλά και ως

προς την παρουσία του βακτηρίου. Αποφασίστηκε ότι κατά τη δειγματοληψία θα λαμβάνονται κάθε φορά τυχαία δείγματα δέρματος λαιμού από τουλάχιστον 15 σφάγια πουλερικών μετά την ψύξη τους. Η φύλαξη τους έως την ανάλυση θα πρέπει να είναι σε θερμοκρασίες από 1-8 °C και όχι περισσότερο από μία ημέρα. Η συχνότητα της δειγματοληψίας ορίστηκε σε μία φορά την εβδομάδα και κάθε φορά διαφορετική ημέρα. Σε περίπτωση ικανοποιητικών αποτελεσμάτων για 52 συνεχόμενες εβδομάδες τότε η συχνότητα της δειγματοληψίας μπορεί να μειωθεί σε μία φορά το δεκαπενθήμερο. (Επιτροπή, 2005). Στον **ΠΙΝΑΚΑ 15** αναφέρονται τα όρια της παρουσίας του *Campylobacter spp.*

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ	ΟΡΙΑ	ΣΤΑΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ	ΜΕΤΡΑ ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΜΗ ΙΚΑΝΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ
Σφάγια κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής	1000 cfu/g	Σφάγια μετά την ψύξη	-Βελτίωση της υγιεινής κατά την σφαγή -Επανεξέταση ελέγχων διαδικασίας -Επανεξέταση καταγωγής ζώων -Επανεξέταση μέτρων βιοασφάλειας στις εκμεταλλεύσεις καταγωγής

Πίνακας 15. Αποδεκτά μικροβιολογικά όρια για *Campylobacter spp.* και μέτρα αντιμετώπισης

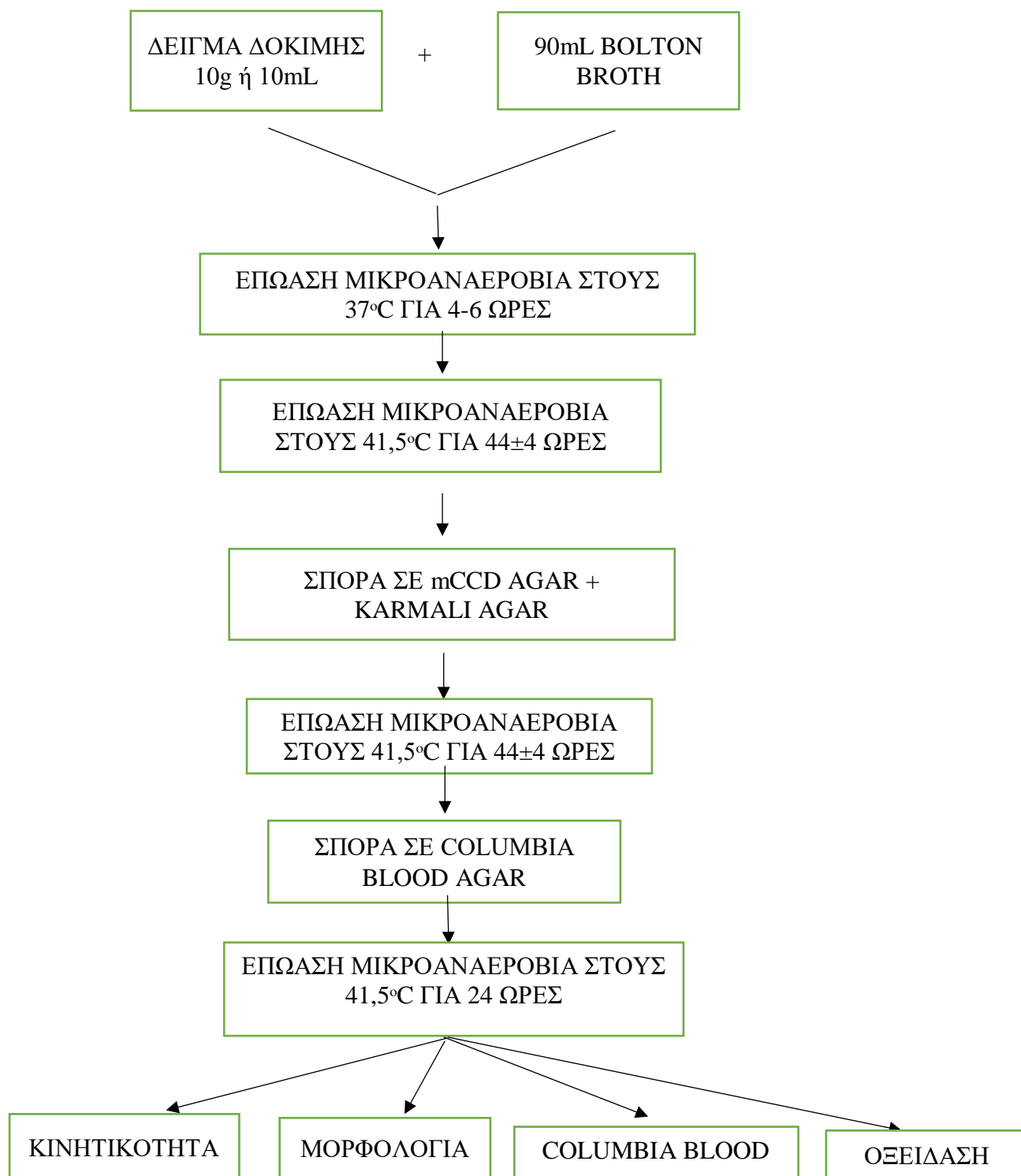


Εικόνα 17. Απεικόνιση *Campylobacter spp.* (Microbiology, 2019)

Η θεμέλια μέθοδος για την ανίχνευση και καταμέτρηση του *Campylobacter spp.* είναι μια συνδυαστική μέθοδος εμπλουτισμού και καλλιέργειας.

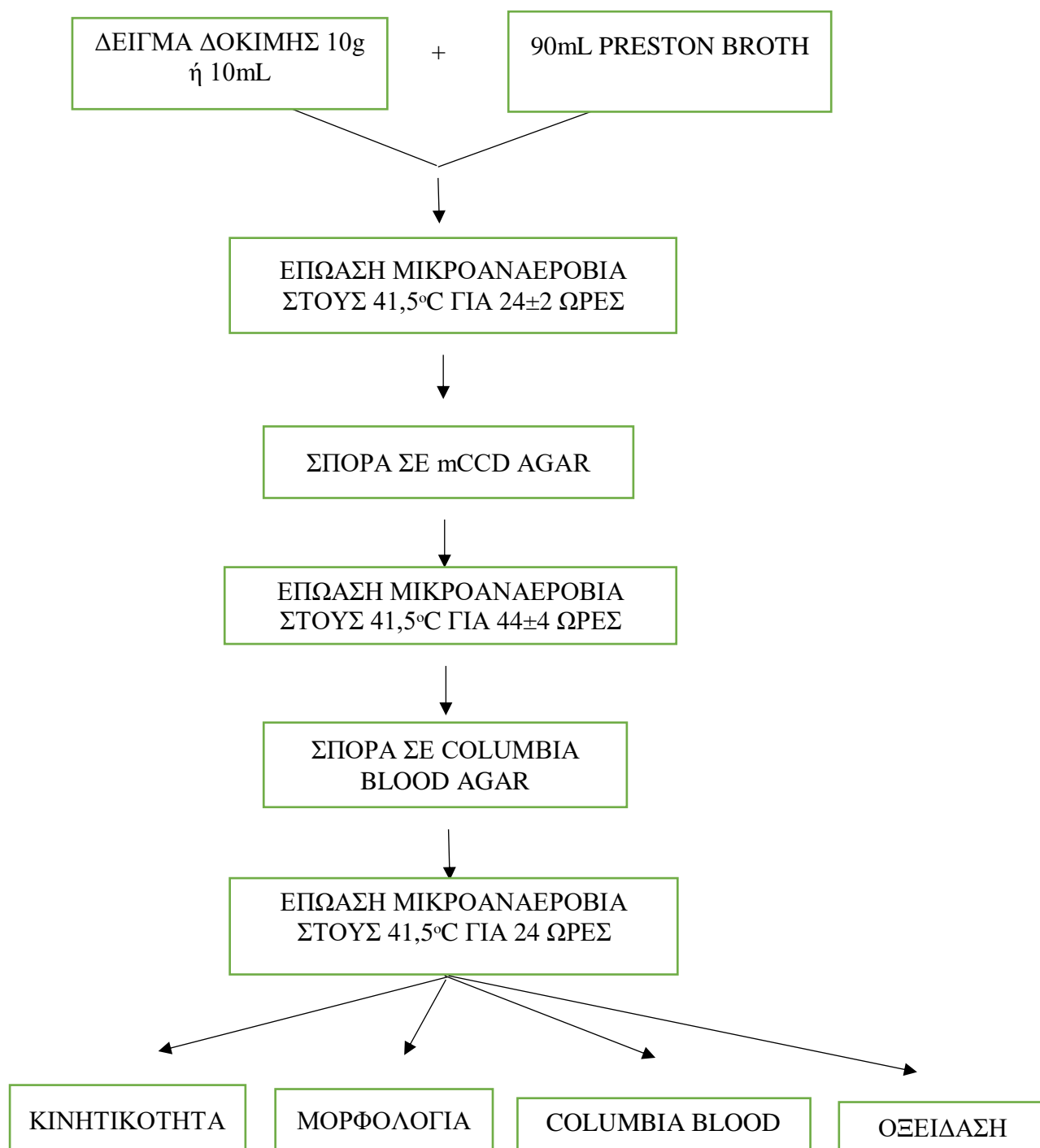
Για τη διαδικασία ανίχνευσης του *Campylobacter spp.* υπάρχουν τρεις επίσημες μέθοδοι. Η διαδικασία Α η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για αναμενόμενους χαμηλούς πληθυσμούς *Campylobacter spp.* χαμηλά επίπεδα μικροχλωρίδας όπως είναι τα μαγειρεμένα ή τα κατεψυγμένα τρόφιμα, η διαδικασία Β η οποία χρησιμοποιείται για χαμηλούς πληθυσμούς *Campylobacter spp.* αλλά για υψηλά επίπεδα μικροχλωρίδας όπως είναι για νωπά κρέατα ή νωπό γάλα και η διαδικασία Γ όπου χρησιμοποιείται για υψηλούς πληθυσμούς *Campylobacter spp.* όπως σε περιττώματα πουλερικών ή σε ωμό κρέας πουλερικών. Στην διαδικασία Α στο δείγμα προστίθεται ένα υγρό εμπλουτιστικό μέσο (Bolton broth) και έπειτα τοποθετείται στον κλίβανο στους 37°C για 4 έως 6 ώρες σε μικροαναερόβιες συνθήκες και έπειτα στους 41,5°C για 44 ώρες. Στην διαδικασία Β προστίθεται στο δείγμα υγρό εμπλουτιστικό μέσο (Preston broth) και τοποθετείται σε κλίβανο στους 41,5°C για 24 ώρες σε μικροαναερόβιες συνθήκες. Και τέλος στην διαδικασία Γ το δείγμα τοποθετείται απευθείας σε τρυβλίο mCCD όπου εμπεριέχεται agar.

Πιο αναλυτικά, για τη διαδικασία Α: Την πρώτη ημέρα ζυγίζεται δείγμα 10g ή 10mL και προστίθεται σε αυτό 90mL Bolton Broth και τοποθετείται σε κλίβανο στους 37°C για 4 έως 6 ώρες και στη συνέχεια στους 41,5°C για 40 έως 48 ώρες σε μικροαναερόβιες συνθήκες. Την τρίτη ημέρα αφαιρούνται από τον κλίβανο και πραγματοποιείται σπορά σε τρυβλίο mCCD agar και karmali agar και τοποθετούνται όλα τα τριβλία σε μικροαναερόβιες συνθήκες στους 41,5°C για 40 έως 48 ώρες. Την πέμπτη ημέρα αφαιρούνται από τον κλίβανο και ελέγχονται για τυχόν χαρακτηριστικές αποικίες οι οποίες είναι γκριζωπές με μεταλλική γυαλάδα, επίπεδες και υγρές με τάση να φουσκώνουν. (**EIKONA 14**) Επιλέγονται οι ύποπτες αποικίες και πραγματοποιείται σπορά σε ένα μη εκλεκτικό υπόστρωμα συνήθως Columbia blood agar και τοποθετείται σε κλίβανο σε μικροαναερόβιες συνθήκες στους 41,5°C για 24 ώρες. Την έκτη ημέρα αφαιρούνται από τον κλίβανο και λαμβάνεται με τη βοήθεια κρικοφόρου στυλεού μία καλά απομονωμένη αποικία (**EIKONA 15**) και αναμιγνύεται με φυσιολογικό ορό σε αντικειμενοφόρο πλάκα και ελέγχεται για τη μορφολογία την κινητικότητα της στο μικροσκόπιο. Η μορφολογία της σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος θα πρέπει να είναι καμπυλωτού βάκιλου και η κινητικότητα θα πρέπει να έχει χαρακτηριστική περιστροφική κίνηση. Από το τρυβλίο Columbia blood agar λαμβάνεται ξανά απομονωμένη αποικίες και πραγματοποιείται σπορά εκ νέου σε ίδιο τρυβλίο Columbia blood agar και τοποθετείται στους 25°C σε αερόβιες συνθήκες για 40 έως 48 ώρες. Ακόμα πραγματοποιείται και η αντίδραση της οξειδάσης όπου στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος θα είναι θετική η αντίδραση. Την όγδοη ημέρα αφαιρείται το τρυβλίο από τον κλίβανο και ελέγχεται για ανάπτυξη. Στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος δεν θα πρέπει να υπάρχει καμία ανάπτυξη μικροοργανισμού. (ISO 1. , 2017)(**ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8**)



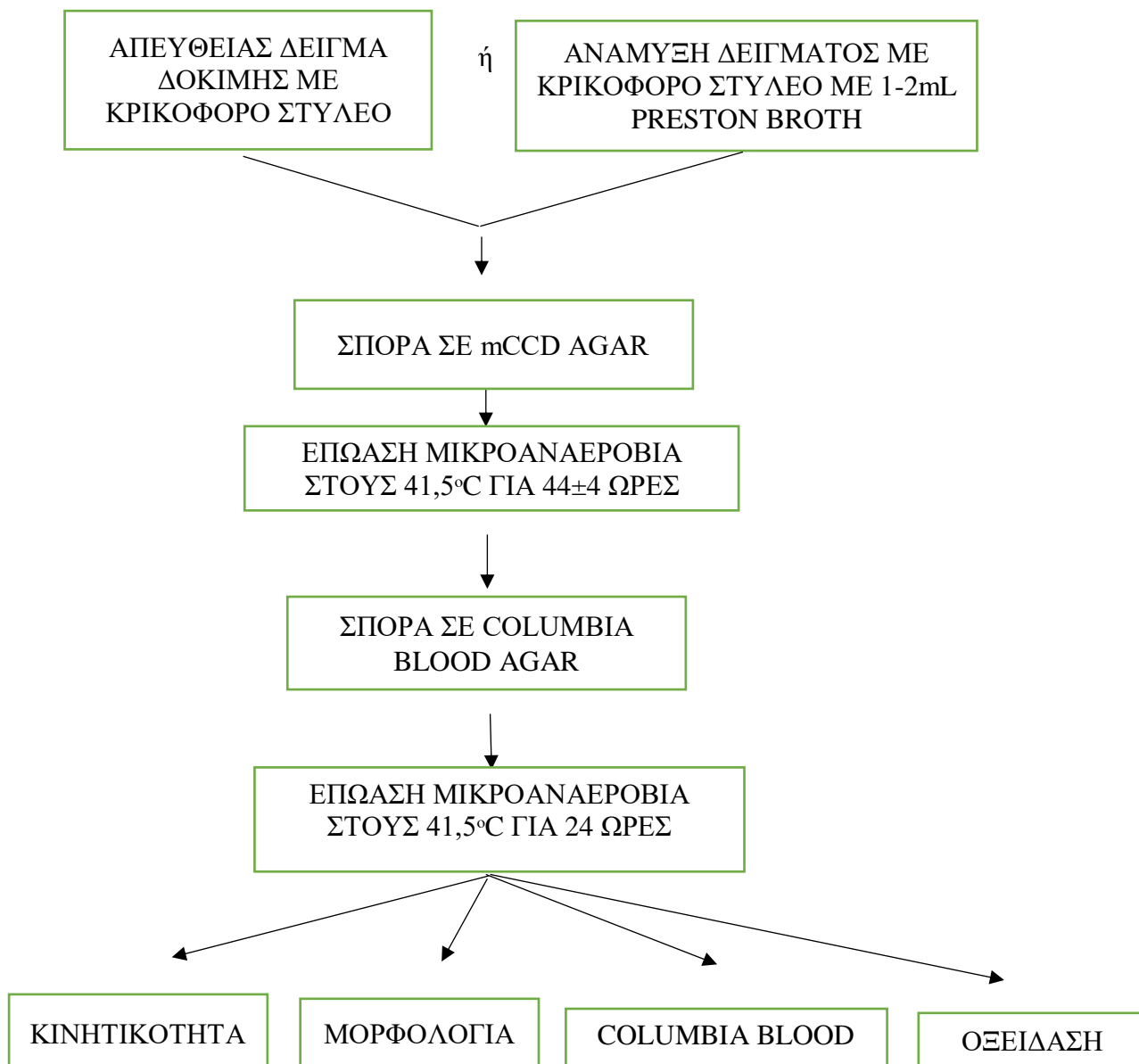
Σχεδιάγραμμα 8. Διαδικασία Α ανίχνευσης και επιβεβαίωσης *Campylobacter spp.*

Για τη διαδικασία B: Την πρώτη ημέρα ζυγίζεται δείγμα 10g ή 10mL και προστίθεται σε αυτό 90mL Preston Broth και τοποθετείται σε κλίβανο στους 41,5°C για 22 έως 26 ώρες σε μικροαναερόβιες συνθήκες. Την δεύτερη ημέρα αφαιρούνται από τον κλίβανο και πραγματοποιείται σπορά σε τρυβλίο mCCD agar και τοποθετείται σε μικροαναερόβιες συνθήκες στους 41,5°C για 40 έως 48 ώρες. Την τέταρτη ημέρα αφαιρούνται από τον κλίβανο και ελέγχονται για τυχόν χαρακτηριστικές αποικίες οι οποίες είναι γκριζωπές με μεταλλική γυαλάδα, επίπεδες και υγρές με τάση να φουσκώνουν. **(ΕΙΚΟΝΑ 14)** Επιλέγονται οι ύποπτες αποικίες και πραγματοποιείται σπορά σε ένα μη εκλεκτικό υπόστρωμα συνήθως Columbia blood agar και τοποθετείται σε κλίβανο σε μικροαναερόβιες συνθήκες στους 41,5°C για 24 ώρες. Την πέμπτη ημέρα αφαιρούνται από τον κλίβανο και λαμβάνεται με τη βοήθεια κρικοφόρου στυλεού μία καλά απομονωμένη αποικία **(ΕΙΚΟΝΑ 15)** και αναμιγνύεται με φυσιολογικό ορό σε αντικειμενοφόρο πλάκα και ελέγχεται για τη μορφολογία την κινητικότητα της στο μικροσκόπιο. Η μορφολογία της σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος θα πρέπει να είναι καμπυλωτού βάκιλου και η κινητικότητα θα πρέπει να έχει χαρακτηριστική περιστροφική κίνηση. Από το τρυβλίο Columbia blood agar λαμβάνεται ξανά απομονωμένη αποικίες και πραγματοποιείται σπορά εκ νέου σε ίδιο τρυβλίο Columbia blood agar και τοποθετείται στους 25°C σε αερόβιες συνθήκες για 40 έως 48 ώρες. Ακόμα πραγματοποιείται και η αντίδραση της οξειδάσης όπου στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος θα είναι θετική η αντίδραση. Την έβδομη ημέρα αφαιρείται το τρυβλίο από τον κλίβανο και ελέγχεται για ανάπτυξη. Στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος δεν θα πρέπει να υπάρχει καμία ανάπτυξη μικροοργανισμού. (ISO 1. , 2017)**(ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9)**



Σχεδιάγραμμα 9. Διαδικασία Β αντίχενσης και επιβεβαίωσης *Campylobacter* spp.

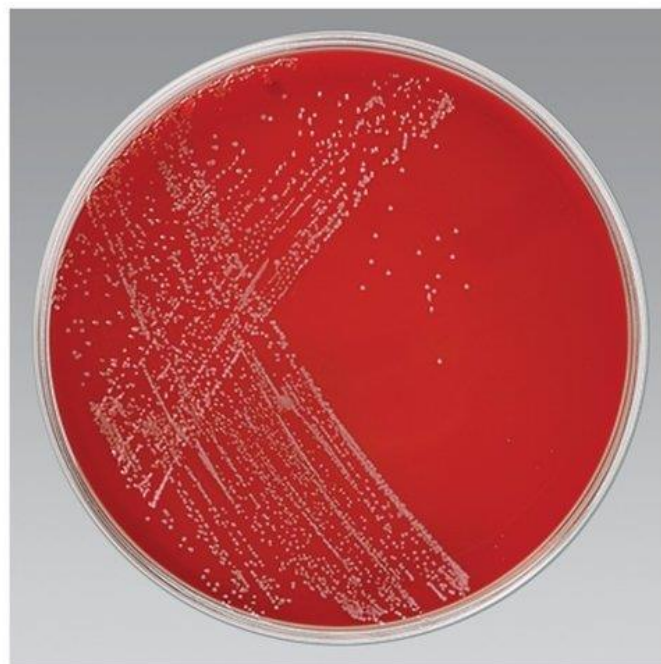
Για τη διαδικασία Γ: Την πρώτη ημέρα λαμβάνεται απευθείας με κρικοφόρο στυλεό ποσότητα και πραγματοποιείται σπορά σε τρυβλίο mCCD agar για δείγματα κοπράνων ή για όλα τα υπόλοιπα δείγματα λαμβάνεται ποσότητα με κρικοφόρο στυλεό και αναμιγνύεται καλά με 1-2 mL Preston broth και έπειτα από το διάλυμα αυτό πραγματοποιείται απευθείας σπορά σε τρυβλίο mCCD agar και τοποθετούνται σε κλίβανο στους 41,5°C για 40 έως 48 ώρες σε μικροαναερόβιες συνθήκες. Την τρίτη ημέρα αφαιρούνται από τον κλίβανο και ελέγχονται για τυχόν χαρακτηριστικές αποικίες οι οποίες είναι γκριζωπές με μεταλλική γυαλάδα, επίπεδες και υγρές με τάση να φουσκώνουν. **(ΕΙΚΟΝΑ 18)** Επιλέγονται οι ύποπτες αποικίες και πραγματοποιείται σπορά σε ένα μη εκλεκτικό υπόστρωμα συνήθως Columbia blood agar και τοποθετείται σε κλίβανο σε μικροαναερόβιες συνθήκες στους 41,5°C για 24 ώρες. Την τέταρτη ημέρα αφαιρούνται από τον κλίβανο και λαμβάνεται με τη βοήθεια κρικοφόρου στυλεού μία καλά απομονωμένη αποικία **(ΕΙΚΟΝΑ 19)** και αναμιγνύεται με φυσιολογικό ορό σε αντικειμενοφόρο πλάκα και ελέγχεται για τη μορφολογία την κινητικότητα της στο μικροσκόπιο. Η μορφολογία της σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος θα πρέπει να είναι καμπυλωτού βάκιλου και η κινητικότητα θα πρέπει να έχει χαρακτηριστική περιστροφική κίνηση. Από το τρυβλίο Columbia blood agar λαμβάνεται ξανά απομονωμένη αποικίες και πραγματοποιείται σπορά εκ νέου σε ίδιο τρυβλίο Columbia blood agar και τοποθετείται στους 25°C σε αερόβιες συνθήκες για 40 έως 48 ώρες. Ακόμα πραγματοποιείται και η αντίδραση της οξειδάσης όπου στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος θα είναι θετική η αντίδραση. Την έκτη ημέρα αφαιρείται το τρυβλίο από τον κλίβανο και ελέγχεται για ανάπτυξη. Στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος δεν θα πρέπει να υπάρχει καμία ανάπτυξη μικροοργανισμού. (ISO 1. , 2017)**(ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10)**



Σχεδιάγραμμα 10. Διαδικασία Γ ανίχνευσης και επιβεβαίωσης *Campylobacter spp.*



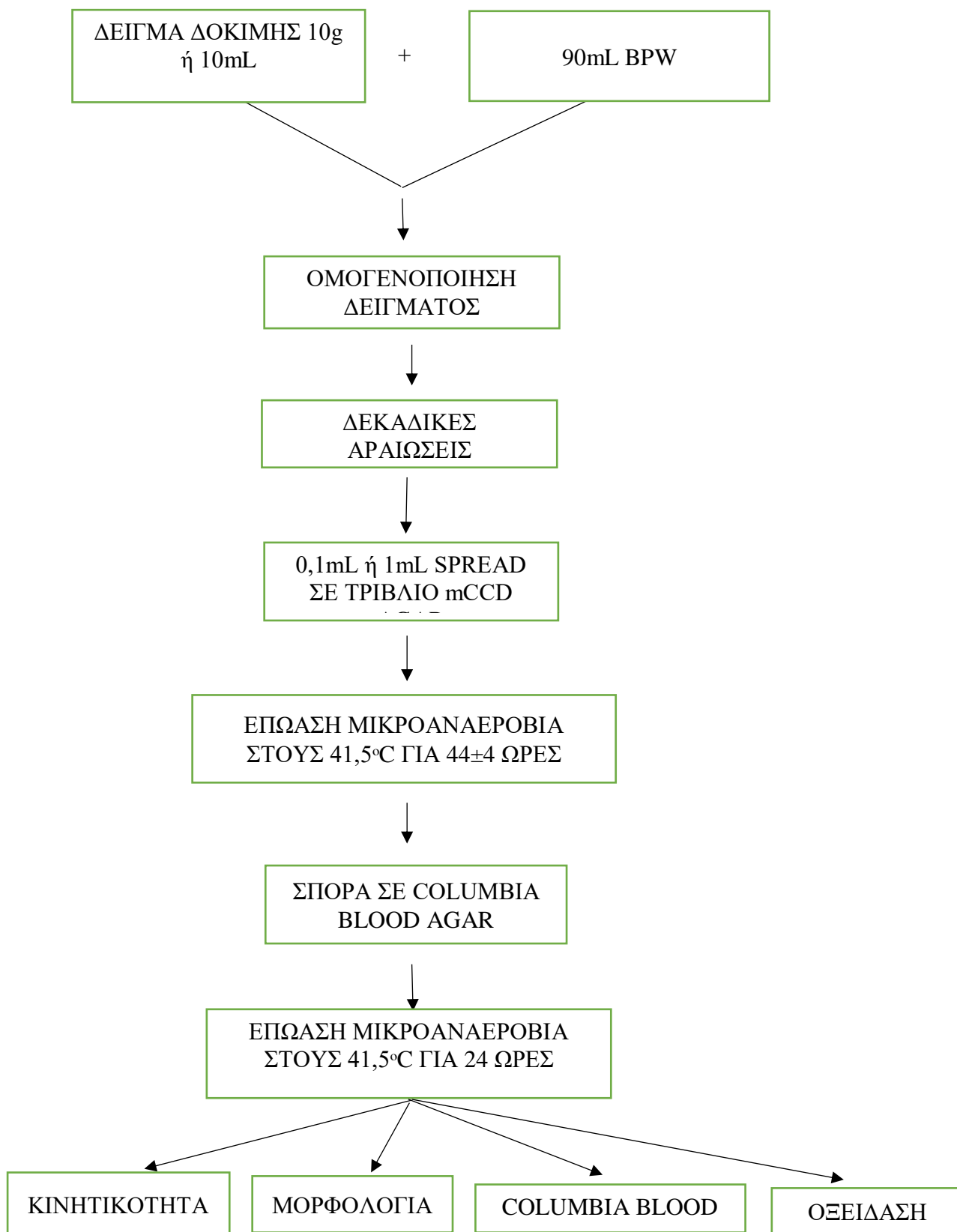
Εικόνα 18. Απεικόνιση θετικών αποικιών *Campylobacter spp.* σε τρυβλίο mCCD agar.
(EOLabs)



Εικόνα 19. Απεικόνιση θετικών αποικιών *Campylobacter spp.* σε τρυβλίο Columbia blood
agar. (LabM)

Για τη διαδικασία καταμέτρησης του *Campylobacter spp.* η επίσημη μέθοδος είναι μία και αφορά όλα τα προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη ή ζωική κατανάλωση, περιβαλλοντικά δείγματα στην παραγωγή τροφίμων ή ζωοτροφών και περιττώματα ζώων ή μάκτρα.

Την πρώτη ημέρα ζυγίζεται δείγμα 10 g ή 10 mL και προστίθεται σε αυτό 90 mL BPW πραγματοποιείται ομογενοποίηση του δείγματος. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται δεκαδικές αραιώσεις του εναιωρήματος τόσες όσες θεωρούνται απαραίτητες για την σωστή έκφραση του αποτελέσματος. Από όλες τις δεκαδικές αραιώσεις λαμβάνεται 0,1 mL τοποθετείται σε τρυβλίο mCCD agar και πραγματοποιείται η τεχνική spread (εξάπλωση του εναιωρήματος στο τρυβλίο). Εναλλακτικά μπορεί να ληφθεί 1 mL και να μοιραστεί σε 3 τριβλία (0,3 mL, 0,3 mL, 0,4 mL) ή οποιοσδήποτε άλλος όγκος αρκεί να καταγράφετε για να γίνει η σωστή αναγωγή του αποτελέσματος στην τελευταία ημέρα. Τα τριβλία τοποθετούνται σε κλίβανο στους 41,5°C για 40 έως 48 ώρες σε μικροαναερόβιες συνθήκες. Την τρίτη ημέρα αφαιρούνται από τον κλίβανο και ελέγχονται για τυχόν χαρακτηριστικές αποικίες οι οποίες είναι γκριζωπές με μεταλλική γυαλάδα, επίπεδες και υγρές με τάση να φουσκώνουν. (**EIKONA 18**) Επιλέγονται οι ύποπτες αποικίες και πραγματοποιείται σπορά σε ένα μη εκλεκτικό υπόστρωμα συνήθως Columbia blood agar και τοποθετείται σε κλίβανο σε μικροαναερόβιες συνθήκες στους 41,5°C για 24 ώρες. Την τέταρτη ημέρα αφαιρούνται από τον κλίβανο και λαμβάνεται με τη βοήθεια κρικοφόρου στυλεού μία καλά απομονωμένη αποικία (**EIKONA 19**) και αναμινύεται με φυσιολογικό ορό σε αντικειμενοφόρο πλάκα και ελέγχεται για τη μορφολογία την κινητικότητα της στο μικροσκόπιο. Η μορφολογία της σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος θα πρέπει να είναι καμπυλωτού βάκιλου και η κινητικότητα θα πρέπει να έχει χαρακτηριστική περιστροφική κίνηση. Από το τρυβλίο Columbia blood agar λαμβάνεται ξανά απομονωμένη αποικίες και πραγματοποιείται σπορά εκ νέου σε ίδιο τρυβλίο Columbia blood agar και τοποθετείται στους 25°C σε αερόβιες συνθήκες για 40 έως 48 ώρες. Ακόμα πραγματοποιείται και η αντίδραση της οξειδάσης όπου στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος θα είναι θετική η αντίδραση. Την έκτη ημέρα αφαιρείται το τρυβλίο από τον κλίβανο και ελέγχεται για ανάπτυξη. Στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος δεν θα πρέπει να υπάρχει καμία ανάπτυξη μικροοργανισμού. (ISO 1.-2. , 2017)(**ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11**)



Σχεδιάγραμμα 11. Διαδικασία καταμέτρησης και επιβεβαίωσης *Campylobacter spp.*

Το *Campylobacter* διακρίνεται από μηχανισμό αντίστασης στις αντιμικροβιακούς παράγοντες η οποία είναι μία στρατηγική επιβίωσης του και γι' αυτό το λόγω θεωρείται ένα από τα δέκα μεγαλύτερα υγειονομικά προβλήματα παγκοσμίως σύμφωνα με τον ΠΟΥ. (Emmanuel O. Njoga, 2023). Άρα, η ανάγκη σχεδιασμού ταχύτερων μεθόδων ήταν επιτακτική. Πλήθος μελετών έχουν πραγματοποιηθεί όλα αυτά τα χρόνια προσπαθώντας να δημιουργήσουν την βέλτιστη μέθοδο ανίχνευσης *Campylobacter spp.* Το 2023 στη Νιγηρία έλαβε χώρα μία μεγάλη μελέτη που αφορούσε την ανίχνευση πολυανθεκτικών ειδών *Campylobacter* σε αντιβιοτικά σε ζώα και σε ανθρώπους. Η μελέτη χρησιμοποιείσαι πουλερικά και βοοειδή που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση αλλά και άτομα που θεωρούνται υψηλού κινδύνου μόλυνσης όπως είναι οι εργαζόμενοι στην επεξεργασία κρεάτων, οι εγκυμονούσες γυναίκες και τα παιδιά κάτω των 5 ετών. Το δείγμα που λήφθηκε ήταν από κόπρανα πουλερικών, βοοειδών και ανθρώπων και ήταν στο σύνολο τους 1212 όπου τα 416 ανήκαν στα πουλερικά, τα 406 σε βοοειδή και τα 390 σε ανθρώπους. Τα δείγματα εμπλουτίστηκαν και απομονώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα mCCD στους 42°C για 48 ώρες. Οι ύποπτες αποικίες επιβεβαιώθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο καλλιέργειας. Από το 1212 δείγματα τα 224 ήταν θετικά επιβεβαιωμένα. Στη συνέχεια τα επιβεβαιωμένα στελέχη *Campylobacter spp.* ελέγχθηκαν για την αντιμικροβιακή τους ευαισθησία με τη χρήση μεθόδου διάχυσης σε τριβλία με άγαρ Kirby-Bauer. Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες ανήκαν σε 9 κατηγορίες αντιβιοτικών. Οι αντιβιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Αμπικιλλίνη
- Πενικιλλίνη
- Κεφοταξίμη
- Χλωραμφενικόλη
- Ερυθρομυκίνη
- Αζιθρομυκίνη
- Τζενταμυκίνη
- Ναλιδιξικό οξύ
- Κεφαλοθίνη
- Μετρονιδαζόλη
- Στρεπτομυκίνη
- Τετρακυκλίνη

- Αμοξικιλίνη
- Σιπροφλοξασίνη
- Κεφτριαζόνη
- Ενροφλοξασίνη.

Με βάση τις ζώνες αναστολής που δημιουργήθηκαν στα τριβλία άγαρ η μικροβιακή αντοχή χαρακτηρίστηκε ως ευαίσθητη, ανθεκτική ή ενδιάμεση. Έπειτα το γονιδιωματικό DNA εκχυλίστηκε από απομονωμένες αποικίες *Campylobacter spp.* χρησιμοποιώντας το Quick-DNA kit Fungal/Bacterial Miniprep και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Για τον έλεγχο καθαρότητας και της συγκέντρωσης του εξαγόμενου DNA χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρία NanoDrop με μέτρηση απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm και 280nm και υπολογίζοντας το λόγο τους. Η ενίσχυση που επιλέχθηκε ήταν η multiplex PCR και οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 3 για να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονη ανίχνευση τριών γονιδίων για τρία διαφορετικά στελέχη *Campylobacter spp.* Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25 μ L όπου αποτελούνταν από 5 Master mix, 1,25 μ L για τον κάθε εκκινήτη (3,75 μ L στο σύνολο), 14,25 μ L DNA εκμαγείου και τέλος αποστειρωμένο νερό 2 μ L. Έπειτα παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και χρησιμοποιήθηκε και αυτό κόκκινη χρωστική, ηλεκτροφορήθηκαν για 15 λεπτά σε 120 V και οπτικοποιήθηκαν σε υπεριώδες φως. Από τα στελέχη που ενισχύθηκαν κανένα δεν ήταν ευαίσθητο στο αντιβιοτικό αμικιλίνη, πενικιλίνη, αμοξικιλίνη, κεφαλοθίνη και μετρονιδαζόλη. Το πιο ευαίσθητο αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η στρεπτομυκίνη και η τζενταμυκίνη και ακολούθησαν η εθυρμυκίνη, η αζιθρομυκίνη, η χλωραμφενικόλη, το ναλιδιξικό οξύ, η ενροφλοξασίνη και η σιπροφλοξασίνη. Τα αποτελέσματα αυτά δεν ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς τα αντιβιοτικά τα οποία που είναι ανθεκτικά στο βακτήριο *Campylobacter spp.* είναι και αυτά τα οποία χρησιμοποιούνται για τα γαστρεντερικά προβλήματα σε ανθρώπους και ζώα. (Emmanuel O. Njoga, 2023)

Το 2023 στην Ιαπωνία δύο ερευνητές δημοσίευσαν μία μέθοδο direct-PCR για τον προσδιορισμό των βιώσιμων κυττάρων *Campylobacter spp.* με τη χρήση qPCR χωρίς εκχύλιση DNA σε δείγματα τροφίμων καθώς και σε μέθοδο δειγματοληψίας περιτύλιξης όπου το δείγμα τυλίγεται σε φύλλο χαρτί και αποδείχτηκε σε προηγούμενη μελέτη ότι αυτή η διαδικασία βελτίωσε την αποτελεσματικότητα του εμπλουτισμού που πραγματοποιήθηκε από τον Ιούνιο του 2019 έως τον Σεπτέμβριο του 2022. Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν από 54 και προέρχονταν από κρέας κοτόπουλου (30 δείγματα από συκώτι και 24 δείγματα στήθος) τα

οποία εμβολιάστηκαν με πρότυπο στέλεχος *Campylobacter spp.* και εμπλουτίστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Preston στους 37°C για 24 ώρες σε αναερόβιες συνθήκες σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο καλλιέργειας που έχει αναπτυχθεί παραπάνω. Μετά από τον εμπλουτισμό με θρεπτικό υπόστρωμα Preston πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση direct-qPCR και μετρήθηκε ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων. Στη διαδικασία περιτύλιξης δείγματος (wrap) 25 g τρόφιμου ζυγίζεται και εμβολιάζονται με πρότυπο στέλεχος και στη συνέχεια τυλίγονται με ειδικό φύλλο για 10 λεπτά. Μετά το πέρας των 10 λεπτών το φύλλο αναμιγνύεται με εμπλουτιστικό μέσο Puchitto-Campylo και πραγματοποιείται ομογενοποίηση για 1 λεπτό και με αυτό τον τρόπο παρασκευάζεται το διάλυμα του δείγματος. Η διαδικασία προσδιορισμού βιώσιμων κυττάρων ήταν ίδια με την παραπάνω διαδικασία. Για την ενίσχυση direct-PCR που χρησιμοποιήθηκε επιλέχθηκαν αντιδραστήρια που είναι ανθεκτικά σε αναστολείς PCR. Το μίγμα PCR περιλάμβανε 1 μ L διαλύματός δείγματος το οποίο αναμίχθηκε με 15 μ L προ μίγματος που περιείχε 0,6 μ L DNA πολυμεράσης, 8 μ L ρυθμιστικού διαλύματος PCR, 0,8 μ L χλωριούχο μαγνήσιο συγκέντρωσης 1,5 και 0,5 μ L LightMix Modular Campylobac. Η διαδικασία ενίσχυσης PCR ακολουθούσε τα εξής στάδια:

1. Μετουσίωση στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα
2. Υβριδοποίηση στους 60°C για 15 δευτερόλεπτα επαναλαμβανόμενα για 50 κύκλους ενίσχυσης
3. Μετουσίωση στους 95°C για 4 δευτερόλεπτα.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού LightCycler 96.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πριν τον εμπλουτισμό το ποσοστό ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης με τη μέθοδο του χαρτιού σε δείγματα συκωτιού ήταν 75% ενώ με την ομογενοποίηση ήταν στο 58,3%. Αντίστοιχα τα αποτελέσματα μετά τον εμπλουτισμό στη διαδικασία με το χαρτί ήταν 100% ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενώ με ομογενοποίηση δείγματος ήταν 95,8%. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ξεκάθαρα ότι η μέθοδος περιτύλιξης υπερτερεί σε σχέση με την ομογενοποίηση δείγματος. Ακόμα, σε δείγματα στήθους κοτόπουλου τα ποσοστά πριν τον εμπλουτισμό με μέθοδο περιτύλιξης άγγιζαν το 75% και με τη μέθοδο ομογενοποίησης το 58,3% που πάλι υπάρχει υπερίσχυση της διαδικασίας περιτύλιξης ενώ μετά τον εμπλουτισμό τους και οι δύο διαδικασίες έδωσαν ποσοστό 100% που τις καθιστά ισοδύναμες. (Satoshi Ito, 2023)

Μια ακόμα έρευνα τον Σεπτέμβριο του 2023 σε κρέας κοτόπουλου χρησιμοποίησε τον συνδυασμό καλλιέργειας και ποσοτικής PCR με τη χρήση μοναζιδίου του προπιδίου (PMA) το οποίο εισέρχεται μόνο σε νεκρά βακτήρια μέσω του κατεστραμμένου κυτταρικού τοιχώματος, συνδέεται με το DNA και αποτρέπει την ενίσχυση τους μέσω PCR και έτσι με αυτό τον τρόπο ανιχνεύονται μόνο βιώσιμα βακτήρια. Συλλέχθηκαν 105 δείγματα κρέατος κοτόπουλου από τα οποία τα 36 προέρχονται από πόδια κοτόπουλου, τα 36 τα από φιλέτο στήθους και τα 33 από συκώτι. Το αρχικό βήμα ήταν να ζυγισθούν 25 g από κάθε δείγμα και να ξεπλυθούν με 10 αποστειρωμένου φωσφορικού αποστειρωμένου αλατούχου διαλύματος (PBS) και το διάλυμα να φυγοκεντρηθεί στα 800rpm για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C για να επιτευχθεί η σφαιροποίηση των βακτηρίων. Έπειτα σε κάθε σφαιρίδιο προστέθηκαν 100 μL PBS, 40 μL PMA Enhancer και 0,5 μL PMAxx. Πραγματοποιήθηκε ανάμιξη του δείγματος και επωάστηκαν στους 37°C για 10 λεπτά σε απόλυτο σκοτάδι και έπειτα στο φως για 15 με της χρήση λαμπτήρων LED Crosslinker 12 ώστε να ενεργοποιηθεί το PMAxx. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν ξανά σε 800rpm για 10 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία με PMA και μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης τα το DNA εκχυλίστηκε από κάθε σφαιρίδιο με τη βοήθεια του DNeasy kit Blood % Tissue σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το εκχυλισμένο DNA υποβλήθηκε σε ενίσχυση qPCR με τη βοήθεια θερμοκυκλοποιητή StepOnePlus. Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν ήταν το campF2 και ο campR2 και ο ανιχνευτής camp2probe. Ο συνολικός όγκος του μίγματος PCR που κατασκευάστηκε ήταν 20 που περιείχε 2 μL εξαγόμενου DNA χρησιμοποιώντας το GoTaq Probe qPCR Master Mix σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ενίσχυση έλαβε χώρα με τις κάτωθι συνθήκες:

1. 95°C για 2 λεπτά
2. 95°C για 3 δευτερόλεπτα επαναλαμβανόμενα για 40 κύκλους
3. 60°C για 30 δευτερόλεπτα

Στο τέλος του κάθε κύκλου μετρίοταν και ο φθορισμός.

Από αποτελέσματα του ελήφθησαν από την πειραματική διαδικασία έδειξαν ότι σε κάποιες λίγες περιπτώσεις η μέθοδος καλλιέργειας δεν ανίχνευε την παρουσία *Campylobacter spp.* σε αντίθεση με τη μέθοδο PMA-qPCR και αυτό ίσως να οφείλεται σε ουσίες που υπήρχαν στο κρέας κοτόπουλου και δεν το άφησε να αναπτυχθεί στο τριβλίο. Γι' αυτό το λόγο η μέθοδος αυτή τείνει να καθιερωθεί με βελτιστοποιημένη συνθήκη. (Ayaka Okada, 2023)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο - *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus aureus* ή αλλιώς χρυσίζων σταφυλόκοκκός είναι ένα Gram (+) βακτήριο που ανήκει στο γένος *Firmicutes* και στην κατηγορία *Bacilli*. (Girma, 2025). Το σχήμα του μοιάζει με «τσαμπί σταφυλίου» από όπου πήρε και το όνομα του. (ΕΙΚΟΝΑ 20) Πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό παθογόνο βακτήριο που δημιουργεί ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων, από μια απλή δερματική λοίμωξη έως σοβαρή μόλυνση ιστών και σήψη. Ο *Staphylococcus aureus* συναντάται στην φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος και τους ανθρώπους αλλά και στα ζώα. (Nour Ahmad-Mansour, 2021). Ο *S. aureus* εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1880 έχοντας πολύ υψηλή θνησιμότητα έως την εισαγωγή της πενικιλίνης το 1940 ως μέθοδο θεραπείας του. (Zhen Xu, 2022). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι οι 37°C.

Οι σταφυλόκοκκοι θετικοί στην κοαγουλάση στους οποίες συμπεριλαμβάνεται και ο *Staphylococcus aureus* αποτελούν κύρια αιτία τροφικής δηλητηρίασης από σταφυλόκοκκό καθώς παράγουν και εκκρίνουν σταφυλοκοκκικές ενδοτοξίνες. (Noémie Vingadassalon, 2025). Συνήθως αποικίζει στους πρόσθιους ρίνους του ανθρώπου. Οι απλές λοιμώξεις του δέρματος κατά το μεγαλύτερο τους ποσοστό είναι αυτοιάσιμες αλλά σε κάποιες περιπτώσεις το παθογόνο εισέρχεται στους βαθύτερους ιστούς και στην κυκλοφορία του αίματος με αποτελέσματα να προκαλούν σημαντικότερες βλάβες στην ανθρώπινο οργανισμό. Ο σημαντικότερος κίνδυνος προσδιορίζεται στους ηλικιωμένους καθώς και στα βρέφη. Ενώ το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού νοσεί ελαφριά από τον *S. Aureus* στο σύνολο τους η θνησιμότητα ανέρχεται από 20% έως 50% ανάλογα με τη σοβαρότητα της κατάστασης και οι υποτροπές τις ασθένειας κυμαίνεται σε ποσοστό από 5% έως 10%. Το ένα τρίτο από τους επιζώντες εξακολουθούν παρά τις θεραπείες να υπάρχουν μόνιμες βλάβες. (Jakub M Kwiecinski, 2020)



Εικόνα 20. Απεικόνιση *Staphylococcus aureus*. (Otter, 2012)

Ο *S. aureus* έχει καταφέρει να αναπτύξει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καθώς παράγει ένζυμα εξουδετέρωσης τους το οποίο θεωρείται από τα σημαντικότερα προβλήματα γενικά καθώς ο ετήσιος αριθμός θνησιμότητας από ασθενείς ανθεκτικούς στα αντιβιοτικά έχει ξεπεράσει τα 10 εκατομμύρια και εκτιμάται ότι μέχρι το 2050 θα ξεπερνά σε θανάτους τον καρκίνο. (Nour Ahmad-Mansour, 2021) Το 2014 ο ΠΟΥ ανέφερε ότι το 86% των κλινικών ελέγχων του *S. Aureus* ήταν ανθεκτικά στη μεθικιλίνη. (Girma, 2025)

Ο *S.aureus* είναι πιο διαδεδομένος σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα σε ποσοστό 35,1% και ακολουθεί το κρέας με 21,7% και τα γαλακτοκομικά προϊόντα με 18,5%. Από το σύνολο των μολυσμένων προϊόντων κρέατος το 44% ανήκε στο βοδινό κρέας, το 22% στο κρέας κοτόπουλου και το 6% στο κρέας γαλοπούλας. (Vincent Léguillier, 2024) Σε Ευρωπαϊκό επίπεδο έχουν δοθεί κατευθυντήριες οδηγίες ως προς το *S.aureus* και την παρουσία του στα τρόφιμα. Στον **ΠΙΝΑΚΑ 16** αναφέρονται οι κατηγορίες τροφίμου και τα επιτρεπόμενα όρια. Οι αναφορές του ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΥ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 αναφέρονται στον *Staphylococcus aureus* θετικό στην πηκτάση.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	ΟΡΙΑ	ΣΤΑΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ	ΜΕΤΡΑ ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΜΗ ΙΚΑΝΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ
Τυριά και νωπό γάλα	10 ⁴ cfu/g	Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής, τη στιγμή όπου αναμένεται ο μέγιστος αριθμός σταφυλόκοκκων	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και στην επιλογή των πρώτων υλών.
Επεξεργασμένα τυριά σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αυτές της παστερίωσης	100 cfu/g	Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής, τη στιγμή όπου αναμένεται ο μέγιστος αριθμός σταφυλόκοκκων	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και στην επιλογή των πρώτων υλών
Ωριμασμένα τυριά από γάλα ή ορό γάλακτος που έχουν υποστεί παστερίωση ή ισχυρότερη θερμική επεξεργασία	100 cfu/g	Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής, τη στιγμή όπου αναμένεται ο μέγιστος αριθμός σταφυλόκοκκων	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και στην επιλογή των πρώτων υλών
Μη ωριμασμένα μαλακά τυριά από γάλα ή ορό γάλακτος που έχουν υποστεί παστερίωση ή ισχυρότερη	10 cfu/g	Τέλος της διαδικασίας παραγωγής	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής

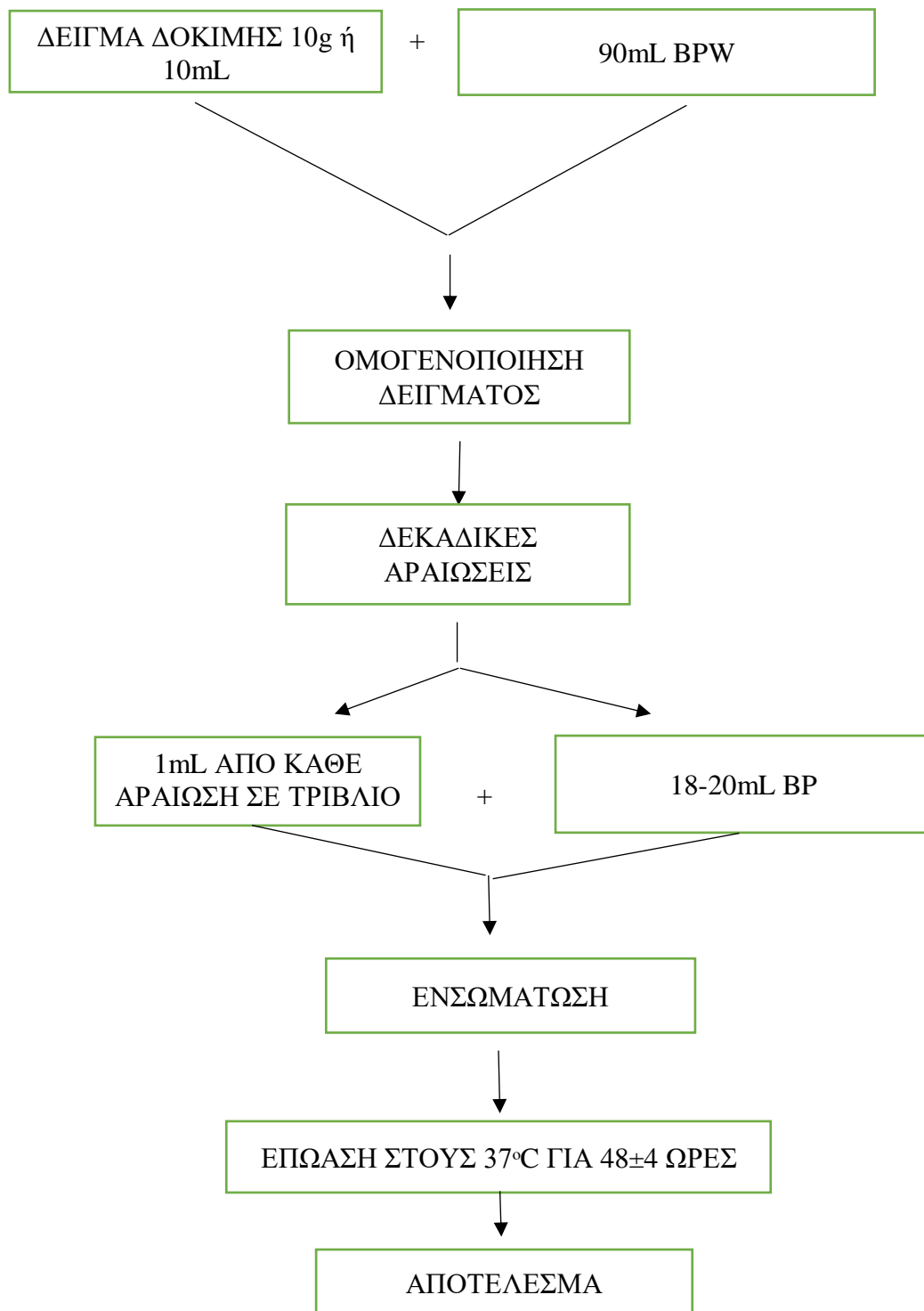
θερμική επεξεργασία			
Σκόνη γάλακτος και σκόνη ορού γάλακτος	10 cfu/g	Τέλος της διαδικασίας παραγωγής	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής
Με κέλυφος και χωρίς κέλυφος προιοντα βρασμένων μαλακοστράκων και μαλακίων	100 cfu/g	Τέλος της διαδικασίας παραγωγής	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής

Πίνακας 16. Αποδεκτά μικροβιολογικά όρια για το *Staphylococcus aureus* θετικό στην
πηκτάση ανά κατηγορία τρόφιμου και μέτρα αντιμετώπισης

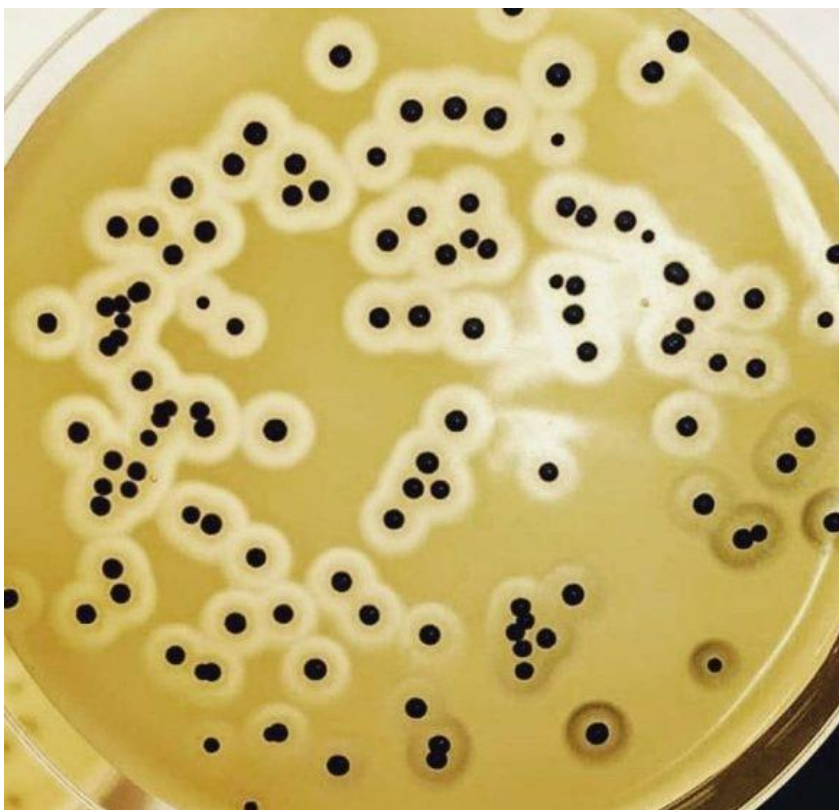
Η μέθοδος που ακολουθείται έως και σήμερα σε πολλά εργαστήρια για την καταμέτρηση του *S.aureus* θετικού στην πηκτάση (κοαγουλάση) είναι η ISO 6888-2:2021 όπου αναφέρεται στην οριζόντια μέθοδο με χρήση θρεπτικού υποστρώματος αگار ινωδογόνου πλάσματος κουνελιού με βέλτιστη θερμοκρασία 34 – 38 °C. Το πρότυπο αναφέρεται σε προϊόντα ανθρώπινης και ζωικής κατανάλωσης, περιβαλλοντικά δείγματα στον τομέα παραγωγής και χειρισμού τροφίμων και ζωοτροφών καθώς και σε δείγματα από το στάδιο της πρωτογενούς παραγωγής. Η γενική διαδικασία που ακολουθείται έχει παρόμοια αν όχι ίδια αρχικά στάδια με τις προηγούμενες μεθόδους. Ζυγίζονται 10 g τρόφιμου και σε αυτά προστίθενται 90 mL BPW και ομογενοποιούνται σε stomacher για 3 λεπτά. Έπειτα λαμβάνεται 1 mL και πραγματοποιούνται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις έως να θεωρηθούν αρκετές ανάλογα το τρόφιμο για να μπορέσει εκάστοτε αναλυτής να δώσει ορθό αποτέλεσμα. Από κάθε αραιώση λαμβάνεται 1 mL και τοποθετείται σε τρυβλίο. Έπειτα σε κάθε τρυβλίο προστίθεται 18-20 mL φρέσκου παρασκευασμένου θρεπτικού υποστρώματος με άγαρ που ονομάζεται Baird Parker (BP). Πραγματοποιείται ενσωμάτωση του δείγματος με το υπόστρωμα, αφήνονται να έρθουν σε στερεή μορφή και τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37°C για 44 - 52 ώρες. Μετά το πέρας των ωρών αφαιρούνται από τον κλίβανο και ελέγχονται για τυχόν τυπικές αποικίες *S.aureus* οι οποίες είναι μαύρες ή γκρι και ίσως κάποιες φορές και λευκές οι οποίες είναι μικρές και γύρω

τους περιβάλλεται άλω που υποδεικνύει και την δραστηριότητα της πηκτάσης. Δεν απαιτείται επιπλέον επιβεβαίωση των αποικιών. **(ΕΙΚΟΝΑ 21)** (ISO 6. , 2021)

Η διαδικασία καταμέτρησης του *S.aureus* δίδεται στο **ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12**.



Σχεδιάγραμμα 12. Διαδικασία καταμέτρησης και επιβεβαίωσης *Staphylococcus aureus*



Εικόνα 21. Απεικόνιση θετικών αποικιών *Staphylococcus aureus* σε τρυβλίο Baird Parker.
(Hub)

Όπως και για όλα τα προηγούμενα παθογόνα έτσι και τον *S.aureus* κρίθηκε απαραίτητη η ανάγκη ανάπτυξης ταχύτερων τεχνικών για την ανίχνευση του. Η τεχνική ανάλυσης του νουκλεϊκού οξέος που βασίζεται στην PCR επιτυγχάνει ταχεία, ευαίσθητη και πολλαπλή ανίχνευση αλλά πάντα με τον κίνδυνο ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων καθώς ενισχύονται βιώσιμα και μη βιώσιμα κύτταρα μαζί. Μία νέα τεχνική η οποία ολοένα και κερδίζει έδαφος είναι αυτή που βασίζεται σε φάγους οι οποίοι είναι ιοί που μολύνουν και διπλασιάζονται μέσα στα βακτήρια τα κύτταρα-στόχους. Έχουν την ιδιότητα να ανιχνεύουν μόνο βιώσιμα κύτταρα και αυτό την κρίνει αρκετά αποτελεσματική. Σε αυτή την διαδικασία αν μετά από την ενίσχυση φάγου τα βακτήρια-στόχοι καλλιεργηθούν με κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικών τότε η αντιβιοτική ευαισθησία των βακτηριών-στόχων προσδιορίζεται με τον υπολογισμό του ρυθμού μείωσης της πλάκας κατά 99%. (Yifeng Ding, 2023)

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2023 στην Κίνα αναπτύχθηκε η τεχνική ενίσχυσης φάγου (PAA) με χρήση του φάγου LSA2311 για να επιτευχθεί η ποσοτική ανίχνευση των βιώσιμων

S.aureus με υψηλή ειδικότητα και ακρίβεια και για να προσδιοριστεί η ευαισθησία του στην πενικιλίνη. Αρχικά επιλέχθηκε πρότυπο στέλεχος αναφοράς *S.aureus* το οποίο εμπλουτίστηκε με εμπλουτιστικό μέσο στους 37°C για 24 ώρες. Για την απενεργοποίηση των φάγων που δεν έχουν μολυνθεί από το βακτήριο ξενιστή επιλέχθηκε κατάλληλο ιοκτόνο όπου ο φάγος LSA2311 επώαστηκε με 10 nM θειικό αμμώνιο σίδηρο (II) (FAS) για 10 λεπτά και ο προσδιορισμός του υπερκειμένου έγινε με τη δοκιμασία επικάλυψης άγαρ. Έπειτα προσδιορίστηκε ο κατάλληλος εξουδετερωτής ώστε να εξουδετερωθεί η δράση του ιοκτόνου αφού σκοτώσει τον ελεύθερο φάγο. Ο φάγος LSA2311 επώαστηκε στους 37°C για 15 λεπτά μαζί με πρότυπο στέλεχος *S.aureus*. Το μίγμα που προέκυψε αναμίχθηκε με FAS σε διάφορες συγκεντρώσεις και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται διάλυμα κιτρικού τρινατρίου (διάλυμα κιτρικού τρινατρίου / FAS με αναλογία 2:3) για την εξουδετέρωση της δραστηριότητας των ιοκτόνων. Οι πλάκες φάγων προσδιορίστηκαν με επικάλυψη διπλού άγαρ στους 37°C για 45 ώρες. Για την βελτιστοποίηση του εξουδετερωτή ο φάγος LSA2311 επώαστηκε στους 37°C για 15 λεπτά μαζί με πρότυπο στέλεχος *S.aureus* και έπειτα επώαστηκε για 10 ακόμα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μαζί με 25 nM FAS. Στην συνέχεια το μίγμα επώαστηκε ξανά σε θερμοκρασία δωματίου μαζί με ίσο όγκο 2% Tween-80, 25 nM CaCl₂ και κιτρικό τρινάτριο (διάλυμα κιτρικού τρινατρίου / FAS με αναλογία 2:3) για αν επιτευχθεί η εξουδετέρωση της δραστηριότητας του FAS. Η ταυτόχρονη επώαση *S.aureus* και FAS είχε ως σκοπό τη διασφάλισης ότι το FAS δεν θα επηρεάσει την ανάπτυξη των βακτηρίων.

Η διαδικασία ανίχνευσης φάγων ξεκινάει με τη διαδικασία όπου πρότυπο στέλεχος *S.aureus* με συγκέντρωση 108CFU/mL αναμίχθηκε με φάγο LSA2311 με συγκέντρωση 107PFU/ και επώαστηκαν στους 37°C για 15 λεπτά με ανακίνηση σε στροφές 180 rpm. Έπειτα προστέθηκε FAS για 5 λεπτά για την εξόντωση των ελεύθερων φάγων και τέλος προστέθηκε διάλυμα κιτρικού τρινατρίου για εξουδετέρωση επίδρασης FAS και όλα αυτά επώαστηκαν στους 37°C για 30 λεπτά με ανάδευση σε στροφές 180rpm. Το τελικό μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 4 λεπτά στους 4°C με στροφές 8500rpm και το υπερκείμενο φάγων προσδιορίστηκε με επικάλυψη διπλού άγαρ. Ακολούθως επιλέχθηκε η κατάλληλη αλληλουχία από την περιοχή πρωτεΐνης του φάγου *S.aureus* για τον σχεδιασμό των εκκινητών με το λογισμικό Primer 3 και ήταν οι εξής:

- F: 5'-TGCGTGCTATTCTAGGTGGA-3'
- R: 5'-ACCACTTACCAAACCTCCGA-3'

Το πρωτόκολλο για την εξαγωγή του DNA που επιλέχθηκε ήταν απλό στην χρήση αλλά και με ταχύτητα. Λήφθηκε 1 mL δείγματος και θερμάνθηκε στους 99°C για 10 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν στα 8000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και τέλος το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα. Η ενίσχυση που επιλέχθηκε ήταν αυτή της qPCR όπου ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20 μ L που σε αυτά συμπεριλαμβάνονταν 10 μ L Grepp Master Mix, 100 nM εκκινητών και 1 μ L πρότυπου στελέχους. Τα στάδια της qPCR που ακολουθήθηκαν ήταν ως εξής:

1. 95°C για 5 λεπτά
2. 95°C για 10 δευτερόλεπτα και 60°C για 30 δευτερόλεπτα επαναλαμβανόμενο για 40 κύκλους και
3. 60°C για 15 δευτερόλεπτα

Στο πείραμα που ακολούθησε συλλέχθηκαν δείγματα από μαρούλι και αποβουτυρωμένο γάλα τα οποία πρώτα αποστειρώθηκαν στους 115°C για 15 λεπτά και έπειτα εμβολιάστηκαν με πρότυπο στέλεχος *S.aureus* σε διάφορες συγκεντρώσεις από 10 έως 10⁶ cfu/mL. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή που περιεγράφηκε παραπάνω. Τα αποτελέσματα εξάχθηκαν με τη μέθοδο PAA-qPCR ήταν σε διάστημα 1,5 ώρας στο σύνολο. Τα αποτελέσματα ανάκτησης έδειξαν το ποσοστό να κυμαίνεται από 85% έως 115% και αυτό κρίνει τη μέθοδο αποτελεσματική σε τρόφιμα και αρκετά ταχύτερη σε σύγκριση με τη μέθοδο καλλιέργειας. (Yifeng Ding, 2023)

Πολύ πρόσφατα, αναγνωρίστηκε η ανάγκη ανάπτυξης φορητών αναλυτικών συσκευών ανίχνευσης *S.aureus* στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης. Έτσι δημιουργήθηκε ένας φορητός ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας με υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα σε τρόφιμα. Ο αισθητήρας αυτός διαθέτει σχεδιασμό νανομηχανικής με χρήση τρισδιάστατων νανοφύλλων άνθρακα με πρόσμιξη αζώτου, φωσφόρου και θείου. Το όριο ανίχνευσης που παρέχεται από αυτή τη συσκευή είναι 24 CFU/mL το οποίο είναι αρκετά χαμηλό. Είναι μία συσκευή απλή στη χρήση και ταχεία. (Mohammed Y. Emran, 2025)

Για της σύνθεση των προσμίξεων αζώτου (N), φωσφόρου (P) και θείου (S) με τρισδιάστατα νανοφύλλα άνθρακα (3D-NPS CNS) αρχικά το άζωτο, ο φώσφορος και το θείο αναμίχθηκαν και υπέκυψαν σε θερμική επεξεργασία. Στη συνέχεια 20 mL διαλύματος θειουρίας 5 M προστέθηκαν στάγδην σε 60mL διαλύματος φυτικού οξέος 0,5 M με συνεχή ανάδευση. Σε αυτό μίγμα αυτό προστέθηκε στάγδην 20 mL διαλύματος εξαμεθυλενοτετραμίνης (HMT) 1,4 M με συνεχή ανάδευση για το σχηματισμό ομοιογενούς μίγματος. Στη συνέχεια ξηράθηκε σε

τρυβλίο στους 80°C για 12 ώρες. Μετά το πέρας των 12 ωρών το 3D-NPS CNS ενανθρακώθηκε στους 900°C για 4 ώρες με ροή αζώτου. Το υλικό που συλλέχθηκε εκπλύθηκε σε διάλυμα νερού-αιθανόλης (1:1) πέντε φορές και έπειτα ξηράθηκε σε κλίβανο στους 60°C. Για την κατασκευή και ακινητοποίηση του στοιχείου *S.aureus* απαιτούνται 3 ηλεκτρόδια, ένα ηλεκτρόδιο άνθρακα, ένα ηλεκτρόδιο εργασίας άνθρακα και ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag. Πριν την κατασκευή του βιοαισθητήρα τα ηλεκτρόδια επεξεργάστηκαν με PBS με pH 7,2. Το ηλεκτρόδιο κατασκευάστηκε ως εξής:

1. Προετοιμασία διαλύματος μελάνης με 10 mg τρισδιάστατων νανοφύλλων άνθρακα (CNS) με πρόσμιξη αζώτου, φωσφόρου και θείου (NPS) που αναμίχθηκαν με 0,99 mL Milli-Q νερό και 10mL Naflion 5% ως συνδετικό μέσο,
2. 10μL διαλύματος μελανιού στην περιοχή ηλεκτροδίου άνθρακα (SPCE)
3. Σταθεροποίηση του ηλεκτροδίου άνθρακα μέσω κυκλικής βολτομετρίας για 50 κύκλους με ρυθμό 50 mVs⁻¹.
4. Ενεργοποίηση επιφάνειας CNS/SPCE με πρόσμιξη 3D-NPS με επώαση για 1 ώρα 100 υδροχλωρικού 1-αιθυλ-3-[3-διμεθυλαμινοπροπυλ] καρβοδιιμιδίου (EDC) και 20 mM N-υδροξυηλεκτριμιδίου (NHS) σε PBS (pH = 7)

Ο ανοσοαισθητήρας *S.aureus* με 3D-NPS-CNS κατασκευάστηκε με ακινητοποίηση του αντισώματος όπου 10 μL αντι-*S.aureus* συγκέντρωση 3mg/mL διαλύθηκε με PBS ρυθμισμένο σε pH 7,2 και πραγματοποιήθηκε εφαρμογή στην περιοχή του ενεργού ηλεκτροδίου εργασίας και αφέθηκε για 4 ώρες στους 4°C. Έπειτα το πέρας των 4 ωρών πραγματοποιήθηκε έκπλυση με PBS για αφαίρεση μη δεσμευμένων αντισωμάτων και ξηράθηκε. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 μL BSA 0.1% στην περιοχή ηλεκτροδίου εργασίας και παρέμεινε για 1ώρα. Για την ανίχνευση δειγμάτων τροφίμων χρησιμοποιήθηκε χυμός γκουάβας όπου 1mL χυμού αραιώθηκε σε 9 mL PBS και προστέθηκε στο διάλυμα πρότυπο στέλεχος *S.aureus*. Τα αποτελέσματα ανίχνευσης έδειξαν υψηλή ακρίβεια σε σύγκριση με μετρήσεις ELISA που πραγματοποιήθηκαν παράλληλα. (Mohammed Y. Emran, 2025)

Σε πρόσφατη συγκριτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε Γαλλία, Κύπρο και Βέλγιο μεταξύ συμβατικών μεθόδων απομόνωσης *S.aureus* σε τρόφιμα με μεθόδους αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος απομονώθηκαν 351 στελέχη *S.aureus*. Οι απομονώσεις προέρχονταν από τροφικές δηλητηριάσεις από σταφυλόκοκκο (SFPO) κατά τα έτη 1980 έως 2020. Όλα τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα με άγαρ (PCA) και επώαστηκαν στους 37°C για 18 - 24 ώρες. Πριν την εκχύλιση του DNA μεμονωμένες αποικίες

καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα BHI στους 37°C για 16-18 ώρες. Έπειτα πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μεθόδων:

- Ηλεκτροφόρηση γέλης παλμικού πεδίου (PFGE)
- Αλληλουχία πολλαπλών τόπων επτά θέσεων (MLST)
- Αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS)
 - Γονιδίωμα του πυρήνα MLST (cgMLST)
 - Πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου πυρήνα (cSNP)

Οι μέθοδοι cgMLST, WGS και cSNP έδωσαν την μεγαλύτερη ακρίβεια ακολουθούμενα από την PFGE και MLST.

Η μέθοδος PFGE παρουσίασε υψηλή ευκρίνεια με χαμηλό κόστος αλλά θα πρέπει να τυποποιηθούν τα πρωτόκολλα της και οι βάσεις δεδομένων για να μπορέσει να είναι περισσότερο λειτουργική. Είναι μέθοδος χρονοβόρα και αρκετά απαιτητική που δεν ενδείκνυται για μεγάλο αριθμό απομονώσεων.

Η μέθοδος MLST είναι αρκετά αναπαραγώγιμη και λιγότερο απαιτητική από την PFGE αλλά και αυτή δεν ενδείκνυται για μεγάλο αριθμό απομονώσεων.

Η μέθοδος WGS χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια και οι μέθοδοι που βασίζονται σε αυτή είναι κατάλληλες για επιδημιολογικές εφαρμογές. Το κόστος λειτουργίας της ολοένα τείνει να μειώνεται και οδεύει προς την κυρίαρχη μέθοδο του μέλλοντος. (Noémie Vingadassalon, 2025)

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Με βάση όλα όσα έχουν αναφερθεί παραπάνω γίνεται εύκολα αντιληπτό πόσο σημαντική και καταστροφική είναι η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα και πόσο σημαντική είναι η συνεχής παρακολούθηση τους από τις πρώτες ύλες έως το τελικό προϊόν για τη διασφάλιση της ποιότητας τους και της δημόσιας υγείας. Παρόλο που οι κλασικές μέθοδοι με βακτηριακή καλλιέργεια είναι ο «θεμέλιος λίθος» της ανίχνευσης των παθογόνων μικροοργανισμών, λόγω της υψηλής τους ακρίβειας είναι πλέον αρκετά παρωχημένες, αρκετά χρονοβόρες και κοστοβόρες. Σε αντίθεση με τις νέες εξελιγμένες μοριακές μεθόδους ανίχνευσης οι οποίες προσφέρουν υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια και σε αρκετές περιπτώσεις με χαμηλό κόστος. Η συνεχής εξέλιξη αυτών των τεχνικών οδηγεί ολοένα σε πιο βελτιωμένες τεχνικές είναι ικανές να εντοπίσουν άμεσα οποιαδήποτε μόλυνση ακόμα και κατά τη διάρκεια της παραγωγής του στις διάφορες βιομηχανίες καθώς με τις συσκευές δοκιμής σημείου (POT) ο έλεγχος πραγματοποιείται επιτόπου.

Ενώ ολοένα και περισσότερο έδαφος κερδίζεται από τις μοριακές τεχνικές οι συμβατικές μέθοδοι δεν έχουν εκλείψει και ακόμα δεν μπορεί αυτό να πραγματοποιηθεί καθώς για οποιοδήποτε πείραμα πρέπει πρώτα να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονος έλεγχος και των δύο πρακτικών. Ακόμα δεν υπάρχουν αρκετές επίσημες πρότυπες μοριακές τεχνικές όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα εργαστήρια, όπως χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια για τις συμβατικές μεθόδους παρά μόνο επιστημονικά πειράματα ανά τον κόσμο και οδηγίες των οργάνων που κατασκευάζονται.

Οι μέθοδοι νουκλεϊκών οξέων που προαναφέρθηκαν διαθέτουν υψηλή ευαισθησία και μπορούν να ανιχνεύσουν πλήθος παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα αλλά απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό εργαστηρίου και εξειδικευμένα όργανα. Ενώ η ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόγχου (LAMP) είναι και αυτή πολύ εξειδικευμένη, ευαίσθητη αλλά με μικρότερο οικονομικό κόστος.

Βιβλιογραφία

- Adobe, S. (n.d.). Arrangements of Cocci. doi:<https://stock.adobe.com/ca>
- Ane Rivas-Macho, U. E.-A.-d.-C. (2024, September). LAMP based electrochemical sensor for extraction-free detection of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Control*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110546>
- Ane Rivas-Macho, U. E.-A.-d.-C. (2024, September). LAMP based electrochemical sensor for extraction-free detection of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Control*, 163. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110546>
- Arun K. Bhunia, B. B.-S. (2020, November 10). Advances in Foodborne Pathogen Analysis. *Foods*, 9(11). doi:10.3390/foods9111635
- Ayaka Okada, M. T. (2023, September). Detection of *Campylobacter* spp. in chicken meat using culture methods and quantitative PCR with propidium monoazide. *Poultry Science*, 102(9). doi:<https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102883>
- Bird, P. (2019, June 18). STEC, EHEC, or E. coli O157? Differentiating between Targets. doi:<https://www.food-safety.com/articles/6260-stec-ehc-or-e-coli-o157-differentiating-between-targets>
- Boyan Guo, Y. Z. (2024, November). The detection of *Salmonella* in food based on PCR combined with *Pyrococcus furiosus* Argonaute. *Microchemical Journal*, 206. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111311>
- Boyer, M. (2021, July 20). *Listeria* sp. et *Listeria monocytogenes*. Paris. doi:<https://www.vigilab.com/documentation/fiches-microbiologie/listeria-sp-et-l-monocytogenes>
- Cesare, A. D. (2018). Chapter Six - *Salmonella* in Foods: A Reemerging Problem. *Advances in Food and Nutrition Research*, 86, σσ. 137-179. doi:<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.007>
- Deepraj Sarkar, R. R. (2024, July). Multiplex PCR for detection of camel milk adulteration with cattle and goat milk. *International Dairy Journal*, 154. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.105922>
- depositphotos. (n.d.). Structure of bacteria cell. doi:<https://depositphotos.com/vector/structure-of-a-bacterial-cell-12433419.html>

- Deshun Xu, L. C. (2024, February). Prevalence and Serotyping of Salmonella in Retail Food in Huzhou China. *Journal of Food Protection*, 87(2). doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100219>
- Eiseul Kim, S.-M.-Y. H.-Y. (2023, December). Development of rapid on-site detection of Salmonella Enteritidis, S. Typhimurium, and S. Thompson in food samples using an ultrafast PCR system. *Food Bioscience*, 56. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103242>
- Eleonora Sarno, D. P. (2021, December). A Review of Significant European Foodborne Outbreaks in the Last Decade. *Journal of Food Protection*, 84(12), σσ. 2059-2070. doi:<https://doi.org/10.4315/JFP-21-096>
- Emmanuel O. Njoga, J. A. (2023, December). Detection of multidrug-resistant Campylobacter species from food-producing animals and humans in Nigeria: Public health implications and one health control measures. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 103. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102083>
- EOLabs. (n.d.). Campylobacter Blood Free Agar (CCDA). Scottish. doi:<https://www.eolabs.com/product/ccda-2/>
- EUROLAB. (n.d.). Turkey. doi:<https://www.laboratuvar.com/en/kozmetik-testleri/mikrobiyolojik-analizler/toplam-aerobik-mezofil-bakteri-sayimi>
- Evangelia A. Zilelidou, P. N. (2018, July 20). Growth, detection and virulence of Listeria monocytogenes in the presence of other microorganisms: microbial interactions from species to strain level. *International Journal of Food Microbiology*, 277, σσ. 10-25. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.011>
- Fan Li, Q. Y. (2021, March). Real-time PCR identification of Listeria monocytogenes serotype 4c using primers for novel target genes obtained by comparative genomic analysis. *LWT*, 138. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110774>
- Girma, A. (2025, June). Staphylococcus aureus: Current perspectives on molecular pathogenesis and virulence. *The Cell Surface*, 13. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tcs.2024.100137>
- Girma, A. (2025, June). Staphylococcus aureus: Current perspectives on molecular pathogenesis and virulence. *The Cell Surface*(13). doi:<https://doi.org/10.1016/j.tcs.2024.100137>

- Hof, H. (2003, April). History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3), 199-202. doi:[https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00471-6](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00471-6)
- Hub, M. R. (n.d.). BAIRD – PARKER AGAR. doi:<https://microbiologyclass.net/baird-parker-agar/>
- ISO. (2017). *Microbiology of food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. - Part 1: Detection method (ISO 11290-1:2017)*. BRUSSELS: EUROPEAN STANDARD.
- ISO, 1. (2017). *Microbiology of food chain - Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. - Part 1: Detection method*. Switzerland: INTERNATIONAL STANDARD.
- ISO, 1.-2. (2017). *Microbiology of food chain - Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. - Part 2: Colony - count technique*. Switzerland: INTERNATIONAL STANDARD.
- ISO, 2. (2017). *Microbiology of food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: Detection of Salmonella spp. ISO 6579-1:2017*. SWITZERLAND: INTERNATIONAL STANDARD.
- ISO, 6. (2021). *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of coagulase - positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) - Part 2: Method using rabbit plasma fibrinogen agar medium*. Geneva: INTERNATIONAL STANDARD.
- ISO, I. S. (2014). *ISO 11133 Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media*. Switzerland: ISO.
- Itumeleng Matle, K. R. (2020, October 9). A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. doi:10.4102/ojvr.v87i1.1869
- Jakub M Kwiecinski, A. R. (2020, February). *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Current Opinion in Microbiology*, 53, σσ. 51-60. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.005>
- Jean-Christophe Lagier, S. E. (2015). Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(28), σσ. 208-236. doi:<https://doi.org/10.1128%2FCMR.00110-14>

- Jin-Hee Kim, S.-W. o. (2021, March). Pretreatment methods for nucleic acid-based rapid detection of pathogens in food: A review. *Food Control*, 121. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107575>
- José A. Vázquez-Boland, M. K.-B.-Z. (2001, July). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, σσ. 584-640. doi:0.1128/CMR.14.3.584-640.2001
- Kang, T. S. (2019, September). Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 91, σσ. 574-585. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.037>
- L. M. Bradford, L. Y.-S. (2024, October 30). Limit of detection of *Salmonella* ser. Enteritidis using culture-based versus culture-independent diagnostic approaches. *Microbiology Spectrum*, 12(12). doi:<https://doi.org/10.1128/spectrum.01027-24>
- LabM. (n.d.). *Campylobacter* Blood Agar. UK.
- Labs, E. (n.d.). PALCAM Agar. Scottish. doi:<https://www.eolabs.com/product/pp0005-palcam-agar/>
- Liang Sun, H. Z. (2021, December 2). Epidemiology of Foodborne Disease Outbreaks Caused by Nontyphoidal *Salmonella* in Zhejiang Province, China, 2010–2019. *Foodborne Pathogens and Disease*, 18(12). doi:<https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0006>
- Linlin Xiao, X. Q. (2024, November). Molecular epidemiological investigation of *Salmonella* isolated from the environment, animals, foods and patients in China. *Food Research Internation*, 196. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115013>
- Lisa M. Harrison, K. V. (2022, October). Current methodologies and future direction of *Campylobacter* isolation and detection from food matrices, clinical samples, and the agricultural environment. *Journal of Microbiological Methods*, 201. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106562>
- Ltd, U. C. (n.d.). Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD) Detail. Sri Lanka. doi:<https://www.ukcas-media.com/Xylose-Lysine-Desoxycholate-Agar.html>
- Lucas Chikhi, M. M. (2024, January 2). Comparison of *Listeria monocytogenes* alternative detection methods for food microbiology official controls in Europe. *International Journal of Food Microbiology*, 408. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110448>

- Luping Xu, X. B. (2021, July). Current State of Development of Biosensors and Their Application in Foodborne Pathogen Detection. *Journal of Food Protection*, 84(7), σσ. 1213-1227. doi:<https://doi.org/10.4315/JFP-20-464>
- Marcela Soto-Beltrán, B. G.-L. (2022, February 16). Overview of methodologies for the culturing, recovery and detection of Campylobacter. *International Journal of Environmental Health Research*, 33(3), σσ. 307-323. doi:<https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2029366>
- Meera Probha Kabiraz, P. R. (2003, April 14). Conventional and advanced detection techniques of foodborne pathogens: A comprehensive review. *Heliyon*, 9(4). doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15482>
- Mengtao Chen, X. L. (2023, August). Nucleic acid-aided molecular amplification techniques for food microorganism detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 165. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117116>
- Microbiology, R. (2019, June 12). Why Aren't We Talking More About Campylobacter? Ireland. doi:<https://www.rapidmicrobiology.com/news/why-aren39t-consumers-talking-more-about-campylobacter>
- Mohammed Y. Emran, M. A. (2025, January). Design of portable biosensor assay using multifunctional carbon nanosheets for on-site monitoring of Staphylococcus Aureus in water and food samples. *Microchemical Journal*, 208. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.112482>
- Natasia Rebekka Thornval, J. H. (2021, June). Progress in detection of Campylobacter in the food production chain. *Current Opinion in Food Science*, 39, σσ. 16-21. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.001>
- Neha Chauhan, C. S. (2024, March 22). Modern techniques and developments in the detection of foodborne pathogens. *Biosensors for Foodborne Pathogens Detection*, σσ. 17-55. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117736>
- Nodali Ndraha, H.-Y. L.-Y.-I.-J. (2023, December). Rapid detection methods for foodborne pathogens based on nucleic acid amplification: Recent advances, remaining challenges, and possible opportunities. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 7(30). doi:<https://doi.org/10.1016/j.fochms.2023.100183>
- Noémie Vingadassalon, D. M.-A. (2025, January). Epidemiology of Staphylococcus aureus food isolates: Comparison of conventional methods with whole genome sequencing

- typing methods. *Food Microbiology*, 125.
doi:https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104625
- Nour Ahmad-Mansour, P. L.-R.-P. (2021, September 23). Staphylococcus aureus Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins*.
doi:https://doi.org/10.3390/toxins13100677
- Otter, J. (2012, December 6). What is “community-associated” MRSA?
doi:https://reflectionsipc.com/2012/12/06/what-is-community-associated-mrsa/
- Patrícia Antunes, C. N. (2020, January 16). *Food-to-Humans Bacterial Transmission*.
doi:10.1128/microbiolspec.mtbp-0019-2016
- Paul Sakkal, L. M. (2019, February 22). Elderly woman dies of Listeria infection as authorities warn thousands at risk. doi:https://www.theage.com.au/national/victoria/meals-on-wheels-service-hit-with-listeria-outbreak-20190222-p50zlp.html
- Peterkin, J. M. (1991, September). Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen. *Microbiology Reviews*, σσ. 476-511. doi:10.1128/mr.55.3.476-511.1991
- Rui Magalhães, C. M. (2014). *Traditional Methods for Isolation of Listeria monocytogenes*. Portugal. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0703-8_2
- Satoshi Ito, M. K. (2023, January). Development of a Sampling and Real-time PCR Method for the Quantitative Detection of Campylobacter spp. in Retail Chicken Meat Without DNA Extraction. *Journal of Food Protection*, 86(1).
doi:https://doi.org/10.1016/j.jfp.2022.100028
- Schell, J. (2020, August 3). What the Public should know during a Salmonella Outbreak. doi:https://www.foodpoisonjournal.com/food-poisoning-information/what-the-public-should-know-during-a-salmonella-outbreak/
- Siti Nur Hazwani Oslan, N. Y. (2024, April). Rapid and sensitive detection of Salmonella in agro-Food and environmental samples: A review of advances in rapid tests and biosensors. *Journal of Microbiological Methods*, 219.
doi:https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.106897
- Siti Nur Hazwani Oslan, N. Y. (2024, April). Rapid and sensitive detection of Salmonella in agro-Food and environmental samples: A review of advances in rapid tests and biosensors. *Journal of Microbiological Methods*, 219.
doi:https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.106897

- Team, S. D. (2023, November 17). Clostridium Perfringens Outbreaks: Prevention and Control and Incidents. doi:<https://www.digicomply.com/blog/clostridium-perfringens-outbreaks-prevention-and-control-and-incidents>
- Vincent Léguillier, D. P.-M.-M.-V. (2024, September). A review and meta-analysis of Staphylococcus aureus prevalence in foods. *The Microbe*, 4. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100131>
- WHO, W. H. (2021, June 7). Estimating the burden of foodborne diseases: a practical handbook for countries. Switzerland. Ανάκτηση από <https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-diseases>
- Xuekun Bai, Z. W. (2022, December). Rapid and accurate detection for Listeria monocytogenes in milk using ampicillin-mediated magnetic separation coupled with quantitative real-time PCR. *Microchemical Journal*, 183. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108063>
- Yagya Adhikari, M. A. (2025, January 2). A Longitudinal Study on Campylobacter spp. in an Integrated Broiler Complex in the Southeast Region of the United States: Prevalence and Phylogenetic Analysis. *Journal of Food Protection*, 88(1). doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100420>
- Yifeng Ding, C. H. (2023, February 15). Rapid and simultaneous detection of viable S. aureus and its penicillin susceptibility by phage amplification techniques in different food matrices. *LWT*, 176. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114526>
- Yue Huo, H. L. (2023, November). Risk-based detection as a cost-effective strategy to reduce foodborne illness due to salmonella. *Heliyon*, 9(11). doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22392>
- Zhen Xu, C. Y. (2022, August 22). Molecular Epidemiology of Staphylococcus aureus in China Reveals the Key Gene Features Involved in Epidemic Transmission and Adaptive Evolution. *Microbiology Spectrum*, 10(5). doi:<https://doi.org/10.1128/spectrum.01564-22>
- Αρβαντιδου-Βαγιωνά, Μ. (2017). Μικροβιολογία νερού - Χαρακτηριστικά βακτηρίων. Θεσσαλονίκη, Ελλάδα. doi:<https://slideplayer.gr/slide/11233165/>
- Βαφοπούλου-Μαστρογιαννάκη, Α. (2003). *Βιοχημεία Τροφίμων*. Θεσσαλονίκη: ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΖΗΤΗ.

- Επιτροπή, Ε. (2005). ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων στα τρόφιμα. *ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων στα τρόφιμα*. Βρυξέλλες: Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.
- Ευθύμιος Γαλανός, Α. Μ. (n.d.). *Υγιεινή και Ασφάλεια Τροφίμων*. ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ.
- Καλογρίδου-Βασιλειάδου, Δ. (1999). *Κανόνες Ορθής Υγιεινής Πρακτικής για τις Επιχειρήσεις Τροφίμων*. Θεσσαλονίκη: UNIVERCITY STUDIO PRESS.
- Κόκκινος, Π. (2024). *Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου - Loop mediated isothermal amplification (LAMP)*. Πάτρα.
- Κωνσταντίνος Κατσαμποξάκης, Χ. Κ. (n.d.). *ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ*. ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ.
- Μπεζιρτζόγλου, Ε. (2005). *Γενική Μικροβιολογία*. Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.
- Μπλούκας, Ι. (2004). *Επεξεργασία & Συντήρηση Τροφίμων*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.
- Σκορίλας, Α. (2020). Αρχές και Μεθοδολογίες της Μοριακής Διαγνωστικής. Στο Α. Σκορίλας, & Π. Β. Αθανάσιος Τσιούφας (Επιμ.), *Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική* (σσ. 97-99). Λευκωσία, Κύπρος: BROKEN HILL PUBLISHERSLTD.
- Χρυσανγή Γαρδέλη, Α. Γ. (n.d.). *Αρχές Επεξεργασίας Τροφίμων*. ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ.