



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

*Παθογόνοι και αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί σε σιτηρά και τα
προϊόντα τους – Σύγχρονες μοριακές μεθοδολογίες ανίχνευσης και
παρακολούθησής τους*

Ιωάννα Κυρίτση

Επιβλέπων καθηγητής: Αυγέρης Μαργαρίτης

Πάτρα, Μάρτιος 2025

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

*Παθογόνοι και αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί σε σιτηρά και τα
προϊόντα τους – Σύγχρονες μοριακές μεθοδολογίες ανίχνευσης και
παρακολούθησής τους*

Ιωάννα Κυρίτση

Επιτροπή Επίβλεψης Πτυχιακής / Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Αυγέρης Μαργαρίτης

Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής
Βιοχημείας

Ιατρική σχολή ΕΚΠΑ

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Αικατερίνη Κωνσταντίνου

Συνεργαζόμενο Εκπαιδευτικό Προσωπικό

Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο

Πάτρα, Μάρτιος 2025

*Ιωάννα Κυρίτση,
Παθογόνοι και αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί σε σιτηρά και τα
προϊόντα τους – Σύγχρονες μοριακές μεθοδολογίες ανίχνευσης και
παρακολούθησής τους*

*«Στον σύζυγο μου Φώτη,
για την παρότρυνση, υπομονή και συνεχή στήριξή του»*

Περίληψη

Η ασφάλεια και η ποιότητα των σιτηρών αποτελούν κρίσιμους παράγοντες στη διατροφική αλυσίδα, τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τις βιομηχανίες που επεξεργάζονται ή διακινούν τα προϊόντα τους. Δεδομένων των ευνοϊκών συνθηκών που προσφέρουν οι καρποί των σιτηρών, παθογόνοι και αλλοιωγόντοι μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες, ιοί) μπορούν να αναπτυχθούν κατά τη φάση της καλλιέργειας, της αποθήκευσης ή της μεταποίησης, οδηγώντας σε μυκοτοξινικές επιμολύνσεις και σοβαρά προβλήματα ποιότητας. Στο πλαίσιο αυτό, οι σύγχρονες μοριακές μεθοδολογίες ανίχνευσης διαδραματίζουν καίριο ρόλο, καθώς επιτρέπουν την ταχεία, εξειδικευμένη και υψηλής ευαισθησίας παρακολούθηση μιας ευρείας γκάμας μικροβιακών παραγόντων.

Η παρούσα Εργασία, η οποία βασίζεται σε βιβλιογραφική ανασκόπηση εικοσιδύο (22) σύγχρονων ερευνών (1993–2024), επιχειρεί να καταδείξει την εξελικτική πορεία των μεθόδων εντοπισμού μικροοργανισμών στα σιτηρά και στα προϊόντα τους. Από την ανοσοενζυμική τεχνική ELISA έως τις εξελιγμένες προσεγγίσεις PCR (συμβατική, real-time, multiplex), αλλά και καινοτομίες όπως η μέθοδος «e-nose», γίνεται σαφές ότι η έγκαιρη διάγνωση καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την επιτυχή φυτοπροστασία και ασφάλεια τροφίμων. Παράλληλα, το θέμα της κλιματικής αστάθειας αναδεικνύεται ως καταλύτης αφού ακραία καιρικά φαινόμενα και αυξημένες θερμοκρασίες τροποποιούν τη γεωγραφική κατανομή και την επιθετικότητα ορισμένων παθογόνων, καθιστώντας αναγκαίες ολοκληρωμένες στρατηγικές διαχείρισης.

Η γεωγραφική διασπορά των μελετών —από την Ευρώπη και την Ασία έως την Αφρική και την Ωκεανία— επιβεβαιώνει τη διεθνή εμβέλεια του προβλήματος. Τελικά, η ενσωμάτωση προηγμένων τεχνολογιών ανάλυσης, η ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών και η επιμελής υιοθέτηση μέτρων ελέγχου ποιότητας συγκροτούν το ενιαίο πλαίσιο αντιμετώπισης των παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα σιτηρά, εξασφαλίζοντας την υγιεινή και την υψηλή διατροφική αξία των προϊόντων.

Λέξεις – Κλειδιά:

Σιτηρά, παθογόνοι μικροοργανισμοί, μοριακές μέθοδοι, μυκοτοξίνες.

Abstract

The safety and quality of cereals are critical factors in the food chain, both for humans and for the industries that process or distribute their products. Given the favourable conditions offered by cereal grains, pathogenic and spoilage micro-organisms (bacteria, fungi, viruses) can develop during the cultivation, storage or processing phase, leading to mycotoxin contamination and serious quality problems. In this context, modern molecular detection methodologies play a key role as they allow rapid, specific and highly sensitive monitoring of a wide range of microbial agents.

The present study, which is based on a literature review of twenty-two (22) studies (1993-2024), attempts to demonstrate the evolutionary development of methods for the detection of microorganisms in cereals and their products. From the immunoenzymatic ELISA technique to sophisticated PCR approaches (conventional, real-time, multiplex) and innovations such as the "e-nose" method, it becomes clear that early diagnosis largely determines successful plant protection and food safety. At the same time, the issue of climate instability is emerging as a catalyst: extreme weather events and increased temperatures are modifying the geographical distribution and aggressiveness of certain pathogens, making integrated management strategies necessary.

The geographical spread of this thesis - from Europe and Asia to Africa and Oceania - confirms the international scope of the problem. Finally, the incorporation of advanced analytical technologies, the development of resistant varieties and the diligent adoption of quality control create a coherent framework for dealing with pathogens and spoilage organisms in cereals, ensuring the hygiene and high nutritional value of the products.

Keywords

Cereals, pathogenic microorganisms, molecular methods, mycotoxins.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	v
Abstract	vi
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	ix
Κατάλογος Πινάκων	xi
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xi
ΜΕΡΟΣ Ι.....	1
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Τύπος και Διάρθρωση της Εργασίας.....	1
1.2 Σιτηρά και Διασφάλιση Ποιότητας: Βασικά Χαρακτηριστικά.....	1
1.2.1 Παράγοντες Ποιότητας και Ευπάθειας	2
1.2.2 Εννοϊκοί Παράγοντες για την Ανάπτυξη Παθογόνων	2
1.3. Παθογόνοι, Είδη Μελετών και Εξελιγμένες Τεχνικές Ανίχνευσης	3
1.3.1 Βασικές Κατηγορίες Παθογόνων και Αλλοιωγόνων Μικροοργανισμών	3
1.3.2 Τύποι Ερευνών: Χρονολογικό Εύρος, Γεωγραφική Εμβέλεια και Εξέλιξη των Μεθόδων	3
1.4. Μέθοδοι Ανίχνευσης και Ευρήματα	3
ΜΕΡΟΣ ΙΙ.....	5
2. Μεθοδολογία.....	5
Εισαγωγή.....	5
1. Polymerase chain reaction (PCR) a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food Detection of wheat contamination in non-wheat food products	13
2. Refinement of PCR-detection of Fusarium avenaceum and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to Fusarium tricinctum	15
3. Isolation of Bacillus strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro- organisms	16
4. Microbiology of wheat and flour milling in Australia	17
5. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens	18
6. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain	20
7. Discrimination of Three BYDV Species by One-step RT-PCR-RFLP and Sequence Based Methods in Cereal Plants from the Czech Republic.....	23
8. Molds and Mycotoxin Content of Cereals in Southeastern Romania	25
9. Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China, Ανίχνευση Οχρατοξίνης Α σε Δημητριακά με ci-ELISA	30
10. Fusarium langsethiae - a HT-2 and T-2 Toxins Producer that Needs More Attention .32	
11. Detection and identification of selected cereal rust pathogens by TaqMan® real-time PCR	35
12. From Field to Table: A Review on the Microbiological Quality and Safety of Wheat- Based Products	38
13. Cereal Industry: e-Nose for Real Time and Online Quality and Safety Control and Management	39

14. A survey of the cereal contamination with deoxynivalenol in Romania, for 2011–2013 period.....	42
15. Biochemical Quality Indicators and Enzymatic Activity of Wheat Flour from the Aspect of Climatic Conditions	47
16. Change of Amino Acid Residues in Idiotypic Nanobodies Enhanced the Sensitivity of Competitive Enzyme Immunoassay for Mycotoxin Ochratoxin A in Cereals	50
17. Analysis of total aflatoxins in commercially available cereal products in the Republic of North Macedonia	52
18. Development of a Multiplex RT-PCR Assay for Simultaneous Detection of Ten Major Viral Pathogens of Wheat	54
19. Cereal production in Africa: the threat of current plant pathogens in changing climate review	57
20. Πρόσθετες έρευνες για εξαγωγή απλών δεδομένων για την βιβλιογραφική ανασκόπηση	61
20.1 Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops.	61
20.2 Quality and Safety Traceable Information Mining in Wheat Flour Processing Based on Risk Matrix and Flow Analysis Method	62
20.3 Investigation of 2,4-Dihydroxylaryl-Substituted Heterocycles as Inhibitors of the Growth and Development of Biotrophic Fungal Pathogens Associated with the Most Common Cereal Diseases.	63
Μέρος III.....	65
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	65
3.1 Η Εξέλιξη των Μεθόδων Ανίχνευσης, ο Ρόλος της Κλιματικής Αλλαγής και η Γεωγραφική Διασπορά των Μελετών (1993–2024)	65
3.1.1 Ο Ρόλος της Κλιματικής Αλλαγής και τα Νέα Δεδομένα	66
3.1.2 Η Ευρεία Γεωγραφική Κάλυψη των Μελετών	66
3.2. Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Ανασκόπησης	68
3.3 Σύνοψη Στατιστικών Δεδομένων	73
3.3.1. Ποιες μέθοδοι ανίχνευσης εμφανίζονται και πόσες φορές στις 22 μελέτες	73
3.3.2. Ποιοι τύποι παθογόνων εμφανίζονται και πόσες φορές συνολικά	74
3.3.3. Αντιστοίχιση Μεθόδων Ανίχνευσης – Τύπων Παθογόνων	75
3.3.4. Κατάταξη Μεθόδων βάσει ευαισθησίας & αποτελεσματικότητας (από πιο ευαίσθητη → λιγότερο)	77
3.3.5. Κατάταξη Μεθόδων βάσει χρόνου ανάλυσης (από πιο σύντομη → πιο χρονοβόρα)	78
3.3.6. Κατάταξη Μεθόδων βάσει κόστους (από την πιο φθηνή → ακριβότερη)	79
3.3.7. Κατάταξη Μεθόδων βάσει περιβαλλοντικού αποτυπώματος (από πιο «πράσινη» → λιγότερο)	80
3.3.8. Σύνοψη	81
3.3.9. Τελικό Συμπέρασμα	82
ΜΕΡΟΣ IV	84
4. Συμπεράσματα, Περιορισμοί και Μελλοντικές Προοπτικές	84
4.1. Η Παγκόσμια Διάσταση των Παθογόνων και των Μυκοτοξινών	84
4.2. Η Εξέλιξη των Μεθόδων Ανίχνευσης και η Αξία των Νέων Τεχνολογιών.....	84
4.3. Ο Ρόλος της Κλιματικής Αλλαγής στην Εμφάνιση Παθογόνων	85
4.4. Η Αναγκαιότητα του HACCP ως Προληπτικού Πυλώνα.....	85

4.5. Περιορισμοί της Παρούσας Έρευνας.....	86
4.6. Μελλοντικές Προοπτικές και Πολυδιάστατες Εφαρμογές	87
4.7. Τελική Συμβολή της Μελέτης.....	87
Βιβλιογραφικές Αναφορές	90

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1: Εξειδίκευση της αντίδρασης πολυμεράσης αλυσίδας (PCR) για το σιτάρι και τους ευκαρυώτες. Τζελ αгарόζης χρωματισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο, με προϊόντα ενίσχυσης που προέκυψαν από διαφορετικά δείγματα δημητριακών (10 ng DNA δημητριακών και 1 μg DNA ζύμης). Διάλυος 1: πρότυπο μεγέθους 123 bp (ladder). Διάλυος 2: DNA ζύμης (Promega). Διάλυοι 3–7: πέντε ποικιλίες σιταριού. Διάλυος 8: σίκαλη. Διάλυος 9: βρώμη. Διάλυος 10: κριθάρι Διάλυος 11: ρύζι. Διάλυος 12: καλαμπόκι. Διάλυος 13: κεχρί. Διάλυος 14: αρνητικός μάρτυρας (χωρίς DNA).....σελ14
Εικόνα 2: Τυπικά προφίλ προϊόντων ενίσχυσης PCR από δείγματα τροφίμων. Τζελ αгарόζης χρωματισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο, με προϊόντα ενίσχυσης από διάφορα δείγματα τροφίμων: Y-08: στιγμιαία σάλτσα ολλανδέζ (hollandaise). Z-01: καρύκευμα με βότανα B. Z-04: κάρυ. Διάλυος E: PCR ευκαρυωτών. Διάλυος W: PCR σιταριού.....σελ14
Εικόνα 3: Απεικόνιση Southern blot τριών κλωνοποιημένων θραυσμάτων RAPD (U171, W191 και Y07) από <i>Fusarium avenaceum</i> , τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως ιχνηθέτες ενάντια σε πέψεις με EcoRI DNA από μονοφυή απομονώματα των <i>F. poae</i> (διάδρομος 1), <i>F. graminearum</i> (διάδρομος 2), <i>F. avenaceum</i> (διάδρομος 3) και <i>F. culmorum</i> (διάδρομος 4). Οι ζώνες που υβριδοποιήθηκαν υποδεικνύουν τα μεγέθη των ενισχυμένων θραυσμάτων DNA.15
Εικόνα 4: Ενίσχυση (PCR) τμημάτων DNA με ζεύγη εκκινητών FA-U171/F (πάνελ Α) και FA-1ST/F (πάνελ Β) σε DNA από απομονώματα <i>F. tricinatum</i> (F114, F308, F402, διάδρομοι 1–3) και <i>F. avenaceum</i> (Fub, C2781, διάδρομοι 4–5). Ο διάδρομος 6 αντιστοιχεί σε μάρτυρα αντιδραστηρίων (χωρίς DNA). Οι συγκεκριμένες ζώνες (~345 bp και ~272 bp) υποδεικνύουν τα κύρια προϊόντα ενίσχυσης, ενώ τυχόν επιπλέον ζώνες ή αμυδρή «ουρά» υποδεικνύουν μη ειδικές αντιδράσεις ή primer-dimers.....σελ16
Εικόνα 5: Ανασταλτική δράση του στελέχους <i>Bacillus</i> (IFS-01) έναντι του <i>Penicillium chrysogenum</i> σε τριβλίο καλλιέργειας (κλίμακα = 10 mm). Στο κέντρο διακρίνεται η βακτηριακή αποικία, ενώ περιμετρικά φαίνεται η περιορισμένη ανάπτυξη του μύκητα.....σελ17
Εικόνα 6: Αλληλεπίδραση μεταξύ ενδογενών και εξωγενών παραγόντων στη διατροφική αλυσίδα που επηρεάζουν την ανάπτυξη μούχλας και την παραγωγή μυκοτοξινών στα αποθηκευμένα προϊόντα δημητριακών.....σελ22
Εικόνα 7: Προφίλ περιορισμού απομονωμάτων του ιού BYDV από φυτά στην Τσεχία. Τα προϊόντα PCR χωνεύτηκαν με την ενδονουκλεάση HpaII και διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 2,5%, χρωματισμένο με SybrGreen.....σελ25
Εικόνα 8 - Πίνακας 1: Ποσοστά μόλυνσης από μύκητες σε δείγματα καλαμποκιού (n = 54), σιταριού (n = 35) και κριθαριού (n = 21). Καταγράφονται οι σημαντικότεροι μύκητες που μολύνουν τα δείγματα και η συχνότητά τους ανά κατηγορία.....σελ28
Εικόνα 9 - Πίνακας 2: Επίπεδα μόλυνσης από αφλατοξίνη Β ₁ , δεοξυνιβαλενόλη (DON) και ζεαραλενόνη (ZEA) σε δείγματα καλαμποκιού, σιταριού και κριθαριού.

Συμπεριλαμβάνονται μέσες συγκεντρώσεις (Mean \pm SE), εύρη συγκεντρώσεων και ποσοστά δειγμάτων που υπερβαίνουν τα όρια της ΕΕ.....σελ29	
Εικόνα 10: Καμπύλη πρότυπου διαλύματος της ΟΤΑ στη μέθοδο ci-ELISA. Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο \pm τυπική απόκλιση από τρεις επαναλήψεις.....σελ31	
Εικόνα 11: Χαρακτηριστικά αποικιών του <i>Fusarium langsethiae</i> σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 7 ημέρες. Το χρώμα των αποικιών ποικίλλει από λευκό έως πορτοκαλί και μοβ, ενώ το σχήμα της περιφέρειας μπορεί να είναι είτε ενιαίο είτε λοβωτό. Προσαρμοσμένο από Imathiu 2008a.....σελ34	
Εικόνα 12: Σύγκριση μορφολογίας κονιδίων των <i>Fusarium poae</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i> και <i>Fusarium langsethiae</i> . Το <i>F. langsethiae</i> διακρίνεται από τα ναπιφόρμου έως σφαιρικού σχήματος κονίδια. Προσαρμοσμένο από Knutsen et al., 2004.....σελ35	
Εικόνα 13: Καμπύλες αναφοράς που παρουσιάζουν τη σχέση μεταξύ λογαριθμικών ποσοτήτων DNA (ng) και τιμών κύκλων ενίσχυσης (Cp) στις δοκιμές TaqMan® real-time PCR για τις PSBT, PSstrRPB2, Pg2+BT και Pg2RPB2. Η αποδοτικότητα της ενίσχυσης υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση $E = 10^{(-1/\text{slope})-1}$ (Bustin et al., 2009).....σελ37	
Εικόνα 14: Γράφημα επιπέδων Deoxynivalenol (DON) ανά είδος δημητριακών (2011-2013).....σελ43	
Εικόνα 15: Γράφημα επιπέδων DON ανά γεωγραφική περιοχή και νομό στη Ρουμανία (2011-2013)44	
Εικόνα 16: Χάρτες GIS που απεικονίζουν τις περιοχές της Ρουμανίας με υψηλή μόλυνση από DON (>1000 $\mu\text{g/kg}$) και τη συσχέτισή τους με τα επίπεδα βροχόπτωσης (Μάιος-Ιούνιος) για τα έτη 2011-2013. Οι περιοχές με αυξημένη βροχόπτωση τείνουν να εμφανίζουν μεγαλύτερη μόλυνση από DON.....σελ45	
Εικόνα 17: Φωτογραφίες τομών ψωμιού (εμπλουτισμένου vs. control) από τις αντίστοιχες ποικιλίες και χρόνια. Παρατηρείται μια ελαφρά διαφορά χρώματος κρούστας, ενώ κάποιες φραντζόλες εμφανίζονται πιο «φουσκωμένες» (π.χ. Ap III + alb).....σελ49	
Εικόνα 18: Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής δύο νανοσωμάτων (NCA1 και NCA2).....σελ51	
Εικόνα 19: Τζελ πολυπλεγμένης RT-PCR για τους 10 ιούς χωριστά και σε συνδυασμό (Lane “10-viruses MLX”), επισημαίνοντας τις θέσεις των προϊόντων TriMV (560 bp) και HPV (490 bp).....σελ55	
Εικόνα 20: Παράδειγμα πεδίου δειγμάτων (FS 1–7) από διάφορες περιοχές των ΗΠΑ με πολλαπλές λοιμώξεις, όπου ανιχνεύονται ταυτόχρονα TriMV και HPV μαζί με άλλους ιούς.....σελ56	
Εικόνα 21: Δοκιμές «drop-out» που αναδεικνύουν την απουσία της αντίστοιχης ζώνης όταν λείπει το ζεύγος εκκινητών (π.χ. Lane 10 χωρίς TriMV primers \rightarrow απουσία ζώνης 560 bp).....σελ56	
Εικόνα 22: Ηλεκτροφερογράμματα από καπιλλική ηλεκτροφόρηση όπου κάθε ιός εμφανίζεται ως διακριτή κορυφή (blue peak) με μέγεθος-στόχο.....σελ57	
Εικόνα 23: Διάγραμμα-κύκλος (pie/donut chart) που δείχνει τα 10 κορυφαία αφρικανικά κράτη στην παραγωγή σιτηρών (ως ποσοστά επί του συνόλου της παραγωγής των δέκα χωρών, όχι επί του συνολικού της Αφρικής).....σελ59	
Εικόνα 24: Διάγραμμα-κύκλος που παρουσιάζει την κατανομή/ποσοστό των τυπικών ειδών σιτηρών που καλλιεργούνται στην Αφρική (elements: Maize, Rice, Wheat, Sorghum, Millet, Barley).....σελ60	

Εικόνα 25: Σειρά εικόνων, όπου κάθε τμήμα παρουσιάζει διαφορετικές ενδείξεις/συμπτώματα ασθενειών σε διάφορα σιτηρά.....σελ60	
Εικόνα 26: Παγκόσμιος Χάρτης Προέλευσης Επιστημονικών Ερευνών.....σελ67	
Σχήμα 1.....σελ74	
Σχήμα 2.....σελ75	
Σχήμα 3.....σελ76	
Σχήμα 4.....σελ77	
Σχήμα 5.....σελ78	
Σχήμα 6.....σελ80	
Σχήμα 7.....σελ81	

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Μελέτες σε Χρονολογική Σειρά.....σελ 6	
Πίνακας 2: Συγκεντρωτικά Μελετών Ανίχνευσης Παθογόνων στα Δημητριακά...σελ 69	

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

Συντομογραφία	Ολογράφος / Επεξήγηση
AFB1	Aflatoxin B1 (Αφλατοξίνη B1)
BYDV	Barley Yellow Dwarf Virus (Ιός κίτρινου νανισμού κριθαριού)
CFU	Colony-Forming Units (Μονάδες σχηματισμού αποικιών)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
DON	Deoxynivalenol (δεοξυνιβαλενόλη)
E. coli	Escherichia coli (εντεροβακτήριο)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ανοσοενζυμική μέθοδος προσδιορισμού)
EU	European Union (Ευρωπαϊκή Ένωση)
FAO	Food and Agriculture Organization (Οργανισμός Τροφίμων & Γεωργίας του ΟΗΕ)
GC-MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry (Αέρια χρωματογραφία–φασματομετρία μάζας)
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points (Ανάλυση Κινδύνων & Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου)
HPV	High Plains Virus (Ιός κοινός σε σιτηρά)

HT-2	HT-2 toxin (τοξίνη HT-2, παράγωγο τριχοθαικενών)
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change (Διακυβερνητική Επιτροπή για την Κλιματική Αλλαγή)
ISO	International Organization for Standardization (Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης)
ITS	Internal Transcribed Spacer (Εσωτερική διαγεγραμμένη περιοχή, συχνή σε μοριακούς δείκτες)
LC-MS/MS	Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (Υγρή χρωματογραφία–φασματομετρία μαζών)
MAV	Στέλεχος του Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV-MAV)
MPN	Most Probable Number (μέθοδος εκτίμησης του αριθμού μικροοργανισμών)
NGS	Next-Generation Sequencing (Αλληλούχιση επόμενης γενιάς)
OTA	Ochratoxin A (ωχρατοξίνη Α)
PAS	Στέλεχος του Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV-PAS)
PAV	Στέλεχος του Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV-PAV)
PCR	Polymerase Chain Reaction (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων περιορισμού)
RT-PCR	Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction (αντίστροφη μεταγραφή και PCR)
T-2	T-2 toxin (τοξίνη T-2, παράγωγο τριχοθαικενών)
WSMV	Wheat Streak Mosaic Virus (Ιός μωσαϊκού παστέλωσης σταριού)
ZEA	Zearalenone (ζεαραλενόνη)

ΜΕΡΟΣ Ι

1. Εισαγωγή

1.1 Τύπος και Διάρθρωση της Εργασίας

Η παρούσα εργασία αποτελεί **βιβλιογραφική ανασκόπηση**, η οποία επικεντρώνεται στους παθογόνους και αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς που προσβάλλουν τα σιτηρά και τα προϊόντα τους, καθώς και στις **σύγχρονες μεθοδολογίες** ανίχνευσης και παρακολούθησής τους. Η διάρθρωσή της, σύμφωνα με τη γενική δομή που έχει τεθεί, περιλαμβάνει:

- **Εισαγωγή:** Παρουσίαση του θέματος, σκοπός της εργασίας και σύνοψη του περιεχομένου.
- **Μεθοδολογία:** Τρόπος συλλογής δεδομένων, κριτήρια επιλογής ερευνών, προσεγγίσεις ανάλυσης.
- **Αποτελέσματα και Συζήτηση:** Παρουσίαση ευρημάτων με τεκμηρίωση από την πρόσφατη βιβλιογραφία, σχολιασμός της εξέλιξης των μεθόδων ανίχνευσης, σημασία της κλιματικής αλλαγής και γεωγραφικής κατανομής των μελετών.
- **Συμπεράσματα:** Ανακεφαλαίωση κύριων σημείων και προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.

1.2 Σιτηρά και Διασφάλιση Ποιότητας: Βασικά Χαρακτηριστικά

Τα σιτηρά (δημητριακά) αποτελούν μέλη της οικογένειας **αγροστοδών (Graminae)** και οι καρποί τους —τυπικά ξηροί, με ένα σπέρμα— είναι κοινοί στη διατροφή των ανθρώπων σε παγκόσμια κλίμακα¹. Είδη όπως το **σιτάρι**, το **καλαμπόκι**, η **βρώμη**, το **ρύζι** και άλλα, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην παραγωγή βασικών τροφίμων. Η υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (κυρίως σε άμυλο) και η σημαντική πρωτεΐνη τους καθιστούν τα σιτηρά ουσιώδη στη διατροφή του ανθρώπου και στην παραγωγή ζωοτροφών.

¹ Κεφάλας, Π. (2009). Τρόφιμα από Σιτηρά. *Χημεία – Βιοχημεία – Τεχνολογία*. Εκδόσεις Γαρταγάνης. ISBN: 978-960-418-591-3. Θεσσαλονίκη, Ελλάς, Ε.Ε.

1.2.1 Παράγοντες Ποιότητας και Ευπάθειας

- **Υγρασία και Θερμοκρασία:** Η υγρασία κάτω του 13% (ή ~12% για το ρύζι) αποτελεί «κλειδί» για την ασφαλή αποθήκευση, καθώς αποτρέπει την ανάπτυξη μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών. Η θερμοκρασία, επίσης, παίζει ρόλο στην επιβίωση εντόμων και παθογόνων.
- **Δομή του Κόκκου:** Το **περικάλυμμα**, το **έμβρυο (φύτρο)** και το **ενδοσπέρμιο** είναι τα τρία κύρια μέρη του κόκκου. Η υψηλή περιεκτικότητα σε **άμυλο** και η παρουσία **γλουτένης** (ιδίως στο σιτάρι) επηρεάζουν την τεχνολογική ποιότητα (π.χ. αρτοζυμωτικές ιδιότητες).
- **Χαρακτηριστικά Συντήρησης:** Λόγω της χαμηλής υγρασίας και της δυνατότητας μακροχρόνιας αποθήκευσης, τα σιτηρά θεωρούνται ιδανικά αποθέματα τροφής. Όμως, υπό ακατάλληλες συνθήκες (υψηλή υγρασία, θερμοκρασιακές διακυμάνσεις), εντοπίζονται συχνά προσβολές από μύκητες και βακτήρια ή αυξημένος αριθμός εντόμων.

1.2.2 Ευνοϊκοί Παράγοντες για την Ανάπτυξη Παθογόνων

1. **Αυξημένη Υγρασία (>14%):** Ενθαρρύνει τη βλάστηση σπορίων και την πολλαπλασιασμό μυκήτων.
2. **Θερμές Συνθήκες Αποθήκευσης:** Θερμοκρασίες πάνω από 17°C διευκολύνουν εντομολογικές και μικροβιακές επιμολύνσεις.
3. **Μη Επαρκής Αερισμός:** Οδηγεί σε συμπύκνωση υδρατμών, τοπικές αυξήσεις υγρασίας και μυκητιακή ανάπτυξη.
4. **Μετασυλλεκτικοί Χειρισμοί** (δεν γίνεται έγκαιρη ξήρανση, καθαρισμός κ.λπ.): Αυξάνουν τις πιθανότητες αλλοίωσης.

Με βάση τα παραπάνω, η διασφάλιση ποιότητας στα σιτηρά περιλαμβάνει τον τακτικό έλεγχο υγρασίας, τον έλεγχο εντόμων και την παρακολούθηση τυχόν μυκοτοξινών. Παράλληλα, τα γονιδιακά (ποικιλία, ανθεκτικότητα) και περιβαλλοντικά (κλίμα, εναλλαγές θερμοκρασίας) χαρακτηριστικά καθορίζουν το είδος και την έκταση των επιμολύνσεων.

1.3. Παθογόνοι, Είδη Μελετών και Εξελιγμένες Τεχνικές Ανίχνευσης

1.3.1 Βασικές Κατηγορίες Παθογόνων και Αλλοιωγόνων Μικροοργανισμών

- **Μύκητες** (π.χ. *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.): Κυριότεροι παραγωγοί μυκοτοξινών (DON, αφλατοξίνες, ωχρατοξίνες). Αποτελούν τη συχνότερη αιτία αλλοίωσης (μούχλα) στα αποθηκευμένα σιτηρά.
- **Βακτήρια** (π.χ. *Salmonella*, *E. coli*, *Xanthomonas* spp.): Είτε τροφιμογενή (μολύνουν τελικά προϊόντα), είτε φυτοπαθογόνα που προσβάλλουν την καλλιέργεια και μειώνουν τις αποδόσεις.
- **Ιοί** (π.χ. BYDV, WSMV σε σιτάρι, Maize streak virus): Συχνό ζήτημα στα χωράφια, προκαλούν σημαντική μείωση παραγωγής.
- **Νηματώδεις** (*Pratylenchus*, *Heterodera*): Προσβάλλουν κυρίως τις ρίζες, προκαλώντας εξασθένηση των φυτών.

1.3.2 Τύποι Ερευνών: Χρονολογικό Εύρος, Γεωγραφική Εμβέλεια και Εξέλιξη των Μεθόδων

Η εργασία αντλεί δεδομένα από 22 επιλεγμένες μελέτες, που εκτείνονται από το 1993 έως το 2024. Αφορούν ερευνητικά κέντρα και φορείς σχεδόν όλων των ηπείρων (Ευρώπη, Ασία, Αφρική, Αυστραλία, Βόρεια/Νότια Αμερική), καταδεικνύοντας την παγκόσμια διάσταση των προβλημάτων ασφάλειας των σιτηρών. Οι πρώτες μελέτες (δεκαετία 1990) στηρίχθηκαν κυρίως σε κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους (καλλιέργειες, δοκιμές σε θρεπτικά υλικά), καθώς και σε ανοσολογικά πρωτόκολλα τύπου ELISA. Από το 2000 κι έπειτα, η PCR (συμβατική, Real-time, multiplex) αποκτά κεντρικό ρόλο, ενώ μετά το 2010 εμφανίζονται καινοτομίες όπως η ηλεκτρονική «μύτη» (e-nose), τα νανοσώματα σε ανταγωνιστικές ELISA, καθώς και οι πολυπλεγμένες RT-PCR για ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών ιών. Ο φασματομετρικός έλεγχος (LC-MS/MS) για μυκοτοξίνες καθίσταται, επίσης, πρότυπο σε βιομηχανικά εργαστήρια ελέγχου.

1.4. Μέθοδοι Ανίχνευσης και Ευρήματα

1. **Μικροβιολογικές Μέθοδοι:** Καλλιέργειες και μορφολογική ταυτοποίηση (παλαιότερες εφαρμογές, δεκαετίες '90-'00).

2. **Ανοσολογικές Προσεγγίσεις:** Ανταγωνιστική ELISA για μυκοτοξίνες (αφλατοξίνες, DON, ωχρατοξίνη Α), γρήγορα screening kits. Πολύ συχνά σε μονάδες παραγωγής αλεύρων.
3. **Μοριακές Τεχνικές:** PCR/RT-PCR (ανίχνευση βακτηρίων, ιών, μυκήτων), Real-time PCR (ποσοτικός προσδιορισμός), multiplex PCR (ταυτόχρονη διάγνωση 5-10 παθογόνων).
4. **Φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS):** Ακριβής μέτρηση επιπέδων μυκοτοξινών σε ελάχιστα ppb.
5. Σύστημα **e-nose:** Real-time ανίχνευση πτητικών ενώσεων από μύκητες/βακτήρια, πιο πρόσφατες εφαρμογές.

Η σύγκριση των ευρημάτων δείχνει ότι:

- Οι **μύκητες** (*Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*) επιβεβαιώνονται ως κυριότερη πηγή αλλοίωσης και μυκοτοξινών σε παγκόσμια κλίμακα.
- Η **βελτίωση** των μοριακών εργαλείων (PCR → Real-time → Multiplex) επιτρέπει πιο **αξιόπιστη** και **ταχεία** διάγνωση, ειδικά για ιούς και βακτήρια.
- Τα **νέα δεδομένα της κλιματικής αλλαγής** υπογραμμίζουν μετατοπίσεις ή έξαρση παθογόνων, ιδίως σε τροπικές/υποτροπικές ζώνες (καλαμπόκι, ρύζι).
- Η γεωγραφική **εμβέλεια** (Αφρική, Ασία, Ευρώπη, Αμερική, Αυστραλία) επιβεβαιώνει τον οικουμενικό χαρακτήρα του ζητήματος.

Με βάση την ανάλυση αυτή, αποδεικνύεται η σημασία της **πολυεπίπεδης τεχνογνωσίας**: από κλασικές μοριακές/ανοσολογικές δοκιμές έως εξελιγμένες φασματομετρικές προσεγγίσεις, διαγνωστικές πλατφόρμες real-time και ολοκληρωμένα συστήματα ελέγχου ποιότητας (HACCP - Hazard Analysis and Critical Control Points – Ανάλυση Κινδύνων και Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου) σε όλα τα στάδια — από το χωράφι έως το τελικό προϊόν.

Στις επόμενες ενότητες θα παρουσιαστούν αναλυτικά η Μεθοδολογία (πώς συλλέχθηκαν τα δεδομένα, κριτήρια συμπερίληψης των 22 ερευνών κ.λπ.) και, στη συνέχεια, τα αποτελέσματα μαζί με συζήτηση για την εξειδικευμένη αξιολόγηση καθενός τύπου μελέτης.

ΜΕΡΟΣ II

2. Μεθοδολογία

Εισαγωγή

Η αναγνώριση και η παρακολούθηση των παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα σιτηρά, είτε αυτά βρίσκονται στο στάδιο της καλλιέργειας είτε είναι ήδη παραγόμενα τρόφιμα, αποτελούν κρίσιμους παράγοντες για την ασφάλεια και την ποιότητα της διατροφικής μας αλυσίδας. Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας, πραγματοποιήσαμε μία ευρεία βιβλιογραφική ανασκόπηση των διαθέσιμων μεθόδων ανίχνευσης και διάγνωσης, με αφετηρία τη δεκαετία του 1990 έως και σήμερα. Μέσω αυτής της ιστορικής διαδρομής, επιδιώκουμε να αναδείξουμε την εξελικτική πορεία των τεχνολογιών και των διαδικασιών που έχουν εφαρμοστεί τα τελευταία 30+ χρόνια, εστιάζοντας στην αποτελεσματικότητα, την εξειδίκευση και την καινοτομία που διακρίνουν τις σύγχρονες πρακτικές.

Οι μελέτες που εξετάσαμε (συνολικά 22 σε αριθμό) αφορούν ερευνητικές εργασίες και άρθρα που είτε επικεντρώνονται σε σιτηρά κατά τη φάση της καλλιέργειάς τους (λ.χ. στάρι, κριθάρι, καλαμπόκι, ρύζι, σόργο) είτε σε σιτηρά ως τρόφιμα που διατίθενται στην αγορά ή βρίσκονται σε στάδιο μεταποίησης. Στο εύρος αυτό, εντοπίζονται διάφοροι παθογόνοι και αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί, κυρίως μύκητες (π.χ. *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*), βακτήρια (π.χ. *Xanthomonas*, *Pseudomonas*), ιοί (π.χ. *Maize streak virus*, *Barley Yellow Dwarf Virus*) και –σε κάποιες περιπτώσεις– νηματώδεις. Παράλληλα, συζητούμε τις τεχνικές και τα πρωτόκολλα που αξιοποιήθηκαν περισσότερο, όπως μοριακές μέθοδοι (qPCR, NGS, μοριακές πλατφόρμες DNA microarray), ανοσοβιολογικές δοκιμασίες (ELISA), αναλύσεις μεταβολομικής (LC-MS/MS, GC-MS), καθώς και κλασικές μικροβιολογικές προσεγγίσεις (καλλιέργειες, βιοχημικές δοκιμές).

Σε πρώτο στάδιο, η αναζήτηση των σχετικών μελετών πραγματοποιήθηκε σε τρεις κυρίως βάσεις δεδομένων: Google Scholar, PubMed και στην ηλεκτρονική πλατφόρμα της Εθνικής Βιβλιοθήκης της Ελλάδος (EBE). Η συγκεκριμένη βιβλιοθήκη, πέρα από τις κλασικές έντυπες συλλογές της, παρέχει πρόσβαση σε πληθώρα επιστημονικών περιοδικών και εξειδικευμένων ιστότοπων, γεγονός που διευκόλυνε σε μεγάλο βαθμό τον εντοπισμό άρθρων και ερευνών με θεματολογία γύρω από την ανίχνευση και τον έλεγχο παθογόνων οργανισμών και μυκοτοξινών στα δημητριακά.

Συγκεντρώσαμε συνολικά 28 δυνητικές πηγές, επιδιώκοντας να καλύψουμε τις πιο πρόσφατες και ουσιαστικές εξελίξεις στη μικροβιολογική και χημική ανάλυση δημητριακών, με στόχο να κατανοήσουμε σε βάθος τους εντοπισμούς παθογόνων και τις συναφείς μεθόδους πρόληψης. Η βασική επιδίωξη ήταν να εντοπιστούν τεχνικές υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας—από κλασικές ανοσοενζυμικές δοκιμές και μοριακές προσεγγίσεις PCR, έως καινοτόμα ενζυμικά και φασματομετρικά εργαλεία—προκειμένου να διασφαλιστεί η ποιότητα και η ασφάλεια των δημητριακών προϊόντων σε όλα τα στάδια της παραγωγής. Με γνώμονα τα τελικά μας συμπεράσματα, που αφορούν τη σημασία συνδυαστικών και ταχείας απόκρισης μεθόδων (π.χ. multiplex RT-PCR ή ανταγωνιστική ELISA) και την ανάγκη ενσωμάτωσής τους σε ένα ολοκληρωμένο σύστημα ελέγχου, επιλέξαμε 22 εργασίες που καλύπτουν επαρκώς τόσο τις τεχνικές ανάλυσης όσο και τα σχετικά βιολογικά και περιβαλλοντικά δεδομένα. Ακολουθεί

κατάλογος με όλες τις εργασίες που συγκεντρώθηκαν αρχικά, ενώ στη συνέχεια παρατίθενται οι λόγοι απόρριψης ορισμένων εξ αυτών.

Πίνακας 1: Μελέτες σε Χρονολογική Σειρά

A/A	Τίτλος Εργασίας	Συγγραφείς	Χρονιά Δημοσίευσης	Περιγραφή
1	The Applicability of Emmerling's Principle ('Mould Test') in Food Microbiology	E. L. Krugers Dagneaux, D. A. A. Mossel	1959	Ανάλυση της εφαρμογής του τεστ μούχλας για τον έλεγχο τροφίμων.
2	Polymerase Chain Reaction (PCR): A Possible Alternative to Immunochemical Methods	Michael Allmann, Urs Candrian, Christiane Hofelein, Jurg Lüthy	1992	Χρήση της PCR για την ανίχνευση μόλυνσης από σιτάρι σε μη σιτηρά τρόφιμα.
3	Refinement of PCR-detection of Fusarium avenaceum	A. S. Turner, A. K. Lees, H. N. Rezanoor, et al.	1998	Βελτίωση μεθόδων PCR για την ανίχνευση του Fusarium avenaceum.
4	Isolation of Bacillus Strains from the Rhizosphere of Cereals	T. FoËldes, I. BaÂnhegyi, Z. Herpai, et al.	2000	Απομόνωση και ανάλυση στελεχών Bacillus από τη ριζόσφαιρα δημητριακών.
5	Microbiology of Wheat and Flour Milling in Australia	Lana K. Berghofer, Ailsa D. Hocking, Di Miskelly, et al.	2002	Μικροβιολογική ανάλυση του σίτου και της διαδικασίας άλεσης αλευριού στην Αυστραλία, με έμφαση στους παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιολογική ποιότητα.
6	Standardization of Diagnostic PCR for the Detection of Foodborne Pathogens	Burkhard Malorny, Panayotis T. Tassios, Peter Rådström, et al.	2003	Τυποποίηση της διαγνωστικής PCR για την ανίχνευση παθογόνων τροφίμων, με έμφαση στην

				εναρμόνιση και την τυποποίηση.
7	Photoluminescence Evaluation of Cereals for Quality Control Application	T. Katsumata, T. Suzuki, H. Aizawa, E. Matashige	2005	Χρήση της φωτοφωταύγειας για μη καταστρεπτικό έλεγχο ποιότητας δημητριακών.
8	Post-harvest Control Strategies: Minimizing Mycotoxins in the Food Chain	Naresh Magan, David Aldred	2007	Στρατηγικές ελέγχου για τη μείωση των μυκοτοξινών στην τροφική αλυσίδα μετά τη συγκομιδή.
9	Discrimination of Three BYDV Species by One-step RT-PCR-RFLP and Sequence-Based Methods	J.K. Kundu, J. Jarošová, S. Gadiou, et al.	2009	Ανίχνευση και διάκριση ειδών BYDV με τεχνικές RT-PCR-RFLP.
10	Molds and Mycotoxin Content of Cereals in Southeastern Romania	C. Tabuc, D. Marin, P. Guerre, et al.	2009	Ανάλυση μυκήτων και μυκοτοξινών στα δημητριακά της νοτιοανατολικής Ρουμανίας, εστιάζοντας σε AFB1, DON και ZEA.
11	Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination	Aihua Zhang, Yanna Ma, Lulu Feng, et al.	2011	Ανάπτυξη μεθόδου ELISA για την ανίχνευση ωχρατοξίνης Α στα δημητριακά.
12	Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops	Author(s): Dimitrios I. TSITSIGIANNIS, Myrto DIMAKOPOULOU, Polymnia P. ANTONIOU and Eleftherios C. TJAMOS	2012	Στρατηγικές ελέγχου μυκοτοξιγόνων μυκήτων (π.χ. Aspergillus, Fusarium, Penicillium) σε καλλιέργειες (δημητριακά).

13	Fusarium langsethiae - a HT-2 and T-2 Toxins Producer that Needs More Attention	Samuel M. Imathiu, Simon G. Edwards, Rumiana V. Ray, et al.	2013	Μελέτη για το Fusarium langsethiae ως παραγωγό τοξινών HT-2 και T-2.
14	Detection and Identification of Four Common Rust Pathogens of Cereals	Julie Carey, Sylvia K. Wilson, Raymond Tropiano, et al.	2014	Ανίχνευση κοινών παθογόνων σκωριάσεων δημητριακών μέσω PCR.
15	Detection and identification of selected cereal rust pathogens by TaqMan real-time PCR	Miao Liu, Elisa McCabe, Julie T. Chapados, et al.	2015	Χρήση της τεχνολογίας TaqMan PCR για την ανίχνευση παθογόνων σκωριάσεων δημητριακών.
16	From Field to Table: A Review on the Microbiological Quality and Safety of Wheat-Based Products	Luis Sabillon, Andreia Bianchini	2016	Ανασκόπηση της μικροβιολογικής ποιότητας και ασφάλειας προϊόντων σίτου, με έμφαση στην αλυσίδα παραγωγής.
17	Quality and Safety Aspects of Cereals (Wheat) and Their Products	Theo Varzakas	2016	Μελέτη για την ποιότητα και ασφάλεια των δημητριακών και των προϊόντων τους.
18	Cereal Industry: e-Nose for Real Time and Online Quality and Safety Control and Management	Federica Cheli, Luciano Pinotti, Matteo Ottoboni, Marco Tretola, Vittorio Dell'Orto	2016	Εφαρμογή της τεχνολογίας e-Nose για έλεγχο ποιότητας και ασφάλειας δημητριακών σε πραγματικό χρόνο.
19	A Survey of the Cereal Contamination with Deoxynivalenol in	Valeria Gagliu, Elena Mateescu, Irina Smeu, et al.	2017	Έρευνα για τη μόλυνση των δημητριακών στη Ρουμανία με δεοξυνιβαλενόλη, λαμβάνοντας

	Romania, 2011– 2013			υπόψη γεωγραφικούς, μετεωρολογικούς και υδρολογικούς παράγοντες.
20	Biochemical Quality Indicators and Enzymatic Activity of Wheat Flour	Jelena Tomic, Aleksandra Torbica, Miona Belovic, et al.	2018	Μελέτη των ενζυμικών δραστηριοτήτων και βιοχημικών δεικτών που επηρεάζουν την ποιότητα του αλευριού.
21	Quality and Safety Traceable Information Mining in Wheat Flour Processing	Qian Jianping, Song Yingzhuo, Wang Shanshan, et al.	2019	Ανάλυση και εξόρυξη δεδομένων για την ιχνηλασιμότητα ποιότητας και ασφάλειας στην παραγωγή αλεύρου, χρησιμοποιώντας μεθόδους ανάλυσης κινδύνου.
22	Change of Amino Acid Residues in Idiotypic Nanobodies Enhanced the Sensitivity of Competitive ELISA	Caixia Zhang, Weiqi Zhang, Xiaoqian Tang, et al.	2020	Βελτίωση της ευαισθησίας ανοσοδοκιμών μέσω τροποποίησης υπολειμμάτων αμινοξέων σε νανοσώματα για την ανίχνευση μυκοτοξινών.
23	Analysis of Total Aflatoxins in Commercially Available Cereal Products in North Macedonia	Elena Dimovska, Zoran Zhivikj, Elizabeta Gavazova, et al.	2022	Ανάλυση της παρουσίας αφλατοξινών σε εμπορικά προϊόντα δημητριακών στη Βόρεια Μακεδονία.
24	Genetic Control of Grain Amino Acid Composition in a	Joseph Oddy, Monika Chhetry, Rajani Awal, et al.	2023	Έλεγχος της γενετικής σύνθεσης

	UK Soft Wheat Mapping Population			αμινοξέων στα δημητριακά με χρήση πληθυσμών χαρτογράφησης.
25	Detection of Viral Pathogens in Wheat Using Multiplex RT-PCR	Mahua Deb, Joseph M. Anderson, Steven R. Scofield	2023	Ανάπτυξη μεθόδου πολλαπλού RT-PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση ιών σε σιτάρι.
26	Investigation of 2,4-Dihydroxylaryl-Substituted Heterocycles	Klaudia Rząd, Aleksandra Nucia, Weronika Grzelak, et al.	2024	Μελέτη ετεροκυκλικών ενώσεων για την αντιμετώπιση βιοτροπικών παθογόνων μυκήτων.
27	Omics and System Biology Approaches for Delivering Better Cereals	Dinesh Kumar Saini, Chittaranjan Kole	2024	Εφαρμογές των ομικών και της συστημικής βιολογίας για την ανάπτυξη ανθεκτικότερων δημητριακών.
28	Cereal production in Africa: the threat of current plant pathogens in changing climate - a review	Joshua Benjamin, David Olayinka Oyedokun, Emmanuel Victor Oziegbe, et al.	2024	Ανασκόπηση για τους φυτοπαθογόνους οργανισμούς στα δημητριακά υπό την επίδραση της κλιματικής αλλαγής.

*Σημείωση στον Πίνακα 1: Ο χρωματισμός με κόκκινο υποδεικνύει τις πηγές που απορρίφθηκαν.

Από τη συλλογή των 28 εργασιών, επιλέχθηκαν οι είκοσι δύο που εντάσσονται πιο στενά στο σκοπό της ανασκόπησης· η πρώτη—“The Applicability of Emmerling's Principle (‘Mould Test’) in Food Microbiology” (1959)—ενσωματώθηκε κυρίως ως ιστορική αναφορά, υπογραμμίζοντας το πώς η ανίχνευση μολύνσεων σε δημητριακά αποτέλεσε διαχρονικό αντικείμενο ερευνητικού ενδιαφέροντος. Οι υπόλοιπες πέντε που αποκλείστηκαν αφορούν: το «Photoluminescence Evaluation of Cereals for Quality Control Application» (αρ. 7), το «Quality and Safety Traceable Information Mining in Wheat Flour Processing» (αριθ. 20) που ήταν κυρίως στα κινεζικά και εστίαζε στη ροή παραγωγής αντί στις διαγνωστικές μεθόδους, το «Genetic Control of Grain Amino Acid Composition in a UK Soft Wheat Mapping Population» (αριθ. 23) με εστίαση κατά βάση σε γενετικές βελτιώσεις, καθώς και το «Omics and System Biology Approaches for Delivering Better

Cereals» (αριθ. 26), που αναλύει ανεπτυγμένες “omics” προσεγγίσεις πέραν του πρακτικού αντικειμένου της παρούσας ανασκόπησης.

Πιο αναλυτικά:

1. The Applicability of Emmerling's Principle ('Mould Test') in Food Microbiology (1959)²
Παρότι ανατρέπει στις απαρχές των ελέγχων μικροβιολογίας σε δημητριακά και χρησιμοποιείται εν μέρει ως ιστορική αναφορά, αυτή η μελέτη δεν είχε θέση στις τελικές είκοσι δύο που μας ενδιέφεραν, καθώς επικεντρωνόταν περισσότερο στην πρωτογενή εφαρμογή της αρχής του Emmerling για τους μύκητες—μια μέθοδο αρκετά περιορισμένη σε σύγκριση με τις σύγχρονες διαγνωστικές τεχνικές. Χρησιμοποιούμε όμως το περιεχόμενό της, σε πλαίσιο ιστορικής επισκόπησης, για να αναδείξουμε πώς η αναζήτηση και η ανάγκη ανίχνευσης παθογόνων στα δημητριακά μάς απασχολεί διαχρονικά, από τη δεκαετία του '50 μέχρι σήμερα.

2. Photoluminescence Evaluation of Cereals for Quality Control Application (2005)³
Η συγκεκριμένη εργασία, ενώ εξετάζει μια ενδιαφέρουσα τεχνική φθορισμού για έλεγχο ποιότητας στα δημητριακά, δεν εστίαζε στη μικροβιολογική ασφάλεια ή στους τρόπους εντοπισμού παθογόνων και μυκοτοξινών. Αντιθέτως, επικεντρωνόταν σε μεθόδους μέτρησης της φωταύγειας για φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, στοιχείο που ξεφεύγει από τους βασικούς στόχους της ανασκόπησης μας περί ανίχνευσης κινδύνων ασφάλειας τροφίμων.

3. Detection and identification of four common rust pathogens of cereals. Carey, J., Wilson, S. K., Tropiano, R., et al. (2014)⁴

Παρότι προσεγγίζει θέματα μοριακής ταυτοποίησης παθογόνων, βρέθηκε ότι καλύπτεται πληρέστερα από νεότερες έρευνες (όπως η αντίστοιχη TaqMan® real-time PCR του 2015). Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη εργασία δεν περιείχε πιο εκτενή συγκριτική αξιολόγηση, θεωρήθηκε λιγότερο επικαιροποιημένη για τους στόχους της παρούσας ανασκόπησης.

4. Quality and safety aspects of cereals (wheat) and their products. Varzakas, T. (2016)⁵
Παρότι περιλαμβάνει πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών, δεν πρόκειται για πρωτότυπη έρευνα, αλλά για επισκόπηση που δεν εστίαζε σε συγκεκριμένα πειραματικά αποτελέσματα σχετικά με εντοπισμό παθογόνων. Η απόφαση απόρριψης συνδέεται με την ερευνητική στόχευση της εργασίας μας, που αφορούσε κυρίως νεότερα εργαστηριακά και βιομηχανικά πρωτόκολλα ταχείας ανάλυσης.

²Kruger Dagneaux, E.L., Mossel, D.A.A. The applicability of Emmerling's principle ("mould test") in food microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek* 25, 152–160 (1959).
<https://doi.org/10.1007/BF02542841>

³Katsumata, T., Suzuki, T., Aizawa, H., & Matashige, E. (2005). Photoluminescence evaluation of cereals for a quality control application.

https://www.researchgate.net/publication/248514854_Photoluminescence_evaluation_of_cereals_for_a_quality_control_application

⁴ Liu, M., McCabe, E., Chapados, J. T., Carey, J., Wilson, S. K., Tropiano, R., ... Hambleton, S. (2015). Detection and identification of selected cereal rust pathogens by TaqMan® real-time PCR. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37(1), 92–105. <https://doi.org/10.1080/07060661.2014.999123>

⁵ Varzakas T. (2016). Quality and Safety Aspects of Cereals (Wheat) and Their Products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(15), 2495–2510.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2013.866070>

5. Genetic Control of Grain Amino Acid Composition in a UK Soft Wheat Mapping Population (2023) ⁶

Επικεντρωμένη κατεξοχήν σε γενετικές πτυχές της βελτίωσης σιταριού, και ειδικότερα στον έλεγχο της σύστασης αμινοξέων μέσω χαρτογράφησης πληθυσμών, αυτή η δημοσίευση ελάχιστα άγγιζε ζητήματα σχετικά με την ανίχνευση ή τον περιορισμό μικροβιολογικών και τοξικολογικών παραγόντων. Εν τέλει, κρίθηκε πως δεν καλύπτει τον άμεσο σκοπό της ανασκόπησής μας, που αφορά τις μεθόδους προστασίας και ασφάλειας από παθογόνα.

6. Omics and System Biology Approaches for Delivering Better Cereals (2024) ⁷

Αν και παρουσιάζει εξελιγμένες «omics» προσεγγίσεις, αυτή η εργασία δεν εντάσσεται στο προφίλ της τρέχουσας ανασκόπησης, αφού εστιάζει πολύ σε μακροπρόθεσμους γενετικούς και λειτουργικούς χειρισμούς βελτίωσης. Δε συνδέεται τόσο με τα βραχυπρόθεσμα εργαλεία ανίχνευσης και περιορισμού παθογόνων ή τοξινών· επομένως αποκλείστηκε με στόχο την εστίαση στις πρακτικές μεθόδους και τα άμεσα συμπεράσματα για την ασφάλεια των δημητριακών.

Η απόρριψη των παραπάνω πέντε εργασιών δεν μειώνει τη σημασία τους για άλλες ερευνητικές κατευθύνσεις, αλλά κρίθηκε αναγκαία εξαιτίας της εστίασης της παρούσας μελέτης σε σύγχρονες, πρακτικές και πρωτότυπες ερευνητικές προσεγγίσεις που αφορούν (α) μεθόδους ανίχνευσης παθογόνων στους καρπούς/άλευρα και (β) τεχνικές διασφάλισης ή αξιολόγησης της ασφάλειας των σιτηρών σε όλα τα στάδια της αλυσίδας.

Στο πλαίσιο μίας σύντομης ιστορικής αναδρομής λοιπόν, όπως σημειώθηκε και παραπάνω, αναφέρουμε την έρευνα “*The Applicability of Emmerling’s Principle*”⁸ των E. L. Krugers Dagneaux και D. A. A. Mossel (1959), θεωρείται ορόσημο στην εισαγωγή πρώιμων εννοιολογικών πλαισίων για τον έλεγχο και την ανίχνευση μικροοργανισμών σε προϊόντα δημητριακών. Σύμφωνα με τις ιστορικές αναφορές, ο Emmerling ανέπτυξε το λεγόμενο “**Mould Test**” ήδη από το **1890**, το οποίο αποτέλεσε την αφετηρία για τη διατύπωση της μετέπειτα γνωστής “**Emmerling’s Principle**”. Το αρχικό αυτό τεστ εστίαζε στην ποσοτική απομόνωση και καταμέτρηση μυκήτων (μούχλας) σε δείγματα σιτηρών, προκειμένου να αξιολογηθεί η μικροβιακή επιβάρυνσή τους. Στη συνέχεια, η παρατήρηση αυτή μετασχηματίστηκε στο “Emmerling’s Principle”, που υπογραμμίζει τη συστηματική και τυποποιημένη αξιολόγηση (μεταξύ άλλων) μυκήτων, βακτηρίων και άλλων αλλοιωτικών μικροοργανισμών στα δημητριακά, ανοίγοντας τον δρόμο για πιο δομημένες και ποσοτικές προσεγγίσεις στον έλεγχο της μικροβιακής ποιότητας των σιτηρών. Παρότι οι μέθοδοι που παρουσιάζονται εκεί ήταν αρκετά πρωτογενείς σε σχέση με τις σύγχρονες, κατέδειξαν πόσο

⁶ Oddy, J., Chhetry, M., Awal, R., Addy, J., Wilkinson, M., Smith, D., King, R., Hall, C., Testa, R., Murray, E., Raffan, S., Curtis, T. Y., Wingen, L., Griffiths, S., Berry, S., Elmore, J. S., Cryer, N., Moreira de Almeida, I., & Halford, N. G. (2023). Genetic control of grain amino acid composition in a UK soft wheat mapping population. *The plant genome*, 16(4), e20335.

<https://doi.org/10.1002/tpg2.20335>

⁷ Saini, D. K., & Kole, C. (Eds.). (2024). *Omics and system biology approaches for delivering better cereals*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781032693385>

⁸ Krugers Dagneaux, E.L., Mossel, D.A.A. The applicability of Emmerling's principle (“mould test”) in food microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek* 25, 152–160 (1959).
<https://doi.org/10.1007/BF02542841>

απαραίτητη είναι η ενδελεχής παρακολούθηση της μικροβιακής επιβάρυνσης στα σιτηρά, θέτοντας βάσεις για περαιτέρω εξειδίκευση στις επόμενες δεκαετίες.

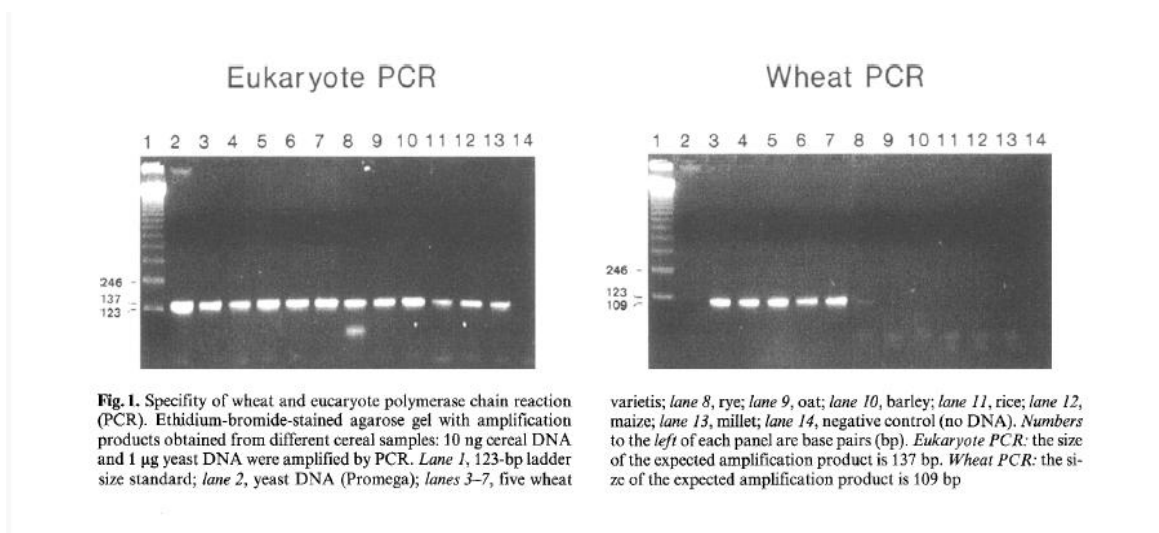
Σημειώνεται, κλείνοντας αυτήν την εισαγωγή πριν περάσουμε στο κύριο μέρος της παρούσας εργασίας, ότι αυτή εκπονήθηκε αποκλειστικά με τη μέθοδο της βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα που παρουσιάζουμε είναι κυρίως ποσοτικού χαρακτήρα, βασισμένα σε δεδομένα που συλλέχθηκαν από επιστημονικές δημοσιεύσεις και περιοδικά υψηλού ακαδημαϊκού κύρους, όπως το *Food Control*, το *Journal of Cereal Science*, το *International Journal of Food Microbiology*, το *Plant Disease*, το *Mycotoxin Research*, κ.ά. Για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά και την ευαισθησία των μεθόδων ανάλυσης ή ανίχνευσης, στηριζόμαστε στα συμπεράσματα που οι ίδιες οι πρωτότυπες δημοσιεύσεις διατυπώνουν. Έτσι, γίνεται φανερό ότι οι τεχνολογικές εξελίξεις στις μεθόδους, από την κλασική μικροβιολογική ταυτοποίηση έως τις σύγχρονες μοριακές και φασματομετρικές προσεγγίσεις, έχουν θέσει νέα δεδομένα για την ασφάλεια και την προστασία των σιτηρών, παρέχοντας ταυτόχρονα τη δυνατότητα εντοπισμού των παθογόνων σε πιο πρώιμα στάδια, αλλά και βελτιωμένου ελέγχου ποιότητας στην αγροδιατροφική αλυσίδα.

1. Polymerase chain reaction (PCR) a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food Detection of wheat contamination in non-wheat food products

Στην έρευνα των Allmann et al. (1993) ⁹ εξετάστηκε η δυνατότητα εφαρμογής μιας PCR-βασισμένης μεθόδου για την ανίχνευση σιταριού (DNA) σε τρόφιμα που υποτίθεται πως είναι μη σιτηρά. Για λόγους εγκυρότητας, σχεδίασαν μια “διπλή PCR”: πρώτα μια “eukaryote PCR” για να επιβεβαιώσουν ότι στο δείγμα υπάρχει επαρκές, ακέραιο ευκαρυωτικό DNA (άρα δεν θα προκύψουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα) και μετά μια “wheat PCR” για την εξειδικευμένη ανίχνευση γονιδιωματικών επαναληπτικών περιοχών του σιταριού. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούσαν να ανιχνεύσουν ποσότητες μέχρι 1 pg DNA, εντοπίζοντας ~0,0001% σιταριού. Οι συγγραφείς συνέκριναν παράλληλα τα ευρήματα με ένα ανοσοχημικό τεστ ενζυμικής ανίχνευσης της γλιαδίνης (Gluten Lab Kit). Τα αποτελέσματα από 35 δείγματα (συμπεριλαμβανομένων σούπες, καρυκεύματα, ρυζάλευρα κ.λπ.) κατέδειξαν ότι ο συνδυασμός PCR & ανοσοδοκιμασίας αποκαλύπτει λεπτομερώς τον τύπο της “μόλυνσης”: π.χ. αλεύρι σιταριού (DNA + γλιαδίνη), καθαρό άμυλο σίτου (DNA+, γλιαδίνη-), ή προσθήκη καθαρής γλιαδίνης (DNA-, γλιαδίνη+). Μερικά δείγματα (όπως κόμμι χαρουπιών) δεν επέτρεψαν αποτελεσματική απομόνωση DNA, οπότε η PCR δεν μπορούσε να εφαρμοστεί. Συνολικά, η PCR έδειξε πολύ χαμηλά επίπεδα σιταριού που το ανοσολογικό τεστ ίσως δε “έβλεπε”, και αντίστροφα. Επίσης, η “eukaryote PCR” εξασφαλίζει ότι οι αρνητικές αποκρίσεις δεν οφείλονταν σε πλήρη αποδόμηση DNA. Η μελέτη λοιπόν καθιστά σαφές ότι η PCR αποτελεί μια αξιόπιστη και συμπληρωματική μέθοδο (σε σχέση με τις ανοσοχημικές), ιδιαίτερα κρίσιμη για τον έλεγχο της ποιότητας και ασφάλειας προϊόντων χαμηλού/μηδενικού γλουτένου.

⁹ Allmann, M., Candrian, U., Höfelein, C., & Lüthy, J. (1993). Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Detection of wheat contamination in non-wheat food products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 196(3), 248–251. <https://doi.org/10.1007/BF01202741>

Η μελέτη κατέδειξε τη σημασία της μοριακής τεχνολογίας για την ανίχνευση ανεπιθύμητων ή κρυφών συστατικών στα τρόφιμα. Η PCR όχι μόνο παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία από τις ανοσοχημικές μεθόδους, αλλά και προσφέρει μια λύση σε περιπτώσεις όπου η υποβάθμιση πρωτεϊνών εμποδίζει τη σωστή ανίχνευση μέσω ανοσολογικών τεχνικών. Για την εποχή, η εφαρμογή της PCR σε επεξεργασμένα τρόφιμα ήταν πρωτοποριακή, θέτοντας τα θεμέλια για σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης που διασφαλίζουν την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων.



Εικόνα 1: Εξειδίκευση της αντίδρασης πολυμεράσης αλυσίδας (PCR) για το σιτάρι και τους ευκαρυώτες. Τζελ αγαρόζης χρωματισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο, με προϊόντα ενίσχυσης που προέκυψαν από διαφορετικά δείγματα δημητριακών (10 ng DNA δημητριακών και 1 μg DNA ζύμης). Διάλυος 1: πρότυπο μεγέθους 123 bp (ladder). Διάλυος 2: DNA ζύμης (Promega). Διάλυοι 3–7: πέντε ποικιλίες σιταριού. Διάλυος 8: σίκαλη. Διάλυος 9: βρώμη. Διάλυος 10: κριθάρι Διάλυος 11: ρύζι. Διάλυος 12: καλαμπόκι. Διάλυος 13: κεχρί. Διάλυος 14: αρνητικός μάρτυρας (χωρίς DNA).

- Οι αριθμοί στα αριστερά των πανέλων αναφέρονται σε ζεύγη βάσεων (bp). Στο πάνελ του PCR ευκαρυωτών, το αναμενόμενο προϊόν ενίσχυσης έχει μέγεθος 137 bp, ενώ στο πάνελ του PCR σιταριού, το αναμενόμενο προϊόν ενίσχυσης έχει μέγεθος 109 bp.

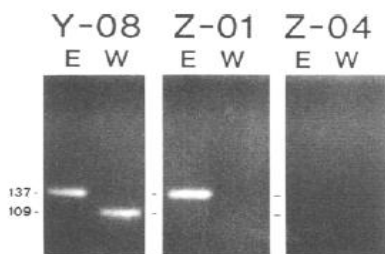


Fig. 2. Typical PCR amplification product profiles of food samples. Ethidium-bromide-stained agarose gel with amplification products obtained from different food samples: Y-08, instant sauce hollandaise; Z-01, condiment with herbs B; Z-04, curry. Lane E, eukaryote PCR; lane W, wheat PCR. Numbers to the left are base pairs (bp)

Εικόνα 2: Τυπικά προφίλ προϊόντων ενίσχυσης PCR από δείγματα τροφίμων. Τζελ αγαρόζης χρωματισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο, με προϊόντα ενίσχυσης από διάφορα δείγματα τροφίμων: Y-08: στιγμιαία σάλτσα ολλανδέζ (hollandaise). Z-01: καρύκευμα με βότανα B. Z-04: κάρυ. Διάλυος E: PCR ευκαρυωτών. Διάλυος W: PCR σιταριού.

- Οι αριθμοί στα αριστερά είναι ζεύγη βάσεων (bp).

2. Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*

Η έρευνα των Turner et al. (1998) [*Plant Pathology*, 47:278–288]¹⁰, αναφέρεται στην βελτίωση της ανίχνευσης του *Fusarium avenaceum*, συνδυάζοντας προσεκτική μελέτη της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ στενά συγγενών ειδών και την ανάπτυξη εξαιρετικά εξειδικευμένων εργαλείων μοριακής διάγνωσης. Η χρήση μεθόδων όπως ITS-RFLP και RAPD αποκάλυψε τη γενετική εγγύτητα μεταξύ *F. avenaceum* και *F. tricinctum*, εξηγώντας τη συχνότητα ψευδών θετικών αποτελεσμάτων με τις υπάρχουσες PCR προσεγγίσεις. Το πρόβλημα αυτό επιλύθηκε μέσω της λεπτομερούς μελέτης RAPD θραυσμάτων, τα οποία αξιολογήθηκαν περαιτέρω με Southern blot για να διασφαλιστεί ότι είναι μοναδικά για το *F. avenaceum*. Η κλωνοποίηση ενός τέτοιου θραύσματος και ο σχεδιασμός των εκκινητών JIAf,r αποτελούν σημαντικό ορόσημο, καθώς αυτά τα νέα εργαλεία επιτρέπουν την ακριβή ανίχνευση του παθογόνου, χωρίς καμία διασταύρωση με συγγενικά είδη.

Η μελέτη επέδειξε ότι οι JIAf,r εκκινητές είναι ικανοί να ανιχνεύουν με υψηλή ευαισθησία το *F. avenaceum* σε σύνθετα δείγματα φυτικού DNA, όπως το σιτάρι, ακόμη και σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (20 pg παθογόνου DNA σε 250 ng φυτικού DNA). Αυτή η επίδοση ενισχύει τη δυνατότητα έγκαιρης διάγνωσης και παρέμβασης στις καλλιέργειες, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου ο μύκητας προκαλεί σοβαρές ασθένειες ή επηρεάζει την ποιότητα και την ασφάλεια των προϊόντων μέσω παραγωγής μυκοτοξινών. Επιπλέον, η εφαρμογή της μεθόδου σε φυσικές συνθήκες μόλυνσης και η αποδεδειγμένη αξιοπιστία της ενισχύουν τη χρησιμότητά της στις γεωργικές και επιδημιολογικές μελέτες.

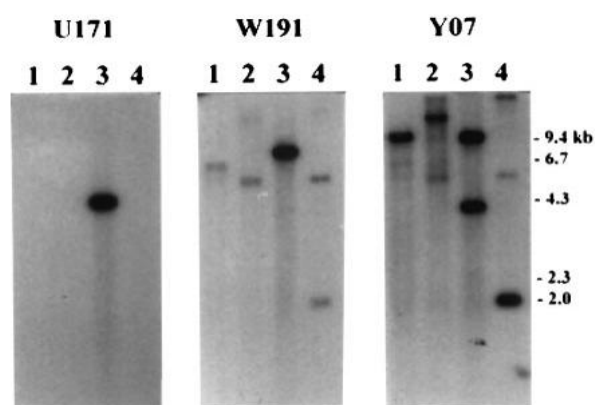


Figure 1 Southern blot analyses of three cloned RAPD fragments from *F. avenaceum*, designated U171, W191 and Y07, used as probes against *EcoRI* digests of DNA from single isolates of *F. poae* (lane 1), *F. graminearum* (lane 2), *F. avenaceum* (lane 3) and *F. culmorum* (lane 4).

Εικόνα 3: Απεικόνιση Southern blot τριών κλωνοποιημένων θραυσμάτων RAPD (U171, W191 και Y07) από *Fusarium avenaceum*, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως ιχνηθέτες ενάντια σε πέψεις με *EcoRI* DNA από μονοφυή απομονώματα των *F. poae* (διάδρομος 1), *F. graminearum* (διάδρομος 2), *F. avenaceum* (διάδρομος 3) και *F. culmorum* (διάδρομος 4). Οι ζώνες που υβριδοποιήθηκαν υποδεικνύουν τα μεγέθη των ενισχυμένων θραυσμάτων DNA.

¹⁰ Turner, A.S., Lees, A.K., Rezanoor, H.N. and Nicholson, P. (1998), Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology*, 47: 278-288. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00250.x>

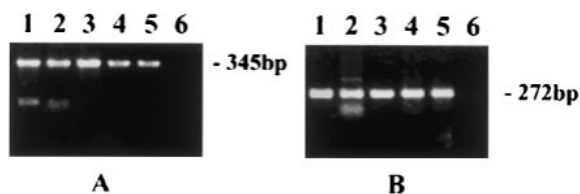


Figure 2 Amplifications using primer pairs FA-U171, r (panel A) and Fa-ITSf, r (panel B) of DNA from *F. tricinctum* isolates F114, F308 and F402 (lanes 1–3) and *F. avenaceum* isolates Fu48 and C2781 (lanes 4 and 5). Lane 6, reagent control (no added DNA). N.B. Primer dimer is visible below the specific product band in panel A, lanes 1 and 2, and consistent, isolate-related nonspecific amplification products are visible as a smear around the specific product band in panel B, lane 2.

Εικόνα 4: Ενίσχυση (PCR) τμημάτων DNA με ζεύγη εκκινητών FA-U171/F (πάνελ A) και FA-1ST/F (πάνελ B) σε DNA από απομονώματα *F. tricinctum* (F114, F308, F402, διάδρομοι 1–3) και *F. avenaceum* (Fub, C2781, διάδρομοι 4–5). Ο διάδρομος 6 αντιστοιχεί σε μάρτυρα αντιδραστηρίων (χωρίς DNA). Οι συγκεκριμένες ζώνες (~345 bp και ~272 bp) υποδεικνύουν τα κύρια προϊόντα ενίσχυσης, ενώ τυχόν επιπλέον ζώνες ή αμυδρή «ουρά» υποδεικνύουν μη ειδικές αντιδράσεις ή primer-dimers.

3. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms

Η έρευνα των Földes et al. (2000)¹¹, στο επιστημονικό τους άρθρο του 2000 ελέγχουν την αντιμικροβιακή δράση στελεχών *Bacillus* από τη ριζόσφαιρα δημητριακών, με σκοπό την ανάδειξη φυσικών βιοπαραγόντων με πιθανή εφαρμογή στη βιολογική προστασία φυτών και τροφίμων. Συνοπτικά, η έρευνα περιλαμβάνει:

- Έλεγχο σε *in vitro* συνθήκες για ανταγωνιστική δράση ενάντια σε φυτοπαθογόνα και παθογόνα τροφίμων (μύκητες/βακτήρια).
- Στόχος της έρευνας είναι η ανάδειξη φυσικών βιοπαραγόντων (BCAs) με εφαρμογές στη «βιολογική προστασία», δηλαδή την ανάπτυξη φυσικών μεθόδων για την προστασία των φυτών και την αποτροπή μικροβιακών μολύνσεων στα τρόφιμα.

Ουσιαστικά η έρευνα των Földes et al. (2000) επιβεβαιώνει την ύπαρξη ανταγωνιστικών στελεχών *Bacillus* στη ριζόσφαιρα δημητριακών που μπορούν να δράσουν ως φυσικοί βιολογικοί παράγοντες προστασίας. Από τα 55 δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν, απομονώθηκαν 25 στελέχη *Bacillus*, εκ των οποίων μόνο το *Bacillus subtilis* IFS-01 επέδειξε ευρύ φάσμα ανταγωνιστικής δράσης ενάντια σε φυτοπαθογόνα και παθογόνα τροφίμων. Αυτό το στέλεχος, που ανήκει στους σπορογόνους, Gram-θετικούς οργανισμούς, ήταν ικανό να αναστείλει την ανάπτυξη ενός μεγάλου αριθμού παθογόνων οργανισμών, όπως μυκήτων (π.χ. *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*) και βακτηρίων (π.χ. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*).

¹¹ Földes T., Bánhegyi I., Herpai Z., Varga L., Szigeti J. (2000). Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 840–846.

Η αντιμικροβιακή δράση του *Bacillus subtilis* IFS-01 φαίνεται να οφείλεται είτε στην παραγωγή μίας ευρείας αντιμικροβιακής ουσίας είτε σε έναν συνδυασμό διαφορετικών μεταβολιτών με δράση κατά διαφόρων τύπων παθογόνων. Συγκεκριμένα, το στέλεχος παρουσίασε ισχυρή ανασταλτική δράση κατά των Gram-θετικών βακτηρίων, ενώ η δράση του κατά των Gram-αρνητικών βακτηρίων και των μυκήτων ήταν επίσης εμφανής, αν και όχι σε όλα τα είδη το ίδιο έντονη.

Η καινοτομία της έρευνας έγκειται στη δυνατότητα χρήσης ενός και μόνο μικροοργανισμού, του *Bacillus subtilis* IFS-01, τόσο για την προστασία των φυτών από μυκητολογικές και βακτηριακές μολύνσεις, όσο και για την προστασία των τροφίμων από παθογόνους μικροοργανισμούς, κάτι που υπογραμμίζει την πρακτική εφαρμογή του για μια βιολογική στρατηγική καταπολέμησης. Η έρευνα αυτή, αν και πραγματοποιήθηκε το 2000, έθεσε τις βάσεις για τη μετέπειτα ανάπτυξη βιολογικών μεθόδων φυτοπροστασίας και βιοσυντήρησης τροφίμων, οι οποίες και συνεχώς εξελίσσονται και εφαρμόζονται στον σύγχρονο αγροτικό και βιομηχανικό τομέα.

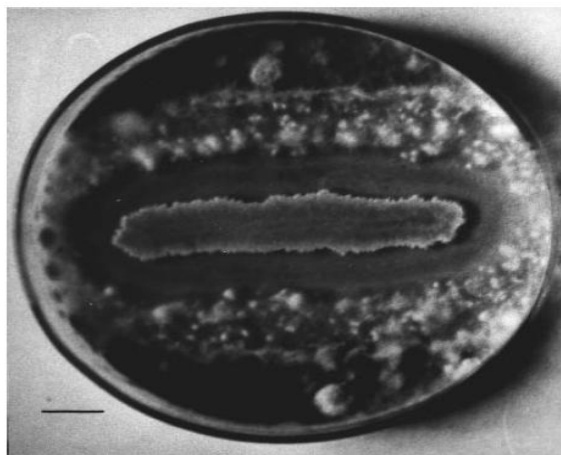


Fig. 1 Inhibitory effect of *Bacillus* isolate IFS-01 on *Penicillium chrysogenum*. Bar = 10 mm

Εικόνα 5: Ανασταλτική δράση του στελέχους *Bacillus* (IFS-01) έναντι του *Penicillium chrysogenum* σε τριβλίο καλλιέργειας (κλίμακα = 10 mm). Στο κέντρο διακρίνεται η βακτηριακή αποικία, ενώ περιμετρικά φαίνεται η περιορισμένη ανάπτυξη του μύκητα

4. Microbiology of wheat and flour milling in Australia

Οι Lana K. Berghofer et al. στο Επιστημονικό τους Άρθρο του 2003 «Μικροβιολογία του σιταριού και των προϊόντων του στην Αυστραλία»¹² διεξάγουν εκτενής επιτόπια έρευνα σε 9 μύλους αλεύρων, δειγματοληψία σε όλα τα στάδια (εισερχόμενο σιτάρι, στάδια άλεσης, τελικά προϊόντα) και τεστ μικροβιολογικών παραμέτρων: γενική αποικία (aerobic mesophilic plate count), coliforms, *Bacillus* spp., *B. cereus*, σπόροι αερόβιων βακτηρίων, θερμόφιλα αερόβια, ζύμες, μύκητες, *E. coli*, *Salmonella*.

Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η μικροβιολογία του σταριού και των τελικών προϊόντων σε 9 αυστραλιανούς μύλους, με δειγματοληψίες στα διάφορα στάδια άλεσης (συνολικά 650

¹² Berghofer, L. K., Hocking, A. D., Miskelly, D., & Jansson, E. (2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *International journal of food microbiology*, 85(1-2), 137–149.
[https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00507-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00507-x)

δείγματα). Στόχος ήταν να αποτιμηθεί η κατανομή κυρίως αερόβιων μεσόφιλων, κολοβακτηρίω, *Bacillus* spp./*B. cereus*, ζυμών, μυκήτων, *E. coli*, *Salmonella* κ.λπ.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εισερχόμενο σιτάρι έχει υψηλούς μικροβιακούς πληθυσμούς (10^5 cfu/g αερόβιων μεσόφιλων), ενώ στο ενδοσπέρμιο τα επίπεδα είναι χαμηλά ($\sim 10^2$ cfu/g). Οι εξωτερικές στιβάδες (πίτουρο, φύτρο) συγκεντρώνουν την πλειονότητα των μικροβίων. Βρέθηκαν *B. cereus* και *Bacillus* spp. (συνήθως $<10^2$ cfu/g), ζύμες/μύκητες (10^2 – 10^3 cfu/g), ενώ η *E. coli* ήταν σπάνια. Η προσθήκη υγρασίας κατά τη διαδικασία προετοιμασίας μπορεί να αυξήσει ορισμένες επιμολύνσεις από το εσωτερικό του εξοπλισμού, αλλά γενικά η τελική ποιότητα στο αλεύρι είναι καλή αν διατηρηθεί επαρκής καθαριότητα του μύλου. Οι συγγραφείς προτείνουν μικροβιολογικές κατευθυντήριες τιμές για το αλεύρι (λ.χ. $<10^4$ μεσόφιλες cfu/g). Συνολικά, η μελέτη υπογραμμίζει τη σημασία της καλής ποιότητας εισερχόμενου σταριού και της υγιεινής συντήρησης εξοπλισμού άλεσης, προκειμένου να επιτυγχάνεται χαμηλό μικροβιακό φορτίο στο τελικό αλεύρι.

Οι μέθοδοι ανάλυσης περιλαμβάνουν συνδυασμό ποσοτικών και επιβεβαιωτικών τεχνικών όπως MPN, μικροσκοπικές εξετάσεις και ειδικά θρεπτικά υποστρώματα. Αυτές οι μέθοδοι έχουν υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση, επιτρέποντας την ακριβή ανίχνευση ακόμη και χαμηλών φορτίων μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, οι *Bacillus* spp. εντοπίζονται συχνά σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, αλλά τα επίπεδά τους μειώνονται σημαντικά στο τελικό προϊόν. Ο *B. cereus* ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα στο 64–94% των δειγμάτων, ενώ *Salmonella* και *E. coli* είναι σχεδόν απύσες, με πολύ σπάνιες εξαιρέσεις.

5. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens

Η μελέτη αυτή δημοσιεύθηκε το 2003 στο περιοδικό *International Journal of Food Microbiology* (διαδικασία υποβολής/έγκρισης: 2001–2002) από τους B. Malorny, P.T. Tassios, P. Rådström, N. Cook, M. Wagner και J. Hoorfar¹³, και αφορά την αναγκαιότητα τυποποίησης (standardization) και εναρμόνισης (harmonization) των πρωτοκόλλων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Προέρχεται από ένα σύνολο ευρωπαϊκών φορέων (π.χ. Federal Institute for Health Protection of Consumers, University of Athens, Lund University κ.ά.) και παρουσιάζει τόσο τα βήματα που απαιτούνται για να υπάρξει ευρεία αποδοχή των μεθόδων PCR στη βιομηχανία τροφίμων, όσο και τα κριτήρια αξιολόγησης στο πλαίσιο έργων όπως το “FOOD-PCR project”.

Οι καθιερωμένες τεχνικές καλλιέργειας των τροφιμογενών παθογόνων, αν και αξιόπιστες, είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες. Η PCR αποτελεί μια ταχύτερη εναλλακτική, με συγκρίσιμη ή και υψηλότερη ευαισθησία κι εξειδίκευση, σε μικρόβια όπως *Salmonella*, *Listeria*

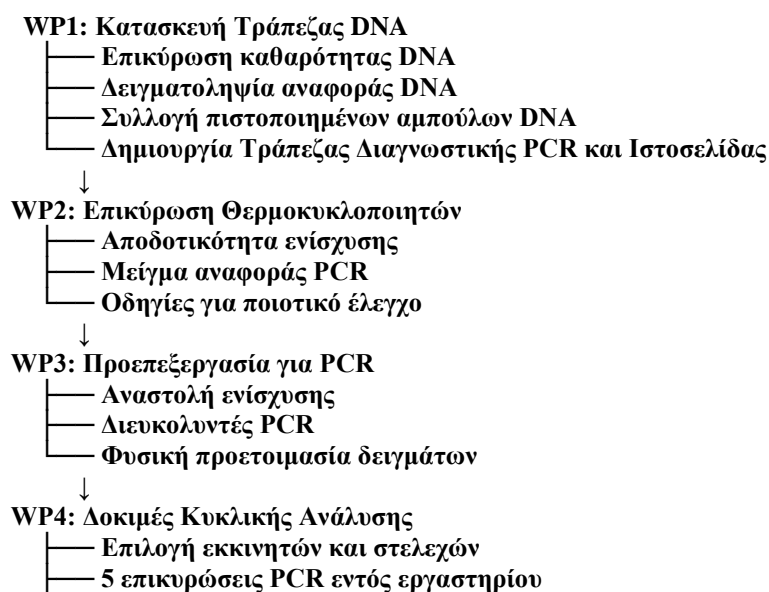
¹³ Malorny B, Tassios PT, Rådström P, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 39–48.

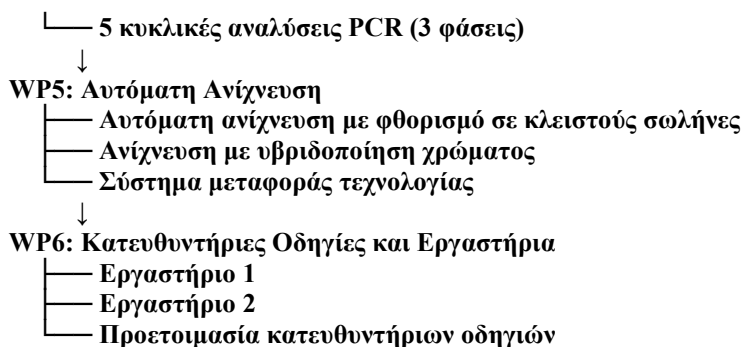
monocytogenes, Campylobacter, E. coli O157 κ.λπ. Ωστόσο, μέχρι την χρονική περίοδο που συντάχθηκε η έρευνα δεν υπήρχαν απόλυτα εναρμονισμένα και επίσημα επικυρωμένα πρωτόκολλα, γεγονός που δυσκόλευε σημαντικά την πλήρη υιοθέτηση της PCR ως μέθοδο αναφοράς στους επίσημους ελέγχους τροφίμων.

Το άρθρο περιγράφει τις ευρωπαϊκές πρωτοβουλίες (FOOD-PCR project κ.ά.) που στοχεύουν στην εναρμόνιση και τυποποίηση των διαγνωστικών μεθόδων PCR. Παρουσιάζει κριτήρια-κλειδιά (π.χ. ευαισθησία, ειδικότητα, ανθεκτικότητα/robustness πρωτοκόλλων, τρόπος ελέγχων για επιμόλυνση, κόστος) και αναλύει τα βήματα που απαιτούνται για να αναγνωριστούν διεθνώς (ISO/CEN). Αναφέρεται σε επιμέρους δυσκολίες (π.χ. διαφοροποιήσεις σε εργαστηριακές συνθήκες, ποιότητα αντιδραστηρίων) και καταλήγει σε προτάσεις για μελλοντικές τεχνολογίες (real-time PCR, RNA-based PCR για έλεγχο βιώσιμων κυττάρων, κ.λπ.).

Παρά το γεγονός ότι η έρευνα αυτή δεν εστιάζει αποκλειστικά στα δημητριακά, έχει άμεση συνάφεια με το αντικείμενό της παρούσας εργασίας, επειδή παρουσιάζει αναλυτικά τη σημασία της τυποποίησης διαγνωστικών μεθόδων PCR για τον εντοπισμό διαφόρων κοινών παθογόνων και αλλοιογόνων που μπορούν να επιμολύνουν ευρύ φάσμα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων και των προϊόντων δημητριακών. Ειδικότερα, μικροοργανισμοί όπως η Salmonella, η Listeria monocytogenes ή η E. coli O157:H7 δύνανται να ανιχνευθούν και σε δείγματα δημητριακών (π.χ. άλευρα, παράγωγα σίτου, ρυζιού, καλαμποκιού κ.λπ.). Η μελέτη περιγράφει τα απαραίτητα βήματα επικύρωσης, τους τυπικούς ελέγχους, τα κριτήρια αξιοπιστίας, καθώς και τις ευρωπαϊκές πρωτοβουλίες που στηρίζουν την εναρμόνιση των PCR-πρωτοκόλλων. Έτσι, οι βασικές αρχές και τα συμπεράσματά της κρίνονται αξιοποιήσιμα στην προσπάθεια καταγραφής μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων και αλλοιογόνων ειδικά στα δημητριακά.

Παρακάτω παρουσιάζεται ένα ενδεικτικό διάγραμμα ροής, που αντανακλά τη δομή και τα «πακέτα εργασίας» (Work Packages, WP) του FOOD-PCR project, όπως εμφανίζονται στο πρωτότυπο Fig. 2 του άρθρου των Malorny et al. (2003), “Structure and components of the FOOD-PCR project”.





Επεξηγήσεις:

1. ΕΕ (Έργο Εργασίας) = WP (Work Package).
2. Κάθε μπλοκ δείχνει ένα βασικό στάδιο/ενέργεια, π.χ. «Δημιουργία τραπεζών DNA», «Επικύρωση καθαρισμού DNA», «5 επικυρώσεις PCR», κ.λπ.
3. Τα βελάκια δείχνουν τη ροή εργασιών ή τη σύνδεση μεταξύ των σταδίων.
4. Το εν λόγω διάγραμμα αποτελεί προσαρμογή στα ελληνικά της Fig. 2 των Malorny et al. (2003), “Structure and components of the FOOD-PCR project”.

6. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain

Η έρευνα αυτή «*Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain*» των Naresh Magan, David Aldred δημοσιευμένη στο *International Journal of Food Microbiology*, Τόμος 119 το 2007, σελ. 131–139¹⁴, εστιάζει στις στρατηγικές ελέγχου μετά τη συγκομιδή (post-harvest) για την ελαχιστοποίηση των μυκοτοξινών που παράγουν οι μύκητες σε δημητριακά και άλλα αμυλούχα προϊόντα. Τονίζει τη σημασία της ορθής διαχείρισης συνθηκών αποθήκευσης και επεξεργασίας, ώστε να περιορίζονται οι κίνδυνοι επιμόλυνσης με παθογόνους μύκητες και μυκοτοξίνες. Σκοπός της έρευνας είναι να παρουσιαστούν οι παράγοντες που οδηγούν σε επιμόλυνση δημητριακών με μύκητες και μυκοτοξίνες, καθώς και στρατηγικές πρόληψης/ελέγχου αυτών των απωλειών και πιθανών κινδύνων για την τροφική αλυσίδα.

Πιο συγκεκριμένα η μελέτη αναφέρεται στη σημασία της διαχείρισης δημητριακών μετά τη συγκομιδή, αναδεικνύοντας τη σύνδεση της υγρασίας, της θερμοκρασίας και άλλων παραγόντων με την ανάπτυξη μυκήτων και την παραγωγή μυκοτοξινών. Ακόμη και μικρές αυξήσεις υγρασίας πάνω από το 14–15% ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων και την παραγωγή τοξινών όπως η ωχρατοξίνη Α (OTA). Σε ψυχρά κλίματα, το *Penicillium verrucosum* αποτελεί τον κυρίαρχο παραγωγό της OTA, ενώ σε θερμότερα κλίματα κυριαρχούν είδη του *Aspergillus*, όπως το *A. ochraceus*. Η ταχεία ξήρανση και η διατήρηση της υγρασίας σε επίπεδα κάτω από το 14% αναφέρονται ως αποτελεσματικά μέτρα για τον περιορισμό αυτής της τοξίνης.

Για το καλαμπόκι, η μελέτη αναφέρει ότι μύκητες όπως το *Fusarium verticillioides* και το *F. graminearum* σχετίζονται με την παραγωγή φουμονισινών και τριχοθαικενών αντίστοιχα, ενώ το *Aspergillus flavus* ευθύνεται για την παραγωγή αφλατοξινών. Μετασυγκομιστικές

¹⁴ Magan N., Aldred D. (2007). Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 131–139. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034

πρακτικές, όπως η ταχεία ξήρανση, ο καθαρισμός και ο έλεγχος των εντόμων, είναι κρίσιμες για την αποτροπή ανάπτυξης αυτών των τοξινών. Επιπλέον, οι τροποποιημένες ατμόσφαιρες, όπως η αύξηση της συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα πάνω από 50%, μπορούν να εμποδίσουν σημαντικά την ανάπτυξη μυκήτων και την παραγωγή τοξινών, αν και η αποτελεσματικότητα ποικίλλει ανάλογα με το είδος του μύκητα.

Κατά την επεξεργασία των δημητριακών, όπως η άλεση, οι μυκοτοξίνες τείνουν να συγκεντρώνονται στα πίτουρα και στα υποπροϊόντα που προορίζονται κυρίως για ζωοτροφές, ενώ το καθαρό αλεύρι περιέχει χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Παρά τις προσπάθειες, οι μυκοτοξίνες συχνά δεν καταστρέφονται πλήρως κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, με αποτέλεσμα να μεταφέρονται στην τροφική αλυσίδα.

Η εφαρμογή συστημάτων HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) αναδεικνύεται ως βασική στρατηγική για τον έλεγχο της ανάπτυξης μυκήτων και της παραγωγής μυκοτοξινών. Κρίσιμα σημεία ελέγχου περιλαμβάνουν τη δειγματοληψία, την τακτική μέτρηση της υγρασίας και της θερμοκρασίας, την ταχεία ξήρανση, την απομάκρυνση εντόμων και παρασίτων, καθώς και τη διατήρηση αεροστεγών περιβαλλόντων αποθήκευσης. Ο έλεγχος της υγρασίας σε επίπεδα κάτω του 14% και η αποτροπή της συγκέντρωσης υπολειμμάτων σε εξοπλισμούς όπως οι δεξαμενές και οι κοχλίες αποτελούν θεμελιώδη βήματα για τη μείωση του κινδύνου.

Η μελέτη τονίζει επίσης τη σημασία της ανάπτυξης νέων εργαλείων ανίχνευσης για τον έγκαιρο εντοπισμό μυκοτοξινών και μυκοτοξινογόνων μυκήτων. Παραδοσιακές μέθοδοι, όπως ο οπτικός έλεγχος, συχνά υποεκτιμούν την πραγματική επιμόλυνση. Προτείνεται η χρήση τεχνικών ταχείας ανίχνευσης, όπως οι βιοαισθητήρες, η φασματομετρία αερίων για τον εντοπισμό πτητικών μεταβολιτών, και η μοριακή ανάλυση με real-time PCR. Η αξιοποίηση αυτών των εργαλείων μπορεί να ενισχύσει την πρόληψη, ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με προγνωστικά μοντέλα που λαμβάνουν υπόψη κλιματικές και περιβαλλοντικές παραμέτρους.

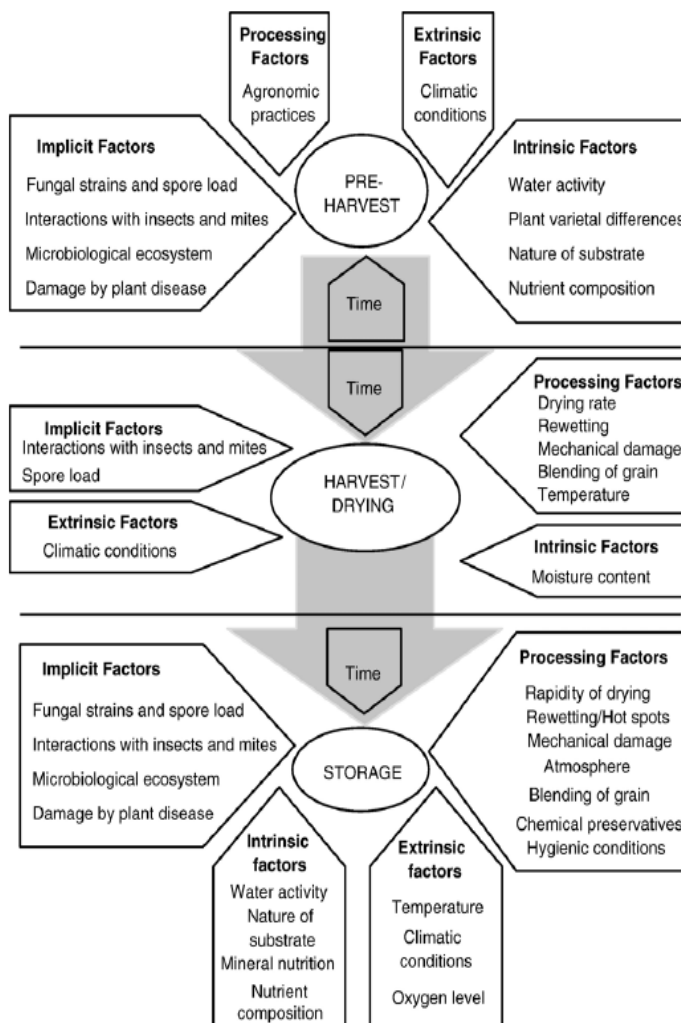


Fig. 1. The interaction between intrinsic and extrinsic factors in the food chain which influences mould spoilage and mycotoxin production in stored commodities (From Magan et al., 2004).

Εικόνα 6: Αλληλεπίδραση μεταξύ ενδογενών και εξωγενών παραγόντων στη διατροφική αλυσίδα που επηρεάζουν την ανάπτυξη μούχλας και την παραγωγή μυκοτοξινών στα αποθηκευμένα προϊόντα δημητριακών.

Το σχήμα παρουσιάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ εσωτερικών (intrinsic) και εξωτερικών (extrinsic) παραγόντων, καθώς και παραγόντων επεξεργασίας (processing factors), που επηρεάζουν την αλλοίωση των δημητριακών και την παραγωγή μυκοτοξινών στη διατροφική αλυσίδα. Χωρίζεται σε τρία στάδια:

1. Προ συγκομιδής (Pre-harvest):

- Εμφανίζονται ενδογενείς παράγοντες, όπως η υδατική δραστηριότητα και η διατροφική σύνθεση των δημητριακών.
- Εξωτερικοί παράγοντες περιλαμβάνουν τις κλιματικές συνθήκες και τις γεωργικές πρακτικές.
- Σημαντικοί έμμεσοι παράγοντες είναι τα φυτοπαθογόνα, η αλληλεπίδραση με έντομα και ακάρεα, καθώς και το μικροβιακό οικοσύστημα.

2. Συγκομιδή και Ξήρανση (Harvest and Drying):

- ο Οι παράγοντες επεξεργασίας περιλαμβάνουν την ταχύτητα ξήρανσης, την αναδιαβροχή, τη θερμοκρασία και τη μηχανική βλάβη των κόκκων.
- ο Εσωτερικοί παράγοντες, όπως η υγρασία, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο.
- ο Έμμεσοι παράγοντες και εξωτερικές κλιματικές συνθήκες επηρεάζουν το μικροβιακό φορτίο και τις αλληλεπιδράσεις με έντομα.

3. Αποθήκευση (Storage):

- ο Παράγοντες επεξεργασίας όπως η αναδιαβροχή, η θερμοκρασία και οι χημικές συντηρητικές μέθοδοι είναι καθοριστικοί για την ποιότητα.
- ο Οι εσωτερικοί παράγοντες (υγρασία, σύνθεση) και οι εξωτερικοί (θερμοκρασία, οξυγόνο) επηρεάζουν την ανάπτυξη μούχλας και την παραγωγή μυκοτοξινών.
- ο Έμμεσοι παράγοντες, όπως οι μυκητιακές καταπονήσεις, συνεχίζουν να παίζουν ρόλο.

7. Discrimination of Three BYDV Species by One-step RT-PCR-RFLP and Sequence Based Methods in Cereal Plants from the Czech Republic

Στην έρευνα των J.K. Kundu, J. Jarošová, S. Gadiou, G. Červená δημοσιευμένη στο *Cereal Research Communications*, Τόμος 37, Αρ. 4, το 2009, σελ. 541–550¹⁵ γίνεται ανάπτυξη και εφαρμογή μεθόδων μοριακής ανίχνευσης (One-step RT-PCR-RFLP, αλληλούχιση) για **BYDV** (*Barley yellow dwarf virus*) σε δείγματα από σιτηρά (κριθάρι, σιτάρι, βρώμη) της Τσεχίας, με σκοπό τη σαφή διάκριση μεταξύ τριών ειδών του ιού: BYDV-PAV, BYDV-PAS και BYDV-MAV.

Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης, η ερευνητική ομάδα ανέπτυξε μια γρήγορη και εξειδικευμένη διαδικασία η οποία βασίστηκε αρχικά στη συλλογή δειγμάτων από κριθάρι, σιτάρι και βρώμη σε διάφορες περιοχές της Τσεχίας κατά την περίοδο 2006–2008, συμπεριλαμβάνοντας 23 φυσικές απομονώσεις καθώς και ένα εργαστηριακό στέλεχος ελέγχου (Blatno85). Η εκχύλιση του RNA έγινε με το Qiagen Plant Mini Kit, χρησιμοποιώντας περίπου 100 mg φυτικού ιστού, αλεσμένου σε υγρό άζωτο για διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού. Στη συνέχεια, η ανίχνευση των τριών ειδών του Barley yellow dwarf virus (PAV, PAS και MAV) επιτεύχθηκε με την προσέγγιση One-step RT-PCR-RFLP, η οποία συνδυάζει σε μια μόνο διαδικασία την αντίστροφη μεταγραφή και

¹⁵ Kundu, J. K., Jarošová, J., Gadiou, S., & Červená, G. (2009). Discrimination of Three BYDV Species by One-step RT-PCR-RFLP and Sequence Based Methods in Cereal Plants from the Czech Republic. *Cereal Research Communications*, 37(4), 541–550. <http://www.jstor.org/stable/23789998>

τη συμβατική PCR, ώστε να παραχθούν προϊόντα του γονιδίου της πρωτεΐνης του καλύμματος (coat protein) μήκους περίπου 461–483 bp. Η ανάλυση RFLP χρησιμοποιώντας, μεταξύ άλλων, το περιοριστικό ένζυμο HpaII, οδήγησε στον διαχωρισμό των τριών ειδών βάσει των χαρακτηριστικών μοτίβων κοπής, με τα διαφορετικά μεγέθη ζωνών να επιβεβαιώνουν τη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ PAV, PAS και MAV. Περαιτέρω επιβεβαίωση δόθηκε με την αλληλούχιση του ίδιου τμήματος, καθώς οι αλληλουχίες των τσεχικών απομονώσεων συγκρίθηκαν με δημοσιευμένα στελέχη βάσει στοίχισης με το CLUSTAL-X¹⁶ (Thompson et al. 1997, και κατασκευής φυλογενετικού δέντρου με τη μέθοδο Neighbor-Joining, ενώ η στατιστική υποστήριξη των κλάδων υπολογίστηκε με 1000 επαναλήψεις¹⁷ (Saitou & Nei, 1987).

Η υψηλή ομοιότητα (97–99%) που εμφάνισαν τα στελέχη εντός της ίδιας ομάδας αντανακλά τη μικρή γενετική απόσταση ανάμεσα σε απομονώσεις του ίδιου είδους, σε αντίθεση με τις αυξημένες δια-ομαδικές διαφορές (90–94%) που επιβεβαιώνουν την ύπαρξη τριών διακριτών γενετικών κλάδων. Με βάση τα αποτελέσματα από τις συγκεκριμένες απομονώσεις, διαπιστώθηκε ότι τα BYDV-PAV και BYDV-PAS εντοπίστηκαν σε σημαντικό βαθμό στην Τσεχία, ενώ τα MAV ήταν λιγότερο συχνά στα δείγματα. Συνολικά, η μέθοδος αποδείχθηκε ιδιαίτερα ευαίσθητη και εξειδικευμένη, καθώς ο συνδυασμός RFLP και αλληλούχισης επέτρεψε τον αξιόπιστο διαχωρισμό των τριών ειδών και συνεπώς τη σαφέστερη επιδημιολογική παρακολούθηση. Επιπλέον, η ευκολία της One-step RT-PCR, που συμπυκνώνει τη φάση της αντίστροφης μεταγραφής και της PCR σε μια μόνο αντίδραση, προσφέρει αποτελέσματα γρήγορα και με χαμηλότερο κόστος από τις παραδοσιακές τεχνικές. Η δυνατότητα, τέλος, να αναλυθεί η γενετική παραλλακτικότητα των απομονώσεων σε επίπεδο νουκλεοτιδίου και αμινοξέων, μέσω της φυλογενετικής προσέγγισης, καθιστά αυτή την προσέγγιση ιδιαίτερα χρήσιμη για την αντιμετώπιση του «κίτρινου νανισμού» σε κριθάρι, καθώς και για την προστασία άλλων σημαντικών σιτηρών στην ευρύτερη γεωγραφική περιοχή.

¹⁶Thomson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>

¹⁷Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

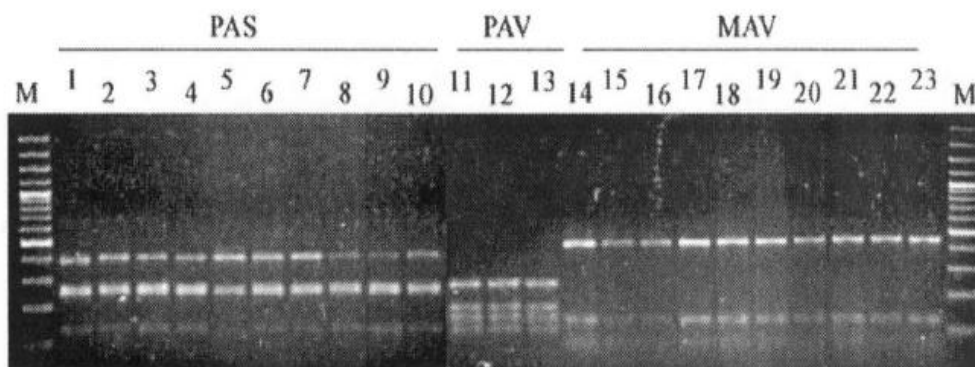


Figure 3. Restriction profiles of BYDV isolates. Independent field samples from plants were collected in Czech Republic. PCR products were digested by *Hpa* II endonuclease and separated on 2.5% agarose gel stained with SybrGreen

Εικόνα 7: Προφίλ περιορισμού απομονωμάτων του ιού BYDV από φυτά στην Τσεχία. Τα προϊόντα PCR χωνεύτηκαν με την ενδονουκλεάση *Hpa*II και διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 2,5%, χρωματισμένο με SybrGreen.

Η εικόνα παρουσιάζει τα προφίλ περιορισμού απομονωμάτων του ιού BYDV (Barley Yellow Dwarf Virus). Τα δείγματα προέρχονται από ανεξάρτητες συλλογές σε φυτά από αγρούς στην Τσεχία. Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με την ενδονουκλεάση *Hpa*II και διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 2,5%, το οποίο χρωματίστηκε με SybrGreen για την ανίχνευση DNA.

- Οι λωρίδες χωρίζονται σε τρεις ομάδες απομονωμάτων: **PAS**, **PAV** και **MAV**.
- Ο δείκτης M στις άκρες υποδηλώνει το δείκτη μοριακού βάρους (DNA ladder).
- Ομοιότητες και διαφορές στα προφίλ δείχνουν τη γενετική ποικιλομορφία ή την παρουσία ειδικών περιοριστικών θέσεων για τα διαφορετικά απομονώματα του ιού.

8. Molds and Mycotoxin Content of Cereals in Southeastern Romania

Η έρευνα των C. Tabuc, D. Marin, P. Guerre, T. Sesan, και J. D. Bailly που δημοσιεύτηκε το 2009 στο *Journal of Food Protection*, 72(3): 662–665¹⁸, επικεντρώθηκε στην μικροβιολογική και τοξικολογική αξιολόγηση 110 δειγμάτων δημητριακών (καλαμπόκι, σιτάρι, κριθάρι) που προέρχονταν από τη νοτιοανατολική Ρουμανία και παρέμειναν αποθηκευμένα για οκτώ έως δέκα μήνες σε σιλό. Βασικός στόχος ήταν η καταγραφή του μυκητιακού φορτίου και η ποσοτική ανίχνευση μυκοτοξινών με τη μέθοδο ELISA. Τα

¹⁸ Tabuc, C., Marin, D., Guerre, P., Sesan, T., & Bailly, J. D. (2009). Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania. *Journal of food protection*, 72(3), 662–665. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.3.662>.

δείγματα συλλέχθηκαν την περίοδο 2002 έως 2004 και αναλύθηκαν ως προς το είδος των μυκήτων που τα μόλυναν, καθώς και ως προς τα επίπεδα αφλατοξίνης B₁ (AFB₁), δεοξυνιβαλενόλης (DON), ζεαραλενόνης (ZEA), φουμονισινών και ωχρατοξίνης A (OTA). Η συγκριτική αξιολόγηση των επιπέδων μόλυνσης έγινε με βάση τα ευρωπαϊκά όρια ασφαλείας, ενώ η στατιστική ανάλυση (ANOVA) συνέκρινε τα αποτελέσματα ανά τύπο δημητριακού και έτος δειγματοληψίας.

Η διαδικασία απομόνωσης των μυκήτων πραγματοποιήθηκε αρχικά με τη διαβροχή 20 g δείγματος σε διάλυμα Tween 80 και την καλλιέργειά τους σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα (malt agar ή malt salt agar) σε θερμοκρασίες 25 και 31°C για διάστημα τριών έως επτά ημερών. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο είδους σύμφωνα με τα κλασικά μορφολογικά κλειδιά, γεγονός που επέτρεψε την αναγνώριση κυρίαρχων γενών όπως το *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*), το *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticillioide*s) και το *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. brevicompactum*). Ειδικότερα στο καλαμπόκι, η παρουσία του *Fusarium verticillioide*s συσχετίστηκε με εντοπισμό του γένους μόνο σε αυτό το δημητριακό, ενώ σε σιτάρι και κριθάρι εμφανίστηκαν διαφορετικές συνθέσεις ειδών, με μικρότερες όμως αποκλίσεις στη συχνότητα.

Παράλληλα, η ποσοτική ανίχνευση των μυκοτοξινών έγινε με τη μέθοδο ELISA, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση. Για την απομόνωση των τοξινών, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί διαλύτες, όπως το 70% MeOH για την αφλατοξίνη B₁, τη ζεαραλενόνη και τις φουμονισίνες, το 50% MeOH για την OTA και απιονισμένο νερό για τη δεοξυνιβαλενόλη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το μυκητιακό φορτίο ήταν σαφώς υψηλότερο στο καλαμπόκι (51×10^3 cfu/g) σε σχέση με το σιτάρι ($37,9 \times 10^3$ cfu/g) και το κριθάρι ($26,6 \times 10^3$ cfu/g). Οι αφλατοξίνες εντοπίστηκαν κυρίως στο καλαμπόκι, όπου το 37% των δειγμάτων βρέθηκε θετικό και το 29% αυτών ξεπερνούσε το ευρωπαϊκό όριο των 5 μg/kg, με μέση τιμή περίπου 7 μg/kg. Στο σιτάρι και το κριθάρι οι τιμές AFB₁ ήταν σημαντικά χαμηλότερες (1–2 μg/kg), με ελάχιστα δείγματα να παραβιάζουν τα όρια. Αντίθετα, η δεοξυνιβαλενόλη (DON) βρέθηκε ευρέως διαδεδομένη σε όλα τα δείγματα, αφού πάνω από το 79% ήταν θετικά. Στο καλαμπόκι η περιεκτικότητα σε DON έφτασε ως και 11.000 μg/kg, ενώ το 67% των δειγμάτων ξεπέρασαν το ευρωπαϊκό όριο (1.750 μg/kg). Μεγάλη ήταν και η συχνότητα εμφάνισης της ζεαραλενόνης (ZEA), καθώς πάνω από το 90% των δειγμάτων ήταν θετικά με μέσες συγκεντρώσεις 80–130 μg/kg. Σε ποσοστό που κυμαινόταν από 33% έως 71% ανάλογα με το δημητριακό, οι συγκεντρώσεις ξεπερνούσαν το όριο των 100 μg/kg, με το κριθάρι να εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό υπέρβασης (71%). Αντίθετα, η ωχρατοξίνη A και οι φουμονισίνες δεν εντοπίστηκαν σε κανένα δείγμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εξάπλωσή τους στη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή ήταν πολύ περιορισμένη ή ανύπαρκτη κατά την περίοδο της μελέτης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συχνότερη παρουσία των ειδών *Aspergillus* σε καλαμπόκι και σιτάρι, με κυριότερους εκπροσώπους το *A. flavus*, το *A. niger* και το *A. parasiticus*, ενώ το *Fusarium graminearum* καταγράφηκε συχνότερα στο κριθάρι, γεγονός που εξηγεί εν μέρει τα διαφορετικά μοτίβα μόλυνσης και παραγωγής τοξινών. Η εκτεταμένη προσβολή με αφλατοξίνη B₁, ειδικά στο καλαμπόκι, αποδίδεται στο ξηροθερμικό κλίμα που ευνοεί την ανάπτυξη του *A. flavus* και του *A. parasiticus*, παράγοντας όχι τόσο συνηθισμένος σε βορειότερες περιοχές της Ευρώπης. Τα ευρήματα σχετικά με τη δεοξυνιβαλενόλη και τη ζεαραλενόνη επιβεβαιώνουν την υψηλή συχνότητα εμφάνισης του

Fusarium, κυρίως στα σιτηρά με μέτρια έως υψηλή υγρασία μετά τη συγκομιδή.

Η απουσία φουμονισινών και ωχρατοξίνης Α διαφοροποιεί τη συγκεκριμένη περιοχή της Ρουμανίας από άλλες ευρωπαϊκές χώρες, όπου συχνά ανιχνεύονται είδη *Fusarium verticillioides* και *Aspergillus ochraceus* ως κύριες πηγές των εν λόγω τοξινών. Ωστόσο, η υψηλή συχνότητα υπέρβασης των επιτρεπόμενων επιπέδων AFB₁, DON και ZEA, όπως προκύπτει από τα ευρήματα, υπογραμμίζει την ανάγκη αυστηρότερων πρακτικών αποθήκευσης και ξήρανσης σε σιλό, καθώς και εφαρμογής συστημάτων HACCP για τη διασφάλιση της ποιότητας των δημητριακών σε κάθε στάδιο. Αν και δεν σχεδιάστηκε συγκεκριμένο στατιστικό πρωτόκολλο δειγματοληψίας που θα επέτρεπε την ακριβή συσχέτιση με τις καιρικές συνθήκες, τα αποτελέσματα τριών διαδοχικών ετών παρέχουν σημαντικές ενδείξεις για τη σταθερή παρουσία των τριών παραπάνω τοξινών. Η μελέτη καταδεικνύει ότι η ευρεία χρήση ανοσοενζυμικών τεχνικών (ELISA) σε συνδυασμό με τη μικροβιολογική ταυτοποίηση μέσω καλλιιεργειών αποτελεί ένα αποτελεσματικό εργαλείο ρουτίνας για τον έλεγχο των μυκήτων και των μυκοτοξινών. Η πρακτική εφαρμογή της μεθόδου καθιστά δυνατή τη συχνή παρακολούθηση της επιβάρυνσης των δημητριακών, ενώ ταυτόχρονα η αναγνώριση των ειδών *Aspergillus* και *Fusarium* που επικρατούν δίνει τη δυνατότητα για πιο στοχευμένα προληπτικά μέτρα, όπως βελτιωμένες συνθήκες αποθήκευσης, έλεγχο της υγρασίας και ρύθμιση της θερμοκρασίας στα σιλό. Συνολικά, τα ευρήματα αναδεικνύουν την ανάγκη για εντατική παρακολούθηση των δημητριακών στη Ρουμανία, όπου το κλίμα της νοτιοανατολικής περιοχής ευνοεί την ανάπτυξη τοξινογόνων μυκήτων, και τονίζουν τη σημασία των προληπτικών πρακτικών που μπορούν να περιορίσουν ή να αποτρέψουν τα υψηλά επίπεδα μόλυνσης.

8.1 Πίνακες που Παρουσιάζονται στην Έρευνα

TABLE 1. Fungal contamination of maize, wheat, and barley samples

Species	% contaminated samples		
	Maize (n = 54)	Wheat (n = 35)	Barley (n = 21)
<i>Aspergillus</i>	66.7	77.2	52.4
<i>A. niger</i>	61.1	48.3	52.3
<i>A. flavus</i>	33.1	57.2	23.8
<i>A. versicolor</i>	46.2	22.8	9.4
<i>A. parasiticus</i>	25.7	31.2	24
<i>A. fumigatus</i>	7.4	34.1	0
Others	48.1	56.6	33.3
<i>Fusarium</i>	31.1	34.2	57.1
<i>F. graminearum</i>	29.3	25.7	42.9
<i>F. culmorum</i>	18.5	22.8	38
<i>F. verticillioides</i>	18.3	0	0
Others	8.9	11.4	14.3
<i>Penicillium</i>	38.8	31.3	33.3
<i>P. griseofulvum</i>	33.3	25.4	23.6
<i>P. purpurogenum</i>	31.4	31	28.4
<i>P. citrinum</i>	26.1	26.4	19
<i>P. brevicompactum</i>	21.8	28.2	16.1
Others	27.8	24.5	23.4
<i>Mucor</i>	55	34.4	47.6
<i>Rhizopus</i>	43.2	40.2	28.5
<i>Cladosporium</i>	15	2.8	4.8
<i>Alternaria</i>	2	2.8	9
<i>Trichoderma</i>	9	0	4.8
<i>Epicoccum</i>	5	0	0

Εικόνα 8 - Πίνακας 1: Ποσοστά μόλυνσης από μύκητες σε δείγματα καλαμποκιού (n = 54), σιταριού (n = 35) και κριθαριού (n = 21). Καταγράφονται οι σημαντικότεροι μύκητες που μολύνουν τα δείγματα και η συχνότητά τους ανά κατηγορία.

Ο πίνακας παρουσιάζει τα ποσοστά μόλυνσης από διάφορα γένη και είδη μυκήτων σε δείγματα καλαμποκιού (n = 54), σιταριού (n = 35) και κριθαριού (n = 21). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι κύριες πηγές μόλυνσης είναι μύκητες από τα γένη *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, καθώς και άλλοι μύκητες όπως *Mucor*, *Rhizopus* και *Trichoderma*.

- Στο **καλαμπόκι**, οι πιο κοινές μολύνσεις προέρχονται από ***Aspergillus niger*** (66.7%) και ***A. flavus*** (33.1%).
- Στο **σιτάρι**, οι κύριες μολύνσεις είναι από ***A. niger*** (77.2%) και ***Fusarium graminearum*** (54.3%).
- Στο **κριθάρι**, τα ***Fusarium graminearum*** (57.1%) και ***Penicillium griseofulvum*** (33.3%) εμφανίζονται συχνότερα.

Η μόλυνση είναι εμφανώς ποικιλόμορφη ανάμεσα στα δείγματα, με το **κριθάρι** να δείχνει μικρότερη ποικιλία μυκήτων.

TABLE 2. Aflatoxin B₁, deoxynivalenol, and zearalenone contamination of maize, wheat, and barley samples

Mycotoxin	Maize (n = 54)	Wheat (n = 35)	Barley (n = 21)
Aflatoxin B₁			
Mean (±SE) (μg/g)	6.86 (±0.2)	1.83 (±0.05)	2.00 (±0.09)
Range (μg/g)	0–46.4	0–6.4	0–7.2
No. (%) of samples > 5 μg/kg ^a	16 (29.6)	3 (8.6)	1 (4.8)
Deoxynivalenol			
Mean (±SE) (μg/g)	4,772.22 (±82)	1,531.43 (±43)	3,923.81 (±269)
Range (μg/g)	0–11,000	0–3,600	0–4,000
No. (%) of samples > 1,750 μg/kg ^a	36 (66.7)	14 (40)	13 (61.9)
Zearalenone			
Mean (±SE) (μg/g)	91.04 (±1.1)	88.01 (±1.3)	132.7 (±2.1)
Range (μg/g)	0–249	0–142	86–202
No. (%) of samples > 100 μg/kg ^a	18 (33)	14 (40)	15 (71.4)

^a Limit set by EU regulation (12, 14).

Εικόνα 9 - Πίνακας 2: Επίπεδα μόλυνσης από αφλατοξίνη B₁, δεοξυνιβαλενόλη (DON) και ζεαραλενόνη (ZEA) σε δείγματα καλαμποκιού, σιταριού και κριθαριού. Συμπεριλαμβάνονται μέσες συγκεντρώσεις (Mean ± SE), εύρη συγκεντρώσεων και ποσοστά δειγμάτων που υπερβαίνουν τα όρια της ΕΕ.

Ο πίνακας παρέχει δεδομένα για την παρουσία των μυκοτοξινών αφλατοξίνης B₁, δεοξυνιβαλενόλης (DON) και ζεαραλενόνης (ZEA) σε δείγματα καλαμποκιού, σιταριού και κριθαριού.

1. Αφλατοξίνη B₁:

- Τα υψηλότερα επίπεδα μέσης συγκέντρωσης παρατηρούνται στο **καλαμπόκι** (6.86 μg/kg), ενώ τα χαμηλότερα στο **σιτάρι** (1.83 μg/kg).
- Σχετικά με τη ρύθμιση της ΕΕ (>5 μg/kg), 29.6% των δειγμάτων καλαμποκιού ξεπέρασαν το όριο, ενώ μόνο το 4.8% στο κριθάρι και 8.6% στο σιτάρι.

2. Δεοξυνιβαλενόλη (DON):

- Η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στο **καλαμπόκι** (4,772.22 μg/kg) με 66.7% των δειγμάτων να ξεπερνούν το όριο της ΕΕ (>1,750 μg/kg).
- Στο **κριθάρι**, το ποσοστό υπέρβασης είναι 61.9%, ενώ στο **σιτάρι** μόνο 40%.

3. Ζεαραλενόνη (ZEA):

- Το **κριθάρι** έχει τη μεγαλύτερη μέση συγκέντρωση (132.7 μg/kg) με 71.4% των δειγμάτων να ξεπερνούν τα 100 μg/kg (όριο της ΕΕ). Αντίθετα, το **καλαμπόκι** και το **σιτάρι** έχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις και μικρότερα ποσοστά υπέρβασης.

9. Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China, Ανίχνευση Οχρατοξίνης Α σε Δημητριακά με ci-ELISA

Η έρευνα «Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals»¹⁹ του Ακαδημαϊκού Ιδρύματος «College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University», στην Κίνα με **Συγγραφείς τους** Aihua Zhang, Yanna Ma, Lulu Feng, Ying Wang, Chenghua He, Xichun Wang, Haibin Zhang, η οποία δημοσιεύτηκε στο έντυπο *Food Control* 22 (2011), σελ. 1723–1728, το 2011 πραγματεύεται την παραγωγή μονοκλωνικού αντισώματος (mAb) υψηλής ειδικότητας για την ωχρατοξίνη Α (OTA) και ανάπτυξη μιας γρήγορης, αξιόπιστης και ευαίσθητης μεθόδου **competitive indirect ELISA (ci-ELISA)** για την ανίχνευση της OTA σε δημητριακά.

Πιο συγκεκριμένα περιγράφει την ανάπτυξη ενός μονοκλωνικού αντισώματος υψηλής ειδικότητας για την ωχρατοξίνη Α (OTA) και τη δημιουργία μιας ευαίσθητης και γρήγορης μεθόδου competitive indirect ELISA (ci-ELISA) για την ποσοτική ανίχνευση της συγκεκριμένης τοξίνης σε δημητριακά. Οι συγγραφείς παρασκεύασαν αρχικά δύο αντιγόνα OTA–BSA και OTA–KLH, χρησιμοποιώντας μεθόδους σύζευξης που περιλάμβαναν καρβοντιμιδική προσέγγιση ή σχηματισμό ενεργών εστέρων για να εμβολιάσουν ποντικούς και να προχωρήσουν σε παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων IgG2b. Μετά τη σύντηξη των σπληνοκυττάρων με κατάλληλα μυελωματικά κύτταρα και την επιλογή σε ειδικά μέσα, τα προκύπτοντα υβριδώματα ελέγχθηκαν με έμμεσο ELISA ώστε να εντοπιστούν εκείνα που παρήγαγαν αντισώματα με υψηλή συγγένεια προς την OTA.

Η μέθοδος ci-ELISA που αναπτύχθηκε βασίστηκε στη χρήση πλακών επικαλυμμένων με OTA–KLH, πάνω στις οποίες διαγωνίζονται η OTA των δειγμάτων και η πρότυπη OTA για τη δέσμευση του αντισώματος. Μια μείωση του σήματος απορρόφησης στα 450 nm υποδηλώνει αυξημένη συγκέντρωση OTA, καθώς λιγότερο αντίσωμα προσδένεται στο σταθερό αντιγόνο της πλάκας. Η ευαισθησία της μεθόδου αποτυπώνεται από το όριο ανίχνευσης της τάξης των 0.15 ng/mL, ενώ η συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή (IC50) ορίστηκε στα 1.70 ng/mL. Σημαντικό χαρακτηριστικό υπήρξε η αξιολόγηση της ειδικότητας του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι άλλων παραγόντων, όπου διαπιστώθηκε ότι η διασταυρούμενη αντίδραση με την ωχρατοξίνη Β έφτανε το 17%, ενώ με τη δεοξυνιβαλενόλη, τις φουμονισίνες και την αφλατοξίνη Β₁ δεν ξεπερνούσε το 10%. Αυτό δείχνει ότι, εκτός από την OTB, η μέθοδος παραμένει εξαιρετικά εξειδικευμένη για την OTA. Οι συγγραφείς εφάρμοσαν το πρωτόκολλο σε 65 δείγματα από τρία είδη δημητριακών (σιτάρι, καλαμπόκι, ρύζι) που συλλέχθηκαν από αγορές της Ναντζίνγκ, επιλέγοντας μια σχετικά απλή διαδικασία εκχύλισης με 50% μεθανόλη σε PBS.

¹⁹ Zhang, A., Ma, Y., Feng, L., Wang, Y., He, C., Wang, X., & Zhang, H. (2011). Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China. *Food Control*, 22(11), 1723-1728. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.004>

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι περίπου το ένα τέταρτο των δειγμάτων (26%) βρέθηκαν θετικά σε OTA, με το καλαμπόκι να παρουσιάζει τις υψηλότερες μέσες συγκεντρώσεις και το σιτάρι να ακολουθεί με χαμηλότερες τιμές. Συγκριτικά λιγότερες μολύνσεις καταγράφηκαν στο ρύζι, όπου μικρό μόνο ποσοστό δειγμάτων εμφάνισε επίπεδα πάνω από τα όρια. Οι συγγραφείς πραγματοποίησαν παράλληλα δοκιμές ανάκτησης σε δείγματα χωρίς αρχικό φορτίο OTA, προσθέτοντας γνωστές ποσότητες τοξίνης (spiking) για να επιβεβαιώσουν τη σταθερότητα και την ακρίβεια της μεθόδου τους. Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 89.7% έως 101.4%, με πολύ μικρές διακυμάνσεις μεταξύ των μετρήσεων (<8%), ενώ η επαναληψιμότητα σε ενδο- και μεταξύ-αναλυτικό επίπεδο ήταν πολύ ικανοποιητική.

Η συγκεκριμένη ci-ELISA, χάρη στην ευαισθησία της, μπορεί να εντοπίζει ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις OTA σε ωμά δημητριακά, πλησιάζοντας και ενίοτε ξεπερνώντας τα όρια που ορίζουν οι διεθνείς προδιαγραφές ασφαλείας. Σε σύγκριση με την τυπική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η αναπτυγμένη τεχνική αποδεικνύεται ταχύτερη και πιο οικονομική, χωρίς να απαιτεί περίπλοκο εξοπλισμό ή χρονοβόρες διαδικασίες προετοιμασίας δειγμάτων. Παρότι η παρουσία διασταυρούμενης αντίδρασης 17% με την ochratoxin B μπορεί να απαιτήσει επιβεβαίωση των ακραίων θετικών αποτελεσμάτων μέσω χρωματογραφικών τεχνικών ή φασματομετρίας μάζας, η ci-ELISA θεωρείται απολύτως κατάλληλη για προ-ελέγχους (screening) σε μεγάλη κλίμακα. Η σημασία της έγκειται και στο γεγονός ότι τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μη αμελητέα συχνότητα μόλυνσης σε μια περιοχή που δεν υπήρχε επαρκής τεκμηρίωση για το πρόβλημα, ενώ παράλληλα αναδεικνύεται η ανάγκη συνεχούς παρακολούθησης της OTA στα κινεζικά δημητριακά.

9.1 Γραφήματα από την Έρευνα

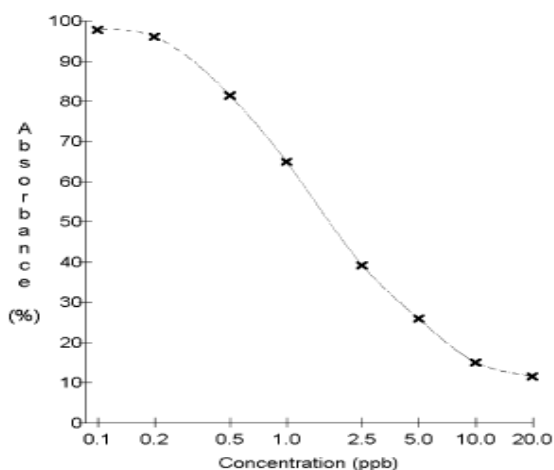


Fig. 1. Standard curve for the mAb in the ci-ELISA for OTA. Each point in the curve represents the mean \pm SD of three assays.

Εικόνα 10: Καμπύλη πρότυπου διαλύματος της OTA στη μέθοδο ci-ELISA. Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο \pm τυπική απόκλιση από τρεις επαναλήψεις.

Το διάγραμμα παρουσιάζει την καμπύλη πρότυπου διαλύματος για την ωχρατοξίνη Α (OTA) κατά τη χρήση της μεθόδου ci-ELISA (competitive indirect ELISA). Η καμπύλη δείχνει τη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της OTA (ppb) και του ποσοστού απορρόφησης (%), που αντανakλάται από την ένταση της χρωματικής αντίδρασης. Η καμπύλη εμφανίζει μία φθίνουσα τάση, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της OTA, γεγονός που αντιστοιχεί σε υψηλότερο ανταγωνισμό με το αντίσωμα και χαμηλότερη ένταση απορρόφησης.

10. *Fusarium langsethiae* - a HT-2 and T-2 Toxins Producer that Needs More Attention

Η έρευνα του 2013, «*Fusarium langsethiae* - a HT-2 and T-2 Toxins Producer that Needs More Attention.»²⁰ επικεντρώνεται στο είδος *Fusarium langsethiae*, το οποίο περιγράφηκε επίσημα ως νέο είδος το 2004. Ο συγκεκριμένος παθογόνος μύκητας αρχικά αναγνωρίστηκε τη δεκαετία του 1990, αλλά συχνά συγγεόταν με το *Fusarium roae* (εξαιτίας παρόμοιας μορφολογίας σπορίων) ή το *Fusarium sporotrichioides* (λόγω του προφίλ μυκοτοξινών). Το *F. langsethiae* απομονώνεται κυρίως από βρώμη, σιτάρι και κριθάρι, προκαλώντας μεγαλύτερα προβλήματα στη βρώμη όσον αφορά τις συγκεντρώσεις μυκοτοξινών. Ο μύκητας παράγει σε υψηλά επίπεδα τις τύπου-Α τριχοθηκένες HT-2 και T-2, οι οποίες είναι εξαιρετικά τοξικές (επηρεάζουν τη σύνθεση πρωτεϊνών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Δεδομένου ότι η Ευρωπαϊκή Επιτροπή εξετάζει ήδη νομοθετικά όρια για τις τοξίνες HT-2 και T-2, η κατανόηση του βιολογικού κύκλου του παθογόνου, των συνθηκών που ευνοούν την παραγωγή μυκοτοξινών και των μεθόδων ανίχνευσης/περιορισμού καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική.

Πιο συγκεκριμένα η έρευνα εστιάζει στο νεοαναγνωρισμένο είδος *Fusarium langsethiae*, το οποίο περιγράφηκε επίσημα το 2004 αλλά είχε πρωτοεντοπιστεί ήδη από τη δεκαετία του 1990. Παρότι το γένος *Fusarium* είναι γνωστό για την παραγωγή επικίνδυνων μυκοτοξινών, το *F. langsethiae* ταυτοποιήθηκε λανθασμένα για χρόνια ως *F. roae* (λόγω όμοιας μορφολογίας σπορίων) ή ως *F. sporotrichioides* (εξαιτίας του προφίλ μυκοτοξινών). Η σημαντικότερη ιδιαιτερότητά του συνίσταται στην υψηλή παραγωγή των τύπου-Α τριχοθηκενών HT-2 και T-2, οι οποίες, αν και γνωστές για την τοξικότητά τους σε ευκαρυωτικά κύτταρα, δεν είχαν ρυθμιστεί νομοθετικά με την ίδια ένταση που επιφυλάσσεται π.χ. στη δεοξυνιβαλενόλη (DON). Η μελέτη συνιστά μια βιβλιογραφική ανασκόπηση της εποχής, όπου συγκεντρώθηκαν δεδομένα από εργαστηριακές και επιδημιολογικές μελέτες σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες (Νορβηγία, Φινλανδία, Ηνωμένο Βασίλειο, Πολωνία), προκειμένου να προσδιοριστεί η φύση, η συμπεριφορά, η παραγωγή τοξινών και οι συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μύκητα. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στη βιβλιογραφική σύνθεση περιλάμβανε κυρίως τη μορφολογική και μοριακή ανάλυση (με τεχνικές PCR) του *F. langsethiae* σε μολυσμένα δείγματα βρώμης, σιταριού και κριθαριού, καθώς και τη συσχέτιση των μετρήσεων του

²⁰ Imathiu, S. M., Edwards, S. G., Ray, R. V., & Back, M. A. (2012). *Fusarium langsethiae* – a HT-2 and T-2 Toxins Producer that Needs More Attention. *Journal of Phytopathology*, 161(1), 1–10.

μυκητιακού DNA με τις συγκεντρώσεις HT-2/T-2.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το *F. langsethiae* φαίνεται να προτιμά κυρίως τη βρώμη, όπου ανιχνεύονται σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις των τύπου-A τριχοθηκενών, αν και μολύνσεις έχουν παρατηρηθεί και σε σιτάρι ή κριθάρι. Σε αντίθεση με άλλα παθογόνα του γένους *Fusarium*, όπως το *F. graminearum*, που ευνοείται από υγρές συνθήκες, υπάρχουν ενδείξεις ότι το *F. langsethiae* αποδίδει καλύτερα σε θερμότερα και συγκριτικά ξηρότερα περιβάλλοντα ή/και σε περιπτώσεις μειωμένου ανταγωνισμού με άλλα είδη. Επιπλέον, η ανάπτυξή του δεν συνοδεύεται απαραίτητα από ορατά συμπτώματα προσβολής στα στάχυα, μια παράμετρος που δυσχεραίνει σημαντικά την έγκαιρη διάγνωση του προβλήματος στο χωράφι ή στην αποθήκη.

Οι μοριακές τεχνικές, ιδίως αυτές που βασίζονται στην PCR (συμπεριλαμβανομένης της real-time PCR), αποδείχθηκαν απαραίτητες για την αξιόπιστη ταυτοποίηση του *F. langsethiae* και την παρακολούθηση των επιπέδων του σε δείγματα σιτηρών. Η δυνατότητα ανίχνευσης του DNA του μύκητα απευθείας σε κόκκους ή ιστό φυτών, χωρίς να χρειάζεται να προηγηθεί απομόνωση στο εργαστήριο, έδωσε τη δυνατότητα για ταχύτερη και ακριβέστερη επιδημιολογική χαρτογράφηση της μόλυνσης. Η επιλογή ειδικών εκκινητών (primers) που διακρίνουν το *F. langsethiae* από το *F. poae* ή το *F. sporotrichioides* ενίσχυσε την περαιτέρω κατανόηση του ρόλου αυτού του νεοαναγνωρισμένου είδους στην επιβάρυνση των αγροτικών προϊόντων με HT-2 και T-2. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι η ποσότητα του DNA του μύκητα σε ένα δείγμα συσχετίζεται στενά με τις συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων τοξινών, επιβεβαιώνοντας έτσι την ευθύνη του *F. langsethiae* για τα αυξημένα επίπεδα HT-2 και T-2 στη βρώμη και επισημαίνοντας ότι η κλασική προσέγγιση της αναζήτησης οπτικών ή μορφολογικών ενδείξεων μόλυνσης δεν επαρκεί για την έγκαιρη ανίχνευση.

Από άποψη επιδημιολογίας, η έλλειψη συμπτωμάτων συσχετίζεται με ασυμπτωματική (ή σχεδόν ασυμπτωματική) ανάπτυξη στο εσωτερικό του φυτού, γεγονός που ίσως ευνοείται από καλλιεργητικές τεχνικές ελάχιστης κατεργασίας εδάφους (minimum tillage), όπου τα φυτικά υπολείμματα μένουν στην επιφάνεια, δημιουργώντας ένα πρόσφορο υπόστρωμα για την εξέλιξη του μύκητα. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τα ευρέως μελετημένα είδη, όπως το *F. graminearum*, τα οποία εμφανίζουν διαφορετικές απαιτήσεις σε θερμοκρασία, υγρασία και διαχείριση υπολειμμάτων. Έτσι, κρίνεται ότι οι συνήθειες πρακτικές αντιμετώπισης των *Fusarium* της κεφαλής πιθανόν δεν αποδίδουν με την ίδια αποτελεσματικότητα απέναντι στο *F. langsethiae*, ενώ παραμένει σχετικά ασαφές πώς ακριβώς επιδρούν παράγοντες όπως η αμειψισπορά, η άροση ή τα διάφορα μυκητοκτόνα στη διασπορά και την επιβίωσή του.

Η ιδιαίτερη τοξικότητα των HT-2 και T-2, που επηρεάζουν τη σύνθεση πρωτεϊνών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, έχει κινητοποιήσει και την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, η οποία εξετάζει τη θέσπιση νομοθετικών ορίων για τις εν λόγω τοξίνες στα σιτηρά. Η μελέτη υπογραμμίζει ότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την κατανόηση του βιολογικού κύκλου του *F. langsethiae*, τη συσχέτισή του με παράγοντες περιβάλλοντος και διαχείρισης του αγρού, καθώς και για τη βελτίωση των μεθόδων ταχείας ανίχνευσης και περιορισμού του. Τα ευρήματα υποδεικνύουν επίσης ότι η αυξημένη συχνότητα της μόλυνσης στη βρώμη σχετίζεται ενδεχομένως με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας ή της ποικιλιακής αντοχής ορισμένων σιτηρών, γεγονός που απαιτεί στοχευμένες μελέτες και δοκιμές

ανθεκτικότητας μελλοντικά. Η έμφαση που δόθηκε στα είδη-ειδικούς εκκινητές (primers) και στη χρήση μοριακών μεθόδων θεωρείται εξαιρετικά καινοτόμος για την εποχή της έρευνας, καθώς φωτίζει ένα παθογόνο που μέχρι πρόσφατα παρέμενε επιστημονικά «αφανές» και ταυτόχρονα επικίνδυνο.



Fig. 1 *Fusarium langsethiae* colony characteristics on potato dextrose agar after incubation at room temperature for 7 days. Colony colour range from white, orange to purple, while margin shape is either entire or lobed. Adapted from Imathiu 2008a

Εικόνα 11: Χαρακτηριστικά αποικιών του *Fusarium langsethiae* σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 7 ημέρες. Το χρώμα των αποικιών ποικίλλει από λευκό έως πορτοκαλί και μοβ, ενώ το σχήμα της περιφέρειας μπορεί να είναι είτε ενιαίο είτε λοβωτό. Προσαρμοσμένο από Imathiu 2008a.

Η εικόνα παρουσιάζει τις αποικίες του *Fusarium langsethiae* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό *potato dextrose agar* (PDA) μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 7 ημέρες. Οι αποικίες εμφανίζουν χρωματική ποικιλία από λευκό, πορτοκαλί έως μοβ, ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης και τον τύπο του στελέχους. Το σχήμα της περιφέρειας των αποικιών μπορεί να είναι είτε ενιαίο είτε λοβωτό, χαρακτηριστικό που συχνά δεν είναι σταθερό για κάθε στέλεχος.

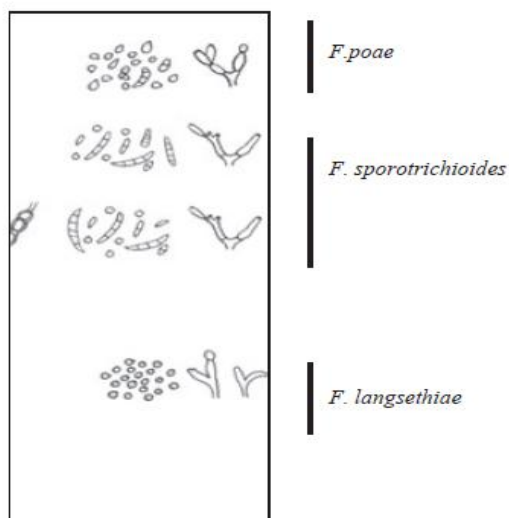


Fig. 2 Comparison of *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* conidia morphology. *Fusarium langsethiae* has napiform to globose-shaped conidia. Adapted from Knutsen et al. 2004

Εικόνα 12: Σύγκριση μορφολογίας κονιδίων των *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* και *Fusarium langsethiae*. Το *F. langsethiae* διακρίνεται από τα ναπιφόρμου έως σφαιρικού σχήματος κονίδια. Προσαρμοσμένο από Knutsen et al., 2004.

Η εικόνα συγκρίνει τη μορφολογία των κονιδίων τριών ειδών *Fusarium*: *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* και *Fusarium langsethiae*. Το *F. langsethiae* χαρακτηρίζεται από κονίδια σχήματος σφαιρικού έως ναπιφόρμου (σχήμα γογγυλίου), ενώ τα άλλα δύο είδη εμφανίζουν διαφορετικά μοτίβα κονιδίων, ενισχύοντας τη δυνατότητα διαχωρισμού τους μέσω μικροσκοπικής παρατήρησης.

11. Detection and identification of selected cereal rust pathogens by TaqMan® real-time PCR

Στην εργασία των Liu et al. (*Canadian Journal of Plant Pathology*, 2015)²¹, στόχος ήταν η ανάπτυξη TaqMan® real-time PCR πρωτοκόλλων για την πρώιμη και αξιόπιστη ανίχνευση δύο βασικών μυκώτων που προκαλούν σκωρίαση των σιτηρών (α) *Puccinia striiformis sensu stricto*, αιτίου της stripe rust, και (β) *Puccinia graminis* Clade 2, της πλέον διαδεδομένης μορφής stem rust. Αρχικά, οι συγγραφείς δοκίμασαν τέσσερις γονιδιακές περιοχές (BT, COI, ITS, RPB2) σε ένα ευρύ σύνολο 131 δειγμάτων, επιβεβαιώνοντας ότι ITS/COI δεν παρέχουν αρκετή εξειδίκευση για διαγνωστικούς σκοπούς, ενώ BT και RPB2

²¹ Liu, M., McCabe, E., Chapados, J. T., Carey, J., Wilson, S. K., Tropiano, R., Redhead, S. A., Lévesque, C. A., & Hambleton, S. (2015). Detection and identification of selected cereal rust pathogens by TaqMan® real-time PCR. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37(1), 92–105.

αποκάλυψαν πολυμορφισμούς ικανούς να σχεδιαστούν ειδικοί ανιχνευτές. Έτσι προέκυψαν τέσσερα TaqMan® Assays (PSBT, PSstrRPB2, Pg2+BT, Pg2RPB2), αποδίδοντας ελάχιστο όριο ανίχνευσης (LOD) 5 pg/μL για τις σκωριάσεις των γραμμών και 0.65 pg/μL για τη στελεχοσκωρίαση. Ταυτόχρονα, η ειδικότητα δοκιμάστηκε σε δεκάδες άλλα είδη (*Uromyces*, *Alternaria*, κ.λπ.) με απόλυτα αρνητικά αποτελέσματα, εξαιρουμένου ενός μεμονωμένου “weak-positive” που διορθώθηκε με προσεκτική αύξηση T °C ανόπτησης. Συνεπώς, η παρούσα μελέτη παρουσιάζει ένα “ιεραρχικό” διαγνωστικό πλαίσιο για τους σκωριαστικούς μύκητες, με υψηλή ακρίβεια, ευαισθησία και δυνατότητα εφαρμογής σε σπόρια, πρόσφατα ή/και αποξηραμένα δείγματα. Επιστημονικά, θέτει τα θεμέλια για περισσότερους πολλαπλούς (multiplex) δείκτες στη μοριακή φυτοπαθολογία των σιτηρών.

Σε επόμενο στάδιο, οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν δείγματα από σκωριάσεις και άλλους συχνά απαντώμενους μύκητες στα σιτηρά για να βεβαιωθούν ότι οι νέες δοκιμές διακρίνουν με ακρίβεια τους στοχευμένους οργανισμούς. Μέσα από εργαστηριακές αναλύσεις, συμπεριλαμβανομένων καθαρών καλλιεργειών σπορίων ή αποξηραμένων δειγμάτων, προέκυψε ότι οι περιοχές BT και RPB2 ήταν οι πλέον κατάλληλες για να χαρτογραφηθούν συγκεκριμένα σημεία σχεδίασης TaqMan® ανιχνευτών, εξασφαλίζοντας εξειδίκευση ανάμεσα στα δύο είδη *Puccinia*, αλλά και έναντι άλλων σκωριαστικών ειδών. Η ιδιαίτερη καινοτομία της μελέτης έγκειται στη χρήση πολλαπλών γονιδιακών θέσεων αντί της παραδοσιακής μονολόκου προσέγγισης, όπως το ITS, το οποίο συχνά δεν επαρκεί για διακριτή ανίχνευση λόγω υψηλής ομοιότητας μεταξύ συγγενικών στελεχών. Οι ευαίσθητες δοκιμές που αναπτύχθηκαν επιτρέπουν ανίχνευση σε επίπεδο DNA της τάξης μερικών pg/μL, καθιστώντας δυνατή την έγκαιρη επισήμανση μιας πιθανής μόλυνσης τόσο σε επίπεδο αγρού όσο και σε εργαστηριακές συνθήκες ελέγχου σπόρων. Επιπλέον, το πρωτόκολλο TaqMan® εξασφάλισε υψηλή ειδικότητα, διαχωρίζοντας αποτελεσματικά τη stripe rust (*P. striiformis sensu stricto*) από άλλα στενά συνδεδεμένα μέλη της ίδιας ευρύτερης ομάδας (*Puccinia Series Striiformis*), καθώς και τη stem rust (*Puccinia graminis* Clade 2) από άλλες μορφές *P. graminis*. Η μελέτη αποκάλυψε επίσης ότι μια από τις σχεδιασμένες αναλύσεις (Pg2+BT) αναγνώρισε ευρύτερα δείγματα εντός του γένους, συμπεριλαμβανομένου ενός Clade 1 στελέχους από την Κίνα, υποδηλώνοντας ότι η γονιδιακή στόχευση μπορεί να υπερκαλύψει επιπλέον ομάδες που σχετίζονται φυλογενετικά.

Η σημασία των αποτελεσμάτων γίνεται εμφανής όταν λαμβάνεται υπόψη ο οικονομικός κίνδυνος που συνεπάγονται οι δύο κυριότερες σκωριάσεις του σιταριού και άλλων δημητριακών. Οι γραμμές *P. graminis* της Clade 2 και η *P. striiformis sensu stricto* ευθύνονται για σοβαρές απώλειες, με τη γρήγορη διάγνωσή τους να συνιστά προϋπόθεση για αποδοτική πρόληψη και έλεγχο στην καλλιέργεια. Η πολυγονιδιακή προσέγγιση που υιοθετήθηκε, σε συνδυασμό με την υψηλή ευαισθησία των TaqMan® πρωτοκόλλων, διευρύνει τις δυνατότητες έγκαιρης διάγνωσης και αποτελεί υπόδειγμα για την περαιτέρω ανάπτυξη μοριακών εργαλείων σε άλλα παθογόνα σιτηρών. Μέσα από τη δυνατότητα ιεραρχικής δοκιμής (π.χ. πρώτα μία ευρύτερη ομάδα και στη συνέχεια μία πιο εξειδικευμένη γραμμή), η συγκεκριμένη μελέτη αποδεικνύει πώς οι τεχνικές real-time PCR μπορούν να εντοπίζουν διαφορετικούς κλάδους μυκήτων που μολύνουν τα φυτά χωρίς να εμφανίζονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα, διατηρώντας έτσι ακεράιη την αξιοπιστία των τελικών συμπερασμάτων. Με αυτόν τον τρόπο, οι συγγραφείς παρέχουν ένα πρότυπο μεθοδολογικής προσέγγισης, το οποίο μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα συστήματα

σκωριαστικών παθογόνων (*Uromyces* κ.ά.), αλλά και να επεκταθεί σε επιπρόσθετους πολλαπλούς δείκτες ή συνδυασμούς.

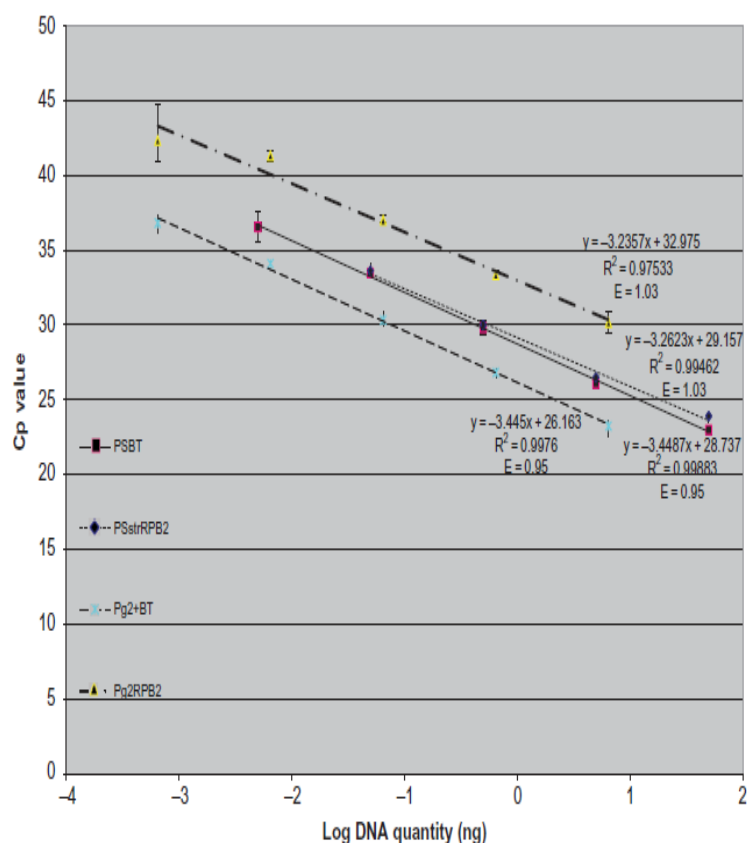


Fig. 2 (Colour online) Standard curves showing the regression between DNA log quantities (ng, x-axis) and cycle thresholds (Cp, y-axis) based on triplicate reactions for each dilution; PCR amplification efficiency was determined by the equation $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ (Bustin et al. 2009).

Εικόνα 13: Καμπύλες αναφοράς που παρουσιάζουν τη σχέση μεταξύ λογαριθμικών ποσοτήτων DNA (ng) και τιμών κύκλων ενίσχυσης (Cp) στις δοκιμές TaqMan® real-time PCR για τις PSBT, PSstrRPB2, Pg2+BT και Pg2RPB2. Η αποδοτικότητα της ενίσχυσης υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ (Bustin et al., 2009) ²²

²² Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Το διάγραμμα παρουσιάζει τις καμπύλες αναφοράς για τη μέθοδο TaqMan® real-time PCR, δείχνοντας τη σχέση μεταξύ των λογαριθμικών ποσοτήτων DNA (x-axis) και των κύκλων ενίσχυσης (C_p value, y-axis). Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις τέσσερις δοκιμές PCR (PSBT, PSstrRPB2, Pg2+BT, Pg2RPB2), που σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση ειδικών γραμμών των μυκήτων *Puccinia graminis* και *Puccinia striiformis*. Οι καμπύλες δείχνουν την απόδοση και ευαισθησία της μεθόδου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA.

Η ευθεία γραμμή για κάθε καμπύλη περιλαμβάνει την εξίσωση της γραμμής (π.χ., $y = -3.445x + 28.737$) και τον συντελεστή απόδοσης (Efficiency, E), ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ 0.95 και 1.03, υποδεικνύοντας υψηλή αποδοτικότητα της ενίσχυσης.

12. From Field to Table: A Review on the Microbiological Quality and Safety of Wheat-Based Products

Στην ανασκόπηση των Sabillón και Bianchini (*Cereal Chemistry*, 2016)²³, εξετάζεται η μικροβιολογική ποιότητα και ασφάλεια των προϊόντων σιταριού από το χωράφι έως το τραπέζι. Καταδεικνύεται ότι, παρά τη χαμηλή υγρασία του αλεύρου, πολυάριθμα βακτήρια (π.χ. *Salmonella*, *E. coli*, σπορογόνα *Bacillus*) και μύκητες με μυκοτοξίνες μπορούν να επιβιώσουν. Κατά την άλεση, το φορτίο στα εμπλεκόμενα κλάσματα συχνά αυξάνεται σε σύγκριση με το “λευκό” αλεύρι, ενώ καμιά από τις βασικές διεργασίες (καθαρισμός, προετοιμασία, άλεση) δεν εξαλείφει τους παθογόνους. Αυτό, κατά τους συγγραφείς, εξηγεί τα πρόσφατα κρούσματα τροφικών δηλητηριάσεων που συνδέονται με ωμή ζύμη (cookie dough) ή “εν μέρει μαγειρεμένα” προϊόντα, όπου το αλεύρι δεν έχει υποστεί κανένα θανατηφόρο (lethality) βήμα. Επιπλέον, μυκοτοξίνες όπως DON, ZEA, και ωχρατιξίνες, παράγονται σε στάδιο αγρού ή αποθήκευσης σιταριού και δεν καταστρέφονται στο ψήσιμο. Έτσι, τα αρτοσκευάσματα μπορεί να εμπεριέχουν τοξίνες (αν και συχνά σε “ίχνη”). Τέλος, τονίζεται η ανάγκη θερμικής επεξεργασίας του αλεύρου σε προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση χωρίς επαρκές ψήσιμο, και η ενημέρωση καταναλωτών να μην τρώνε ωμή ή “υπόψητη” ζύμη.

Η συστηματική προσέγγιση που υιοθέτησαν οι συγγραφείς περιελάμβανε την ενδελεχή ανασκόπηση επιστημονικών εργασιών, επιδημιολογικών δεδομένων και αναφορών τροφιμογενών ξεσπασμάτων, αναζητώντας τους παράγοντες που συμβάλλουν στη μόλυνση του αλεύρου. Τα στοιχεία προέρχονταν από διάφορα στάδια της εφοδιαστικής αλυσίδας, καλύπτοντας την καλλιέργεια σιταριού, τη μεταχείριση και την αποθήκευση των κόκκων, καθώς και τη διαδικασία καθαρισμού και ύγρανσης πριν από την άλεση. Παράλληλα, ενσωματώθηκαν πληροφορίες για τα τελικά προϊόντα από διάφορες χώρες με διαφορετικά κλιματικά χαρακτηριστικά, δείχνοντας ότι η επιμόλυνση είναι πολυπαραγοντική και δεν περιορίζεται σε μία μόνο περιοχή ή είδος παραγωγής. Οι συγγραφείς επεσήμαναν ότι η

²³ Sabillón, L., & Bianchini, A. (2016). From field to table: A review on the microbiological quality and safety of wheat-based products. *Cereal Chemistry*, 93(2), 105–115. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-07-15-0142-FI>

άλεση δεν περιλαμβάνει θερμική επεξεργασία, οπότε τα παθογόνα βακτήρια και μύκητες που υπάρχουν στους κόκκους συχνά μεταφέρονται στα διάφορα κλάσματα του αλεύρου. Σε προϊόντα που δεν θα υποστούν τελικό θανάσιμο στάδιο, η παρουσία αυτών των μικροοργανισμών και των τοξινών τους μπορεί να οδηγήσει σε κρούσματα δηλητηρίασης, όπως συνέβη με ωμή ζύμη μπισκότων ή «σχεδόν ψημένα» προϊόντα. Η ανασκόπηση τονίζει επίσης το πρόβλημα της παραγωγής μυκοτοξινών (DON, ZEA, ochratoxin) κατά τη φάση αποθήκευσης σε ακατάλληλες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας, υπογραμμίζοντας ότι αυτές οι ουσίες εμφανίζουν σημαντική ανθεκτικότητα στη θερμότητα και έτσι μπορεί να παραμένουν στα τελικά προϊόντα ακόμη και μετά το ψήσιμο. Παράλληλα, αναφέρεται ότι η *Bacillus cereus* ενδέχεται να επιβιώσει ως σπόριο και να προκαλέσει αλλοιώσεις και τροφικές δηλητηριάσεις σε ψωμιά και ζύμες, ειδικά σε περιστάσεις όπου οι θερμοκρασίες ή ο χρόνος ψησίματος δεν αρκούν για να καταστρέψουν τα σπορογόνα βακτήρια. Καθίσταται, λοιπόν, φανερό ότι οι προληπτικές πρακτικές, οι έλεγχοι μυκοτοξινών στο στάδιο του χωραφιού, η σωστή αποθήκευση σε σιλό και ο καθαρισμός του εξοπλισμού στους μύλους συνιστούν καίρια μέτρα για τη μείωση των κινδύνων. Στο τελικό στάδιο, προϊόντα όπως έτοιμες προς χρήση ζύμες ή μίγματα για οικιακή χρήση θα πρέπει να παρασκευάζονται από αλεύρι που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία, ώστε να αποφευχθεί η μεταφορά επικίνδυνων μικροοργανισμών σε παρασκευάσματα που καταναλώνονται χωρίς επαρκές ψήσιμο. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται και στην ανάγκη ενημέρωσης του κοινού, το οποίο συχνά δοκιμάζει ωμά μείγματα ή προτιμά την κατανάλωση ατελώς ψημένων αρτοσκευασμάτων, αγνοώντας ότι το χαμηλό επίπεδο υγρασίας δεν επαρκεί από μόνο του για να εμποδίσει την επιβίωση παθογόνων ή την παρουσία τοξινών.

13. Cereal Industry: e-Nose for Real Time and Online Quality and Safety Control and Management

Στην μελέτη «Cereal Industry: e-Nose for Real Time and Online Quality and Safety Control and Management»²⁴ οι **συγγραφείς** Federica Cheli, Luciano Pinotti, Matteo Ottoboni, Marco Tretola και Vittorio Dell'Orto, οι οποίοι δημοσίευσαν στο *Sensors & Transducers*, το 2016, 201(6): 52–58 επιθυμούν να παρουσιάσουν πώς η τεχνολογία » (e-nose) μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πραγματικό χρόνο (real-time) και σε συνεχή ροή (online) για τον έλεγχο ποιότητας και ασφάλειας στη βιομηχανία των δημητριακών. Εστιάζει ιδιαίτερα στην ανίχνευση μυκοτοξινών καθώς και άλλων πτητικών δεικτών υποβάθμισης/αλλοίωσης, σε κρίσιμα στάδια επεξεργασίας σιτηρών (κυρίως στο άλεσμα του σίτου).

Επισημαίνεται ότι οι μυκοτοξίνες παρουσιάζονται ως Κεντρικό Πρόβλημα στην ασφάλεια των δημητριακών. Η ασφάλεια των δημητριακών, όπως καταγράφεται, και ιδίως του σιταριού, απειλείται από μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες (π.χ. DON, ZEA, αφλατοξίνες), με σημαντικές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία και την οικονομία. Αντίστοιχα

²⁴ Cheli, F., Pinotti, L., Ottoboni, M., Tretola, M., & Dell'Orto, V. (2016). Cereal industry: e-Nose for real-time and online quality and safety control and management. *Sensors & Transducers*, 201(6), 52–58. Retrieved from http://www.sensorsportal.com/HTML/DIGEST/P_2831.htm

οι συμβατικές μέθοδοι (LC–MS/MS, ELISA κ.λπ.) είναι ακριβείς, αλλά συχνά χρονοβόρες ή ακριβές για συνεχή βιομηχανική χρήση.

Έτσι λοιπόν προκύπτει η ανάγκη για γρήγορα και συνεχή εργασία (Real-time & Online) για την αντιμετώπιση των παθογόνων. Σε βιομηχανική κλίμακα απαιτείται άμεση/ανεμπόδιση (on-site) παρακολούθηση της ποιότητας ενόσω τα σιτηρά ή ενδιάμεσα προϊόντα διέρχονται από τη γραμμή παραγωγής (π.χ. άλεση, αποθήκευση), ενώ παράλληλα οι συμβατικές δειγματοληπτικές τεχνικές συχνά δεν επαρκούν για ολοκληρωμένη εικόνα – χρειάζεται οπότε μια διαρκής ελεγκτική τεχνολογία.

Σε αυτό το σημείο οι ερευνητές προτείνουν το σύστημα e-nose ή αλλιώς Ηλεκτρονική “Μύτη” για την συνολική εκτίμηση πτητικών ουσιών²⁵. Οι πτητικές ουσίες (VOC – Volatile Organic Compounds) που ανιχνεύει ένα σύστημα ηλεκτρονικής «μύτης» (e-nose) είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες εξαερώνονται εύκολα σε συνθήκες δωματίου και απελευθερώνουν χαρακτηριστικά αέρια/οσμές. Το e-nose ανιχνεύει και καταγράφει «αποτύπωμα» πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs). Στα σιτηρά, αυτά τα VOCs μπορούν να σχετίζονται με μυκοτοξινική δραστηριότητα, τάγγισμα, αλλοιώσεις, κ.ά. Η μέτρηση των VOCs μπορεί να υποδείξει την παρουσία συγκεκριμένων προβλημάτων ασφάλειας (μύκητες που παράγουν τοξίνες) ή ποιότητας (off-odors από οξείδωση)²⁶. Στην περίπτωση των δημητριακών (όπως σιτάρι, καλαμπόκι κ.λπ.), οι πτητικές ουσίες προέρχονται κυρίως από:

1. Μεταβολική δραστηριότητα μυκήτων και βακτηρίων

- Μικροοργανισμοί (π.χ. μύκητες όπως *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*) που αναπτύσσονται στους κόκκους παράγουν συγκεκριμένα πτητικά προϊόντα (αλκοόλες, κετόνες, εστέρες, τερπένια κ.ά.) ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού τους.
- Η παρουσία αυτών των πτητικών μεταβολιτών αποτελεί «υπογραφή» (fingerprint) πιθανής αλλοίωσης ή μόλυνσης (π.χ. από μυκοτοξικογόνα είδη).

2. Διάσπαση λιπιδίων και πρωτεϊνών

- Στα δημητριακά, φυσιολογικά λιπίδια και πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν οξείδωση ή/και αποικοδόμηση, απελευθερώνοντας συγκεκριμένες πτητικές ενώσεις όπως αλδεΐδες (π.χ. ελαφρύ άρωμα τάγγισης), κετόνες ή άλλες οργανικές ουσίες.

²⁵ Gardner, J. W., & Bartlett, P. N. (1994). A brief history of electronic noses. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 18(1–3), 210–211. doi:10.1016/0925-4005(94)87085-3

²⁶ Magan, N., & Evans, P. (2000). Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *Journal of Stored Products Research*, 36(3), 319–340.

- Η ένταση και το είδος αυτών των ουσιών μπορούν να αποτελέσουν δείκτες υποβάθμισης ή «γήρανσης» του προϊόντος.

3. Εντομολογική δραστηριότητα

- Οσμές ή εκκρίσεις από τα έντομα που τυχόν προσβάλλουν τον κόκκο (π.χ. σκαθάρια, σκώροι) μπορεί να συμβάλλουν στο συνολικό «προφίλ» πτητικών, αποκαλύπτοντας έμμεσα προσβολή εντόμων στο απόθεμα.

4. Συνολική «αρωματική ταυτότητα» του προϊόντος

- Πέρα από τους ανεπιθύμητους μεταβολίτες, κάθε δημητριακό έχει το δικό του «τυπικό» φάσμα αρωμάτων (εστέρες, αλκοόλες, φαινολικές ενώσεις κ.λπ.) που συνθέτουν το κανονικό άρωμα ή γεύση του.
- Η ηλεκτρονική «μύτη» μπορεί να ξεχωρίζει το «φυσιολογικό» προφίλ πτητικών από το «αποκλίνον» (που σχετίζεται με αλλοίωση, μόλυνση κ.ο.κ.)²⁷.

Στη μελέτη αναδεικνύεται ότι η ηλεκτρονική «μύτη» (e-nose) μπορεί να εφαρμοστεί στα διάφορα στάδια παραγωγής δημητριακών, από το ακατέργαστο στάρι (ή άλλα σιτηρά) έως τα ενδιάμεσα κλάσματα και τα τελικά προϊόντα. Στην πράξη, η δοκιμαστική χρήση της συσκευής εστιάζει τόσο σε φυσικώς όσο και σε τεχνητά μολυσμένα δείγματα με μύκητες ή μυκοτοξίνες, ώστε να καταγραφεί η ικανότητά της να ανιχνεύει πτητικά μοτίβα που συνδέονται με την παραγωγή επικίνδυνων ουσιών, όπως οι αφλατοξίνες και η ωχρατοξίνη Α. Έμφαση δίνεται σε κρίσιμα σημεία της βιομηχανικής διαδικασίας, όπως η παραλαβή και αποθήκευση του σίτου, η ολοκλήρωση του αλέσματος (όπου ελέγχεται η υπολειμματική μόλυνση) και η τελική φάση αποθήκευσης ή συσκευασίας. Σημειώνεται ότι σε μερικές περιπτώσεις οι τοξίνες είναι πιθανό να συσσωρεύονται σε παραπροϊόντα (πίτουρα), γεγονός που καθιστά το e-nose χρήσιμο για τον έγκαιρο εντοπισμό παρτίδων υψηλού κινδύνου.

Η μελέτη καταδεικνύει ότι το e-nose μπορεί να εντοπίσει έγκαιρα οσμές αλλοίωσης που προκαλούνται από μυκητιακή δράση, σε στάδιο προγενέστερο της ορατής ανάπτυξης μούχλας ή της ολοκλήρωσης μιας χρονοβόρας χημικής ανάλυσης. Σε επίπεδο μυκοτοξικών συμβάντων, επισημαίνεται η δυνατότητά του να λειτουργεί ως εργαλείο διαλογής (screening), υποδεικνύοντας με ταχύ ρυθμό εάν μια παρτίδα ενδέχεται να ξεπερνά τα καθιερωμένα όρια για συγκεκριμένες τοξίνες, οπότε και κρίνεται απαραίτητη μια στοχευμένη επιβεβαίωση μέσω εργαστηριακών μεθόδων ακριβείας. Παράλληλα, παρουσιάζονται περιπτώσεις προσδιορισμού διαφορετικών επιπέδων μόλυνσης σε άλευρα και καλαμπόκι, αλλά και αναγνώρισης διαφορετικών ειδών τοξικογόνων μυκήτων βάσει της χημικής «υπογραφής» των πτητικών συστατικών που εκλύουν. Η ίδια τεχνολογία παρέχει επιπρόσθετα πληροφορίες σχετικά με το γενικό άρωμα ή τη γεύση του προϊόντος, επιτρέποντας ποιοτική αξιολόγηση και όχι μόνο εντοπισμό προβλημάτων ασφάλειας.

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι, με ένα τέτοιο σύστημα ελέγχου ενσωματωμένο στη γραμμή

²⁷ Campagnoli, A., Cheli, F., Polidori, C., Zaninelli, M., Zecca, O., Savoini, G., Pinotti, L., & Dell'Orto, V. (2011). Use of the electronic nose as a screening tool for the recognition of durum wheat naturally contaminated by deoxynivalenol: A preliminary approach. *Sensors*, 11(5), 4899–4916. doi:10.3390/s110504899

παραγωγής (on-line), οι χειριστές μπορούν να αντιδρούν σε πραγματικό χρόνο και να αποσύρουν ύποπτες παρτίδες χωρίς να βασίζονται αποκλειστικά σε αποσπασματικές δειγματοληψίες. Αυτό μειώνει τις πιθανότητες διαφυγής μολυσμένου υλικού σε επόμενα στάδια. Παράλληλα, οι συγγραφείς υπογραμμίζουν ότι η “ηλεκτρονική” μύτη έχει προοπτικές να ενταχθεί σε πλατφόρμες πολλαπλών αισθητήρων, συνδυάζοντάς την με τεχνολογίες όπως η φασματοσκοπία NIR και οι οπτικοί διαχωριστές, ώστε να επιτευχθεί συνολικός έλεγχος ποιότητας και ασφάλειας σε μια ενιαία μονάδα. Η ταχύτητα απόκρισης, η εύκολη λειτουργία και η διαρκής παρακολούθηση σε όλα τα κρίσιμα σημεία της παραγωγής συγκαταλέγονται στα βασικά πλεονεκτήματα του e-nose.

Η μελέτη καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η εγκατάσταση τέτοιων συστημάτων σε βιομηχανίες σιτηρών συνιστά μια ρεαλιστική προοπτική για την on-line και σε πραγματικό χρόνο ανίχνευση παθογόνων και πτητικών δεικτών υποβάθμισης. Παρότι παρουσιάζονται βελτιωτικά περιθώρια όσον αφορά τη διαχείριση των δεδομένων, την εξειδίκευση των αισθητήρων και τη μείωση του περιθωρίου σφαλμάτων, θεωρείται ότι η έγκαιρη προειδοποίηση για την ύπαρξη ανεπιθύμητων μυκοτοξινών μπορεί να λειτουργήσει καθοριστικά στη λήψη άμεσων αποφάσεων. Οι περιορισμοί που επισημαίνονται αφορούν κυρίως την ανάγκη εκπαίδευσης του μοντέλου με επαρκή ποικιλία δειγμάτων, την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων (υγρασία, θερμοκρασία) και την απαραίτητη βαθμονόμηση για επίσημη αναγνώριση της μεθόδου. Ωστόσο, με διαρκή έρευνα και εξέλιξη, η ηλεκτρονική μύτη προβλέπεται να αποτελέσει κρίσιμο εργαλείο για τη βελτίωση της διαχείρισης επικίνδυνων επιπέδων μυκοτοξινών σε ροές παραγωγής σιτηρών και να ενισχύσει τα συστήματα HACCP, παρέχοντας ουσιαστική συνεισφορά στη συνολική ασφάλεια και ποιότητα των τελικών προϊόντων.

14. A survey of the cereal contamination with deoxynivalenol in Romania, for 2011–2013 period

Η εργασία παρουσιάζει μια εκτεταμένη έρευνα σχετικά με τη μόλυνση των δημητριακών από τη μυκοτοξίνη δεοξυνιβαλενόλη (DON) σε καλλιέργειες σιτηρών (κυρίως σιταριού, τριτικάλε, σίκαλης) σε 41 κομητείες (6 αγροτικές περιφέρειες) της Ρουμανίας κατά τις συγκομιδές 2011–2013. Σκοπός ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος συγκεκριμένων παραγόντων—μετεωρολογικών, υδρολογικών και γεωγραφικών—στην εμφάνιση και τα επίπεδα της DON σε διάφορες καλλιέργειες σιτηρών²⁸.

²⁸ Gagi, V., Mateescu, E., Smeu, I., Dobre, A.A., Cucu, M.E., Oprea, O.A., Iorga, E., & Belc, N. (2017). A survey of the cereal contamination with deoxynivalenol in Romania, for 2011–2013 period. *Romanian Biotechnological Letters*, 22(1), 12240–12249.

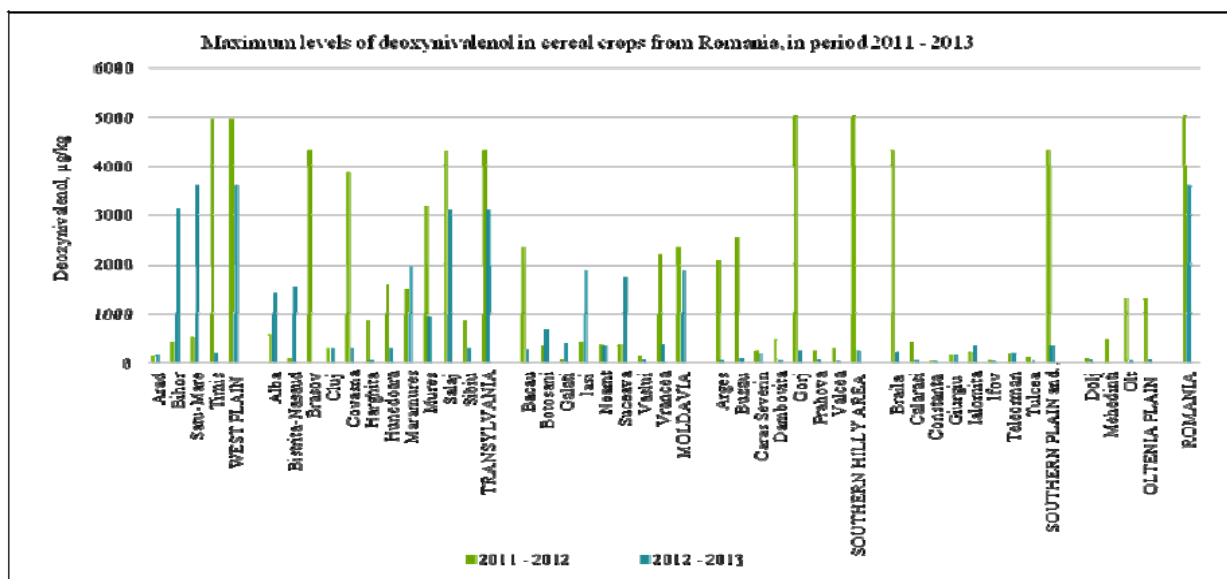


Figure 1. Maximum levels of DON in cereal crops from Romanian counties and agricultural regions, under the synergistic action of meteorological, hydrological and geographical factors in 2011 - 2013 period. The incidence and level of DON were highest for Western Plain (Timis, Bihor and Satu-Mare counties), Transylvania (Salaj, Maramures, Mures and Bistrita-Nasaud counties) and Southern Hilly Area (Gorj, Arges and Buzau counties).

Εικόνα 14: Γράφημα επιπέδων Deoxynivalenol (DON) ανά είδος δημητριακών (2011-2013)

Στην Εικόνα 15 παρατηρούμε τα μέγιστα επίπεδα Deoxynivalenol (DON) σε διαφορετικά είδη δημητριακών από τη Ρουμανία την περίοδο 2011-2013. Το κοινό σιτάρι και η τριτικάλε εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις DON, κυρίως κατά το 2012, ενώ το σιμιγδάλι και η σίκαλη παρουσίασαν χαμηλή μόλυνση. Οι διαφορές στα επίπεδα DON μεταξύ των κατηγοριών δημητριακών μπορεί να οφείλονται στους παρακάτω λόγους:

- **Φυσιολογία των φυτών:** Το κοινό σιτάρι και η τριτικάλε είναι πιο ευαίσθητα σε μυκοτοξίνες, καθώς έχουν πιο ανοιχτές ταξιανθίες που ευνοούν την είσοδο μυκήτων (π.χ., *Fusarium*).
- **Καλλιεργητικές πρακτικές:** Εντατικές καλλιεργείες σε ευπαθείς περιοχές με υψηλή υγρασία ή χρήση ανεπαρκών φυτοπροστατευτικών μέτρων.
- **Κλιματικές συνθήκες:** Το 2012 ήταν πιθανώς χρονιά με ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη μυκήτων λόγω υψηλών βροχοπτώσεων κατά την περίοδο άνθησης (Μάιος-Ιούνιος).

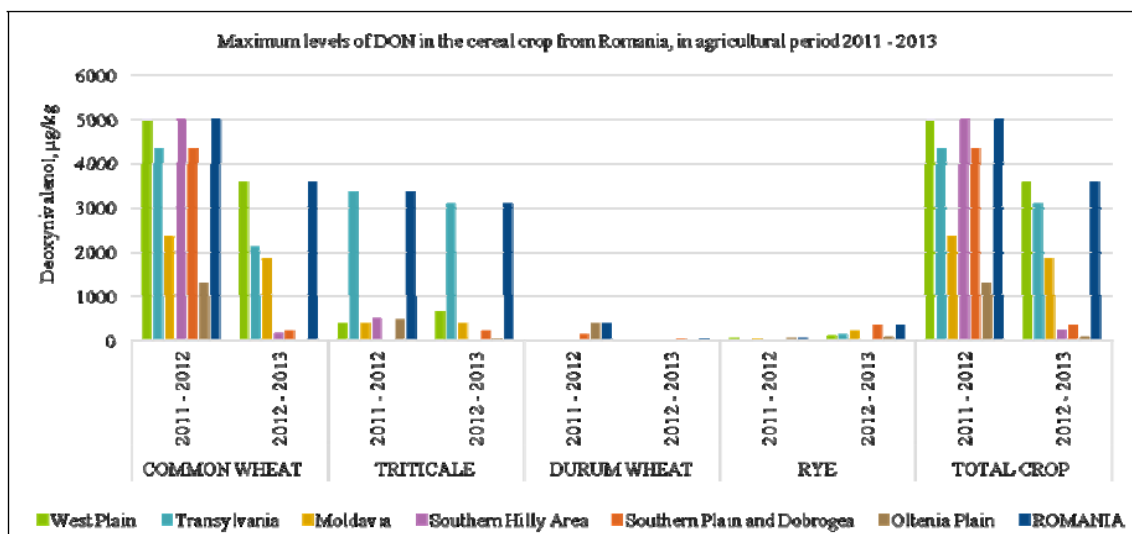


Figure 2. Deoxynivalenol level in cereal categories from Romania, in period 2011 – 2013.
Common wheat and triticale had the highest DON contamination level (especially in 2012 crop, for all regions);
durum wheat and rye samples showed a very low DON contamination.

Εικόνα 15: Γράφημα επιπέδων DON ανά γεωγραφική περιοχή και νομό στη Ρουμανία (2011-2013)

Στην Εικόνα 16 παρατηρούμε τα μέγιστα επίπεδα DON στα δημητριακά από γεωγραφικές περιοχές και νομούς της Ρουμανίας την περίοδο 2011-2013. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις καταγράφηκαν στα δυτικά πεδινά (Δυτική Πεδιάδα), την Τρανσυλβανία και τη Νότια Ορεινή Περιοχή, επηρεαζόμενες από μετεωρολογικούς και γεωγραφικούς παράγοντες. Το 2012 καταγράφεται ως η χρονιά με τη μεγαλύτερη μόλυνση, γεγονός που συνδέεται με αυξημένες βροχοπτώσεις και υγρασία, ενώ περιοχές με κακή αποστράγγιση ή πυκνή καλλιέργεια φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη συχνότητα μόλυνσης.

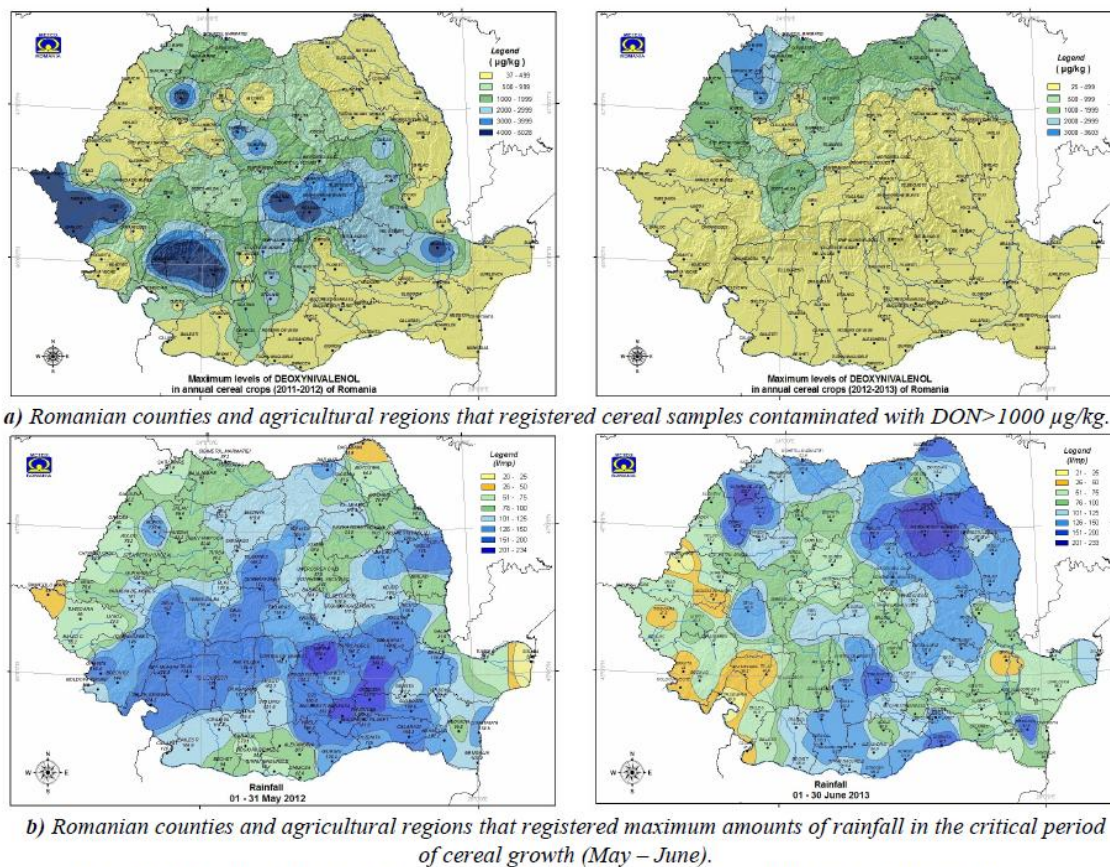


Figure 3. Integration of the cereal contamination with deoxynivalenol and the rainfall data in GIS maps, for agricultural years 2011 - 2012 and 2012 - 2013.

Εικόνα 16: Χάρτες GIS που απεικονίζουν τις περιοχές της Ρουμανίας με υψηλή μόλυνση από DON (>1000 µg/kg) και τη συσχέτισή τους με τα επίπεδα βροχόπτωσης (Μάιος-Ιούνιος) για τα έτη 2011-2013. Οι περιοχές με αυξημένη βροχόπτωση τείνουν να εμφανίζουν μεγαλύτερη μόλυνση από DON.

Στα αριστερά προβάλλεται χάρτης που παρουσιάζει τις περιοχές (counties) όπου εντοπίστηκαν δείγματα σιτηρών με DON > 1000 µg/kg για το έτος 2011–2012, ενώ στα δεξιά για το 2012–2013. Οι αποχρώσεις (π.χ. κίτρινο, μπλε, πράσινο) δείχνουν τα επίπεδα συγκέντρωσης — όσο πιο έντονη/σκούρα είναι η περιοχή, τόσο υψηλότερες οι συγκεντρώσεις DON. Παρατηρείται ότι οι βορειοδυτικές κομητείες (Salaş, Maramureş κ.ά.) και κάποιες στη νότια–νοτιοδυτική Ρουμανία εμφάνισαν τα υψηλότερα ποσοστά μολυσμένων δειγμάτων.

Στο κάτω ζεύγος, οι χάρτες απεικονίζουν χωρικά τις ποσότητες βροχοπτώσεων (mm βροχής) τον Μάιο–Ιούνιο των δύο γεωργικών ετών. Όσο πιο σκούρα είναι η απόχρωση, τόσο υψηλότερο το ύψος της βροχόπτωσης. Σε συνδυασμό με τους πάνω χάρτες, διαπιστώνεται ότι οι περιοχές με υψηλές βροχοπτώσεις συμπίπτουν σε μεγάλο βαθμό με τις περιοχές που καταγράφουν τα υψηλότερα επίπεδα DON. Έτσι, επιβεβαιώνεται η άμεση συσχέτιση μεταξύ αφθονίας υγρασίας τον κρίσιμο μήνα Μάιο–Ιούνιο (περίοδος άνθηση/γεμίσματος κόκκου) και έντονης εμφάνισης μυκοτοξινών.

Οι περιοχές των χαρτών της Εικόνας 17, που καταγράφουν DON > 1000 µg/kg (πάνω όριο της ΕΕ) εντοπίζονται κυρίως στη Δυτική Πεδιάδα και την Τρανσυλβανία, όπου οι βροχοπτώσεις ήταν έντονες τον Μάιο και τον Ιούνιο. Επίσης, τα έτη 2011-2012 και 2012-

2013 καταγράφουν διαφορετική γεωγραφική κατανομή, το 2012 παρουσιάζει εκτεταμένη μόλυνση, ενώ το 2013 δείχνει πιο εντοπισμένα προβλήματα. Η αυξημένη βροχοπτώση στις περιοχές αυτές φαίνεται να λειτουργεί ως ο βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη *Fusarium spp.*

Η μυκοτοξίνη DON όπως αναφέρθηκε, παράγεται από είδη *Fusarium*, τα οποία ευδοκούν σε συνθήκες υψηλής υγρασίας. Η κατανομή των βροχοπτώσεων (Μάιος-Ιούνιος) ταυτίζεται γεωγραφικά με τις περιοχές υψηλής μόλυνσης. Ταυτόχρονα οι περιοχές με μειωμένες βροχοπτώσεις δείχνουν μικρότερη πιθανότητα μόλυνσης, γεγονός που ενισχύει τη συσχέτιση βροχοπτώσης-DON. Συνεπώς γίνεται αντιληπτό ότι η χρήση τεχνολογιών GIS για την παρακολούθηση των βροχοπτώσεων και την πρόβλεψη των περιοχών κινδύνου δύναται να συμβάλλει στην ενημέρωση αγροτών για τις κλιματικές συνθήκες που αυξάνουν τη μόλυνση και προληπτική εφαρμογή κατάλληλων γεωργικών πρακτικών.

Στο επίκεντρο της μελέτης βρίσκονται οι συνθήκες που επικρατούν στον αγρό και κατά τη συγκομιδή, με έμφαση στις περιόδους ανθοφορίας και καρποφορίας, όταν οι βροχοπτώσεις μπορούν να ξεπεράσουν τα 200 mm και ευνοούν την ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium*. Τα δεδομένα που προέκυψαν επιβεβαιώνουν ότι περιοχές με κορεσμό εδάφους ή πιθανές πλημμύρες εμφανίζουν έντονη μόλυνση από DON, επιβεβαιώνοντας τη συσχέτιση υδρολογικών συνθηκών και μυκητιακής επιμόλυνσης. Η ασφάλεια τροφίμων καθίσταται κρίσιμο ζήτημα, αφού το DON θεωρείται μία από τις επικίνδυνες μυκοτοξίνες στα σιτηρά, με θεσμικό όριο στην Ευρωπαϊκή Ένωση τα 1250 $\mu\text{g/kg}$ για μη επεξεργασμένα δημητριακά. Στο δείγμα της περιόδου 2012–2013, ένα μικρό αλλά αξιοσημείωτο ποσοστό υπερέβη τα 1000 $\mu\text{g/kg}$, αναδεικνύοντας την περιοχή της βορειοδυτικής Ρουμανίας ως υψηλού κινδύνου. Η μεθοδολογία εστίασε στη δειγματοληψία μετασυλλεκτικά με βάση ρουμανικό πρωτόκολλο (Order no. 355/2005), από την οποία προέκυψαν σύνθετα δείγματα περίπου 5 kg που αντιπροσώπευαν μεγάλες εκτάσεις. Ακολούθησε άλεση εργαστηρίου και ποσοτικός προσδιορισμός του DON με τη μέθοδο ELISA (Ridascreen DON kit), ενώ παράλληλα συγκεντρώθηκαν μετεωρολογικά δεδομένα (θερμοκρασία, βροχή) και στοιχεία για τη γεωγραφική κατανομή των χωραφιών, ώστε να επιτευχθεί συσχέτιση σε βάση GIS. Συνολικά αναλύθηκαν 1754 δείγματα σιτηρών από 41 κομητείες, με παράλληλη επεξεργασία μετεωρολογικών πληροφοριών από 90 σταθμούς. Τα αποτελέσματα φανέρωσαν ότι το 2012 περίπου 65% των δειγμάτων ήταν θετικά σε DON, με ορισμένες τιμές να ξεπερνούν τα 5000 $\mu\text{g/kg}$ σε συγκεκριμένες ζώνες. Το 2013 τα θετικά δείγματα μειώθηκαν στο 53% και οι μέγιστες μετρήσεις ήταν σημαντικά χαμηλότερες, μέχρι 3602 $\mu\text{g/kg}$. Η συχνότητα υπέρβασης του ορίου των 1000 $\mu\text{g/kg}$ παρέμεινε μικρή (2–3%), αλλά εύγλωττη για την ετερογένεια των συνθηκών. Ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε σε παράγοντες όπως η υψηλή βροχοπτώση κατά τους κρίσιμους μήνες (Μάιο–Ιούνιο), οι χαμηλότερες ή υψηλότερες θερμοκρασίες πριν από τη συγκομιδή και η παρουσία μεγάλων ποταμών ή πλημμυρικών εδαφών, που καθιστούν το υπόστρωμα πιο ευνοϊκό για τον *Fusarium*. Ο εντοπισμός κομητειών με αυξημένες ενδείξεις DON κατέστη εφικτός χάρη στη χρήση χαρτογράφησης GIS, στοιχείο που επιτρέπει στοχευμένες παρεμβάσεις και αυστηρότερες επιθεωρήσεις σε περιοχές υψηλού ρίσκου. Η μελέτη επισημαίνει ότι ακόμα και σε επίπεδο χώρας τα συνολικά προβλήματα μπορεί να είναι σχετικά περιορισμένα, όμως εντοπίζονται «θύλακες» με υψηλότερες τιμές που υπερβαίνουν τα όρια ασφαλείας, καθιστώντας απαραίτητη την προσοχή σε καλλιέργειες που βρίσκονται σε ευαίσθητες ζώνες. Προτείνονται η υιοθέτηση ποικιλιών σιτηρών ανθεκτικών στο *Fusarium* και πρακτικές που μειώνουν τη διάρκεια έκθεσης του φυτού σε υπερβολική υγρασία, καθώς και βελτιώσεις στην άρδευση και τη διαχείριση φυτικών υπολειμμάτων. Όλα αυτά υπογραμμίζουν τη

σημασία μιας ολοκληρωμένης προσέγγισης, στην οποία οι αναλυτικές τεχνικές (όπως η ELISA), η χρήση γεωγραφικών και κλιματικών δεδομένων και η συντονισμένη αγροτική πολιτική συνεργούν στη διασφάλιση της ποιότητας των σιτηρών.

15. Biochemical Quality Indicators and Enzymatic Activity of Wheat Flour from the Aspect of Climatic Conditions

Στη συγκεκριμένη εργασία²⁹ διερευνάται πώς οι κλιματικές συνθήκες δύο διαδοχικών ετών (2011 και 2012) επηρεάζουν την ποιότητα του κοινού σιταριού (*Triticum aestivum* L.), εστιάζοντας στη σύσταση και λειτουργικότητα των πρωτεϊνών του αλεύρου, καθώς και στο τελικό προϊόν (ψωμί). Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν **βιοχημικοί δείκτες** που σχετίζονται με τη γλουτένη—όπως οι ελεύθερες θειολικές ομάδες (SH), οι δισουλφιδικές γέφυρες (SS) και οι ελεύθερες αμινομάδες (NH₂)—καθώς και η ενζυμική δράση της α-αμυλάσης και των πρωτεασών. Ο έλεγχος των συγκεντρώσεων έγινε φασματοφωτομετρικά.

Λαμβάνοντας δείγματα από τέσσερις ποικιλίες σιταριού σε διάφορες τοποθεσίες στη βόρεια Σερβία, οι συγγραφείς εξετάζουν πώς η αυξημένη θερμοκρασία και ο μεγαλύτερος αριθμός τροπικών ημερών κατά την ανάπτυξη των κόκκων αλλάζουν τη δομή και τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνικών συστατικών του σιταριού. Παράλληλα, υλοποιούν μια πρόσθετη δοκιμή όπου εκχυλίζουν τις φυσικά παρούσες λευκωματίνες από επιλεγμένα δείγματα αλεύρου (ώστε να αυξηθεί η ενζυμική δράση) και τις προσθέτουν εκ νέου σε ένα «βασικό» αλεύρι. Με αυτόν τον τρόπο επιδιώκουν να κατανοήσουν κατά πόσο η επιπλέον (ενδογενής) πρωτεϊνική/ενζυμική «ενίσχυση» μπορεί να βελτιώσει τις αρτοποιητικές ιδιότητες ενός αλευριού που επηρεάστηκε αρνητικά από δυσμενείς κλιματικές συνθήκες.

Στη συνέχεια, οι συγγραφείς αξιολόγησαν τα παραγόμενα άλευρα, έχοντας αλέσει το σιτάρι με εργαστηριακό μύλο Bühler MLU 202³⁰, και διαπίστωσαν ότι η πολύ θερμή περίοδος του 2012, με περισσότερες τροπικές ημέρες, συνδέθηκε άμεσα με αυξημένες τιμές ελεύθερων θειολικών ομάδων (SH), οι οποίες κυμάνθηκαν μεταξύ 0.14–0.26 $\mu\text{mol/g}$, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες 0.10–0.21 $\mu\text{mol/g}$ του 2011. Αυτή η μεταβολή, που σχετίστηκε με τη μείωση των δισουλφιδικών δεσμών (SS), επιβεβαίωσε την τάση του θερμοκρασιακού στρες να προκαλεί αλλαγές στη γλουτένη και άρα να αποδυναμώνει το πρωτεϊνικό πλέγμα. Για τον ακριβή προσδιορισμό των SH/SS εφαρμόστηκε τροποποιημένη προσέγγιση της μεθόδου Morel et al.³¹, ενώ η α-αμυλασική δραστηριότητα μετρήθηκε με το Ceralpha kit³² και φάνηκε

²⁹ Tomić, J., Torbica, A., Belović, M., Popović, L., & Knežević, N. (2018). Biochemical Quality Indicators and Enzymatic Activity of Wheat Flour from the Aspect of Climatic Conditions. *Journal of Food Quality*, 2018, Article ID 5187841.

³⁰Bühler MLU 202 (σύστημα εργαστηριακής άλεσης) Bühler Group. (2015). *MLU-202 Laboratory Flour Mill [User Manual]*. Uzwil, Switzerland: Bühler Group.

³¹ Morel, M.-H., Redl, A., & Guilbert, S. (2002). Mechanism of heat and shear mediated aggregation of wheat gluten protein upon mixing. *Biomacromolecules*, 3(3), 488–497. <https://doi.org/10.1021/bm015629u>.

³² Ceralpha method (Megazyme) Megazyme International. (2020). *Ceralpha α -Amylase Assay Procedure* (K-CERA 09/20). Bray, Ireland: Megazyme International.

ενίοτε ανεπαρκής στα δείγματα του 2012. Επιπλέον, η πρωτεολυτική δράση εκτιμήθηκε με πρωτόκολλο που βασίστηκε στους Tomić et al. (2016)³³ και συνέβαλε στην ερμηνεία των διαφοροποιήσεων σε ελεύθερες αμινομάδες (NH₂), οι οποίες βρέθηκαν αυξημένες όταν η γλουτένη επωαζόταν στους 37°C. Με τις αρτοποιήτες δοκιμές που ακολούθησαν, αποδείχθηκε ότι τα αλεύρια του 2012 παρήγαν ψωμιά χαμηλότερου όγκου και σκληρότερης υφής, ωστόσο η στοχευμένη επανεισαγωγή λευκωματινών που είχαν απομονωθεί και λυοφιλοποιηθεί βελτίωσε σημαντικά τη δομή της ψίχας και οδήγησε σε μείωση της σκληρότητας, επιτυγχάνοντας πιο τρυφερό τελικό προϊόν. Η μέθοδος χρωματικής ανάλυσης με το πρότυπο CIE Lab³⁴ ανέδειξε πως η εμπλουτισμένη ζύμη είχε ελαφρώς πιο σκούρα κόρα (μειωμένο L*) και αυξημένες τιμές ερυθρότητας (a*), πιθανότατα λόγω εντονότερων αντιδράσεων Maillard. Σε επίπεδο εφαρμογής στη βιομηχανία, τα ευρήματα υπογραμμίζουν ότι η παρακολούθηση των βιοχημικών δεικτών (SH, SS, NH₂) και των ενζυμικών επιπέδων (α-αμυλάσης και πρωτεολυτικών ενζύμων) μπορεί να δράσει προληπτικά, επιτρέποντας στον αρτοβιομήχανο ή στον μύλο να προσαρμόσει διαδικασίες ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες κάθε έτους. Η αύξηση της θερμοκρασίας και η συνακόλουθη επίδρασή της στη δομή των πρωτεϊνών θέτουν και ένα έμμεσο ζήτημα για πιθανή ευπάθεια του σπόρου σε παθογόνους παράγοντες, αν και η συγκεκριμένη εργασία δεν εστιάζει στην μικροβιολογική οπτική. Εντέλει, η καινοτομία της προσθήκης λευκωματινών ως «ενζυμικό boost» σε προβληματικά άλευρα απέδειξε ότι οι επιπτώσεις του θερμικού στρες μπορούν ως ένα βαθμό να μετριαστούν, προσφέροντας μια ευέλικτη λύση για τη διατήρηση σταθερής ποιότητας στο τελικό ψωμί.

³³ Tomić, J., Torbica, A., Popović, L., Hristov, N., & Nikolovski, B. (2016). Wheat breadmaking properties in dependence on wheat enzymes status and climate conditions. *Food Chemistry*, 199, 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.073>

³⁴ Σύστημα Μέτρησης Χρώματος, *Commission Internationale de l'Éclairage (CIE). (1976). Colorimetry: Official Recommendations on Uniform Color Spaces, Color Difference Equations, and Metric Color Terms (CIE Publication No. 15). Vienna, Austria: CIE.*

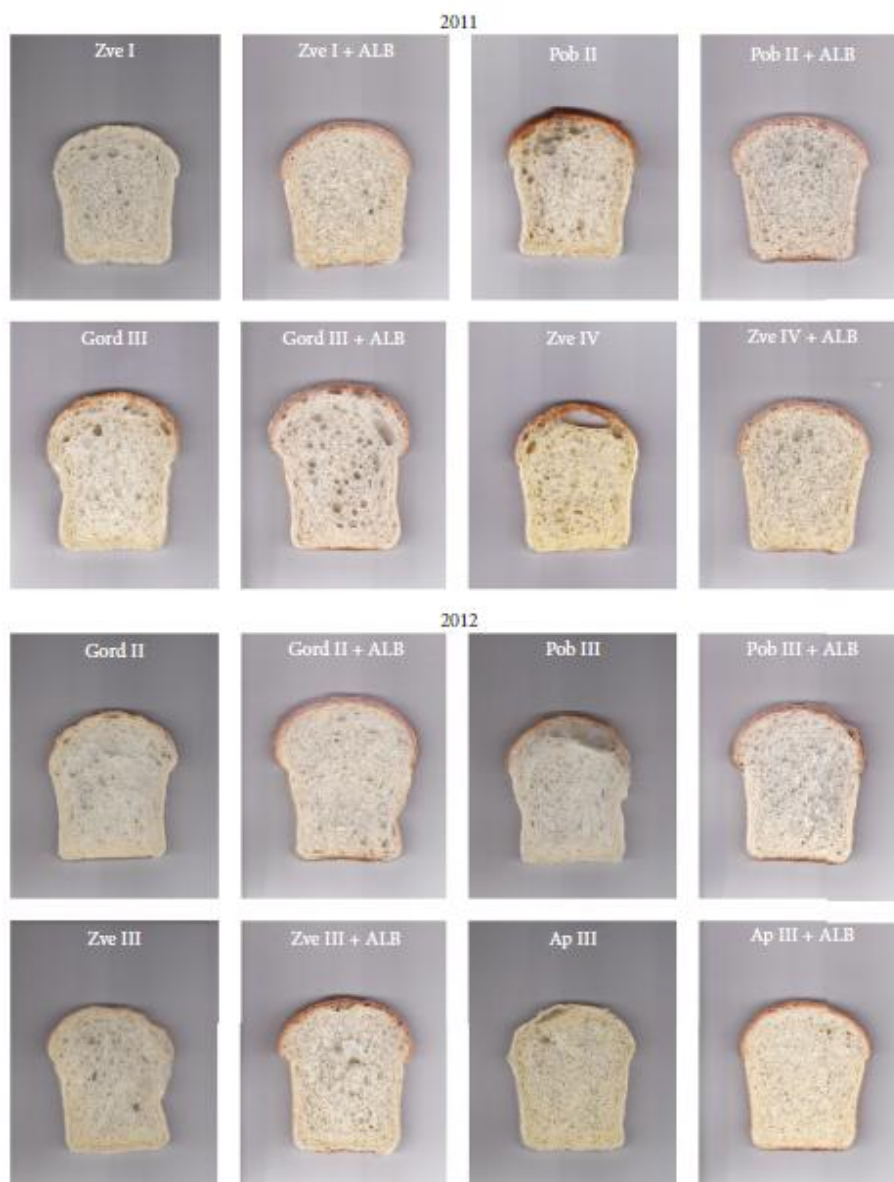


FIGURE 5: Cut loaves of bread produced with increased total albumin content and control samples from both production years.

Εικόνα 17: Φωτογραφίες τομών ψωμιού (εμπλουτισμένου vs. control) από τις αντίστοιχες ποικιλίες και χρόνια. Παρατηρείται μια ελαφρά διαφορά χρώματος κρούστας, ενώ κάποιες φραντζόλες εμφανίζονται πιο «φουσκωμένες» (π.χ. Ap III + alb).

16. Change of Amino Acid Residues in Idiotypic Nanobodies Enhanced the Sensitivity of Competitive Enzyme Immunoassay for Mycotoxin Ochratoxin A in Cereals

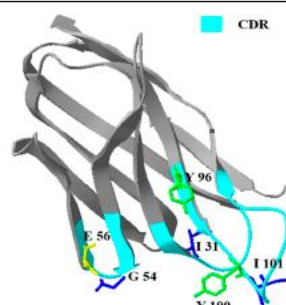
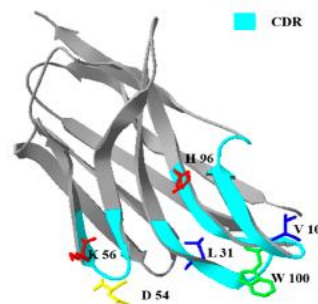
Στην έρευνα των Caixia Zhang, Weiqi Zhang, Xiaoqian Tang, Qi Zhang*, Wen Zhang, Peiwu Li που δημοσιεύτηκε στο έντυπο *Toxins* το 2020³⁵, οι συγγραφείς επιδιώκουν να αναπτύξουν μια «πράσινη» (eco-friendly) ανταγωνιστική ELISA, χωρίς τη χρήση τοξικών αντιγόνων, μέσω της αξιοποίησης ειδικών αντισωμάτων τύπου νανοςώματος (anti-idiotypic nanobodies). Αυτά τα νανοςώματα, που ονομάζονται «μη τοξικά αντιγόνα επίστρωσης» (NCAs), είναι σχεδιασμένα να μιμούνται τον ρόλο του πραγματικού αντιγόνου (OTA), δεσμεύοντας το ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb). Με τον τρόπο αυτό, το στάδιο της επικάλυψης της μικροπλάκας δεν χρειάζεται πλέον κάποιο σύμπλοκο OTA-πρωτεΐνης, μειώνοντας δραστικά την έκθεση σε τοξικά υλικά.

Οι συγγραφείς απομόνωσαν δύο τέτοια νανοςώματα (NCA1, NCA2) μέσω φασματομετρικών, γενετικών και ανοσολογικών τεχνικών. Στη συνέχεια, χαρτογράφησαν τις κρίσιμες μεταβολές αμινοξέων στις περιοχές συμπληρωματικής καθοριστικότητας (CDR), οι οποίες επηρεάζουν καθοριστικά τη συγγένεια με το αντίσωμα. Με συγκριτικές μετρήσεις (affinity constants) και ελέγχους ευαισθησίας (IC₅₀ σε ανταγωνιστική ELISA), έδειξαν ότι ένα από τα νανοςώματα (NCA2) προσφέρει ιδιαίτερα υψηλή συγγένεια ($\sim 5,36 \times 10^8$ L/mol) και βελτιωμένη ευαισθησία (IC₅₀ $\approx 0,015$ ng/mL), συγκριτικά με το άλλο (NCA1). Η αντικατάσταση μη πολικών αμινοξέων με πολικά στις CDR φαίνεται να σχετίζεται με την ενίσχυση της ευαισθησίας.

Με βάση το NCA2, ανέπτυξαν μια τροποποιημένη ELISA, όπου το επίχρισμα του νανοςώματος στα φρεάτια της μικροπλάκας λειτουργεί ως «ψευδο-αντιγόνο». Έτσι, η OTA από το δείγμα συναγωνίζεται το NCA2 στη δέσμευση του ειδικού mAb. Αυτή η μέθοδος εμφάνισε όριο ανίχνευσης (LOD) μόλις 0,003 ng/mL και IC₅₀ 0,017 ng/mL, επιτυγχάνοντας αντίστοιχα ή καλύτερα επίπεδα από συμβατικές ELISA. Επιπλέον, επαληθεύτηκε σε διαφορετικές μήτρες (καλαμπόκι, ρύζι, σιτάρι) με υψηλές ανακτήσεις (80–115%) και περιορισμένη διασταυρούμενη αντίδραση.

³⁵ Zhang, C., Zhang, W., Tang, X., Zhang, Q., Zhang, W., & Li, P. (2020). Change of amino acid residues in idiotypic nanobodies enhanced the sensitivity of competitive enzyme immunoassay for mycotoxin ochratoxin A in cereals. *Toxins*, 12(4), 273. <https://doi.org/10.3390/toxins12040273>

Table 1. The characters of NCA1 and NCA2.

Name	Structure ^a	Affinity Constant (L mol ⁻¹)	IC ₅₀ (ng mL ⁻¹)
NCA1		1.20×10^8	0.052
NCA2		5.36×10^8	0.015

^a the amino acid residues in red, yellow, blue, and green represent the basic amino acid, acidic amino acid, nonpolar aliphatic amino acid, and nonpolar aromatic amino acid, respectively.

Εικόνα 18: Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής δύο νανοσωμάτων (NCA1 και NCA2)

Τα δύο νανοσωμάτα (NCA1 και NCA2) λειτουργούν ως «μη τοξικά αντιγόνα» (nontoxic coating antigens). Σημειώνονται με χρωματικούς κώδικες οι περιοχές CDR (complementarity determining regions), μέσα στις οποίες εντοπίζονται κρίσιμες μεταλλάξεις αμινοξέων (απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα: κόκκινο, κίτρινο, μπλε, πράσινο), καθώς και οι θέσεις τους στο χωροταξικό μοντέλο. Δίπλα σε κάθε δομή αναφέρεται η σταθερά συγγένειας (affinity constant) και η τιμή IC₅₀, υποδεικνύοντας ότι το NCA2 διαθέτει υψηλότερη σταθερά συγγένειας και μεγαλύτερη ευαισθησία (χαμηλότερο IC₅₀) συγκριτικά με το NCA1.

Η εικόνα παρουσιάζει δύο ομολογικά μοντέλα νανοσωμάτων (NCA1 και NCA2) που απομονώθηκαν ως αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα έναντι ενός μονοκλωνικού αντισώματος για την ωχροτοξίνη Α. Στο κάθε μοντέλο επισημαίνονται οι τρεις περιοχές CDR (CDR1, CDR2, CDR3), οι οποίες απεικονίζονται με κυκλικές σημάνσεις (π.χ. πράσινες/γαλάζιες επιφάνειες). Οι αμινοξικές μεταλλάξεις (I→L, G→D, E→K, Y→H/W κ.λπ.) σημειώνονται σε διαφορετικά χρώματα, υποδηλώνοντας αλλαγές στη χημική τους φύση (όξινες, βασικές, μη πολικές κ.ο.κ.).

Δίπλα σε κάθε νανόσωμα αναγράφεται η αντίστοιχη σταθερά συγγένειας (Affinity Constant) και η IC₅₀, δείχνοντας ότι το NCA1 έχει χαμηλότερη σταθερά συγγένειας (1.20×10^8 L/mol) και υψηλότερο IC₅₀ (0.052 ng/mL), ενώ το NCA2 εμφανίζει αυξημένη ικανότητα δέσμευσης (5.36×10^8 L/mol) και βελτιωμένη ευαισθησία (IC₅₀ = 0.015 ng/mL). Αυτά τα στοιχεία καταδεικνύουν πώς οι αλλαγές αμινοξέων στις περιοχές CDR μπορούν να επηρεάσουν δραστικά την αλληλεπίδραση νανοσώματος-αντισώματος και συνεπώς την αποδοτικότητα ευαισθησία σε ανοσολογικά τεστ.

Στην πράξη, η διαδικασία που ακολούθησαν για να απομονώσουν και να εκφράσουν τα αντι-ιδιοτυπικά νανοσώματα περιλάμβανε την ανοσοποίηση αλπακά με το μονοκλωνικό αντίσωμα 1H2, τη δημιουργία φασματοθήκης φάγων και την επιλογή των κλώνων που εμφάνισαν υψηλή συγγένεια για την περιοχή δέσμευσης του αντισώματος της ωχροτοξίνης Α. Ανάμεσα στα επιλεγμένα νανοσώματα, το NCA2 εμφάνισε εμφανώς μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης, κάτι που συνδέθηκε με την παρουσία πιο πολικών αμινοξέων στη συμπληρωματική περιοχή και την αντίστοιχη ενισχυμένη συγγένεια προς το mAb. Η ενσωμάτωση του NCA2 στη θέση του τοξικού συμπλόκου OTA-BSA οδήγησε σε μια νέα, «φιλική προς το περιβάλλον» μορφή ανταγωνιστικής ELISA. Η αξιολόγηση της μεθόδου, με δείγματα δημητριακών όπως καλαμπόκι, ρύζι και σιτάρι, έδειξε ότι είναι εξαιρετικά ευαίσθητη ($IC_{50}=0,017$ ng/mL, $LOD=0,003$ ng/mL) και εμφανίζει υψηλές ανακτήσεις με αμελητέα διασταυρούμενη αντίδραση προς άλλες συχνές μυκοτοξίνες.

Αποδείχθηκε έτσι ότι η χρήση ενός αντι-ιδιοτυπικού νανοσώματος μπορεί να αντικαταστήσει την επίστρωση τοξικών συνθετικών αντιγόνων στη μικροπλάκα, μειώνοντας την έκθεση του προσωπικού σε επιβλαβείς ενώσεις και επιτυγχάνοντας συγχρόνως εξαιρετική ευαισθησία και εξειδίκευση στη διάγνωση της OTA. Η μελέτη παρέχει ενδείξεις ότι η τροποποίηση επιλεγμένων αμινοξέων στις περιοχές δέσμευσης ενός νανοσώματος μπορεί να βελτιώσει περαιτέρω τη συγγένεια, κάτι που πιθανότατα θα μπορούσε να αξιοποιηθεί και σε άλλες αναλύσεις μυκοτοξινών ή παρόμοιων χημικών ενώσεων. Το επιπλέον πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα γρήγορου ελέγχου (screening) σε τυπικές βιομηχανικές συνθήκες, όπου η ακρίβεια των χρονοβόρων συμβατικών τεχνικών πρέπει να συνδυαστεί με την ανάγκη ταχύτητας και ασφάλειας. Παρά τη σχετικά σύνθετη διαδικασία παραγωγής νανοσωμάτων (ανοσοποίηση ζώου, δημιουργία βιβλιοθήκης φάγων και επιλογή), η καινοτομία της προσέγγισης έγκειται στο ότι αποφεύγονται τα επικίνδυνα στάδια χειρισμού της OTA ως αντιγόνου επίστρωσης, συμβάλλοντας στην προστασία του προσωπικού και την οικολογική διάσταση των δοκιμών. Συνολικά, η συγκεκριμένη «πράσινη» ανταγωνιστική ELISA μπορεί να αποτελέσει ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τον ποιοτικό έλεγχο των δημητριακών, θέτοντας τις βάσεις για την ανάπτυξη και άλλων μη τοξικών διαγνωστικών προσεγγίσεων στον τομέα των μυκοτοξινών.

17. Analysis of total aflatoxins in commercially available cereal products in the Republic of North Macedonia

Στην παρούσα μελέτη (Analysis of total aflatoxins in commercially available cereal products in the Republic of North Macedonia, 2022)³⁶, των Elena Dimovska, Zoran Zhivikj, Elizabeta Gavazova, Tanja Petreska Ivanovska, Lidija Petrushevska-Tozi, οι συγγραφείς επικεντρώθηκαν στον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών αφλατοξινών (αθροιστικά όλες οι μορφές) σε αντιπροσωπευτικά δείγματα επεξεργασμένων δημητριακών, όπως ρυζογοκφρέτες, νιφάδες διαφόρων τύπων (βρώμης, κριθαριού, καλαμποκιού), προϊόντα πολλαπλών δημητριακών κ.ά., τα οποία διατίθενται στο εμπόριο της Βόρειας Μακεδονίας. Κύριος στόχος τους ήταν, αφενός, η επιβεβαίωση ή μη τήρηση των νομοθετικά θεσπισμένων ορίων (4 μg/kg για ολικές αφλατοξίνες) και, αφετέρου, η αξιολόγηση της

³⁶ Dimovska, E., Zhivikj, Z., Gavazova, E., Petreska Ivanovska, T., & Petrushevska-Tozi, L. (2022). *Analysis of total aflatoxins in commercially available cereal products in the Republic of North Macedonia. Macedonian Pharmaceutical Bulletin.*

αποτελεσματικότητας μιας εμπορικής μεθόδου ELISA ως εργαλείου γρήγορης και αξιόπιστης ανίχνευσης αυτών των επικίνδυνων μυκοτοξινών. Με αυτόν τον τρόπο, η έρευνα φιλοδοξεί να ενισχύσει τη γνώση γύρω από την παρουσία αφλατοξινών σε έτοιμα προϊόντα δημητριακών και να συμβάλει στη βελτίωση των πρακτικών ελέγχου, διασφαλίζοντας την υγεία του καταναλωτικού κοινού.

Συνολικά αναλύθηκαν δώδεκα προϊόντα, τα οποία αποκτήθηκαν τυχαία από διαφορετικά σημεία λιανικής και περιελάμβαναν ποικιλίες επεξεργασμένων δημητριακών, όπως ρυζογκοφρέτες, corn flakes, oat flakes και άλλους συνδυασμούς πολυδημητριακών σκευασμάτων. Η παραλαβή και ομογενοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν έτσι ώστε να υπάρχει αντιπροσωπευτικότητα της παρτίδας, ενώ για την εκχύλιση των αφλατοξινών έγινε χρήση μείγματος μεθανόλης-νερού σε αναλογία 70:30. Ακολούθησε εφαρμογή ενός εμπορικού ανοσοενζυμικού κιτ (RIDASCREEN Aflatoxin total), το οποίο στηρίζεται σε ανταγωνιστικό ανοσοπροσδιορισμό και ανιχνεύει αθροιστικά όλες τις μορφές των αφλατοξινών (B1, B2, G1, G2). Η όλη διαδικασία περιελάμβανε επώαση δείγματος και πρότυπων διαλυμάτων σε πλάκες ELISA, προσθήκη ενζυμικού συζεύγματος, ανάπτυξη χρωστικής μετά από αντίδραση με το υπόστρωμα και τελικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης με φασματοφωτομετρικές μετρήσεις στους 450 nm. Χρησιμοποιώντας ένα ειδικό λογισμικό, οι συγγραφείς υπολόγισαν τα επίπεδα των ολικών αφλατοξινών σε κάθε δείγμα και τα συνέκριναν με το ανώτατο επιτρεπόμενο όριο των 4 $\mu\text{g/kg}$, όπως προβλέπεται από την εθνική και ευρωπαϊκή νομοθεσία για τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα από τα εξεταζόμενα δείγματα δεν υπερέβη το όριο των 4 $\mu\text{g/kg}$ και τα περισσότερα εμφάνισαν τιμές αρκετά χαμηλότερες από το 1–2 $\mu\text{g/kg}$. Αυτό υποδηλώνει ότι τα συγκεκριμένα προϊόντα που ελέγχθηκαν διατηρούνται εντός ασφαλούς επιπέδου για τον καταναλωτή. Η μέθοδος ELISA αποδείχθηκε επαρκώς ευαίσθητη (με όριο ανίχνευσης της τάξης του 1.7 $\mu\text{g/kg}$) και χρήσιμη για γρήγορους ελέγχους ρουτίνας, παρέχοντας μια λιγότερο δαπανηρή και ευκολότερη εναλλακτική σε σύγκριση με πιο απαιτητικές χρωματογραφικές τεχνικές. Ωστόσο, σε αμφίβολες περιπτώσεις ή για πιο αναλυτική διερεύνηση της ειδικής συγκέντρωσης κάθε αφλατοξίνης χωριστά, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επιβεβαιωτικά κάποια τεχνική τύπου HPLC. Η επιλογή του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού κρίνεται ιδιαίτερα εφαρμόσιμη στις βιομηχανίες και στα αρμόδια κρατικά εργαστήρια που χρειάζονται επαναλαμβανόμενα και ταχύτητα αποτελέσματα για την προστασία της δημόσιας υγείας. Συμπληρωματικά, επισημαίνεται ότι η ασφάλεια των δημητριακών εξαρτάται και από παράγοντες όπως οι συνθήκες καλλιέργειας και αποθήκευσης, καθώς μύκητες του γένους *Aspergillus* ευνοούνται από υψηλές θερμοκρασίες και υγρασία, οπότε δεν μπορεί κανείς να αποκλείσει ότι σε άλλες παρτίδες ή κάτω από διαφορετικές συνθήκες δεν θα εμφανιστούν υψηλότερα επίπεδα αφλατοξινών. Η τρέχουσα έρευνα υποστηρίζει ότι τα τυχαία επιλεγμένα προϊόντα δημητριακών της Βόρειας Μακεδονίας συμμορφώνονται πλήρως με τη νομοθεσία σε επίπεδο ολικών αφλατοξινών, κάτι που αφήνει περιθώρια αισιοδοξίας για το επίπεδο ελέγχου που εφαρμόζεται στην τοπική αγορά. Οι συγγραφείς καταλήγουν στο ότι η μέθοδος ELISA προσφέρει μια αποδοτική λύση για τη ρουτίνα, υπογραμμίζοντας ταυτόχρονα την ανάγκη για συστηματικότερο δειγματοληπτικό έλεγχο και, όποτε ενδείκνυται, για επιβεβαίωση με χρωματογραφικές τεχνικές πιο υψηλής εξειδίκευσης. Έτσι θεωρούν ότι ενισχύεται η διασφάλιση ποιότητας, στη βάση μιας ολοκληρωμένης στρατηγικής πρόληψης και ελέγχου των αφλατοξινών, η οποία συμβάλλει στη θωράκιση της υγείας των καταναλωτών.

18. Development of a Multiplex RT-PCR Assay for Simultaneous Detection of Ten Major Viral Pathogens of Wheat

Στην έρευνα των Mahua Deb, Joseph M. Anderson, Steven R. Scofield, που δημοσιεύτηκε στο έντυπο *Agronomy*, 13(3): 833, το 2023, οι συγγραφείς μελετούν την ανάπτυξη μιας σύνθετης (multiplex) μεθόδου RT-PCR ικανής να ανιχνεύσει ταυτόχρονα δέκα ιούς-παθογόνων του σιταριού, συμπεριλαμβανομένων των Triticum mosaic virus (TriMV) και High plains virus (HPV), επιπλέον των πέντε στελεχών B/CYDVs και των WSSMV, SBWMV, WSMV. Η εισαγωγή των δύο νέων ιών (TriMV, HPV) στον ίδιο διαγνωστικό «πίνακα» (panel) έρχεται να καλύπτει την ανάγκη για γρήγορη/αξιόπιστη διάγνωση σε πεδία με πολλαπλές ταυτόχρονες λοιμώξεις³⁷.

Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης, συλλέχθηκαν δείγματα σιταριού από διάφορες Πολιτείες των ΗΠΑ, είτε ήταν φυσικά είτε εργαστηριακά μολυσμένα με τους ιούς-στόχους, και χρησιμοποιήθηκε επίσης υγιές φυτικό υλικό ως αρνητικός μάρτυρας. Η παρουσία πολλαπλών ιών στο ίδιο φυτό επιβεβαιώθηκε όταν εξετάστηκαν μικτά δείγματα πεδίου. Για την απομόνωση του ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε TRIzol και, μετά την παραγωγή cDNA μέσω ανάστροφης μεταγραφής, πραγματοποιήθηκε αραίωση του δείγματος για βέλτιστη απόδοση στην PCR. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν βάσει συντηρημένων περιοχών του coat protein κάθε ιού, έτσι ώστε να παράγονται τμήματα διαφορετικών μεγεθών (μεταξύ 154 και 560 bp), ενώ οι εμπρόσθιοι εκκινητές έφεραν φθορίζουσα σήμανση για ανάλυση με καπιλλική ηλεκτροφόρηση, στοιχείο που διασφαλίζει υψηλή ακρίβεια στον προσδιορισμό των προϊόντων. Για τον περιορισμό των συγκεκριμένων αντιδράσεων ακολουθήθηκε σύστημα «hot-start Taq» με πρωτόκολλο touchdown, ώστε η θερμοκρασία ανόπτησης να μειώνεται σταδιακά στις αρχικές αντιδράσεις και να επιτυγχάνεται η απαιτούμενη εξειδίκευση. Με την προσθήκη δύο επιπλέον ιών στο ήδη γνωστό διαγνωστικό σχήμα των οκτώ ιών του σιταριού, τα προϊόντα 560 bp (TriMV) και 490 bp (HPV) έδωσαν σαφή σήματα όταν εξετάστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και, επιπλέον, απέδειξαν την ιδιαίτερη ειδικότητα των εκκινητών στο “drop-out” test, όπου η απουσία κάποιου ζεύγους εκκινητών εξαφάνιζε πλήρως τη σχετική ζώνη. Οι πολλαπλές λοιμώξεις επιβεβαιώθηκαν σε πραγματικές συνθήκες, όπως συνέβη σε δείγματα από το Missouri, όπου βρέθηκαν συγχρόνως TriMV, HPV, RPV και άλλοι ιοί, υπογραμμίζοντας τη συχνότητα της “mixed infection” σε καλλιέργειες σιταριού και την ανάγκη για ένα ολοκληρωμένο εργαλείο ανίχνευσης. Η μέθοδος αποδείχτηκε αξιόπιστη, οικονομικά συμφέρουσα και γρήγορη, αφού με μία μόνο αντίδραση εντοπίζονται ταυτόχρονα δέκα διαφορετικοί ιοί, ενώ η capillary electrophoresis παρέχει αυτοματοποιημένη και ακριβή ανίχνευση των αποτελεσμάτων. Παράλληλα, το νέο σύστημα επιδεικνύει υψηλότερη ευαισθησία συγκριτικά με τις παραδοσιακές μεθόδους ELISA και επιτρέπει σαφέστερη διάκριση ιών που συχνά εμφανίζουν παρόμοια συμπτώματα. Επιπλέον, η συνδυαστική ανίχνευση σε ένα μόνο τεστ διευκολύνει τις διαδικασίες ελέγχου ανθεκτικότητας σε προγράμματα βελτίωσης σιταριού και προσφέρει ένα χρήσιμο εργαλείο σε επιδημιολογικές έρευνες και φυτοϋγειονομικούς ελέγχους. Η καινοτομία έγκειται κυρίως στο ότι, για πρώτη φορά, η ανίχνευση των TriMV και HPV πραγματοποιείται μαζί με τα υπόλοιπα οκτώ γνωστά παθογόνα του σιταριού, συνθέτοντας ένα “10-plex” πρωτόκολλο που

³⁷ Deb, M., Anderson, J. M., & Scofield, S. R. (2023). *Development of a Multiplex RT-PCR Assay for Simultaneous Detection of Ten Major Viral Pathogens of Wheat*. *Agronomy*, 13(3), 833. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030833>.

ανταποκρίνεται στις ολοένα αυξανόμενες απαιτήσεις της διαγνωστικής ιολογίας των σιτηρών. Με βάση τα αποτελέσματα από δείγματα πεδίου και τις τεχνικές επαλήθευσης που εφαρμόστηκαν, επιβεβαιώθηκε ότι το νέο σύστημα μπορεί να υποστηρίξει έγκαιρη και αξιόπιστη διάγνωση, παρέχοντας την απαιτούμενη ταχύτητα σε περιβάλλοντα όπου ο εντοπισμός και η διαχείριση των πολυμολύνσεων αποτελούν κρίσιμο παράγοντα επιτυχούς καλλιέργειας. Συνολικά, η εν λόγω μέθοδος προσφέρει έναν πολύτιμο διαγνωστικό οδηγό με ευρείες προοπτικές εφαρμογής στην έρευνα και στη φυτοπροστασία του σιταριού, με τη δυνατότητα περαιτέρω προσαρμογής ή επέκτασης για την ανίχνευση και άλλων ιών που απειλούν την παγκόσμια παραγωγή δημητριακών.

18.1 Γραφήματα από την Έρευνα

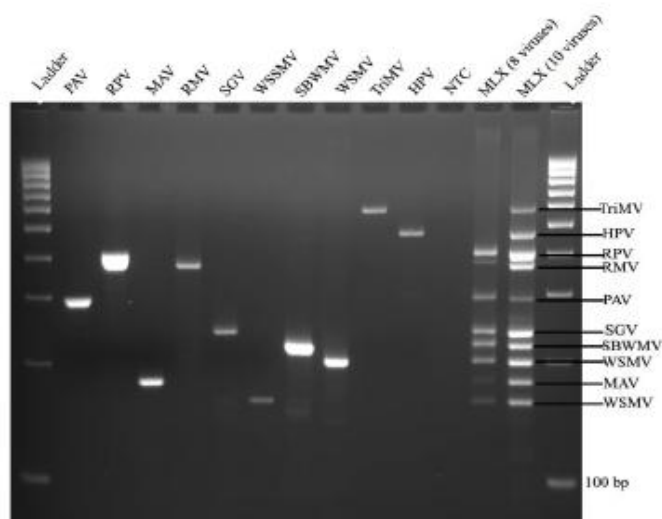


Figure 1. Multiplex RT-PCR with 10 wheat viruses. Lanes 2–11 show individual bands for two newly added viruses TriMV (Lane 10) and HPV (Lane 11) in addition to RPV, MAV, RMV, SGV (Lanes 2–6) and other wheat viruses WSSMV, SBWMV, WSMV (Lanes 7–9) with a no template control (Lane 12). The M-RT-PCR identifying all these viruses (Lane 14) shows these added viruses as two new gel bands on the top in comparison to the developed multiplex PCR with eight viruses (Lane 13). Lanes 1 and 14 have a reference.

Εικόνα 19: Τζελ πολυπλεγμένης RT-PCR για τους 10 ιούς χωριστά και σε συνδυασμό (Lane “10-viruses MLX”), επισημαίνοντας τις θέσεις των προϊόντων TriMV (560 bp) και HPV (490 bp).

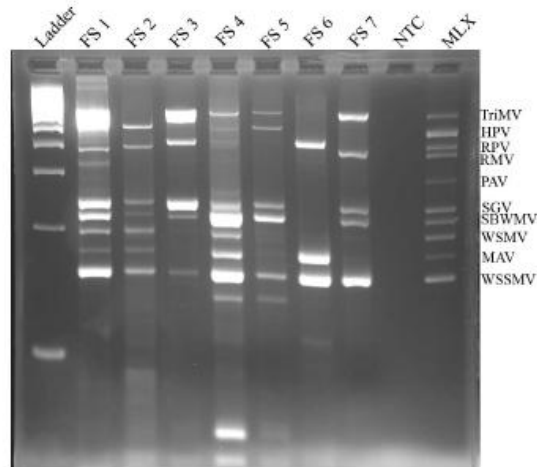


Figure 2. Simultaneous detection of TriMV, HPV, and other wheat viruses from field plant samples using M-RT-PCR. A subset of isolates is shown here: (1) FS 1-2 were received from the state of Texas, (2) FS 3 from Missouri, (3) FS 4 from Oklahoma, (4) FS 5 from Kansas, (5) FS 6 from Oklahoma, and (6) FS 7 from North Dakota. A positive control M-RT-PCR of all ten viruses simultaneously amplified with multiple primer pairs provides a reference ladder (Lane 10). There is lack of amplification of total nucleic acid from healthy wheat sample using all ten primer sets (Lane 9).

Εικόνα 20: Παράδειγμα πεδίου δειγμάτων (FS 1–7) από διάφορες περιοχές των ΗΠΑ με πολλαπλές λοιμώξεις, όπου ανιχνεύονται ταυτόχρονα TriMV και HPV μαζί με άλλους ιούς.

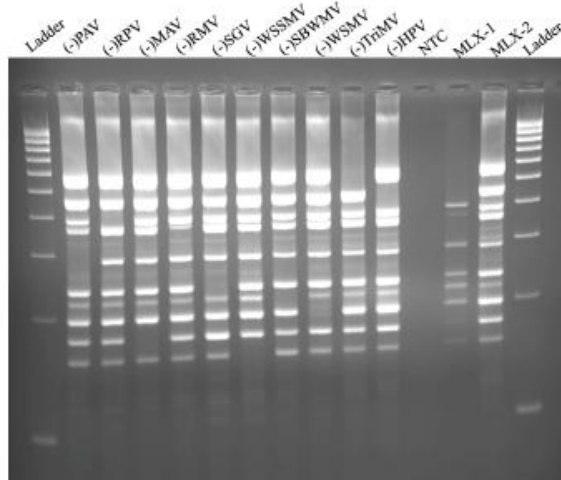


Figure 3. Specificity of the primers. Multiplex RT-PCRs (MLX) were carried out with a pool of control virus samples. A set of virus-specific primers were sequentially deleted from each M-RT-PCR (Lanes 2–11). M-RT-PCR without the TriMV-specific primers shows no band for TriMV (Lane 10) and amplification without HPV primers did not give HPV band (Lane 11). This can be visually compared with the control eight- and ten-virus multiplex (Lane 13 and 14, respectively). Lanes 1 and 15 contain a 100 bp molecular marker ladder for reference.

Εικόνα 21: Δοκιμές «drop-out» που αναδεικνύουν την απουσία της αντίστοιχης ζώνης όταν λείπει το ζεύγος εκκινητών (π.χ. Lane 10 χωρίς TriMV primers → απουσία ζώνης 560 bp).

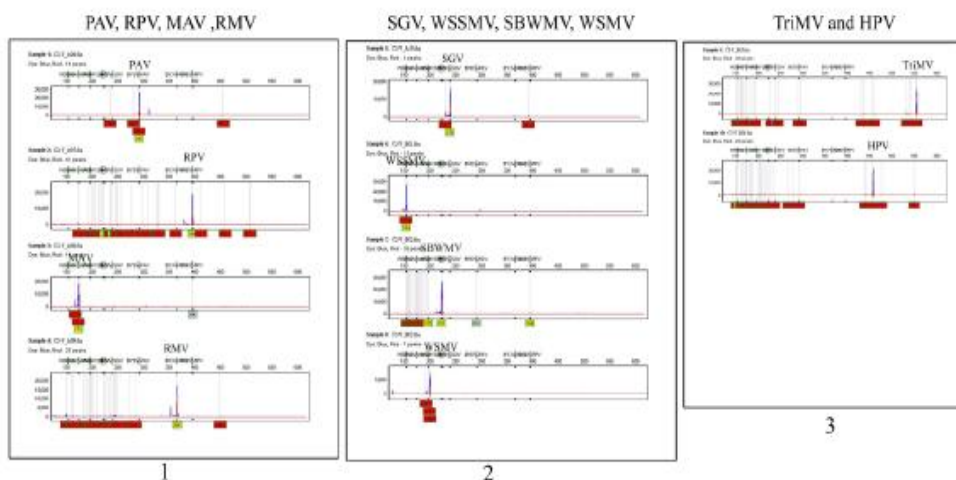


Figure 4. Electropherogram for each of the ten viruses. Individual RT-PCRs with each set of virus-specific primers were run on capillary electrophoresis using an ABI 3130xl. Each separate capillary contained the sample from an individual PCR (blue peak) and the GeneScan 500 LIZ standards (red peak) in deionized formamide. The first panel on the left (1) shows the results for the viruses PAV, RPV, MAV, and RMV, (2) identifies the other 4 viruses SGV, WSSMV, SBWMV, and WSMV, while (3) shows the additional two new viruses in the assay, TriMV and HPV. All these ten viruses were identified by separate peaks (blue) very close to the amplicon size identified in an agarose gel.

Εικόνα 22: Ηλεκτροφερογράμματα από καπυλική ηλεκτροφόρηση όπου κάθε ιός εμφανίζεται ως διακριτή κορυφή (blue peak) με μέγεθος-στόχο.

19. Cereal production in Africa: the threat of current plant pathogens in changing climate review

Η μελέτη με τίτλο «*Cereal production in Africa: the threat of current plant pathogens in changing climate—A review*»³⁸ δημοσιεύτηκε το **2024** στο περιοδικό **Discover Agriculture** από τους **Joshua Benjamin, David Olayinka Oyedokun, Emmanuel Victor Oziegbe, Joshua Oni, Emmanuel Boluwatife Ogundare, Godswill Ofuowoichoyama Ujah** και **Aminat Adebayo**. Πρόκειται για review (ανασκόπηση), στην οποία οι συγγραφείς συνέλεξαν πρόσφατες βιβλιογραφικές πηγές (άρθρα, εκθέσεις) για να καταγράψουν κυρίως τα τρέχοντα σημαντικά παθογόνα (μύκητες, βακτήρια, ιοί και νηματώδεις) που προσβάλλουν τις κυριότερες καλλιέργειες σιτηρών στην Αφρική (καλαμπόκι, σόργο, ρύζι, σιτάρι, κριθάρι, κεχρί κ.λπ.). Εξετάζουν τις απώλειες από αυτές τις ασθένειες, καθώς και τον δυνητικό τους αντίκτυπο στο πλαίσιο των κλιματικών αλλαγών. Στο κείμενο αυτό επίσης, οι συγγραφείς αναδεικνύουν τη σημασία της παραγωγής σιτηρών στην Αφρική και τη συμβολή της στην επισιτιστική επάρκεια, περιγράφοντας παράλληλα τους κυριότερους μικροβιακούς παθογόνους παράγοντες (μύκητες, βακτήρια, ιούς και νηματώδεις) που απειλούν την αποδοτικότητα των καλλιεργειών. Επιπλέον, υπογραμμίζουν πώς οι μεταβαλλόμενες κλιματικές συνθήκες, όπως η άνοδος της θερμοκρασίας, οι ακανόνιστες

³⁸ Benjamin, J., Oyedokun, D. O., Oziegbe, E. V., Oni, J., Ogundare, E. B., Ujah, G. O., & Adebayo, A. (2024). Cereal production in Africa: the threat of current plant pathogens in changing climate-a review. *Discover Agriculture*, 2(33).

<https://doi.org/10.1007/s44279-024-00040-3>

βροχοπτώσεις και η αυξημένη συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα, πιθανότατα θα εντείνουν ή θα τροποποιήσουν την εξάπλωση και τη σοβαρότητα αυτών των ασθενειών. Η εν λόγω μελέτη συγκεντρώνει στοιχεία από πολυάριθμες έρευνες πεδίου και μοντέλα προσομοίωσης, προβάλλοντας μια “μεγάλη εικόνα” του προβλήματος και προτείνοντας λύσεις, όπως η ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών ή η εφαρμογή προγνωστικών συστημάτων— που κρίνονται καθοριστικές για τη βιώσιμη παραγωγή σιτηρών στην αφρικανική ήπειρο.

Σύμφωνα με το κείμενο, οι συγγραφείς αντλούν δημογραφικά και στατιστικά δεδομένα από βάσεις όπως η FAOSTAT³⁹, επισημαίνοντας τον κομβικό ρόλο των σιτηρών στην επισιτιστική ασφάλεια πολλών αφρικανικών χωρών, ενώ παράλληλα παραπέμπουν σε εκθέσεις IPCC⁴⁰ που αναδεικνύουν τις ταχύτατες κλιματικές μεταβολές και τη συνακόλουθη επίδρασή τους στην εμφάνιση και εξάπλωση παθογόνων. Η μεθοδολογική προσέγγιση είναι κυρίως βιβλιογραφική, με συγκέντρωση πρόσφατων ερευνητικών εργασιών που αναφέρονται στα σοβαρότερα παθογόνα μύκητα (*Fusarium*, *Magnaporthe*, *Cercospora*, *Claviceps*, *Ustilago* κ.ά.), σε ιογενείς ασθένειες (Maize Streak Virus, Rice Yellow Mottle Virus, Maize lethal necrosis κ.λπ.), σε βακτήρια (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. translucens*) και σε νηματώδεις (*Pratylenchus*, *Meloidogyne*, *Heterodera*), τα οποία επιφέρουν σημαντικές απώλειες στις καλλιέργειες καλαμποκιού, σόργου, ρυζιού, σιταριού και άλλων σιτηρών σε χώρες όπως η Νιγηρία, η Αιθιοπία, η Κένυα, η Νότια Αφρική και η Τυνησία. Η ανασκόπηση περιλαμβάνει εκτιμήσεις ποσοστών ζημιάς, που σε ακραίες περιπτώσεις αγγίζουν το 30–100% των αποδόσεων, αναδεικνύοντας ότι η μυκητιακή μόλυνση (π.χ. *Fusarium*) είναι από τις πιο απειλητικές, διότι συνδέεται και με την παρουσία επικίνδυνων μυκοτοξινών. Τονίζονται επίσης οι ιολογικές προσβολές (Maize lethal necrosis, Rice yellow mottle virus κ.λπ.) που διαδίδονται ταχύτερα εξαιτίας της ενίσχυσης των πληθυσμών των εντόμων-φορέων σε θερμότερες και υγρότερες συνθήκες, ενώ οι ερευνητές επισημαίνουν ότι η αύξηση θερμοκρασίας και οι ακανόνιστες βροχοπτώσεις, σε συνδυασμό με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα, πιθανότατα θα μετατοπίσουν ή θα επεκτείνουν τη γεωγραφική εξάπλωση αρκετών παθογόνων. Όπως σημειώνεται και σε πρόσφατες μοντελοποιήσεις⁴¹, η κλιματική αστάθεια μπορεί να ευνοήσει συγκεκριμένους μύκητες ή ιούς, ενώ ταυτόχρονα να δυσχεράνει την επιβίωση άλλων, δημιουργώντας όμως αβεβαιότητες στις προβλέψεις. Στη συζήτηση, οι συγγραφείς υπογραμμίζουν την επείγουσα ανάγκη εφαρμογής συστημάτων

³⁹ FAOSTAT. Cereal production. 2021. Available from: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.

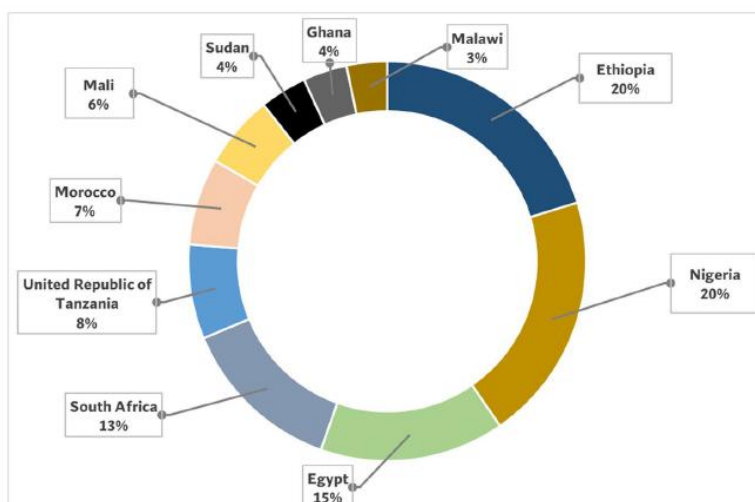
⁴⁰ IPCC. Global Warming of 1.5°C: IPCC Special Report on Impacts of Global Warming of 1.5°C above Pre-industrial Levels in Context of Strengthening Response to Climate Change, Sustainable Development, and Efforts to Eradicate Poverty. 1st ed. Cambridge University Press; 2022. Available from: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9781009157940/type/book>.

⁴¹ Ορισμένοι παθογόνοι δυσκολεύονται και περιορίζονται υπό συνθήκες παρατεταμένης ξηρασίας και υψηλότερων θερμοκρασιών, όπως: **Magnaporthe oryzae** (μύκητας του “rice blast”), που προτιμά σχετικά υψηλή υγρασία, η οποία οδηγεί σε μειωμένη διαθεσιμότητα υγρών επιφανειών σε συνδυασμό με παρατεταμένη ζέστη μπορούν να περιορίσουν τη βλαστική του ανάπτυξη (Mutiga et al. 2017). **Fusarium graminearum** (*Fusarium* head blight σε σιτάρι), χρειάζεται δροσερές-υγρές συνθήκες για ωρίμανση ασκοσπορίων και η παρατεταμένη έλλειψη βροχοπτώσεων πιθανόν μειώνει τις επιδημίες (West et al. 2012). **Xanthomonas oryzae** pv. **oryzae** (βακτήριο του bacterial leaf blight ρυζιού) στο οποίο η ακραία ξηρασία μειώνει την ελεύθερη υγρασία στο φύλλωμα και δυσχεραίνει τη διασπορά του (Nino-Liu et al. 2006).

παρακολούθησης και έγκαιρης προειδοποίησης, που θα βασίζονται σε κλιματικά δεδομένα και επιδημιολογικά μοντέλα, καθώς και την ανάπτυξη ολοένα και ανθεκτικότερων ποικιλιών μέσω βελτιωτικών τεχνικών. Παρότι δεν περιγράφουν ενδελεχώς τεχνικά πρωτόκολλα εργαστηριακής ανίχνευσης, αναφέρουν ότι η επαρκής διάγνωση και η στοχευμένη αντιμετώπιση αποτελούν βασικές στρατηγικές για τον περιορισμό των απωλειών και την προαγωγή της διασφάλισης ποιότητας των σιτηρών. Επισημαίνουν ακόμη τη σημασία της καταπολέμησης μυκοτοξινών, οι οποίες έχουν αντίκτυπο όχι μόνο στην παραγωγικότητα, αλλά και στην εμπορική αξία και ασφάλεια των τελικών προϊόντων. Συνολικά, η ανασκόπηση καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η κλιματική αλλαγή θα συνεχίσει να ασκεί σημαντική πίεση στη σιτοπαραγωγή της Αφρικής, με πολλούς παθογόνους παράγοντες να απειλούν την απόδοση και την ποιότητα των καλλιεργειών, και προτείνει συντονισμένες παρεμβάσεις σε επίπεδο πολιτικής, έρευνας και εκπαίδευσης των παραγωγών, ώστε να διασφαλιστεί η βιώσιμη διαχείριση και αξιοποίηση των πολύτιμων σιτηρών της ηπείρου.

19.1. Γραφήματα/Πίνακες από την Έρευνα

Fig. 1 Top 10 producing countries of total cereal in Africa as of 2021. Percentage values are derived from total cereal production by the ten countries (not total production in Africa). Ethiopia and Nigeria are leading countries. Source [13]



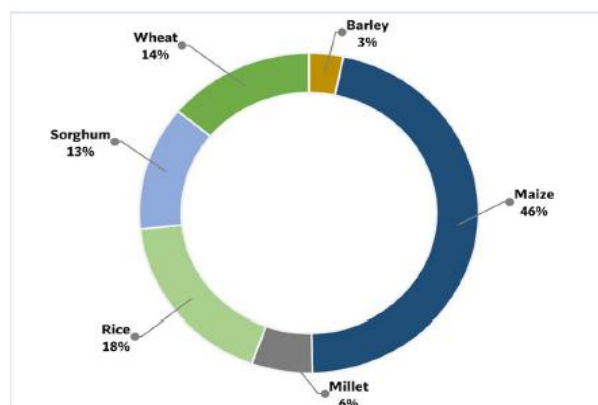
Εικόνα 23 : Διάγραμμα-κύκλος (pie/donut chart) που δείχνει τα 10 κορυφαία αφρικανικά κράτη στην παραγωγή σιτηρών (ως ποσοστά επί του συνόλου της παραγωγής των δέκα χωρών, όχι επί του συνολικού της Αφρικής).

- Η Αιθιοπία και η Νιγηρία εμφανίζονται ως οι δύο μεγαλύτερες χώρες παραγωγής (από 20% η καθεμία).
- Ακολουθούν η Αίγυπτος (15%) και η Νότια Αφρική (13%).
- Υπάρχουν επίσης η Τανζανία (8%), το Μαρόκο (7%), το Μάλι (6%), το Σουδάν και η Γκάνα (~4%) και τέλος το Μαλάουι (3%).

Τα στοιχεία αφορούν το 2021 και προέρχονται από τη βάση FAOSTAT⁴².

⁴² FAOSTAT. Cereal production. 2021. Available from:
<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.

Fig. 2 Percentage production of different cereal crops in Africa as of 2021. Maize is the most cultivated cereal followed by rice and wheat. Source [13]



Εικόνα 24: Διάγραμμα-κύκλος που παρουσιάζει την κατανομή/ποσοστό των τυπικών ειδών σιτηρών που καλλιεργούνται στην Αφρική (elements: Maize, Rice, Wheat, Sorghum, Millet, Barley).

- Το καλαμπόκι (maize) καταλαμβάνει το 46% της συνολικής παραγωγής.
- Το ρύζι αντιστοιχεί σε 18%, το σιτάρι σε 14%.
- Το σόργο με 13%, το κεχρί (millet) 6% και το κριθάρι (barley) 3%.

Διαφαίνεται ότι το καλαμπόκι έχει την κυρίαρχη θέση στην αφρικανική παραγωγή σιτηρών, ακολουθούμενο από ρύζι και σιτάρι.



Fig. 3 Disease symptoms of some current pathogens affecting cereal production in Africa. From left to right: *Magnaporthe oryzae* (rice blast), *Claviceps africana* (sorghum ergot), *Fusarium verticillioides* (Gibberella rot), *F. graminearum* (wheat head blight), *Cercospora zeina* (grey spot), Maize streak virus, *Ustilago maydis* (maize smut), Maize lethal necrosis virus, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and Rice yellow virus

Εικόνα 25: Σειρά εικόνων, όπου κάθε τμήμα παρουσιάζει διαφορετικές ενδείξεις/συμπτώματα ασθενειών σε διάφορα σιτηρά.

Το κολάζ δείχνει ορατές βλάβες: από κηλίδες και κηλιδώσεις στα φύλλα, μέχρι σήψεις στον καρπό, αποχρωματισμούς σε στάχυα και μεταχρωματισμούς. Συνοψίζει πώς αυτά τα παθογόνα επιδρούν εμφανισιακά σε κάθε στάδιο του φυτού. Επιβεβαιώνεται η ποικιλία των παθογόνων που επηρεάζουν την παραγωγή σιτηρών και επισημαίνεται έτσι η σημασία της έγκαιρης αναγνώρισης των συμπτωμάτων στον αγρό.

1. *Magnaporthe oryzae* (rice blast) σε ρύζι
2. *Claviceps africana* (sorghum ergot) στο σόργο
3. *Fusarium verticillioides* (*Gibberella* rot) στο καλαμπόκι
4. *Fusarium graminearum* (wheat head blight) στο σιτάρι
5. *Cercospora zeina* (grey leaf spot) σε καλαμπόκι
6. Maize streak virus (MSV) στο καλαμπόκι
7. *Ustilago maydis* (maize smut)
8. Maize lethal necrosis virus (MLN)
9. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (bacterial leaf blight) στο ρύζι
10. Rice yellow virus σε ρύζι

20. Πρόσθετες έρευνες για εξαγωγή απλών δεδομένων για την βιβλιογραφική ανασκόπηση

20.1 Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops⁴³.

- **Συγγραφείς:** Dimitrios I. Tsitsigiannis, Myrto Dimakopoulou, Polymnia P. Antoniou, Eleftherios C. Tjamos.
- **Έντυπο δημοσίευσης:** *Phytopathologia Mediterranea*.
- **Ημερομηνία δημοσίευσης:** Απρίλιος 2012.
- **Χώρα προέλευσης:** Ελλάδα.
- **Τύπος έρευνας:** Βιβλιογραφική ανασκόπηση με αναφορές σε πειραματικά δεδομένα.

1. Μέθοδος ανάλυσης εντοπισμού παθογόνου

- Η έρευνα περιλαμβάνει βιολογικές στρατηγικές ελέγχου μέσω μικροβιακών ανταγωνιστών.
- Αναφέρεται στη χρήση ατοξικών στελεχών *Aspergillus*, βακτηρίων (π.χ. *Pseudomonas*), και ζυμών (π.χ. *Aureobasidium pullulans*) για τη μείωση της παραγωγής μυκοτοξινών.

2. Δείγμα έρευνας

- **Τύπος δημητριακών:** Σιτάρι, καλαμπόκι, και άλλα γεωργικά προϊόντα (π.χ. σταφύλια, φιστίκια, μήλα).
- **Μορφή:** Φυτά στο στάδιο της ανάπτυξης και μετά τη συγκομιδή.

⁴³ Tsitsigiannis, D. I., Dimakopoulou, M., Antoniou, P. P., & Tjamos, E. C. (2012). Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(1), 158-174. <https://doi.org/10.1234/abcde>.

3. Τύπος ή τύποι παθογόνου

- **Μύκητες:**
 - *Aspergillus* spp. (παραγωγή αφλατοξινών).
 - *Fusarium* spp. (παραγωγή φουμονισινών, DON).
 - *Penicillium* spp. (παραγωγή πατουλίνης).

4. Ευρήματα

- Η βιολογική καταπολέμηση είναι πολλά υποσχόμενη για τη μείωση μυκοτοξινών, με παραδείγματα επιτυχίας:
 - Ατοξικά στελέχη *Aspergillus flavus* μειώνουν τις αφλατοξίνες σε φιστίκια και καλαμπόκι κατά 70-99%.
 - Το *Aureobasidium pullulans* μείωσε τις μολύνσεις από *Aspergillus carbonarius* σε σταφύλια, μειώνοντας τη συγκέντρωση ωχρατοξίνης Α στο κρασί.
- Βακτήρια όπως το *Bacillus subtilis* και ζύμες όπως το *Candida sake* χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της παραγωγής μυκοτοξινών σε καλλιέργειες και αποθηκευμένα προϊόντα.

20.2 Quality and Safety Traceable Information Mining in Wheat Flour Processing Based on Risk Matrix and Flow Analysis Method⁴⁴

- **Συγγραφείς:** Qian Jianping, Song Yingzhuo, Wang Shanshan, Wu Xiaoming, Luo Jiyang
- **Έντυπο Δημοσίευσης:** *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*
- **Ημερομηνία Δημοσίευσης:** Ιανουάριος 2019
- **Χώρα Προέλευσης:** Κίνα
- **Τύπος Έρευνας:** Πρωτότυπη ερευνητική εργασία που συνδυάζει ανάλυση δεδομένων και σχεδίαση συστήματος

1. Μέθοδος Ανάλυσης Εντοπισμού Παθογόνου

Η έρευνα χρησιμοποίησε ανάλυση κινδύνων με τη βοήθεια:

- **Δεδομένων LD50 και καρκινογένεσης** για την αξιολόγηση της τοξικότητας.
- **Δισδιάστατης μήτρας κινδύνων** για την εκτίμηση της σοβαρότητας και της πιθανότητας εμφάνισης κινδύνων. Αν και δεν γίνεται άμεση χρήση μοριακών τεχνικών όπως PCR ή ELISA, η προσέγγιση ανήκει στον τομέα **χημικής και στατιστικής ανάλυσης**.

2. Δείγμα Έρευνας

- **Τύπος Δημητριακών:** Σιτάρι (σε μορφή αλεύρου).
- **Μορφή:** Επεξεργασμένο προϊόν (αλεύρι σίτου).

⁴⁴ Qian, J., Song, Y., Wang, S., Wu, X., & Luo, J. (2019). Quality and safety traceable information mining in wheat flour processing based on risk matrix and flow analysis method. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 35(2), 302-308.

3. Τύπος Παθογόνου

Η έρευνα εντόπισε κυρίως χημικά και τοξικές ουσίες που επηρεάζουν την ασφάλεια του αλευριού:

- Δεοξυνιβαλενόλη (DON)
- Υπεροξειδίο βενζοϋλίου
- Αλουμίνιο
- Μόλυβδος
- Κάδμιο
- Βενζοπυρένιο
- Αφυδροξικό οξύ

4. Ευρήματα

- Η δεοξυνιβαλενόλη (DON) ήταν η ουσία με τον υψηλότερο κίνδυνο (κατηγορία 4).
- Βενζοπυρένιο, αλουμίνιο, μόλυβδος και κάδμιο ανήκουν σε χαμηλότερες κατηγορίες κινδύνου (κατηγορίες 2-3).
- Οι βασικοί κόμβοι κινδύνου στην επεξεργασία αλεύρου περιλαμβάνουν:
 - ο Αποθήκευση πρώτων υλών
 - ο Προσθήκη υλικών
 - ο Συνθήκες εξοπλισμού και συσκευασίας.

20.3 Investigation of 2,4-Dihydroxylaryl-Substituted Heterocycles as Inhibitors of the Growth and Development of Biotrophic Fungal Pathogens Associated with the Most Common Cereal Diseases⁴⁵.

- **Συγγραφείς:** Klaudia Rząd, Aleksandra Nucia, Weronika Grzelak, Joanna Matysiak, Krzysztof Kowalczyk, Sylwia Okon, Arkadiusz Matwijczuk.
- **Έντυπο δημοσίευσης:** International Journal of Molecular Sciences.
- **Ημερομηνία δημοσίευσης:** 29 Ιουλίου 2024.
- **Χώρα προέλευσης:** Πολωνία.
- **Τύπος έρευνας:** Πρωτότυπη εργαστηριακή έρευνα.

1. Μέθοδος ανάλυσης εντοπισμού παθογόνου:

- Η μέθοδος βασίστηκε σε βιολογικές δοκιμές *in vitro* με χρήση παραγόντων σε διάφορες συγκεντρώσεις (5–10 µg/mL).
- Χρησιμοποιήθηκε οπτική εκτίμηση ανάπτυξης μυκητιακών παθογόνων σε φύλλα αγρών, χωρίς συγκεκριμένες μοριακές ή φασματομετρικές τεχνικές.

⁴⁵ Rząd, K., Nucia, A., Grzelak, W., Matysiak, J., Kowalczyk, K., Okon, S., & Matwijczuk, A. (2024). Investigation of 2,4-Dihydroxylaryl-Substituted Heterocycles as Inhibitors of the Growth and Development of Biotrophic Fungal Pathogens Associated with the Most Common Cereal Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(15), 8262.

<https://doi.org/10.3390/ijms25158262>

2. Δείγμα έρευνας:

- **Τύπος δημητριακών:** Βρώμη, σιτάρι, κριθάρι, και τριτικάλε.
- **Μορφή:** Φύλλα φυτών μολυσμένα από μυκητιακά παθογόνα.

3. Τύπος ή τύποι παθογόνου:

- *Blumeria graminis* (προκαλεί ωίδιο).
- *Puccinia coronata*, *P. recondita*, και *P. hordei* (προκαλούν σκωρίαση).

4. Ευρήματα:

- Από τους 33 εξεταζόμενους ετεροκυκλικούς παράγοντες, οι ενώσεις **28**, **29**, και **19** ήταν οι πιο αποτελεσματικές, με αναστολή ανάπτυξης παθογόνων έως 90–100%.
- Οι ενώσεις 28 και 29 έδειξαν υψηλή αποτελεσματικότητα ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (5 µg/mL).
- Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι ετεροκυκλικές ενώσεις με υποκατάστατα διωδροξυαρύλια είναι υποσχόμενοι υποψήφιοι για χρήση ως μυκητοκτόνα

Μέρος III

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

Παρακάτω παρουσιάζονται βασικά συμπεράσματα που προκύπτουν από την ανασκόπηση των 22 ερευνών που διερευνούν τις μεθόδους ανίχνευσης παθογόνων και τις στρατηγικές ελέγχου ποιότητας σε σιτηρά και προϊόντα τους. Στο σύνολο των μελετών, καμία μέθοδος δεν εφαρμόζεται σε όλες ανεξαιρέτως τις εργασίες. Οι δύο συχνότερες, ωστόσο, είναι η ELISA (9 φορές) και η PCR σε διάφορες παραλλαγές (8 φορές). Οι μύκητες εμφανίζονται ως βασική κατηγορία παθογόνων (16 εμφανίσεις), ακολουθούν τα βακτήρια (5 φορές), οι ιοί (3 φορές) και οι νηματώδεις (1 φορά). Κεντρικό σημείο αποτελεί η ανίχνευση και ο περιορισμός των μυκοτοξινών (ιδίως μέσω ELISA, αλλά και φασματομετρικών τεχνικών όπως HPLC/LC–MS/MS), ενώ σε αρκετές εργασίες περιγράφονται μοριακές τεχνικές (PCR, RT-PCR, real-time PCR) για την αναγνώριση φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων ή ιών σε αγρούς σιτηρών. Ταυτόχρονα, μελέτες επιτόπιας δειγματοληψίας και κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους αποτυπώνουν τον μικροβιακό φόρτο σε αλεύρια και δημητριακά προϊόντα. Τέλος, γίνονται σαφείς οι διαφορετικοί τρόποι διασφάλισης ποιότητας (QA), από απλές πρακτικές αποθήκευσης και βιολογικό έλεγχο, έως ακριβείς τεχνικές screening (ELISA, PCR) και πιο καινοτόμες προσεγγίσεις (ηλεκτρονική «μύτη», risk matrix). Όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν αφενός την πολυμορφία των παθογόνων και αφετέρου την ανάγκη πολυεπίπεδων αναλυτικών εργαλείων για την αποτελεσματική διαχείριση της ασφάλειας των σιτηρών.

3.1 Η Εξέλιξη των Μεθόδων Ανίχνευσης, ο Ρόλος της Κλιματικής Αλλαγής και η Γεωγραφική Διασπορά των Μελετών (1993–2024)

Η ανασκόπηση των 22 ερευνών, που εκτείνονται χρονολογικά από το 1993 έως το 2024, επιβεβαιώνει το ταχύτατα εξελισσόμενο τοπίο στις μεθόδους ανίχνευσης παθογόνων και στον έλεγχο ποιότητας/ασφάλειας των σιτηρών. Οι πρώτες μελέτες (δεκαετία 1990–αρχές 2000) δείχνουν μια σχετικά περιορισμένη χρήση PCR και ELISA, με σαφή έμφαση σε κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές (καλλιέργειες, plate counts). Ωστόσο, ήδη από τα τέλη των 1990 έως και τα μέσα της επόμενης δεκαετίας, αποτυπώνεται η σταδιακή ενσωμάτωση πιο εξειδικευμένων μοριακών (π.χ. ITS-RFLP, RAPD, Southern blot, στην έρευνα Turner et al. 1998) και ανοσολογικών μεθόδων (π.χ. ανταγωνιστική ELISA για μυκοτοξίνες). Καθώς προχωράμε στον 21ο αιώνα (2005–2015), διακρίνεται η επιταχυνόμενη καθιέρωση της PCR (ειδικότερα η Real-time PCR) ως μεθόδου για την ακριβή διάγνωση βακτηριακών/ιολογικών/μυκητιακών παθογόνων, καθώς και η διαρκώς βελτιωμένη ELISA για την ανίχνευση διαφόρων μυκοτοξινών (αφλατοξίνες, ωχρατοξίνες, DON κ.ά.). Αργότερα, στη δεκαετία 2010–2020, βλέπουμε πρωτότυπες εφαρμογές, όπως η χρήση νανοσωμάτων (anti-idiotypic) για περισσότερη «πράσινη» και ευαίσθητη ELISA, ή ακόμα και την εφαρμογή ηλεκτρονικής «μύτης» (e-nose) σε βιομηχανική κλίμακα για real-time screening πτητικών ουσιών από μύκητες. Τέλος, στις πλέον πρόσφατες δημοσιεύσεις (μετά το 2020), διακρίνονται δύο βασικά σημεία:

1. Η ενσωμάτωση πολυπλεγμένων τεχνικών (π.χ. Multiplex RT-PCR ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών ιών/παθογόνων).

2. Η επικράτηση καινοτόμων συστημάτων τόσο στην αναλυτική προσέγγιση (π.χ. real-time monitoring, data-fusion) όσο και στη βελτιστοποίηση της μετασυλλεκτικής διαχείρισης.

3.1.1 Ο Ρόλος της Κλιματικής Αλλαγής και τα Νέα Δεδομένα

Οι νεότερες μελέτες (κυρίως από το 2012 κι έπειτα) εισάγουν την παράμετρο της κλιματικής αλλαγής, υπογραμμίζοντας ότι τα ακραία καιρικά φαινόμενα, οι απότομες διακυμάνσεις θερμοκρασίας και υγρασίας, καθώς και η αύξηση του διοξειδίου του άνθρακα μπορούν να αλλάξουν:

- Την επιτομή των παθογόνων που αναπτύσσονται (π.χ. ευνοώντας μύκητες όπως *Fusarium* ή ιούς που διασπείρονται από έντομα-φορείς),
- Την περίοδο και ένταση της μόλυνσης (συνχά σημειώνονται περισσότερες μικτές λοιμώξεις),
- Τη γεωγραφική εξάπλωση (ανάλογα με τα νέα κλιματικά «παράθυρα» ευνοούνται ή περιορίζονται συγκεκριμένα είδη).

Μελέτες από την Αφρική (2024) αλλά και την Ευρώπη (όπως στις ρουμανικές ή μεσογειακές εργασίες) καταγράφουν ξεκάθαρα αυτήν τη μετατόπιση και προτείνουν προγνωστικά μοντέλα, συστήματα προειδοποίησης και ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών. Παράλληλα, αναφέρεται συχνά η ανάγκη εφαρμογής μετασυλλεκτικών πρακτικών (αεροστεγής αποθήκευση, βιολογικά σκευάσματα ανταγωνιστικών μικροβίων) ειδικά όταν οι καιρικές συνθήκες είναι απρόβλεπτες.

3.1.2 Η Ευρεία Γεωγραφική Κάλυψη των Μελετών

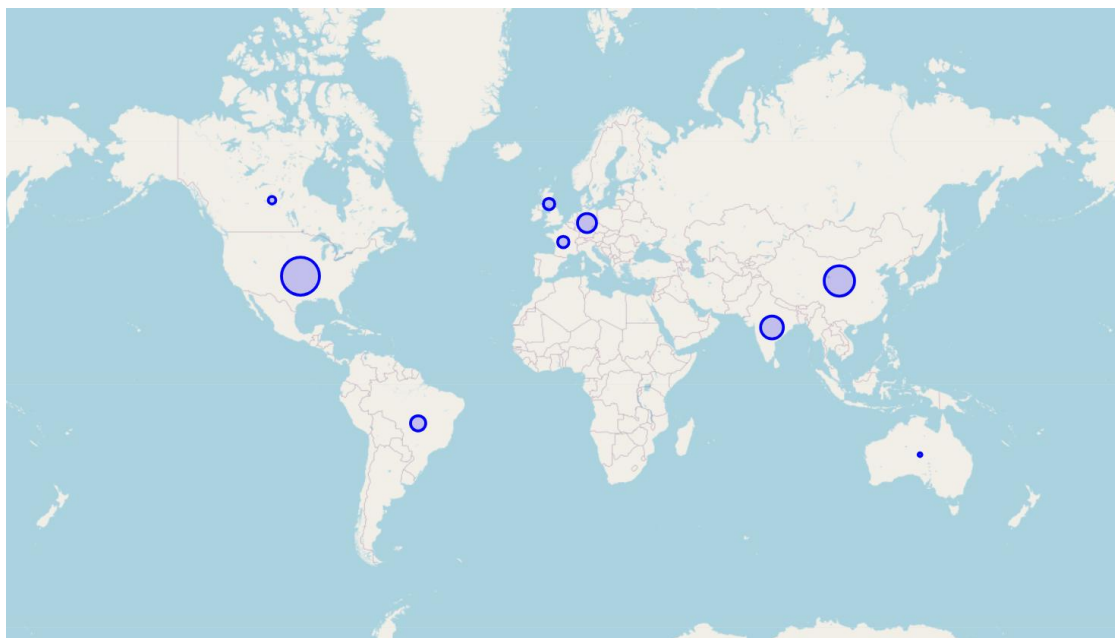
Είναι επίσης σημαντικό ότι οι 22 μελέτες καλύπτουν ένα ευρύ γεωγραφικό φάσμα, σχεδόν από όλες τις ηπείρους:

- Ευρώπη: Ρουμανία, Τσεχία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ελλάδα, Ιταλία, Πολωνία κ.ά.
- Αυστραλία: μελέτη για μικροβιολογία αλεύρων (Berghofer et al.).
- Ασία: Κίνα (Nanjing), αφενός με ELISA για ωχρατοξίνη (2011) και risk analysis (2019).
- Αφρική: μελέτες για κλιματική αλλαγή και την παραγωγή δημητριακών, εστίαση σε μυκοτοξίνες/παθογόνα (2024), όπως και επιμέρους καταγραφές στον μεσογειακό χώρο.
- Βόρεια Αμερική: PCR τυποποίηση (FOOD-PCR project) ή αναφορές σε Hoorfar κ.ά., καθώς και Deb et al. (2023) στις ΗΠΑ.

Η γεωγραφική αυτή πολυμορφία επιτρέπει τη διαμόρφωση γενικών συμπερασμάτων:

1. Οι μέθοδοι ανίχνευσης (ELISA, PCR, φασματομετρικές) έχουν καθιερωθεί σε παγκόσμιο επίπεδο, αλλά σε διαφορετικούς βαθμούς ωρίμανσης.
2. Η κλιματική αλλαγή επηρεάζει τόσο θερμές όσο και εύκρατες περιοχές, καθιστώντας παγκόσμια την ανάγκη βελτιωμένων συστημάτων διαχείρισης και πολυπαραμετρικής παρακολούθησης των σιτηρών (κλιματικά μοντέλα, ανθεκτικές ποικιλίες, on-line τεχνολογίες).
3. Παρά το ότι αρκετές μελέτες εστιάζουν σε συγκεκριμένες γεωγραφικές ζώνες (Ευρώπη, Ασία κ.λπ.), τα συνολικά ευρήματα συγconverge σε παρόμοια ζητήματα

ασφάλειας: μυκοτοξίνες (*Fusarium*, *Aspergillus*), σκωριάσεις (*Puccinia*), ιολογικές ασθένειες (BYDV, WSMV) και τροφιμογενή βακτήρια (*Salmonella*, *E. coli*).



Εικόνα 26: Παγκόσμιος Χάρτης Προέλευσης Επιστημονικών Ερευνών

Αποτιμώντας μακρά εξέλιξη (1993–2024), προκύπτει μια σαφής πρόοδος από τις βασικές κλασικές τεχνικές (μικροβιολογικοί μετρητές, απλή PCR/ELISA) σε πιο σύγχρονες:

- Real-time / multiplex PCR,
- διαφοροποιημένες μορφές ELISA (νανοσώματα, ταχύρρυθμα kits),
- ηλεκτρονική «μύτη» (real-time VOC),
- LC–MS/MS.

Η κλιματική αλλαγή ήδη αναμορφώνει τον επιπολασμό και τη δυναμική παθογόνων· οι μετασυσλλεκτικές τεχνικές και ο συντονισμός με προγνωστικά μοντέλα εμφανίζονται όλο και πιο αναγκαίοι. Παράλληλα, το γεωγραφικό εύρος των μελετών επιβεβαιώνει ότι οι προκλήσεις ασφάλειας των σιτηρών —είτε μυκοτοξίνες, είτε σκωριάσεις, είτε βακτήρια— είναι διεθνείς, με κάθε περιοχή να προσαρμόζει τα εργαλεία και τις μεθόδους στη δική της παραγωγική και κλιματική πραγματικότητα.

3.2. Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Ανασκόπησης

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικά Μελετών Ανίχνευσης Παθογόνων στα Δημητριακά

A/A	Έτος	Τίτλος	Συγγραφείς	Τύπος Έρευνας	Μέθοδος Ανίχνευσης	Τύπος Παθογόνου	Τύπος Δημητριακού
1	1993	Polymerase chain reaction (PCR) a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food — Detection of wheat contamination in non-wheat food products	Michael Allmann et al.	Πρωτότυπη έρευνα	PCR, ELISA	Μη παθογόνο (DNA σιταριού)	Επεξεργασμένα τρόφιμα (π.χ. σούπες, ρυζάλευρα)
2	1998	Refinement of PCR-detection of Fusarium avenaceum and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to Fusarium tricinatum	A. S. Turner, A. K. Lees, H. N. Rezanoor, P. Nicholson	Πρωτότυπη έρευνα	PCR (ITS-RFLP, RAPD, Southern blot)	Μύκητες (F. avenaceum, F. tricinatum)	Καλλιέργειες (σιτάρι, κριθάρι)
3	2000	Isolation of Bacillus strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms	T. Földes, I. Bánhegyi, Z. Herpai, L. Varga, J. Szigeti	Πρωτότυπη έρευνα	Microbiological plating	Μύκητες, Βακτήρια	Ριζόσφαιρα δημητριακών

4	2003	Microbiology of wheat and flour milling in Australia	Lana K. Berghofer et al.	Έρευνα επιτόπιας δειγματοληψίας	Plate counts, MPN	Βακτήρια, Μύκητες, Salmonella	Σιτάρι, προϊόντα αλευροποίησης
5	2003	Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens	B. Malorny, P. T. Tassios, P. Rådström, N. Cook, M. Wagner, J. Hoorfar	Ανασκόπηση	PCR, real-time PCR, DNA chips	Βακτήρια, Ιοί	Ευρύ φάσμα (περιλαμβάνει δημητριακά)
6	2007	Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain	Naresh Magan, David Aldred	Ανασκόπηση + Πειραματικά παραδείγματα	ELISA, HPLC, GC-MS	Μύκητες (μυκοτοξίνες)	Δημητριακά (μετά τη συγκομιδή)
7	2009	Discrimination of Three BYDV Species by One-step RT-PCR-RFLP and Sequence Based Methods in Cereal Plants from the Czech Republic	J. K. Kundu, J. Jarošová, S. Gadiou, G. Červená	Πρωτότυπη έρευνα	RT-PCR, RFLP, Sequencing	Ιός (BYDV)	Καλλιέργειες (σιτάρι, κριθάρι)
8	2009	Molds and Mycotoxin Content of Cereals in Southeastern Romania	C. Tabuc, D. Marin, P. Guerre, T. Sesan, J. D. Bailly	Έρευνα + Ανάλυση στο εργαστήριο	Microbiological + ELISA	Μύκητες (Aspergillus, Fusarium)	Δημητριακά (καλαμπόκι, σιτάρι)
9	2011	Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China	Aihua Zhang, Yanna Ma, Lulu Feng, Ying Wang, Chenghua He, Xichun Wang, Haibin Zhang	Πρωτότυπη έρευνα	Competitive ELISA	Μύκητες (Ochratoxin A)	Δημητριακά (ρύζι, καλαμπόκι)

10	2012	Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops	Dimitrios I. Tsitsigiannis, Myrto Dimakopoulou, Polymnia P. Antoniou, Eleftherios C. Tjamos	Ανασκόπηση	Biological control agents	Μύκητες (Fusarium, Aspergillus)	Καλλιέργειες (Μεσογειακά δημητριακά)
11	2013	Fusarium langsethiae – a HT-2 and T-2 Toxins Producer that Needs More Attention	Imathiu et al.	Ανασκόπηση	PCR, LC-MS/MS, ELISA	Μύκητες (F. langsethiae, HT-2/T-2)	Καλλιέργειες + Μετά συγκομιδής δημητριακά
12	2015	Detection and identification of selected cereal rust pathogens by TaqMan® real-time PCR	Liu et al.	Πρωτότυπη έρευνα	Real-time PCR (TaqMan)	Μύκητες (Puccinia spp.)	Καλλιέργειες (φύλλα σίτου)
13	2016	From Field to Table: A Review on the Microbiological Quality and Safety of Wheat-Based Products	Liliana Sabillón, Anton Bianchini	Ανασκόπηση	Plate counts, ELISA, PCR	Βακτήρια, Μύκητες, Ιοί	Ολόκληρη αλυσίδα δημητριακών
14	2016	Cereal Industry: e-Nose for Real Time and Online Quality and Safety Control and Management	Federica Cheli, Luciano Pinotti, Matteo Ottoboni, Marco Tretola, Vittorio Dell'Orto	Ανασκόπηση + Εφαρμογές	e-Nose for VOC	Μύκητες (VOC producers)	Αποθηκευμένα δημητριακά

15	2017	A survey of the cereal contamination with deoxynivalenol in Romania, for 2011–2013 period	Unknown (Romania)	Έρευνα + GIS	ELISA + GIS	Μύκητες (DON producers)	Δημητριακά (μετά τη συγκομιδή)
16	2018	Biochemical Quality Indicators and Enzymatic Activity of Wheat Flour from the Aspect of Climatic Conditions	Jelena Tomić, Aleksandra Torbica, Miona Belović, Ljiljana Popović, Nada Knežević	Πρωτότυπη έρευνα	Biochemical markers	Κανένα (Βιοχημικοί δείκτες)	Αλεύρι
17	2019	Quality and Safety Traceable Information Mining in Wheat Flour Processing Based on Risk Matrix and Flow Analysis Method	Qian Jianping, Song Yingzhuo, Wang Shanshan, Wu Xiaoming, Luo Jiyang	Ανάλυση ροής + Risk matrix	Risk matrix + Flow analysis	Δυνητικοί παθογόνοι (Μύκητες, χημικά)	Επεξεργασμένα δημητριακά
18	2020	Change of Amino Acid Residues in Idiotype Nanobodies Enhanced the Sensitivity of Competitive Enzyme Immunoassay for Mycotoxin Ochratoxin A in Cereals	Caixia Zhang, Weiqi Zhang, Xiaoqian Tang, Qi Zhang, Wen Zhang, Peiwu Li	Πρωτότυπη έρευνα	Competitive ELISA (Nanobody)	Μύκητες (Ochratoxin A)	Δημητριακά (καλαμπόκι, ρύζι)

19	2022	Analysis of total aflatoxins in commercially available cereal products in the Republic of North Macedonia	Elena Dimovska, Zoran Zhivikj, Elizabeta Gavazova, Tanja Petreska Ivanovska, Lidija Petrushevska-Tozi	Έρευνα	ELISA	Μύκητες (Aflatoxin producers)	Επεξεργασμένα δημητριακά
20	2023	Development of a Multiplex RT-PCR Assay for Simultaneous Detection of Ten Major Viral Pathogens of Wheat	Mahua Deb, Joseph M. Anderson, Steven R. Scofield	Πρωτότυπη έρευνα	Multiplex RT-PCR	Ιοί (WSMV, TriMV, HPV)	Καλλιέργειες (φύλλα σίτου)
21	2024	Cereal production in Africa: the threat of current plant pathogens in changing climate—a review	Joshua Benjamin, David Olayinka Oyedokun, Emmanuel Victor Oziegbe, Joshua Oni, Emmanuel Boluwatife Ogundare, Godswill Ofuowoichoyama Ujah, Aminat Adebayo	Ανασκόπηση	Epidemiology + Models	Μύκητες, Ιοί, Βακτήρια	Καλλιέργειες (Αφρικανικά δημητριακά)
22	2024	Investigation of 2,4-Dihydroxylaryl-Substituted Heterocycles as Inhibitors of the Growth and Development of Biotrophic Fungal Pathogens Associated with the Most Common Cereal Diseases	Klaudia Rząd, Aleksandra Nucia, Weronika Grzelak, Joanna Matysiak, Krzysztof Kowalczyk, Sylwia Okon, Arkadiusz Matwijczuk	Πρωτότυπη έρευνα	In vitro bioassays	Μύκητες (Βιοτροφικοί παθογόνοι)	Καλλιέργειες (σιτάρι, κριθάρι)

3.3 Σύνοψη Στατιστικών Δεδομένων

Παρακάτω ακολουθεί μια σύνοψη-στατιστική των μεθόδων ανίχνευσης καθώς και των παθογόνων που εμφανίζονται στις μελέτες. Στη συνέχεια, παρατίθενται οι αντιστοιχίσεις “μέθοδος-παθογόνο” και οι κατατάξεις των μεθόδων βάσει ευαισθησίας, χρόνου, κόστους και περιβαλλοντικού αποτυπώματος, όπως συνάγονται συγκριτικά από τα στοιχεία των μελετών.

3.3.1. Ποιες μέθοδοι ανίχνευσης εμφανίζονται και πόσες φορές στις 22 μελέτες

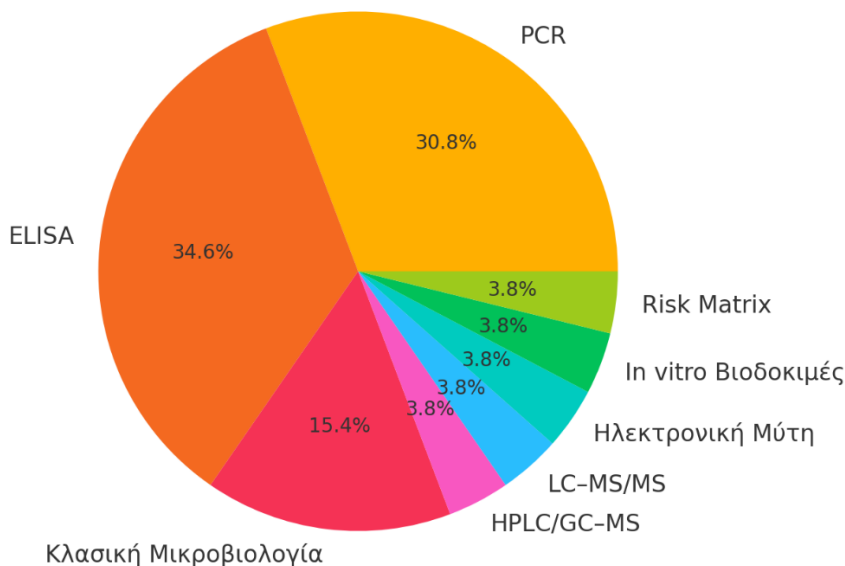
Από τη συγκεντρωτική λίστα:

- PCR ή κάποια παραλλαγή (PCR, RT-PCR, Real-time PCR, Multiplex PCR κ.λπ.): Εμφανίζεται σε 8 μελέτες (#1, #2, #5, #7, #11, #12, #13, #20).
- ELISA (συμπ. ανταγωνιστική ELISA, έμμεση ELISA, Ridascreen κ.λπ.): Εμφανίζεται σε 9 μελέτες (#1, #6, #8, #9, #11, #13, #15, #18, #19).
- Κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές (plate counts, MPN, καλλιέργειες σε υλικό κ.λπ.): Εμφανίζονται σε 4 μελέτες (#3, #4, #8, #13) – στις δύο πρώτες (#3, #4) πιο καθαρά ως *in vitro* antagonism/microbiological counts, στην #8 συνδυασμός με ELISA, και στην #13 (ως «plate counts»).
- HPLC ή GC-MS / LC-MS/MS:
 - ✓ HPLC / GC-MS εμφανίζεται ρητά σε #6 (1 φορά).
 - ✓ LC-MS/MS εμφανίζεται ρητά σε #11 (1 φορά).
- E-nose (ηλεκτρονική μύτη): Εμφανίζεται 1 φορά (#14).
- *In vitro* βιοδοκιμές (με οπτική εκτίμηση ανάπτυξης μυκήτων, χωρίς ειδικές μοριακές/φασματομετρικές τεχνικές):
 - ✓ Σαφώς σε #22.
 - ✓ Εν μέρει σε #3 (*in vitro* ανταγωνισμός *Bacillus*-μύκητες), ωστόσο εκεί κυρίως κλασική μικροβιολογία.
- Risk matrix / Flow analysis (ως εργαλείο εντοπισμού κινδύνων): Εμφανίζεται 1 φορά (#17).
- Southern blot / RFLP / RAPD (συνοδευτικά σε PCR):
 - ✓ RFLP: #2, #7 (2 φορές)
 - ✓ Southern blot: #2 (1 φορά)
- Καμία σαφής μέθοδος (ή απλά δεν αναφέρεται):
 - ✓ #10 (βιολογικός έλεγχος μυκοτοξινογόνων, χωρίς ανίχνευση),
 - ✓ #16 (μελέτη βιοχημικών δεικτών αλεύρου, δεν ανιχνεύεται παθογόνο),
 - ✓ #17 (risk matrix μόνο, όχι πραγματική ανάλυση δειγμάτων),
 - ✓ #21 (ανασκόπηση κλιματικών επιπτώσεων, δεν δίνει συγκεκριμένο διαγνωστικό πρωτόκολλο).

Συμπέρασμα:

Καμία μέθοδος δεν χρησιμοποιείται σε όλες τις 22 μελέτες, αφού ούτε PCR ούτε ELISA εμφανίζονται στο 100% των άρθρων.

Συχνότητα Μεθόδων Ανίχνευσης στις Μελέτες



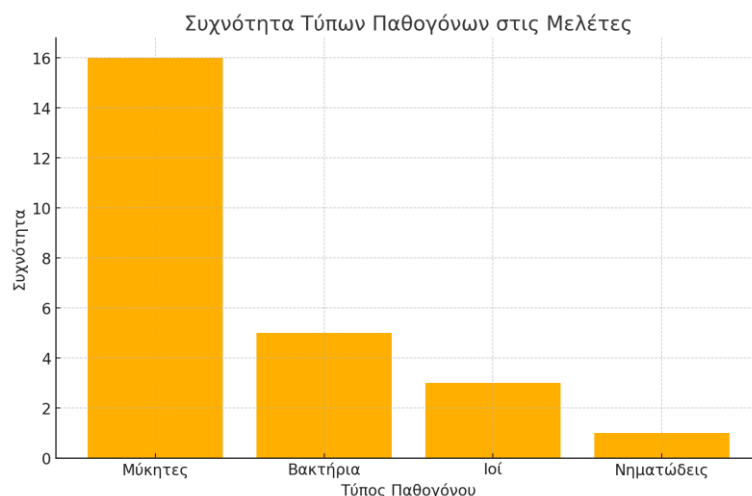
Σχήμα 1

3.3.2. Ποιοι τύποι παθογόνων εμφανίζονται και πόσες φορές συνολικά

Εντοπίζονται τέσσερις βασικές κατηγορίες: **μύκητες, βακτήρια, ιοί, νηματώδεις.**

- **Μύκητες (Fungi)**
Εμφανίζονται σε **16** μελέτες (π.χ. *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Puccinia* spp., *Blumeria graminis* κ.ά.).
(Συγκεκριμένα σε #2, #3, #4, #6, #8, #9, #10, #11, #12, #13, #14, #15, #18, #19, #21, #22).
- **Βακτήρια (Bacteria)**
Αναφέρονται σε **5** μελέτες (#3, #4, #5, #13, #21) [π.χ. *Salmonella*, *Listeria*, *Xanthomonas*, coliforms, *Bacillus* (και ως ωφέλιμος/ανταγωνιστικός)].
- **Ιοί (Viruses)**
Εμφανίζονται σε **3** μελέτες (#7, #20, #21), κυρίως (BYDV, WSMV, Maize streak κ.λπ.).
- **Νηματώδεις (Nematodes)**
Μόνο σε **1** μελέτη (#21), όπου συζητούνται *Pratylenchus*, *Meloidogyne* κ.λπ.

Παρατήρηση: Κάποιες μελέτες είτε δεν αφορούν παθογόνους (#1, #16), είτε δεν αναφέρουν συγκεκριμένους (#17, #10 απλώς μιλά για βιολογικό έλεγχο μυκήτων).



Σχήμα 2

3.3.3. Αντιστοίχιση Μεθόδων Ανίχνευσης – Τύπων Παθογόνων

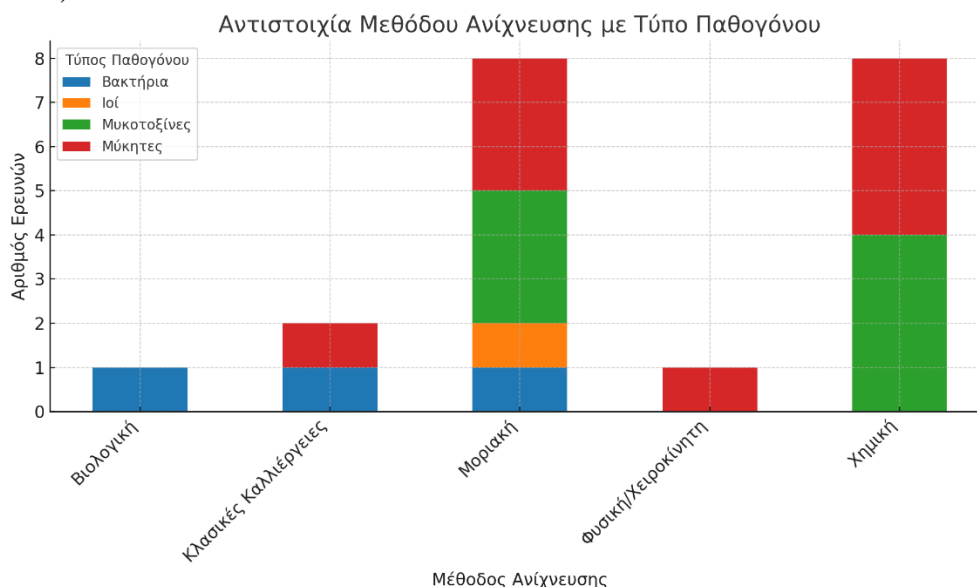
Παρακάτω τα συνηθέστερα ζεύγη «(Μέθοδος)-(Παθογόνος Οργανισμός)», όπως εμφανίζονται στις μελέτες. Εάν κάποιο ζεύγος εμφανίζεται παραπάνω από μία φορά, αναφέρεται το πλήθος:

1. PCR – Μύκητες
 - ✓ #2 (Fusarium), #11 (Fusarium langsethiae), #12 (Puccinia, σκωρία), #13 (γενική αναφορά σε fungi).
 - ✓ 4 εμφανίσεις.
2. PCR – Βακτήρια
 - ✓ #5 (Salmonella, Listeria κ.λπ.)
 - ✓ Ενδεχομένως και στη #13 (γενική ανασκόπηση σε foodborne), όχι όμως λεπτομερής.
 - ✓ Συνολικά 1-2 εμφανίσεις (σίγουρα #5).
3. PCR – Ιοί
 - ✓ #7 (RT-PCR για BYDV), #20 (Multiplex RT-PCR για 10 wheat viruses).
 - ✓ 2 εμφανίσεις.
4. ELISA – Μύκητες (ιδίως για μυκοτοξίνες)
 - ✓ #6 (μυκοτοξίνες), #8 (AFB1, ZEA κ.λπ.), #9 (OTA), #11 (HT2/T2), #13 (μυκοτοξίνες γενικά), #15 (DON), #18 (OTA), #19 (aflatoxins).
 - ✓ Εμφανίζεται 8 φορές ως «ELISA + μύκητες (μυκοτοξίνες)».
5. ELISA – Βακτήρια
 - ✓ Σχεδόν καμία σαφής εφαρμογή στις συγκεκριμένες (δεν αναφέρεται ρητώς «ELISA για βακτήρια»).
6. ELISA – Ιοί
 - ✓ Επίσης δεν αναφέρεται σε αυτές τις έρευνες.
7. Κλασικές Μικροβιολογικές – Μύκητες
 - ✓ #8 (μούχλες). Εν μέρει #13 (plate counts) που μπορεί να περιλαμβάνουν ζύμες/μούχλες.
 - ✓ Εμφανίσεις: ~2.

8. Κλασικές Μικροβιολογικές – Βακτήρια
 - ✓ #3 (διάφορα βακτήρια και μύκητες), #4 (Salmonella κ.λπ.), #13 (plate counts).
 - ✓ Εμφανίσεις: ~3.
9. Real-time PCR – Μύκητες
 - ✓ #12 (Puccinia rust).
 - ✓ (1 φορά)
10. Real-time PCR – Βακτήρια**
 - ✓ #5 αναφέρει «PCR/real-time PCR για foodborne παθογόνα» (1 φορά).
11. E-nose – Μύκητες
 - ✓ #14 (VOC από Aspergillus, Fusarium κ.λπ.) (1 φορά)
12. In vitro Bioassays – Μύκητες
 - ✓ #22 (Blumeria, Puccinia) (1 φορά)
13. LC-MS / HPLC / GC-MS – Μύκητες (μυκοτοξίνες)
 - ✓ #6 (HPLC, GC-MS), #11 (LC-MS/MS). Κάθε μία εμφανίζεται 1 φορά.

Επαναλήψεις:

- «ELISA + μύκητες» 8 φορές είναι το πιο συχνό pairing.
- «PCR + μύκητες» 4 φορές.
- «PCR + ιοί» 2 φορές.
- «PCR + βακτήρια» 1–2 φορές.
- «Real-time PCR + μύκητες ή βακτήρια» εμφανίζεται λιγότερο (1–2).
- «E-nose + μύκητες» 1 φορά.
- «LC-MS + μύκητες» 2 φορές (#6, #11 αλλά σε διαφορετική εκδοχή HPLC vs. LC-MS).

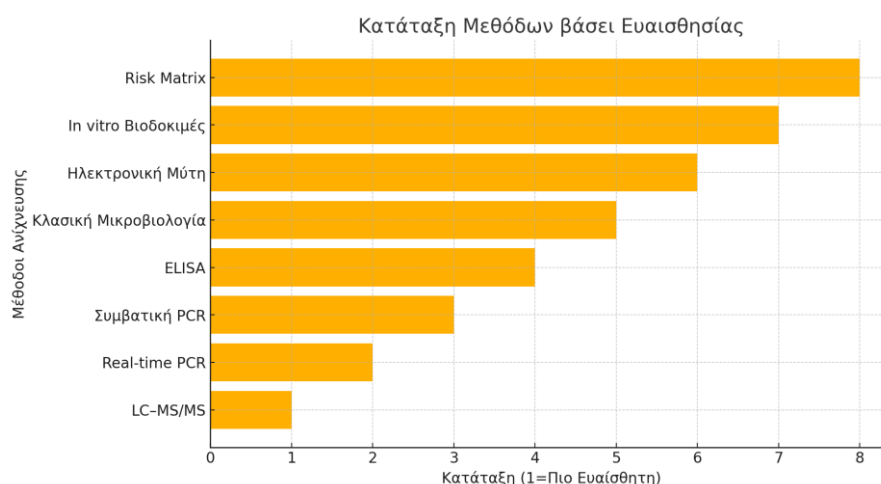


Σχήμα 3

3.3.4. Κατάταξη Μεθόδων βάσει ευαισθησίας & αποτελεσματικότητας (από πιο ευαίσθητη → λιγότερο)

Με βάση τη συνολική εικόνα των άρθρων, αλλά και γενικά στη βιβλιογραφία:

1. LC-MS/MS (και γενικά φασματομετρία μάζας)
 - ✓ Θεωρείται η πιο ευαίσθητη & εξειδικευμένη (εντοπίζει πολύ χαμηλά όρια ppb/ppm για μυκοτοξίνες).
2. Real-time PCR / Multiplex RT-PCR
 - ✓ Πολύ υψηλή ευαισθησία, ειδικά για ιούς/βακτήρια/μύκητες. Μικρά όρια ανίχνευσης DNA/RNA.
3. Συμβατική PCR
 - ✓ Εξακολουθεί να είναι αρκετά ευαίσθητη, αλλά λίγο πίσω από real-time PCR.
4. ELISA
 - ✓ Καλή ευαισθησία (sub-ppb-ppb σε μυκοτοξίνες), όμως συνήθως χαμηλότερη από LC-MS/MS ή PCR.
5. Κλασικές Μικροβιολογικές (plate counts, MPN κ.λπ.)
 - ✓ Επαρκείς αλλά μειωμένη ευαισθησία συγκριτικά με μοριακές/φασματομετρικές. Ενίοτε δεν ανιχνεύουν χαμηλές προσβολές.
6. Ηλεκτρονική μύτη (e-nose)
 - ✓ Ανιχνεύει πτητικές ενώσεις· χρήσιμη σαν «screening» και real-time, όχι τόσο ευαίσθητη σε μικροποσότητες μυκοτοξινών.
7. In vitro βιοδοκιμές
 - ✓ Φαίνεται λιγότερο ακριβής ως προς την ποσοτική ευαισθησία (βασίζεται σε οπτική εκτίμηση ανάπτυξης/αναστολής).
8. Risk matrix / Flow analysis
 - ✓ Δεν είναι ακριβής μέθοδος ανίχνευσης, αλλά διαχειριστικό εργαλείο· δεν δίνει καθαρό LOD (Limit of Detection – Όριο Ανίχνευσης).



Σχήμα 4

3.3.5. Κατάταξη Μεθόδων βάσει χρόνου ανάλυσης (από πιο σύντομη → πιο χρονοβόρα)

- (1) Ηλεκτρονική μύτη (e-nose):
✓ Πολύ γρήγορη σε real-time εφαρμογές (απαιτεί βέβαια ρύθμιση / calibration).
- (2) ELISA (rapid kits):
✓ Τα ανταγωνιστικά ή έμμεσα ELISA έχουν συνήθως χρόνο 1–3 ώρες.
- (3) Real-time PCR / Multiplex RT-PCR:
✓ Χρειάζεται εκχύλιση & RT-PCR (~3–5 ώρες), αλλά παραμένει σχετικά «γρήγορη» για μοριακή.
- (4) Συμβατική PCR:
✓ Παρόμοιος ή ελαφρώς μεγαλύτερος χρόνος (προετοιμασία, τζελ ηλεκτροφόρηση κ.λπ.).
- (5) In vitro bioassays
✓ Συνήθως χρειάζονται αρκετές ώρες ως μέρες (ανάπτυξη μυκήτων, οπτική εκτίμηση).
- (6) Κλασικές μικροβιολογικές (plate counts, MPN)
✓ Χρονική διάρκεια 24–72 ώρες (επώαση).
- (7) LC–MS/MS ή HPLC / GC–MS
✓ Η ανάλυση δείγματος μπορεί να είναι γρήγορη στο όργανο, αλλά η προετοιμασία/καθαρισμός δείγματος είναι συνήθως αρκετά απαιτητική. Πρακτικά, όμως, σε λειτουργία ρουτίνας μπορεί να πάρει μία μέρα ή και περισσότερο.
- (8) Risk matrix / Flow analysis
✓ Δεν είναι στενά «εργαστηριακή» μέθοδος· η εφαρμογή της σε πραγματικά δεδομένα μπορεί να χρειαστεί αρκετό χρόνο συλλογής/επεξεργασίας. Θεωρείται μακροχρόνια στη σύλληψη, αλλά δεν είναι «εργαστηριακή» ανάλυση.



Σχήμα 5

3.3.6. Κατάταξη Μεθόδων βάσει κόστους (από την πιο φθηνή → ακριβότερη)

- (1) Κλασικές μικροβιολογικές
 - ✓ Συνήθως απαιτούν βασικό εξοπλισμό (θρεπτικά υλικά, τρυβλία). Το κόστος/δείγμα θεωρείται χαμηλό.
- (2) In vitro bioassays
 - ✓ Ουσιαστικά παρόμοιας κλίμακας κόστους με τις μικροβιολογικές.
- (3) ELISA
 - ✓ Απαιτείται κιτ & πλακέτες, αλλά σε ρουτίνα προσφέρει μέτριο κόστος/ανάλυση.
- (4) PCR (συμβατική)
 - ✓ Απαιτεί thermal cycler, αντιδραστήρια· το κόστος/δείγμα είναι μέτριο-υψηλότερο από ELISA.
- (5) Real-time PCR / Multiplex RT-PCR
 - ✓ Κόστος αυξάνεται λόγω εξειδικευμένου οργάνου & χρωστικών.
- (6) Ηλεκτρονική μύτη (e-nose)
 - ✓ Απαιτεί υψηλό αρχικό κόστος εγκατάστασης αισθητήρων· ωστόσο, ανά δείγμα μπορεί να είναι φθηνότερο. Συνολικά το κατατάσσουμε σε υψηλότερη βαθμίδα κόστους (ιδίως αρχικής επένδυσης).
- (7) LC-MS/MS / HPLC / GC-MS
 - ✓ Ακριβά όργανα, εξειδικευμένα αναλώσιμα/διαλύτες· συνήθως θεωρούνται ακριβότερες τεχνικές ανάλυσης δείγματος.
- (8) Risk matrix
 - ✓ Στην πράξη δεν είναι «εργαστηριακή ανάλυση», άρα το κόστος εξαρτάται από τη συλλογή-επεξεργασία δεδομένων. Θα μπορούσε να τοποθετηθεί πολύ χαμηλά (αν θεωρήσουμε ότι δεν χρειάζονται ακριβά αντιδραστήρια/εξοπλισμός) ή αρκετά ψηλά σε ευρεία κλίμακα.
 - ✓ Επειδή δεν είναι καθαρά «ανάλυση παθογόνων», μπορούμε να το βάλουμε ξεχωριστά.

(Λόγω ιδιομορφίας του “risk matrix”, αρκετοί θα το θεωρούσαν «πολύ φθηνό» σε σχέση με μοριακά όργανα. Οπότε μπαίνει στην αρχή του πίνακα ως “σχεδόν μηδενικό κόστος οργάνου”).



Σχήμα 6

3.3.7. Κατάταξη Μεθόδων βάσει περιβαλλοντικού αποτυπώματος (από πιο «πράσινη» → λιγότερο)

Κριτήρια είναι η χρήση τοξικών/οργανικών διαλυτών, η παραγωγή αποβλήτων, και η κατανάλωση ενέργειας.

1. Risk matrix / Flow analysis
 - ✓ Ουσιαστικά δεν παράγει εργαστηριακά απόβλητα.
2. E-nose
 - ✓ Αρκετά «πράσινη» (καθημερινή λειτουργία κυρίως ηλεκτρική κατανάλωση, ελάχιστα χημικά).
3. In vitro bioassays
 - ✓ Χαμηλή χρήση επικίνδυνων χημικών, κυρίως θρεπτικά υλικά.
4. Κλασικές μικροβιολογικές
 - ✓ Καταναλώνουν θρεπτικά υλικά & πλαστικά αναλώσιμα, όμως όχι πολλούς επικίνδυνους διαλύτες.
5. PCR (συμβατική / real-time)**
 - ✓ Μέτριο αποτύπωμα, χρειάζονται πλαστικά αναλώσιμα (tubes, tips), buffer, dNTP, χημικά.
6. ELISA
 - ✓ Οι ανοσοβιολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούν πλαστικές μικροπλάκες, ρυθμιστικά, ενίοτε reagents που καταλήγουν σε απόβλητα.
7. HPLC / LC-MS/MS / GC-MS
 - ✓ Απαιτούν οργανικούς διαλύτες (MeOH, ACN, κ.λπ.), αρκετά ενεργοβόρο εξοπλισμό· δημιουργείται χημικό υπόλειμμα/απόβλητα.

(Εντός αυτής της κατηγορίας, LC-MS συχνά χρειάζεται λιγότερους διαλύτες από κλασική HPLC, αλλά παραμένει ενεργοβόρο, οπότε τα τοποθετούμε ψηλά σε κατανάλωση πόρων.)



Σχήμα 7

3.3.8. Σύνοψη

- Καμία μέθοδος** δεν εμφανίζεται σε όλες τις 22 μελέτες.
✓ Η πιο συχνή είναι **ELISA** (9 φορές) και ακολουθεί **PCR** (8 φορές).
- Τύποι παθογόνων & συχνότητα:**
✓ **Μύκητες:** 16 εμφανίσεις
✓ **Βακτήρια:** 5 εμφανίσεις
✓ **Ιοί:** 3 εμφανίσεις
✓ **Νηματώδεις:** 1 εμφάνιση
- Αντιστοίχιση Μεθόδων – Παθογόνων (συνοπτικά):**
✓ **ELISA + μύκητες** (ιδίως μυκοτοξίνες): 8 φορές (το πιο συχνό pairing)
✓ **PCR + μύκητες:** 4 φορές
✓ **PCR + ιοί:** 2 φορές
✓ **PCR + βακτήρια:** ~1–2 φορές
✓ **Κλασική μικροβιολογία + μύκητες:** ~2 φορές
✓ **Κλασική μικροβιολογία + βακτήρια:** ~3 φορές
✓ **E-nose + μύκητες:** 1 φορά
✓ **In vitro bioassays + μύκητες:** 1–2 φορές
✓ **LC–MS/MS + μύκητες:** 1 φορά (#11), **HPLC/GC–MS + μύκητες:** 1 φορά (#6)
- Κατάταξη βάσει ευαισθησίας (ευαίσθητη → λιγότερο)**
 - LC–MS/MS**
 - Real-time PCR / multiplex RT-PCR**
 - Συμβατική PCR**
 - ELISA**
 - Κλασικές μικροβιολογικές**
 - E-nose**
 - In vitro bioassays**
 - Risk matrix** (δεν είναι καν ανάλυση δειγμάτων)

5. **Κατάταξη βάσει διάρκειας/ταχύτητας** (πιο σύντομη → πιο χρονοβόρα)

1. **E-nose** (άμεση)
1. **ELISA** (1–3 ώρες)
1. **Real-time / Multiplex PCR** (3–5 ώρες)
1. **Συμβατική PCR** (συν τζελ, ~5–6 ώρες)
1. **In vitro βιοδοκιμές** (μέρες/οπτική ανάπτυξη)
1. **Κλασικές μικροβιολογικές** (24–72 ώρες επώαση)
1. **LC–MS/MS / HPLC/GC–MS** (χρόνος δειγματοληψίας & χημ. προετοιμασίας: 1 μέρα ή >)
1. **Risk matrix** (δεν είναι «ανάλυση δειγμάτων», απαιτεί ωστόσο πολύ χρόνο αξιολόγησης σε πραγματικές συνθήκες)

6. **Κατάταξη βάσει κόστους** (πιο οικονομική → ακριβότερη)

1. **Risk matrix** (ουσιαστικά «λογισμικό/θεωρητική» μέθοδος – χαμηλό κόστος εργαστηριακών υλικών)
1. **Κλασικές μικροβιολογικές** (φτηνά υλικά, χρειάζεται μόνο θρεπτικά υλικά)
1. **In vitro bioassays** (συγκρίσιμο / χαμηλό κόστος)
1. **ELISA** (μέτριο κόστος λόγω κιτ)
1. **PCR** (συμβατική) (ελαφρώς ακριβότερο από ELISA)
1. **Real-time PCR / Multiplex** (εξειδικευμένο όργανο & αναλώσιμα)
1. **E-nose** (απαιτεί υψηλό αρχικό κόστος συσκευής, παρότι ανά δείγμα ίσως φτηνότερο)
1. **LC–MS/MS / HPLC/GC–MS** (από τις πιο ακριβές λόγω οργάνου, αναλωσίμων, εξειδικευμένου προσωπικού)

7. **Κατάταξη βάσει περιβαλλοντικού αποτυπώματος** (πιο “πράσινη” → λιγότερο)

1. **Risk matrix** (μη εργαστηριακή, σχεδόν μηδενικά χημικά απόβλητα)
1. **E-nose** (κυρίως ηλεκτρική κατανάλωση, ελάχιστα αντιδραστήρια)
1. **In vitro bioassays** (χαμηλά απόβλητα, βασικά θρεπτικά υλικά)
1. **Κλασικές μικροβιολογικές** (πλαστικά αναλώσιμα, θρεπτικά υλικά, κ.λπ.)
1. **PCR** (σωληνάρια, χημικά, ρεύμα για thermal cycler)
1. **ELISA** (πλακέτες, διαλύματα, απορρίμματα)
1. **HPLC / LC–MS/MS / GC–MS** (χρήση οργανικών διαλυτών, υψηλή κατανάλωση ενέργειας, απόβλητα)

3.3.9. **Τελικό Συμπέρασμα**

- (1) Καμία μέθοδος δεν είναι «πανταχού παρούσα» σε όλες τις μελέτες. Η ELISA εμφανίζεται 9 φορές και η PCR 8 φορές, όντας οι συχνότερες.
- (2) Οι μύκητες πρωταγωνιστούν (16 φορές), ακολουθούν βακτήρια (5), ιοί (3), νηματώδεις (1).

- **(3)** Στις αντιστοιχίσεις, το πιο κοινό ζεύγος είναι «ELISA + μύκητες (μυκοτοξίνες)» (8 εμφανίσεις).
- **(4–7)** Η κατάταξη σε κριτήρια ευαισθησίας, χρόνου, κόστους και οικολογικού αποτυπώματος είναι **ενδεικτική** και βασισμένη σε γενική εμπειρία/αναφορές της βιβλιογραφίας.

ΜΕΡΟΣ IV

4. Συμπεράσματα, Περιορισμοί και Μελλοντικές Προοπτικές

4.1. Η Παγκόσμια Διάσταση των Παθογόνων και των Μυκοτοξινών

Η ανασκόπηση και οι επιμέρους μελέτες που καλύπτουν τις σχεδόν τις ηπείρους —από την Ευρώπη, την Ασία και την Αφρική, έως τη Βόρεια Αμερική και την Ωκεανία— επιβεβαιώνουν ότι η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών και μυκοτοξινών στα σιτηρά αποτελεί φαινόμενο παγκόσμιας εμβέλειας, ανεξάρτητα από διαφορετικά γεωγραφικά πλάτη, κλιματικές συνθήκες και τεχνολογικό επίπεδο. Καθώς τα δημητριακά διατηρούν κομβική θέση στη διατροφική αλυσίδα ανθρώπων και ζώων, τυχόν επιμολύνσεις (π.χ. από *Salmonella*, *E. Coli*, *Bacillus cereus*) ή μυκοτοξίνες (αφλατοξίνες, DON, ωχρατοξίνη Α) θέτουν σε κίνδυνο τόσο τη δημόσια υγεία όσο και τη φήμη των βιομηχανιών τροφίμων. Τόσο στον ανεπτυγμένο κόσμο όσο και σε αναπτυσσόμενες οικονομίες, οι απώλειες από ασθένειες φυτών (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Puccinia*, κ.ά.) μπορεί να κυμανθούν από 10% έως και 80–100% σε ακραίες περιπτώσεις, καταδεικνύοντας την ανάγκη διεθνούς συντονισμού για αποτελεσματικές πρακτικές πρόληψης και ελέγχου.

4.2. Η Εξέλιξη των Μεθόδων Ανίχνευσης και η Αξία των Νέων Τεχνολογιών

Οι κλασικές μικροβιολογικές προσεγγίσεις (plate counts, MPN) θεωρούνται ακόμη χρήσιμες για βασικό έλεγχο, ωστόσο η ανάπτυξη της PCR, της Real-time PCR και η συστηματική χρήση ELISA για τις μυκοτοξίνες έχουν αναβαθμίσει θεαματικά την αξιοπιστία και την ταχύτητα των διαγνωστικών πρωτοκόλλων. Μελέτες που ενσωματώνουν πολυπλεγμένη (multiplex) RT-PCR δείχνουν ότι η ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών ιών ή άλλων παθογόνων σε ένα μόνο τεστ εξοικονομεί χρόνο και πόρους, ενώ η LC–MS/MS αναδεικνύεται ως σημείο αναφοράς για την εξαιρετικά ευαίσθητη και εξειδικευμένη μέτρηση μυκοτοξινών. Οι καινοτομίες όπως η ηλεκτρονική «μύτη» (e-nose), που καταγράφει πτητικές ουσίες σε πραγματικό χρόνο, ή τα νανοσώματα στην ELISA, υποδηλώνουν ότι, εφόσον υπάρξει η αντίστοιχη υποδομή και το επαρκές προσωπικό, οι βιομηχανίες μπορούν να εντοπίζουν ταχύτερα και με μεγαλύτερη ακρίβεια πιθανές επιμολύνσεις. Εντούτοις, το υψηλό κόστος του εξοπλισμού και η ανάγκη εξειδικευμένης εκπαίδευσης συχνά αποτρέπουν τις μικρότερες επιχειρήσεις από την ενσωμάτωση αυτών των προχωρημένων τεχνικών.

4.3. Ο Ρόλος της Κλιματικής Αλλαγής στην Εμφάνιση Παθογόνων

Από τις πιο πρόσφατες δημοσιεύσεις και τα πορίσματα κλιματικών μοντέλων, φαίνεται ότι οι ακραίες θερμοκρασίες, η αυξημένη υγρασία και οι απρόβλεπτες βροχοπτώσεις ευνοούν τη μετατόπιση ή έξαρση ορισμένων παθογόνων. Τα είδη *Fusarium*, *Aspergillus flavus* και άλλα μυκοτοξινογόνα, υπό συνθήκες αστάθειας κλίματος, εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα επιμόλυνσης των σιτηρών, με πιθανές υπερβάσεις των νομοθετημένων ορίων για τις τοξίνες τους. Παράλληλα, ιολογικές ασθένειες όπως η Maize streak virus ή η Rice yellow mottle virus, που μεταδίδονται κυρίως από έντομα-φορείς, παρουσιάζουν νέα δυναμική εξάπλωσης. Η επιστημονική κοινότητα επισημαίνει την ανάγκη ενίσχυσης των προγνωστικών συστημάτων και συστηματικής παρακολούθησης θερμοκρασίας/υγρασίας στις αποθήκες, ώστε να προλαμβάνονται ανεπιθύμητες αλλοιώσεις, επιβεβαιώνοντας ότι η διασφάλιση ποιότητας απαιτεί σήμερα και μετεωρολογικές γνώσεις.

4.4. Η Αναγκαιότητα του HACCP ως Προληπτικού Πυλώνα

Ένα από τα πιο κρίσιμα συμπεράσματα της εργασίας είναι η σημασία της πρακτικής εφαρμογής του HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points - Ανάλυση Κινδύνων και Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου) σε όλη την αλυσίδα εφοδιασμού των σιτηρών. Ο Codex Alimentarius (FAO/WHO) ⁴⁶ έχει καθιερώσει από καιρό τις κατευθυντήριες αρχές του HACCP, ενώ σε ευρωπαϊκό επίπεδο οι Κανονισμοί (ΕΕ) ⁴⁷ ορίζουν συγκεκριμένες απαιτήσεις υγιεινής και μικροβιολογικών κριτηρίων. Αυτά τα πλαίσια καλούν τις επιχειρήσεις να αναγνωρίζουν έγκαιρα τους κινδύνους (βιολογικούς, χημικούς, φυσικούς), να καθορίζουν κρίσιμα σημεία ελέγχου (π.χ. δειγματοληψίες σε στάδια αποθήκευσης ή αλεύρωσης), να θέτουν προκαθορισμένα όρια (συγκεντρώσεις μυκοτοξινών ή μικροβιακό φορτίο) και να τηρούν αξιόπιστα αρχεία παρακολούθησης. Όπως προκύπτει από πολλές μελέτες, η απλή ύπαρξη εξοπλισμού PCR ή ELISA δεν επαρκεί εάν δεν εντάσσεται σε ένα ολοκληρωμένο προληπτικό σχέδιο, το οποίο θα συνδυάζει επανελέγχους, επιβεβαιώσεις με επιπρόσθετες μεθόδους (π.χ. LC-MS/MS), αυστηρό καθαρισμό εξοπλισμού και εκπαίδευση του προσωπικού.

⁴⁶ FAO/WHO (Food and Agriculture Organization / World Health Organization). General Guidelines on Sampling (CAC/GL 50-2004). <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>. Περιγράφει τρόπους αντιπροσωπευτικής δειγματοληψίας για τον έλεγχο ρύπων, συμπεριλαμβανομένων και των μυκοτοξινών. FAO Mycotoxin Prevention and Control in Foodgrains <https://www.fao.org/4/x5036e/x5036e00.htm>. Παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την πρόληψη και τον έλεγχο των μυκοτοξινών σε διάφορους τύπους τροφίμων, με έμφαση στις συνθήκες αποθήκευσης.

⁴⁷ Ευρωπαϊκή Νομοθεσία – Κανονισμοί και Οδηγίες. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 για τον καθορισμό των ανώτατων επιτρεπόμενων ορίων για ορισμένους ρυπαντές στα τρόφιμα (συμπεριλαμβανομένων των μυκοτοξινών) <https://eur-lex.europa.eu/search.html?text=1881%2F2006&lang=el&type=quick&qid=1736879460804&scope=EURLEX>. Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 401/2006 σχετικά με τις μεθόδους δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα. <https://eur-lex.europa.eu/search.html?text=401%2F2006&lang=el&type=quick&qid=1736879514758&scope=EURLEX>

Το HACCP λειτουργεί επομένως ως βασικός «οδηγός» που μεταφράζει την επιστημονική γνώση για τα παθογόνα και τις τοξίνες σε συγκεκριμένες καθημερινές διαδικασίες, θωρακίζοντας την αλυσίδα τροφίμων και διασφαλίζοντας τη συμμόρφωση με τις διατάξεις των αρμόδιων αρχών.

Τα βασικά βήματα του συστήματος HACCP συνοψίζονται στα εξής:

1. **Ανάλυση Κινδύνων (Hazard Analysis)**
Εντοπισμός των πιθανών κινδύνων (βιολογικών, χημικών, φυσικών) και αξιολόγηση της σοβαρότητας και της πιθανότητας εμφάνισής τους.
2. **Προσδιορισμός Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (CCPs)**
Καθορισμός των σημείων στη διαδικασία όπου ο έλεγχος είναι απαραίτητος για την πρόληψη ή τη μείωση του κινδύνου σε αποδεκτά επίπεδα.
3. **Καθορισμός Κρίσιμων Ορίων (Critical Limits)**
Ορισμός ποσοτικών ή ποιοτικών παραμέτρων (π.χ. θερμοκρασία, χρόνος, επίπεδα ρύπων) που δεν πρέπει να ξεπεραστούν στα CCPs.
4. **Σύστημα Παρακολούθησης (Monitoring)**
Καθιέρωση τακτικών μετρήσεων ή παρατηρήσεων στα CCPs, για να επιβεβαιώνεται ότι τηρούνται τα κρίσιμα όρια.
5. **Διορθωτικές Ενέργειες (Corrective Actions)**
Προσδιορισμός των ενεργειών που πρέπει να λαμβάνονται όταν διαπιστώνεται ότι τα κρίσιμα όρια έχουν ξεπεραστεί ή ενδέχεται να ξεπεραστούν.
6. **Επαλήθευση (Verification)**
Έλεγχος ότι το σύστημα HACCP λειτουργεί αποτελεσματικά (μέσω επιθεωρήσεων, πρόσθετων δειγματοληψιών, εργαστηριακών αναλύσεων κ.ά.).
7. **Τεκμηρίωση & Αρχαιοθέτηση (Documentation)**
Διατήρηση των καταγεγραμμένων στοιχείων και διαδικασιών, ώστε να διασφαλίζονται η ιχνηλασιμότητα και η συμμόρφωση με τις προδιαγραφές ασφάλειας τροφίμων.

Οι επτά αρχές του HACCP περιγράφονται αναλυτικά στο Annex του Codex Alimentarius Commission (2003)⁴⁸.

4.5. Περιορισμοί της Παρούσας Έρευνας

Παρά την εκτενή βιβλιογραφική κάλυψη και την παρουσίαση αποτελεσμάτων από διάφορες ηπείρους, διαπιστώνεται ότι η ανάλυση έδωσε έμφαση σε συγκεκριμένες εγκαταστάσεις, είδη σιτηρών και παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Δεν καλύφθηκαν όλοι οι τύποι σιτηρών (π.χ. ζέα, φαγόπυρο, κεχρί κ.α) και παθογόνων /αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (π.χ πρωτόζωα άλγη κ.α). Επίσης, πολλές από τις μελέτες αφορούσαν βραχυπρόθεσμες περιόδους δειγματοληψίας, χωρίς να προκύπτει μια μακροχρόνια συσχέτιση με τις κλιματικές μεταβολές. Το κόστος και η πολυπλοκότητα των πιο σύγχρονων τεχνικών (NGS, e-nose σε βιομηχανική κλίμακα) εμπόδισαν μια ολοκληρωμένη προσέγγιση όλων των υποπληθυσμών μικροβίων. Σε επίπεδο ποιοτικής πληροφορίας, οι

⁴⁸ Codex Alimentarius Commission. (2003). *Recommended International Code of Practice – General Principles of Food Hygiene (CAC/RCP 1-1969, Rev. 4) – Annex: HACCP System and Guidelines for its Application*. FAO/WHO

συνεντεύξεις με υπεύθυνους HACCP κάλυψαν λίγες μόνο περιπτώσεις εταιρειών, οπότε δεν είναι εφικτό να γενικευθεί η εικόνα για ολόκληρο τον κλάδο.

4.6. Μελλοντικές Προοπτικές και Πολυδιάστατες Εφαρμογές

Η κλιματική αστάθεια, σε συνδυασμό με την παγκοσμιοποίηση των αγορών, οδηγεί σε πιο περίπλοκες μορφές μόλυνσης και απαιτεί διαρκή εγρήγορση. Προτείνεται η πραγματοποίηση μακροχρόνιων (longitudinal) μελετών που θα χαρτογραφούν συστηματικά την εμφάνιση παθογόνων ή μυκοτοξινών ανά εποχή και γεωγραφική ζώνη, με συσχέτιση συνθηκών θερμοκρασίας και υγρασίας. Η ανάπτυξη βιολογικών ανταγωνιστών και ανθεκτικών ποικιλιών σιτηρών σε μυκητιακές προσβολές αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο. Η περαιτέρω καινοτομία σε επίπεδο ανίχνευσης —π.χ. η συνδυαστική αξιοποίηση e-nose, data-fusion και τεχνικών μηχανικής μάθησης— ίσως καταστήσει δυνατή την έγκαιρη πρόβλεψη εξάρσεων μόλυνσης μέσα σε σιλό ή διαμετακομιστικά κέντρα, πριν καν εντοπιστούν «ορατά» προβλήματα. Ταυτόχρονα είναι φανερό πως η διασφάλιση της ασφάλειας των δημητριακών δεν είναι ζήτημα μεμονωμένων εταιρειών. Απαιτείται συνεργασία μεταξύ παραγωγών, μεταποιητών, διακινητών, επιστημόνων τροφίμων, νομοθετών.

Παράλληλα, μια μελλοντική διάσταση είναι η ενίσχυση της οικονομικής ανάλυσης (cost-benefit) για την ενσωμάτωση αυτών των σύγχρονων μεθόδων. Τα πρωτόκολλα HACCP, παρότι εδραιωμένα σε πολλές χώρες, συχνά εφαρμόζονται επιφανειακά όταν οι επιχειρηματίες δεν αντιλαμβάνονται τα οικονομικά οφέλη της αποτελεσματικής πρόληψης. Η τεκμηρίωση του κόστους από πιθανές ανακλήσεις, κυρώσεις και δυσφήμιση μπορεί να ωθήσει ακόμη περισσότερο τους επαγγελματίες του κλάδου στην υιοθέτηση προηγμένων τεχνικών ελέγχου. Πολλές επιχειρήσεις διστάζουν να επενδύσουν σε μοριακές τεχνικές υψηλού κόστους, χρειάζεται όμως τεκμηρίωση του οφέλους, όσο αφορά την μείωση πιθανών ανακλήσεων, την βελτίωση της φήμης των επιχειρήσεων και την παροχή ευκαιριών για διείσδυση σε διεθνείς αγορές σε συνδυασμό με την ενημέρωση για το εκτιμώμενο κόστος που δύναται να προκύψει από πιθανές νομικές κυρώσεις και από απώλειες παρτίδων με υψηλές συγκεντρώσεις μυκοτοξινών.

4.7. Τελική Συμβολή της Μελέτης

Συνολικά, η παρούσα εργασία αποδεικνύει ότι η ασφάλεια των σιτηρών προκύπτει από μια σύνθεση επιστημονικής γνώσης, τεχνολογικών εργαλείων και θεσμικών πλαισίων. Η πολυμορφία των μεθόδων ανίχνευσης, η σημασία του HACCP και η διεθνής συνεργασία στην αλυσίδα εφοδιασμού διασφαλίζουν ότι οι κίνδυνοι από βακτήρια, μύκητες και ιούς παραμένουν σε ελεγχόμενα επίπεδα. Είναι λοιπόν εμφανές πως η διασφάλιση της ποιότητας των δημητριακών έχει θεσμοθετηθεί, γεγονός που καταδεικνύει την σπουδαιότητα του θέματος και την αναγκαιότητα περαιτέρω διερεύνησης του (Οι Ευρωπαϊκοί Κανονισμοί (Reg. (EC) 1831/2003, 2073/2005): Θέτουν ξεκάθαρα όρια για μυκοτοξίνες και μικροοργανισμούς. Η συμμόρφωση είναι υποχρεωτική και επηρεάζει τη διακίνηση/εμπορία δημητριακών ενώ εφαρμόζονται υποχρεωτικά HACCP και Συστήματα ISO 22000: Απαραίτητα για τη χαρτογράφηση κινδύνων, με βασικό συντελεστή την εκπαίδευση

προσωπικού. Η ουσιαστική εφαρμογή τους, ωστόσο, προϋποθέτει οικονομικούς πόρους, τεχνογνωσία και συνεχείς ελέγχους).

Απέναντι στις προκλήσεις της κλιματικής αλλαγής και της αβεβαιότητας που τη συνοδεύει, καθίσταται σαφές πως η συνεχής αναβάθμιση και ενοποίηση ποικίλων τεχνικών — μοριακών, ανοσολογικών, φασματομετρικών, αλλά και βιολογικών— είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ποιότητας και της υψηλής διατροφικής αξίας των δημητριακών. Το μεγαλύτερο κενό, άλλωστε στη διεθνή επιστημονική κοινότητα αφορά τον συσχετισμό κλιματικών μεταβολών (ακραίες θερμοκρασίες, ξηρασίες, υγρασίες) με την εμφάνιση επιμολύνσεων και μυκοτοξινών στα δημητριακά. Προτείνεται για αυτό τον λόγο η εκπόνηση:

- **Πολυετών μελετών (Longitudinal Studies)** σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας (ή άλλων χωρών), καταγράφοντας θερμοκρασία/υγρασία σιλό, συγκεντρώσεις μυκοτοξινών και συχνότητα βακτηριακών μολύνσεων.
- **Προγνωστικών Μοντέλων** που θα προβλέπουν κίνδυνο ανάπτυξης *Aspergillus* ή *Fusarium* βάσει των καιρικών δεδομένων.

Η ανθρωπότητα εξακολουθεί να βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στα προϊόντα αυτά, γι' αυτό και η βελτιωμένη κατανόηση, η προληπτική δράση και η υιοθέτηση καινοτομιών στην αλυσίδα τους αποτελούν μονόδρομο για μια βιώσιμη και ασφαλή διατροφική αλυσίδα.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

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

Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Κεφάλας, Π. (2009). Τρόφιμα από Σιτηρά. *Χημεία – Βιοχημεία – Τεχνολογία*. Εκδόσεις Γαρταγάνης. ISBN: 978-960-418-591-3. Θεσσαλονίκη. Ελλάδα. Ε.Ε.
2. Krugers Dagneaux, E.L., Mossel, D.A.A. The applicability of Emmerling's principle ("mould test") in food microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek* 25, 152–160 (1959). <https://doi.org/10.1007/BF02542841>
3. Katsumata, T., Suzuki, T., Aizawa, H., & Matashige, E. (2005). *Photoluminescence evaluation of cereals for a quality control application*. https://www.researchgate.net/publication/248514854_Photoluminescence_evaluation_of_cereals_for_a_quality_control_application
4. Liu, M., McCabe, E., Chapados, J. T., Carey, J., Wilson, S. K., Tropiano, R., ... Hambleton, S. (2015). Detection and identification of selected cereal rust pathogens by TaqMan[®] real-time PCR. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37(1), 92–105. <https://doi.org/10.1080/07060661.2014.999123>
5. Varzakas T. (2016). Quality and Safety Aspects of Cereals (Wheat) and Their Products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(15), 2495–2510. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.866070>
6. Oddy, J., Chhetry, M., Awal, R., Addy, J., Wilkinson, M., Smith, D., King, R., Hall, C., Testa, R., Murray, E., Raffan, S., Curtis, T. Y., Wingen, L., Griffiths, S., Berry, S., Elmore, J. S., Cryer, N., Moreira de Almeida, I., & Halford, N. G. (2023). Genetic control of grain amino acid composition in a UK soft wheat mapping population. *The plant genome*, 16(4), e20335. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20335>
7. Saini, D. K., & Kole, C. (Eds.). (2024). *Omics and system biology approaches for delivering better cereals*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781032693385>
8. Allmann, M., Candrian, U., Höfelein, C., & Lüthy, J. (1993). Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Detection of wheat contamination in non-wheat food products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 196(3), 248–251. <https://doi.org/10.1007/BF01202741>
9. Turner, A.S., Lees, A.K., Rezanoor, H.N. and Nicholson, P. (1998), Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology*, 47: 278–288. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00250.x>
10. Földes T., Bánhegyi I., Herpai Z., Varga L., Szigeti J. (2000). Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 840–846.

11. Berghofer, L. K., Hocking, A. D., Miskelly, D., & Jansson, E. (2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *International journal of food microbiology*, 85(1-2), 137–149. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00507-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00507-x)
12. Malorny B, Tassios PT, Rådström P, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 39–48.
13. Magan N., Aldred D. (2007). Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 131–139. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034
14. Kundu, J. K., Jarošová, J., Gadiou, S., & Červená, G. (2009). Discrimination of Three BYDV Species by One-step RT-PCR-RFLP and Sequence Based Methods in Cereal Plants from the Czech Republic. *Cereal Research Communications*, 37(4), 541–550. <http://www.jstor.org/stable/23789998>
15. Thomson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
16. Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
17. Tabuc, C., Marin, D., Guerre, P., Sesan, T., & Bailly, J. D. (2009). Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania. *Journal of food protection*, 72(3), 662–665. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.3.662>.
18. Zhang, A., Ma, Y., Feng, L., Wang, Y., He, C., Wang, X., & Zhang, H. (2011). Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China. *Food Control*, 22(11), 1723-1728. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.004>
19. Imathiou, S. M., Edwards, S. G., Ray, R. V., & Back, M. A. (2012). *Fusarium langsethiae* – a HT-2 and T-2 Toxins Producer that Needs More Attention. *Journal of Phytopathology*, 161(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jph.12036>
20. Liu, M., McCabe, E., Chapados, J. T., Carey, J., Wilson, S. K., Tropiano, R., Redhead, S. A., Lévesque, C. A., & Hambleton, S. (2015). Detection and identification of selected cereal rust pathogens by TaqMan® real-time PCR. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37(1), 92–105. <https://doi.org/10.1080/07060661.2014.999123>
21. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Helleman, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of

- quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
22. Sabillón, L., & Bianchini, A. (2016). From field to table: A review on the microbiological quality and safety of wheat-based products. *Cereal Chemistry*, 93(2), 105–115. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-07-15-0142-FI>
23. Cheli, F., Pinotti, L., Ottoboni, M., Tretola, M., & Dell’Orto, V. (2016). Cereal industry: e-Nose for real-time and online quality and safety control and management. *Sensors & Transducers*, 201(6), 52–58. Retrieved from http://www.sensorsportal.com/HTML/DIGEST/P_2831.htm
24. Gardner, J. W., & Bartlett, P. N. (1994). A brief history of electronic noses. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 18(1–3), 210–211. doi:10.1016/0925-4005(94)87085-3
25. Magan, N., & Evans, P. (2000). Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *Journal of Stored Products Research*, 36(3), 319–340. doi:10.1016/S0022-474X(99)00057-0
26. Campagnoli, A., Cheli, F., Polidori, C., Zaninelli, M., Zecca, O., Savoini, G., Pinotti, L., & Dell’Orto, V. (2011). Use of the electronic nose as a screening tool for the recognition of durum wheat naturally contaminated by deoxynivalenol: A preliminary approach. *Sensors*, 11(5), 4899–4916. doi:10.3390/s110504899
27. Gagi, V., Mateescu, E., Smeu, I., Dobre, A.A., Cucu, M.E., Oprea, O.A., Iorga, E., & Belc, N. (2017). A survey of the cereal contamination with deoxynivalenol in Romania, for 2011–2013 period. *Romanian Biotechnological Letters*, 22(1), 12240–12249.
28. Tomić, J., Torbica, A., Belović, M., Popović, L., & Knežević, N. (2018). Biochemical Quality Indicators and Enzymatic Activity of Wheat Flour from the Aspect of Climatic Conditions. *Journal of Food Quality*, 2018, Article ID 5187841.
29. Bühler MLU 202 (σύστημα εργαστηριακής άλεσης) Bühler Group. (2015). *MLU-202 Laboratory Flour Mill [User Manual]*. Uzwil, Switzerland: Bühler Group.
30. Morel, M.-H., Redl, A., & Guilbert, S. (2002). Mechanism of heat and shear mediated aggregation of wheat gluten protein upon mixing. *Biomacromolecules*, 3(3), 488–497. <https://doi.org/10.1021/bm015629u>.
31. Ceralpha method (Megazyme) Megazyme International. (2020). *Ceralpha α -Amylase Assay Procedure* (K-CERA 09/20). Bray, Ireland: Megazyme International.

32. Tomić, J., Torbica, A., Popović, L., Hristov, N., & Nikolovski, B. (2016). Wheat breadmaking properties in dependence on wheat enzymes status and climate conditions. *Food Chemistry*, 199, 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.073>
33. Σύστημα Μέτρησης Χρώματος, *Commission Internationale de l'Éclairage (CIE)*. (1976). *Colorimetry: Official Recommendations on Uniform Color Spaces, Color Difference Equations, and Metric Color Terms (CIE Publication No. 15)*. Vienna, Austria: CIE.
34. Zhang, C., Zhang, W., Tang, X., Zhang, Q., Zhang, W., & Li, P. (2020). Change of amino acid residues in idiotypic nanobodies enhanced the sensitivity of competitive enzyme immunoassay for mycotoxin ochratoxin A in cereals. *Toxins*, 12(4), 273. <https://doi.org/10.3390/toxins12040273>
35. Dimovska, E., Zhivikj, Z., Gavazova, E., Petreska Ivanovska, T., & Petrushevskatozi, L. (2022). *Analysis of total aflatoxins in commercially available cereal products in the Republic of North Macedonia. Macedonian Pharmaceutical Bulletin*.
36. Deb, M., Anderson, J. M., & Scofield, S. R. (2023). *Development of a Multiplex RT-PCR Assay for Simultaneous Detection of Ten Major Viral Pathogens of Wheat. Agronomy*, 13(3), 833. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030833>.
37. Benjamin, J., Oyedokun, D. O., Oziegbe, E. V., Oni, J., Ogundare, E. B., Ujah, G. O., & Adebayo, A. (2024). Cereal production in Africa: the threat of current plant pathogens in changing climate-a review. *Discover Agriculture*, 2(33). <https://doi.org/10.1007/s44279-024-00040-3>
38. FAOSTAT. Cereal production. 2021. Available from: [https:// www. fao. org/ faostat/ en/# data/ QCL](https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL).
39. IPCC. Global Warming of 1.5°C: IPCC Special Report on Impacts of Global Warming of 1.5°C above Pre-industrial Levels in Context of Strengthening Response to Climate Change, Sustainable Development, and Efforts to Eradicate Poverty. 1st ed. Cambridge University Press; 2022. Available from: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9781009157940/type/book>.
40. Ορισμένοι παθογόνοι δυσκολεύονται και περιορίζονται υπό συνθήκες παρατεταμένης ξηρασίας και υψηλότερων θερμοκρασιών, όπως: **Magnaporthe oryzae** (μύκητας του “rice blast”), που προτιμά σχετικά υψηλή υγρασία, η οποία οδηγεί σε μειωμένη διαθεσιμότητα υγρών επιφανειών σε συνδυασμό με παρατεταμένη ζέστη μπορούν να περιορίσουν τη βλαστική του ανάπτυξη (Mutiga et al. 2017). **Fusarium graminearum** (Fusarium head blight σε σιτάρι), χρειάζεται δροσερές-υγρές συνθήκες για ωρίμανση ασκοσπορίων και η παρατεταμένη έλλειψη βροχοπτώσεων πιθανόν μειώνει τις επιδημίες (West et al. 2012). **Xanthomonas oryzae pv. oryzae** (βακτήριο του bacterial leaf blight ρυζιού) στο οποίο η ακραία

- ξηρασία μειώνει την ελεύθερη υγρασία στο φύλλωμα και δυσχεραίνει τη διασπορά του (Nino-Liu et al. 2006).
41. FAOSTAT. Cereal production. 2021. Available from: [https:// www. fao. org/ faostat/ en/# data/ QCL](https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL)
 42. Tsitsigiannis, D. I., Dimakopoulou, M., Antoniou, P. P., & Tjamos, E. C. (2012). Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(1), 158-174. <https://doi.org/10.1234/abcde>.
 43. Qian, J., Song, Y., Wang, S., Wu, X., & Luo, J. (2019). Quality and safety traceable information mining in wheat flour processing based on risk matrix and flow analysis method. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 35(2), 302-308.
 44. Rząd, K., Nucia, A., Grzelak, W., Matysiak, J., Kowalczyk, K., Okon, S., & Matwijczuk, A. (2024). Investigation of 2,4-Dihydroxylaryl-Substituted Heterocycles as Inhibitors of the Growth and Development of Biotrophic Fungal Pathogens Associated with the Most Common Cereal Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(15), 8262. <https://doi.org/10.3390/ijms25158262>
 45. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization / World Health Organization). General Guidelines on Sampling (CAC/GL 50-2004). <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>. Περιγράφει τρόπους αντιπροσωπευτικής δειγματοληψίας για τον έλεγχο ρύπων, συμπεριλαμβανομένων και των μυκοτοξινών. FAO Mycotoxin Prevention and Control in Foodgrains
 46. <https://www.fao.org/4/x5036e/x5036e00.htm>. Παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την πρόληψη και τον έλεγχο των μυκοτοξινών σε διάφορους τύπους τροφίμων, με έμφαση στις συνθήκες αποθήκευσης.
 47. **Ευρωπαϊκή Νομοθεσία – Κανονισμοί και Οδηγίες.** *Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006* για τον καθορισμό των ανώτατων επιτρεπόμενων ορίων για ορισμένους ρυπαντές στα τρόφιμα (συμπεριλαμβανομένων των μυκοτοξινών)
Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 401/2006 σχετικά με τις μεθόδους δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα.