



Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Πρόγραμμα Σπουδών

Διπλωματική Εργασία

«Σύγχρονη προσέγγιση της ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών
στο νερό»

ΜΑΡΙΑ ΑΡΙΣΤΕΙΔΟΥ

Επιβλέπων καθηγήτρια: Αικατερίνη Κωνσταντίνου

Συν-επιβλέπων καθηγήτρια: Κωνσταντίνα Τσουμάνη

Πάτρα, Ιούλιος, 2026

Η παρούσα Εργασία καθώς και τα αποτελέσματα αυτής, αποτελούν συνιδιοκτησία του ΕΑΠ και του φοιτητή, ο καθένας από τους οποίους έχει το δικαίωμα ανεξάρτητης χρήσης, αναπαραγωγής και αναδιανομής τους (στο σύνολο ή τμηματικά) για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, σε κάθε περίπτωση αναφέροντας τον τίτλο και το συγγραφέα της Εργασίας καθώς και το όνομα του ΕΑΠ όπου εκπονήθηκε.



«Σύγχρονη προσέγγιση των παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό»

ΜΑΡΙΑ ΑΡΙΣΤΕΙΔΟΥ

Επιτροπή Επίβλεψης Πτυχιακής / Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγήτρια:

Συν-Επιβλέπων Καθηγήτρια:

Αικατερίνη Κωνσταντίνου

Κωνταντίνα Τσουμάνη

Πάτρα, Ιούλιος, 2026

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζει τις σύγχρονες μεθόδους ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό, με έμφαση στις ισοθερμικές τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων και στις δυνατότητες εφαρμογής τους στην επιτόπια διάγνωση. Η ανίχνευση παθογόνων σε υδατικά δείγματα αποτελεί κρίσιμο ζήτημα για τη δημόσια υγεία, καθώς συνδέεται με την πρόληψη υδατογενών λοιμώξεων και με τη διασφάλιση της ποιότητας του νερού.

Στην εργασία παρουσιάζονται αρχικά οι βασικές συμβατικές και μοριακές τεχνικές ανίχνευσης, ενώ στη συνέχεια αναλύονται οι κυριότερες ισοθερμικές μέθοδοι, όπως η LAMP, η RPA, η HDA, η RCA, η CPA και η NASBA, ως προς τον μηχανισμό λειτουργίας τους, την αναλυτική τους απόδοση και την καταλληλότητά τους για περιβαλλοντικά δείγματα. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στη LAMP, η οποία εμφανίζει υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα, ταχύτητα και δυνατότητα απλής ανάγνωσης των αποτελεσμάτων, στοιχεία που την καθιστούν ιδιαίτερα κατάλληλη για εφαρμογές ανίχνευσης παθογόνων στο νερό.

Παράλληλα, εξετάζεται ο ρόλος των point-of-care διαγνωστικών συστημάτων και των φορητών πλατφορμών, όπως paper-based διατάξεις, μικρορευστονικά συστήματα και lateral flow assays, τα οποία ενισχύουν τη δυνατότητα ταχείας ανάλυσης εκτός εργαστηρίου. Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση προκύπτει ότι οι ισοθερμικές τεχνικές αποτελούν ιδιαίτερα υποσχόμενα εργαλεία για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα νερού, αν και εξακολουθούν να υπάρχουν προκλήσεις που σχετίζονται με την πολυπλοκότητα των περιβαλλοντικών δειγμάτων, την παρουσία ανασταλτικών ουσιών και την ανάγκη για τυποποίηση των διαγνωστικών πλατφορμών.

Συμπερασματικά, η εργασία αναδεικνύει ότι οι ισοθερμικές τεχνικές και ιδιαίτερα η LAMP διαθέτουν σημαντική προοπτική για τη βελτίωση της περιβαλλοντικής παρακολούθησης και της επιτόπιας διάγνωσης παθογόνων στο νερό.

Λέξεις κλειδιά: Παθογόνοι μικροοργανισμοί, νερό, επιτόπια διάγνωση, ισοθερμική ενίσχυση, LAMP, RPA, point-of-care, νουκλεϊκά οξέα.

Abstract

This thesis examines contemporary methods for the detection of pathogenic microorganisms in water, with emphasis on isothermal nucleic acid amplification techniques and their potential use in point-of-care diagnostics. The detection of pathogens in water samples is a critical issue for public health, as it is directly related to the prevention of waterborne infections and the protection of water quality.

The study initially presents the main conventional and molecular detection methods and then analyzes the most important isothermal techniques, including LAMP, RPA, HDA, RCA, CPA, and NASBA, in terms of their operating principles, analytical performance, and suitability for environmental samples. Particular emphasis is placed on LAMP, which demonstrates high sensitivity, specificity, rapidity, and simple result readout, making it one of the most promising methods for pathogen detection in water.

In parallel, the role of point-of-care diagnostic systems and portable platforms, such as paper-based devices, microfluidic systems, and lateral flow assays, is discussed, as these technologies enhance the possibility of rapid analysis outside the laboratory. The literature review indicates that isothermal techniques are highly promising tools for the detection of pathogenic microorganisms in water samples, although important challenges remain, including the complexity of environmental matrices, the presence of inhibitory substances, and the need for standardization of diagnostic platforms.

In conclusion, this thesis highlights that isothermal amplification methods, and especially LAMP, hold considerable potential for improving environmental monitoring and point-of-care detection of waterborne pathogens.

Keywords:

Pathogenic microorganisms, water, point-of-care diagnostics, isothermal amplification, LAMP, RPA, nucleic acids.

Περιεχόμενα

Περίληψη	ii
Abstract	iii
1. Εισαγωγή	1
1.1. Η σημασία της έγκαιρης ανίχνευσης παθογόνων στο νερό.....	1
1.2. Μικροβιολογικοί παράμετροι και κίνδυνοι	1
2. Στόχος Εργασίας.....	3
2.1. Εισαγωγή στις μεθόδους ανίχνευση.....	3
2.2. Περιορισμοί των κλασικών τεχνικών	4
2.3. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης PCR και qPCR	6
2.4. Ισοθερμικές μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων.....	8
3. Κριτήρια ASSURED του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας	10
3.1. Ορισμός και σημασία των κριτηρίων ASSURED	10
3.2. Αναλυτική ερμηνεία των επιμέρους κριτηρίων.....	10
3.3. Σχέση των ASSURED με την ανίχνευση παθογόνων στο νερό.	10
3.4. Τα ASSURED ως εργαλεία αξιολόγησης της παρούσας εργασίας	11
4. Helicase-dependent amplification (HDA)	12
4.1. Εισαγωγή στη μέθοδο HDA	12
4.2. Μηχανισμός λειτουργίας της HDA.....	14
4.3. Πλεονεκτήματα της HDA	15
4.4. Εφαρμογές της HDA στην ανίχνευση παθογόνων	15
4.5. Περιορισμοί και τεχνικές προκλήσεις της HDA.....	19
4.6. Θέση της HDA στη συγκριτική αξιολόγηση της εργασίας	20
5. Recombinase polymerase amplification (RPA)	21
5.1. Εισαγωγή στη μέθοδο RPA.....	21

5.2.	Μηχανισμός λειτουργίας της RPA.....	21
5.3.	Πλεονεκτήματα της RPA.....	23
5.4.	Εφαρμογές της RPA στην ανίχνευση παθογόνων.....	24
5.5.	Περιορισμοί και τεχνικές προκλήσεις της RPA	25
5.6.	Θέση της RPA στη συγκριτική αξιολόγηση της εργασίας	26
6.	Rolling Circle Amplification (RCA)	28
6.1.	Εισαγωγή στη μέθοδο RCA	28
6.2.	Μηχανισμός λειτουργίας RCA.....	30
6.3.	Πλεονεκτήματα της RCA	32
6.4.	Εφαρμογές της RCA στην ανίχνευση παθογόνων	33
6.5.	Περιορισμοί και τεχνικές προκλήσεις της RCA.....	34
6.6.	Θέση της RCA στη συγκριτική αξιολόγηση της εργασίας.....	35
7.	Cross – Priming Amplification (CPA)	36
7.1.	Εισαγωγή στη μέθοδο CPA.....	36
7.2.	Μηχανισμός λειτουργίας της CPA.....	36
7.3.	Πλεονεκτήματα της CPA.....	38
7.4.	Εφαρμογές της CPA στην ανίχνευση παθογόνων.....	39
7.5.	Περιορισμοί και τεχνικές προκλήσεις της CPA	40
7.6.	Θέση της CPA στη συγκριτική αξιολόγηση της εργασίας	42
8.	Nucleic Acid Sequence – Based Amplification (NASBA)	44
8.1.	Εισαγωγή στη μέθοδο NASBA.....	44
8.2.	Μηχανισμός λειτουργίας της NASBA	44
8.3.	Πλεονεκτήματα της NASBA	47
8.4.	Εφαρμογές της NASBA στην ανίχνευση παθογόνων στο νερό.....	47

8.5.	Περιορισμοί και τεχνικές προκλήσεις της NASBA.....	49
8.6.	Θέση της NASBA στη συγκριτική αξιολόγηση της εργασίας.....	49
9.	Loop – mediated isothermal amplification (LAMP)	50
9.1.	Εισαγωγή στη μέθοδο LAMP	50
9.2.	Μηχανισμός λειτουργίας της LAMP	51
9.3.	Πλεονεκτήματα της LAMP	52
9.4.	Εφαρμογές της LAMP στην ανίχνευση παθογόνων	53
9.5.	Περιορισμοί και προκλήσεις της LAMP.....	54
9.6.	Η θέση της LAMP στη συγκριτική αξιολόγηση	56
10.	Συγκριτική αξιολόγηση των ισοθερμικών τεχνικών ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό.	58
10.1.	Γενικό πλαίσιο	58
10.2.	Σύγκριση ως προς τον μηχανισμό λειτουργίας.....	58
10.3.	Σύγκριση ως προς την απόδοση.....	59
10.4.	Καταλληλότητα για δείγματα νερού.....	61
10.5.	Επιτόπια διαγνωστική και περιορισμοί	61
10.6.	Συμπερασματική αξιολόγηση.....	63
11.	Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές.....	64
	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

Κατάλογος εικόνων / σχημάτων

Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της ανίχνευσης βακτηρίων σε γεωργικά ύδατα με καλλιεργητικές και μοριακές μεθόδους. Η καλλιέργεια ανιχνεύει μόνο τα καλλιεργήσιμα βακτήρια, ενώ η qPCR επιτρέπει την ανίχνευση και των βιώσιμων αλλά μη καλλιεργήσιμων κυττάρων.

Εικόνα 4.1. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου HDA. Η ελικάση διαχωρίζει τις δύο αλυσίδες του DNA, οι εκκινητές (primers) υβριδοποιούνται στις μονόκλωνες αλυσίδες και η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές, οδηγώντας σε εκθετική ενίσχυση του DNA-στόχου.

Εικόνα 4.2. Σχηματική αναπαράσταση πλατφόρμας ανίχνευσης DNA που συνδυάζει ασύμμετρη HDA ή PCR, μαγνητικό εμπλουτισμό των αμπλικονίων και ηλεκτροχημική ανίχνευση.

Σχήμα 4.1. Σύγκριση των τεχνικών HDA και PCR ως προς την κινητική ενίσχυσης, την επίδραση της συγκέντρωσης εκκινητών και τη σχέση μεταξύ χρόνου κατωφλίου και αρχικού αντιγράφου DNA.

Εικόνα 5.1. Βασικά στάδια της τεχνικής RPA. Α) σχηματισμός συμπλόκων ανασυνδυασμού-εκκινητή, Β) αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας στο DNA-στόχο, C) εισβολή του εκκινητή και εκτόπιση του συμπληρωματικού κλώνου, D) σταθεροποίηση του εκτοπισμένου μονόκλωνου DNA από πρωτεΐνες SSB, E) απομάκρυνση των πρωτεϊνών ανασυνδυασμού και πρόσδεση της πολυμεράσης με ικανότητα εκτόπισης κλώνου και F) σύνθεση νέων κλώνων DNA και παραγωγή αμπλικονίων μέσω ισοθερμικής ενίσχυσης.

Εικόνα 6.1. Αρχή λειτουργίας και κύριες παραλλαγές της τεχνικής Rolling Circle Amplification (RCA), συμπεριλαμβανομένων των RCA, Linear RCA (LRCA), και Hyperbranched RCA (HRCa).

Εικόνα 6.2. Σχηματική αναπαράσταση της ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων με χρήση padlock probes και Rolling Circle Amplification (RCA). Το γραμμικό padlock probe υβριδοποιείται με την αλληλουχία-στόχο και κυκλοποιείται μέσω λιγάσης, σχηματίζοντας κυκλικό πρότυπο DNA. Στη συνέχεια πραγματοποιείται RCA για την παραγωγή μακρών επαναλαμβανόμενων

αλληλουχιών, οι οποίες ανιχνεύονται μέσω νανοσωματιδίων χρυσού και βιοαισθητήρα επιφανειακού πλασμονικού συντονισμού (SPR).

Εικόνα 7.1. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού cross-priming amplification (CPA) και του σχεδιασμού των εκκινητών

Εικόνα 7.2. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης των εκκινητών της τεχνικής Cross-Priming Amplification (CPA) στην αλληλουχία-στόχο και ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων ενίσχυσης που προέκυψαν από διαφορετικούς συνδυασμούς εκκινητών (A–C).

Εικόνα 8.1. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της NASBA, με τα διαδοχικά στάδια αντίστροφης μεταγραφής, αποικοδόμησης του RNA και ενίσχυσης του στόχου.

Εικόνα 9.1. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της LAMP και των σταδίων ενίσχυσης.

Εικόνα 9.2. Εφαρμογή της LAMP σε ολοκληρωμένο διαγνωστικό workflow από δείγμα έως το αποτέλεσμα.

Εικόνα 9.3. Συνολική ροή εφαρμογής της LAMP ως φορητής διαγνωστικής μεθόδου, από τη δειγματοληψία έως την τελική ανίχνευση του αποτελέσματος

Εικόνα 10.1. Σχηματική απεικόνιση φορητής επιτόπιας διαγνωστικής πλατφόρμας βασισμένης σε later flow aptamer assay και ανάλυση μέσω smartphone.

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 2.1. Πειραματικά βήματα στην ανάλυση ενός νουκλεϊκού οξέος με τη μέθοδο qPCR.

Πίνακας 5.1. Συγκριτική αξιολόγηση των ισοθερμικών τεχνικών αναδεικνύει ότι καμία μέθοδος δεν υπερτερεί απόλυτα σε όλους τους δείκτες, καθώς η καταλληλότητα τους εξαρτάται από την αναλυτική ευαισθησία, τον χρόνο αντίδρασης, της απαιτήσεις εξοπλισμού και τη δυνατότητα εφαρμογής σε συνθήκες πεδίου. Επομένως, η επιλογή της καταλληλότερης τεχνικής πρέπει να γίνεται με βάση το φιαγνωστικό σενάριο και τις απαιτήσεις της εφαρμογής.

Πίνακας 8.1. Εφαρμογές της NASBA για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα και περιβαλλοντικά δείγματα, με αναφορά στο στόχο, το είδος δείγματος, τη μέθοδο ανάγνωσης και το όριο ανίχνευσης.

Πίνακας 10.1. Παρουσιάζεται συνοπτικά η σύγκριση των κυριότερων ισοθερμικών τεχνικών ως προς το μηχανισμό λειτουργίας, τα πλεονεκτήματα, τους περιορισμούς και τη καταλληλότητα τους για επιτόπιες εφαρμογές σε δείγματα νερού.

1. Εισαγωγή

1.1. Η σημασία της έγκαιρης ανίχνευσης παθογόνων στο νερό

Η διασφάλιση της ποιότητας του πόσιμου νερού αποτελεί θεμελιώδεις πυλώνα της δημόσιας υγείας, απαιτώντας μια ολιστική προσέγγιση διαχείρισης κινδύνων. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO Guidelines for Drinking – water Quality), η ασφάλεια του νερού δεν πρέπει να περιορίζεται σε μεμονωμένους ελέγχους, αλλά να εντάσσεται σε ένα ολοκληρωμένο πλαίσιο («Framework for safe drinking-water») που εκτείνεται από την πηγή υδροληψίας έως τον τελικό καταναλωτή.

Το εν λόγω πλαίσιο βασίζεται σε τρεις κεντρικούς πυλώνες: τον καθορισμό στόχων με βάση τη δημόσια υγεία (health-based targets), την εφαρμογή συστηματικών σχεδίων ασφάλειας νερού (water safety plans) και τη διασφάλιση μέσω ανεξάρτητης επιτήρησης (independent surveillance). Η υιοθέτηση μιας τέτοιας προληπτικής στρατηγικής επιτρέπει τον έγκαιρο εντοπισμό και τη διαχείριση κινδύνων που σχετίζονται με τη κλιματική αλλαγή και την αστική ανάπτυξη, μετατοπίζοντας την έμφαση από τον εντοπισμό της μόλυνσης εκ των υστέρων, στην πρόληψη της εισόδου παθογόνων μικροοργανισμών στα συστήματα ύδρευσης.

Στο πλαίσιο αυτό, η αποτελεσματική επιτήρηση (surveillance) και η αξιολόγηση του συστήματος απαιτούν σύγχρονα αναλυτικά εργαλεία, ικανά να παρέχουν ταχύτερα και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα σε σχέση με τις παραδοσιακές μικροβιολογικές μεθόδους. Η ανάπτυξη και εφαρμογή ισοθερμικών τεχνικών ανίχνευσης, που ευθυγραμμίζονται με τα κριτήρια ASSURED του WHO, αναδεικνύεται ως επιτακτική ανάγκη για την ενίσχυση του συστήματος επιτήρησης και την αποτελεσματική προστασία των καταναλωτών.(1)

1.2. Μικροβιολογικοί παράμετροι και κίνδυνοι

Η μικροβιολογική ασφάλεια του πόσιμου νερού βασίζεται στη στρατηγική των «πολλαπλών φραγμών», η οποία στοχεύει στην πρόληψη της μόλυνσης στη πρόληψη της μόλυνσης από την πηγή μέχρι τον καταναλωτή. Οι μεγαλύτεροι κίνδυνοι για τη δημόσια υγεία συνδέονται με τη κατάποση νερού που έχει μολυνθεί από κοπρανώδη υλικά ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης,

περιέχοντας ένα ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, ιοί, πρωτόζωα και έλμινθες.

Ένα κρίσιμο ζήτημα που αναδεικνύεται από τις οδηγίες του WHO είναι η ταχύτητα με την οποία μεταβάλλεται η ποιότητα του νερού. Η εμφάνιση σύντομων «αιχμών» (peaks) συγκέντρωσης παθογόνων μπορεί να προκαλέσει επιδημίες πριν προλάβουν οι παραδοσιακές αναλυτικές μέθοδοι να εντοπίσουν τον κίνδυνο. Δεδομένου ότι οι κλασικές μικροβιολογικές μέθοδοι βασίζονται συχνά σε χρονοβόρες καλλιέργειες, η έγκαιρη ανίχνευση καθίσταται συχνά ανεπαρκής, εκθέτοντας τον πληθυσμό σε σημαντικούς κινδύνους. Επομένως, ο έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας απαιτεί την ενσωμάτωση προηγμένων τεχνολογιών που εξασφαλίζουν ταχεία απόκριση, επιτρέποντας τη άμεση διαχείριση της ασφάλειας του δικτύου ύδρευσης σε πραγματικό χρόνο.

Ιδιαίτερη σημασία μεταξύ των παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται με το νερό έχουν οι ιοί, καθώς πολλοί από αυτούς μεταδίδονται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και μπορούν να επιβιώσουν στο υδάτινο περιβάλλον για σημαντικό χρονικό διάστημα. Στους σημαντικότερους υδατογενείς ιούς περιλαμβάνονται οι νοροϊοί, οι αδενοϊοί, οι ροταϊοί, καθώς και οι ιοί της ηπατίτιδας Α και Ε, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με επεισόδια γαστρεντερίτιδας και άλλων λοιμώξεων που σχετίζονται με τη κατανάλωση μολυσμένου νερού. Η παρουσία του στο πόσιμο νερό αποτελεί ιδιαίτερη πρόκληση, καθώς συχνά δεν ανιχνεύονται εύκολα με τις κλασικές μεθόδους μικροβιολογικού ελέγχου, γεγονός που καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη ταχύτερων και περισσότερο ευαίσθητων τεχνικών ανίχνευσης.(2)

2. Στόχος Εργασίας

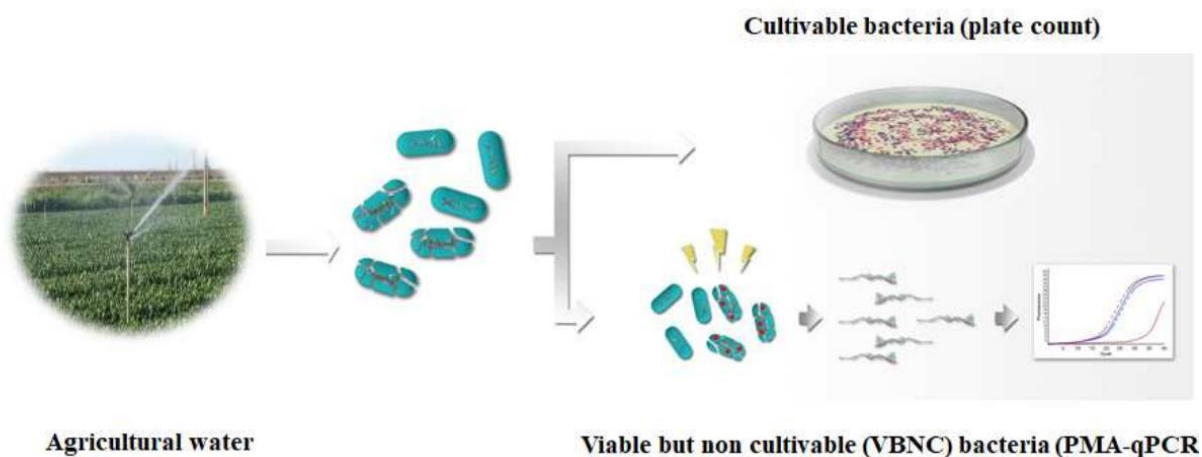
2.1. Εισαγωγή στις μεθόδους ανίχνευση

Η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό αποτελεί διαχρονικά βασικό πεδίο ενδιαφέροντος για τη δημόσια υγεία, την περιβαλλοντική μικροβιολογία και την ασφάλεια των υδάτινων πόρων, καθώς η έγκαιρη αναγνώριση της μικροβιακής επιβάρυνσης συνδέεται άμεσα με την πρόληψη υδατογενών νοσημάτων. Η ανάγκη ελέγχου του πόσιμου και περιβαλλοντικού νερού οδήγησε αρχικά στην ανάπτυξη μεθόδων που στηρίζονταν κυρίως σε καλλιεργητικές προσεγγίσεις και σε δείκτες μικροβιακής ρύπανσης, οι οποίες για πολλά χρόνια αποτέλεσαν το βασικό εργαλείο αξιολόγησης της ποιότητας του νερού. Ωστόσο, η αυξανόμενη πολυπλοκότητα των μικροβιολογικών κινδύνων, η παρουσία παθογόνων που δεν καλλιεργούνται εύκολα και η ανάγκη για ταχύτερη λήψη αποφάσεων κατέστησαν σαφές ότι οι παραδοσιακές τεχνικές δεν επαρκούσαν πλέον από μόνες τους. (3,4)

Στο πλαίσιο αυτό, η εξέλιξη των μεθόδων ανίχνευσης ακολούθησε την ευρύτερη πρόοδο της βιοτεχνολογίας και της μοριακής διάγνωσης. Οι αρχικές κλασικές τεχνικές, αν και πολύτιμες, ήταν περιορισμένες από τον μεγάλο χρόνο επεξεργασίας, την εξάρτηση από εργαστηριακές υποδομές και τη μειωμένη δυνατότητα έγκαιρης απόκρισης σε περιστατικά ρύπανσης. Η σταδιακή εισαγωγή των μοριακών μεθόδων και κυρίως της PCR, πρόσφερε νέα προοπτική, καθώς επέτρεψε την άμεση ανίχνευση του γενετικού υλικού παθογόνων μικροοργανισμών με μεγαλύτερη ταχύτητα και εξειδίκευση. Στη συνέχεια, η ανάπτυξη τεχνικώς όπως η qPCR, η ψηφιακή PCR και άλλες προηγμένες προσεγγίσεις ενίσχυσε ακόμη περισσότερο την αναλυτική ικανότητα των εργαστηρίων και βελτίωσε τη δυνατότητα επιβεβαίωσης και ποσοτικοποίησης των μικροβιακών στόχων. (3,5)

Παρά τη θαυμαστική αυτή πρόοδο, οι ανάγκες της σύγχρονης παρακολούθησης της ποιότητας του νερού δεν περιορίζονται μόνο στην ακρίβεια ή στην ευαισθησία. Ιδιαίτερη σημασία έχει πλέον η ταχύτητα απόκρισης, η δυνατότητα εφαρμογής εκτός κεντρικού εργαστηρίου, η λειτουργικότητα σε περιοχές χαμηλής υποδομής και η ενσωμάτωση των τεχνολογιών σε συστήματα επιτήρησης σε πραγματικό χρόνο. Οι απαιτήσεις αυτές οδήγησαν στη στροφή προς φορητές, απλοποιημένες και πιο ευέλικτες διαγνωστικές τεχνολογίες, οι οποίες να μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα στο πεδίο χωρίς να θυσιάζεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. (5,6)

Μέσα σε αυτό το εξελικτικό πλαίσιο, οι ισοθερμικές μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων αναδείχθηκαν ως ιδιαίτερα υποσχόμενη κατηγορία τεχνικών, καθώς συνδυάζουν υψηλή αναλυτική απόδοση με απλούστερες τεχνικές απαιτήσεις σε σχέση με τις κλασικές μοριακές μεθόδους. Η ανάπτυξη τους δεν προέκυψε τυχαία, αλλά ως απάντηση στις αδυναμίες τόσο των καλλιεργητικών όσο και των συμβατικών μοριακών τεχνικών, ιδίως όταν ζητούμενο είναι η γρήγορη και επιτόπια ανίχνευση παθογόνων στο νερό. Για τον λόγο αυτό, η μελέτη της εξέλιξης των μεθόδων ανίχνευσης δεν έχει μόνο ιστορική σημασία, αλλά αποτελεί απαραίτητη βάση για την κατανόηση των τεχνολογικών επιλογών που κυριαρχούν σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία και αναλύονται στα επόμενα υποκεφάλαια. (4,6)



Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της ανίχνευσης βακτηρίων σε γεωργικά ύδατα με καλλιεργητικές και μοριακές μεθόδους. Η καλλιέργεια ανιχνεύει μόνο τα καλλιεργήσιμα βακτήρια, ενώ η qPCR επιτρέπει την ανίχνευση και των βιώσιμων αλλά μη καλλιεργήσιμων κυττάρων. (Truchado et al)

2.2. Περιορισμοί των κλασικών τεχνικών

Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό βασίστηκαν ιστορικά κυρίως σε καλλιεργητικές τεχνικές, μικροσκόπηση και επιβεβαιωτικές φαινοτυπικές δοκιμές, οι οποίες αποτέλεσαν για πολλά χρόνια το θεμέλιο της μικροβιολογικής αξιολόγησης της ποιότητας του νερού. Παρότι οι τεχνικές αυτές θεωρούνται αξιόπιστες και παραμένουν χρήσιμες σε αρκετά πλαίσια, η εφαρμογή τους χαρακτηρίζεται από σημαντικούς περιορισμούς που

σχετίζονται κυρίως με τον απαιτούμενο χρόνο, την ανάγκη για εργαστηριακή υποδομή και τη δυσκολία άμεσης λήψης απόφασης σε περιπτώσεις μικροβιακής επιβάρυνσης. (3,4)

Ένα βασικό μειονέκτημα των καλλιεργητικών μεθόδων είναι ότι προϋποθέτουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και υπό ελεγχόμενες συνθήκες επώασης, διαδικασίας που συχνά απαιτεί ώρες ή και ημέρες μέχρι να δοθεί το τελικό αποτέλεσμα. Σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού, όπου η συγκέντρωση των παθογόνων μπορεί να είναι χαμηλή ή οι μικροοργανισμοί να βρίσκονται σε κατάσταση στρες, η καλλιέργεια γίνεται ακόμη πιο δύσκολη και σε ορισμένες περιπτώσεις αναξιόπιστη. Αυτό σημαίνει ότι η ανίχνευση δεν είναι πάντοτε αντιπροσωπευτική της πραγματικής μικροβιακής επιβάρυνσης του δείγματος. (3,6)

Επιπλέον, οι κλασικές μέθοδοι δεν είναι πάντοτε κατάλληλες για την ανίχνευση όλων των παθογόνων, ιδίως εκείνων που είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν ή που απαιτούν εξειδικευμένες συνθήκες ανάπτυξης. Η αδυναμία αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία όταν το ενδιαφέρον στρέφεται σε ιούς και άλλους μικροοργανισμούς που δεν ανιχνεύονται εύκολα με τις ίδιες διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για τα βακτήρια. Ως, αποτέλεσμα η αποκλειστική εξάρτηση από παραδοσιακές τεχνικές μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση του πραγματικού κινδύνου για τη δημόσια υγεία. (3,4)

Ένας ακόμη σημαντικός περιορισμός είναι ότι οι συμβατικές προσεγγίσεις δεν είναι σχεδιασμένες για ταχεία επιτόπια εφαρμογή. Σε περιπτώσεις όπου απαιτείται άμεση απόφαση, όπως σε δίκτυα ύδρευσης, σε χώρους αναψυχής ή σε έκτακτα επεισόδια ρύπανσης, η καθυστέρηση στην έκδοση αποτελέσματος μειώνει την πρακτική αξία της ανάλυσης. Για αυτό το λόγο, η σύγχρονη έρευνα έχει στραφεί προς μεθόδους που προσφέρουν μεγαλύτερη ταχύτητα, ευαισθησία και λειτουργικότητα εκτός του κεντρικού εργαστηρίου, ανοίγοντας τον δρόμο για τις μοριακές και ισοθερμικές τεχνολογίες. (6,7)

Αν και οι παραδοσιακές μέθοδοι εξακολουθούν να έχουν θέση στη μικροβιολογική επιτήρηση, τα μειονεκτήματά τους καθιστούν σαφές ότι δεν επαρκούν μόνες τους για τις απαιτήσεις της σύγχρονης παρακολούθησης της ποιότητας του νερού. Η ανάγκη για πιο γρήγορη, ευαίσθητη και πρακτική ανίχνευση οδηγεί αναπόφευκτα στην ανάπτυξη και υιοθέτηση νεότερων τεχνολογιών, οι οποίες θα παρουσιαστούν στα επόμενα υποκεφάλαια. (6,7)

2.3. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης PCR και qPCR

Η εισαγωγή των μοριακών μεθόδων ανίχνευσης αποτέλεσε καθοριστική εξέλιξη στον τομέα της μικροβιολογικής ανάλυσης του νερού, καθώς πρόσφερε τη δυνατότητα άμεσης αναγνώρισης γενετικών στόχων παθογόνων μικροοργανισμών χωρίς να απαιτείται απαραίτητα καλλιέργεια. Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές καλλιεργητικές τεχνικές, οι οποίες βασίζονται στην ανάπτυξη του οργανισμού σε ειδικά υποστρώματα και απαιτούν σημαντικό χρόνο επώασης, οι μοριακές τεχνικές επιτρέπουν την ταχύτερη, περισσότερη ειδική και συχνά περισσότερη ανίχνευση βακτηρίων, ιών και πρωτόζωων σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού. Για τον λόγο αυτό, η ανάπτυξη της PCR και των παραλλαγών της άλλαξε ουσιαστικά στο πεδίο της επιτήρησης των υδατογενών παθογόνων και δημιούργησε νέες δυνατότητες για την παρακολούθηση της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού. (3,8)

Η κλασσική PCR βασίζεται στην ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων αποδιάταξης, πρόσδεσης εκκινητών και επιμήκυνσης, επιτρέποντας την ανίχνευση ακόμη και πολύ μικρών ποσοτήτων γενετικού υλικού. Η μέθοδος αυτή κατέστη ιδιαίτερα σημαντική για παθογόνους μικροοργανισμούς που είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν ή εμφανίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις δείγματα νερού, καθώς παρέχει αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές. Επιπλέον, η εφαρμογή της PCR επέτρεψε την ανίχνευση με παραδοσιακές μεθόδους είναι συχνά πιο δύσκολη, χρονοβόρα ή λιγότερο αξιόπιστη. (5)

Σημαντική εξέλιξη της κλασσικής PCR αποτέλεσε η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο, γνωστή ως qPCR, η οποία δεν περιορίζεται στην απλή ανίχνευση της παρουσίας ενός μικροοργανισμού αλλά επιτρέπει και τη ποσοτική εκτίμηση του γενετικού υλικού του. Η qPCR θεωρείται μια από τις πιο χρήσιμες και διαδεδομένες τεχνικές για την ανίχνευση παθογόνων στο νερό, καθώς προσφέρει υψηλή ευαισθησία, δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο και μεγαλύτερη επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Η δυνατότητα αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη δημόσια υγεία, επειδή επιτρέπει όχι μόνο την επιβεβαίωση της παρουσίας ενός παθογόνου αλλά και την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου, στοιχείο κρίσιμο για την αξιολόγηση του κινδύνου. (3,9)

Πίνακας 2.1: Πειραματικά βήματα στην ανάλυση ενός νουκλεϊκού οξέος με τη μέθοδο qPCR.
(Mikael Kubista)



Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα των μοριακών μεθόδων, η χρήση τους δεν είναι χωρίς περιορισμούς. Η PCR και ιδιαίτερα η qPCR απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό, θερμοκυκλοποιητές, αναλυτικά όργανα και προσωπικό με τεχνική κατάρτιση, γεγονός που αυξάνει το κόστος και περιορίζει τη δυνατότητα εφαρμογής τους σε αποκεντρωμένα ή χαμηλής υποδομής περιβάλλοντα. Επιπλέον, στα περιβαλλοντικά δείγματα νερού είναι συχνή η παρουσία ανασταλτικών ουσιών που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την απόδοση της ενίσχυσης, οδηγώντας είτε σε μειωμένη ευαισθησία είτε σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Ένα ακόμη ουσιαστικό πρόβλημα είναι ό,τι οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων δεν μπορούν πάντοτε να διακρίνουν με σαφήνεια μεταξύ βιώσιμων και μη βιώσιμων μικροοργανισμών, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την ερμηνεία του πραγματικού κινδύνου.(6,10)

Παρά τα μειονεκτήματα αυτά, οι μοριακές μέθοδοι καθιέρωσαν ένα νέο πρότυπο στην ανίχνευση παθογόνων στο νερό και άνοιξαν τον δρόμο για ακόμη πιο ευέλικτες και πρακτικές τεχνολογίες. Η ανάγκη για απλούστευση της διαδικασίας, μείωσης του εξοπλισμού, περιορισμό του χρόνου ανάλυσης και ενίσχυση της δυνατότητας επιτόπιας εφαρμογής, οδήγησε σταδιακά στην ανάπτυξη των ισοθερμικών μεθόδων ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, οι οποίες επιδιώκουν να διατηρήσουν τα πλεονεκτήματα της μοριακής διάγνωσης παρακάμπτοντας ορισμένες από τις τεχνικές δυσκολίες της PCR και της qPCR. Έτσι, η μοριακή διάγνωση δεν αποτέλεσε το τελικό στάδιο εξέλιξης των τεχνικών ανίχνευσης, αλλά το αναγκαίο ενδιάμεσο βήμα προς την ανάπτυξη πιο προσιτών, γρήγορων και λειτουργικών διαγνωστικών προσεγγίσεων. (4,11)

2.4. Ισοθερμικές μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων

Οι ισοθερμικές μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων αναπτύχθηκαν ως εναλλακτική προσέγγιση απέναντι στους περιορισμούς των συμβατικών μοριακών τεχνικών, κυρίως της PCR και qPCR, οι οποίες απαιτούν επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους και κατά συνέπεια, εξειδικευμένο εξοπλισμό. Η βασική αρχή των ισοθερμικών τεχνικών είναι ότι η ενίσχυση του γενετικού υλικού πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία, γεγονός που απλοποιεί σημαντικά τη διαδικασία και μειώνει τις τεχνικές απαιτήσεις της ανάλυσης. Η δυνατότητα αυτή κατέστησε τις ισοθερμικές μεθόδους ιδιαίτερα ελκυστικές για εφαρμογές ταχείας διάγνωσης και επιτόπιας ανίχνευσης παθογόνων, ειδικά σε περιβάλλοντα όπου οι εργαστηριακές υποδομές είναι περιορισμένες ή απουσιάζουν εντελώς. (6,11)

Σε αντίθεση με τις συμβατικές τεχνικές ενίσχυσης, οι ισοθερμικές μέθοδοι αξιοποιούν διαφορετικούς ενζυμικούς μηχανισμούς για τον διαχωρισμό των κλώνων και την αντιγραφή του γενετικού υλικού, χωρίς να απαιτείται θερμική αποδιάταξη του DNA. Ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους, μπορούν να χρησιμοποιούν πολυμεράσες με ιδιότητες μετατόπισης κλώνου, ελικάσες, ανασυνδιαστικές πρωτεΐνες ή ένζυμα που διευκολύνουν την εκθετική ενίσχυση DNA ή RNA σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας. Από αυτή την τεχνολογική λογική προέκυψαν πολλές διαφορετικές μέθοδοι, όπως η HDA, η RPA, η RCA, η CPA, η NASBA και η LAMP, καθεμία από τις οποίες εμφανίζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ως προς την ταχύτητα, την ευαισθησία, την πολυπλοκότητα του σχεδιασμού και την πρακτική της εφαρμογής. (11)

Η αυξανόμενη σημασία των ισοθερμικών τεχνικών συνδέεται άμεσα με το γεγονός ότι ανταποκρίνονται σε ανάγκες που οι συμβατικές μοριακές μέθοδοι δεν καλύπτουν πλήρως. Η λειτουργία τους σε σταθερή θερμοκρασία επιτρέπει τη χρήση απλούστερων συσκευών, μικρότερων ενεργειακών απαιτήσεων και περισσότερο φορητών πλατφορμών ανάλυσης, διευκολύνοντας έτσι η μετάβαση από το κλασικό εργαστήριο σε εφαρμογές πεδίου και point-of-care. Παράλληλα, αρκετές από αυτές τις μεθόδους παράγουν αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό στην επιτήρηση της ποιότητας του νερού, όπου η ταχύτητα λήψης απόφασης μπορεί να είναι κρίσιμη για την προστασία της δημόσιας υγείας. (3,6,12)

Επιπλέον, οι ισοθερμικές μέθοδοι παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό επειδή μπορούν να συνδυαστούν με φορητά συστήματα ανάγνωσης, μικρορευστονικές διατάξεις και απλές τελικές μεθόδους ανίχνευσης, όπως χρωματομετρική ή φθορισμομετρική ανάλυση. Αυτή η ευελιξία επιτρέπει την ενσωμάτωσή τους σε αναδυόμενες διαγνωστικές πλατφόρμες χαμηλού κόστους, οι οποίες στοχεύουν σε ταχεία, αποκεντρωμένη και πιο προσιτή μικροβιολογική επιτήρηση. Για τον λόγο αυτό, οι ισοθερμικές τεχνολογίες δεν θεωρούνται απλώς μια παραλλαγή των μοριακών μεθόδων, αλλά μια ξεχωριστή και ιδιαίτερα δυναμική κατηγορία εργαλείων, η οποία επηρεάζει ουσιαστικά τον σχεδιασμό των σύγχρονων διαγνωστικών συστημάτων. (6,13)

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματά τους, οι ισοθερμικές μέθοδοι δεν στερούνται περιορισμών. Η απόδοση τους μπορεί να επηρεάζεται από την πολυπλοκότητα του σχεδιασμού των εκκινητών, από τον κίνδυνο μη ειδικής ενίσχυσης ή από την δυσκολίες στην τυποποίηση μεταξύ διαφορετικών πρωτοκόλλων και δειγμάτων. Επιπλέον, δεν παρουσιάζουν όλες οι ισοθερμικές τεχνικές την ίδια ωριμότητα ή το ίδιο επίπεδο εφαρμοσμένης τεκμηρίωσης, γεγονός που καθιστά αναγκαία τη συγκριτική τους αξιολόγηση πριν από την ευρεία υιοθέτησή τους σε συστήματα ρουτίνας. Επομένως, η μελέτη τους δεν πρέπει να περιορίζεται στην αναφορά των πλεονεκτημάτων τους, αλλά να περιλαμβάνει και κριτική ανάλυση των τεχνικών, λειτουργικών και εφαρμοστικών παραμέτρων που καθορίζουν την πραγματική τους αξία. (13)

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής, οι ισοθερμικές μέθοδοι εξετάζονται ως πιο υποσχόμενη κατεύθυνση για την σύγχρονη ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό, ακριβώς επειδή επιχειρούν να συνδυάσουν την αναλυτική ισχύ των μοριακών προσεγγίσεων με τις πρακτικές απαιτήσεις της επιτόπιας εφαρμογής. Η αναλυτική παρουσίαση των επιμέρους τεχνικών που ακολουθεί στα επόμενα κεφάλαια αποσκοπεί όχι μόνο στην κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας τους, αλλά και στη συγκριτική αξιολόγηση τους με βάση την ευαισθησία, την ειδικότητα, τον χρόνο απόκρισης, το κόστος, την ευκολία χρήσης και τη συμβατότητά τους με τα κριτήρια ASSURED. (6)

3. Κριτήρια ASSURED του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας

3.1. Ορισμός και σημασία των κριτηρίων ASSURED

Η ανάπτυξη διαγνωστικών τεχνολογιών για χρήση εκτός εξειδικευμένων εργαστηριακών δομών οδήγησε τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας στη διαμόρφωση των κριτηρίων ASSURED, τα οποία περιγράφουν τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να διαθέτει ένα ιδανικό διαγνωστικό εργαλείο για χρήση σε περιβάλλοντα περιορισμένων πόρων. Ο όρος ASSURED αποτελεί ακρωνύμιο των λέξεων Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free και Deliverable to end-users, και χρησιμοποιείται ευρέως στη διεθνή βιβλιογραφία ως πλαίσιο αξιολόγησης τεχνολογιών point-of-care. Η χρησιμότητα του είναι ιδιαίτερα σημαντική στην ανίχνευση παθογόνων στο νερό, όπου η αποτελεσματικότητα μιας μεθόδου δεν εξαρτάται μόνο από την αναλυτική της ακρίβεια, αλλά και από το κατά πόσο μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα, γρήγορα και αξιόπιστα σε πραγματικές συνθήκες. (15,16)

3.2. Αναλυτική ερμηνεία των επιμέρους κριτηρίων.

Το πρώτο κριτήριο, η οικονομική προσιτότητα, αφορά τη δυνατότητα μιας μεθόδου να εφαρμόζεται με χαμηλό συνολικό κόστος, ώστε να είναι εφικτή η χρήση της σε ευρεία κλίμακα και σε συστήματα επιτήρησης με περιορισμένους πόρους. Η ευαισθησία και η ειδικότητα συνιστούν τον πυρήνα της αναλυτικής αξιοπιστίας, καθώς καθορίζουν αν η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει μικρές ποσότητες του στόχου και να διακρίνει με σαφήνεια τον συγκεκριμένο παθογόνο μικροοργανισμό από άλλους μη σχετικούς παράγοντες. Η φιλικότητα προς το χρήστη σχετίζεται με την απλότητα της διαδικασίας, τη μικρή ανάγκη εξειδικευμένης εκπαίδευσης και τη δυνατότητα εύκολης ερμηνείας των αποτελεσμάτων, ενώ η ταχύτητα και η ανθεκτικότητα αφορούν την ικανότητα της μεθόδου να λειτουργεί αποτελεσματικά σε σύντομο χρόνο και σε μη ιδανικές συνθήκες εφαρμογής. Τέλος, η ελάχιστη ανάγκη εξοπλισμού και η δυνατότητα διάθεσης στον τελικό χρήστη προσδίδουν σε μια τεχνολογία τον πραγματικά εφαρμοσμένο χαρακτήρα που απαιτείται για χρήση σε συνθήκες πεδίου. (15)

3.3. Σχέση των ASSURED με την ανίχνευση παθογόνων στο νερό.

Η εφαρμογή των ASSURED κριτηρίων αποκτά ιδιαίτερη σημασία στην παρακολούθηση της ποιότητας του νερού, επειδή το συγκεκριμένο πεδίο χαρακτηρίζεται από αυξημένη ανάγκη για άμεση απόκριση, αποκεντρωμένη δειγματοληψία και έγκαιρη λήψη αποφάσεων. Σε ένα τέτοιο

πλαίσιο, ακόμη και μέθοδοι με υψηλή αναλυτική ακρίβεια ενδέχεται να μη είναι πρακτικά χρήσιμες εάν απαιτούν δαπανηρό εξοπλισμό, σύνθετη προετοιμασία δείγματος ή μεταφορά του υλικού σε κεντρικά εργαστήρια. Για τον λόγο αυτό, οι τεχνολογίες που προτείνονται για ανίχνευση παθογόνων στο νερό οφείλουν να αξιολογούνται όχι μόνο με βάση τη θεωρητική τους απόδοση, αλλά και με βάση την πραγματική λειτουργικότητα τους σε συνθήκες περιβαλλοντικής επιτήρησης. (16)

3.4. Τα ASSURED ως εργαλεία αξιολόγησης της παρούσας εργασίας

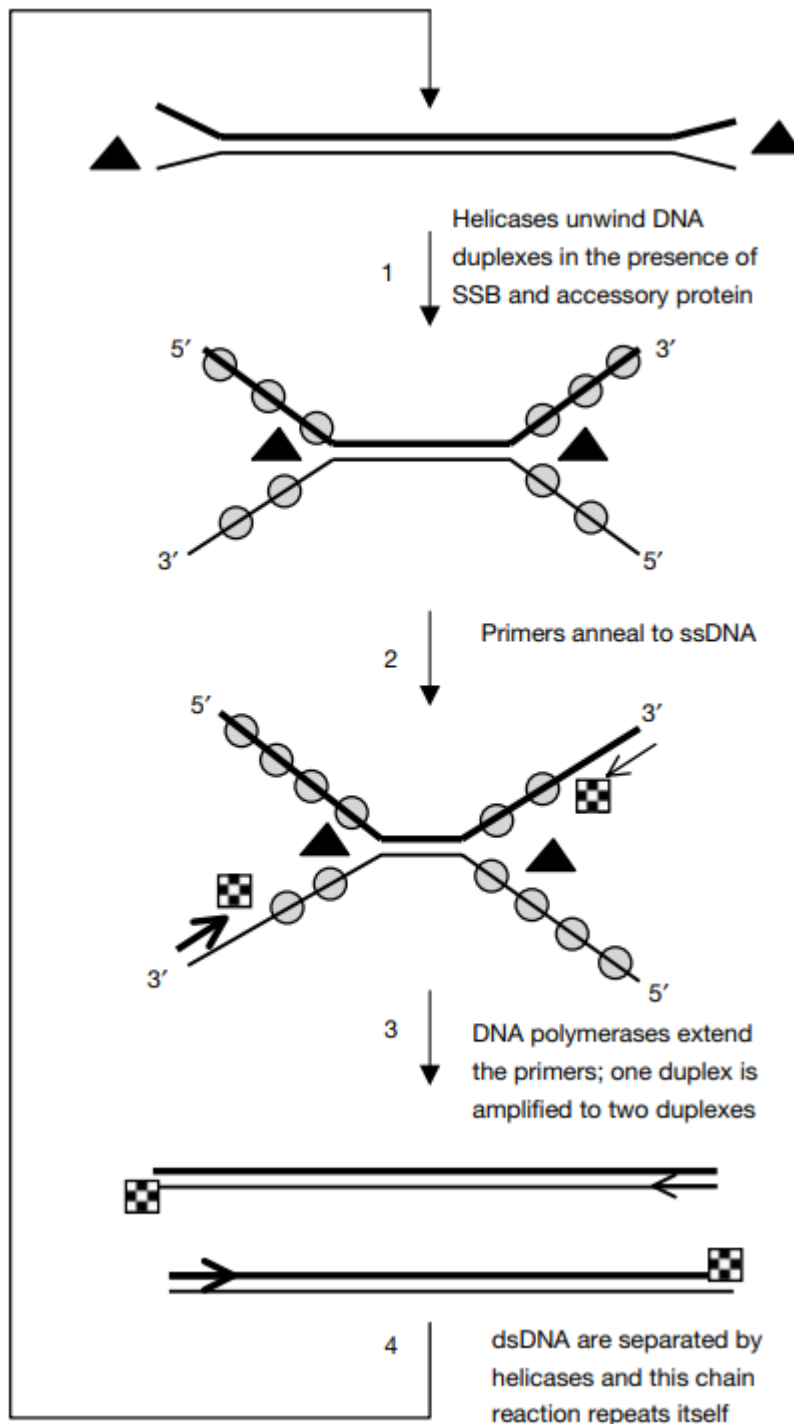
Στην παρούσα διπλωματική εργασία, τα ASSURED κριτήρια λειτουργούν ως βασικό θεωρητικό πλαίσιο για τη συγκριτική αξιολόγηση των ισοθερμικών μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό. Η επιλογή αυτού του πλαισίου είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, διότι επιτρέπει την αποτίμηση των τεχνολογιών όχι μόνο σε επίπεδο μηχανισμού δράσης, αλλά και ως προς την πρακτική τους δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σε πραγματικές εφαρμογές δημόσιας υγείας και περιβαλλοντικής μικροβιολογίας. Με τον τρόπο αυτό, το κεφάλαιο αυτό θέτει τα κριτήρια πάνω στα οποία θα στηριχθεί η ανάλυση των επόμενων κεφαλαίων, όπου παρουσιάζονται και συγκρίνονται οι επιμέρους ισοθερμικές τεχνικές. (15,16)

4. Helicase-dependent amplification (HDA)

4.1. Εισαγωγή στη μέθοδο HDA

Η Helicase-dependent amplification (HDA) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ισοθερμικές τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων και αναπτύχθηκε ως εναλλακτική προσέγγιση προς την κλασική PCR, με στόχο να διατηρήσει την αρχή της εκθετικής ενίσχυσης του DNA χωρίς την ανάγκη θερμικού κυκλισμού. Η μέθοδος περιγράφηκε αρχικά το 2004 και προσέλκυσε γρήγορα το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, επειδή εισήγαγε μια περισσότερο «βιολογική» λογική διαχωρισμού των δύο κλώνων του DNA, αξιοποιώντας τη δράση της ελικάσης αντί της θερμικής αποδιάταξης. Με αυτό το τρόπο, η HDA πρόσφερε μια σημαντική τεχνολογική μετατόπιση από τις συμβατικές μοριακές μεθόδους προς πιο απλοποιημένες πλατφόρμες ενίσχυσης, οι οποίες μπορούν δυνητικά να εφαρμοστούν σε περιβάλλοντα με περιορισμένη υποδομή, σε φορητές διαγνωστικές διατάξεις και σε συνθήκες point-of-care. (17,18)

Η σημασία της HDA δεν έγκειται μόνο στο ότι αποτέλεσε μία από τις πρώτες εναλλακτικές της PCR, αλλά και στο ότι συνέβαλε ουσιαστικά στη διαμόρφωση της νέας γενιάς ισοθερμικών διαγνωστικών συστημάτων. Η δυνατότητα ενίσχυσης σε σταθερή θερμοκρασία έδωσε το έναυσμα για τη σύνδεση της μεθόδου με φορητές συσκευές, μικρορευστονικές πλατφόρμες, διατάξεις lab-on-chip και απλοποιημένα διαγνωστικά πρωτόκολλα, καθιστώντας τη HDA ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα όχι μόνο για τη κλινική διάγνωση αλλά και για τη περιβαλλοντική παρακολούθηση, την ασφάλεια τροφίμων και τη γρήγορη ανίχνευση παθογόνων σε αποκεντρωμένα σημεία ελέγχου. Στο πλαίσιο της ανίχνευσης παθογόνων στο νερό, η HDA αποκτά ιδιαίτερη σημασία επειδή συνδυάζει τη λογική της μοριακής εξειδίκευσης με απλούστερες τεχνικές απαιτήσεις σε σχέση με την PCR, κάτι που την καθιστά ελκυστική για εφαρμογές επιτήρησης πεδίου. (19,20)



Εικόνα 4.1.: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου HDA. Η ελικάση διαχωρίζει τις δύο αλυσίδες του DNA, οι εκκινητές (primers) υβριδοποιούνται στις μονόκλωνες αλυσίδες και η DNA

πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές, οδηγώντας σε εκθετική ενίσχυση του DNA-στόχου. (Vincent et al)

4.2. Μηχανισμός λειτουργίας της HDA

Ο μηχανισμός της HDA βασίζεται σε ένα σύστημα ενζυμικής αποδιάταξης και αντιγραφής του DNA που μιμείται σε σημαντικό βαθμό φυσικές διαδικασίες αντιγραφής νουκλεϊκών οξέων. Αντί η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA να επιτυγχάνεται μέσω υψηλής θερμοκρασίας, όπως συμβαίνει στην PCR, η HDA χρησιμοποιεί ελικάση για να διαχωρίσει τους δύο συμπληρωματικούς κλώνους του μορίου-στόχου, δημιουργώντας μονόκλωνα πρότυπα διαθέσιμα για πρόσδεση εκκινητών. Στη συνέχεια, πρωτεΐνες δέσμευσης μονόκλωνου DNA σταθεροποιούν τα ανοιχτά τμήματα και αποτρέπουν την επανασύζευξη, ενώ η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές και συνθέτει νέα μόρια DNA, τα οποία εισέρχονται στον επόμενο κύκλο ενίσχυσης. (17,18,20)

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία, η οποία ανάλογα με τη διαμόρφωση της μεθόδου και τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται μπορεί να κυμαίνεται από περίπου 37°C έως 65°C, με τις θερμοφιλικές παραλλαγές να εφαρμόζονται συνήθως σε υψηλότερα θερμοκρασιακά εύρη. Αυτή η θερμοκρασιακή σταθερότητα αποτελεί σημαντικό τεχνολογικό πλεονέκτημα, διότι μειώνει τις ενεργειακές απαιτήσεις της μεθόδου και απλοποιεί την αναγκαία υποδομή. Επιπλέον, η απουσία θερμικού κυκλισμού ευνοεί την ενσωμάτωση της HDA σε μικροσυστήματα ανάλυσης, όπου ο περιορισμένος όγκος, η ταχεία θερμική ισορροπία και η ανάγκη αυτοματοποίησης είναι καθοριστικής σημασίας. (9,19)

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι, παρότι η HDA χρησιμοποιείται κυρίως για ενίσχυση DNA, μπορούν να προστεθούν κατάλληλα ένζυμα, όπως αντίστροφη μεταγραφάση, ώστε να επιτραπεί και η ανίχνευση RNA στόχων μέσω παραλλαγών της μεθόδου. Η δυνατότητα αυτή διευρύνει τη χρησιμότητα της τεχνικής, καθώς επιτρέπει θεωρητικά την εφαρμογή της όχι μόνο σε βακτηριακούς αλλά και σε ιικούς στόχους, στοιχείο ιδιαίτερα χρήσιμο για τη σύγχρονη περιβαλλοντική μικροβιολογία. (17,20)

4.3. Πλεονεκτήματα της HDA

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της HDA είναι ότι επιτυγχάνει ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων χωρίς την ανάγκη θερμοκυκλοποιητή, γεγονός που μειώνει σημαντικά την πολυπλοκότητα του εξοπλισμού και ενισχύει τις δυνατότητες χρήσης της εκτός κεντρικού εργαστηρίου. Σε σύγκριση με την PCR, η ισοθερμική φύση της HDA καθιστά τη μέθοδο περισσότερο κατάλληλη για αποκεντρωμένες ή φορητές εφαρμογές, όπου η σταθερότητα της θερμοκρασίας μπορεί να επιτευχθεί με απλούστερες και φθηνότερες συσκευές. Αυτό προσδίδει στη HDA σημαντικό πλεονέκτημα σε περιβάλλοντα περιορισμένων πόρων ή σε εφαρμογές που απαιτούν γρήγορη επιτόπια λήψη αποφάσεων.(20,21)

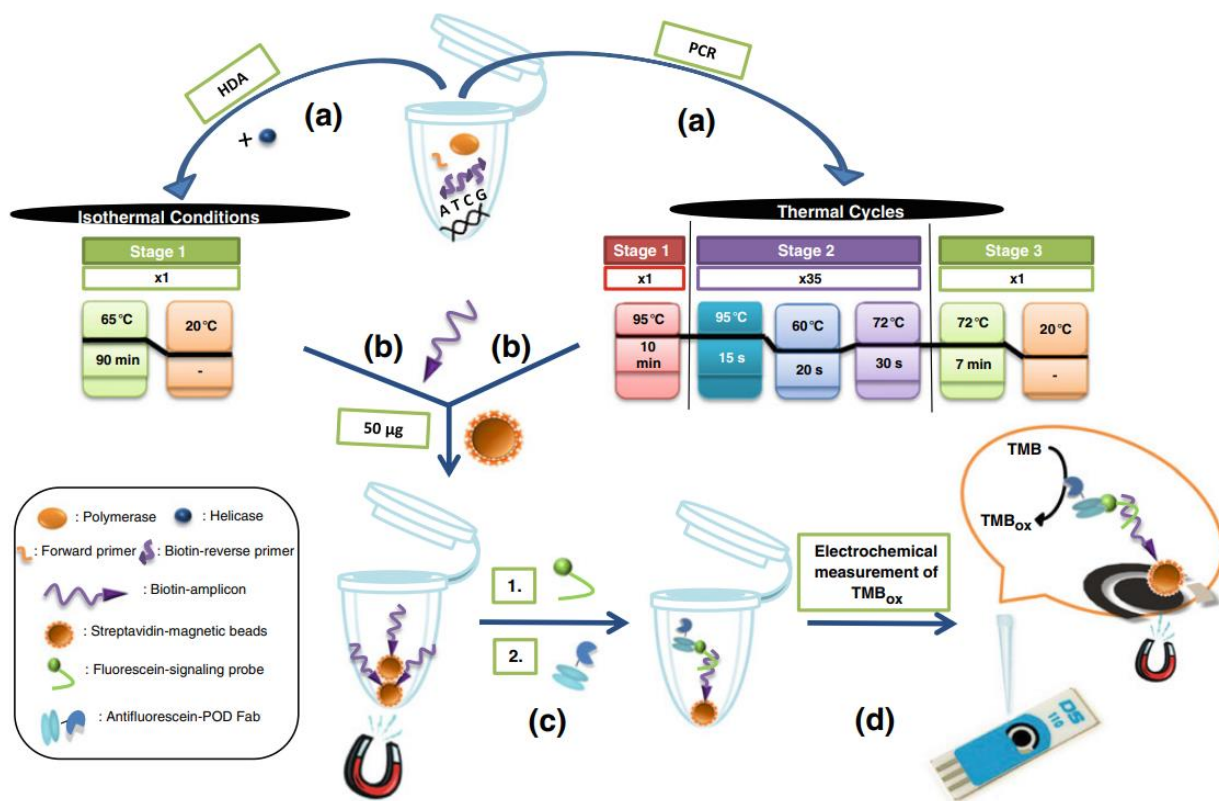
Επιπλέον, η HDA έχει αποδειχθεί ικανή να παρέχει καλή αναλυτική ευαισθησία και ειδικότητα σε διάφορες εφαρμογές ανίχνευσης παθογόνων. Σε μελέτες που συνέκριναν την απόδοσή της με αυτήν της PCR, η HDA παρουσίασε συγκρίσιμα αποτελέσματα για συγκεκριμένους στόχους, ενώ παράλληλα διατήρησε το πλεονέκτημα της απλούστερης τεχνικής διάταξης. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί ότι μπορεί να ανιχνεύσει χαμηλό αριθμό αντιγράφων στόχου με αποδεκτή αναπαραγωγιμότητα, γεγονός που την καθιστά ενδιαφέρουσα ως ποιοτική ή ημι-ποσοτική μέθοδο ανίχνευσης σε εφαρμογές δημόσιας υγείας. (21,22)

Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι η ευκολία συνδυασμού της με διάφορα συστήματα τελικής ανάγνωσης. Η HDA έχει χρησιμοποιηθεί μαζί με χρωματομετρικές ενδείξεις, πλευρικής ροής τεστ, φθορισμομετρικές μεθόδους και ολοκληρωμένες μικρορευστονικές διατάξεις, κάτι που αυξάνει σημαντικά το πεδίο εφαρμογών της. Η δυνατότητα αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική σε περιβάλλοντα όπου η ανάγνωση του αποτελέσματος πρέπει να είναι απλή, γρήγορη και κατανοητή ακόμη και από μη εξειδικευμένους χρήστες. Συνεπώς, η HDA δεν είναι μόνο μια μέθοδος ενίσχυσης, αλλά και μια τεχνολογία που μπορεί να ενσωματωθεί σε πλήρη διαγνωστικά συστήματα με αυξημένη πρακτική αξία. (9,20)

4.4. Εφαρμογές της HDA στην ανίχνευση παθογόνων

Η HDA έχει αξιοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών ανίχνευσης παθογόνων, τόσο στην κλινική διάγνωση όσο και σε πεδία όπως η ασφάλεια τροφίμων και η περιβαλλοντική επιτήρηση.

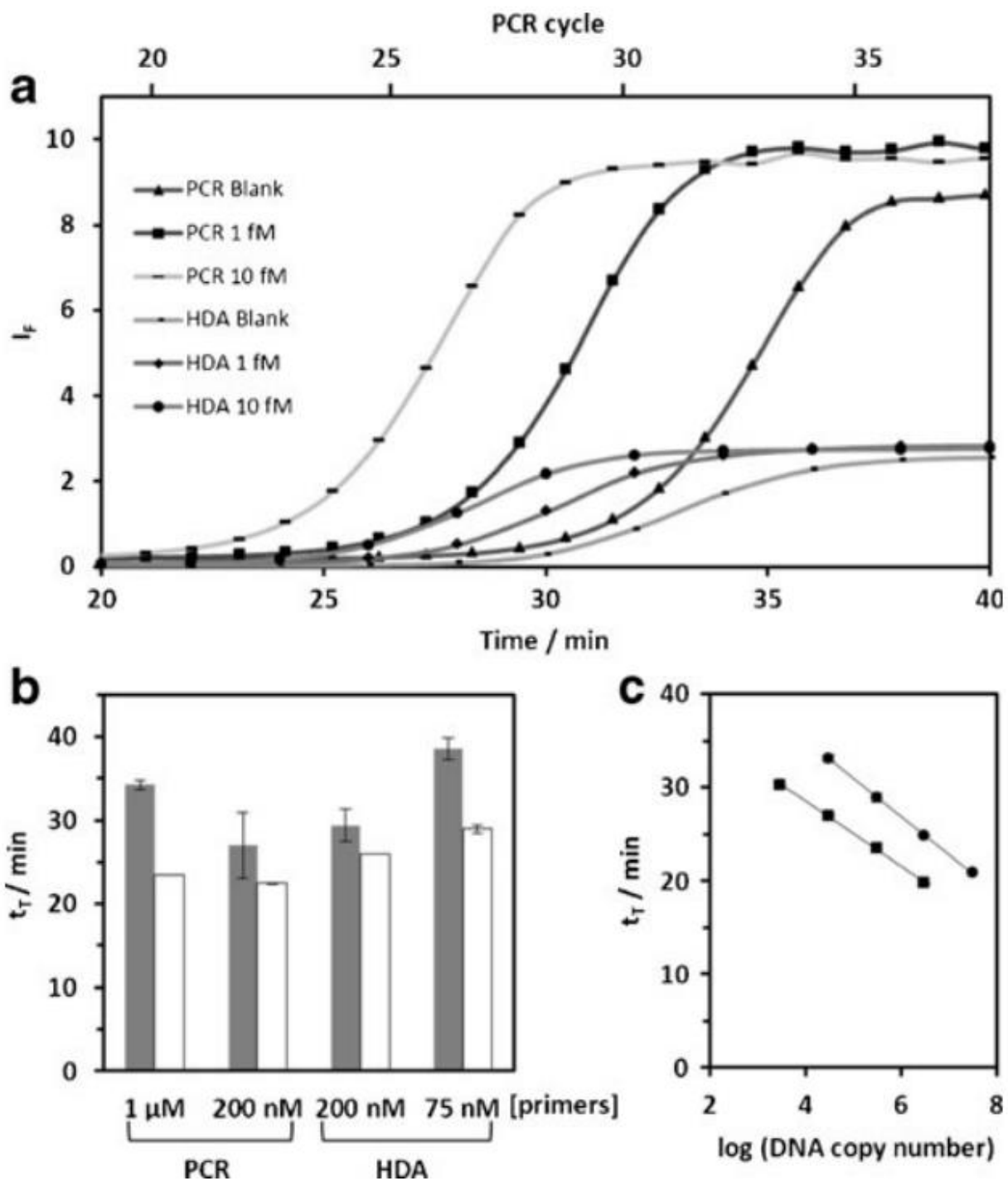
Στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί εφαρμογές της για την ανίχνευση βακτηρίων όπως το *Mycobacterium tuberculosis*, το *Escherichia coli*, η *Chlamydia trachomatis* και η *Neisseria gonorrhoeae*, αλλά και για την ανίχνευση ιικών στόχων μέσω κατάλληλων παραλλαγών της μεθόδου. Οι εφαρμογές αυτές δείχνουν ότι η HDA μπορεί να λειτουργήσει με ικανοποιητική απόδοση σε διαφορετικούς τύπους δειγμάτων, στοιχείο που υποστηρίζει τη διαγνωστική της ευελιξία. (21)



Εικόνα 4.2. Σχηματική αναπαράσταση πλατφόρμας ανίχνευσης DNA που συνδυάζει ασύμμετρη HDA ή PCR, μαγνητικό εμπλουτισμό των αμπλικονίων και ηλεκτροχημική ανίχνευση. (Barreda-García et al)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι εφαρμογές της HDA σε περιβαλλοντικά δείγματα και ειδικότερα στην παρακολούθηση της μικροβιακής ποιότητας του νερού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη HDA δοκιμασίας για την ανίχνευση εντερόκοκκων ως δεικτών κοπρανώδους ρύπανσης σε περιβαλλοντικά ύδατα, όπου τα αποτελέσματα κρίθηκαν συνεπή με αντίστοιχες qPCR προσεγγίσεις. Η συγκεκριμένη εφαρμογή έχει ιδιαίτερη αξία, διότι δείχνει ότι

η HDA μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για κλινικούς στόχους αλλά και για δείκτες που έχουν άμεση σημασία στη δημόσια υγεία και στην αξιολόγηση της ποιότητας του νερού. Επιπλέον, μελέτες ολοκλήρωσης της HDA σε μικρορευστονικά chips για ανίχνευση βακτηρίων καταδεικνύουν τη δυνατότητα της μεθόδου να προσαρμοστεί σε miniaturized και αυτοματοποιημένα συστήματα, κάτι που ενισχύει τη μελλοντική της προοπτική. (9,17,20)



Σχήμα 4.1. Σύγκριση των τεχνικών HDA και PCR ως προς την κινητική ενίσχυσης, την επίδραση της συγκέντρωσης εκκινητών και τη σχέση μεταξύ χρόνου κατωφλίου και αρχικού αντιγράφου DNA. (Barreda-García et al)

4.5. Περιορισμοί και τεχνικές προκλήσεις της HDA

Παρά τα πλεονεκτήματά της, η HDA παρουσιάζει και ουσιώδεις περιορισμούς που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την αξιολόγησή της. Ένα βασικό ζήτημα αφορά τη βελτιστοποίηση της αντίδρασης, καθώς η αποτελεσματική συνεργασία της ελικάσης, των πρωτεϊνών σύνδεσης μονόκλωνου DNA, της πολυμεράσης και των εκκινητών απαιτεί προσεκτική ρύθμιση των συνθηκών. Σε αντίθεση με την PCR, όπου η θερμική αποδιάταξη είναι σχετικά τυποποιημένη, στη HDA η αποτελεσματικότητα του ενζυμικού διαχωρισμού μπορεί να επηρεαστεί από τη δομή του στόχου, τη σύνθεση του δείγματος και την ποιότητα των αντιδραστηρίων. Αυτό σημαίνει ότι η μεταφορά της μεθόδου από πειραματικό σε εφαρμοσμένο επίπεδο δεν είναι πάντοτε απλή. (17, 18, 20)

Ένα ακόμη ζήτημα είναι ο κίνδυνος μη ειδικής ενίσχυσης ή σχηματισμού παραπροϊόντων, ιδίως όταν δεν έχει επιτευχθεί σωστός σχεδιασμός εκκινητών ή όταν η αντίδραση εφαρμόζεται σε σύνθετα περιβαλλοντικά δείγματα. Αν και τέτοια προβλήματα δεν είναι μοναδικά για τη HDA, αποκτούν ιδιαίτερη σημασία όταν η μέθοδος προορίζεται για περιβάλλοντα εκτός εργαστηρίου, όπου η ανάγκη για σταθερή απόδοση και χαμηλό ποσοστό ψευδών αποτελεσμάτων είναι ακόμη μεγαλύτερη. Επίσης, η HDA δεν έχει αποκτήσει ακόμη τον ίδιο βαθμό διάδοσης και εκτεταμένης εφαρμοσμένης επικύρωσης με άλλες ισοθερμικές τεχνικές όπως η LAMP ή η RPA, γεγονός που περιορίζει, σε ορισμένες περιπτώσεις, τη διαθεσιμότητα πρωτοκόλλων, εμπορικών λύσεων και συγκριτικών δεδομένων. (17,18)

Παράλληλα, για δείγματα όπως το περιβαλλοντικό νερό, όπου συχνά υπάρχουν ανασταλτικές ουσίες, χαμηλή συγκέντρωση στόχου και ανάγκη προεπεξεργασίας, η απόδοση της HDA εξαρτάται όχι μόνο από την ίδια την ενίσχυση αλλά και από την αποτελεσματικότητα των upstream σταδίων, δηλαδή της συλλογής, συγκέντρωσης και εκχύλισης του γενετικού υλικού. Αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο για τη δική σου εργασία, επειδή δείχνει ότι καμία μέθοδος δεν μπορεί να κριθεί αποκλειστικά από τον μηχανισμό της ενίσχυσης χωρίς να ληφθεί υπόψη το συνολικό διαγνωστικό workflow. (17,20,22)

4.6. Θέση της HDA στη συγκριτική αξιολόγηση της εργασίας

Η HDA κατέχει ιδιαίτερη θέση στη συγκριτική αξιολόγηση των ισοθερμικών τεχνικών, επειδή αντιπροσωπεύει μια προσέγγιση που επιχειρεί να διατηρήσει τη λογική των κλασικών μεθόδων ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, ενώ ταυτόχρονα μειώνει την εξάρτηση από τον θερμικό κυκλισμό και τον σύνθετο εξοπλισμό. Η αξία της στη διπλωματική σου δεν είναι μόνο ιστορική ή τεχνολογική, αλλά και συγκριτική, καθώς επιτρέπει να διερευνηθεί κατά πόσο μια πιο “μηχανιστικά άμεση” ισοθερμική μέθοδος μπορεί να ανταποκριθεί στις σύγχρονες απαιτήσεις ευαισθησίας, ευχρηστίας και εφαρμογής πεδίου. Μέσα από αυτή τη σκοπιά, η HDA λειτουργεί ως σημαντικό σημείο αναφοράς για την αποτίμηση των μεθόδων που ακολουθούν, όπως η RPA, η RCA, η NASBA και η LAMP, και συμβάλλει στη διαμόρφωση μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας για το ποια τεχνολογία είναι τελικά καταλληλότερη για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό. (17,18,20)

5. Recombinase polymerase amplification (RPA)

5.1. Εισαγωγή στη μέθοδο RPA

Η Recombinase polymerase amplification (RPA) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες και περισσότερο μελετημένες ισοθερμικές τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων της σύγχρονης μοριακής διαγνωστικής. Η μέθοδος αναπτύχθηκε με στόχο να προσφέρει τα πλεονεκτήματα της γρήγορης και ειδικής μοριακής ανίχνευσης χωρίς την ανάγκη θερμοκυκλοποιητή, επιτρέποντας έτσι την εφαρμογή της σε περιβάλλοντα με περιορισμένο εξοπλισμό και σε συνθήκες point-of-care. Σε αντίθεση με τη PCR, η RPA λειτουργεί σε σταθερή και σχετικά χαμηλή θερμοκρασία, συνήθως μεταξύ 37 και 45°C, γεγονός που απλοποιεί ουσιαστικά τη διαδικασία της ενίσχυσης και καθιστά τη μέθοδο ιδιαίτερα ελκυστική και εφαρμογές πεδίου. (23,24)

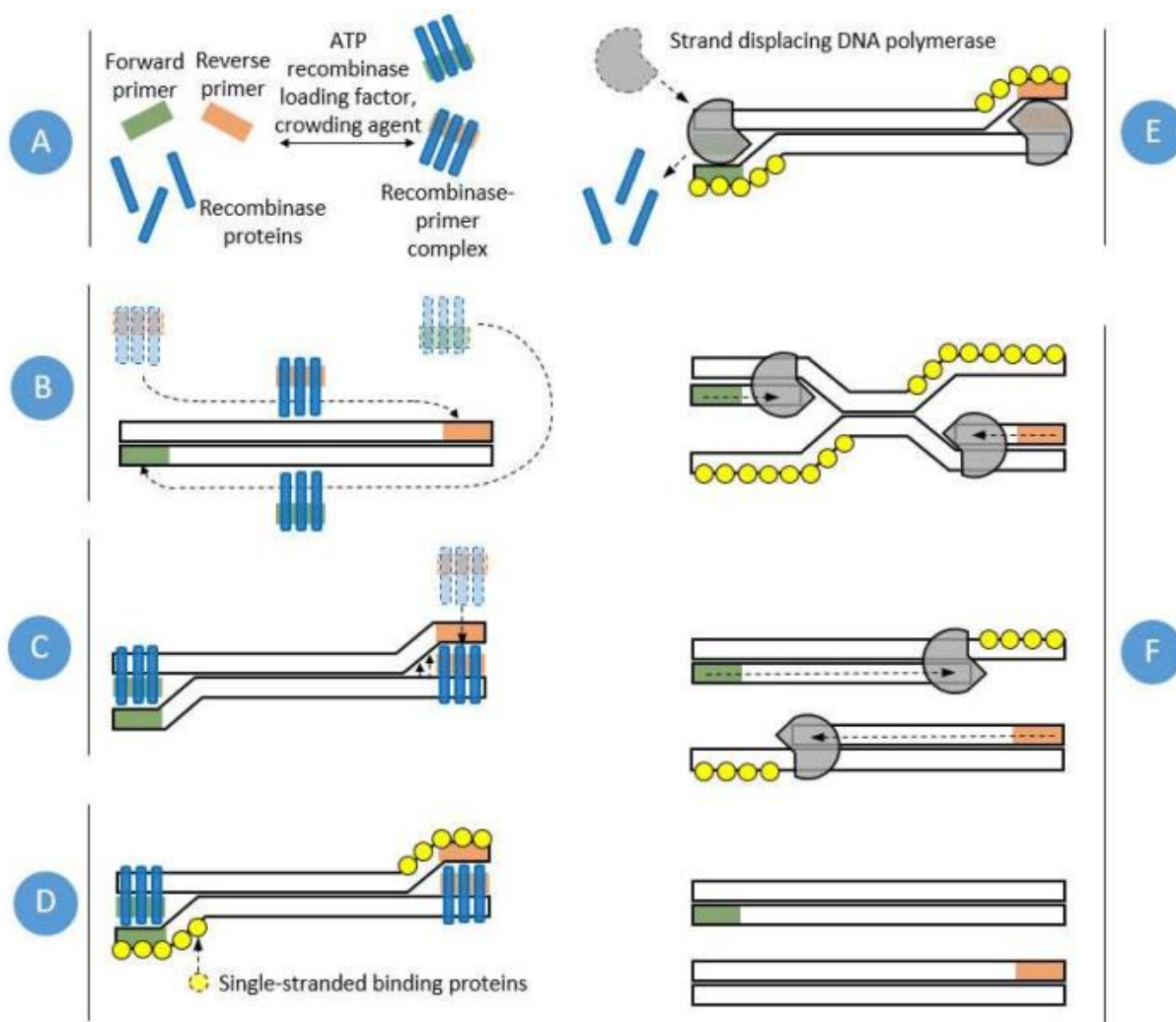
Η τεχνολογία της RPA προσέλκυσε έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον επειδή συνδυάζει υψηλή ταχύτητα απόκρισης με πολύ καλή αναλυτική απόδοση και ευελιξία ως προς τους τρόπους τελικής ανίχνευσης. Η δυνατότητα παραγωγής ανιχνεύσιμων προϊόντων μέσα σε λίγα λεπτά, σε συνδυασμό με την περιορισμένη ενεργειακή απαίτηση της αντίδρασης, την καθιστά από τις πλέον κατάλληλες ισοθερμικές τεχνολογίες για καταστάσεις όπου απαιτείται γρήγορη λήψη αποφάσεων. Για τον λόγο αυτό, η RPA έχει χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα εφαρμογών για ανίχνευση βακτηρίων, ιών και παρασίτων, ενώ έχει συνδεθεί στενά με φορητά διαγνωστικά εργαλεία, πλευρικής ροής συστήματα, paper-based πλατφόρμες και πρόσφατα με συστήματα CRISPR. Στο πεδίο της ανίχνευσης παθογόνων στο νερό, η RPA παρουσιάζει ιδιαίτερη αξία, επειδή ανταποκρίνεται σε βασικές απαιτήσεις της περιβαλλοντικής επιτήρησης, όπως η ταχύτητα, η ευχρηστία και η δυνατότητα εφαρμογής εκτός πλήρως εξοπλισμένου εργαστηρίου. (23)

5.2. Μηχανισμός λειτουργίας της RPA

Ο μηχανισμός της RPA βασίζεται στη συνεργασία τριών βασικών παραγόντων: ανασυνδυαστικών πρωτεϊνών, πρωτεϊνών δέσμευσης μονόκλωνου DNA και πολυμεράσης με ικανότητα μετατόπισης κλώνου. Αρχικά, οι ανασυνδυαστικές πρωτεΐνες σχηματίζουν σύμπλοκα με τους εκκινητές και διευκολύνουν την αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών πάνω στο δίκλωνο DNA-στόχο. Όταν εντοπιστεί η κατάλληλη περιοχή, οι εκκινητές εισβάλλουν στο δίκλωνο DNA και υβριδοποιούνται με τη συμπληρωματική αλληλουχία, ενώ οι πρωτεΐνες δέσμευσης μονόκλωνου DNA σταθεροποιούν το εκτοπισμένο νήμα. Στη συνέχεια, η πολυμεράση ξεκινά τη σύνθεση νέας

αλυσίδας DNA χωρίς να απαιτείται θερμική αποδιάταξη, οδηγώντας σταδιακά σε εκθετική ενίσχυση του στόχου. (23,24)

Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα αποδοτική επειδή εξελίσσεται σε χαμηλή και σταθερή θερμοκρασία, με αποτέλεσμα η αντίδραση να ολοκληρώνεται συχνά μέσα σε 10 έως 20 λεπτά. Η ταχύτητα αυτή αποτελεί βασικό συγκριτικό πλεονέκτημα της RPA έναντι τόσο της PCR όσο και ορισμένων άλλων ισοθερμικών μεθόδων, ειδικά όταν ζητούμενο είναι η γρήγορη επιβεβαίωση της παρουσίας ενός παθογόνου. Επιπλέον, με την προσθήκη αντίστροφης μεταγραφάσης, η RPA μπορεί να προσαρμοστεί για ανίχνευση RNA, επεκτείνοντας έτσι τη χρησιμότητά της και στην ανίχνευση ιικών στόχων. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την παρούσα εργασία, καθώς τα παθογόνα του νερού δεν περιορίζονται μόνο σε βακτήρια αλλά περιλαμβάνουν και ιούς που σχετίζονται με σημαντικό φορτίο δημόσιας υγείας. (25)



Εικόνα 5.1. Βασικά στάδια της τεχνικής RCA. A) σχηματισμός συμπλόκων ανασυνδυασμού-εκκινητή, B) αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας στο DNA-στόχο, C) εισβολή του εκκινητή και εκτόπιση του συμπληρωματικού κλώνου, D) σταθεροποίηση του εκτοπισμένου μονόκλωνου DNA από πρωτεΐνες SSB, E) απομάκρυνση των πρωτεϊνών ανασυνδυασμού και πρόσδεση της πολυμεράσης με ικανότητα εκτόπισης κλώνου και F) σύνθεση νέων κλώνων DNA και παραγωγή αμπλικονίων μέσω ισοθερμικής ενίσχυσης. (Lobato et al)

5.3. Πλεονεκτήματα της RCA

Η RCA διαθέτει σειρά πλεονεκτημάτων που εξηγούν γιατί έχει αναδειχθεί ως μία από τις πλέον υποσχόμενες τεχνολογίες ταχείας μοριακής ανίχνευσης. Το σημαντικότερο ίσως είναι ο πολύ μικρός χρόνος αντίδρασης, καθώς σε πολλές περιπτώσεις η ενίσχυση ολοκληρώνεται σε λιγότερο

από 20 λεπτά, ενώ ανιχνεύσιμα σήματα μπορεί να εμφανιστούν ακόμη νωρίτερα. Η ιδιότητα αυτή είναι κρίσιμη για εφαρμογές περιβαλλοντικής επιτήρησης, όπου η καθυστέρηση στη διάγνωση ενδέχεται να έχει άμεσες συνέπειες στην προστασία της δημόσιας υγείας. (23,26)

Ένα δεύτερο σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι η RPA λειτουργεί σε χαμηλή θερμοκρασία, κοντά στις φυσιολογικές θερμοκρασίες περιβάλλοντος ή σώματος, γεγονός που επιτρέπει την εφαρμογή της ακόμη και με απλά θερμαντικά μέσα. Αυτό μειώνει δραστικά τις απαιτήσεις εξοπλισμού και ενισχύει τη δυνατότητα υλοποίησης της τεχνικής σε φορητά ή ημι-φορητά διαγνωστικά συστήματα. Παράλληλα, η μέθοδος έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα ευαίσθητη, με μελέτες να αναφέρουν δυνατότητα ανίχνευσης πολύ μικρού αριθμού αντιγράφων στόχου, στοιχείο που την καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλη για δείγματα όπου το παθογόνο υπάρχει σε χαμηλή συγκέντρωση. (23,27)

Η ευελιξία της RPA ως προς τα συστήματα ανάγνωσης αποτελεί επίσης ιδιαίτερο πλεονέκτημα. Η μέθοδος μπορεί να συνδυαστεί με φθορισμομετρική ανίχνευση, ηλεκτροχημικές διατάξεις, πλευρικής ροής ταινίες, paper-based platforms και πιο πρόσφατα με τεχνολογίες CRISPR-Cas, επιτρέποντας τόσο ποιοτική όσο και ημι-ποσοτική ή ποσοτική ανάγνωση. Η προσαρμοστικότητα αυτή αυξάνει τη δυνατότητα χρήσης της σε διαφορετικά περιβάλλοντα εφαρμογής, από το εργαστήριο μέχρι το πεδίο, και διευκολύνει τη δημιουργία ολοκληρωμένων διαγνωστικών συστημάτων χαμηλού κόστους. Συνεπώς, η RPA δεν είναι απλώς μία γρήγορη ισοθερμική τεχνική, αλλά μια πλατφόρμα με μεγάλη τεχνολογική ευελιξία και έντονη αναπτυξιακή δυναμική. (24,27,28)

5.4. Εφαρμογές της RPA στην ανίχνευση παθογόνων

Η RPA έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στην ανίχνευση μεγάλου εύρους παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ιών, παρασίτων και μυκήτων, γεγονός που καταδεικνύει τη διαγνωστική της ευρύτητα. Η βιβλιογραφία αναφέρει εφαρμογές της για την ανίχνευση *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, ιών RNA και DNA, καθώς και παρασιτικών στόχων, τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά δείγματα. Η ευρύτητα αυτή είναι σημαντική, διότι υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός της μεθόδου είναι επαρκώς ευέλικτος ώστε να προσαρμόζεται σε διαφορετικά είδη παθογόνων και σε διαφορετικά διαγνωστικά ερωτήματα. (23,24,27)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι εφαρμογές της RPA σε δείγματα νερού και σε υδατογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς. Σε μελέτες για *E. coli* O157:H7 σε πόσιμο νερό, η RPA σε συνδυασμό με lateral flow assay παρουσίασε υψηλή ευαισθησία, ταχύτητα και απλότητα, ολοκληρώνοντας την ανάλυση μέσα σε λίγα λεπτά και με περιορισμένες απαιτήσεις εξοπλισμού. Αντίστοιχα, έχει αναπτυχθεί φορητό, χαμηλού κόστους σύστημα RPA-LFA για την ανίχνευση *Enterococcus faecalis* σε λύματα και περιβαλλοντικά ύδατα, το οποίο ολοκληρώνεται σε περίπου 30 λεπτά και στοχεύει ειδικά σε δείκτες κοπρανώδους ρύπανσης. Τα παραδείγματα αυτά έχουν ιδιαίτερη βαρύτητα, επειδή δείχνουν ότι η RPA δεν αποτελεί μόνο θεωρητικά υποσχόμενη τεχνική, αλλά έχει ήδη αρχίσει να μεταφράζεται σε λειτουργικές εφαρμογές σχετικές με την ασφάλεια του νερού. (26, 29)

Επιπλέον, η ενσωμάτωση της RPA σε μικρορευστονικές ή διατάξεις βασιζόμενες σε χαρτί και η σύζευξή της με CRISPR συστήματα έχει ενισχύσει ακόμα περισσότερο το πεδίο εφαρμογών της. Μέσα από τέτοιες τεχνολογικές συνδέσεις, η RPA αποκτά αυξημένη ειδικότητα, καλύτερη αναγνωσιμότητα αποτελέσματος και μεγαλύτερη δυνατότητα χρήσης σε φορητά, ολοκληρωμένα συστήματα ανίχνευσης. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για το μέλλον της περιβαλλοντικής επιτήρησης, καθώς επιτρέπει τη μετάβαση από τη μεμονωμένη εργαστηριακή ανάλυση σε πλατφόρμες ταχείας διάγνωσης. (26,27,28)

5.5. Περιορισμοί και τεχνικές προκλήσεις της RPA

Παρά τα πολυάριθμα πλεονεκτήματα της, η RPA εμφανίζει και ορισμένους περιορισμούς που πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη στην αξιολόγηση της τεχνολογίας. Ένα από τα συχνότερα ζητήματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι η πιθανότητα μη ειδικής ενίσχυσης ή παραγωγής παραπροϊόντων, ιδιαίτερα όταν ο σχεδιασμός των εκκινητών και των ανιχνευτών δεν έχει βελτιστοποιηθεί επαρκώς. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά σήματα ή σε μειωμένη ειδικότητα, ειδικά όταν η μέθοδος χρησιμοποιείται σε πολύπλοκα περιβαλλοντικά δείγματα με υψηλό υπόβαθρο παρεμβολών. Συνεπώς, η επιτυχής εφαρμογή της RPA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προσεκτική μοριακή σχεδίαση και την επικύρωση κάθε συστήματος σε πραγματικά δείγματα. (23,24)

Επιπλέον, παρότι η μέθοδος είναι γρήγορη και απλή στην αρχή της, η διαθεσιμότητα αντιδραστηρίων και η σχετική εξάρτηση από εμπορικά kits παραμένουν ζητήματα που

επηρεάζουν την ευρύτερη διάδοση της. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το κόστος ή η προσβασιμότητα των εξειδικευμένων αντιδραστηρίων μπορεί να αποτελέσει εμπόδιο για μαζική ή μακροχρόνια χρήση, ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα με περιορισμένους πόρους. Παράλληλα, η RPA, όπως και άλλες μοριακές τεχνικές, επηρεάζεται από την ποιότητα της προετοιμασίας του δείγματος, καθώς η παρουσία ανασταλτικών ουσιών ή η ανεπαρκής εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων μπορεί να μειώσει την πραγματική διαγνωστική της απόδοση. (26)

Ένα ακόμη στοιχείο που αξίζει να επισημανθεί είναι ότι, αν και η RPA είναι εξαιρετικά κατάλληλη για ταχεία ποιοτική ανίχνευση, η πλήρης τυποποίηση για ποσοτική εφαρμογή ή για απόλυτη σύγκριση μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων παραμένει πιο σύνθετη σε σχέση με την qPCR. Αυτό δεν μειώνει τη χρησιμότητα της, αλλά σημαίνει ότι η επιλογή της μεθόδου πρέπει να συνδέεται με τον τελικό στόχο της ανάλυσης. Αν ο στόχος είναι η άμεση επιτόπια διάγνωση και η ταχεία ειδοποίηση για πιθανή μόλυνση, η RPA παρουσιάζει ιδιαίτερα ισχυρά πλεονεκτήματα. Αν όμως ζητούμενο είναι ακριβής ποσοτική εκτίμηση με αυστηρή εργαστηριακή τυποποίηση, ίσως χρειάζεται να συνδυαστεί με άλλες τεχνικές ή να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά. (23,27)

5.6. Θέση της RPA στη συγκριτική αξιολόγηση της εργασίας

Η RPA κατέχει κεντρική θέση στη συγκριτική αξιολόγηση των ισοθερμικών τεχνικών, καθώς συνδυάζει πολλά από τα χαρακτηριστικά που αναζητούνται σε μία ιδανική μέθοδο ανίχνευσης παθογόνων στο νερό: χαμηλή θερμοκρασία λειτουργίας, μικρό χρόνο ανάλυσης, υψηλή ευαισθησία, δυνατότητα φορητής εφαρμογής και ευκολία ενσωμάτωσης σε απλές διατάξεις ανάγνωσης. Από την άποψη των ASSURED κριτηρίων, η RPA εμφανίζει ιδιαίτερα ελκυστικό προφίλ, καθώς είναι γρήγορη, σχετικά φιλική προς τον χρήστη και κατάλληλη για αποκεντρωμένα περιβάλλοντα. Ωστόσο, οι ζητήματα μη ειδικότητας, προσβασιμότητας αντιδραστηρίων και ανάγκης βελτιστοποίησης υποδεικνύουν ότι η μέθοδος δεν μπορεί να θεωρηθεί αυτόματα ιδανική χωρίς κριτική αποτίμηση. (23)

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής, η RPA παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον επειδή βρίσκεται κοντά στον στόχο μιας πραγματικά επιτόπιας και ταχείας μοριακής ανίχνευσης για υδατογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς. Η αξιολόγησή της σε σύγκριση με τεχνικές όπως η HDA, η RCA, η NASBA και η LAMP αναμένεται να αναδείξει κατά πόσο τα πρακτικά της

πλεονεκτήματα υπερτερούν των τεχνικών της περιορισμών και αν μπορεί να αποτελέσει ρεαλιστική επιλογή για μελλοντικά συστήματα παρακολούθησης της ποιότητας του νερού. (26)

Πίνακας 5.1. Συγκριτική αξιολόγηση των ισοθερμικών τεχνικών αναδεικνύει ότι καμία μέθοδος δεν υπερτερεί απόλυτα σε όλους τους δείκτες, καθώς η καταλληλότητα τους εξαρτάται από την αναλυτική ευαισθησία, τον χρόνο αντίδρασης, της απαιτήσεις εξοπλισμού και τη δυνατότητα εφαρμογής σε συνθήκες πεδίου. Επομένως, η επιλογή της καταλληλότερης τεχνικής πρέπει να γίνεται με βάση το φιαγνωστικό σενάριο και τις απαιτήσεις της εφαρμογής.

Τεχνική	Θερμοκρασία	Χρόνος	Ευαισθησία	Ειδικότητα	Εξοπλισμός	Καταλληλότητα για Field use
HDA	Σταθερή, μέτρια	Σύντομος	Υψηλή	Υψηλή	Χαμηλός εως μέτριος	Καλή
RPA	37-42°C	Πολύ σύντομος	Υψηλή	Υψηλή αλλά εξαρτάται απο primers	Πολύ χαμηλός	Πολύ καλή
RCA	Χαμηλή	Μέτριος	Υψηλή	Υψηλή	Χαμηλός	Καλή
CPA	Μέτρια	Σύντομος	Υψηλή	Καλή	Χαμηλός	Καλή
NASBA	41°C	Μέτριος	Υψηλή	Υψηλή	Μέτριος	Καλή
LAMP	60-65°C	σύντομος	Πολύ υψηλή	Υψηλή	χαμηλός	Πολύ καλή

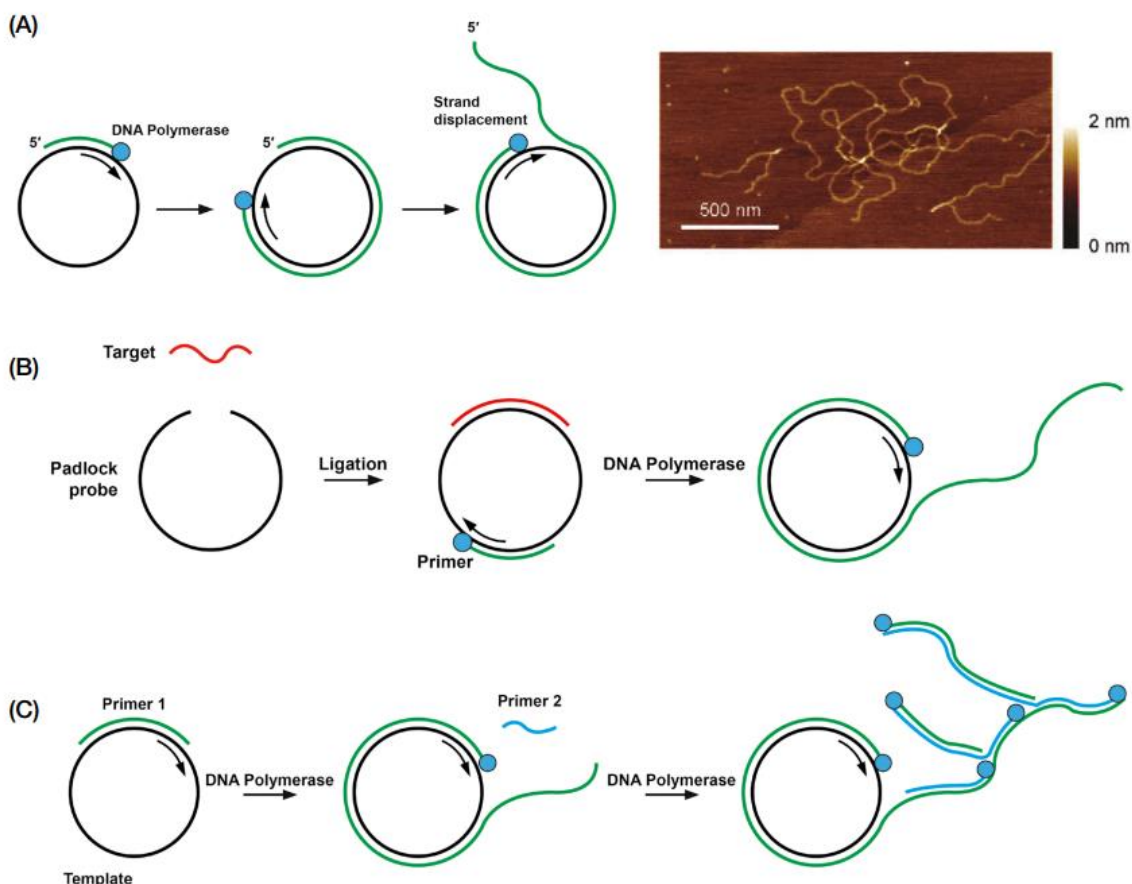
6. Rolling Circle Amplification (RCA)

6.1. Εισαγωγή στη μέθοδο RCA

Η Rolling Circle Amplification (RCA) αποτελεί μία από τις πιο χαρακτηριστικές ισοθερμικές μεθόδους ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων και έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της υψηλής ειδικότητας, της ευαισθησίας και της μεγάλης ευελιξίας της ως προς τις διαγνωστικές εφαρμογές. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση κυκλικού προτύπου DNA, πάνω στο οποίο μια πολυμεράση με ικανότητα μετατόπισης κλώνου συνθέτει συνεχώς νέο γενετικό υλικό, παράγοντας μακριά μονόκλωνα μόρια DNA που περιέχουν πολλαπλά επαναλαμβανόμενα αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου. Η ιδιότητα αυτή καθιστά την RCA ιδιαίτερα ελκυστική για εφαρμογές όπου απαιτείται ισχυρή ενίσχυση σήματος και εξαιρετική ευαισθησία ανίχνευσης, χωρίς να είναι απαραίτητος ο θερμικός κυκλισμός που χαρακτηρίζει την PCR. (30, 31)

Σε αντίθεση με άλλες ισοθερμικές τεχνικές, όπου η ενίσχυση στηρίζεται σε πολύπλοκους συνδυασμούς εκκινήτων ή σε πολλαπλά ένζυμα, η RCA συχνά παρουσιάζεται ως μία περισσότερο “καθαρή” και μοριακά κομψή τεχνική, επειδή βασίζεται σε ένα κυκλικό πρότυπο και σε συνεχόμενη πολυμεριστική δραστηριότητα. Η απλότητα αυτή, όμως, δεν σημαίνει μειωμένη λειτουργικότητα. Αντιθέτως, η RCA μπορεί να ενσωματωθεί σε μεγάλο εύρος συστημάτων ανίχνευσης, από κλασικά φθορισμομετρικά πρωτόκολλα έως προηγμένα βιοαισθητήρια, ηλεκτροχημικές πλατφόρμες, χρωματομετρικές αναγνώσεις και υβριδικά συστήματα συνδυασμού με CRISPR ή άλλες τεχνολογίες ενίσχυσης σήματος. Για τον λόγο αυτό, η RCA δεν αποτελεί απλώς ακόμη μία ισοθερμική μέθοδο, αλλά μια εξαιρετικά ευέλικτη πλατφόρμα μοριακής διάγνωσης που συνδέεται στενά με τη νέα γενιά βιοαισθητήρων και point-of-care τεχνολογιών.

(30,31)



Εικόνα 6.1. Αρχή λειτουργίας και κύριες παραλλαγές της τεχνικής Rolling Circle Amplification (RCA), συμπεριλαμβανομένων των RCA, Linear RCA (LRCA), και Hyperbranched RCA (HRCA). (Nam-In Goo, Dong-Eun Kim)

Στο πεδίο της ανίχνευσης παθογόνων στο νερό, η RCA παρουσιάζει ιδιαίτερη σημασία, διότι συνδυάζει υψηλή ειδικότητα αναγνώρισης με δυνατότητα σημαντικής ενίσχυσης του ανιχνευτικού σήματος. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά είναι εξαιρετικά σημαντικά όταν το ζητούμενο είναι η ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων γενετικού υλικού σε σύνθετα περιβαλλοντικά δείγματα, όπου η παρουσία παρεμβολών, ανασταλτικών ουσιών ή μη-στόχων μπορεί να δυσχεραίνει σημαντικά τη διάγνωση. Συνεπώς, η RCA αποτελεί τεχνική με ιδιαίτερη προοπτική για εφαρμογές

περιβαλλοντικής μικροβιολογίας και επιτήρησης της ποιότητας του νερού, ειδικά όταν η έμφαση δίνεται στην ευαισθησία, στην εξειδίκευση και στην ενσωμάτωση της μεθόδου σε προηγμένα διαγνωστικά συστήματα. (4)

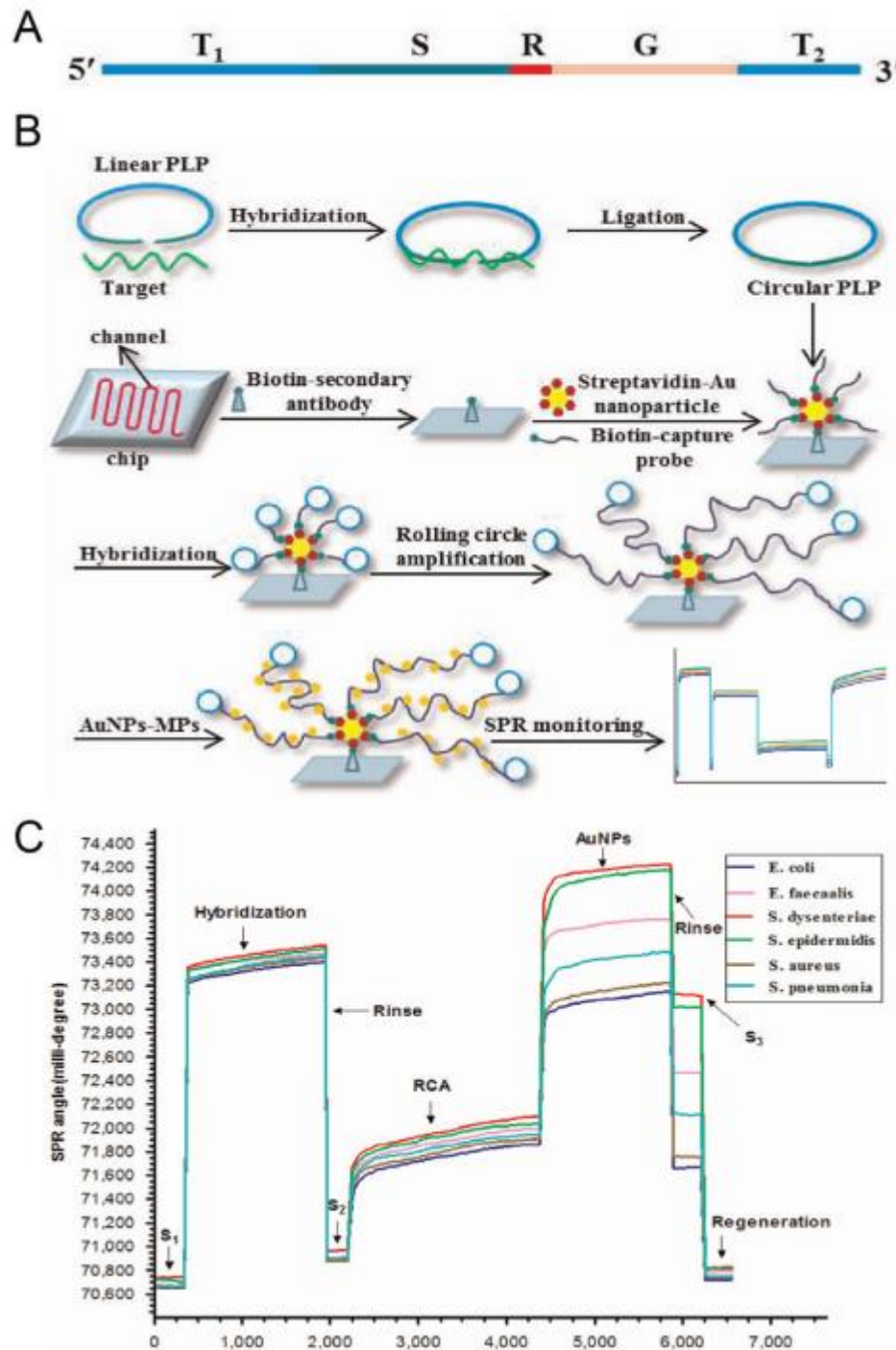
6.2. Μηχανισμός λειτουργίας RCA

Η βασική αρχή της RCA στηρίζεται στην ύπαρξη ενός κυκλικού μορίου DNA, το οποίο λειτουργεί ως πρότυπο για τη συνεχή σύνθεση νέας αλυσίδας από μια DNA πολυμεράση με ικανότητα μετατόπισης κλώνου, όπως η φ29 DNA polymerase. Η διαδικασία ξεκινά με την υβριδοποίηση ενός εκκινητή στο κυκλικό πρότυπο και ακολουθεί η επιμήκυνσή του από την πολυμεράση, η οποία “γυρίζει” επανειλημμένα γύρω από τον κυκλικό κλώνο, παράγοντας ένα μακρύ μονόκλωνο προϊόν με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες συμπληρωματικές προς το πρότυπο. Το προϊόν αυτό μπορεί στη συνέχεια να ανιχνευθεί άμεσα ή να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για δευτερογενή ενίσχυση σήματος, γεγονός που αυξάνει σημαντικά τη συνολική αναλυτική απόδοση της μεθόδου. (30, 31)

Συχνά, η RCA εφαρμόζεται σε συνδυασμό με λεγόμενους padlock probes, δηλαδή γραμμικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές που κυκλικοποιούνται μόνο όταν αναγνωρίσουν με ακρίβεια τη συμπληρωματική αλληλουχία-στόχο. Το χαρακτηριστικό αυτό προσδίδει στη μέθοδο πολύ υψηλή ειδικότητα, καθώς η κυκλικοποίηση του ανιχνευτή αποτελεί ουσιαστικά ένα πρόσθετο επίπεδο επιβεβαίωσης της ταυτότητας του στόχου πριν από την ίδια την ενίσχυση. Έτσι, η RCA δεν βασίζεται αποκλειστικά στην εκθετική παραγωγή σήματος, αλλά και σε πολύ αυστηρή αρχική μοριακή αναγνώριση, γεγονός που την καθιστά ιδανική για εφαρμογές όπου απαιτείται ανίχνευση με εξαιρετική ακρίβεια ή ακόμη και διάκριση μικρών διαφορών αλληλουχίας. (30, 31, 33)

Ανάλογα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται, η RCA μπορεί να λάβει διάφορες μορφές, όπως linear RCA, hyperbranched RCA ή συνδυαστικά σχήματα με άλλες στρατηγικές ενίσχυσης. Η hyperbranched παραλλαγή, για παράδειγμα, χρησιμοποιεί επιπρόσθετους εκκινητές που προσδένονται στο αρχικό προϊόν RCA και προκαλούν περαιτέρω διακλαδούμενη ενίσχυση, εντείνοντας δραστικά το παραγόμενο σήμα. Η ευελιξία αυτή επιτρέπει στην RCA να προσαρμόζεται ανάλογα με το ζητούμενο της ανάλυσης, είτε αυτό αφορά απλή επιβεβαίωση

παρουσίας ενός παθογόνου είτε ανίχνευση πολύ χαμηλής συγκέντρωσης στόχου με υπερενισχυμένο τελικό σήμα. (30, 31)



Εικόνα 6.2. Σχηματική αναπαράσταση της ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων με χρήση padlock probes και Rolling Circle Amplification (RCA). Το γραμμικό padlock probe υβριδοποιείται με την αλληλουχία-στόχο και κυκλοποιείται μέσω λιγάσης, σχηματίζοντας κυκλικό πρότυπο DNA. Στη συνέχεια πραγματοποιείται RCA για την παραγωγή μακρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, οι οποίες ανιχνεύονται μέσω νανოსωματιδίων χρυσού και βιοαισθητήρα επιφανειακού πλασμονικού συντονισμού (SPR). (Shi etc)

6.3. Πλεονεκτήματα της RCA

RCA παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα που την καθιστούν ιδιαίτερα ελκυστική στη σύγχρονη μοριακή διάγνωση. Ένα από τα σημαντικότερα είναι η εξαιρετικά υψηλή ειδικότητα, κυρίως όταν χρησιμοποιούνται κυκλικοποιούμενοι ανιχνευτές τύπου padlock probe. Η ανάγκη επιτυχούς υβριδοποίησης και σωστής κυκλικοποίησης πριν από την έναρξη της αντίδρασης μειώνει σημαντικά την πιθανότητα μη ειδικών σημάτων και αυξάνει τη διακριτική ικανότητα της τεχνικής ακόμη και σε περιπτώσεις μικρών διαφορών αλληλουχίας. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι πολύ σημαντικό στην ανίχνευση παθογόνων, όπου η διάκριση συγγενών μικροοργανισμών ή στελεχών μπορεί να έχει ουσιαστική διαγνωστική αξία. (30, 31, 33)

Ένα δεύτερο σημαντικό πλεονέκτημα της RCA είναι η μεγάλη ενίσχυση σήματος που μπορεί να προσφέρει. Αν και η βασική αντίδραση θεωρείται συχνά γραμμική σε σχέση με άλλες εκθετικές τεχνικές, η παραγωγή πολύ μακρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και η δυνατότητα περαιτέρω ενίσχυσης του παραγόμενου προϊόντος προσφέρουν πολύ υψηλή αναλυτική ευαισθησία. Για τον λόγο αυτό, η RCA έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε εφαρμογές βιοαισθητήρων, όπου το ζητούμενο δεν είναι μόνο η ενίσχυση του γενετικού στόχου αλλά και η ισχυρή μετατροπή του μοριακού γεγονότος αναγνώρισης σε μετρήσιμο σήμα. Σε πολλές περιπτώσεις, η μέθοδος έχει επιτύχει ανίχνευση σε πολύ χαμηλά επίπεδα, ακόμη και σε φεμτομοριακή κλίμακα, στοιχείο που υπογραμμίζει τη διαγνωστική της ισχύ. (30, 31)

Επιπλέον, η RCA λειτουργεί σε σταθερή θερμοκρασία, γεγονός που απλοποιεί την απαιτούμενη υποδομή και διευκολύνει την ενσωμάτωσή της σε φορητά ή ημι-φορητά αναλυτικά συστήματα. Αν και η μέθοδος δεν είναι πάντοτε τόσο γρήγορη όσο η RPA, η ισοθερμική της φύση την καθιστά

πιο συμβατή με point-of-care λογικές σε σχέση με την PCR, ειδικά όταν συνδυάζεται με απλές πλατφόρμες ανάγνωσης. Η προσαρμοστικότητα της σε ηλεκτροχημικές, φθορισμομετρικές, οπτικές και χρωματομετρικές προσεγγίσεις ενισχύει περαιτέρω την πρακτική της αξία. Έτσι, η RCA μπορεί να θεωρηθεί τεχνολογία-γέφυρα ανάμεσα στην κλασική μοριακή ενίσχυση και στα σύγχρονα ευφυή βιοαισθητήρια. (31)

6.4. Εφαρμογές της RCA στην ανίχνευση παθογόνων

Η RCA έχει χρησιμοποιηθεί σε ευρύ φάσμα εφαρμογών για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ιών και άλλων γενετικών στόχων σχετικών με τη δημόσια υγεία. Η υψηλή ευαισθησία και η εξειδίκευσή της την καθιστούν ιδιαίτερα κατάλληλη για περιπτώσεις όπου απαιτείται χαμηλό όριο ανίχνευσης και αξιόπιστη διάκριση στόχων, ιδίως σε βιοαισθητήρες και ολοκληρωμένες διαγνωστικές πλατφόρμες. Στη βιβλιογραφία έχουν παρουσιαστεί εφαρμογές της RCA για ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων μέσω 16S rDNA και άλλων ειδικών γενετικών δεικτών, συχνά σε συνδυασμό με επιφανειακό πλασμονικό συντονισμό, ηλεκτροχημικά σήματα ή άλλες τεχνικές ανάγνωσης. Οι προσεγγίσεις αυτές αναδεικνύουν την αξία της RCA ως πλατφόρμας ενίσχυσης σήματος για ανίχνευση παθογόνων σε σύνθετα βιολογικά και περιβαλλοντικά δείγματα. (30, 33)

Αν και η RCA δεν εμφανίζεται τόσο συχνά όσο η LAMP ή η RPA σε κλασικές εφαρμογές επιτόπιας ανίχνευσης νερού, διαθέτει ιδιαίτερες δυνατότητες στον τομέα των προηγμένων αισθητήρων για υδατογενείς παθογόνους στόχους. Η σημασία της για τη δική σου διπλωματική έγκειται στο ότι αντιπροσωπεύει μια διαφορετική φιλοσοφία ισοθερμικής ενίσχυσης: λιγότερο προσανατολισμένη στη γρήγορη απλή ενίσχυση τύπου point-of-care και περισσότερο στη δημιουργία εξαιρετικά ενισχυμένου και εξειδικευμένου σήματος, κατάλληλου για βιοαισθητηριακές εφαρμογές υψηλής απόδοσης. Αυτό σημαίνει ότι η RCA μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν η έμφαση δίνεται όχι μόνο στην παρουσία ή απουσία του στόχου, αλλά και στη βελτιστοποίηση της αναλυτικής πλατφόρμας ως προς την εξειδίκευση και την ποιότητα του σήματος. (4, 30)

Επιπλέον, οι σύγχρονες τάσεις δείχνουν ότι η RCA ενσωματώνεται όλο και περισσότερο σε σύνθετα διαγνωστικά σχήματα, όπως υβριδικά συστήματα με CRISPR/Cas, ηλεκτροχημικά chips και πολυπαραμετρικά biosensors. Μέσα από αυτές τις τεχνολογικές συνδέσεις, η μέθοδος αποκτά μεγαλύτερη λειτουργικότητα και μεταβαίνει από απλή εργαστηριακή τεχνική σε βασικό εργαλείο ανάπτυξης “έξυπνων” διαγνωστικών συστημάτων. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για μια διπλωματική που εστιάζει όχι μόνο στην υπάρχουσα κατάσταση των τεχνικών, αλλά και στις μελλοντικές τους προοπτικές στον χώρο της ανίχνευσης παθογόνων στο νερό. (30, 34)

6.5. Περιορισμοί και τεχνικές προκλήσεις της RCA

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματά της, η RCA εμφανίζει και ορισμένους περιορισμούς που πρέπει να αναγνωρίζονται στο πλαίσιο μιας συγκριτικής αξιολόγησης. Ένα από τα βασικά ζητήματα αφορά την ανάγκη δημιουργίας ή αναγνώρισης κυκλικού προτύπου, η οποία προσθέτει ένα επιπλέον στάδιο στη διαδικασία και μπορεί να αυξήσει την πολυπλοκότητα του πρωτοκόλλου. Σε αντίθεση με τεχνικές όπως η RPA ή η LAMP, οι οποίες συχνά λειτουργούν πιο άμεσα πάνω στο γραμμικό γενετικό υλικό του στόχου, η RCA βασίζεται έντονα σε σωστά σχεδιασμένους ανιχνευτές και, σε πολλές περιπτώσεις, σε επιτυχή κυκλοποίηση του μορίου πριν αρχίσει η ενίσχυση. Αυτό αυξάνει τη θεωρητική ειδικότητα, αλλά παράλληλα μπορεί να καταστήσει τη μέθοδο λιγότερο απλή στην πρακτική εφαρμογή. (30)

Ένα δεύτερο ζήτημα είναι ότι η RCA, αν και πολύ ισχυρή ως προς την ενίσχυση σήματος, δεν είναι πάντοτε η ταχύτερη ισοθερμική μέθοδος όταν συγκρίνεται με τεχνικές όπως η RPA. Σε εφαρμογές όπου η ταχύτητα είναι η κυρίαρχη απαίτηση, το πλεονέκτημα της RCA μπορεί να είναι μικρότερο, ιδιαίτερα αν ληφθούν υπόψη τα επιπλέον βήματα προετοιμασίας ή αν η τεχνική απαιτεί συνδυασμό με ανιχνευτές και εξειδικευμένες πλατφόρμες ανάγνωσης. Για τον λόγο αυτό, η RCA είναι συχνά περισσότερο κατάλληλη για υψηλής ευαισθησίας βιοαισθητήρες και λιγότερο για τις πιο απλές, άμεσες και “γυμνές” εφαρμογές πεδίου. (23)

Επιπλέον, όπως και άλλες μοριακές μέθοδοι, η RCA εξαρτάται από την ποιότητα του δείγματος και από την αποτελεσματική προεπεξεργασία του γενετικού υλικού. Σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού, όπου η συγκέντρωση του στόχου μπορεί να είναι χαμηλή και η παρουσία ανασταλτικών

ουσιών συχνή, η συνολική αναλυτική απόδοση της τεχνικής δεν καθορίζεται μόνο από τον μηχανισμό της RCA αλλά και από την αποδοτικότητα των σταδίων συλλογής, συγκέντρωσης και εκχύλισης. Επομένως, η εφαρμογή της σε πραγματικά δείγματα απαιτεί καλά σχεδιασμένο συνολικό πρωτόκολλο και όχι μόνο ισχυρό στάδιο ενίσχυσης. (4, 35)

6.6. Θέση της RCA στη συγκριτική αξιολόγηση της εργασίας

Η RCA κατέχει ιδιαίτερη θέση μεταξύ των ισοθερμικών τεχνικών, επειδή διαφέρει ουσιαστικά από τις υπόλοιπες ως προς τη φιλοσοφία της ενίσχυσης και τον τρόπο με τον οποίο ενσωματώνεται σε διαγνωστικά συστήματα. Ενώ τεχνικές όπως η HDA και η RPA προσεγγίζουν περισσότερο τη λογική της άμεσης γρήγορης ενίσχυσης, η RCA εστιάζει περισσότερο στην παραγωγή ισχυρού, υψηλής ειδικότητας σήματος, συχνά σε συνδυασμό με ανιχνευτές και βιοαισθητήρες. Αυτό σημαίνει ότι η RCA δεν πρέπει να αξιολογείται μόνο με βάση το αν είναι “γρηγορότερη” ή “απλούστερη”, αλλά με βάση το αν εξυπηρετεί καλύτερα εφαρμογές όπου η ακρίβεια, η ενίσχυση σήματος και η ενσωμάτωση σε σύνθετες διαγνωστικές πλατφόρμες είναι πιο σημαντικές από την απόλυτη ταχύτητα. (30,31)

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η RCA προσφέρει μια χρήσιμη αντιπαραβολή προς τις υπόλοιπες ισοθερμικές τεχνικές, διότι αναδεικνύει ότι η “καταλληλότητα” μιας μεθόδου δεν είναι ενιαία έννοια αλλά εξαρτάται από το εφαρμοστικό σενάριο. Για εφαρμογές ρουτίνας και άμεσης επιτόπιας ανίχνευσης, ίσως άλλες τεχνικές να εμφανίζονται πιο πρακτικές. Για εφαρμογές όμως που απαιτούν πολύ υψηλή ειδικότητα, ενίσχυση σήματος και διασύνδεση με προηγμένες πλατφόρμες biosensing, η RCA διαθέτει ιδιαίτερα ισχυρά πλεονεκτήματα. Επομένως, η RCA δεν θα πρέπει να θεωρείται απλώς μια “εναλλακτική” μέθοδος, αλλά μια ξεχωριστή τεχνολογική κατηγορία με ειδικό ρόλο στο τοπίο της σύγχρονης ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών. (30, 31)

7. Cross – Priming Amplification (CPA)

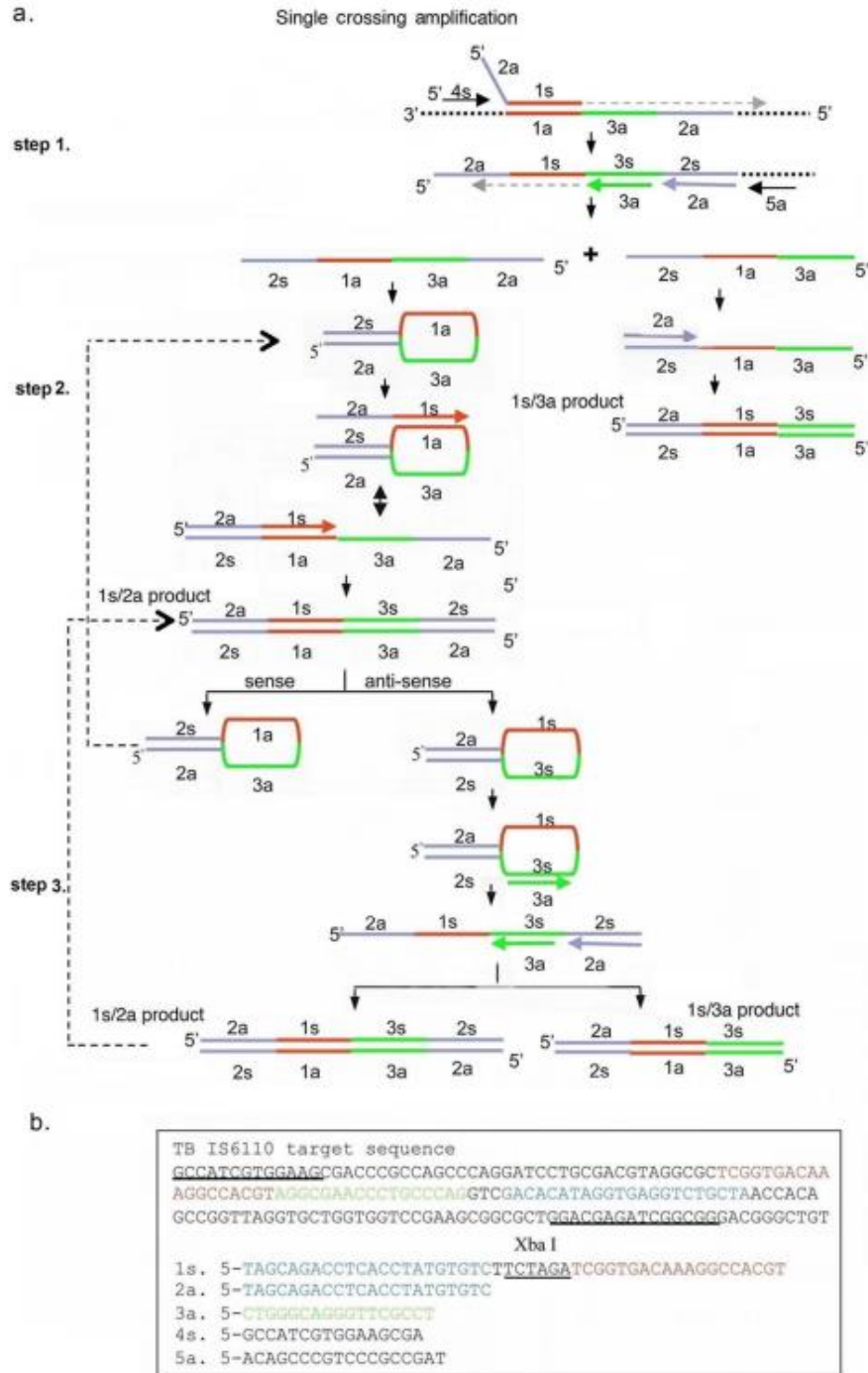
7.1. Εισαγωγή στη μέθοδο CPA

Η Cross-Priming Amplification (CPA) αποτελεί μία ισοθερμική τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων που αναπτύχθηκε ως εναλλακτική λύση έναντι της κλασικής PCR, με στόχο την επίτευξη υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας χωρίς την ανάγκη θερμικού κυκλισμού. Η μέθοδος ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των ισοθερμικών τεχνολογιών που επιδιώκουν να διατηρήσουν την αναλυτική ισχύ των μοριακών μεθόδων ενώ παράλληλα απλοποιούν τις απαιτήσεις σε εξοπλισμό, χρόνο και λειτουργικό περιβάλλον. Η CPA παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον επειδή βασίζεται σε έναν ειδικό σχεδιασμό πολλαπλών εκκινητών, μέσω του οποίου επιτυγχάνεται ταχεία και εκθετική ενίσχυση του στόχου σε σταθερή θερμοκρασία, χωρίς να απαιτείται ξεχωριστό στάδιο αρχικής αποδιάταξης ή πρόσθετο nicking enzyme. (36, 37)

Η σημασία της CPA στη σύγχρονη μοριακή διάγνωση σχετίζεται κυρίως με την προσπάθεια ανάπτυξης τεχνικών που να μπορούν να εφαρμοστούν σε συνθήκες point-of-care ή point-of-need. Σε περιβάλλοντα όπου η διαθεσιμότητα θερμοκυκλοποιητή, εξειδικευμένου προσωπικού ή σύνθετης υποδομής είναι περιορισμένη, μια ισοθερμική μέθοδος που μπορεί να λειτουργήσει με απλό θερμαντικό μέσο και να δώσει γρήγορο αποτέλεσμα αποκτά ιδιαίτερη πρακτική αξία. Για την ανίχνευση παθογόνων στο νερό, η προοπτική αυτή είναι σημαντική, διότι οι τεχνολογίες που απαιτούν ελάχιστο εξοπλισμό και προσφέρουν γρήγορη απόκριση είναι περισσότερο κατάλληλες για αποκεντρωμένη περιβαλλοντική επιτήρηση και για εφαρμογές που συνδέονται με άμεση λήψη αποφάσεων. (38, 39)

7.2. Μηχανισμός λειτουργίας της CPA

Ο μηχανισμός της CPA βασίζεται στη χρήση DNA πολυμεράσης με ικανότητα μετατόπισης κλώνου και ενός συστήματος πολλαπλών εκκινητών που δρουν συνεργιστικά ώστε να επιτευχθεί εκθετική ενίσχυση του στόχου. Σε αντίθεση με την PCR, όπου η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA επιτυγχάνεται θερμικά, η CPA εκμεταλλεύεται τη δημιουργία παροδικών περιοχών αποδιάταξης στο μόριο-στόχο και την υψηλή συγκέντρωση εκκινητών, ώστε να ευνοείται η πρόσδεση τους πριν από την επανασύζευξη των δύο κλώνων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται συνήθως γύρω στους 63°C, θερμοκρασία στην οποία η ισορροπία μεταξύ τοπικής αποδιάταξης και υβριδοποίησης επιτρέπει την έναρξη της ενίσχυσης. (36)



Εικόνα 7.1. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού cross-priming amplification (CPA) και του σχεδιασμού των εκκινήτων. (Xu etc)

Κεντρικό στοιχείο της μεθόδου είναι οι λεγόμενοι cross primers, οι οποίοι διαθέτουν 5' άκρα που δεν είναι πλήρως συμπληρωματικά προς το αρχικό πρότυπο και συμβάλλουν στη δημιουργία δομών που διευκολύνουν τη μετατόπιση κλώνου και την έναρξη νέων γεγονότων ενίσχυσης. Παράλληλα, επιπλέον εκκινητές πρόσδεσης και μετατόπισης δρουν σε γειτονικές περιοχές του στόχου, δημιουργώντας ένα σύνθετο αλλά αποδοτικό σύστημα αλληλοτροφοδοτούμενης ενίσχυσης. Το αποτέλεσμα είναι η ταχεία συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων προϊόντος, χωρίς να απαιτούνται οι επαναλαμβανόμενοι θερμικοί κύκλοι της PCR και χωρίς την ανάγκη για θερμοκυκλοποιητή. (39)

Η πολυπλοκότητα του μηχανισμού της CPA είναι, ωστόσο, και ένα από τα στοιχεία που απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή κατά τον σχεδιασμό της μεθόδου. Επειδή η αντίδραση βασίζεται στην ακριβή συνεργασία αρκετών εκκινητών, η επιτυχία της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σωστή επιλογή των αλληλουχιών, τη θερμοδυναμική τους συμβατότητα και την αποφυγή ανεπιθύμητων δευτεροταγών δομών ή μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Με άλλα λόγια, η CPA μπορεί να είναι ιδιαίτερα αποδοτική όταν έχει βελτιστοποιηθεί σωστά, αλλά ο σχεδιασμός της δεν είναι πάντοτε απλός. (36)

7.3. Πλεονεκτήματα της CPA

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της CPA είναι ότι επιτρέπει ισοθερμική ενίσχυση με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, χωρίς να απαιτείται θερμοκυκλοποιητής. Το χαρακτηριστικό αυτό μειώνει τις τεχνικές απαιτήσεις της μεθόδου και ενισχύει την προοπτική εφαρμογής της σε αποκεντρωμένα ή χαμηλής υποδομής περιβάλλοντα, όπου η χρήση κλασικών μοριακών τεχνικών είναι συχνά δυσχερής. Επιπλέον, η CPA μπορεί να ολοκληρωθεί σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, συνήθως εντός περίπου μίας ώρας, γεγονός που την καθιστά σημαντικά ταχύτερη από τις καλλιεργητικές τεχνικές και λειτουργικά ανταγωνιστική έναντι άλλων μοριακών προσεγγίσεων. (36, 38)

Ένα δεύτερο σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα συνδυασμού της με απλές τελικές μορφές ανίχνευσης, όπως *nucleic acid detection strips*, *lateral flow biosensors* ή άλλες οπτικές αναγνώσεις. Η ιδιότητα αυτή αυξάνει σημαντικά την πρακτική της αξία, καθώς επιτρέπει

η ανίχνευση του προϊόντος να γίνεται χωρίς σύνθετα όργανα ανάγνωσης και χωρίς ιδιαίτερα πολύπλοκη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Σε αρκετές εφαρμογές, η δυνατότητα αυτή έχει καταστήσει την CPA ιδιαίτερα ελκυστική για χρήσεις γρήγορου προσυμπτωματικού ή επιτόπιου ελέγχου. (36, 38)

Επιπλέον, η CPA έχει δείξει ικανοποιητική έως υψηλή αναλυτική ευαισθησία σε διάφορα παθογόνα. Για παράδειγμα, σε εφαρμογές ανίχνευσης *Salmonella enterica serovar Indiana* έχει αναφερθεί όριο ανίχνευσης 8.997 fg/μL για γονιδιωματικό DNA και 6.2×10^1 CFU/mL σε καθαρή καλλιέργεια. Αντίστοιχα, για *Listeria monocytogenes* έχει αναφερθεί ότι ορισμένες παραλλαγές CPA ήταν περίπου 10 φορές πιο ευαίσθητες από την PCR. Τα αποτελέσματα αυτά δεν σημαίνουν ότι η CPA υπερέχει σε κάθε περίπτωση όλων των άλλων τεχνικών, αλλά δείχνουν ότι διαθέτει ισχυρό αναλυτικό δυναμικό και μπορεί να λειτουργήσει αποτελεσματικά ως διαγνωστικό εργαλείο όταν σχεδιαστεί σωστά. (39, 40)

7.4. Εφαρμογές της CPA στην ανίχνευση παθογόνων

Η CPA έχει εφαρμοστεί σε σημαντικό εύρος παθογόνων μικροοργανισμών και σε διαφορετικά διαγνωστικά πεδία, από την κλινική μικροβιολογία έως την ασφάλεια τροφίμων και τη δημόσια υγεία. Στη βιβλιογραφία έχουν παρουσιαστεί επιτυχείς εφαρμογές για την ανίχνευση *Chlamydia trachomatis* και *Neisseria gonorrhoeae*, όπου η μέθοδος χαρακτηρίστηκε ως οικονομικά προσιτή, προσβάσιμη και με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Αντίστοιχα, έχουν περιγραφεί εφαρμογές για *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* και άλλους σημαντικούς μικροβιακούς στόχους, συχνά σε συνδυασμό με απλά strips ανίχνευσης. Οι εφαρμογές αυτές υπογραμμίζουν την ευελιξία της CPA ως πλατφόρμας μοριακής ανίχνευσης. (37, 39, 40)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη δική σου εργασία παρουσιάζει η εφαρμογή της CPA σε παθογόνους μικροοργανισμούς σχετικούς με το νερό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανίχνευση *Vibrio cholerae* με ισοθερμική CPA συνδυασμένη με *nucleic acid detection strip*, όπου χρησιμοποιήθηκαν πέντε έως έξι εκκινητές για ενίσχυση της ευαισθησίας και ειδικότητας μέσα σε περίπου μία ώρα. Η περίπτωση αυτή είναι ιδιαίτερος σημαντική, διότι ο *V. cholerae* αποτελεί κλασικό υδατογενές παθογόνο με μεγάλη σημασία για τη δημόσια υγεία, και η χρήση της CPA σε

τέτοιο στόχο δείχνει ότι η μέθοδος μπορεί να βρει εφαρμογή και στον τομέα της υδρολογικής επιτήρησης. Με βάση αυτό, η CPA μπορεί να θεωρηθεί τεχνική με πραγματική, και όχι μόνο θεωρητική, προοπτική για την ανίχνευση υδατογενών παθογόνων. (32, 41)

Επιπλέον, η ενσωμάτωση της CPA σε biosensors και κλειστά συστήματα αντίδρασης έχει βοηθήσει στην αντιμετώπιση προβλημάτων επιμόλυνσης και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Σε μελέτη για *Klebsiella pneumoniae*, η συνδυασμένη χρήση CPA με nanoparticles-based biosensor και θερμοευαίσθητη uracil-DNA-glycosylase πραγματοποιήθηκε σε one-pot και closed-vessel σύστημα, μειώνοντας τον κίνδυνο carryover contamination και ολοκληρώνοντας τη διαδικασία σε περίπου 1.5 ώρα. Αυτές οι εφαρμογές είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη μετάβαση της CPA από το ερευνητικό εργαστήριο σε πιο ρεαλιστικές εφαρμογές πεδίου. (38)

7.5. Περιορισμοί και τεχνικές προκλήσεις της CPA

Παρά τα πλεονεκτήματά της, η CPA παρουσιάζει και ορισμένους ουσιώδεις περιορισμούς. Ο σημαντικότερος από αυτούς σχετίζεται με την πολυπλοκότητα του σχεδιασμού των εκκινήτων. Σε αντίθεση με πιο “απλές” μοριακές τεχνικές, η CPA απαιτεί πολλαπλούς εκκινήτες με ακριβή λειτουργική αλληλεπίδραση, γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο λανθασμένων σχεδιασμών, μη ειδικών προϊόντων ή ανεπιθύμητων δευτεροταγών δομών. Η απαίτηση αυτή σημαίνει ότι η ανάπτυξη ενός νέου CPA assay δεν είναι πάντοτε εύκολη και συχνά απαιτεί σημαντική πειραματική βελτιστοποίηση. (36, 37, 39)

1 ATGGACAACA CCGTGCGTGT TGGAGTTTCC CGCAACACAT CCGGCGCAGC TGGTCAGACA
61 CTCTTTAGAA ACTTCTATTT ACTACGATGT AATATTTTCAG CTGATGGCCG TAATGCAACG
121 AAGGCGGTAC AATCCCACTT TCCATTCTTT TACGTGCTG TGCATGCCT ATCGCCTCTT
181 GCCGCTCACT GTGCTGATAG AACCCCTCGC CGTGACAACG TGAAACAGAT TCTTACTCGT
241 GAACTGCCAT TTTCCCTCGGA TCTAATCAAC TACGCACACC ATGTCAATTC ATCATCCCTT

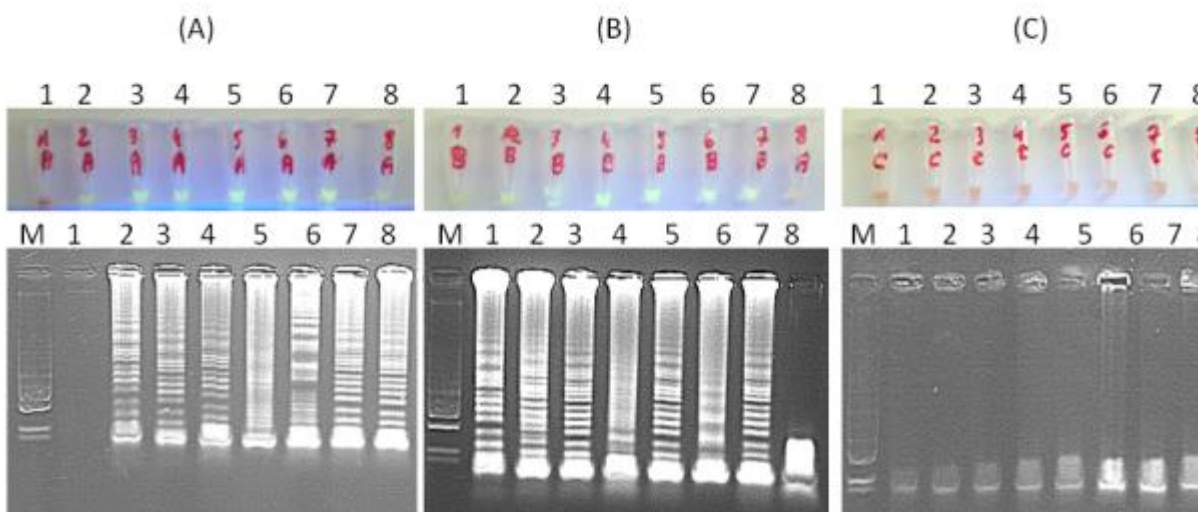
1s- ATCGCCTCTTGCCGCTCACTGT TTTTATGGCAGTTCACGAGTAAGA

2a- ATCGCCTCTTGCCGCTCACTGT

3a- CGTGACAACG TGAAACAGAT

4s- GTTGATTAGATCCGAGGAAA

5a- ATCCCACTTTCCATTCTTTG



Εικόνα 7.2. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης των εκκινητών της τεχνικής Cross-Priming Amplification (CPA) στην αλληλουχία-στόχο και ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων ενίσχυσης που προέκυψαν από διαφορετικούς συνδυασμούς εκκινητών (A–C). (Woźniakowski et al)

Ένα δεύτερο ζήτημα αφορά την περιορισμένη ακόμη διάδοση της μεθόδου σε σύγκριση με τεχνικές όπως η LAMP ή η RPA. Παρότι υπάρχουν αρκετές ενθαρρυντικές δημοσιεύσεις, η CPA

δεν έχει ακόμη αποκτήσει το ίδιο εύρος εμπορικών εφαρμογών, την ίδια τυποποίηση πρωτοκόλλων ή το ίδιο επίπεδο βιβλιογραφικής ωριμότητας. Αυτό δεν μειώνει την αξία της, αλλά σημαίνει ότι η συγκριτική της αξιολόγηση πρέπει να γίνεται με προσοχή και με επίγνωση ότι η τεχνολογία βρίσκεται σε λιγότερο ώριμο στάδιο εφαρμοσμένης διάδοσης. (37)

Επιπλέον, όπως όλες οι μοριακές τεχνικές που εφαρμόζονται σε περιβαλλοντικά δείγματα, η CPA επηρεάζεται από την ποιότητα του δείγματος και από την αποτελεσματικότητα των σταδίων προεπεξεργασίας. Στο νερό, όπου το γενετικό υλικό μπορεί να βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση και να συνοδεύεται από ανασταλτικές ουσίες ή πολύπλοκο μικροβιακό υπόβαθρο, η τελική απόδοση της αντίδρασης δεν εξαρτάται μόνο από τον μηχανισμό ενίσχυσης αλλά και από τη συγκέντρωση, την εκχύλιση και τον καθαρισμό του δείγματος. Για τον λόγο αυτό, η επιτυχής εφαρμογή της CPA σε πραγματικές υδατικές μήτρες απαιτεί ολιστική προσέγγιση του διαγνωστικού workflow και όχι αποσπασματική αξιολόγηση μόνο της ενίσχυσης. (37)

7.6. Θέση της CPA στη συγκριτική αξιολόγηση της εργασίας

Η CPA καταλαμβάνει ιδιαίτερη θέση στη συγκριτική αξιολόγηση των ισοθερμικών τεχνικών, επειδή αποτελεί μέθοδο που ισορροπεί ανάμεσα στην ευαισθησία, στην ειδικότητα, στην απλότητα εξοπλισμού και στη λειτουργική ευελιξία. Δεν είναι απαραίτητα η πιο απλή τεχνική ως προς τον σχεδιασμό των εκκινήτων, ούτε η περισσότερο διαδεδομένη, διαθέτει όμως χαρακτηριστικά που την καθιστούν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα για εφαρμογές όπου ζητούμενο είναι η σχετικά γρήγορη, φθηνή και ισοθερμική ανίχνευση με δυνατότητα οπτικής ή strip-based ανάγνωσης. Με αυτή την έννοια, η CPA μπορεί να θεωρηθεί ως μια ενδιάμεση αλλά ουσιαστική τεχνολογική επιλογή ανάμεσα στις απλούστερες και στις πιο τεχνολογικά ώριμες ισοθερμικές πλατφόρμες. (37, 38, 39)

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η CPA έχει ιδιαίτερη σημασία επειδή εμπλουτίζει τη συγκριτική θεώρηση των ισοθερμικών τεχνικών και δείχνει ότι η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου εξαρτάται από το εφαρμοστικό πλαίσιο. Για παράδειγμα, σε εφαρμογές όπου ζητείται γρήγορη επιτόπια ανάγνωση με σχετικά απλό εξοπλισμό, η CPA μπορεί να εμφανίζεται ιδιαίτερα ανταγωνιστική. Αντίθετα, σε περιπτώσεις όπου η ευρεία εμπορική διαθεσιμότητα, η απόλυτη τυποποίηση ή η μέγιστη βιβλιογραφική ωριμότητα αποτελούν πρωτεύοντα ζητούμενα, άλλες μέθοδοι ίσως υπερέχουν. Επομένως, η CPA αποτελεί σημαντική

αλλά όχι μονοσήμαντη επιλογή μέσα στο ευρύτερο φάσμα των ισοθερμικών τεχνικών. (37, 38, 39)

8. Nucleic Acid Sequence – Based Amplification (NASBA)

8.1. Εισαγωγή στη μέθοδο NASBA

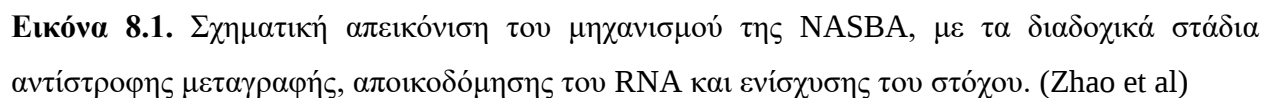
Η Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ισοθερμικές μεθόδους ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, με ιδιαίτερο χαρακτηριστικό ότι έχει σχεδιαστεί κυρίως για την ενίσχυση RNA στόχων. Σε αντίθεση με πολλές άλλες ισοθερμικές τεχνικές που στοχεύουν πρωτίστως DNA, η NASBA εστιάζει στη μοριακή ανίχνευση μέσω RNA, γεγονός που της προσδίδει ιδιαίτερη σημασία για την ανίχνευση RNA ιών, μεταγραφικά ενεργών μικροοργανισμών και βιολογικών δεικτών που συνδέονται με τη βιωσιμότητα των παθογόνων. Η δυνατότητα αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική στο πεδίο της περιβαλλοντικής μικροβιολογίας, καθώς το RNA μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να προσφέρει πιο λειτουργική εικόνα της βιολογικής δραστηριότητας ενός μικροοργανισμού σε σχέση με το DNA. (42,43)

Η NASBA αναπτύχθηκε ως ισοθερμική εναλλακτική προς τις τεχνικές ενίσχυσης που απαιτούν θερμικό κυκλισμό και βασίζεται σε ενζυμικό σύστημα πολλαπλών σταδίων που επιτρέπει συνεχή παραγωγή RNA αμπλικονίων σε σταθερή θερμοκρασία, συνήθως γύρω στους 41°C. Η θερμοκρασιακή αυτή σταθερότητα και η ισχυρή ικανότητα ενίσχυσης RNA καθιστούν τη μέθοδο ιδιαίτερα ελκυστική για εφαρμογές όπου επιδιώκεται γρήγορη και ευαίσθητη ανίχνευση χωρίς πολύπλοκο εξοπλισμό. Για τον λόγο αυτό, η NASBA έχει βρει εφαρμογές σε κλινική διάγνωση, σε ανίχνευση τροφιμογενών και περιβαλλοντικών παθογόνων, αλλά και σε εξελιγμένα lab-on-a-chip συστήματα για υδατογενείς μικροοργανισμούς. (42,43,44)

8.2. Μηχανισμός λειτουργίας της NASBA

Ο μηχανισμός της NASBA βασίζεται στη συνεργασία τριών βασικών ενζύμων: της αντίστροφης μεταγραφάσης, της RNase H και της T7 RNA polymerase. Αρχικά, ένας εκκινητής που φέρει αλληλουχία υποκινητή της T7 RNA polymerase υβριδοποιείται με τον RNA στόχο και η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει το πρώτο συμπληρωματικό cDNA. Στη συνέχεια, η RNase H αποικοδομεί το RNA τμήμα του RNA-DNA υβριδίου και επιτρέπει σε δεύτερο εκκινητή να προσδεθεί στο cDNA, ώστε να συντεθεί και η δεύτερη αλυσίδα DNA. Το διπλόκλωνο αυτό DNA πλέον περιέχει λειτουργικό T7 promoter και χρησιμοποιείται από την T7 RNA polymerase για την παραγωγή μεγάλου αριθμού νέων RNA μορίων, τα οποία μπορούν να επανεισέλθουν στον ίδιο κύκλο, οδηγώντας σε έντονη ενίσχυση. (42,43)

Ο μηχανισμός αυτός διαφοροποιεί ουσιαστικά τη NASBA από τις περισσότερες άλλες ισοθερμικές μεθόδους, διότι το τελικό κύριο προϊόν είναι RNA και όχι DNA. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο όταν ο στόχος της ανάλυσης είναι RNA ιών ή όταν ζητείται ανίχνευση μοριακών δεικτών που σχετίζονται με ενεργό μεταβολική κατάσταση ή βιωσιμότητα. Από τεχνική άποψη, η NASBA είναι πιο σύνθετη από άλλες ισοθερμικές τεχνικές, καθώς απαιτεί σταθερή λειτουργία πολλών ενζύμων και αποτελεσματικό συγχρονισμό των διαδοχικών σταδίων της αντίδρασης. (42,43)



8.3. Πλεονεκτήματα της NASBA

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της NASBA είναι η εξειδίκευσή της στην ενίσχυση RNA στόχων. Αυτό την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανίχνευση RNA ιών, αλλά και για την παρακολούθηση μικροοργανισμών των οποίων η βιολογική δραστηριότητα ή βιωσιμότητα μπορεί να αποτυπωθεί καλύτερα μέσω RNA δεικτών παρά μέσω σταθερού γονιδιωματικού DNA. Σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπου το ερώτημα δεν είναι μόνο αν υπήρξε παρουσία ενός μικροοργανισμού αλλά και αν αυτός είναι δυνητικά ενεργός ή βιώσιμος, η ιδιότητα αυτή αποκτά ιδιαίτερη σημασία.(42,43)

Επιπλέον, η NASBA χαρακτηρίζεται από μικρό χρόνο αντίδρασης, υψηλή αναλυτική ευαισθησία και λειτουργεί σε σχετικά χαμηλή και σταθερή θερμοκρασία. Στη βιβλιογραφία έχει υποστηριχθεί ότι η μέθοδος δεν επηρεάζεται τόσο έντονα από ανασταλτικές ουσίες που συχνά αφθονούν στα περιβαλλοντικά δείγματα, στοιχείο που θεωρείται σημαντικό πλεονέκτημα για αναλύσεις νερού και άλλων σύνθετων μητρών. Η δυνατότητα αυτή καθιστά τη NASBA ιδιαίτερα ελκυστική για εφαρμογές περιβαλλοντικής επιτήρησης, όπου η καθαρότητα του δείγματος σπάνια είναι ιδανική.(42,43)

Ένα ακόμη σημαντικό πλεονέκτημα είναι η συμβατότητα της NASBA με εξελιγμένες πλατφόρμες ανίχνευσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί lab-on-a-chip immuno-NASBA σύστημα για ποσοτική και ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών υδατογενών παθογόνων, το οποίο έχει σχεδιαστεί ώστε να είναι συμβατό με κοινούς microplate readers. Η ύπαρξη τέτοιων εφαρμογών δείχνει ότι η NASBA δεν περιορίζεται σε αμιγώς θεωρητικό επίπεδο, αλλά μπορεί να ενσωματωθεί σε πολυπαραμετρικά, πρακτικά και τεχνολογικά ώριμα διαγνωστικά συστήματα.(43,44)

8.4. Εφαρμογές της NASBA στην ανίχνευση παθογόνων στο νερό

Η NASBA έχει εφαρμοστεί για την ανίχνευση ποικίλων μικροβιακών στόχων σε τρόφιμα, περιβαλλοντικά δείγματα και υδατικές μήτρες. Ήδη από πρώιμες εφαρμογές της, είχε αναφερθεί η χρήση της για *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica serovar Enteritidis* και *Cryptosporidium parvum* στο νερό, γεγονός που επιβεβαιώνει την περιβαλλοντική της σημασία. Οι εφαρμογές αυτές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τη δική σου διπλωματική, καθώς δείχνουν ότι η NASBA έχει πραγματικό ιστορικό χρήσης σε περιβαλλοντικούς και υδατογενείς στόχους, και δεν αποτελεί απλώς θεωρητικά ενδιαφέροντα τεχνική. (42,43)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η χρήση της NASBA σε συστήματα lab-on-a-chip για ποσοτική και ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών υδατογενών παθογόνων. Η προσέγγιση αυτή συνδέει τη μέθοδο όχι μόνο με την απλή ενίσχυση RNA αλλά και με τη σύγχρονη τάση προς ολοκληρωμένες, φορητές ή ημι-φορητές διαγνωστικές πλατφόρμες. Για τον λόγο αυτό, η NASBA κατέχει σημαντική θέση στη συζήτηση γύρω από τις τεχνολογίες που μπορούν να στηρίξουν μελλοντικά συστήματα ταχείας περιβαλλοντικής επιτήρησης και έγκαιρης προειδοποίησης. (43,44)

Πίνακας 8.1. Εφαρμογές της NASBA για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα και περιβαλλοντικά δείγματα, με αναφορά στο στόχο, το είδος δείγματος, τη μέθοδο ανάγνωσης και το όριο ανίχνευσης. (Cook et al)

NASBA-based methods reported for detection of pathogenic microorganisms in food and environmental samples					
Target	Matrix	Isolation procedure	Amplicon detection	Detection limit	Reference
<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> (16S rRNA)	poultry products	SE	ELGA	< 10 cfu/10 g	Uyttendaele et al. (1995a)
<i>C. jejuni</i> (16S rRNA)	poultry products	SE	ELGA	naturally contaminated (10 g)	Uyttendaele et al. (1995b)
<i>L. monocytogenes</i> (16S rRNA)	poultry products, meat products, seafood, vegetables, dairy products	SE	ELGA	< 10 cfu/25 g	Uyttendaele et al. (1995c)
<i>C. jejuni</i> (16S rRNA)	poultry products	SE	ELGA	naturally contaminated (10 g)	Uyttendaele et al. (1996)
<i>L. monocytogenes</i> (hlyA mRNA)	egg products, dairy products	SE	colorimetric probe hybridization	< 10 cfu/60 g	Blais et al. (1997)
<i>C. jejuni</i> (16S rRNA)	poultry products	direct detection	ELGA	< 10 ⁵ cfu/10 g	Uyttendaele et al. (1997)
<i>C. jejuni</i> (16S rRNA)	poultry products, meat products, dairy products	buoyant density separation	ELGA	5 × 10 ² –5 × 10 ⁴ cfu/20 g	Uyttendaele et al. (1999)
<i>C. parvum</i> (hsp70 mRNA)	water	filtration/IMS	ECL	50 oocysts/100 l	Baemmer et al. (2001)
Hepatitis A virus (VP2 gene)	blueberries, lettuce	elution	probe hybridization/ dot-blot		Jean et al. (2001)
<i>E. coli</i> (clpB mRNA)	wastewater	direct detection	ECL	40 cfu/ml	Min and Baemmer (2002)
Rotavirus (Gene 9)	water	–			
<i>S. enterica</i> ser. <i>Enteritidis</i> (dnaK mRNA)	sewage	direct detection	ELISA		Jean et al. (2002b)
	liquid egg	enrichment	ECL	< 10 cfu/25 g	Cook et al. (2002)

SE: selective enrichment. ELGA: enzyme-linked gel assay. IMS: immunomagnetic separation. ECL: electrochemiluminescence.

8.5. Περιορισμοί και τεχνικές προκλήσεις της NASBA

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματά της, η NASBA εμφανίζει και συγκεκριμένους περιορισμούς. Ο σημαντικότερος σχετίζεται με την τεχνική πολυπλοκότητα του ενζυμικού της συστήματος, καθώς η αντίδραση απαιτεί συντονισμένη λειτουργία πολλών ενζύμων και σταθερότητα των αντιδραστηρίων. Η πολυπλοκότητα αυτή αυξάνει τις απαιτήσεις βελτιστοποίησης και μπορεί να επηρεάσει την αναπαραγωγικότητα, ειδικά όταν η μέθοδος μεταφέρεται από ελεγχόμενο εργαστηριακό περιβάλλον σε εφαρμοσμένα συστήματα πεδίου. (42)

Ένα επιπλέον ζήτημα είναι ότι το RNA, ως μόριο, είναι πιο ασταθές από το DNA και πιο επιρρεπές σε αποδόμηση από RNases. Αυτό σημαίνει ότι, παρότι η στόχευση RNA προσφέρει σημαντικά διαγνωστικά οφέλη, απαιτείται μεγαλύτερη προσοχή στη δειγματοληψία, στη συντήρηση, στη μεταφορά και στην εκχύλιση του δείγματος. Για περιβαλλοντικά δείγματα νερού, όπου οι συνθήκες δεν είναι πάντοτε ελεγχόμενες, το ζήτημα αυτό μπορεί να επηρεάσει ουσιαστικά την αξιοπιστία της ανάλυσης. (42,43)

Επιπλέον, παρότι η NASBA θεωρείται τεχνική με σημαντικό περιβαλλοντικό δυναμικό, η μετάβασή της από το ερευνητικό πεδίο σε πλήρως τυποποιημένο εργαλείο περιβαλλοντικής ανάλυσης δεν έχει ολοκληρωθεί στον ίδιο βαθμό όπως σε ορισμένες κλινικές εφαρμογές. Αυτό σημαίνει ότι, παρά την υψηλή της αξία, η NASBA εξακολουθεί να απαιτεί περαιτέρω τεκμηρίωση, βελτιστοποίηση και τυποποίηση προτού καθιερωθεί ευρύτερα ως μέθοδος ρουτίνας στην επιτήρηση νερού. (43,44)

8.6. Θέση της NASBA στη συγκριτική αξιολόγηση της εργασίας

Η NASBA κατέχει μοναδική θέση μεταξύ των ισοθερμικών τεχνικών, επειδή διαφοροποιείται ξεκάθαρα από τις περισσότερες άλλες ως προς τον μοριακό της στόχο και τον λειτουργικό της ρόλο. Ενώ τεχνικές όπως η HDA, η RPA, η RCA και η CPA εφαρμόζονται κυρίως σε DNA ή απαιτούν ειδικές προσαρμογές για RNA, η NASBA είναι εγγενώς προσανατολισμένη στην ενίσχυση RNA, κάτι που της δίνει ιδιαίτερο συγκριτικό πλεονέκτημα σε εφαρμογές όπου το RNA αποτελεί τον καταλληλότερο βιοδείκτη. Η διαφοροποίηση αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική για μια εργασία που εξετάζει συνολικά τις ισοθερμικές τεχνικές, διότι αποδεικνύει ότι η “καταλληλότερη” μέθοδος εξαρτάται όχι μόνο από την ταχύτητα ή το κόστος, αλλά και από τη φύση του βιολογικού στόχου. (42,43)

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής, η NASBA είναι ιδιαίτερα σημαντική επειδή συνδέεται άμεσα με την ανίχνευση περιβαλλοντικών και υδατογενών παθογόνων και επειδή προσφέρει θεωρητικά και πρακτικά πλεονεκτήματα στην ανάλυση RNA στόχων. Παράλληλα, οι τεχνικές προκλήσεις που σχετίζονται με τη σταθερότητα του RNA και με την πολυπλοκότητα του ενζυμικού συστήματος σημαίνουν ότι η αξιολόγησή της πρέπει να γίνει με ισορροπημένο τρόπο, συνυπολογίζοντας τόσο τη μοναδική της αξία όσο και τους περιορισμούς της. Επομένως, η NASBA αποτελεί τεχνική με σαφώς διακριτό ρόλο μέσα στο σύνολο των ισοθερμικών μεθόδων και προσφέρει στην εργασία ένα ουσιαστικό παράδειγμα του πώς η μοριακή στρατηγική της ενίσχυσης συνδέεται με το είδος του στόχου και με την τελική εφαρμογή. (42,43,44)

9. Loop – mediated isothermal amplification (LAMP)

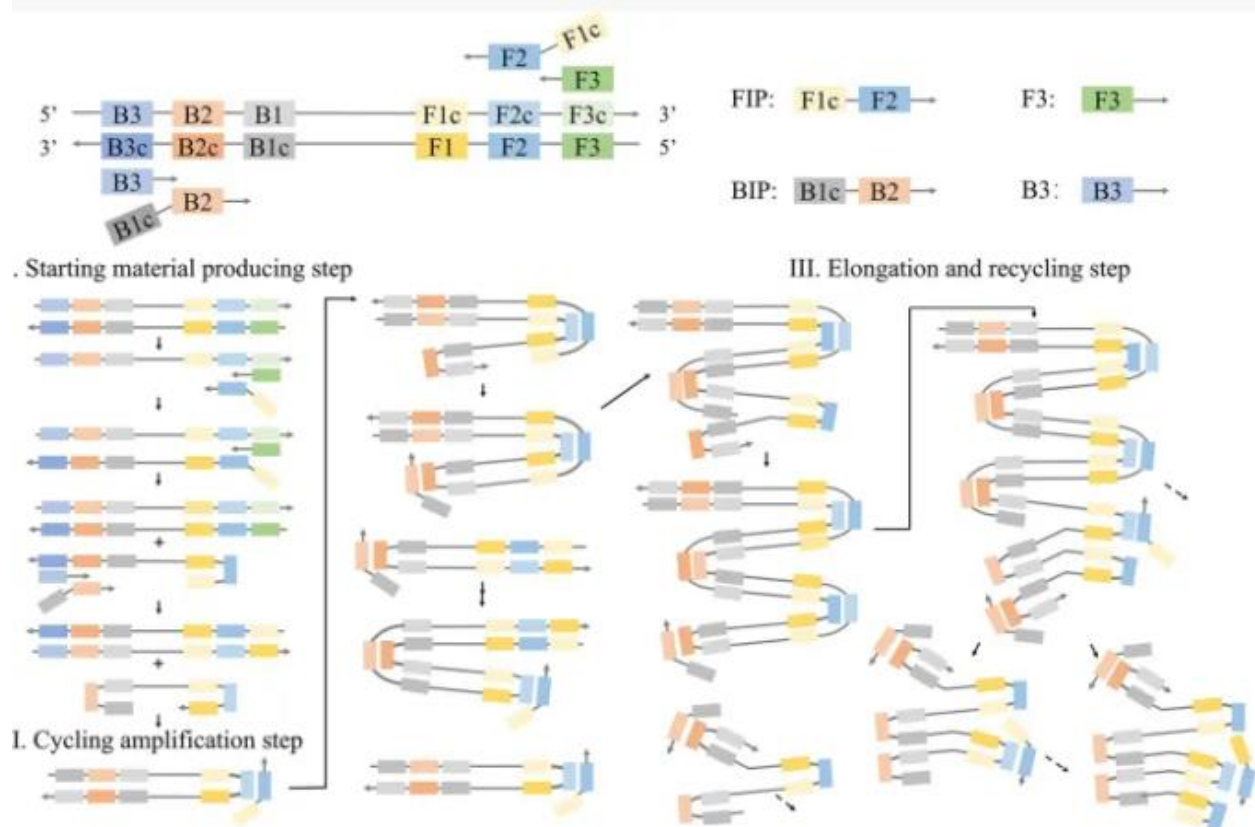
9.1. Εισαγωγή στη μέθοδο LAMP

Η Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες και τεχνολογικά ώριμες ισοθερμικές μεθόδους ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων. Αναπτύχθηκε με στόχο να προσφέρει υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και ταχύτητα, χωρίς να απαιτείται ο θερμικός κυκλισμός που χαρακτηρίζει την PCR. Η μέθοδος έχει εξελιχθεί σε μία από τις πλέον δημοφιλείς τεχνικές για εφαρμογές point-of-care, επιτήρησης πεδίου και γρήγορης μοριακής ανίχνευσης, επειδή συνδυάζει σχετικά απλό εξοπλισμό με πολύ καλή αναλυτική απόδοση. (45,46,47)

Η LAMP παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο πλαίσιο της ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό, καθώς μπορεί να εφαρμοστεί σε περιβάλλοντα όπου απαιτείται γρήγορη απόκριση, περιορισμένο κόστος και δυνατότητα χρήσης εκτός κεντρικού εργαστηρίου. Η σημασία της είναι ακόμη μεγαλύτερη επειδή έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για βακτηριακούς, ιικούς και παρασιτικούς στόχους, ενώ η απόδοσή της έχει αξιολογηθεί σε ποικιλία δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων περιβαλλοντικών και υδατικών δειγμάτων. Για τον λόγο αυτό, η LAMP θεωρείται σήμερα μία από τις πιο ολοκληρωμένες ισοθερμικές πλατφόρμες μοριακής διάγνωσης. (45,46,47)

9.2. Μηχανισμός λειτουργίας της LAMP

Ο μηχανισμός της LAMP διαφέρει σημαντικά από εκείνον της PCR, καθώς στηρίζεται σε ενίσχυση σε σταθερή θερμοκρασία, συνήθως γύρω στους 60–65°C, με τη χρήση πολυμεράσης που διαθέτει ισχυρή ικανότητα εκτόπισης κλώνου. Η αντίδραση πραγματοποιείται με τη βοήθεια τεσσάρων έως έξι εκκινητών που αναγνωρίζουν έξι έως οκτώ διαφορετικές περιοχές του στόχου, γεγονός που προσδίδει στη μέθοδο ιδιαίτερα υψηλή ειδικότητα. Οι βασικοί εκκινητές είναι οι F3 και B3, ενώ οι εσωτερικοί εκκινητές FIP και BIP παίζουν καθοριστικό ρόλο στην έναρξη της ενίσχυσης. Σε αρκετά πρωτόκολλα χρησιμοποιούνται επίσης loop primers, οι οποίοι επιταχύνουν σημαντικά τη διαδικασία. (45,46,47)



Εικόνα 9.1. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της LAMP και των σταδίων ενίσχυσης. (Yang, Zhang, Han, Liu, Lu)

Η αντίδραση ξεκινά με την υβριδοποίηση των εκκινητών στον στόχο και την επιμήκυνσή τους από την πολυμεράση. Στη συνέχεια δημιουργούνται δομές τύπου loop, οι οποίες επιτρέπουν την επανειλημμένη έναρξη νέων κύκλων ενίσχυσης χωρίς θερμική αποδιάταξη. Το αποτέλεσμα είναι η ταχεία συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων DNA σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Η LAMP συχνά παράγει χαρακτηριστικές δομές σε σχήμα «cauliflower-like» ή ladder-like, οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με διάφορες τελικές μεθόδους, όπως φθορισμό, χρωματομετρία, turbidimetry ή πλευρικής ροής ταινίες. (45,46,47)

Η τεχνική αυτή είναι εξαιρετικά αποδοτική, αλλά ταυτόχρονα απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό των εκκινητών. Η πολυπλοκότητα του primer design είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την PCR, επειδή πρέπει να εξασφαλιστεί ότι οι πολλαπλές περιοχές του στόχου θα αναγνωριστούν σωστά και ότι οι εκκινητές δεν θα δημιουργούν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Παρά την πολυπλοκότητα αυτή, η LAMP παραμένει ιδιαίτερα πρακτική, επειδή η ίδια η εκτέλεση της αντίδρασης είναι απλούστερη και ταχύτερη από τις περισσότερες συμβατικές μοριακές τεχνικές. (45,46,47)

9.3. Πλεονεκτήματα της LAMP

Η LAMP διαθέτει σειρά σημαντικών πλεονεκτημάτων που εξηγούν τη μεγάλη απήχυσή της στη διαγνωστική. Πρώτον, είναι εξαιρετικά γρήγορη. Σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να δώσει αποτέλεσμα μέσα σε 30 έως 60 λεπτά, κάτι που την καθιστά ιδανική για εφαρμογές όπου ο χρόνος είναι κρίσιμος. Δεύτερον, παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία, με δυνατότητα ανίχνευσης πολύ μικρών ποσοτήτων νουκλεϊκού οξέος, ενώ η αναγνώριση πολλαπλών περιοχών του στόχου συμβάλλει στην υψηλή ειδικότητα της μεθόδου. (45,46,47)

Ένα ακόμη μεγάλο πλεονέκτημα της LAMP είναι ότι δεν χρειάζεται θερμοκυκλοποιητή. Η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί με μια απλή θερμική πλάκα, υδατόλουτρο ή φορητή συσκευή σταθερής θερμοκρασίας, γεγονός που μειώνει σημαντικά το κόστος και αυξάνει τη δυνατότητα χρήσης της σε περιβάλλοντα χαμηλής υποδομής. Αυτή η ιδιότητα την καθιστά ιδιαίτερα ελκυστική για εφαρμογές πεδίου, αναπτυσσόμενες περιοχές και γρήγορη επιδημιολογική επιτήρηση. (45,46,47)

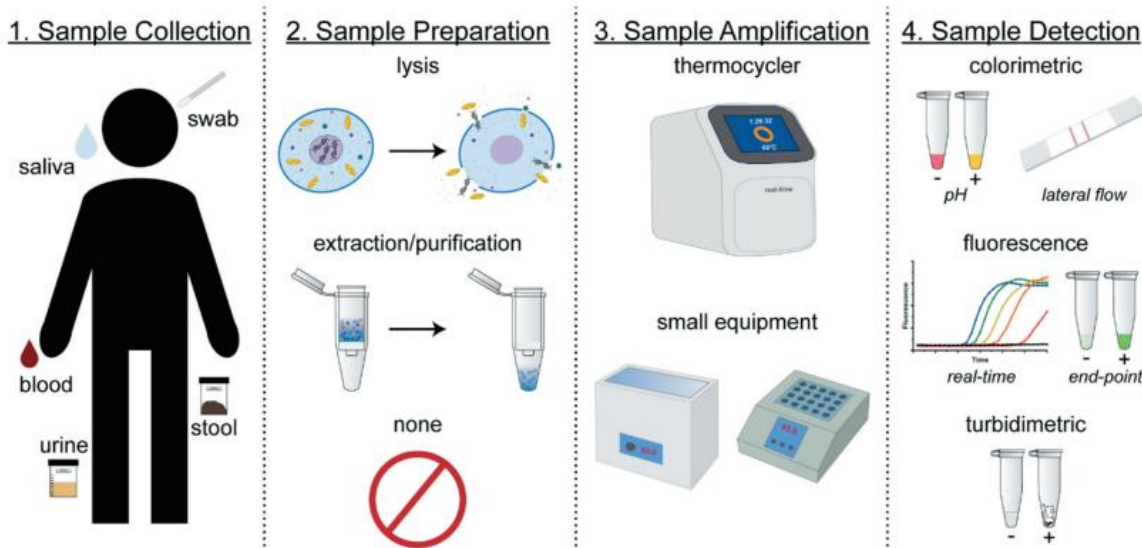
Η LAMP είναι επίσης ιδιαίτερα φιλική προς τον χρήστη, καθώς το αποτέλεσμα μπορεί να διαβαστεί με οπτικό τρόπο, χωρίς να απαιτείται πολύπλοκος αναλυτικός εξοπλισμός. Σε αρκετά πρωτόκολλα, η θετικότητα φαίνεται με αλλαγή χρώματος, θολότητα ή ένδειξη σε strip assay. Η πρακτική αυτή απλοποίηση την καθιστά ιδιαίτερα συμβατή με τα κριτήρια ASSURED, καθώς συνδυάζει οικονομική προσιτότητα, ταχύτητα, απλότητα και δυνατότητα επιτόπιας εφαρμογής. Για τον λόγο αυτό, η LAMP θεωρείται από τις πιο ώριμες τεχνικές για χρήση σε point-of-care και point-of-need πλατφόρμες. (45,46,47)

9.4. Εφαρμογές της LAMP στην ανίχνευση παθογόνων

Η LAMP έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, ιοί και πρωτόζωα. Έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση παθογόνων σε κλινικά δείγματα, σε τρόφιμα, σε ύδατα και σε περιβαλλοντικές μήτρες. Η μεγάλη της ευελιξία οφείλεται στο ότι μπορεί να προσαρμοστεί εύκολα σε διαφορετικούς στόχους, αρκεί να σχεδιαστούν κατάλληλα οι εκκινήτες. (45,46,47)

Στο πεδίο των υδατογενών παθογόνων, η LAMP έχει ιδιαίτερη σημασία, επειδή μπορεί να δώσει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα για μικροοργανισμούς που σχετίζονται με ρύπανση πόσιμου νερού, επιφανειακών νερών ή λυμάτων. Η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί για βακτηριακούς δείκτες κοπρανώδους ρύπανσης, για παθογόνους ιούς και για άλλους μικροοργανισμούς που ενδιαφέρουν τη δημόσια υγεία. Σε αρκετές περιπτώσεις, η LAMP έχει συνδυαστεί με φορητές διαγνωστικές διατάξεις, paper-based formats και lateral flow readouts, ενισχύοντας περαιτέρω τη χρηστικότητά της. (45,46,47)

Molecular Diagnostics Based on LAMP



Εικόνα 9.2. Εφαρμογή της LAMP σε ολοκληρωμένο διαγνωστικό workflow από δείγμα έως το αποτέλεσμα. (Moehling, et al)

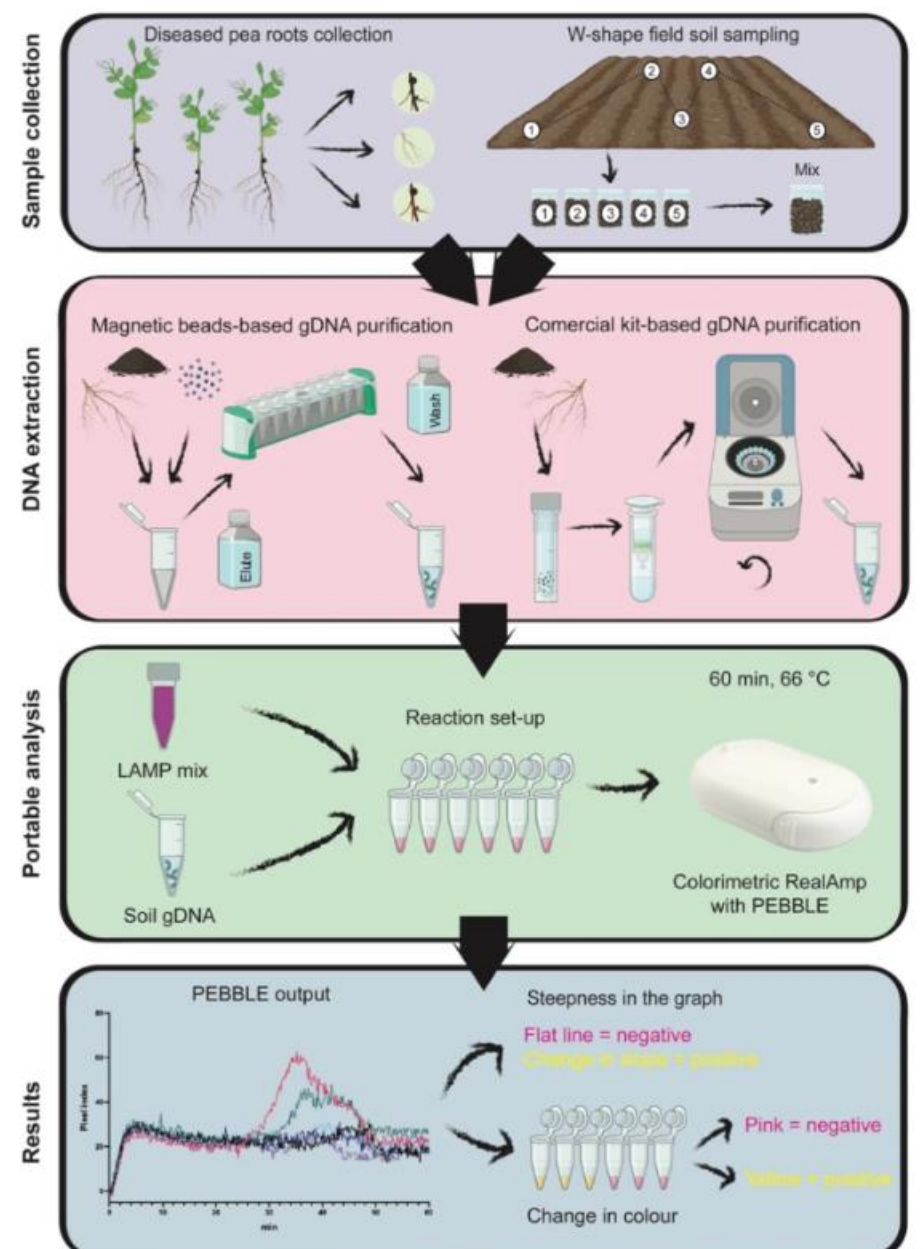
Ιδιαίτερα σημαντικό είναι ότι η LAMP μπορεί να λειτουργήσει και με απλοποιημένη προεπεξεργασία δείγματος, γεγονός που είναι πολύ χρήσιμο σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού. Η δυνατότητα αυτή μειώνει τον συνολικό χρόνο ανάλυσης και καθιστά τη μέθοδο πρακτική για επιτόπια εφαρμογή. Για τη δική σου εργασία, αυτό σημαίνει ότι η LAMP μπορεί να παρουσιαστεί ως μία από τις πιο ισχυρές επιλογές για υδατογενή διαγνωστική χρήση, ιδιαίτερα όταν ζητείται συνδυασμός ταχύτητας, ευαισθησίας και ευκολίας εφαρμογής. (45,46,47)

9.5. Περιορισμοί και προκλήσεις της LAMP

Παρά τα ισχυρά πλεονεκτήματά της, η LAMP παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς. Ο πιο γνωστός είναι ο κίνδυνος μη ειδικών προϊόντων και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, ειδικά όταν ο σχεδιασμός των εκκινητών δεν είναι απολύτως βελτιστοποιημένος. Επειδή η μέθοδος χρησιμοποιεί πολλούς εκκινητές, η πιθανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ τους είναι μεγαλύτερη σε σχέση με απλούστερες τεχνικές. Αυτό σημαίνει ότι η ανάπτυξη ενός αξιόπιστου LAMP assay απαιτεί προσεκτική μοριακή σχεδίαση και εκτενή πειραματική επικύρωση. (45,46,47)

Επιπλέον, αν και η LAMP είναι απλούστερη ως προς την εκτέλεση, η ερμηνεία του αποτελέσματος μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να είναι λιγότερο τυποποιημένη από ό,τι σε qPCR. Για παράδειγμα, η χρωματομετρική ή οπτική ανάγνωση μπορεί να επηρεαστεί από υποκειμενικούς παράγοντες, χρώμα του δείγματος ή περιβαλλοντικές συνθήκες. Επίσης, σε σύνθετα περιβαλλοντικά δείγματα, ανασταλτικές ουσίες ή ακατάλληλη προετοιμασία δείγματος μπορεί να μειώσουν την απόδοση της μεθόδου. (45,46,47)

Άλλος ένας περιορισμός είναι ότι η LAMP, παρότι είναι πολύ καλή για ποιοτική ή ημι-ποσοτική ανίχνευση, δεν είναι πάντα η ιδανικότερη επιλογή όταν απαιτείται αυστηρή ποσοτικοποίηση. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η qPCR ή η digital PCR μπορεί να παραμένουν πιο κατάλληλες. Ωστόσο, αυτό δεν μειώνει τη σημασία της LAMP, αλλά δείχνει ότι κάθε μέθοδος έχει τη δική της θέση ανάλογα με το διαγνωστικό ερώτημα. (45,46,47)



Εικόνα 9.3. Συνολική ροή εφαρμογής της LAMP ως φορητής διαγνωστικής μεθόδου, από τη δειγματοληψία έως την τελική ανίχνευση του αποτελέσματος (Pacheco et al.)

9.6. Η θέση της LAMP στη συγκριτική αξιολόγηση

Η LAMP κατέχει ξεχωριστή θέση ανάμεσα στις ισοθερμικές τεχνικές, διότι συνδυάζει σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό τα περισσότερα από τα χαρακτηριστικά που επιζητά μια σύγχρονη διαγνωστική μέθοδος. Είναι γρήγορη, ευαίσθητη, σχετικά απλή, οικονομική και πολύ καλά

προσαρμόσιμη σε φορητά ή αποκεντρωμένα συστήματα. Για τον λόγο αυτό, συχνά θεωρείται μια από τις πιο ισορροπημένες τεχνολογίες όταν το ζητούμενο είναι η πρακτική εφαρμογή στο πεδίο. (45,46,47)

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής, η LAMP μπορεί να παρουσιαστεί ως η πιο ώριμη και ευρέως εφαρμόσιμη ισοθερμική τεχνική για την ανίχνευση παθογόνων σε νερό, αλλά όχι απαραίτητα ως η τελειότερη σε όλα τα κριτήρια. Η αξία της έγκειται στο ότι συνδυάζει υψηλή απόδοση με μεγάλη λειτουργική ευκολία, ενώ μπορεί να ενσωματωθεί εύκολα σε συστήματα επιτήρησης που πλησιάζουν πολύ τις απαιτήσεις των ASSURED κριτηρίων. Με αυτόν τον τρόπο, η LAMP αποτελεί ιδανικό τελικό σημείο στη σειρά των τεχνικών που εξετάζεις, γιατί συγκεντρώνει πολλά από τα χαρακτηριστικά που οι προηγούμενες μέθοδοι επιδιώκουν να πετύχουν. (45,46,47)

10. Συγκριτική αξιολόγηση των ισοθερμικών τεχνικών ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό.

10.1. Γενικό πλαίσιο

Οι ισοθερμικές τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων αποτελούν μια ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία μοριακών μεθόδων, καθώς επιτρέπουν την ενίσχυση γενετικού υλικού σε σταθερή θερμοκρασία, χωρίς την ανάγκη θερμικού κυκλισμού που απαιτείται στην PCR. Το χαρακτηριστικό αυτό τις καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικές για εφαρμογές περιβαλλοντικής ανάλυσης και ειδικότερα για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα νερού, όπου η ταχύτητα, η απλότητα και η δυνατότητα εφαρμογής εκτός εξειδικευμένου εργαστηρίου έχουν ιδιαίτερη σημασία. Παράλληλα, οι μέθοδοι αυτές έχουν αναδειχθεί ως υποσχόμενες λύσεις για την επιτόπια διάγνωση, επειδή μπορούν να συνδυαστούν με φορητές ή χαμηλού κόστους πλατφόρμες ανίχνευσης. (5,17)

Η συγκριτική μελέτη των HDA, RPA, RCA, CPA, NASBA και LAMP είναι απαραίτητη, καθώς κάθε τεχνική βασίζεται σε διαφορετικό μηχανισμό ενίσχυσης και εμφανίζει διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Επομένως, η αξιολόγησή τους δεν πρέπει να περιορίζεται μόνο στην αναλυτική ευαισθησία, αλλά να περιλαμβάνει και την ειδικότητα, τον χρόνο απόκρισης, την ευκολία σχεδιασμού, τη συμβατότητα με σύνθετα περιβαλλοντικά δείγματα και την καταλληλότητα για point-of-care εφαρμογές. Στο πλαίσιο αυτό, το παρόν κεφάλαιο αποσκοπεί στη συνολική αποτίμηση των κυριότερων ισοθερμικών τεχνικών για την ανίχνευση παθογόνων στο νερό. (5,17)

10.2. Σύγκριση ως προς τον μηχανισμό λειτουργίας

Οι επιμέρους ισοθερμικές τεχνικές διαφέρουν ουσιαστικά στον τρόπο με τον οποίο επιτυγχάνεται η ενίσχυση του νουκλεϊκού οξέος. Η HDA χρησιμοποιεί ελικάση για τον διαχωρισμό των δύο κλώνων του DNA, προσομοιώνοντας σε έναν βαθμό τη λογική της PCR αλλά χωρίς εναλλαγές θερμοκρασίας. Η RPA στηρίζεται στη δράση recombinase, πρωτεϊνών πρόσδεσης μονόκλωνου DNA και πολυμεράσης με ικανότητα εκτόπισης κλώνου, με αποτέλεσμα να λειτουργεί σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες και με πολύ γρήγορη κινητική. Η RCA διαφοροποιείται, καθώς βασίζεται

σε κυκλικό πρότυπο και συνεχή πολυμεριστική σύνθεση, προσφέροντας ιδιαίτερη ισχύ στην ενίσχυση σήματος και υψηλή ειδικότητα. (5,17)

Η CPA και η LAMP χρησιμοποιούν πολλαπλούς εκκινητές και μηχανισμούς αυτοτροφοδοτούμενης ενίσχυσης, με τη LAMP να διαθέτει ευρύτερη βιβλιογραφική τεκμηρίωση και μεγαλύτερη πρακτική διάδοση. Η NASBA αποτελεί ξεχωριστή κατηγορία, καθώς στοχεύει κυρίως RNA μόρια και βασίζεται στη συνδυασμένη δράση αντίστροφης μεταγραφάσης, RNase H και T7 RNA polymerase. Επομένως, οι ισοθερμικές τεχνικές δεν συνιστούν μία ομοιογενή ομάδα, αλλά ένα σύνολο διαφορετικών μοριακών στρατηγικών που εξυπηρετούν διαφορετικές αναλυτικές ανάγκες. (5,17)

10.3. Σύγκριση ως προς την απόδοση

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα των ισοθερμικών τεχνικών είναι ο μειωμένος χρόνος ανάλυσης σε σύγκριση με κλασικές εργαστηριακές μεθόδους. Η RPA συγκαταλέγεται συνήθως στις ταχύτερες τεχνικές, καθώς μπορεί να ολοκληρώσει την ενίσχυση σε πολύ σύντομο χρόνο και σε χαμηλή θερμοκρασία λειτουργίας. Η LAMP επίσης χαρακτηρίζεται από πολύ καλή ταχύτητα και υψηλή αναλυτική απόδοση, γεγονός που εξηγεί τη συχνή χρήση της σε πρακτικές εφαρμογές ανίχνευσης παθογόνων. Η HDA, η CPA και η NASBA εμφανίζουν επίσης σημαντική δυναμική, αν και η εφαρμοστική τους διάδοση είναι μικρότερη σε σχέση με τη LAMP. (5,17)

Πίνακας 10.1. Παρουσιάζεται συνοπτικά η σύγκριση των κυριότερων ισοθερμικών τεχνικών ως προς το μηχανισμό λειτουργίας, τα πλεονεκτήματα, τους περιορισμούς και τη καταλληλότητα τους για επιτόπιες εφαρμογές σε δείγματα νερού. (Nieuwkerk et al)

Τεχνική	Βασικός μηχανισμός	Θερμοκρασία λειτουργίας	Χρόνος ανάλυσης	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί	Καταλληλότητα για επιτόπια διάγνωση
HDA	Χρησιμοποιεί ελικάση για τον διαχωρισμό των αλυσίδων DNA και στη συνέχεια επιμήκυνση από πολυμεράση.	Σταθερή, χαμηλή έως μέση	Σύντομος	Απλούστερη από την PCR, χωρίς θερμικό κυκλισμό.	Λιγότερη διαδεδομένη, μικρότερη εφαρμοστική ωρίμανση	Μέτρια

RPA	Βασίζεται σε recombinase, πρωτεΐνες πρόσδεσης μονόκλωνου DNA και πολυμεράση με ικανότητα εκτόπισης κλώνου.	Πολύ χαμηλή	Πολύ σύντομος	Πολύ γρήγορη, κατάλληλη για φορητές εφαρμογές	Απαιτεί προσεκτική βελτιστοποίηση για αποφυγή μη ειδικών ενισχύσεων	Πολύ υψηλή
RCA	Κυκλική ενίσχυση μέσω κυκλικού προτύπου και συνεχούς σύνθεσης νουκλεϊκού οξέος	Σταθερή	Μεσαίος	Πολύ υψηλή ειδικότητα, κατάλληλη για ανίχνευση με ισχυρό σήμα.	Όχι πάντα η ταχύτερη μέθοδος, πιο εξειδικευμένος σχεδιασμός	Υψηλή σε ειδικές διατάξεις
CPA	Ενίσχυση με πολλαπλούς εκκινητές και αλληλοτροφοδοτούμενο μηχανισμό	Σταθερή	Σύντομο έως μέσο	Υψηλή ευαισθησία, λειτουργεί χωρίς θερμικό κυκλισμό.	Πιο σύνθετος σχεδιασμός εκκινητών, μικρότερη διάδοση.	Υψηλή
NASBA	Ενίσχυση RNA με αντίστροφη μεταγραφάση, RNase ή και T7 RNA polymerase	Σταθερή	Σύντομο έως μέσο	Ιδανική για RNA στόχους, χρήσιμη σε ιικούς και μικροβιακούς δείκτες.	Αυξημένη ενζυμική πολυπλοκότητα, ευαισθησία στις συνθήκες αντίδρασης.	Υψηλή για RNA ανίχνευση
LAMP	Ενίσχυση με πολλαπλούς εκκινητές και αλυσιδωτό μηχανισμό εκτόπισης κλώνου.	Σταθερή συνήθως 60-65°C	Πολύ σύντομος	Πολύ υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, εύκολη οπτική ανάγνωση, ευρεία εφαρμογή.	Απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό εκκινητών.	Πολύ υψηλή

Ως προς την ευαισθησία και την ειδικότητα, η βιβλιογραφία δείχνει ότι οι περισσότερες ισοθερμικές μέθοδοι μπορούν να προσφέρουν υψηλή αναλυτική απόδοση, αλλά η πραγματική τους αποτελεσματικότητα εξαρτάται από τον στόχο, τον σχεδιασμό των εκκινητών και τη φύση του δείγματος. Η LAMP παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή ειδικότητα, επειδή βασίζεται στην αναγνώριση πολλαπλών περιοχών του στόχου, ενώ η RCA προσφέρει επίσης πολύ υψηλή εξειδίκευση όταν συνδυάζεται με κατάλληλους κυκλικούς ανιχνευτές. Αντίστοιχα, η NASBA έχει ξεχωριστή σημασία για RNA στόχους, κάτι που την καθιστά πολύτιμη σε εφαρμογές όπου δεν αρκεί η ανίχνευση DNA. Συνεπώς, η συνολική απόδοση κάθε τεχνικής πρέπει να αξιολογείται σε άμεση συνάρτηση με το είδος του παθογόνου και τις συνθήκες της ανάλυσης. (5,17)

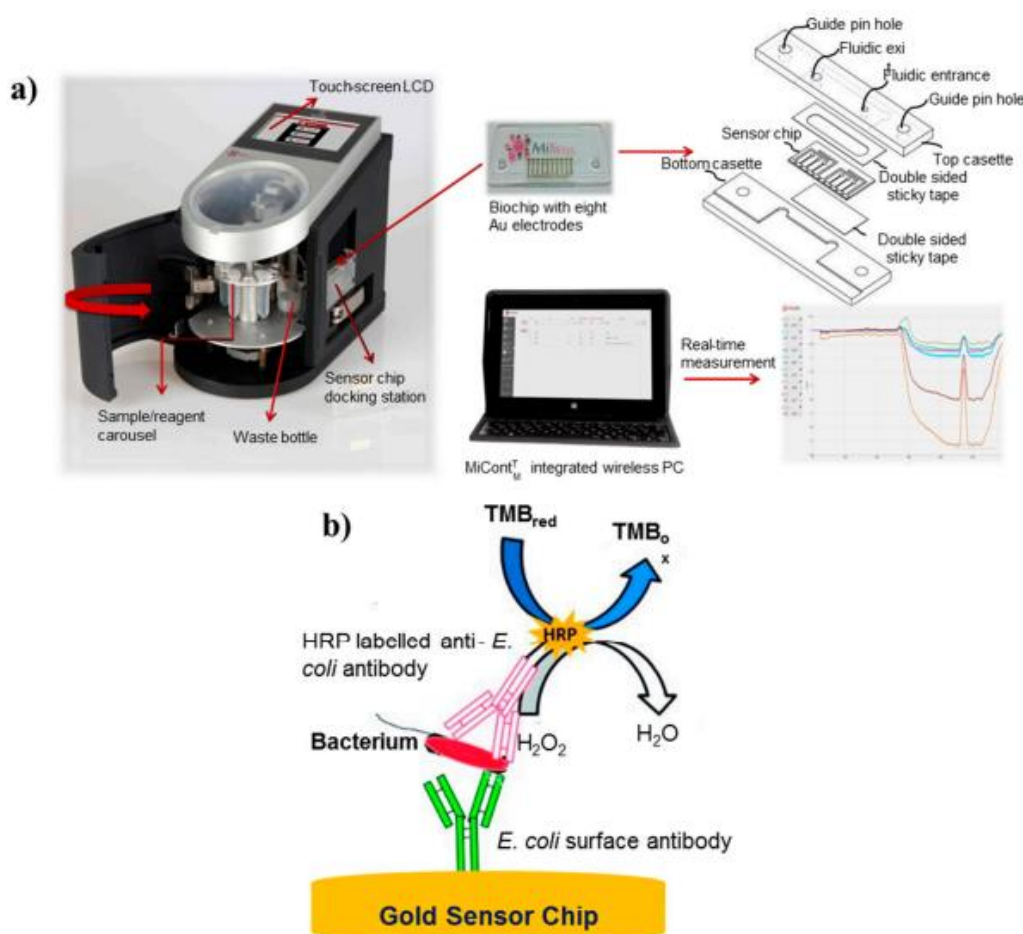
10.4. Καταλληλότητα για δείγματα νερού

Η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα νερού αποτελεί ιδιαίτερα απαιτητικό αναλυτικό πεδίο, επειδή τα περιβαλλοντικά δείγματα συχνά περιέχουν χαμηλές συγκεντρώσεις στόχου, ανασταλτικές ουσίες και σύνθετο μικροβιακό υπόβαθρο. Για τον λόγο αυτό, η επιτυχία μιας ισοθερμικής μεθόδου δεν εξαρτάται μόνο από τον θεωρητικό μηχανισμό ενίσχυσης, αλλά και από τη συμβατότητά της με στάδια συγκέντρωσης, προετοιμασίας και εκχύλισης του δείγματος. Οι ανασκοπήσεις για την περιβαλλοντική ανάλυση δείχνουν ότι οι IAMs έχουν σημαντική προοπτική για εφαρμογές σε περιβαλλοντικά ύδατα, λύματα, ανακτημένο νερό και άλλες υδατικές μήτρες. (5,17)

Ανάμεσα στις διαθέσιμες τεχνικές, η LAMP αναφέρεται συχνά ως μία από τις πιο ώριμες επιλογές για δείγματα νερού, λόγω της ευαισθησίας της, της ανθεκτικότητας της σε πρακτικές συνθήκες εφαρμογής και της δυνατότητας απλής ανάγνωσης του αποτελέσματος. Η RPA είναι επίσης ιδιαίτερα ελκυστική για επιτόπια περιβαλλοντική ανάλυση εξαιτίας της χαμηλής θερμοκρασίας λειτουργίας και της γρήγορης ολοκλήρωσης της αντίδρασης. Η NASBA αποκτά ιδιαίτερη σημασία όταν ο μοριακός στόχος είναι RNA, ενώ η RCA φαίνεται περισσότερο κατάλληλη για πιο εξειδικευμένες βιοαισθητηριακές πλατφόρμες. Συνολικά, η καταλληλότητα κάθε τεχνικής για δείγματα νερού εξαρτάται από τη φύση του παθογόνου, τον απαιτούμενο χρόνο απόκρισης και το επίπεδο φορητότητας που ζητείται από την εφαρμογή. (5,17)

10.5. Επιτόπια διαγνωστική και περιορισμοί

Η επιτόπια διαγνωστική έχει ιδιαίτερη αξία στην παρακολούθηση της ποιότητας του νερού, επειδή επιτρέπει την ταχεία λήψη αποφάσεων κοντά στο σημείο δειγματοληψίας, χωρίς καθυστερήσεις που σχετίζονται με τη μεταφορά του δείγματος σε κεντρικό εργαστήριο. Ωστόσο, η επιτόπια διαγνωστική αντιμετωπίζει συγκεκριμένες προκλήσεις και περιορισμούς, που σχετίζονται με τη δειγματοληψία, την αναστολή της αντίδρασης από συστατικά του δείγματος, την ανάγκη για απλή αλλά αξιόπιστη ανάγνωση των αποτελεσμάτων και τη μεταφορά της μεθόδου από το εργαστήριο στο πεδίο. Επιπλέον, η πρακτική αξιοποίηση point-of-care τεχνολογιών εξαρτάται και από ζητήματα σταθερότητας αντιδραστηρίων, ελέγχου ποιότητας, κανονιστικής αποδοχής και επαναληψιμότητας. (5,17)



Εικόνα 10.1. Σχηματική απεικόνιση φορητής επιτόπιας διαγνωστικής πλατφόρμας βασισμένης σε later flow aptamer assay και ανάλυση μέσω smartphone. (Kumar et al)

Στο πλαίσιο αυτό, οι ισοθερμικές τεχνικές παρουσιάζουν σαφές συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι των θερμοκυκλικών μεθόδων, επειδή απαιτούν απλούστερο εξοπλισμό και μπορούν να ενσωματωθούν ευκολότερα σε φορητές συσκευές ή μικρορευστονικές πλατφόρμες. Παρ' όλα αυτά, καμία μέθοδος δεν είναι απόλυτα απαλλαγμένη από περιορισμούς, ιδιαίτερα όταν εφαρμόζεται σε σύνθετα περιβαλλοντικά δείγματα. Συνεπώς, η επιτυχής επιτόπια εφαρμογή δεν εξαρτάται μόνο από την ίδια τη μέθοδο ενίσχυσης, αλλά και από την ποιότητα της συνολικής διαγνωστικής πλατφόρμας. (17)

10.6. Συμπερασματική αξιολόγηση

Η συγκριτική ανάλυση δείχνει ότι όλες οι βασικές ισοθερμικές τεχνικές συμβάλλουν ουσιαστικά στην εξέλιξη της μοριακής ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό, αλλά καθεμία διαθέτει διαφορετικά πλεονεκτήματα. Η HDA προσφέρει μια πιο «κλασική» λογική ισοθερμικής ενίσχυσης, η RPA υπερέχει σε ταχύτητα και φορητότητα, η RCA σε ειδικότητα και ενίσχυση σήματος, η NASBA σε RNA στόχους και η LAMP σε συνολική ισορροπία μεταξύ ευαισθησίας, ειδικότητας, απλότητας και πρακτικής εφαρμογής. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο η LAMP εμφανίζεται συχνά ως η πιο ώριμη επιλογή για εφαρμογές ανίχνευσης παθογόνων σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού. (17)

Κατά συνέπεια, η επιλογή της κατάλληλης ισοθερμικής τεχνικής δεν πρέπει να γίνεται με γενικό τρόπο, αλλά με βάση το αναλυτικό ερώτημα, το είδος του παθογόνου, τη φύση του δείγματος και τις επιχειρησιακές απαιτήσεις της εφαρμογής. Σε συνθήκες όπου απαιτείται γρήγορη, απλή και επιτόπια ανίχνευση, η LAMP και η RPA παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, ενώ σε πιο εξειδικευμένα σενάρια η NASBA ή η RCA μπορεί να αποδειχθούν καταλληλότερες. Επομένως, το μέλλον του πεδίου φαίνεται να συνδέεται όχι μόνο με τη βελτίωση των επιμέρους τεχνικών, αλλά και με την αποτελεσματικότερη ενσωμάτωσή τους σε ολοκληρωμένα διαγνωστικά συστήματα πεδίου. (17)

11. Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό αποτελεί κρίσιμο ζήτημα δημόσιας υγείας, καθώς η έγκαιρη και αξιόπιστη διάγνωση συνδέεται άμεσα με την πρόληψη υδατογενών λοιμώξεων και με την αποτελεσματική παρακολούθηση της ποιότητας του νερού. Οι παραδοσιακές καλλιεργητικές και μοριακές τεχνικές παραμένουν σημαντικές, όμως συχνά παρουσιάζουν περιορισμούς ως προς τον χρόνο απόκρισης, τον απαιτούμενο εξοπλισμό και την καταλληλότητά τους για άμεση χρήση στο πεδίο. Για τον λόγο αυτό, η ανάγκη για γρήγορες, ευαίσθητες και πρακτικά εφαρμόσιμες διαγνωστικές λύσεις έχει ενισχύσει σημαντικά το ενδιαφέρον για ισοθερμικές μεθόδους ενίσχυσης και point-of-care πλατφόρμες.

Οι ισοθερμικές τεχνικές, όπως η LAMP, η RPA, η NASBA, η HDA, η RCA και η CPA, προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις κλασικές μοριακές μεθόδους, επειδή λειτουργούν σε σταθερή θερμοκρασία, απαιτούν απλούστερο εξοπλισμό και μπορούν να προσαρμοστούν πιο εύκολα σε φορητές διατάξεις. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, η LAMP αναδείχθηκε ως μία από τις πιο ώριμες και ευρέως αξιοποιήσιμες τεχνικές, λόγω της υψηλής ευαισθησίας, της ειδικότητας και της δυνατότητας οπτικής ή απλής χρωματομετρικής ανάγνωσης του αποτελέσματος. Παράλληλα, η RPA ξεχωρίζει για την ταχύτητά της και τη χαμηλή θερμοκρασία λειτουργίας, ενώ η NASBA διατηρεί ιδιαίτερη αξία για RNA στόχους και η RCA για εφαρμογές όπου απαιτείται υψηλή ειδικότητα.

Η εφαρμογή των τεχνικών αυτών σε δείγματα νερού παρουσιάζει όμως και σημαντικές προκλήσεις. Τα περιβαλλοντικά δείγματα συχνά περιέχουν ανασταλτικές ουσίες, χαμηλές συγκεντρώσεις στόχου και πολύπλοκο μικροβιακό υπόβαθρο, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την προσεκτική προετοιμασία του δείγματος και τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου. Επιπλέον, η μετάβαση από το εργαστήριο στο πεδίο απαιτεί λύσεις με σταθερά αντιδραστήρια, χαμηλές απαιτήσεις συντήρησης και αξιόπιστη ερμηνεία αποτελεσμάτων από μη εξειδικευμένους χρήστες. Επομένως, η τεχνική επιτυχία μιας μεθόδου δεν αρκεί από μόνη της· απαιτείται και επιχειρησιακή συμβατότητα με τις συνθήκες επιτόπιας εφαρμογής.

Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στην ενσωμάτωση ισοθερμικών τεχνικών σε paper-based συστήματα, μικρορευστονικές πλατφόρμες, lateral flow διατάξεις και smartphone-assisted

αναγνώσεις, τα οποία ενισχύουν την προοπτική τους για χρήση σε αποκεντρωμένα περιβάλλοντα. Τέτοιες πλατφόρμες ανταποκρίνονται καλύτερα στις ανάγκες ταχείας επιτήρησης, ειδικά σε περιοχές με περιορισμένη εργαστηριακή υποδομή. Ωστόσο, η καθολική υιοθέτησή τους προϋποθέτει περαιτέρω αξιολόγηση ως προς την αναπαραγωγιμότητα, την ανθεκτικότητα σε πραγματικές μήτρες και τη δυνατότητα τυποποίησης για ευρεία εφαρμογή.

Μελλοντικά, η έρευνα φαίνεται να προσανατολίζεται σε ακόμη πιο ολοκληρωμένες διαγνωστικές λύσεις, όπου η δειγματοληψία, η προεπεξεργασία, η ενίσχυση και η ανίχνευση θα ενσωματώνονται σε ενιαίες φορητές πλατφόρμες. Παράλληλα, η συνδυασμένη χρήση ισοθερμικής ενίσχυσης με biosensors, οπτικές διατάξεις και ψηφιακή ανάλυση μέσω έξυπνων συσκευών μπορεί να ενισχύσει περαιτέρω τη χρησιμότητα των μεθόδων αυτών για περιβαλλοντική επιτήρηση. Συνεπώς, η πορεία του πεδίου δεν εξαρτάται μόνο από τη βελτίωση των επιμέρους μεθόδων, αλλά και από την ανάπτυξη ολοκληρωμένων συστημάτων που θα είναι ταυτόχρονα αξιόπιστα, απλά και πρακτικά εφαρμόσιμα.

Συνολικά, η παρούσα εργασία καταδεικνύει ότι οι ισοθερμικές τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων αποτελούν μια από τις πιο ελπιδοφόρες κατευθύνσεις για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό. Η LAMP, η RPA και οι υπόλοιπες τεχνικές έχουν ήδη αποδείξει ότι μπορούν να προσφέρουν ταχύτητα, ευαισθησία και φορητότητα, όμως η πλήρης αξιοποίησή τους απαιτεί συνεχή βελτιστοποίηση και στενότερη σύνδεση με πραγματικές εφαρμογές πεδίου. Έτσι, το μέλλον της επιτόπιας μοριακής διάγνωσης φαίνεται ιδιαίτερα υποσχόμενο, υπό την προϋπόθεση ότι η τεχνολογική καινοτομία θα συνδυαστεί με πρακτική αξιοπιστία και επιχειρησιακή απλότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. World Health Organization (2022). Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporation the first and second addenda.
2. World Health Organization (2023). Drinking water
3. Waterborne pathogens: detection methods and challenges
4. Waterborne pathogens detection technologies: advance, challenge and future perspectives, 2023, Microbiotechnology
5. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater, 1999, Simon Toze
6. Advance in point-of-care and molecular techniques to detect waterborne pathogens, 2024, Khodaparast, Sharley, Marshall, Beddoe
7. Navigating the complex landscape of waterborne disease research, 2025, Khant, Lumongsod
8. Detection of pathogens in water: from phylochips to qPCR to pyrosequencing, 2011, Gim Aw
9. HPB-Chip: An accurate high-throughput qPCR-based tool for rapidly profiling waterborne human pathogenic bacteria in the environment, 2024, Tuo, Shen, Jia
10. PCR-based detection of pathogens in improved water sources: a scoping review protocol of the evidence in low-income and middle-income countries,
11. Isothermal Nucleic Acid Amplification Techniques and Their Use in Bioanalysis, 2019, Bodulev, Sakharon
12. Advances in paper based isothermal nucleic acid amplification tests for water-related infectious diseases, 2023, Jena, Gaur
13. LAMP-Based Point-of-Care Biosensors for Rapid Pathogen Detection, Das, Lin
14. Recent Developments in Isothermal Amplification Methods for the Detection of Foodborne Viruses, 2022, Suther, Stoufer
15. Connectivity of rapid-testing diagnostics and surveillance of infectious diseases, Ming, Rawson, Sangkaew, Holmes, Georgiou
16. REASSURED Multiplex Diagnostics: A Critical Review and Forecast

17. Critical review of methods for isothermal amplification of nucleic acids for environmental analysis, 2020, Dana M. Nieuwkerk, Asja Korajkic, Erika L. Valdespino, Michael P. Herrmann, Valerie J. Harwood
18. Isothermal DNA amplification in vitro: the helicase-dependent amplification system, 2009, Yong-Joo Jeong & Kkothanahreum Park & Dong-Eun Kim
19. Diagnostic Devices for Isothermal Nucleic Acid Amplification, 2012, Chia-Chen Chang , Chien-Cheng Chen , Shih-Chung Wei , Hui-Hsin Lu , Yang-Hung Liang and Chii-Wann Lin
20. Helicase-dependent amplification: use in OnChip amplification and potential for point-of-care diagnostics, 2009
21. Comparison of isothermal helicase-dependent amplification and PCR for the detection of Mycobacterium tuberculosis by an electrochemical genomagnetic assay, 2016, Susana Barreda-García & Rebeca Miranda-Castro & Noemí de-los-Santos-Álvarez & Arturo J. Miranda-Ordieres & M. Jesús Lobo-Castañón
22. A complementary isothermal amplification method to the US EPA qPCR approach for the detection of enterococci in environmental waters, 2017, Claudia Kolm, Roland Martzy, Kurt Brunner, Robert L Mach, Rudolf Krska, Georg Heinze, Regina Sommer, Georg H Reischer, and Andreas H Farnleitner
23. Recombinase Polymerase Amplification: Basics, applications and recent advances, 2017, Ivan Magriñá Lobato, Ciara K. O'Sullivan
24. Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages and applications, 2022, Tan, Liao, Liang, Yi
25. Introduction to Waterborne Pathogens in Agricultural Watersheds, 2012, NRCS
26. Development of A Rapid, Low-Cost Portable Detection Assay for Enterococci in Wastewater and Environmental Waters, 2023, Batra, Cottam, Lepesteur
27. Critical insight into recombinase polymerase amplification technology, 2022, Munawar
28. Advance in the application of recombinase- aided amplification combined with CRISPR-Cas technology in quick detection of pathogenic microbe, 2023, Li, Zhu, Zhang, Ren, He

29. Evaluation and comparison of recombinase polymerase amplification coupled with lateral-flow bioassay for Escherichia coli O157:H7 detection using different genes, 2021, Rani, Ravindran, Surapaneni
30. Rolling Circle Amplification as Isothermal Gene Amplification in Molecular Diagnostics, 2016, Nam-In Goo, Dong-Eun Kim
31. Recent advances in rolling circle amplification-based biosensing strategies-A review, 2020, Lulu Xu, Jiaxin Duan, Junman Chen, Shijia Ding ,Wei Cheng
32. Waterborne pathogens detection technologies: advances, challenges, and future perspectives, 2023, Oon, Ayaz, Deng, Li, Song
33. Isothermal and rapid detection of pathogenic microorganisms using a nano-rolling circle amplification-surface plasmon resonance biosensor, 2014, Dachuan Shi, Junfu Huang, Zhengran Chuai, Dong Chen, Xiaoyan Zhu, Huan Wang, Jia Peng, Haiyan Wu, Qing Huang
34. Advance in point-of-care and molecular techniques to detect waterborne pathogens, 2024, Khodaparast, Sharley, Marshall, Beddoe
35. Guidance on waterborne pathogens in drinking water, 2022, Canada.ca
36. Cross Priming Amplification: Mechanism and Optimization for Isothermal DNA Amplification, 2012, Xu,Hu etc
37. Isothermal amplification-based methods for assessment of microbiological safety and authenticity of meat and meat products, 2020, Yogesh Kumar
38. Detection of Nucleic Acids and Prevention of Carryover Contamination Using Cross-Priming Amplification Combined with Nanoparticles-Based Biosensor and Antarctic Thermal Sensitive Uracil-DNA-Glycosylase, 2018, Yi Wang, Lin Sun, Jie-Qiong Li, Ze-Ming Wang, Wei-Wei Jiao, Jing Xiao, Chen Shen, Fang Xu, Hui Qi, Yong-Hong Wang, Ya-Jie Guo, and A-Dong Shen
39. Sensitive and rapid detection of Salmonella enterica serovar Indiana by crosspriming amplification, 2018, Yong-xiang Wanga, An-yun Zhanga, Yong-qiang Yanga, Chang-wei Leia, Guang-yang Chenga, Wen-cheng Zoua, Jin-xin Zenga, Yan-peng Chena, Hong-ning Wang.

40. Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by cross priming amplification of lmo0733 gene, 2014, Yi Wang , Yan Wang , Aijing Ma, Dongxun Li & Changyun Ye
41. Detection of *Vibrio cholerae* by isothermal cross-priming amplification Q3 combined with nucleic acid detection strip analysis, 2015, Xia Zhang, Xin-Jun Du, Chun Guan, Ping Li, Wen-Jie Zheng, Shuo Wang
42. The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples, 2003, Nigel Cook
43. From research lab to standard environmental analysis tool: Will NASBA make the leap?, 2016, Birgitte K. Hønsvall, Lucy J. Robertson
44. Compatible immuno-NASBA LOC device for quantitative detection of waterborne pathogens: design and validation, 2011, Xinyan Zhao, Tao Dong, Zhaochu Yang, Nuno Pires and Nils Høivik
45. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) as a rapid and portable diagnostic tool for the detection of pea root rot pathogens, 2025, Alba Pacheco, Samuel Bruty, Henry Tidd.
46. Advancements and applications of loop-mediated isothermal amplification technology: a comprehensive overview, 2024, Yang, Zhang, Han, Liu, Lu
47. LAMP Diagnostics at the Point-of-Care: Emerging Trends and Perspectives for the Developer Community, 2021, Taylor J. Moehling, Gihoon Choi, Lawrence C. Dugan, Marc Salit & Robert J. Meagher
48. Εικόνα 2.1. Correlation between *E. coli* levels and the presence of foodborne pathogens in surface irrigation water: Establishment of a sampling program (Truchado, Hernandez et al)
49. Εικόνα 4.1. Helicase-dependent isothermal DNA amplification (Vincent et al)
50. Σχήμα 4.1. Comparison of isothermal helicase-dependent amplification and PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* by an electrochemical genomagnetic assay (Susana Barreda-García & Rebeca Miranda-Castro & Noemí de-los-Santos-Álvarez & Arturo J. Miranda-Ordieres & M. Jesús Lobo-Castañón)
51. Εικόνα 4.2. Comparison of isothermal helicase-dependent amplification and PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* by an electrochemical genomagnetic assay (Susana Barreda-García & Rebeca Miranda-Castro & Noemí de-los-Santos-Álvarez & Arturo J. Miranda-Ordieres & M. Jesús Lobo-Castañón)

52. Εικόνα 5.1. Recombinase Polymerase Amplification: Basics, applications and recent advances
53. Εικόνα 6.1. Rolling Circle Amplification as Isothermal Gene Amplification in Molecular Diagnostics, 2016, Nam-In Goo, Dong-Eun Kim
54. Εικόνα 6.2. Isothermal and rapid detection of pathogenic microorganisms using a nano-rolling circle amplification-surface plasmon resonance biosensor, 2014, Dachuan Shi, Junfu Huang, Zhengran Chuai, Dong Chen, Xiaoyan Zhu, Huan Wang, Jia Peng, Haiyan Wu, Qing Huang
55. Εικόνα 7.1. Cross Priming Amplification: Mechanism and Optimization for Isothermal DNA Amplification, 2012, Xu,Hu etc
56. Εικόνα 7.2. The development and evaluation of cross-priming amplification (CPA) for the detection of avian reovirus (ARV), Grzegorz Woźniakowski , Jowita Samanta Niczyporuk , Elżbieta Samorek-Salamonowicz and Andrzej Gawel
57. Εικόνα 8.1. Compatible immuno-NASBA LOC device for quantitative detection of waterborne pathogens: design and validation, 2011, Xinyan Zhao, Tao Dong, Zhaochu Yang, Nuno Pires and Nils Høivik
58. Εικόνα 9.1. Advancements and applications of loop-mediated isothermal amplification technology: a comprehensive overview, 2024, Yang, Zhang, Han, Liu, Lu
59. Εικόνα 9.2. LAMP Diagnostics at the Point-of-Care: Emerging Trends and Perspectives for the Developer Community, 2021, Taylor J. Moehling, Gihoon Choi, Lawrence C. Dugan, Marc Salit & Robert J. Meagher
60. Εικόνα 9.3. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) as a rapid and portable diagnostic tool for the detection of pea root rot pathogens, 2025, Alba Pacheco, Samuel Bruty, Henry Tidd.
61. Εικόνα 10.1. Point-of-Care Strategies for Detection of Waterborne Pathogens, 2019, Sandeep Kumar, Monika Nehra, Jyotsana Mehta, Neeraj Dilbaghi, Giovanna Marrazza and Ajeet Kaushik
62. Πίνακας 2.1. Technical aspects and recommendations for single-cell qPCR (Mikael Kubista)

63. Πίνακας 5.1. Helicase-dependent isothermal amplification: a novel tool in the development of molecular-based analytical systems for rapid pathogen detection
64. Πίνακας 8.1. The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples, 2003, Nigel Cook
65. Πίνακας 10.1. Critical review of methods for isothermal amplification of nucleic acids for environmental analysis, 2020, Dana M. Nieuwkerk, Asja Korajkic, Erika L. Valdespino, Michael P. Herrmann, Valerie J. Harwood

Υπέθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν. 1599/1986 και τα άρθρα 2,4,6 παρ. 3 του Ν. 1256/1982, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής εργασίας και δεν προσβάλλει κάθε μορφής πνευματικά δικαιώματα τρίτων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.