



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

**Διπλωματική εργασία  
Σύγχρονες τεχνικές ανίχνευσης των παθογόνων βακτηρίων  
*Listeria monocytogenes* και *Shigella* spp στα τρόφιμα**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΑΤΣΙΚΑΣ**

**Επιβλέπων καθηγητής  
ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΚΑΜΠΟΛΗΣ**

**Λάρισα, Ιανουάριος 2025**

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



**Σύγχρονες τεχνικές ανίχνευσης των παθογόνων βακτηρίων  
*Listeria monocytogenes* και *Shigella* spp στα τρόφιμα**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΑΤΣΙΚΑΣ**

**Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας**

**Επιβλέπων καθηγητής  
Αναστάσιος Καμπόλης**

**Συν-Επιβλέπων καθηγητής  
Κωνσταντίνος Τσιαφούλης**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω τους αγαπημένους μου ανθρώπους που σταθήκανε δίπλα μου αρωγοί όλα αυτά τα χρόνια. Τους γονείς, Αντώνιο και Βασιλική, την σύζυγο μου Κωνσταντία και τα παιδιά μου Αθηνά και Αντωνία για την αμέριστη στήριξη τους κατά την διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών σπουδών μου. Χωρίς αυτούς δεν θα είχα κατορθώσει να επιτύχω όλα όσα επιθυμούσα και ονειρευόμουν.

Ένα ταξίδι χιλίων χιλιομέτρων αρχίζει με ένα βήμα.  
Λάο Τσε

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τροφή είναι ένας από τους βασικότερους παράγοντες της ζωής. Με την κατανάλωση της όμως ο άνθρωπος μπορεί να οδηγηθεί σε λοιμώδεις καταστάσεις οι οποίες ονομάζονται τροφιμογενής λοιμώξεις με απρόβλεπτα αποτελέσματα για την υγεία του. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν αυτές τις μολύνσεις είναι τα παράσιτα, τα βακτήρια, οι ιοί και οι τοξίνες με τα οποία μπορεί να έχει έρθει σε επαφή το τρόφιμο τόσο στην αρχική μορφή του όσο και κατά την επεξεργασία και την διακίνηση του. Τα περισσότερα τροφιμογενή παθογόνα συχνά συνδέονται με ένα σύνδρομο αυτοπεριοριζόμενης γαστρεντερίτιδας αλλά μπορούν να προκαλέσουν και πολύ πιο σοβαρά προβλήματα όπως νευρικές διαταραχές και επικίνδυνες επιπλοκές που μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και στο θάνατο. Για να προληφθούν τέτοιου είδους καταστάσεις έχουν αναπτυχθεί και συνεχίζουν να αναπτύσσονται, εργαστηριακές τεχνικές με σκοπό την ανίχνευση και την ταυτοποίηση παθογόνων κάθε τύπου σε προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από το κοινό. Για την αντιμετώπιση αυτών των κινδύνων, χρησιμοποιούνται μέθοδοι ανίχνευσης, όπως οι καλλιεργητικές μέθοδοι, η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) και μέθοδοι που στηρίζονται πάνω σε αυτή, ο Ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (ELISA), καθώς επίσης και πιο σύγχρονες όπως οι μικροσυστοιχίες DNA και η NGS κ.λπ, που επιτρέπουν τον ακριβή και γρήγορο εντοπισμό των παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα τροφίμων. Στόχος της χρήσης των εργαστηριακών τεχνικών είναι να γίνει η τροφή ασφαλέστερη για κατανάλωση αλλά και να κατανοήσουμε τη δράση των παθογόνων και ποια από αυτά είναι επικίνδυνα για τον άνθρωπο.

**Λέξεις-Κλειδιά** Τροφιμογενής λοίμωξη, ασφάλεια τροφίμων, μέθοδοι ανίχνευσης, παθογόνοι μικροοργανισμοί

## **Modern techniques for the detection of pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* and *Shigella* spp in food**

### **ABSTRACT**

Food is one of the most essential factors of life. However, by consuming it, humans can be led to infectious conditions called foodborne infections with unpredictable effects on their health. The pathogenic microorganisms that can cause these infections are parasites, bacteria, viruses and toxins with which the food may have come into contact both in its original form and during its processing and handling. Most foodborne pathogens are often associated with a self-limiting gastroenteritis syndrome but can also cause much more serious problems such as nervous disorders and dangerous complications that can even lead to death. In order to prevent such situations, laboratory techniques have been developed and continue to be developed with the aim of detecting and identifying pathogens of all types in products intended for consumption by the public. To address these risks, detection methods are used, such as culture methods, Polymerase Chain Reaction (PCR) and methods based on it, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), as well as more modern ones such as DNA microarrays and NGS, etc., which allow the accurate and rapid identification of pathogenic microorganisms in food samples. The aim of using laboratory techniques is to make food safer for consumption but also to understand the action of pathogens and which of them are dangerous to humans.

**Keywords** Foodborne infection, food safety, detection methods, pathogenic microorganisms

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....</b>	<b>8</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....</b>	<b>11</b>
<b>ΣΚΟΠΟΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....</b>	<b>13</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....</b>	<b>13</b>
1.1 <i>Shigella</i> spp.....	17
1.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	21
1.3 Επιδημιολογικά δεδομένα.....	28
1.3.1 <i>Shigella</i> spp.....	28
1.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	35
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ.....</b>	<b>39</b>
2.1 Μέθοδοι που βασίζονται σε καλλιέργειες.....	39
2.2 Ανοσολογικές μέθοδοι.....	41
2.2.1 Δοκιμασία Ανοσοπροσρόφησης Συνδεδεμένη με Ένζυμο ( Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA).....	41
2.2.1.1 Άμεση ELISA.....	44
2.2.1.2 Έμμεση ELISA.....	46
2.2.1.3 Sandwich ELISA.....	48
2.2.1.4 Ανταγωνιστική ELISA.....	50
2.2.2 Ανοσοδοκιμασία Πλευρικής Ροής (Later Flow Immunoassay, LFIA).....	53
2.3 Μέθοδοι Ενίσχυσης Νουκλεϊκών Οξέων.....	56
2.3.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράση (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	56
2.3.2 Ισοθερμική Ενίσχυση μέσω Βρόγχου (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP).....	75
2.3.3 Μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων DNA.....	78
2.4 Μέθοδοι Αλληλούχησης Νουκλεϊκών Οξέων.....	81
2.4.1 Η μέθοδος Sanger.....	81
2.4.2 Η μέθοδος της χημικής αποδόμησης των Maxam-Gilbert.....	84
2.4.3 Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς - Next Generation Sequencing, NGS....	86

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ <i>Shigella</i> και <i>Listeria monocytogenes</i>.....</b>	<b>94</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>100</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>102</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1</b> : εξιδρώματα κοπράνων δε ασθενή με <i>Shigella dysenteriae</i> .....	<b>17</b>
<b>Εικόνα 2</b> : Maurelli T. 1992. <i>Shigella</i> inside and out: lifestyles of the invasive and dysenteric. <i>ASM News</i> 58: 603–608.....	<b>18</b>
<b>Εικόνα 3</b> : Kiyoshi Shiga (1871–1957). Ανατύπωση από Sasakawa. Η φωτογραφία παρέχεται ευγενική προσφορά του Shibasaburo Kitasato Memorial Museum στο Ινστιτούτο Kitasato (Τόκιο). Πνευματικά δικαιώματα © 2010 The Japan Academy.....	<b>19</b>
<b>Εικόνα 4</b> : Weiman, S., & Fox, J. (2015c). Figure 5. Gram stain of <i>Salmonella typhimurium</i> . Retrieved from <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/website/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519801/figure/fig5/">www.ncbi.nlm.nih.gov/website:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519801/figure/fig5/</a> .....	<b>22</b>
<b>Εικόνα 5</b> : Compliant Detection of <i>Listeria monocytogenes</i> in Food &. (n.d.). Retrieved from <a href="http://www.rapidmicrobiology.com/website/https://www.rapidmicrobiology.com/news/compliant-detection-of-listeriamonocytogenes-in-food-environmental-samples">www.rapidmicrobiology.com/website:https://www.rapidmicrobiology.com/news/compliant-detection-of-listeriamonocytogenes-in-food-environmental-samples</a> .....	<b>22</b>
<b>Εικόνα 7</b> : Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001. <i>Listeria</i> pathogenesis and molecular virulence determinants. <i>Clin Microbiol Rev</i> 14:584–640. doi: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.....	<b>24</b>
<b>Εικόνα 8</b> : Μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση (αριθμός κρουσμάτων/ 1.000.000 πληθυσμού) της σιγκέλλωσης στην Ελλάδα ανά ηλικιακή ομάδα.....	<b>31</b>



<b>Εικόνα 9</b> : Μέση μηνιαία δηλούμενη επίπτωση (αριθμός κρουσμάτων/1.000.000 πληθυσμού) της σιγκέλλωσης στην Ελλάδα.....	<b>32</b>
<b>Εικόνα 10</b> : Μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση (κρούσματα/1.000.000 πληθυσμού) της σιγκέλλωσης ανά περιφέρεια στην Ελλάδα 2004-2023.....	<b>33</b>
<b>Εικόνα 11</b> : Μέση ετήσια επίπτωση της λιστερίωσης ανά περιφέρεια της χώρας (κρούσματα/1.000.000 κατοίκους), Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, 2004-2023.....	<b>38</b>
<b>Εικόνα 12</b> : Άμεση ELISA για την ανίχνευση του αντιγόνου ( α ) και του αντισώματος ( β ).....	<b>45</b>
<b>Εικόνα 13</b> : Έμμεση ELISA για ανάλυση αντισωμάτων.....	<b>47</b>
<b>Εικόνα 14</b> : ELISA σάντουιτς για ειδική ανίχνευση αντιγόνου.....	<b>49</b>
<b>Εικόνα 15</b> : Ανταγωνιστική ELISA για την ανίχνευση αντιγόνου ( α ) και αντισώματος ( β ).....	<b>51</b>
<b>Εικόνα 16</b> : Συσκευή ανοσοδοκιμασίας πλευρικής ροής.....	<b>54</b>
<b>Εικόνα 17</b> : Θερμοκυκλωτές PCR   Biocompare.com.....	<b>58</b>
<b>Εικόνα 18</b> : θερμοκρασιακά στάδια PCR.....	<b>58</b>
<b>Εικόνα 19</b> : Πρόσδεση των εκκινητών στα μονόκλωνα μόρια DNA.....	<b>59</b>
<b>Εικόνα 20</b> : Σύνθεση συμπληρωματικής DNA αλυσίδας.....	<b>60</b>
<b>Εικόνα 21</b> : PCR αντίδραση.....	<b>61</b>
<b>Εικόνα 22</b> : Απόδοση PCR.....	<b>62</b>
<b>Εικόνα 23</b> : προϊόντα αντίδρασης PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	<b>64</b>
<b>Εικόνα 24</b> : SBR green .....	<b>66</b>
<b>Εικόνα 25</b> : Taqan probe.....	<b>66</b>
<b>Εικόνα 26</b> : Μοριακοί φάροι.....	<b>68</b>
<b>Εικόνα 27</b> : Q1000+ Μηχάνημα Real Time PCR.....	<b>69</b>
<b>Εικόνα 28</b> : RT-PCR.....	<b>71</b>
<b>Εικόνα 29</b> : Επάλληλη PCR.....	<b>73</b>

<b>Εικόνα 30</b> : Αρχή dPCR.....	<b>74</b>
<b>Εικόνα 31</b> : Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση LAMP.....	<b>76</b>
<b>Εικόνα 32</b> : Η δομή αλτήρα στη μέθοδο Lamp.....	<b>77</b>
<b>Εικόνα 33</b> : Μικροσυστοιχίες – οπτικό αποτέλεσμα πάνω σε γυαλί.....	<b>80</b>
<b>Εικόνα 34</b> : Η διαδικασία αλληλούχισης DNA με τη μέθοδο του Sanger που βασίζεται στη χρήση ραδιοσημασμένων διδεοξυνουκλεοτιδίων.....	<b>82</b>
<b>Εικόνα 35</b> : Η διαδικασία αλληλούχισης DNA με τη μέθοδο του Sanger που βασίζεται στη χρήση φθοριοσημασμένα διδεοξυνουκλεοτιδίων.....	<b>83</b>
<b>Εικόνα 36</b> : Διαγραμματική αποικόνιση της μεθόδου Maxam-Gilbert.....	<b>85</b>
<b>Εικόνα 37</b> : Αλληλούχιση επόμενης γενιάς.....	<b>88</b>
<b>Εικόνα 38</b> : Pyrosequencing.....	<b>91</b>
<b>Εικόνα 39</b> : Σύνοψη της λειτουργίας του Roche/454.....	<b>92</b>
<b>Εικόνα 40</b> : Σύνοψη της λειτουργίας της πλατφόρμας Illumina.....	<b>93</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1:</b> Συμπτώματα, έναρξη συμπτωμάτων και υπεύθυνοι μικροοργανισμοί ή τοξίνες για τις κύριες τροφιμογενείς ασθένειες.....	<b>16</b>
<b>Πίνακας 2:</b> Ορισμένες τροφές εμπλέκονται σε δημοσιευμένες αναφορές τροφιμογενούς λιστερίωσης.....	<b>22</b>
<b>Πίνακας 3:</b> Ορισμένα κλινικά σύνδρομα που σχετίζονται με λοίμωξη από <i>L.monocytogenes</i> .....	<b>23</b>
<b>Πίνακας 4:</b> Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων και δηλωθείσα επίπτωση σιγκέλλωσης στην Ελλάδα.....	<b>26</b>
<b>Πίνακας 5:</b> Κατανομή συχνοτήτων των ειδών <i>Shigella</i> spp. στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων & Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών, Σιγκελλών, δονακίων χολέρας, Λιστέριας και λοιπών εντεροπαθογόνων, 2004-2023....	<b>30</b>
<b>Πίνακας 6:</b> Επιδημίες λιστερίωσης που σχετίζονται με φρέσκα προϊόντα.....	<b>33</b>
<b>Πίνακας 7:</b> Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων και επίπτωση της λιστερίωσης στην Ελλάδα κατ' έτος, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, 2004-2023.....	<b>34</b>
<b>Πίνακας 8:</b> Βασικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο ELISA και τα υποστρώματα τους.....	<b>40</b>
<b>Πίνακας 9:</b> Πίνακας 9 πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της ELISA.....	<b>52</b>

## **ΣΚΟΠΟΣ**

Στόχος αυτής της μελέτης είναι τόσο να διερευνήσει όσο και να αξιολογήσει τις νέες μοριακές τεχνικές ανίχνευσης και ταυτοποίησης των παθογόνων βακτηρίων *Listeria monocytogenes* και *Shigella* spp στα τρόφιμα. Η κατανάλωση τροφίμων που έχουν μολυνθεί από τα συγκεκριμένα παθογόνα μπορεί να οδηγήσει σε τροφιμογενείς ασθένειες οδηγώντας σε σοβαρά προβλήματα υγείας καθώς επίσης και σε εμφάνιση επιδημιών. Για το λόγο αυτό η κατανόηση αυτών των παθογόνων που μπορούν να επιφέρουν μόλυνση στα τρόφιμα και η ανάπτυξη ταχέων και αποτελεσματικών μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης τους είναι μείζονος σημασία τόσο για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας όσο και για την εύρυθμη λειτουργία των συστημάτων υγείας .

## **ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

Για την πραγμάτωση της εν λόγω μελέτης υλοποιήθηκε βιβλιογραφική έρευνα και χρησιμοποιήθηκαν επιστημονικά άρθρα από τη βάση δεδομένων PubMed και από αξιόπιστες ιστοσελίδες τόσο σε εγχώριο επίπεδο όσο και σε διεθνές ( ΕΟΔΥ, WHO, USFDA, IFT ). Για την συγγραφή της χρησιμοποιήθηκαν οι λέξεις κλειδιά τροφιμογενείς μολύνσεις (foodborne disease), παθογόνα βακτήρια (pathogenic bacteria), ασφάλεια τροφίμων (food safety), μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης (molecular detection methods), και τροφιμογενείς εξάρσεις ( foodborne outbreaks).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

### **ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ**

Η τροφή είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες για την επιβίωση ενός έμβιου οργανισμού. Ως τροφή ορίζουμε οποιαδήποτε ουσία που άμεσα ή μετά από επεξεργασία χρησιμοποιείται για να παρέχει διατροφική υποστήριξη σε έναν οργανισμό. Η τροφή είναι συνήθως φυτικής ή ζωικής προέλευσης και περιέχει βασικά θρεπτικά συστατικά, όπως υδατάνθρακες, λίπη, πρωτεΐνες, βιταμίνες ή μέταλλα. Η κατανάλωση όμως της τροφής από έναν άνθρωπο μπορεί να τον οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις με απρόβλεπτα αποτελέσματα για την υγεία του αν αυτή δεν είναι ασφαλής. Αυτές οι παθολογικές καταστάσεις μετά από κατανάλωση τροφής η οποία έχει μολυνθεί από παθογόνα βακτήρια, παράσιτα, ιούς, τοξίνες (μυκοτοξίνες, εντεροτοξίνες ή φυσικές τοξίνες) ή άλλες δηλητηριώδεις χημικές ουσίες ονομάζονται τροφιμογενείς μολύνσεις. Βασικές αιτίες των μολύνσεων αυτών είναι η μη τήρηση κανόνων ατομικής υγιεινής, το ανεπαρκές μαγείρεμα και η μη τήρηση ορθών πρακτικών παραγωγής, επεξεργασίας και συσκευασίας των τροφίμων. Σύμφωνα με τον WHO (World Health Organization) κάθε χρόνο παγκοσμίως, τα μη ασφαλή τρόφιμα προκαλούν 600 εκατομμύρια περιπτώσεις τροφιμογενών ασθενειών και 420.000 θανάτους. Το 30% των τροφιμογενών θανάτων συμβαίνουν σε παιδιά κάτω των 5 ετών καθώς διατρέχουν ιδιαίτερα υψηλό κίνδυνο, με 125.000 παιδιά να πεθαίνουν από τροφιμογενείς ασθένειες κάθε χρόνο. Ο WHO υπολόγισε ότι χάνονται 33 εκατομμύρια χρόνια υγιεινών ζώων λόγω της κατανάλωσης μη ασφαλών τροφίμων παγκοσμίως κάθε χρόνο, και αυτός ο αριθμός είναι πιθανώς υποεκτιμημένος [1]. Το βάρος των τροφιμογενών μολύνσεων δεν κατανέμεται εξίσου σε ολόκληρο τον κόσμο, αλλά συσχετίζεται με την κοινωνικοοικονομική ανάπτυξη των χωρών. Οι τροφιμογενείς μολύνσεις παρεμποδίζουν την κοινωνική και οικονομική ανάπτυξη επιβαρύνοντας τα συστήματα

υγειονομικής περίθαλψης και βλάπτοντας τις εθνικές οικονομίες, το εμπόριο αλλά και τον τουρισμό.

Αυτές οι ασθένειες και οι θάνατοι μπορούν να προληφθούν σε μεγάλο βαθμό. Για να προληφθούν τέτοιου είδους καταστάσεις έχουν αναπτυχθεί και συνεχίζουν να αναπτύσσονται, εργαστηριακές μοριακές τεχνικές με σκοπό την ανίχνευση και την ταυτοποίηση παθογόνων κάθε τύπου σε προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από το κοινό, πριν ή μετά την επεξεργασία τους, καθώς και στις συσκευασίες αυτών. Τροφιμογενείς ασθένειες ονομάζονται οι ασθένειες οι οποίες προκαλούνται από παθογόνα βακτήρια, παράσιτα, ιούς, τοξίνες (μυκοτοξίνες, εντεροτοξίνες ή φυσικές τοξίνες) ή άλλες δηλητηριώδεις χημικές ουσίες που έχουν μολύνει ένα τρόφιμο. Ένα τρόφιμο για να φτάσει στην κατανάλωση ακολουθεί μια συγκεκριμένη διαδρομή, παραγωγή-επεξεργασία-συσκευασία. Η μόλυνση του τροφίμου μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε από αυτά τα στάδια. Εάν το τρόφιμο μολυνθεί και καταναλωθεί τότε ο καταναλωτής μπορεί να οδηγηθεί σε παθολογικές καταστάσεις με απρόβλεπτα αποτελέσματα για την υγεία του. Τα περισσότερα τροφιμογενή βακτηριακά παθογόνα συχνά συνδέονται με ένα σύνδρομο αυτοπεριοριζόμενης γαστρεντερίτιδας με ναυτία, έμετο, διάρροια, κοιλιακό άλγος και μερικές φορές πυρετό. Υπάρχουν όμως και αρκετές περιπτώσεις που η κατανάλωση της μολυσμένης τροφής από έναν άνθρωπο μπορεί προκαλέσουν σοβαρή ασθένεια με εξωεντερικές λοιμώξεις, επακόλουθα μετά τη μόλυνση, ακόμη και θάνατο, ειδικά σε άτομα υψηλού κινδύνου. Η τροφιμογενής νόσος εμφανίζεται όταν ένα παθογόνο καταναλώνεται μαζί με την τροφή και εγκαθίσταται (συνήθως πολλαπλασιάζεται) στον ανθρώπινο ξενιστή. Επίσης υπάρχουν και τοξικογόνα παθογόνα τα οποία εγκαθίστανται σε ένα τρόφιμο και παράγουν μια τοξίνη, η οποία στη συνέχεια με την κατανάλωση του τροφίμου προσλαμβάνεται από τον ανθρώπινο ξενιστή. Έτσι, οι τροφιμογενείς μολύνσεις ταξινομούνται γενικά σε δύο κατηγορίες:

**(α) τροφιμογενή λοίμωξη και**

**(β) τροφιμογενή δηλητηρίαση**

Στις τροφιμογενείς λοιμώξεις, λόγω της περιόδου επώασης που χρειάζεται το παθογόνο, ο χρόνος από την κατάποση έως την εμφάνιση των συμπτωμάτων είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν των τροφιμογενών δηλητηριάσεων. Ως έξαρση τροφιμογενούς ασθένειας ορίζεται η εμφάνιση δύο ή περισσότερων περιπτώσεων παρόμοιας ασθένειας που προκύπτουν από την κατάποση μιας κοινής τροφής [2]. Έχουν αναγνωριστεί περισσότερες από 200 διαφορετικές τροφιμογενείς ασθένειες [3]. Περιστατικά με αυξημένη σοβαρότητα συνήθως εμφανίζονται σε υγιή άτομα που εκτίθενται σε πολύ υψηλή δόση ενός παθογόνου οργανισμού ή μιας τοξίνης, σε πολύ ηλικιωμένους, σε ανοσοκατεσταλμένους και σε πολύ νέους [2]. Τα βακτήρια είναι η πιο κοινή αιτία τροφιμογενών μολύνσεων και υπάρχουν σε ποικίλα σχήματα, είδη και ιδιότητες. Τα συμπτώματα, η έναρξη των συμπτωμάτων και οι πιο κοινοί υπεύθυνοι μικροοργανισμοί για τις κύριες τροφιμογενείς ασθένειες φαίνονται στον **Πίνακα 1**

**Πίνακας 1.** Συμπτώματα, έναρξη συμπτωμάτων και υπεύθυνοι μικροοργανισμοί ή τοξίνες για τις κύριες τροφιογενείς ασθένειες.

Κατά προσέγγιση χρόνος έναρξης των συμπτωμάτων	Κυριαρχικά συμπτώματα	Συσχετισμένος οργανισμός ή τοξίνη
1–7 ώρες, κατά μέσο όρο 2–4 ώρες	Ναυτία, έμετος, τσούξιμο, διάρροια, κοιλιακό άλγος, κατάπτωση	<i>Staphylococcus aureus</i> και οι εντεροτοξίνες του
8–16 ώρες (2–4 ώρες εάν κυριαρχεί ο έμετος)	Έμετος ή διάρροια, ανάλογα με το εάν υπάρχει διαρροϊκή ή εμετική τοξίνη, κοιλιακές κράμπες? ναυτία	<i>Bacillus cereus</i> (εμετική τοξίνη)
12–48 h	Ναυτία, έμετος, υδαρής μη αιματηρή διάρροια, αφυδάτωση	Νοροϊός
2–36 ώρες (μέσος όρος 6–12 ώρες)	Κοιλιακές κράμπες, διάρροια, διάρροια σήψης ( <i>Cl. perfringens</i> ), μερικές φορές ναυτία και έμετος	<i>Clostridium perfringens</i>
6–96 ώρες (συνήθως 1–3 ημέρες)	Πυρετός, κράμπες στην κοιλιά, διάρροια, έμετος, πονοκέφαλος	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>E. coli</i>
6 ώρες έως 5 ημέρες	Κοιλιακές κράμπες, διάρροια, έμετος, πυρετός, κακουχία, ναυτία, πονοκέφαλος, αφυδάτωση	<i>Vibrio cholerae</i> (O1 και μη-O1), <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
1–10 (διάμεσος 3–4) ημέρες	Διάρροια (συνήθως αιματηρή), κοιλιακό άλγος, ναυτία, έμετος, κακουχία, πυρετός (όχι συχνές με <i>E. coli</i> O157:H7)	Εντεροαιμορραγικό <i>E. coli</i> , <i>Campylobacter</i> spp.
3–5 ημέρες	Πυρετός, έμετος, υδαρής μη φλεγμονώδης διάρροια	Ροταιός, Αστροϊός, εντερικός αδενοϊός
3–7 ημέρες	Πυρετός, διάρροια, πόνος στην κοιλιά	<i>Yersinia enterocolitica</i>
1 έως αρκετές εβδομάδες	Κοιλιακό άλγος, διάρροια, δυσκοιλιότητα, πονοκέφαλος, υπνηλία, έλκη, μεταβλητά — συχνά ασυμπτωματικά	<i>Entamoeba histolytica</i>
3–6 μήνες	Νευρική κατάσταση, απώλεια βάρους, κοιλιακό άλγος, μερικές φορές γαστρεντερίτιδα	<i>Taenia saginata</i> , <i>Taenia solium</i>
2 ώρες έως 6 ημέρες, συνήθως 12–36 ώρες	Άλγος, διπλή ή θαλή όραση, απώλεια ή αντανάκλαστικό φωτός, δυσκολία στην κατάποση, ξηροστομία, αδυναμία, αναπνευστική παράλυση	Το <i>Clostridium botulinum</i> και οι νευροτοξίνες του
4–28 ημέρες	Γαστρεντερίτιδα, πυρετός, οίδημα γύρω από τα μάτια, εφίδρωση, μυϊκός πόνος, ρίγη, κατάπτωση, δυσκολία στην αναπνοή	<i>Trichinella spiralis</i>
7–28 ημέρες	Κακουχία, πονοκέφαλος, πυρετός, πυρετός, βήχας, ναυτία, έμετος, δυσκοιλιότητα, κοιλιακό άλγος, ρίγη, τριανταφυλλίες, αιματηρές κενώσεις	<i>Σαλμονέλα Τύμμη</i>
10–13 ημέρες	Πυρετός, πονοκέφαλος, μυαλγία, εξάνθημα	<i>Toxoplasma gondii</i>
Διάφορες περίοδοι	Πυρετός, ρίγη, πονοκέφαλος, αρθραλγία, κατάπτωση, κακουχία, πρησμένοι λεμφαδένες και άλλα συγκεκριμένα συμπτώματα της εν λόγω ασθένειας	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>

[4], [5]



## 1.1 Shigella spp.

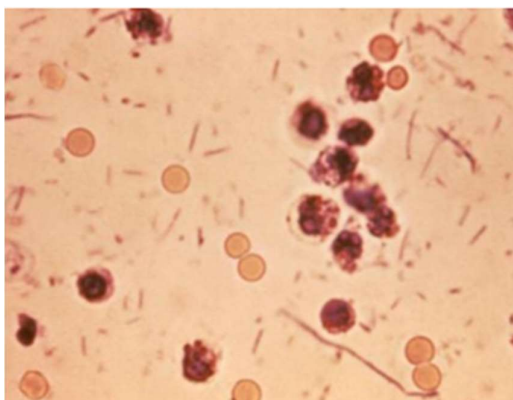
Το γένος *Shigella* είναι μέλος της οικογένειας Enterobacteriaceae και διαθέτει τέσσερις οροομάδες που παραδοσιακά αντιμετωπίζονται ως είδη:

οροομάδα A : *Shigella dysenteriae* (12 ορότυποι)

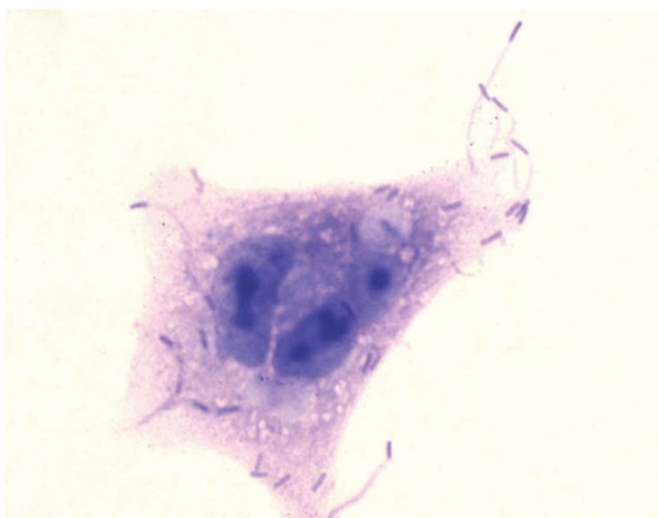
οροομάδα B : *Shigella flexneri* (6 ορότυποι)

οροομάδα C : *Shigella boydii* (23 ορότυποι)

οροομάδα D : *Shigella sonnei* (1 ορότυπος)



**Εικόνα 1** Εξιδρώματα κοπράνων σε ασθενή με *Shigella dysenteriae*



**Εικόνα 2** Κινητικότητα του *Shigella flexneri* 2a εντός κυττάρου ιστοκαλλιέργειας [6]

Τα *Shigella* είναι μη κινητές, προαιρετικά αναερόβιες αρνητικές κατά Gram ράβδοι που δεν σχηματίζουν σπόρια. Οι θερμοκρασίες που μπορούν να αναπτυχθούν κυμαίνονται από 6 έως 48 °C, αλλά προτιμούν τους 37 °C. Ο *S. sonnei* φαίνεται να μπορεί να αναπτύσσεται και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες καλύτερα από τις άλλες οροομάδες. Η βέλτιστη ανάπτυξη των *Shigella* εμφανίζεται μεταξύ pH 6,0 και 8,0, αν και έχει αναφερθεί ανάπτυξη μεταξύ pH 4,8 και 9,3. Οι *Shigella* spp. είναι διαρροϊκά παθογόνα που σχετίζονται στενά με το *Escherichia coli*. Ονομάζονται από τον Kiyoshi Shiga, ο οποίος το 1898 αναγνώρισε το πιο λοιμογόνο μέλος του, τη *Shigella dysenteriae*, ως τον αιτιολογικό παράγοντα της βακτηριακής δυσεντερίας, γνωστής και ως σιγκέλλωση [7].



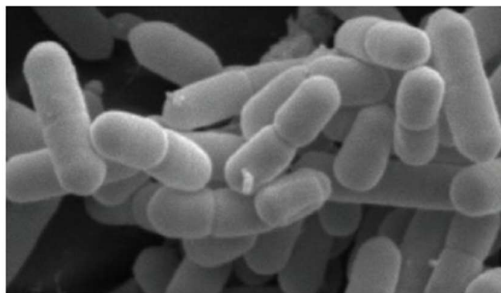
**Εικόνα 3** Kiyoshi Shiga (1871–1957) [8]

Τα παθογόνα *Shigella* spp. προκαλούν διαρροϊκή νόσο εισβάλλοντας στο επιθήλιο του παχέος εντέρου. Η εξάπλωση της λοίμωξης περιορίζεται γενικά στην εντερική επένδυση, όπου οδηγεί σε φλεγμονή του παχέος εντέρου, εξέλκωση του βλεννογόνου και απώλεια της λειτουργίας του εντερικού φραγμού. Τα *Shigella* spp. δεν έχουν συσχετιστεί με ένα συγκεκριμένο είδος τροφής. Μεταδίδονται μέσω της κοπράνο-στοματικής οδού ή μέσω της κατάποσης μολυσμένων τροφών και νερού. Το εύρος των κλινικών συμπτωμάτων σχετίζεται τόσο με την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή όσο και με τα είδη *Shigella*, τα οποία διαφέρουν στην παρουσία ορισμένων κρίσιμων παραγόντων λοιμογόνου δράσης, συμπεριλαμβανομένης της τοξίνης Shiga. Το *S. dysenteriae* θεωρείται το πιο λοιμογόνο είδος, ιδιαίτερα ο ορότυπος τύπου 1 λόγω της ικανότητάς του να παράγει μια ισχυρή κυτταροτοξίνη που ονομάζεται τοξίνη Shiga (STX). Τα *S. flexneri*, *S. boydii* και *S. sonnei* γενικά δεν παράγουν τοξίνη Shiga. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα *Shigella* spp. οδηγούν συνήθως σε ήπια διάρροια. Σε ένα υγιές άτομο, η ασθένεια είναι αυτοπεριοριζόμενη και υποχωρεί ακόμη και χωρίς αντιβιοτική θεραπεία εντός 2 εβδομάδων με από του στόματος επανυδάτωση.

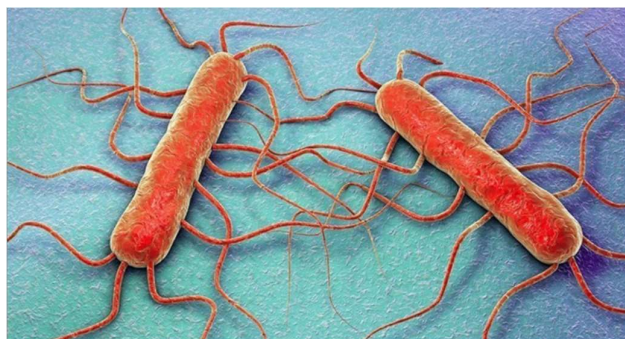
Υπάρχουν όμως και αρκετές περιπτώσεις που τα *Shigella* spp. οδηγούν σε βλεννώδη/αιματώδη διάρροια, η οποία χαρακτηρίζεται από πυρετό, κοιλιακό άλγος και κράμπες, τενεσμούς και την έξοδο αιματηρών, βλεννοειδών κοπράνων [9]. Τα παιδιά (<5 ετών), οι ηλικιωμένοι, οι ανοσοκατεσταλμένοι και άτομα που δεν έχουν πρόσβαση σε επαρκή ιατρική θεραπεία διατρέχουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο αρνητικών εκβάσεων από αυτές τις λοιμώξεις. Το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS) που χαρακτηρίζεται από νεφρική ανεπάρκεια, χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων και ερυθρών αιμοσφαιρίων και ποσοστό θνησιμότητας 35%, η μεταδραστική αρθρίτιδα, όπου οι ασθενείς μπορεί να υποφέρουν από χρόνια αρθρίτιδα των αρθρώσεων για χρόνια μετά το επεισόδιο σιγκέλλωσης καθώς και νευρολογικές επιπλοκές όπως η εγκεφαλοπάθεια είναι πιθανά επακόλουθά μόλυνσης για στελέχη που παράγουν τοξίνες Shiga, [10]. Ένα χαρακτηριστικό που καθιστά τα *Shigellas spp* τόσο ισχυρά και επιτυχημένα ανθρώπινα παθογόνα είναι η χαμηλή μολυσματική δόση που απαιτείται για την πρόκληση ασθένειας. Αυτή η δόση έχει υπολογιστεί ότι είναι μόλις 100 οργανισμοί [11]. Πρόσφατες εκτιμήσεις αποδίδουν στα *Shigellas spp* ότι προκαλεί περίπου 125 εκατομμύρια διαρροϊκά επεισόδια ετησίως [12], οδηγώντας σε περίπου 160.000 θανάτους, με το ένα τρίτο από αυτούς να σχετίζεται με μικρά παιδιά [1]. Τα *Shigella spp*, μαζί με το εντεροτοξιγονικό *Escherichia coli* (*E. coli*), αναγνωρίστηκαν ως τα κυρίαρχα βακτηριακά διαρροϊκά παθογόνα σε παιδιατρικούς πληθυσμούς της Νότιας Ασίας και της υποσαχάριας Αφρικής [13,14]. Με βάση λοιπόν τις μελέτες για τα *Shigella spp* βλέπουμε ότι συμβάλλουν σημαντικά στην παγκόσμια επιβάρυνση της διάρροιας και είναι χωρίς αμφιβολία, δεδομένης της σχετιζόμενης σοβαρότητας της νόσου και της αυξανόμενης μικροβιακής αντοχής, η κύρια βακτηριακή αιτία της παρατεταμένης ενδημικής διάρροιας. Στο 60% όλων των περιπτώσεων, το *S. flexneri* είναι η πιο κοινή αιτία σιγκέλλωσης παγκοσμίως ενώ το *S. sonnei* είναι το πιο διαδεδομένο είδος *Shigella* που συνδέεται με τη διαρροϊκή νόσο στις βιομηχανικές χώρες και αποτελεί σημαντικό αιτία της διάρροιας των ταξιδιωτών [15]. Το *S. boydii* και το *S. dysenteriae* είναι οι λιγότερο συχνοί παράγοντες της σιγκέλλωσης.

## 1.2 Listeria monocytogenes

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα βραχύ (περίπου 0,5  $\mu\text{m}$  σε πλάτος και 1  $\mu\text{m}$  – 1,5  $\mu\text{m}$  σε μήκος), ραβδωτό, προαιρετικά ενδοκυτταρικό - αναερόβιο, δεν σχηματίζει σπόρια, κινητικό (είναι γενικά κινητικό βακτήριο λόγω των περιτριχωδών μαστιγίων σε εύρος θερμοκρασίας 24 °C – 28 °C αλλά μη κινητικά πάνω από 30 °C [16]), θετικό κατά Gram βακτήριο. Προκαλεί μια στενή ζώνη αιμόλυσης στο άγαρ αίματος και είναι θετικό στην καταλάση. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί εξαιρέσεις [17]. Είναι αρνητικό στην οξειδάση, ουρία και ινδόλη και υδρολύει την εσκουλίνη [18]. Έχει επίσης την ικανότητα να ανέχεται συνθήκες αλατιού (NaCl) έως και 20% w/v και αναπτύσσεται σε εύρος pH 4,4–9,6 [19]. Η θερμοκρασία ανάπτυξης για αυτό το βακτήριο κυμαίνεται από -0,4 °C έως 45 °C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 37 °C. Αυτές οι συνθήκες ανάπτυξης συμβάλλουν στην ευελιξία τους να αναπτύσσονται και να επιβιώνουν κάτω από ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες που τίθενται σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων και γίνονται σοβαρό πρόβλημα για τη βιομηχανία τροφίμων [20]. Το γένος *Listeria* αποτελείται από έξι είδη από τα οποία η *Listeria monocytogenes* θεωρείται το μοναδικό παθογόνο είδος που προκαλεί λιστερίωση στον άνθρωπο. Από τους 13 ορότυπους του *Listeria monocytogenes*, το 1/2a, το 1/2b και το 4b ευθύνονται για την πλειοψηφία των κλινικών περιπτώσεων [21].



**Εικόνα 4** *L. monocytogenes*, ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης [22]

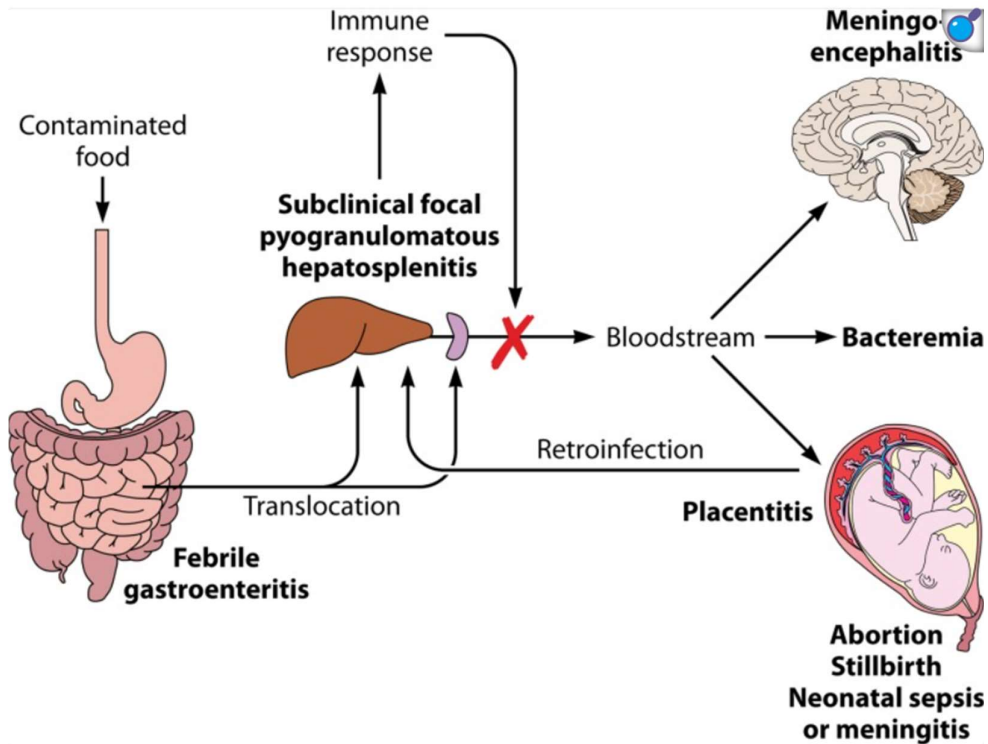


**Εικόνα 5** Το *L. monocytogenes* και τα μαστίγια που διαθέτει [23]

*H Listeria monocytogenes* περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Hülphers το 1910 από το νεκρωτικό ήπαρ ενός κουνελιού στη Σουηδία [24]. Ο Murray απομόνωσε ένα παρόμοιο βακτήριο το 1926 σε κουνέλια και ινδικά χοιρίδια σε ερευνητικά εργαστήρια του Cambridge, [25]. Ένα χρόνο αργότερα (1927), ο Pirie απομόνωσε επίσης ένα βακτήριο που αντιστοιχεί στην περιγραφή που δίνουν οι Hülphers και Murray από άγριους γερβίλους στη Νότια Αφρική [26]. *H Listeria monocytogenes* απομονώθηκε για πρώτη φορά στους ανθρώπους από τον Nyfeldt το 1929 [27]. Αν και αναγνωρίστηκε γρήγορα ως πιθανό ανθρώπινο παθογόνο, μόνο μετά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο άρχισε να θεωρείται ως ένα σημαντικό ανθρώπινο παθογόνο υπεύθυνο για θανατηφόρες λοιμώξεις.

Η τροφιμογενής προέλευσή του αποδείχθηκε επίσημα στα μέσα της δεκαετίας του 1980, στο πλαίσιο των επιδημιολογικών ερευνών μιας μεγάλης εστίας στον Καναδά, η οποία συνδέθηκε με την κατάποση μολυσμένης λαχανοσαλάτας [28]. Η λιστερίωση είναι μια σοβαρή λοίμωξη που συνήθως προκαλείται από την κατανάλωση τροφών μολυσμένων με *L. monocytogenes*. Άλλες πιθανές οδοί μόλυνσης για τον άνθρωπο περιλαμβάνουν την άμεση επαφή με μολυσμένα ζώα. Αν και είναι μια σχετικά σπάνια ασθένεια το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (20–30 %), την καθιστά μια από τις πιο θανατηφόρες τροφικές απειλές [29]. Επηρεάζει γενικά άτομα πολύ μικρής ηλικίας, ηλικιωμένους, έγκυες γυναίκες και ανοσοκατεσταλμένα άτομα, αν και έχουν περιγραφεί περιπτώσεις και σε ανοσοεπαρκείς ενήλικες και παιδιά. Η ανθρώπινη λιστερίωση κυμαίνεται από υποκλινική και μη επιπλεγμένη εμπύρετη γαστρεντερίτιδα έως σοβαρή επεμβατική νόσο [30]. Οι διηθητικές λοιμώξεις από *Listeria monocytogenes* μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 3 κύριες κλινικές μορφές: (i) σχετιζόμενη με την εγκυμοσύνη (πιθανή αποβολή του εμβρύου) και νεογνική λιστερίωση, (ii) βακτηριαιμία ή σηψαιμία και (iii) λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), όπως μηνιγγίτιδα ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, με το καθένα να αντιπροσωπεύει αντίστοιχα 14%, 52% και 31% των περιπτώσεων λιστερίωσης στον άνθρωπο [30, 31].





**Εικόνα 7** Παθοφυσιολογία τροφιμογενούς λιστερίωσης [32]



Μια μεγάλη ποικιλία κλινικών συνδρόμων έχει συσχετιστεί με μόλυνση από *L. monocytogenes* τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους **Πίνακας 2**

## Πίνακας 2

Ορισμένα κλινικά σύνδρομα που σχετίζονται με λοίμωξη από *L. monocytogenes*

Νεογνική μηνιγγίτιδα
Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα σε ενήλικες
Ρομβεγκεφαλίτιδα
Σήψη (βακτηραιμία) σε βρέφη ή ενήλικες
Εγγενής ή προσθετική ενδοκαρδίτιδα βαλβίδας
Αυθόρμητη βακτηριακή περιτονίτιδα
Σηπτική αρθρίτιδα
Νόσος των χοληφόρων οδών
Ηπατίτιδα
Ηπατικό απόστημα
Δερματικές λοιμώξεις (σε εργάτες ζώων)
Ενδοφθαλμίτιδα
Εμπύρετη γαστρεντερίτιδα
Περιτονίτιδα συνεχούς περιπατητικής περιτοναϊκής κάθαρσης
Οστεομυελίτιδα

[33]

Πολλά τρόφιμα έχουν εμπλακεί σε λοιμώξεις από *Listeria monocytogenes* , συμπεριλαμβανομένων μη παστεριωμένων και παστεριωμένων τυριών, παστεριωμένου γάλακτος, βούτυρο, διαφόρων φρούτων και λαχανικών και αρκετά προϊόντα κρέατος όπως φαίνονται στον **Πίνακα 3**

### Πίνακας 3

Ορισμένες τροφές εμπλέκονται σε δημοσιευμένες αναφορές τροφιμογενούς λιστερίωσης

Γαλακτοκομικά προϊόντα	Φρούτα και λαχανικά	Προϊόντα κρέατος	Προϊόντα ψαριών
Παστεριωμένο πλήρες γάλα Σοκολατένιο	Λαχανοσαλάτα (λάχανο)	Ντελικάτέσεν φαγητά (ντελικάτέσεν) Πατέ	Τονοσαλάτα
γάλα Μεξικάνικο τυρί	Μαρούλι Κορνοσαλάτα Ρύζι	Άψητα χοτ ντογκ	Καπνιστό ψάρι
Μαλακό τυρί (διάφοροι τύποι)	Φράουλες	τουρκικά	Σαλάτα με γαρίδες
Σκληρό τυρί	Κανταλούπες Νεκταρίνια	φράγκα «Ριλλέτες»	
Κατσικίσιο τυρί	Αλατισμένα μανιτάρια Μηδική	Χοιρινή γλώσσα σε	
Παγωτό Φρέσκια κρέμα	ταμπλέτες Μήλα βατόμουρα	χοιρινό πίτα Βοδινό Ζελέ	
	Πέτρινα φρούτα λαχανάκια	χοιρινό Μαγειρεμένο	
		ζαμπόν Γράσο φουά Βόδι	
		Γλώσσα Μη μαγειρεμένο	
		κοτόπουλο	

[33]

Τα τρόφιμα που εμπλέκονται σε τροφιμογενείς λοιμώξεις είναι συνήθως πολύ μολυσμένα ( $>10^9$  CFU/g *L. monocytogenes*). Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) εφαρμόζει πολιτική μηδενικής ανοχής για το *L. monocytogenes* στα προγράμματα δειγματοληψίας της βιομηχανίας. Άλλες χώρες έχουν υιοθετήσει λιγότερο αυστηρές κατευθυντήριες γραμμές, επιτρέποντας μια μικρή ποσότητα μόλυνσης από *L. monocytogenes* ( $<10^2$  CFU/g) προσπαθώντας να επιτύχει μια ισορροπία μεταξύ της προστασίας της δημόσιας υγείας και της άσκοπης ενοχοποίησης των κατά τα άλλα βρώσιμων προϊόντων διατροφής. Ενώ η διεισδυτική λιστερίωση μπορεί να είναι πιο συχνή σε ορισμένες χώρες της Ευρώπης από ό,τι στις Ηνωμένες Πολιτείες, δεν είναι σαφές εάν αυτές οι διαφορές μπορούν να αποδοθούν σε λιγότερο αυστηρά πρότυπα στην

Ευρώπη που επιτρέπουν περισσότερη *L. monocytogenes* στην παροχή τροφίμων. Η συζήτηση συνεχίζεται μεταξύ των υποστηρικτών της μηδενικής ανοχής και εκείνων που υποστηρίζουν μια προσέγγιση αξιολόγησης κινδύνου για τη μόλυνση των τροφίμων από *L. monocytogenes*. Το πρωτοποριακό έργο στον τομέα πρόληψης αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1980 από το γαλλικό εργαστήριο αναφοράς *Listeria*, που ιδρύθηκε αρχικά από τους Audurier et al. με βάση τον τύπο φάγου των απομονώσεων. Στις ΗΠΑ, το Foodborne Disease Active Surveillance Network (FoodNet) εφαρμόζει εργαστηριακή επιτήρηση στην επιδημιολογία της *Listeria* από το 1996. Το FoodNet περιλαμβάνει το CDC, την Υπηρεσία Ασφάλειας και Επιθεώρησης Τροφίμων του Υπουργείου Γεωργίας των ΗΠΑ (USDA-FSIS) και την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA). Το USDA-FSIS και η FDA είναι υπεύθυνα για τη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων μέσω κανονισμών στην επεξεργασία τροφίμων για την πρόληψη της μόλυνσης από *Listeria*. Το 2002, η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) ίδρυσε την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), η οποία, μεταξύ άλλων, αξιολογεί τους κινδύνους που ενέχει η *L. monocytogenes* παρακολουθώντας τον επιπολασμό και τα επίπεδα του παθογόνου στα τρόφιμα, και συμβουλεύει για μέτρα ελέγχου.

## 1.3 Επιδημιολογικά δεδομένα

### 1.3.1 Shigella spp.

Η σιγκέλλωση εμφανίζεται παγκοσμίως, σε ενδημικές και επιδημικές μορφές. Η πλειονότητα των περιπτώσεων είναι παιδιά <5 ετών. Ο ετήσιος αριθμός επεισοδίων σιγκέλλωσης σε όλο τον κόσμο εκτιμάται ότι είναι 164,7 εκατομμύρια, με το 69% όλων των επεισοδίων και το 61% όλων των θανάτων να αποδίδονται στη σιγκέλλωση που αφορούν παιδιά ηλικίας <5 ετών [34].

Η σιγκέλλωση είναι η τρίτη πιο συχνή εντερική βακτηριακή λοίμωξη στις Ηνωμένες Πολιτείες με 500.000 λοιμώξεις, 6.000 νοσηλεία και 70 θανάτους κάθε χρόνο [35]. Η επιδημιολογία των διαφόρων ειδών *Shigella* ποικίλλει. Το *S. flexneri* είναι πιο κοινό στις αναπτυσσόμενες χώρες [36], ενώ το *S. sonnei* είναι πιο κοινό στις ανεπτυγμένες χώρες [37,38]. Ο *S. dysenteriae* είναι λιγότερο κοινός στις ανεπτυγμένες χώρες, ωστόσο είναι συχνά αιτία εστιών στην υποσαχάρια Αφρική και τη Νότια Ασία [39]. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από το *S. boydii* είναι σχετικά σπάνιες παγκοσμίως [39]. Υπάρχει μια αναδυόμενη παγκόσμια τάση του *S. sonnei* να αντικαθιστά το *S. flexneri* σε περιοχές αναπτυσσόμενων χωρών που παρουσιάζουν οικονομική ανάπτυξη και βελτίωση της υγιεινής, όπως το Βιετνάμ [40] και το Μπαγκλαντές [41].

Ο *S. sonnei* προκάλεσε δύο μεγάλα κρούσματα στην Καλιφόρνια το 2014 και το 2015. Το πρώτο ξέσπασμα στις περιοχές του Σαν Ντιέγκο και του Σαν Χοακίν προκλήθηκε από στελέχη που παράγουν την τοξίνη Shiga [42].

Ένα άλλο ξέσπασμα του *S. sonnei* εμφανίστηκε εντός του ίδιου χρονικού πλαισίου αλλά προκλήθηκε από ένα στέλεχος *S. sonnei* αρνητικό για την τοξίνη Shiga και περιορίστηκε κυρίως στην περιοχή του κόλπου του Σαν Φρανσίσκο [43].

Επίσης αναφερθεί αρκετές επιδημίες από πολλές ασιατικές χώρες όπως το Μπαγκλαντές (1972-1978, 2003), η Σρι Λάνκα (1976), οι Μαλδίβες (1982), το Νεπάλ (1984-1985), το Μπουτάν (1984-1985) και η Μιανμάρ (1984-1985). ) [44,45,46,47].

Στην Ινδία, έχουν αναφερθεί επιδημίες από τη νότια Ινδία, Vellore (1972-1973, 1997-2001) [48,49], ανατολική Ινδία (1984) [50,51], βόρεια Ινδία [52]. Στο ξέσπασμα του 1984 στη Δυτική Βεγγάλη και στην Τριπούρα, προσβλήθηκαν 3.50.000 άνθρωποι με 3.500 θανάτους [51]. Όλα αυτά τα κρούσματα οφείλονταν στον ορότυπο 1 του *S. dysenteriae*.

Το 2007, σε δήμο της Δυτικής Βεγγάλης, οι ορότυποι 2α και 3α του *S. flexneri* προκάλεσαν ξέσπασμα που επηρέασαν 461 άτομα. Οι πηγές που σχετίζονται με την ασθένεια ήταν το πόσιμο, το πλύσιμο των σκευών και το μπάνιο σε νερό βρύσης μολυσμένο με *Shigella* [53].

Στην Κεράλα της νότιας Ινδίας περισσότεροι από 300 άνθρωποι υπέφεραν το 2009, όπου τα τοπικά τρόφιμα από ρύζι, φακές, γάλα και νερό ενοχοποιήθηκαν ως πηγή μετάδοσης του *S. sonnei* [54].

Στη Μαχαράστρα το 2010, περίπου 150 άτομα έπασχαν από σιγκέλλωση αφού έφαγαν σε ένα θρησκευτικό μέρος (Madrasa) [54].

Η σιγκέλλωση είναι επίσης σημαντικός παράγοντας της διαρροϊκής νόσου σε ταξιδιώτες από τον ανεπτυγμένο στις αναπτυσσόμενες χώρες. Σύμφωνα με εκτίμηση, 15-20 εκατομμύρια ταξιδιώτες στις αναπτυσσόμενες χώρες εμφανίζουν διάρροια ετησίως [55]. Από τις 64.039 εντερικές λοιμώξεις που αναφέρθηκαν στο FoodNet με πληροφορίες για ταξίδια, οι 8270 (13%) σχετίζονταν με ταξίδια και μεταξύ των βακτηριακών παραγόντων, η *Shigella* (13%) ήταν η τρίτη πιο συχνή, μετά το *Campylobacter* (42%) και τη μη τυφοειδής *Σαλμονέλα* (32%).

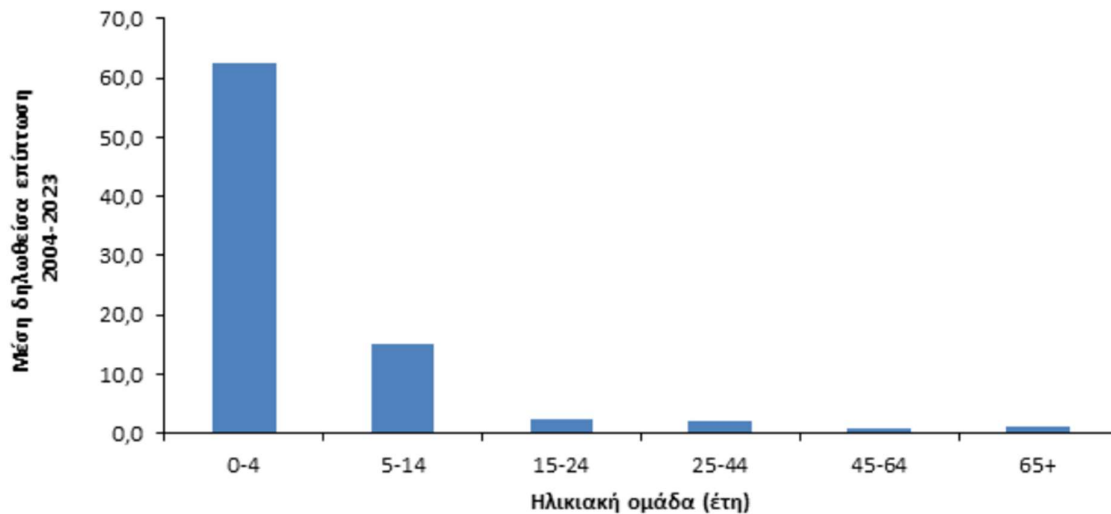
Στην Ελλάδα τα επιδημιολογικά δεδομένα για την σιγκέλλωση σύμφωνα με τον ΕΟΔΥ για το διάστημα 2004-2023 είναι χαμηλή. Ο αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων και δηλωθείσα επίπτωση σιγκέλλωσης στην Ελλάδα φαίνεται στον **Πίνακα 4**

**Πίνακας 4**

Έτος	Αριθμός κρουσμάτων	Ετήσια δηλωθείσα επίπτωση (ανά 1.000.000 πληθυσμού)
2004	61	5,6
2005	26	2,4
2006	28	2,5
2007	48	4,3
2008	19	1,7
2009	38	3,4
2010	33	3,0
2011	47	4,2
2012	91	8,2
2013	120	10,9
2014	90	8,2
2015	79	7,3
2016	74	6,9
2017	80	7,4
2018	78	7,2
2019	105	9,8
2020	62	5,8
2021	26	2,4
2022	67	6,3
2023	62	6,0
<b>Σύνολο</b>	<b>1.235</b>	<b>5,7*</b>

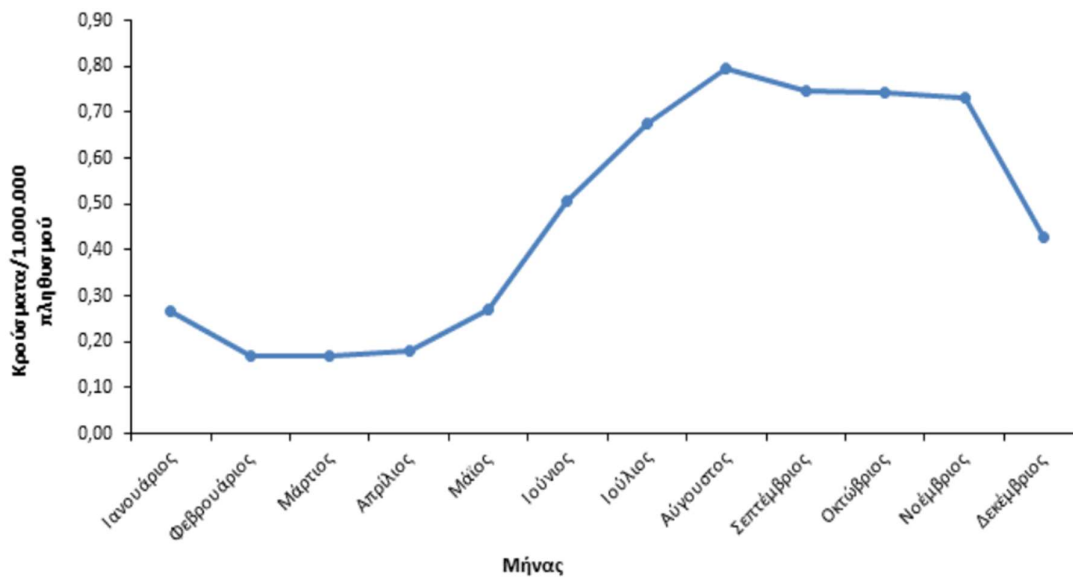
Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων και δηλωθείσα επίπτωση σιγκέλλωσης στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων 2004-2023

Για το διάστημα 2004-2023, το νόσημα παρουσίασε υψηλότερη μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση στην ηλικιακή ομάδα 0-4 έτη (62,6 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού) και στην ηλικιακή ομάδα 5-14 έτη (15,1 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού) όπως φαίνεται παρακάτω



**Εικόνα 8** Μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση (αριθμός κρουσμάτων/ 1.000.000 πληθυσμού) της σιγέλλωσης στην Ελλάδα ανά ηλικιακή ομάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, 2004-2023.

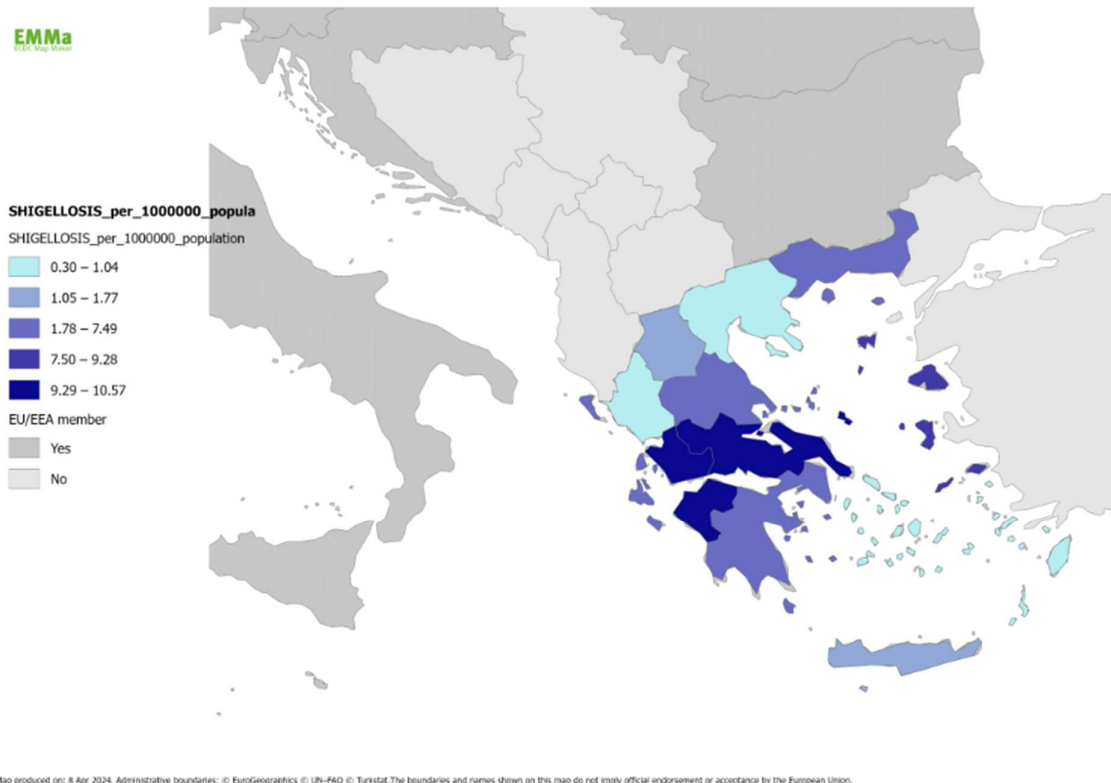
Το ίδιο διάστημα, η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση του νοσήματος δεν παρουσίασε διαφορά μεταξύ των φύλων (άνδρες: 5,9 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού, γυναίκες: 5,4 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού). Η μέση μηνιαία δηλούμενη επίπτωση του νοσήματος για το διάστημα 2004-2023, ήταν μεγαλύτερη τους καλοκαιρινούς μήνες, παρουσίαζε κορύφωση τον Αύγουστο παραμένοντας υψηλή και τους φθινοπωρινούς μήνες.



**Εικόνα 9** Μέση μηνιαία δηλούμενη επίπτωση (αριθμός κρουσμάτων/1.000.000 πληθυσμού) της σιγκέλλωσης στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων 2004-2023

Η μεγαλύτερη μέση δηλούμενη επίπτωση του νοσήματος για τα έτη 2004-2023 παρατηρήθηκε στην περιφέρεια Δυτικής Ελλάδας με 10,6 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού και η μικρότερη στο Νότιο Αιγαίο με 0,3 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού.





**Εικόνα 10** Μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση (κρούσματα/1.000.000 πληθυσμού) της σιγκέλλωσης ανά περιφέρεια στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων 2004-2023

Τα συχνότερα δηλωθέντα είδη των παθογόνων *Shigella* spp. για την περίοδο 2004-2023 ήταν το *S. flexneri* και το *S. sonnei*, ενώ τη μικρότερη συχνότητα δήλωσης είχε το *S. Dysenteriae* όπως φαίνεται στον **Πίνακα 5**

**Πίνακας 5**

	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. dysenteriae</i>	Άγνωστο	Σύνολο
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
2004	19 (31)	13 (21)	1 (2)	0 (0)	28 (46)	61 (100)
2005	8 (30)	11 (42)	1 (4)	0 (0)	6 (24)	26 (100)
2006	4 (15)	2 (7)	1 (4)	0 (0)	20 (74)	27 (100)
2007	4 (8)	23 (49)	0 (0)	0 (0)	20 (43)	47 (100)
2008	7 (50)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	6 (43)	14 (100)
2009	17 (50)	1 (3)	1 (3)	0 (0)	15 (44)	34 (100)
2010	17 (63)	2 (8)	0 (0)	2 (7)	6 (22)	27 (100)
2011	16 (37)	1 (2)	1 (2)	0 (0)	26 (59)	44 (100)
2012	27 (30)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	63 (69)	91 (100)
2013	54 (49)	27 (25)	0 (0)	1 (1)	28 (25)	110 (100)
2014	37 (43)	19 (22)	1 (1)	0 (0)	30 (34)	87 (100)
2015	45 (61)	18 (24)	4 (5)	2 (3)	5 (7)	74 (100)
2016	29 (41)	12 (17)	4 (6)	0 (0)	25 (36)	70 (100)
2017	25 (33)	31 (41)	1 (1)	0 (0)	18 (24)	75 (100)
2018	25 (39)	21 (32)	2 (3)	0 (0)	17 (26)	65 (100)
2019	40 (38)	33 (31)	2 (2)	0 (0)	30 (29)	105 (100)
2020	14 (23)	11 (18)	11 (18)	0 (0)	26 (42)	62 (100)
2021	9 (35)	1 (4)	3 (11)	0 (0)	13 (50)	26 (100)
2022	28 (42)	2 (3)	4 (6)	1 (1)	32 (48)	67 (100)
2023	16 (26)	4 (7)	0 (0)	0 (0)	42 (68)	62 (100)

Κατανομή συχνοτήτων των ειδών *Shigella* spp. στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων & Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών, Σιγκελλών, δονακιών χολέρας, Λιστέριας και λοιπών εντεροπαθογόνων, 2004-2023.

### 1.3.2 Listeria monocytogenes

Η πρώτη αποδεδειγμένη τροφογενής εστία εμφανίστηκε στη Νέα Σκωτία του Καναδά, που αφορούσε 7 ενήλικες και 34 περιγεννητικά περιστατικά, που σχετίζονται με την κατανάλωση μολυσμένης λαχανοσαλάτας το 1980 και προκλήθηκε από την κατάποση μολυσμένης λαχανοσαλάτας [28]. Στη συνέχεια, πολλά άλλα τρόφιμα έχουν εμπλακεί σε μικρές και μεγάλες επιδημίες, συμπεριλαμβανομένων μη παστεριωμένων και παστεριωμένων τυριών, παστεριωμένου γάλακτος, βούτυρο, διαφόρων φρούτων και λαχανικών και αρκετά προϊόντα κρέατος.

Το 1997, μια σοβαρή εστία *Listeria* που σχετίζεται με κονσερβοποιημένο καλαμπόκι μολυσμένο από *L. monocytogenes* εμφανίστηκε σε δύο δημοτικά σχολεία και ένα πανεπιστήμιο στην Ιταλία. Τα κύρια συμπτώματα σε αυτό το ξέσπασμα ήταν η εμπύρετη ασθένεια και η γαστρεντερίτιδα. Ένας μεγάλος αριθμός ατόμων (2930 συνολικά) ανέπτυξαν εμπύρετη γαστρεντερίτιδα. Η έρευνα για αυτό το περιστατικό έδειξε ότι τα συμπτώματα εμφανίστηκαν μετά από κατανάλωση φαγητού που προμήθευε η ίδια επιχείρηση εστίασης [56].

Μια μεγάλη εστία λιστερίωσης με περισσότερα από 900 κρούσματα και 200 θανάτους αναφέρθηκε από τη Νότια Αφρική το 2017-2018. Η πηγή ήταν ένα μολυσμένο επεξεργασμένο κρέας που ονομαζόταν «roloony» [57].

Στις ΗΠΑ, το 2011 ολόκληρα πεπόνια από ένα μόνο αγρόκτημα συσχετίστηκαν με μια μεγάλη, πολυπολιτειακή ( 28 πολιτείες ) επιδημία λιστερίωσης. Στην επιδημία αυτή προσβλήθηκαν 147 άτομα από τα οποία 33 πέθαναν.

Την ίδια χρονιά, ένα άλλο ξέσπασμα που σχετίζεται με το μαρούλι romaine καταγράφηκε σε 19 πολιτείες των ΗΠΑ. Σε αυτό το ξέσπασμα, 84 αρρώστησαν και από αυτούς, 15 πέθαναν.

Ένα ξέσπασμα λιστερίωσης που σχετίζεται με μήλα καραμέλας σημειώθηκε τον Δεκέμβριο του 2014 στις ΗΠΑ. Το τρόφιμο για αυτό το ξέσπασμα ήταν προσυσκευασμένα καραμελωμένα μήλα. Οι δοκιμές επιβεβαίωσαν ότι η προέλευση αυτής της επιδημίας ήταν από τις εγκαταστάσεις συσκευασίας μήλων της εταιρείας.

Συνολικά, 35 άτομα, συμπεριλαμβανομένων 11 εγκύων, μολύνθηκαν από το *L. monocytogenes* σε 12 πολιτείες. Μία από τις μολυσμένες έγκυες απέβαλε. Επτά από τα 35 άτομα που μολύνθηκαν πέθαναν κατά τη διάρκεια της επιδημίας [ 59].

Ο **Πίνακας 6** παρακάτω παρέχει μια περίληψη πολλών εστιών που προκαλούνται από φρέσκα φρούτα και λαχανικά από το 1979.

**Πίνακας 6**

Outbreak Location/Year	Deaths/Cases (% Mortality)	Food Vehicle	References
Boston, USA, 1979	3/20 (15)	Raw vegetables	Ho et al. [56]
Nova Scotia, Canada, 1981	17/41 (41)	Vegetable mix for coleslaw	Schlech et al. [57]
Moncalieri and Giaveno, Italy, 1997	0/2930 (0)	Corn	Aureli et al. [13]
Texas, USA, 2010	5/10 (50)	Chopped celery	Gaul et al. [30]
Colorado, USA, 2011	33/147 (22)	Whole cantaloupes	CDC [54]
Colorado, USA, 2011	15/99 (15)	Lettuce	Shrivastava et al. [55]
Illinois and Michigan, USA, 2014	2/5 (40)	Mung bean sprouts	Garner and Kathariou [58]
California, USA, 2014	1/32 (3)	Caramel apples	CDC [5]
Ohio, USA, 2016	1/19 (5)	Packaged salads	CDC [50]

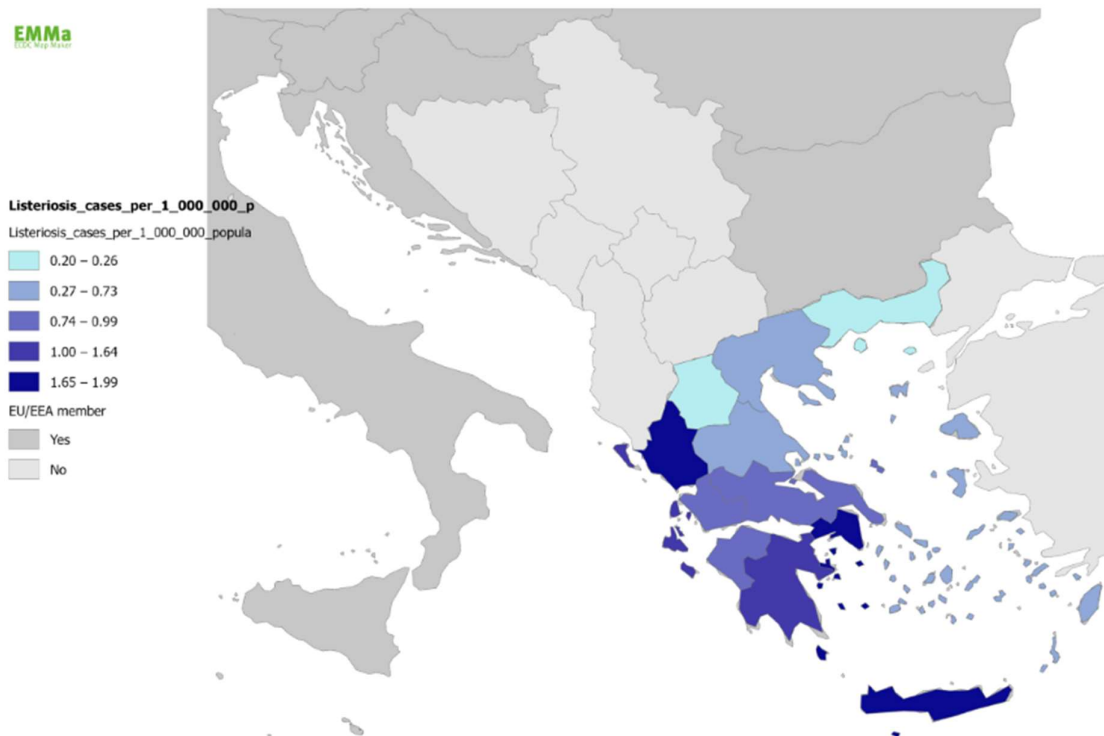
[58]

Συνολικά, το διάστημα 2004-2023 δηλώθηκαν στην Ελλάδα 266 κρούσματα λιστερίωσης σύμφωνα με τον ΕΟΔΥ. Ο μέσος ετήσιος αριθμός των κρουσμάτων ήταν 13,3. Η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση ήταν 1,23 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού. Τα έτη 2015 και 2023 παρατηρήθηκε αύξηση των δηλωθέντων κρουσμάτων λιστερίωσης (3,0 κρούσματα/1.000.000 πληθυσμού και τα δύο έτη). Ο αριθμός των δηλωθέντων κρουσμάτων, καθώς και η επίπτωση της λιστερίωσης κατ' έτος για το χρονικό διάστημα 2004-2023 παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**

Έτος	Αριθμός Κρουσμάτων	Ετήσια επίπτωση (ανά 1.000.000 πληθυσμού)
2004	3	0,3
2005	8	0,7
2006	7	0,6
2007	10	0,9
2008	1	0,1
2009	4	0,4
2010	10	0,9
2011	10	0,9
2012	11	1,0
2013	10	0,9
2014	10	0,9
2015	33	3,0
2016	20	1,9
2017	21	2,0
2018	19	1,8
2019	10	0,9
2020	20	1,9
2021	21	2,0
2022	7	0,7
2023	31	3,0
<b>Σύνολο</b>	<b>266</b>	<b>1,2*</b>

**Πίνακας 7.** Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων και επίπτωση της λιστερίωσης στην Ελλάδα κατ' έτος, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, 2004-2023.

Η μέση μηνιαία δηλούμενη επίπτωση της λιστερίωσης για τη χρονική περίοδο 2004-2023 ήταν αυξημένη την άνοιξη, με κορύφωση το Μάρτιο και μειωνόταν σταδιακά τους επόμενους μήνες. Η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση της λιστερίωσης για τα έτη 2004-2023 ανά περιφέρεια απεικονίζεται στην **Εικόνα 11**. Η υψηλότερη επίπτωση παρατηρήθηκε στην περιφέρεια Κρήτης (2,0 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού) και η χαμηλότερη στην περιφέρεια Δυτικής Μακεδονίας (0,2 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού).



**Εικόνα 11** Μέση ετήσια επίπτωση της λιστερίωσης ανά περιφέρεια της χώρας (κρούσματα/1.000.000 κατοίκους), Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, 2004-2023.

Στο σύνολο των δηλωθέντων κρουσμάτων, 141 (53,0%) ήταν ανοσοκατεσταλμένα άτομα, 10 (3,8%) ήταν εγκυμονούσες και 11 (4,1%) ήταν νεογνά. Σε 4 (1,5%) περιπτώσεις, επήλθε αυτόματη αποβολή και σε 8 (3,0%) πρόωρος τοκετός. Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα, στο σύνολο των κρουσμάτων με γνωστή έκβαση (n=246), καταγράφηκαν 59 θάνατοι (24,0%).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ**

#### **2.1 Μέθοδοι που βασίζονται σε καλλιέργειες**

Πολλές μικροβιολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούνταν επί δεκαετίες στη βιομηχανία τροφίμων για τον εντοπισμό βακτηρίων. Οι μέθοδοι αυτές έχουν σχεδιαστεί ώστε να γίνεται η ανίχνευση ενός μοναδικού κυττάρου-στόχου σ' ένα δείγμα. Η νομοθεσία τόσο στην Ευρωπαϊκή Ένωση όσο και στις ΗΠΑ βασίζεται σε μεθόδους που στηρίζονται σε τεχνικές καλλιέργειας. Η καλλιεργητική μέθοδος είναι μια από τις παλαιότερες τεχνικές που ανιχνεύει την ύπαρξη τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα που έχουν μολυνθεί. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί στα τρόφιμα ενδέχεται να υποστούν τραυματισμό από διάφορους παράγοντες (υψηλή θερμοκρασία, ψύξη, άλατα, διάφορες χημικές ουσίες ή φυτικές αντιμικροβιακές ενώσεις [60]). Επίσης τα βακτήρια για διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες που δεν τα ευνοούν μπορούν να εισέλθουν σε μια κατάσταση που είναι μεν βιώσιμα αλλά όχι πλέον καλλιεργήσιμα (Viable But Non-Culturable, VBNC) στα συνήθη καλλιεργητικά μέσα [61]. Λόγω αυτών των τραυματισμών και της κατάστασης VBNC, η πρακτική ανίχνευσης χωρίζεται σε μια διαδικασία εμπλουτισμού δύο βαθμίδων.



- ❖ τον προ-εμπλουτισμό σε ένα μη ή ημι-επιλεκτικό μέσο που επαναφέρει τους τραυματισμένους οργανισμούς-στόχους με αποτέλεσμα να τους αυξάνει ενώ συγχρόνως αραιώνει τις ανασταλτικές ενώσεις και ενυδατώνει τα βακτηριακά κύτταρα που προέρχονται από αποξηραμένα ή επεξεργασμένα τρόφιμα.
- ❖ εμπλουτισμός σε εκλεκτικό μέσο που αυξάνει την συγκέντρωση του οργανισμού-στόχου επιλεκτικά επιτρέποντας την ανίχνευση του [62].

Οι πιθανές αποικίες απομονώνονται σε επιλεκτικό άγαρ και επιβεβαιώνονται με τη βοήθεια πρόσθετων μορφολογικών, βιοχημικών, φυσιολογικών και/ή ορολογικών ελέγχων. Μπορεί να χρειαστούν έως και 4 ημέρες για ένα αρνητικό ή θετικό αποτέλεσμα (την ανίχνευση τυπικών αποικιών του παθογόνου μέσα στο μέσο), ενώ η περαιτέρω επιβεβαίωση ενός θετικού αποτελέσματος μπορεί να χρειαστεί μια εβδομάδα ακόμη [61, 62]. Αρκετές καλλιεργητικές μέθοδοι έχουν τροποποιηθεί ώστε να είναι ταχύτερες και πολύ λιγότερο επίπονες. Με την χρήση φθοριογόνου ή χρωμογόνου υποστρώματος σε επιλεκτικά μέσα αποφεύγεται η ανάγκη για υποκαλλιέργειες και περαιτέρω βιοχημικές εξετάσεις για την ταυτοποίηση του παθογόνου-στόχου [63]. Οι καλλιεργητικές μέθοδοι χρειάζονται αρκετό εξοπλισμό, προκειμένου να εξασφαλισθεί ότι οι καλλιέργειες θα αναπτυχθούν άρτια και ότι τα δεδομένα που θα προκύψουν μπορούν να ερμηνευθούν ορθά. Παρά το μικρό κόστος, την ευαισθησία και την επιλεκτικότητα με χρωμογόνα, οι μέθοδοι που βασίζονται σε καλλιέργειες και αποικίες απαιτούν χρόνο και παράμετροι όπως ο χαμηλός αριθμός παθογόνων μικροοργανισμών, και η άνιση κατανομή τους στα τρόφιμα κάνουν τις μεθόδους αυτές επίπονες. Επίσης οι μικροβιακές επιμολύνσεις, κατά την διάρκεια αυτών των μεθόδων μπορούν να παρεμποδίσουν το σχηματισμό παθογόνων μικροοργανισμών. [64].



## 2.2 Ανοσολογικές μέθοδοι

Τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες, είναι πρωτεΐνες που συντίθενται από έναν οργανισμό ως απάντηση στην παρουσία οιασδήποτε ξένης ουσίας στο εσωτερικό του. Αντιγόνο ονομάζεται κάθε ξένο στοιχείο, ικανό να προκαλέσει την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αντισωμάτων. Το κάθε αντίσωμα διαθέτει ειδική συγγένεια για το εκάστοτε αντιγόνο. Η ποιοτική/ποσοτική ανίχνευση των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών με τη χρήση ανοσολογικών μεθόδων στηρίζεται στην αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Στην περίπτωση αυτή ένα συγκεκριμένο αντιγόνο συνδέεται με ένα συγκεκριμένο αντίσωμα, μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό. [83]. Η ανοσοδοκιμασία συνδεδεμένη με ένζυμο (ELISA), η ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής, και η μέθοδος western blot αποτελούν κομμάτι από τις μεθόδους που στηρίζονται στην ανοσολογία, οι οποίες εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων στα τρόφιμα.

### 2.2.1 Δοκιμασία Ανοσοπροσρόφησης Συνδεδεμένη με Ένζυμο ( Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

Οι Berson και Yalow ήταν οι πρώτοι που ανέπτυξαν μια ανοσοδοκιμασία, γνωστή ως Ραδιοανοσοπροσδιορισμός (Radio Immuno Assay, RIA), για την ανίχνευση ενδογενούς ινσουλίνης πλάσματος [ 66], μια εξέλιξη για την οποία ο Yalow τιμήθηκε με το Νόμπελ Φυσιολογίας το 1977. Ακόμη και σήμερα, οι ανοσοδοκιμασίες χρησιμοποιούνται ευρέως με ορισμένες τροποποιήσεις από το αρχικά προτεινόμενο σύστημα. Οι τροποποιήσεις αφορούν την αντικατάσταση των ραδιοϊσοτόπων <sup>125</sup>I με ένζυμα λόγω ανησυχιών για την ασφάλεια σχετικά με τη χρήση ραδιενέργειας, και πλέον

η ανοσοδοκιμασία αναφέρεται ως ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA).

Η τεχνική της ELISA αξιοποιεί τη μοναδική σχέση “κλειδί-κλειδαριάς” μεταξύ αντισώματος και αντιγόνου επιτρέποντας την εξαιρετικά ευαίσθητη και επιλεκτική ποσοτική/ποιοτική ανάλυση αντιγόνων, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, πεπτιδίων, νουκλεϊκών οξέων, ορμονών κ.α. ακόμα και σε πολύ μικρές ποσότητες δείγματος.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά με σκοπό να προσδιοριστούν τα επίπεδα IgG σε ορό κουνελιών. Στο ίδιο έτος οι επιστήμονες κατάφεραν να πραγματοποιήσουν τον ποσοτικό προσδιορισμό της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης στα ούρα με τη χρήση υπεροξειδάσης του χρένου. Από τότε η μέθοδος ELISA έχει πλήθος εφαρμογών. Αποτελεί μια από τις πλέον συνηθισμένες τεχνικές για διάγνωση και εργαστηριακή ερευνά παγκοσμίως. Αρχικά η μεθοδολογία ELISA περιελάμβανε τη χρήση χρωμογόνων μορίων-ενζύμων και των αντίστοιχων υποστρωμάτων τους για την παραγωγή παρατηρήσιμης αλλαγής χρώματος, ανάλογης της παρουσίας-συγκέντρωσης του αντιγόνου. Σήμερα, η πρόοδος της ELISA οδήγησε σε εναλλακτικούς ανιχνευτές οι οποίοι μπορούν να παράγουν σήμα φθορισμού ή ηλεκτροχημικό.

Μια πρόσφατη εξέλιξη που έλαβε χώρα το 2012, αφορά μια αρκετά ευαίσθητη μέθοδο ELISA στηριζόμενη στο ένζυμο που μπορεί να χειριστεί νανοσωματίδια σαν χρωμογόνα. Η συγκεκριμένη τεχνική έχει τη δυνατότητα παραγωγής έγχρωμου σήματος, το οποίο είναι ορατό με γυμνό μάτι. Συγκεκριμένα το μπλε χρώμα υποδεικνύει θετικά αποτελέσματα και το κόκκινο υποδεικνύει τα αρνητικά αποτελέσματα. Παρόλα αυτά η εν λόγω τεχνική είναι ποιοτική και όχι ποσοτική. Μπορεί να προσδιορίσει την ύπαρξη ή όχι ενός αναλυτή αλλά όχι και τα επίπεδα συγκέντρωσης του. Η ELISA πραγματοποιείται σε ειδικές πλάκες πολυστερινίου μικροτιτλοδότησης 96 πηγαδίων (96-well plates) ο πυθμένας των οποίων έχει την ιδιότητα να δεσμεύει πολύ ισχυρά τις πρωτεΐνες.

Τα βασικά βήματα της μεθόδου είναι τέσσερα και περιλαμβάνουν:

- i) την μονιμοποίηση στον πυθμένα των πηγαδιών του αντιγόνου ή του αντισώματος
- ii) το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων της επιφάνειας της πλάκας μικροτιτλοδότησης με διάλυμα πρωτεΐνης μεγάλου μοριακού βάρους, όπως η πρωτεΐνη ορού βοός (bovine serum albumin – BSA)
- iii) την ανίχνευση του αναλύτη
- iv) την τελική ανάγνωση του αποτελέσματος [67, 68]

Η ανίχνευση πραγματοποιείται με την προσθήκη του υποστρώματος και την παραγωγή προϊόντων που δημιουργούν ορατό χρώμα. Στην ELISA χρησιμοποιούνται αρκετά υποστρώματα με συνηθέστερα την υπεροξειδάση του χρένου (horseradish peroxidase – HRP) [69], την αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase – ALP) [70], και την β-γαλακτοσιδάση [71, 72, 73].

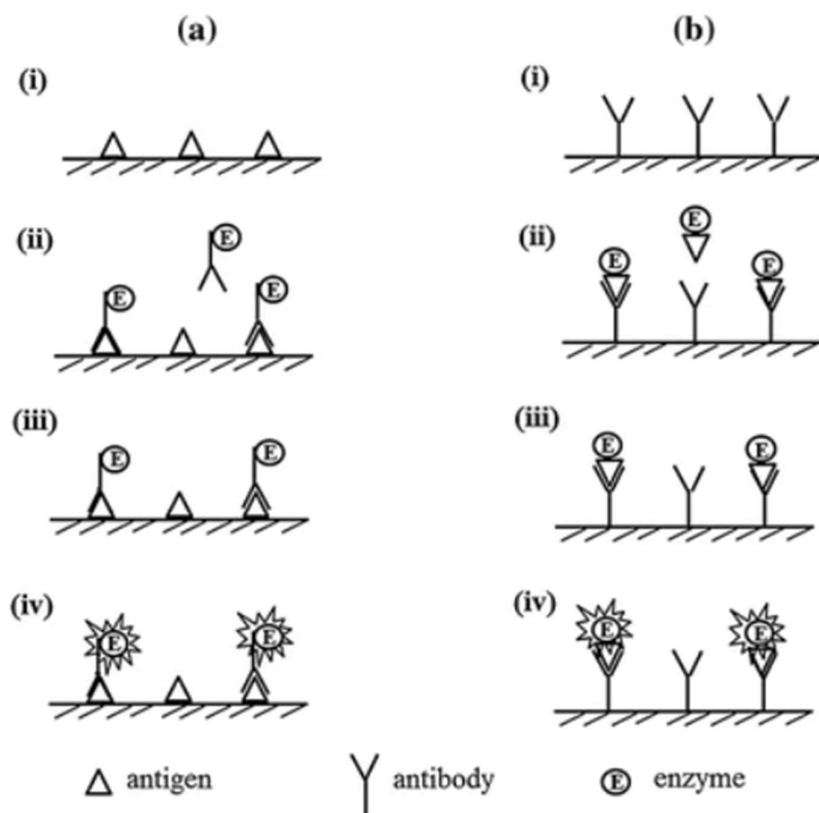
<u>Ένζυμο</u>	<u>Είδος ενζύμου</u>	<u>Χρωμογόνα υποστρώματα</u>	<u>Συντόμευση</u>	<u>Μήκος κύματος (nm)</u>
<b>Υπεροξειδάση (HRP)</b>	Οξειδάση	2,2-άζινο δις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ	ABTS	415
		3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη	TMB	450
		ορθό-φαινυλενοδιαμίνη	OPD	492
<b>Αλκαλική φωσφατάση (ALP)</b>	Υδρολάση	π-φωσφορική νιτροφαινόλη	pNPP	405
<b>β-γαλακτοσιδάση (β-GAL)</b>	Υδρολάση	ο-νιτροφαινυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη	Onpg	420
		Ερυθρό χλωροφαινόλης-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης	CPRG	571

**Πίνακας 8** βασικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο ELISA και τα υποστρώματα τους

Μεταξύ των τεσσάρων βασικών βημάτων πραγματοποιείται πλύσιμο με την προσθήκη ρυθμιστικού πλυστικού διαλύματος που περιέχει φωσφορικά άλατα και μη ιονικά απορρυπαντικά προκειμένου να απομακρυνθούν τα μη δεσμευμένα σωματίδια ανάλογα με τις συστάσεις του κάθε πρωτοκόλλου [68]. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι ELISA, όπως η άμεση, η έμμεση, η σάντουιτς και η ανταγωνιστική ELISA.

#### **2.2.1.1. Άμεση ELISA**

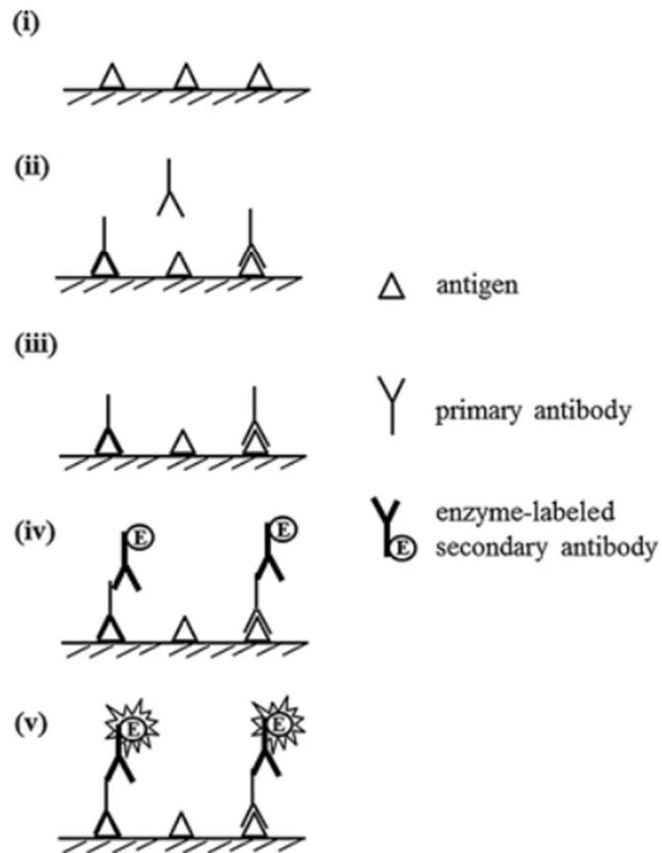
Το 1971, οι Engvall και Perlmann [74] και οι Van Weemen και Schuurs [75] ήταν οι πρώτοι που ανέπτυξαν την άμεση ELISA, που ήταν το βασικό στυλ για άλλους τύπους ELISA. Κυρίως, ένα αντιγόνο ή ένα αντίσωμα ακινητοποιείται στην επιφάνεια της πλάκας μικροτιτλοδότησης και τα οποία επωάζονται για μια ώρα στους 37°C. Μετά ακολουθεί το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων της επιφάνειας της πλάκας μικροτιτλοδότησης με διάλυμα πρωτεΐνης μεγάλου μοριακού βάρους, (π.χ. λευκωματίνη, ζελατίνη, καζεΐνη και αποβουτυρωμένο γάλα [76]) για να αποφευχθεί η μη ειδική προσρόφηση άλλων πρωτεϊνών, το αντίστοιχο επισημασμένο με ένζυμο αντίσωμα ή αντιγόνο αφήνεται να αντιδράσει με τους ακινητοποιημένους στόχους. Προσθέτουμε τα κατάλληλα υποστρώματα. Για την ανάπτυξη χρώματος. Με αυξανόμενο αριθμό στόχων, το σήμα αυξάνεται. Η άμεση ELISA είναι κατάλληλη για την ποιοτική ανάλυση μακρομορίων. Είναι απλή, γρήγορη και ολοκληρώνεται σε μία φάση. Μπορεί να είναι χρονοβόρα κατά την εκτέλεση πολλαπλών πειραμάτων, είναι λιγότερο ειδική γιατί χρησιμοποιεί μόνο 1 αντίσωμα και έχει μεγάλο κόστος.



**Εικόνα 12 Άμεση ELISA** για την ανίχνευση του αντιγόνου ( **a** ) και του αντισώματος ( **b** ). (i) Προσάρτηση αντιγόνου/αντισώματος σε στερεά φάση. (ii) Επώαση με σημασμένο με ένζυμο αντίσωμα/αντιγόνο. (iii) Ξέπλυμα το μη δεσμευμένο με ένζυμο σημασμένο αντίσωμα/αντιγόνο. (iv) Αναπτύξη χρώματος με το κατάλληλο υπόστρωμα

### **2.2.1.2 Έμμεση ELISA**

Το σύστημα έμμεσης ELISA έχει αναπτυχθεί με βάση την άμεση ELISA. Το βασικό βήμα αυτού του συστήματος είναι η διαδικασία δύο δεσμεύσεων του πρωτογενούς αντισώματος και του σημασμένου με ένζυμο δευτερογενούς αντισώματος. Δηλαδή, το αντιγόνο στόχος ανιχνεύεται έμμεσα από το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι σημασμένο με το ένζυμο. Το αντιγόνο ακινητοποιείται αρχικά στην επιφάνεια της πλάκας μικροτιτλοδότησης, η οποία στη συνέχεια μπλοκάρεται με πρωτεΐνες αποκλεισμού όπως και στην άμεση ELISA. Το πρωτεύον αντίσωμα που δεσμεύεται στο ακινητοποιημένο αντιγόνο αφήνεται στη συνέχεια να αντιδράσει με το σημασμένο με ένζυμο δευτερεύον αντίσωμα, και τέλος προσθέτουμε το κατάλληλο υπόστρωμα και ακολουθεί η ανάπτυξη χρώματος. Το σήμα αυξάνεται με αυξανόμενη ποσότητα του ακινητοποιημένου αντιγόνου στόχου. Η έμμεση ELISA είναι κατάλληλη για τη μέτρηση μακρομορίων. Έχει υψηλή ευαισθησία, μικρό κόστος αλλά υπάρχει πιθανότητα διασταυρούμενης αντιδραστικότητας που μπορεί να προκληθεί από το δεύτερο αντίσωμα.

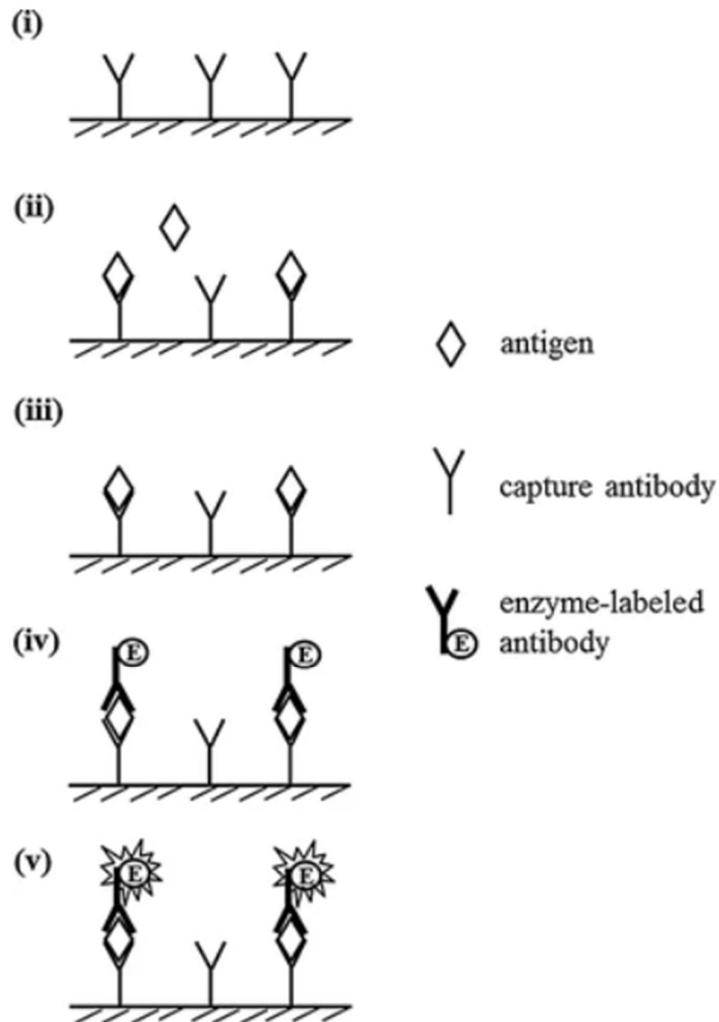


**Εικόνα 13** Έμμεση ELISA για ανάλυση αντισωμάτων. (i) Σύνδεση αντιγόνου σε στερεά φάση. (ii) Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα. (iii) Ξέπλυμα το μη δεσμευμένο πρωτογενές αντίσωμα. (iv) Επώαση με σημασμένο με ένζυμο δευτερεύον αντίσωμα. (v) Ανάπτυξη χρώματος με την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος

### **2.2.1.3 Sandwich ELISA**

Σε αυτό το σύστημα, το αντιγόνο στόχος ανιχνεύεται μέσω αγκύρωσης μεταξύ δύο αντισωμάτων, το λεγόμενο σύστημα σάντουιτς. Η ELISA σάντουιτς ξεκινά με την ακινητοποίηση ενός αντισώματος στην πλάκα μικροτιτλοδότησης που ονομάζεται αντίσωμα σύλληψης. Μετά το μπλοκάρισμα της επιφάνειας της πλάκας για να αποφευχθεί η μη ειδική προσρόφηση άλλων πρωτεϊνών, το αντιγόνο ενδιαφέροντος προστίθεται στις πλάκες για να συνδεθεί με το αντίσωμα σύλληψης. Στη συνέχεια ακολουθεί και πάλι διάλυμα αποκλεισμού και έπειτα το αντιγόνο που είναι δεσμευμένο στο αντίσωμα σύλληψης καλύπτεται με ένα σημασμένο με ένζυμο αντίσωμα. Τέλος έχουμε την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος για ανάπτυξη χρώματος. Η ELISA σάντουιτς είναι γενικά κατάλληλη για τη μέτρηση μακρομορίων με ορισμένες εξαιρέσεις. Έχει υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία (δύο αντισώματα) και είναι συμβατή με πολύπλοκα δείγματα. Η διαδικασία είναι πολύπλοκη, είναι χρονοβόρα και έχει μεγάλο κόστος.

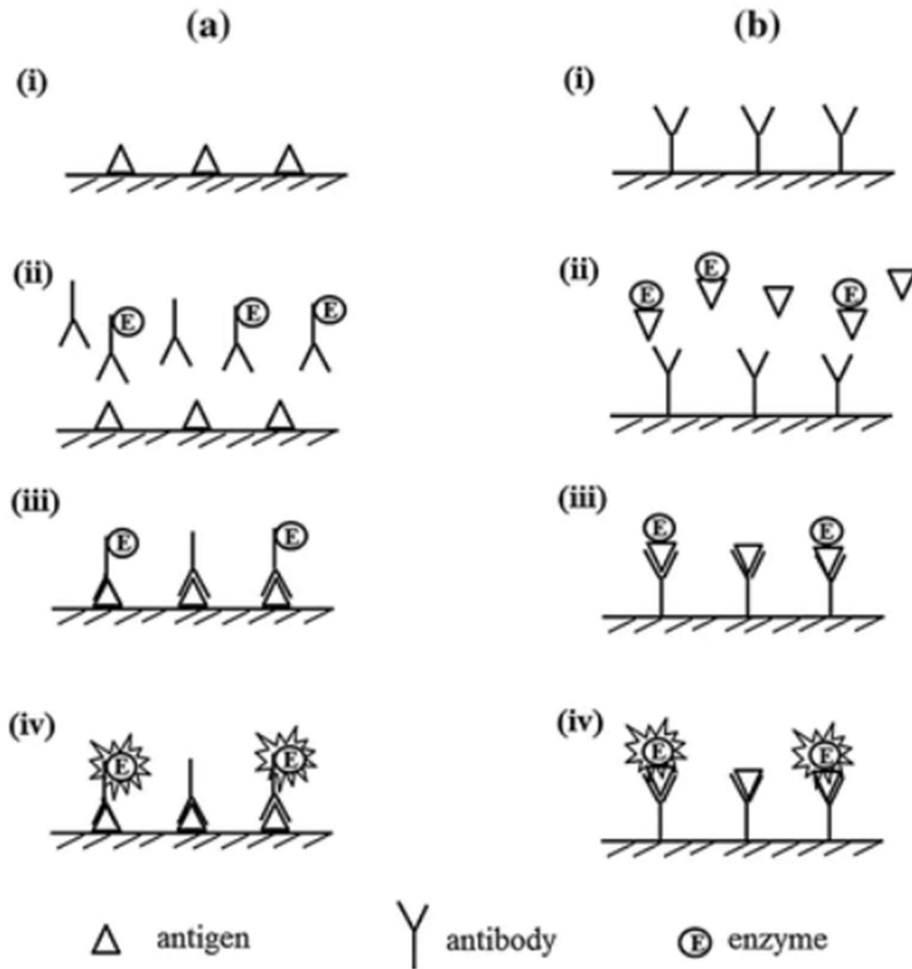




**Εικόνα 14** ELISA σάντουιτς για ειδική ανίχνευση αντιγόνου. (i) Σύνδεση του αντισώματος σύλληψης σε στερεά φάση. (ii) Επώαση με αντιγόνο στόχο. (iii) Ξέπλυμα του μη δεσμευμένου στόχου. (iv) Επώαση με σημασμένο με ένζυμο αντίσωμα. (v) Ανάπτυξη χρώματος με το κατάλληλο υπόστρωμα υπόστρωμα

#### **2.2.1.4 Ανταγωνιστική ELISA**

Αυτός ο τύπος ELISA χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1976. Το βασικό χαρακτηριστικό της ανταγωνιστικής ELISA είναι η ανταγωνιστική αντίδραση μεταξύ στόχων (αντιγόνου ή αντισώματος) στο δείγμα και σημασμένων με ένζυμο στόχων (αντιγόνου ή αντίσωμα) έναντι του αντίστοιχου ακινητοποιημένου αντισώματος ή αντιγόνου. Για την ανίχνευση του αντιγόνου σε ανταγωνιστική ELISA, χρησιμοποιείται ένα σημασμένο με ένζυμο αντιγόνο για να ανταγωνιστεί τα αντιγόνα στόχους έναντι του ακινητοποιημένου αντισώματος. Όσο υψηλότερη είναι η ποσότητα αντιγόνου στο δείγμα, τόσο μικρότερη είναι η ποσότητα του σημασμένου με ένζυμο αντιγόνου που συνδέεται με το αντίσωμα. Δηλαδή, με αυξανόμενη ποσότητα αντιγόνου στόχου, το σήμα μειώνεται. Η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόζεται κυρίως για την ανάλυση παθογόνων στα τρόφιμα εξαιτίας του φθηνού κόστους, της μεγάλης απόδοσης, των άμεσων ενδείξεων και της εξαιρετικής εξειδίκευσης. Έχει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης μικρών μορίων και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση μεγάλου εύρους αντιγόνων σε ένα δείγμα. Είναι λιγότερο ειδική και δεν μπορεί να χρησιμοποιείται σε αραιωμένα δείγματα.



**Εικόνα 15** Ανταγωνιστική ELISA για την ανίχνευση αντιγόνου ( α ) και αντισώματος ( β ). (i) Προσάρτηση αντιγόνου/αντισώματος σε στερεά φάση. (ii) Επώαση αντισώματος/αντιγόνου με σημασμένο με ένζυμο αντίσωμα/αντιγόνο. (iii) Ξέπλυμα το μη δεσμευμένο με ένζυμο σημασμένο αντίσωμα/αντιγόνο. (iv) Ανάπτυξη χρώματος με το κατάλληλο υπόστρωμα.

Η τεχνική ELISA έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της τα οποία συνοψίζονται στον **Πίνακα 9**

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Απλή διαδικασία	Εντατική εργασία και δαπανηρή παρασκευή αντισώματος επειδή είναι μια περίπλοκη τεχνική και απαιτούνται ακριβά κυτταρικά μέσα καλλιέργειας για τη λήψη ενός ειδικού αντισώματος.
Υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, λόγω αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος	Υψηλή πιθανότητα ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω ανεπαρκούς μπλοκαρίσματος της επιφάνειας της πλάκας μικροτιτλοδότησης ακινητοποιημένης με αντιγόνο
Υψηλή απόδοση, καθώς μπορούν να πραγματοποιηθούν ταυτόχρονες αναλύσεις χωρίς περίπλοκη προεπεξεργασία δείγματος	Αστάθεια αντισωμάτων επειδή ένα αντίσωμα είναι μια πρωτεΐνη που απαιτεί μεταφορά και αποθήκευση στο ψυγείο.
Γενικά ασφαλές και φιλικό προς το περιβάλλον, επειδή δεν απαιτούνται ραδιενεργές ουσίες και μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών	
Οικονομικός προσδιορισμός, καθώς χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια χαμηλού κόστους	

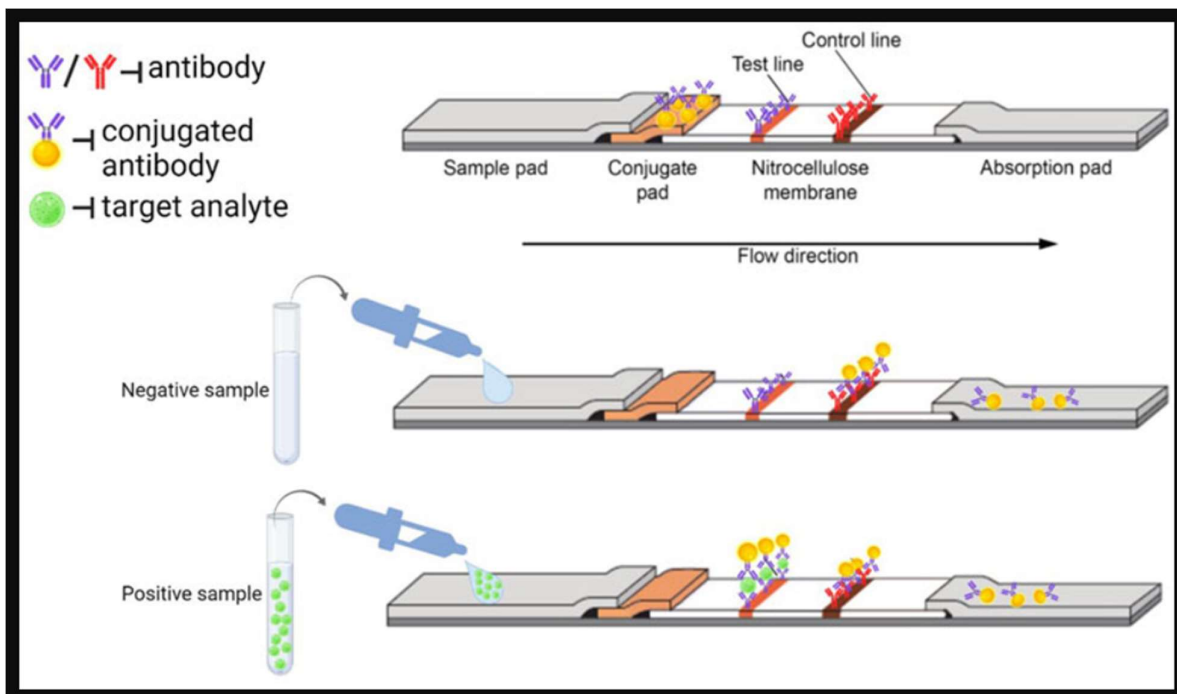
**Πίνακας 9** πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της ELISA

### 2.2.2 Ανοσοδοκιμασία Πλευρικής Ροής (Later Flow Immunoassay, LFIA)

Η ανοσοενζυμική μέθοδος της πλευρικής ροής (LFA) ονομαζόμενη και ανοσοχρωματογραφία, είναι μια τεχνική μέσω της οποίας ανιχνεύεται η παρουσία ή η απουσία ενός στόχου στο δείγμα υπό ανάλυση. Είναι ένας συνδυασμός χρωματογραφίας και ανοσολογικής τεχνικής, μία από τις πιο επιτυχημένες αναλυτικές μεθόδους για την ανίχνευση διαφόρων μορίων στόχων όπως ιών, βακτηρίων και παρασίτων παίζοντας σημαντικό ρόλο στη διάγνωση λοιμωδών νοσημάτων. Οι συγκεκριμένες συσκευές είναι εύκολες στη χρήση, δε χρειάζονται καταρτισμένη εκπαίδευση ή εξοπλισμό προκειμένου να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την παρουσία/απουσία ή την ποσότητα μιας αναλυόμενης ουσίας στόχου εντός λίγων λεπτών από την έναρξη της ανάλυσης. Οι LFIA στηρίζονται στην υψηλή ποιότητα μονοκλωνικών αντισωμάτων που μπορούν να αναγνωρίσουν το ενδιαφερόμενο μόριο-στόχο. Η ανοσοενζυμικές μέθοδοι της πλευρικής ροής (LFAs) εμφανίστηκαν για πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του 1960, και χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα για την μελέτη των πρωτεϊνών του ορού. Η πρώτη LFA πραγματοποιήθηκε το 1976 για την ανίχνευση της ανθρώπινης χορειακής γοναδοτροπίνης (hCG) στα ούρα. Η αρχή αυτής της τεχνικής βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου και στο ότι το υγρό, που περιέχει την αναλυόμενη ουσία στόχο μπορεί να μεταναστεύει κατά μήκος της συσκευής μέσω της τριχοειδούς δύναμης. Η LFA μπορεί να αναλύσει διάφορα βιολογικά δείγματα, όπως αίμα, σάλιο, ούρα και πλάσμα. Ο πρωταρχικός σκοπός της είναι να ανιχνεύει αντιγόνα, αντισώματα ή άλλα μόρια-στόχους, προσφέροντας ποιοτικές και ποσοτικές γνώσεις. Μια συσκευή ανοσοδοκιμασίας πλευρικής ροής αποτελείται από τέσσερα μέρη:

- I) **επίθεμα δείγματος** - Χρησιμεύει ως σημείο εισόδου για το δείγμα. Εξασφαλίζει ομοιόμορφη κατανομή και μπορεί να περιέχει αντιδραστήρια για την προετοιμασία του δείγματος
- II) **συζευγμένο επίθεμα**- Φιλοξενεί αντιδραστήρια ανίχνευσης που συνδέονται με τον αναλυτή στόχο, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα που κινείται κατά μήκος της συσκευής

- III) **μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**- Ο πυρήνας της ανάλυσης όπου λαμβάνει χώρα η ανίχνευση. Περιέχει γραμμές δοκιμής και ελέγχου για οπτικοποίηση και επιβεβαίωση σήματος
- IV) **επίθεμα απορρόφησης**- Συλλέγει την περίσσεια δείγματος και αντιδραστηρίων, διατηρώντας σταθερή ροή μέσω της τριχοειδούς δράσης



**Εικόνα 16** Συσκευή ανοσοδοκιμασίας πλευρικής ροής

Η λειτουργικότητα της ανοσοδοκιμασίας πλευρικής ροής όπως αναφέρθηκε παραπάνω εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ αντισωμάτων και αντιγόνων. Όταν εφαρμόζεται ένα δείγμα, τα συζευγμένα αντισώματα στο συζευγμένο επίθεμα συνδέονται με τους αναλυτές στόχους, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Αυτό το σύμπλεγμα μεταναστεύει στη γραμμή δοκιμής, όπου συλλαμβάνεται από ακινητοποιημένα αντισώματα ειδικά για τον στόχο. Ένα ορατό σήμα στη γραμμή δοκιμής υποδεικνύει την παρουσία της αναλυόμενης ουσίας. Αυτή η μορφή "σάντουιτς" εξασφαλίζει υψηλή ειδικότητα και αξιοπιστία, καθιστώντας τις ανοσοδοκιμασίες πλευρικής ροής αποτελεσματικές για την ανίχνευση ενός ευρέος φάσματος ουσιών. Ένας από τους πιο κοινές μεθόδους ανίχνευσης που χρησιμοποιεί η LFA είναι η χρωματομετρική ανίχνευση. Σε αυτή χρησιμοποιούνται νανοσωματίδια όπως ο κολλοειδής χρυσός, τα οποία παράγουν ορατά σήματα όταν δεσμεύονται σε στοχευόμενους αναλύτες. Αυτή η μέθοδος είναι οικονομικά αποδοτική και εύκολη στην ερμηνεία ωστόσο, η ευαισθησία του είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με άλλους μηχανισμούς ανίχνευσης όπως η ανίχνευση με φθορισμό. Σε αυτή χρησιμοποιούνται δείκτες όπως νανοσωματίδια πυριτίου με πρόσμειξη Cy5 ή κβαντικές κουκκίδες, που εκπέμπουν φως όταν διεγείρονται. Αυτοί οι δείκτες μπορούν να ανιχνεύσουν αναλύτες στόχους σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Αυτή η μέθοδος απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό, περιορίζοντας έτσι τη χρήση της. Σήμερα τεχνικές όπως η ισοταχοφόρηση και η προσυγκέντρωση δείγματος μπορούν να ενισχύσουν την ευαισθησία έως και 400 φορές. Επίσης η προσθήκη Triton X-114 συμπυκνώνει τις πρωτεΐνες, μειώνοντας τα όρια ανίχνευσης. Τροποποιήσεις στη λωρίδα, όπως η προσθήκη νανοϊνών κυτταρίνης ή φραγμάτων αλατιού, ενισχύουν περαιτέρω τις δυνατότητες ανίχνευσης στην τεχνική LFA.

Επιπλέον εξελίξεις στον ανοσοπροσδιορισμό πλευρικής ροής όπως η δυνατότητα πολυπλεξίας ενισχύει την αποτελεσματικότητα της τεχνικής με την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αναλυτών ενώ μειώνει και το κόστος. Επίσης η ενσωμάτωση smartphone όπου οι κάμερες αυτοματοποιούν πλέον την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, μειώνοντας το ανθρώπινο λάθος και το AI και οι αλγόριθμοι μηχανικής μάθησης αναλύουν τα αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο, προσφέρουν υψηλή ακρίβεια. Αυτές οι εφαρμογές λειτουργούν εκτός σύνδεσης, καθιστώντας τις ιδανικές για χρήση στο πεδίο ελέγχου.

Εν κατακλείδι η τεχνική πλευρικής ροής έχει φέρει επανάσταση στα διαγνωστικά test με την ταχύτητα, απλότητα και προσιτή τιμή. Αυτές οι συσκευές ανιχνεύουν βιοδείκτες, παθογόνους παράγοντες και ρύπους στην υγειονομική περίθαλψη, την ασφάλεια των τροφίμων και την περιβαλλοντική παρακολούθηση. Η εξέλιξη περιλαμβάνει ενισχυμένη ευαισθησία, ψηφιακή ολοκλήρωση και διευρυμένες εφαρμογές όπως δοκιμές αντισωμάτων εξουδετέρωσης. Με την εξάλειψη της ανάγκης για εργαστηριακή ανάλυση, η τεχνική της πλευρικής ροής ενισχύει τα διαγνωστικά test στο πεδίο εφαρμογής.

## 2.3 Μέθοδοι Ενίσχυσης Νουκλεϊκών Οξέων

### 2.3.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, PCR (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Υπάρχουν πολύ λίγες εφευρέσεις που μπορούν να ανταγωνιστούν τη σημασία της PCR τα τελευταία 100 χρόνια, καθώς έφερε επανάσταση στη βιολογική και γενετική έρευνα. Πρόκειται για την επιλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οδηγεί στην *in vitro* παραγωγή εκατομμυρίων αντιγράφων αυτής της αλληλουχίας. Είναι μια τεχνική που μιμείται τη φυσική κυτταρική διαδικασία της ενζυμικής αντιγραφής του DNA και εφευρέθηκε το 1985 από τον Kary B. Mullis ο οποίος τιμήθηκε με Νόμπελ χημείας το 1993. Η PCR είναι μια διαδικασία που εστιάζει επιλεκτικά σε ένα μικροσκοπικό τμήμα DNA σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα και η βασική τεχνική της περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης επιλεγμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων. Η τεχνική μπορεί να πολλαπλασιάσει οποιοδήποτε θραύσμα DNA μέσα σε δύο ή και τρεις ώρες. Για την εκτέλεση της απαιτούνται:



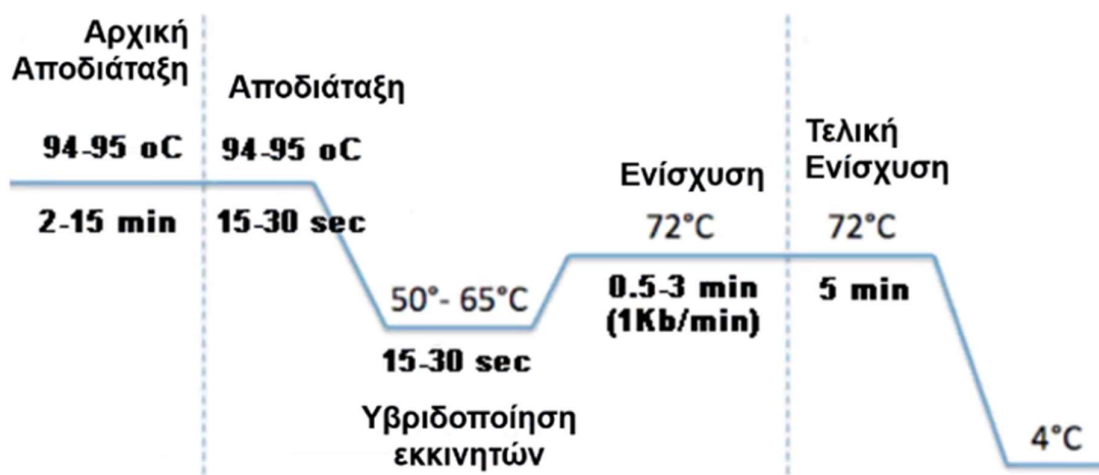
- i) **Εκμαγείο DNA**
- ii) **Μίγμα των 4 τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτίδιων (dNTPs) που θα φτιάξουν τις νέες αλυσίδες DNA (dATP, dGTP, dCTP, dTTP )**
- iii) **Ζεύγος εκκινητών ( primers ) που θα δεσμευτούν εκατέρωθεν του τμήματος DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε και σε συγκεκριμένες θέσεις ξεκινώντας την αντιγραφή. Το μήκος των εκκινητών κυμαίνεται από 20 έως 25 νουκλεοτίδια.**
- iv) **Κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να δουλέψει το ένζυμο DNA πολυμεράση ( pH~8,5 )**
- v) **Άλας – διάλυμα  $MgCl_2$**
- vi) **Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (συνήθως Taq πολυμεράση)**

Οι διεργασίες της τεχνικής ξεκινούν με τη λήψη ενός μικρού τμήματος DNA σε δοκιμαστικό σωλήνα. Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε θερμοκυκλώτη, ολοκληρώνεται σε 25-35 κύκλους και σε κάθε κύκλο έχουμε το διπλασιασμό του DNA – στόχου.



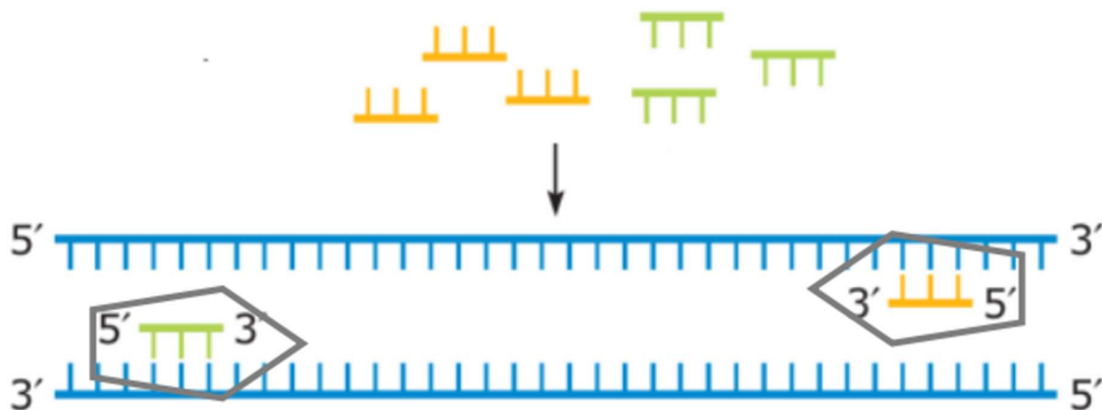
**Εικόνα 17** Θερμοκυκλωτές PCR | Biocompare.com

Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία θερμοκρασιακά στάδια:



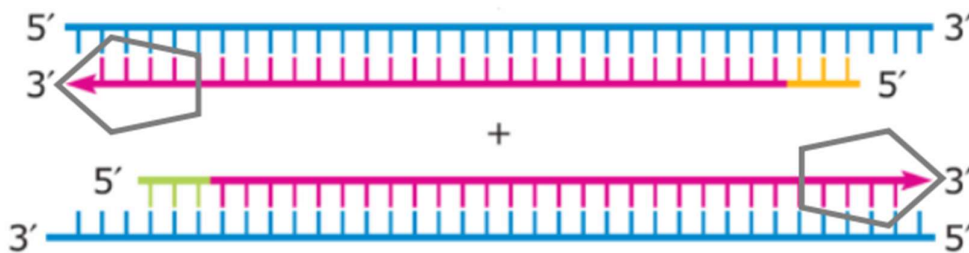
**Εικόνα 18** θερμοκρασιακά στάδια PCR

1. **Αποδιάταξη του DNA.** Το δίκλωνο DNA θερμαίνεται στους 94-95°C, προκειμένου να διασπαστούν οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα συμπληρωματικά ζεύγη των βάσεων του. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται μονόκλωνα μόρια DNA. Επίσης σε αυτή την θερμοκρασία ενεργοποιούνται και οι πολυμεράσες με την ένδειξη hot start.
2. **Υβριδοποίηση εκκινητών.** Η θερμοκρασία μετά την ολοκλήρωση του πρώτου σταδίου ελαττώνεται στους 50-65°C. σε αυτή τη θερμοκρασία οι εκκινητές ( πρόσθιος και ανάστροφος ) προσδένονται στις συμπληρωματικές με αυτούς περιοχές του μονόκλωνου DNA δημιουργώντας δίκλωνες περιοχές. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης τους  $T_m$ . **Θερμοκρασία υβριδοποίησης =  $\{ [ 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) ] - 5^{\circ}\text{C} \}$ .** Η DNA πολυμεράση μετά την πρόσδεση των εκκινητών μπορεί να ξεκινήσει την αντιγραφή διότι υπάρχει ελεύθερο 3' άκρο που φέρει -OH



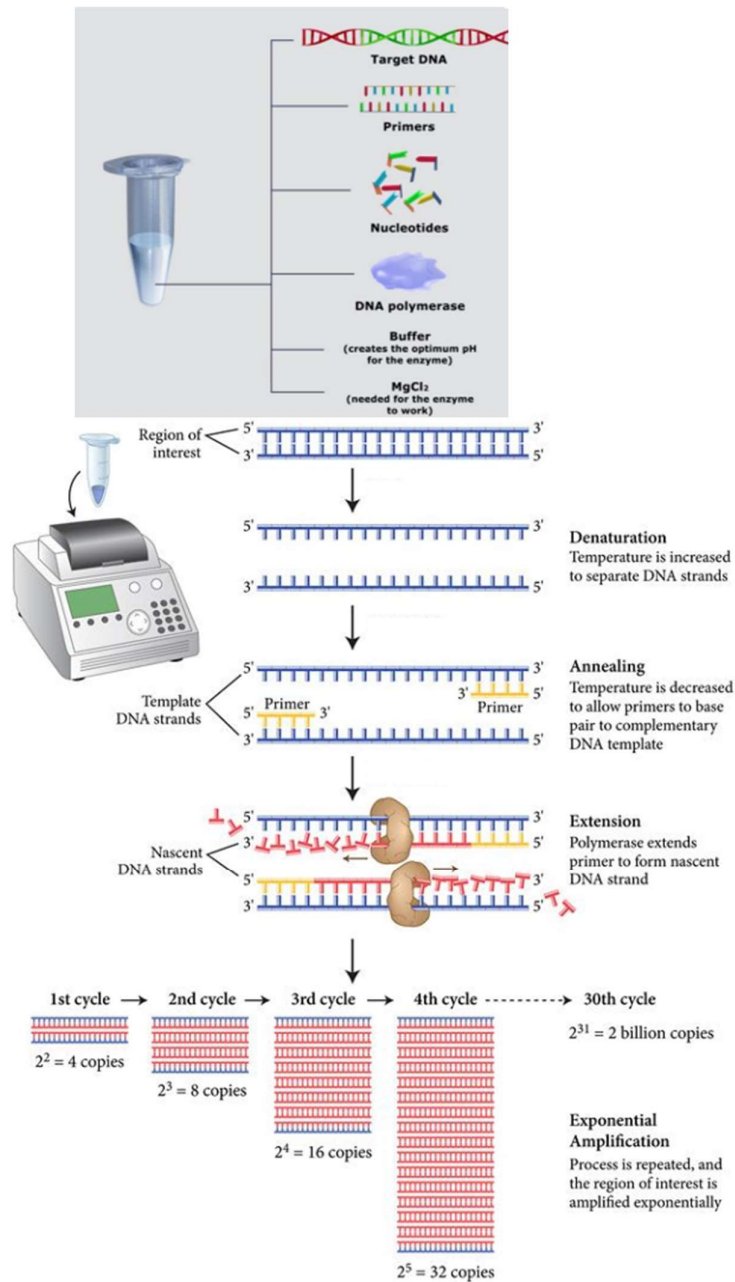
**Εικόνα 19** πρόσδεση των εκκινητών στα μονόκλωνα μόρια DNA

3. **Σύνθεση συμπληρωματικής DNA αλυσίδας.** Η θερμοκρασία αυξάνει στους 68 ή 72 °C όπου η DNA πολυμεράση (Taq ) επιμηκύνει τους εκκινητές προσθέτοντας σταδιακά dNTPs συνθέτοντας έτσι συμπληρωματικές αλυσίδες.



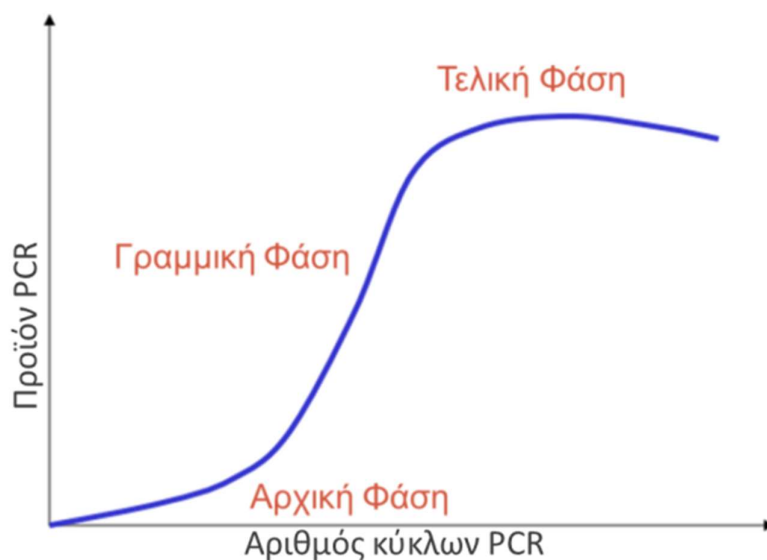
**Εικόνα 20** Σύνθεση συμπληρωματικής DNA αλυσίδας

Σε ιδανικές συνθήκες στο τέλος κάθε κύκλου έχουν παραχθεί τα διπλάσια μόρια δίκλωνου DNA από αυτά που υπήρχαν στην αρχή.



**Εικόνα 21** PCR αντίδραση

Μετά από 30 έως 35 κύκλους, η απόδοση της PCR τελικά μειώνεται λόγω της εξάντλησης των αντιδραστηρίων, της μείωσης της δραστηριότητας της πολυμεράσης και άλλων παραγόντων που συμβάλλουν, όπως η συσσώρευση μορίων πυροφωσφορικού, και η υπερβολική αυτο-υβριδοποίηση(διμερή εκκινητών) των εκκινητών. Επίσης και η παρουσία αναστολέων PCR στο δείγμα [77] μπορούν να επηρεάσουν την καλή λειτουργία της PCR. Οι πιο συνηθισμένοι αναστολείς της PCR είναι η ηπαρίνη, τα ιοντικά απορρυπαντικά (SDS), τα μη ιοντικά απορρυπαντικά σε συγκεντρώσεις >5% και οι DNases.



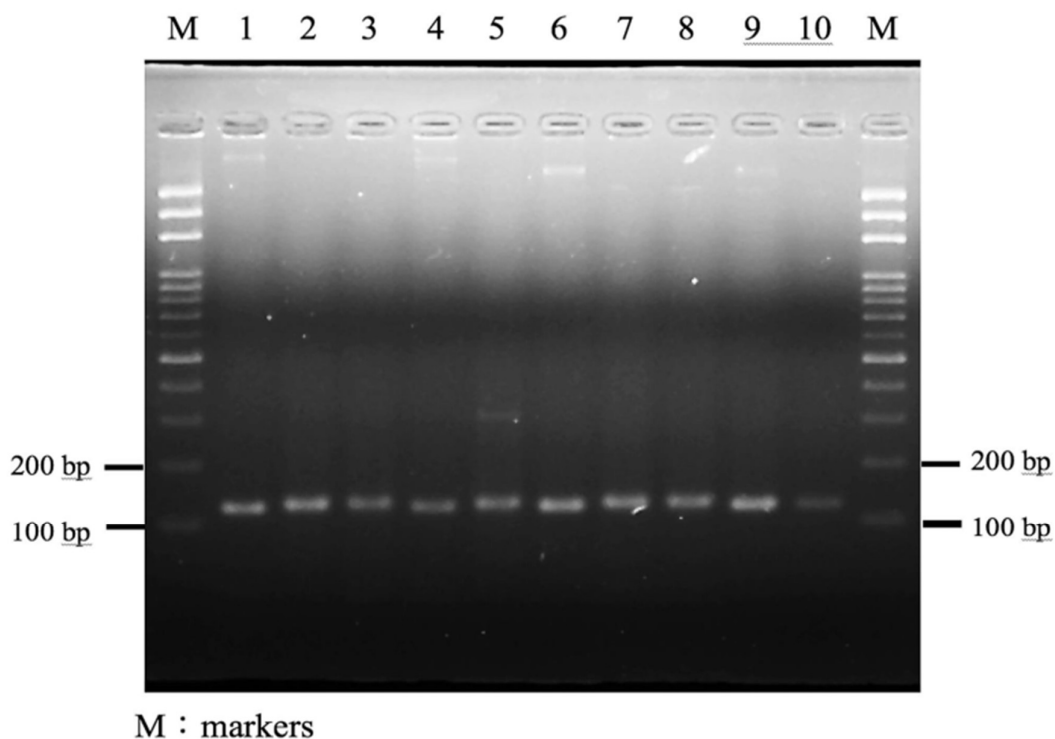
**Εικόνα 22** απόδοση PCR

Η μέθοδος PCR έχει αναδειχθεί σε μια ιδιαίτερα υποσχόμενη τεχνική ανίχνευσης, όσον αφορά τους παθογόνους μικροοργανισμούς, παρόλα αυτά υπάρχουν και ορισμένα μειονεκτήματα όπως η εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων και η λύση των κυττάρων, η διασταυρούμενη μόλυνση και οι ανεπιτυχείς αντιδράσεις εξαιτίας της παρουσίας παραγόντων που μπορούν να την αναστείλουν. Επίσης οι τεχνικές PCR δεν έχουν τη δυνατότητα διάκρισης ανάμεσα σε ζωντανά και νεκρά κύτταρα και ένα από τα βασικότερα μειονεκτήματα της είναι ότι ενέχει ο κίνδυνος παραγωγής ψευδώς θετικών σημάτων, εξαιτίας της σύνδεσης των εκκινητών σε μη εξειδικευμένες δίκλωνες ακολουθίες DNA.

#### **Υπάρχουν διάφοροι τύποι PCR όπως :**

**End Point PCR:** Μετά την ενίσχυση PCR, τυπικά εκτελείται ηλεκτροφόρηση γέλης αгарόζης με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου(EtBr) για την οπτικοποίηση του DNA [78]. Η γέλη στη συνέχεια αξιολογείται σε υπεριώδες φως όπου το βρωμιούχο αιθίδιο φωσφορίζει. Κατά την ηλεκτροφόρηση το ενισχυμένο DNA τμήμα κινείται προς τον θετικό πόλο αντιστρόφος ανάλογα του μεγέθους του. Με τη βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών προσδιορίζεται το μέγεθος του ενισχυμένου τμήματος. Πρόκειται για ποιοτικό και ημιποσοτικό προσδιορισμό του DNA σε σχέση πάντα με ένα πρότυπο δείγμα γνωστής συγκέντρωσης.

Μετά την ενίσχυση PCR, τυπικά εκτελείται ηλεκτροφόρηση γέλης αгарόζης με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου(EtBr) για την οπτικοποίηση του DNA [78]. Η γέλη στη συνέχεια αξιολογείται σε υπεριώδες φως όπου το βρωμιούχο αιθίδιο φωσφορίζει. Κατά την ηλεκτροφόρηση το ενισχυμένο DNA τμήμα κινείται προς τον θετικό πόλο αντιστρόφος ανάλογα του μεγέθους του. Με τη βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών προσδιορίζεται το μέγεθος του ενισχυμένου τμήματος.



**Εικόνα 23** προϊόντα αντίδρασης PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης

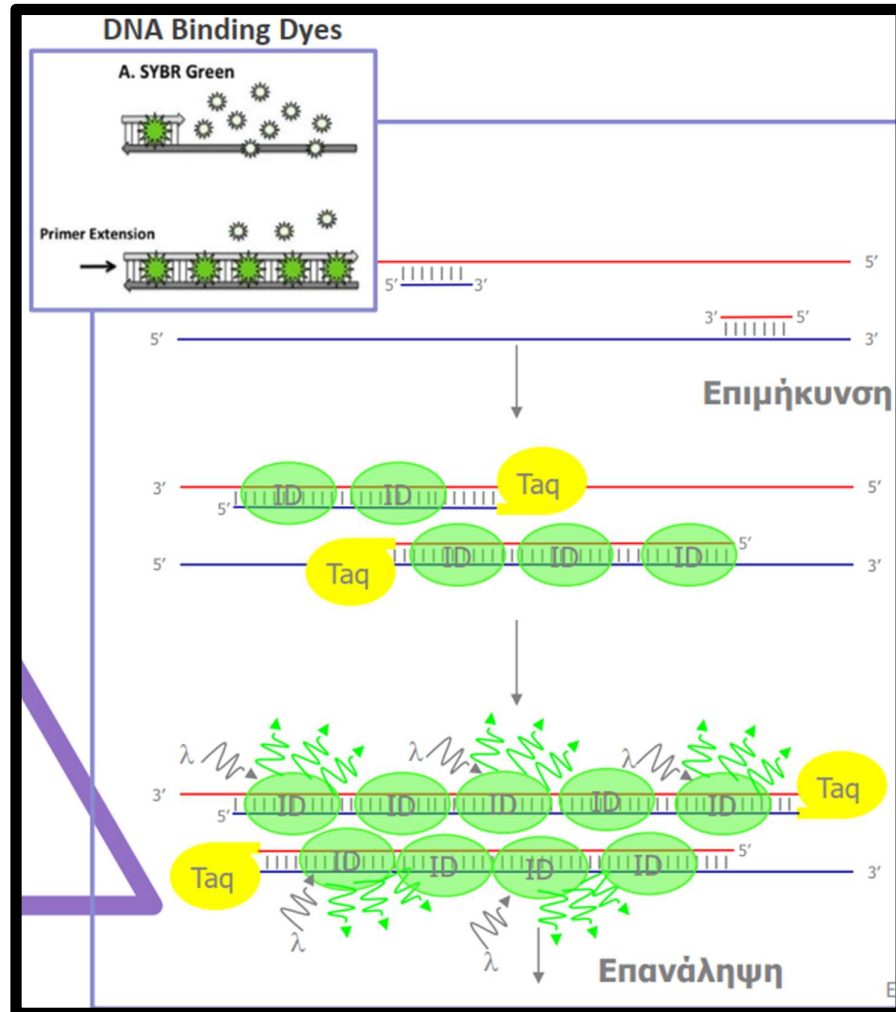
Για την σωστή αξιολόγηση της αντίδρασης PCR κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται ένας θετικός μάρτυρας που περιέχει την αλληλουχία στόχο για τον έλεγχο της απόδοσης της αντίδρασης και ένας αρνητικός μάρτυρας που δεν περιέχει DNA για τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης.



**Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time Quantitative qPCR):**

Η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR) αποτελεί μια εξελιγμένη αντίδραση της κλασσικής PCR που ενισχύει, προσδιορίζει και ποσοτικοποιεί τον DNA-στόχο. Η εν λόγω μέθοδος είναι ταχύτατη και αξιόπιστη ως προς τον προσδιορισμό των επιλεγμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων καθώς δεν τίθενται ζητήματα για μετέπειτα επεξεργασία (ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και έκθεση σε λάμπα UV), μειώνοντας έτσι τον χρόνο και τον κόπο αναφορικά με τον προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών. [79]. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ανίχνευση ενός φθορίζοντος σήματος του οποίου η ένταση μετρίεται στο τέλος κάθε κύκλου και είναι ανάλογη της ποσότητας του προϊόντος PCR. Η όλη αντίδραση πραγματοποιείται με ένα μόνο μηχάνημα που συνδυάζει την θερμική ανακύκλωση με την ικανότητα σάρωσης της χρωστικής φθορισμού και απαιτούνται περίπου 40 κύκλοι. Οι συνηθέστερες μέθοδοι φθορισμομετρικού προσδιορισμού των PCR προϊόντων είναι με:

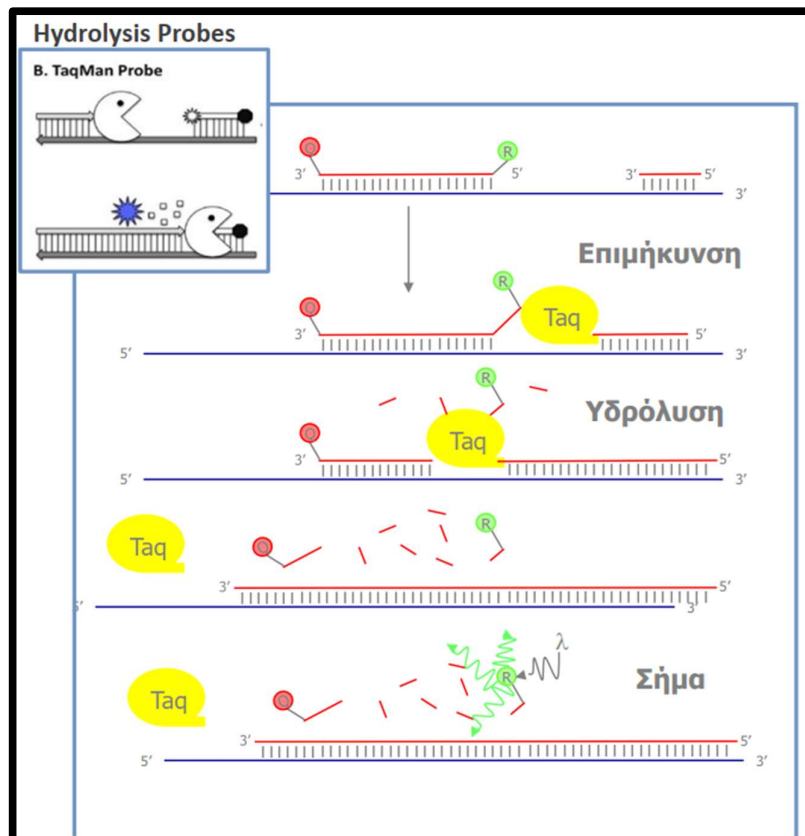
- I) **Μη-ειδικές φθορισμογόνες χρωστικές με πιο συνηθέστερη την SBR Green I, οι οποίες δεσμεύονται στα νεοσυντιθέμενα δίκλινα μόρια DNA που παράγονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Στο τέλος της αντίδρασης qPCR ακολουθεί ένας κύκλος βαθμιαίας αύξησης της θερμοκρασίας από του 50°C στους 95°C κατά τον οποίο πραγματοποιείται αποδιάτξη των προϊόντων της αντίδρασης με ταυτόχρονη απελευθέρωση της χρωστικής που είχε δεσμευτεί σε αυτά κατά την σύνθεσή τους.**



Εικόνα 24 SYBR Green

- II) Ειδικούς φθορισμογόνους DNA-ανιχνευτές(probes) γνωστούς ως TaqMan. Οι ανιχνευτές TaqMan είναι ολιγονουκλεοτίδια που εμπεριέχουν ως χρωστική αναφοράς ένα φθορισμογόνο μόριο στο 5' άκρο και στο 3' άκρο ένα μόριο απόσβεσης και υβριδοποιούνται σε διαφορετική θέση σε σχέση με τους δύο εκκινητές. Όταν τα δύο αυτά μόρια βρίσκονται κοντά τότε παρεμποδίζεται ο εκπεμπόμενος φθορισμός από

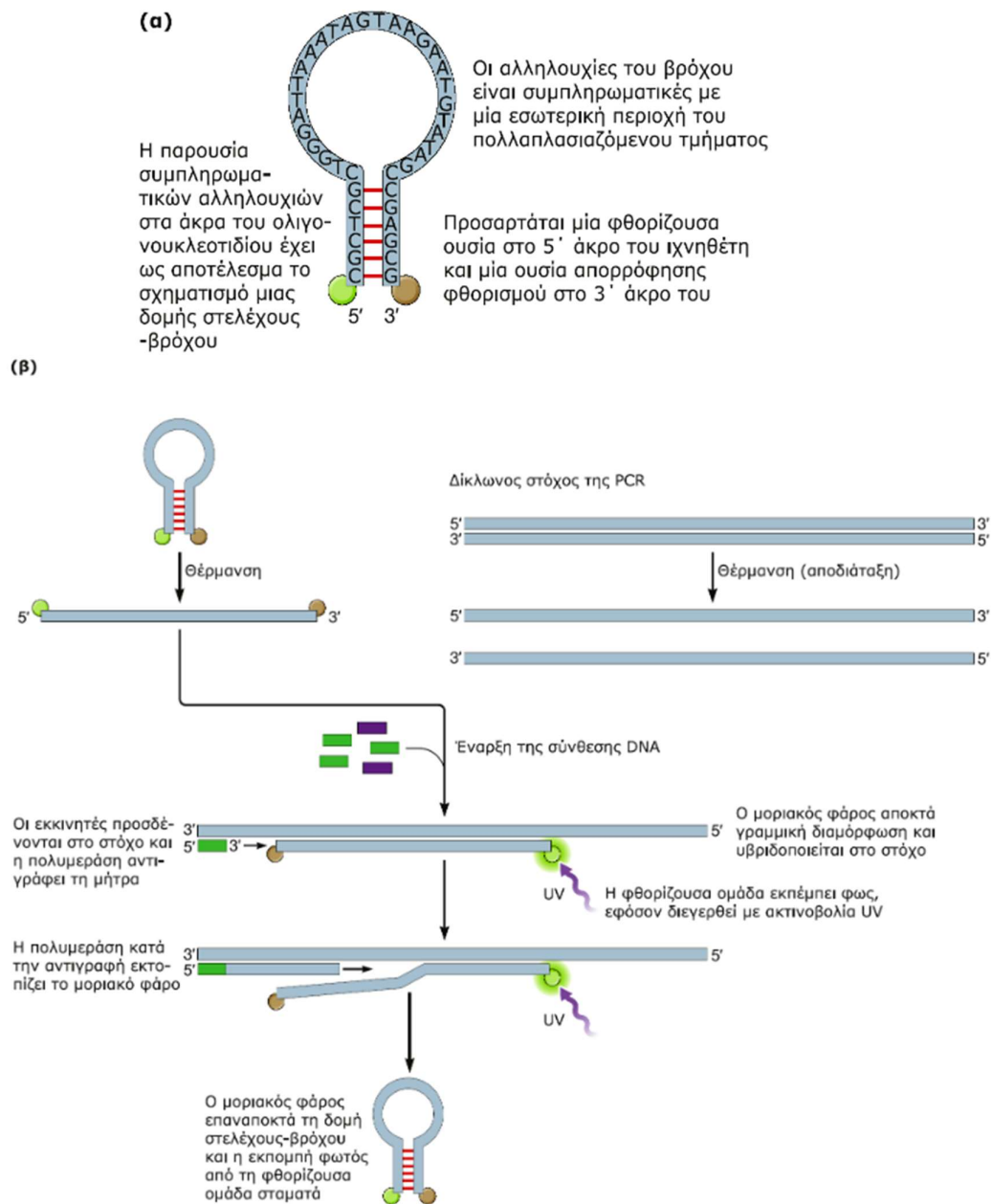
το φθορισμογόνο μόριο στο 5' άκρο, ενώ όταν απομακρυνθούν τότε το φθορισμογόνο μόριο φθορίζει(φαινόμενο FRET). Στους TaqMan probes είναι αναγκαία η 5'-3' εξωνουκλεοτιδική δράση της Taq πολυμεράσης.



**Εικόνα 25** TaqMan probe

- III) Μοριακούς φάρους(Molecular Beacons).** Οι μοριακοί φάροι αποτελούν ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές με διάπλωση στελέχους/φουρκέτας και βρόγχου, όπου η ακολουθία είναι συμπληρωματική προς μια ακολουθία-στόχο και βρίσκεται σε ένα μέρος του βρόγχου και το στέλεχος σχηματίζεται με υβριδοποίηση ανάμεσα σε δυο συμπληρωματικές αλληλουχίες βραχιόνων. Ο μοριακός φάρος δημιουργεί ένα σήμα

φθορισμού κατά τη διάρκεια υβριδισμού του ανιχνευτή με τη νουκλεοτιδική ακολουθία στο αμπλικόνιο, η οποία είναι συμπληρωματική.



**Εικόνα 26** Μοριακοί φάροι



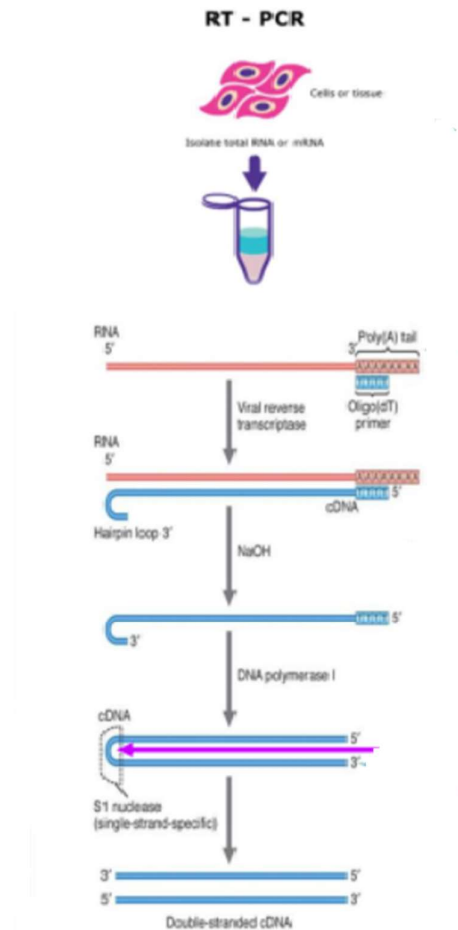
**Εικόνα 27** Q1000+ Μηχάνημα Real Time PCR

Η ενίσχυση, η ποσοτικοποίηση και η ανίχνευση του DNA-στόχου γίνεται σε ένα μόνο σωλήνα ελαττώνοντας έτσι την πιθανότητα επιμολύνσεων. Η τεχνική έχει την ικανότητα παρακολούθησης της προόδου των αντιδράσεων PCR πραγματικό χρόνο καθώς και την δυνατότητα ακριβούς μέτρησης των προϊόντων σε κάθε κύκλο. Το δεύτερο μας επιτρέπει την πολύ ακριβή ποσοτικοποίηση του αρχικού DNA-στόχου στα δείγματα μας. Έχει μεγάλο εύρος ανίχνευσης και είναι πολύ πιο γρήγορη και “ξεκούραστη” από την απλή PCR. Γι’ αυτούς τους λόγους η qPCR έχει γίνει κορυφαίο εργαλείο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση DNA.

Βέβαια είναι πιο ακριβή από την απλή PCR και επιπλέον, μερικές φθορογόνες χημικές ουσίες δεν είναι συμβατές με τις πλατφόρμες PCR σε πραγματικό χρόνο [80].

### **PCR αντίστροφης μεταγραφής (End-Point Reverse Transcription PCR,**

**RT-PCR**: πρόκειται για μια παραλλαγή της τυπικής PCR. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση για να μετατρέψει το RNA σε DNA, το οποίο χρησιμοποιείται ως μήτρα στην PCR. Το πρώτο βήμα είναι η απομόνωση του RNA από ιστό, κύτταρα ή άλλο βιολογικό υλικό. Έπειτα με την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης και με τη χρήση ειδικών ή τυχαίων ή polyTTTT εκκινήτων ξεκινά η σύνθεση ενός υβριδίου DNA/RNA μορίου το οποίο στη συνέχεια με την χρήση του ενζύμου RNase ανοικοδομείται σε μονόκλωνο DNA. Τέλος έχουμε την μετατροπή του μονόκλωνου DNA σε δίκλωνο DNA με τη χρήση της DNA πολυμεράσης και τη διάσπαση της φουρκέτας με την S1 νουκλεάση έτοιμο πλέον προς χρήση για την απλή PCR. Πρόκειται για ποιοτικό και ημιποσοτικό προσδιορισμό των μορίων RNA χωρίς να παρέχονται ακριβείς πληροφορίες σχετικά με την αρχική συγκέντρωση του RNA στο δείγμα. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την qPCR για ακριβή ποσοτικοποίηση του RNA.



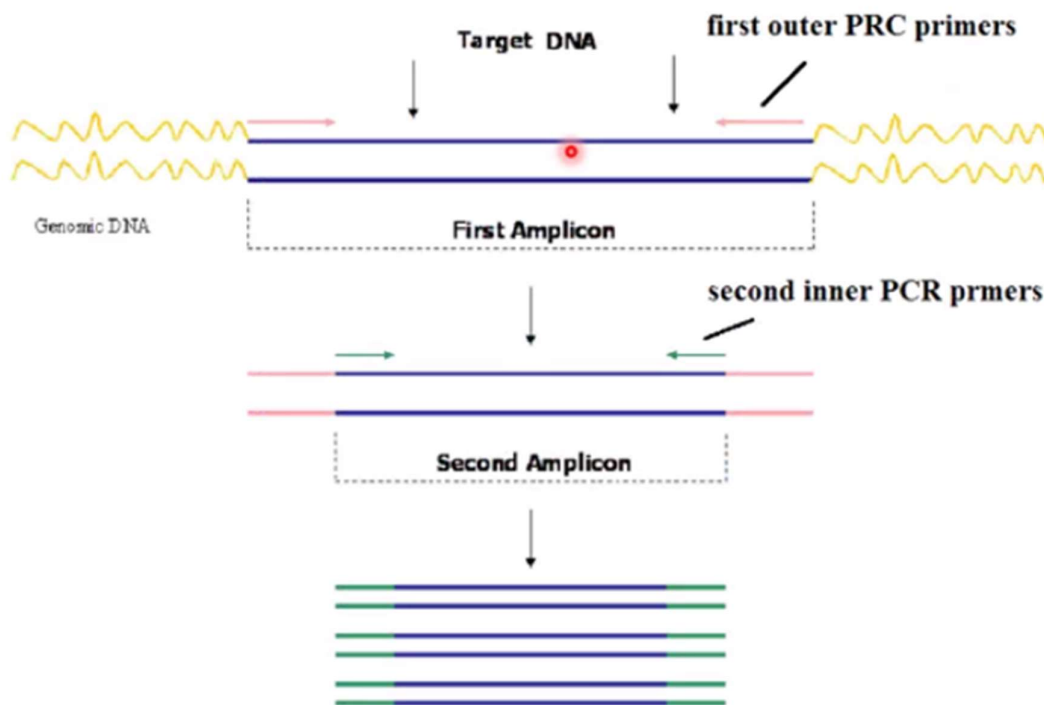
**Εικόνα 28** RT-PCR

**Πολυπλεκτική PCR (multiplex PCR, mPCR):** Η πολυπλεκτική PCR (multiplex PCR, mPCR) είναι μια τεχνική η οποία δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης πολλαπλών στόχων στο ίδιο δείγμα. Στην συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερα ζεύγη εκκινητών, ειδικά για διαφορετικούς στόχους τα οποία εισάγονται στον ίδιο σωλήνα αντίδρασης με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ακριβών αντιδραστηρίων καθώς και τη μείωση των πιθανών μολύνσεων.

Συγκριτικά με την απλή PCR, η mPCR προσφέρει πιο γρήγορη ανίχνευση είναι εξαιρετικά ειδική ως της το είδος και εξαιρετικά ευαίσθητη. Ο σχεδιασμός των εκκινητών πρέπει να γίνει πολύ προσεκτικά ώστε να έχουν μια κοινή θερμοκρασία ανόπτησης και η συγκέντρωση τους να είναι τέτοια που να μην ευνοείται η δημιουργία διμερών μεταξύ τους. Η επιλογή των στόχων ενίσχυσης πρέπει να γίνει έτσι ώστε τα μεγέθη τους να είναι αρκετά διαφορετικά για να δημιουργούν διακριτές ζώνες κατά την οπτικοποίηση με ηλεκτροφόρηση γέλης.

**Επάλληλη PCR (nested PCR, nPCR):** Η συγκεκριμένη τεχνική πραγματοποιείται με την εφαρμογή 2 ζευγών εκκινητών σε διαφορετικές PCR αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιείται ένα ζεύγος εκκινητών που καλείται εξωτερικό για λίγους κύκλους 10-18 και επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό ενός ειδικού αρχικού υποστρώματος. Στην δεύτερη αντίδραση εφαρμόζεται ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητών καλείται εσωτερικό και χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το ενισχυμένο προϊόν της πρώτης αντίδρασης. Η χρήση δύο ζευγών εκκινητών επιτρέπει την εκτέλεση της μεγαλύτερου αριθμού κύκλων, με συνέπεια την αύξηση της ευαισθησίας της PCR. Η καλύτερη ειδικότητα της αντίδρασης απορρέει από τη συγκρότηση δύο ξεχωριστών σετ εκκινητών στο ίδιο πρότυπο στόχο.

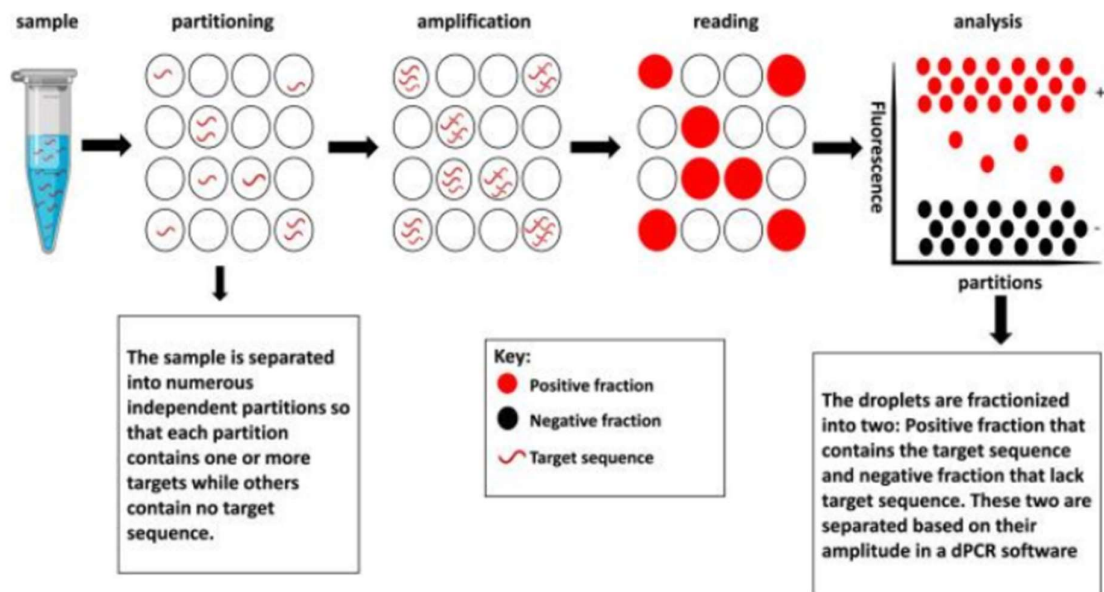




**Εικόνα 29** Επάλληλη PCR

**Ψηφιακή PCR (digital PCR, dPCR):** Η ψηφιακή PCR περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1999 από τους Kinzler και Vogelstein [81]. Η dPCR λειτουργεί παρόμοια με την κλασική PCR. Χρησιμοποιείται για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση και σε αυτή την τεχνική το δείγμα προς εξέταση κατανέμεται αραιωμένο (Στην dPCR, το δείγμα προς ανάλυση χρησιμοποιείται στη μέγιστη δυνατή αραιώσή του ) σε μεμονωμένα μόρια σε περίπου 20000 φρεάτια. Σε κάθε φρεάτιο ξεχωριστά πραγματοποιείται η ενίσχυση (PCR) δίνοντας σήμα για την ανάλυση της φύσης του μορίου-στόχου (ποιοτική ανάλυση) [82]. Η ποσοτική ανάλυση στη συγκεκριμένη τεχνική γίνεται με τη χρήση της κατανομής Poisson [81].

Η dPCR παρουσιάζει τόσο μεγάλη ευαισθησία όσο και ακρίβεια, και επηρεάζεται λιγότερο από τους ανασταλτικούς παράγοντες του δείγματος. Παρουσιάζει λιγότερο ακριβή ποσοτικοποίηση όταν το DNA-στόχος είναι μεγάλο, χαμηλή απόδοση αλλά το μεγαλύτερο μειονέκτημα της είναι το μεγάλο κόστος.

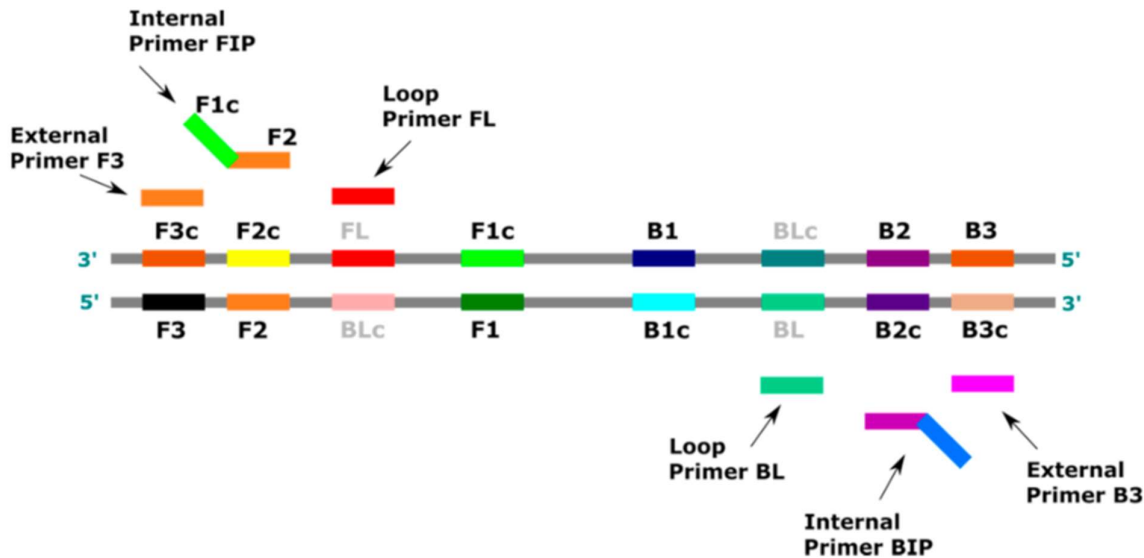


**Εικόνα 30** Αρχή dPCR. Πραγματοποιείται διαίρεση του δείγματος σε ανεξάρτητα τμήματα με σκοπό το καθένα να περιέχει λίγες ή περισσότερες αλληλουχίες-στόχους. Η καταμέριση των αλληλουχιών- στόχων σε μέρη μπορεί να εκτιμηθεί προσεγγιστικά με την κατανομή Poisson. Κάθε τμήμα δρα ως ατομικός μικροαντιδραστήρας PCR. Τα διαμερίσματα που εμπεριέχουν ενισχυθείσες αλληλουχίες- στόχους καταγράφονται με φθορισμό. Η αναλογία των θετικών τμημάτων (παρουσία φθορισμού).

### **2.3.2 Ισοθερμική Ενίσχυση μέσω Βρόγχου (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)**

Το 1998, μια Ιαπωνική εταιρεία με την επωνυμία Eiken Chemical Co., Ltd. σχεδίασε μια μέθοδο γνωστή ως ισοθερμική ενίσχυση του DNA με τη μεσολάβηση βρόχου (LAMP), εξαλείφοντας έτσι ορισμένες δυσκολίες εγγενείς στην PCR [83]. Η συγκεκριμένη τεχνική είναι εξαιρετικά ειδική και μπορεί να παράγει έως και  $10^9$  αντίγραφα του ενισχυμένου DNA μέσα σε λιγότερο από μία ώρα. Η ισοθερμική ενίσχυση μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς προηγμένο εργαστηριακό εξοπλισμό, όπως σε θερμαντήρα ξηρού μπλοκ ή σε λουτρό νερού. Μια άλλη καινοτόμος πτυχή της LAMP είναι η υψηλή ειδικότητά του λόγω της χρήσης πολλών εκκινητών (από τέσσερις έως έξι), οι οποίοι μπορούν να διακρίνουν έως και οκτώ συγκεκριμένες θέσεις στο πρότυπο DNA [84]. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στο LAMP είναι τα εξής:

- i) τα εσωτερικά ζεύγη εκκινητών, ο εμπρόσθιος εσωτερικός εκκινητής (FIP) και ο πίσω εσωτερικός εκκινητής (BIP)
- ii) τα εξωτερικά ζεύγη εκκινητών, εμπρόσθιος εξωτερικός εκκινητής (F3) και ο πίσω εξωτερικός εκκινητής (B3)
- iii) και τα προαιρετικά ζεύγη εκκινητών βρόχου, ο εμπρόσθιος εκκινητής βρόχου (FL) και ο πίσω εκκινητής βρόχου (BL)

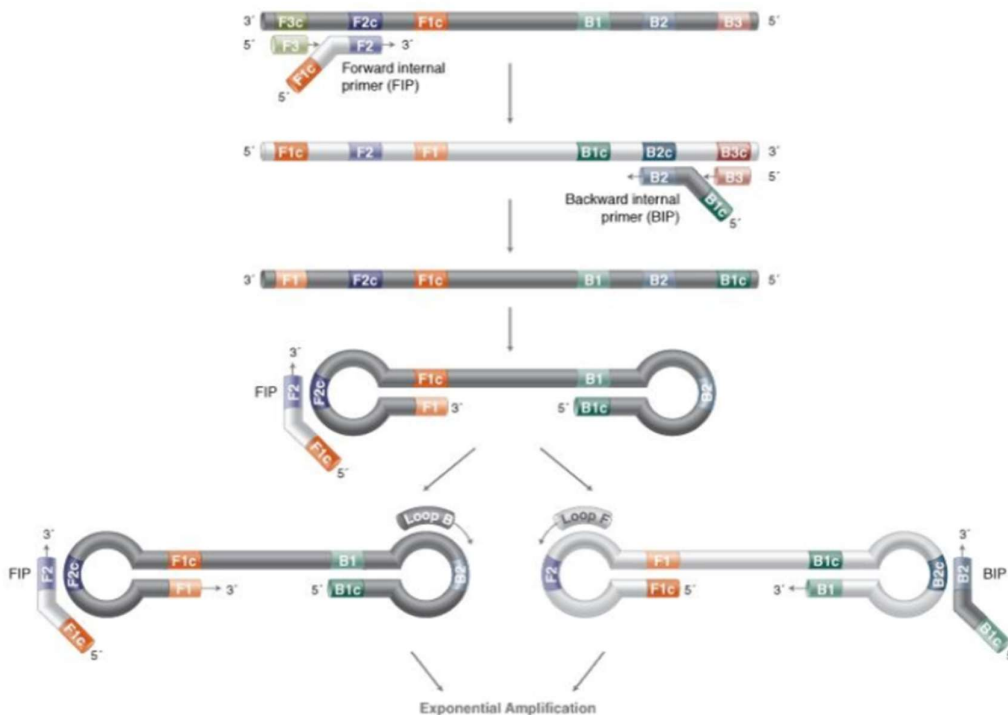


**Εικόνα 31** Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση LAMP. Το FIP (εμπρός εσωτερικός εκκινητής) περιέχει μια περιοχή F2 συμπληρωματική του F2c της μήτρας και μια ελεύθερη περιοχή F1c συμπληρωματική του F1 στον νεοσχηματισμένο κλώνο. Το BIP (προς τα πίσω εσωτερικός εκκινητής) περιέχει μια περιοχή B2 συμπληρωματική προς το B2c του προτύπου και μια ελεύθερη περιοχή B1c συμπληρωματική του B1 στον νεοσχηματισμένο κλώνο. Το F3 (εμπρός εξωτερικός εκκινητής) περιέχει μια περιοχή F3 συμπληρωματική του F3c του προτύπου. Το B3 (προς τα πίσω εξωτερικός εκκινητής) περιέχει την περιοχή B3 συμπληρωματική του B3c του προτύπου. Το FL (προς τα μπροστά εκκινητής βρόγχου) είναι συμπληρωματικό του μονόκλωνου βρόγχου μεταξύ των περιοχών F2 και F1. Το BL (προς τα πίσω εκκινητής βρόγχου) είναι συμπληρωματικό του μονόκλωνου βρόγχου μεταξύ των περιοχών B2 και B1.

Η τεχνική LAMP δεν περιλαμβάνει το στάδιο μετουσίωσης του DNA λόγω της υψηλής δραστηριότητας μετατόπισης κλώνου που παρουσιάζει στους 60-65 °C η Bst DNA πολυμεράση. Έτσι η αντίδραση μπορεί να διεξαχθεί σε ισοθερμικές συνθήκες, εξαλείφοντας την ανάγκη χρήσης θερμοκυκλωτή για

την ακριβή ρύθμιση των θερμικών και χρονικών σταδίων, κάτι που είναι απαραίτητο για την τεχνική PCR.

Η τεχνική LAMP μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια: την παραγωγή του υλικού έναρξης για την αντίδραση, την κυκλική ενίσχυση και την επιμήκυνση σε συνδυασμό με την ανακύκλωση. Το πιο σημαντικό βήμα στο πρώτο στάδιο είναι η παραγωγή ενός τεχνητού προτύπου με τη μορφή μονόκλωνου DNA με δομή που μοιάζει με αλτήρα.



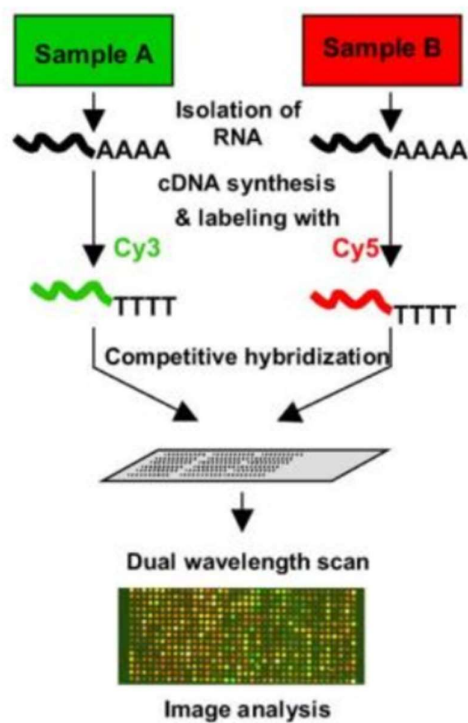
**Εικόνα 32** Η δομή αλτήρα στη μέθοδο Lamp

Με την πάροδο του χρόνου, εισήχθησαν διάφορες παραλλαγές του LAMP, συμπεριλαμβανομένης της ισοθερμικής ενίσχυσης με τη μεσολάβηση βρόχου αντίστροφης μεταγραφής (RT-LAMP), της ισοθερμικής ενίσχυσης με μεσολάβηση πολυπλεξικού βρόχου (M-LAMP) και της παρατήρησης του προϊόντος σε πραγματικό χρόνο. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του LAMP είναι η δυνατότητα γρήγορης ανίχνευσης θετικών προϊόντων χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους όπως η χρωματομετρική ανίχνευση με γυμνό μάτι [85] με χρήση φθορίζουσων χρωστικών (οι φθορίζουσες βαφές calcein, οι βαφές SYBR Green και το EvaGreen είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες για την ανίχνευση προϊόντων LAMP), η ακτινοβολία υπεριώδους φωτός, η ηλεκτροφόρηση γέλης αгарόζης, η θολότητα, ο φθορισμός σε πραγματικό χρόνο [86, 87]. Μεταξύ αυτών των μεθόδων, οι τυπικές μέθοδοι για την επιβεβαίωση της παρουσίας προϊόντων LAMP είναι η μέτρηση της θολότητας [88, 89] και οι χρωματομετρικές μέθοδοι με γυμνό μάτι [90, 91]. Η τεχνική LAMP είναι μια σχετικά απλή μέθοδος για την ανίχνευση συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών ωστόσο ο σχεδιασμός των εκκινητών είναι αρκετά δύσκολος και ακριβός, το προϊόν ενίσχυσης δεν μπορεί να υπερβαίνει το μήκος των 300 bp, ενώ η μη ειδική σύζευξη των εκκινητών βρόχου μπορεί να οδηγήσει σε ψεύδη αποτελέσματα.

### **2.3.3 Μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων DNA**

Οι μικροσυστοιχίες - microarrays, άρχισαν να εμφανίζονται και να εφαρμόζονται το 1995. Είναι μια τεχνολογία, η οποία εξελίσσεται με γοργούς ρυθμούς τα τελευταία χρόνια και μας παρέχει τη δυνατότητα να επιτύχουμε με ταχύτητα παράλληλα πειράματα υβριδοποίησης. Οι μικροσυστοιχίες ή τα *τσιπ* DNA είναι πλάκες πάνω στις οποίες στερεώνονται και ακινητοποιούνται μονόκλωνα τμήματα (ανιχνευτές) με τακτοποιημένο τρόπο και σε συγκεκριμένες περιοχές. Η αρχή της τεχνικής βασίζεται κυρίως στην ιδιότητα συμπληρωματικού υβριδισμού των νουκλεϊκών οξέων και στο γεγονός ότι οι ανιχνευτές στη *συστοιχία* παρουσιάζουν αλληλουχίες παρόμοιες με αυτές των γονιδίων ενδιαφέροντος.

Η αρχική μορφή των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν στις μικροσυστοιχίες ήταν cDNAs και η ανίχνευση γινόταν πάνω σε γυαλί. Καθώς η τεχνική εξελισσόταν στην πορεία άρχισαν να χρησιμοποιούνται βραχεία ολιγονουκλεοτίδια [92] 15-30 βάσεων σε αντικειμενοφόρο πλάκα πυριτίου αντι της γυαλινής. Κάθε ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής μπορεί να στοχεύσει ένα συγκεκριμένο σημείο μιας γονιδιακής αλληλουχίας. Στα υπό εξέταση δείγματα κομματιών νουκλεϊκού οξέος (DNA, cDNA ή mRNA) γίνεται επισημάνση με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες και στη συνέχεια διασπώνται με σκοπό τη δημιουργία μονόκλωνων θραυσμάτων. Τα μονόκλωνα θραύσματα που προκύπτουν θα υβριδοποιηθούν μέσω της σύνδεσης τους με τους αντίστοιχους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές. Η λήψη των αποτελεσμάτων γίνεται με την οπτικοποίηση του σήματος φθορισμού, το οποίο παράγεται από τη σύνδεση ανιχνευτή-μονόκλωνων θραυσμάτων. Η συγκέντρωση κάθε σημασμένου κομματιού νουκλεϊκού οξέος είναι ανάλογη με την ένταση φθορισμού. Η ολιγονουκλεοτιδική μικροσυστοιχία DNA εφαρμόζεται ευρέως στο τομέα ανίχνευσης παθογόνων στα τρόφιμα και ενδείκνυται για την ταυτόχρονη και ακριβή αναγνώριση αρκετών βακτηριακών τροφιμογενών παθογόνων. Είναι ικανή για την ανάλυση υψηλής απόδοσης και υπάρχει η δυνατότητα της αυτοματοποίησής της. [93]. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι είναι ισχυρή και εννοιολογικά απλή τεχνική, η χρήση της τεχνολογίας εξακολουθεί να είναι αρκετά περιορισμένη, κυρίως λόγω του υψηλού κόστους που σχετίζεται με την απόκτηση εξοπλισμού, *ισππ* και αντιδραστηρίων. Ένα άλλο σημείο που πρέπει να ληφθεί υπόψη για την χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής είναι η ανάγκη εφαρμογής ειδικών εργαλείων βιοπληροφορικής και στατιστικής ανάλυσης για τη διαχείριση και την ερμηνεία του τεράστιου ποσού των δεδομένων που δημιουργούνται.



**Εικόνα 33** Μικροσυστοιχίες – οπτικό αποτέλεσμα πάνω σε γυαλί



## 2.4 Μέθοδοι Αλληλούχησης Νουκλεϊκών Οξέων

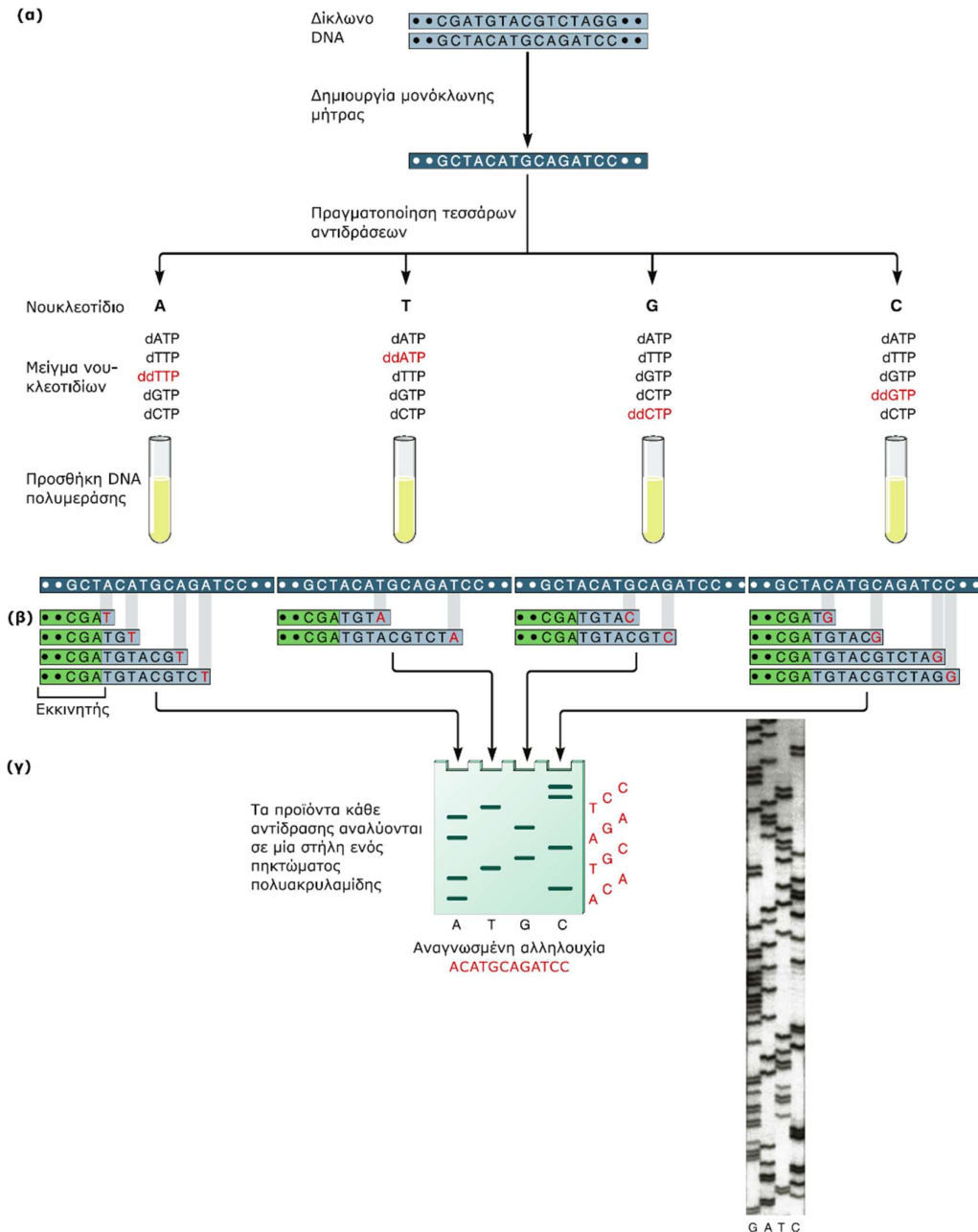
Με τη βοήθεια κατάλληλων τεχνικών μπορούμε να “διαβάσουμε” βάση προς βάση την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ενός τμήματος DNA ή RNA. Για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση νουκλεϊκού οξέος (DNA) το 1965 από τον Robert Holley, 12 χρόνια μετά από την ανακάλυψη της διπλής έλικας το 1953 από τους Watson JD και Crick FH. Στα τέλη της δεκαετίας του '70 και πιο συγκεκριμένα το 1977 αναφέρθηκαν δύο πρωτοποριακές μέθοδοι αλληλούχησης DNA.

### 2.4.1 Η μέθοδος Sanger

Η πρώτη και επικρατέστερη είναι η ενζυμική μέθοδος αλληλούχησης με τερματισμό επιμήκυνσης της αλυσίδας (chain termination) που στηρίζεται στη χρήση τροποποιημένων δεοξυνουκλεοτιδίων, των τριφωσφορικών 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs), τα οποία φέρουν υδρογόνο αντί υδροξυλίου στην 3' θέση της δεοξυριβόζης και ανακαλύφθηκε από τον βρετανό βιοχημικό Frederick Sanger και τους συνεργάτες του το 1977 [94]. Τα ddNTPs ενσωματώνονται φυσιολογικά κατά τη σύνθεση της νέας αλυσίδας DNA αλλά εμποδίζουν την ενσωμάτωση του επόμενου δεοξυνουκλεοτιδίου, επειδή δεν διαθέτουν την 3'-OH ομάδα, η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού. Για το κάθε νουκλεοτίδιο (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) πραγματοποιείται μια τροποποιημένη αντίδραση PCR επομένως πραγματοποιούνται 4 αντιδράσεις. Σε κάθε αντίδραση PCR προστίθεται το DNA προς αλληλούχηση, ένας εκκινητής, πολυμεράση, τα τέσσερα dNTPs και σε μικρή αναλογία ένα διαφορετικό κάθε φορά ddNTP. Το διδεοξυνουκλεοτίδιο ενσωματώνεται τυχαία σε διάφορες θέσεις του DNA, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα μίγμα τμημάτων DNA, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από τη θέση ενσωμάτωσης του ddNTP. Ο διαχωρισμός των μορίων των παραπάνω αντιδράσεων γίνεται με τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε

πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ο εντοπισμός των τμημάτων γίνεται με χρήση χρήση ραδιοσημασμένων ddNTPs.

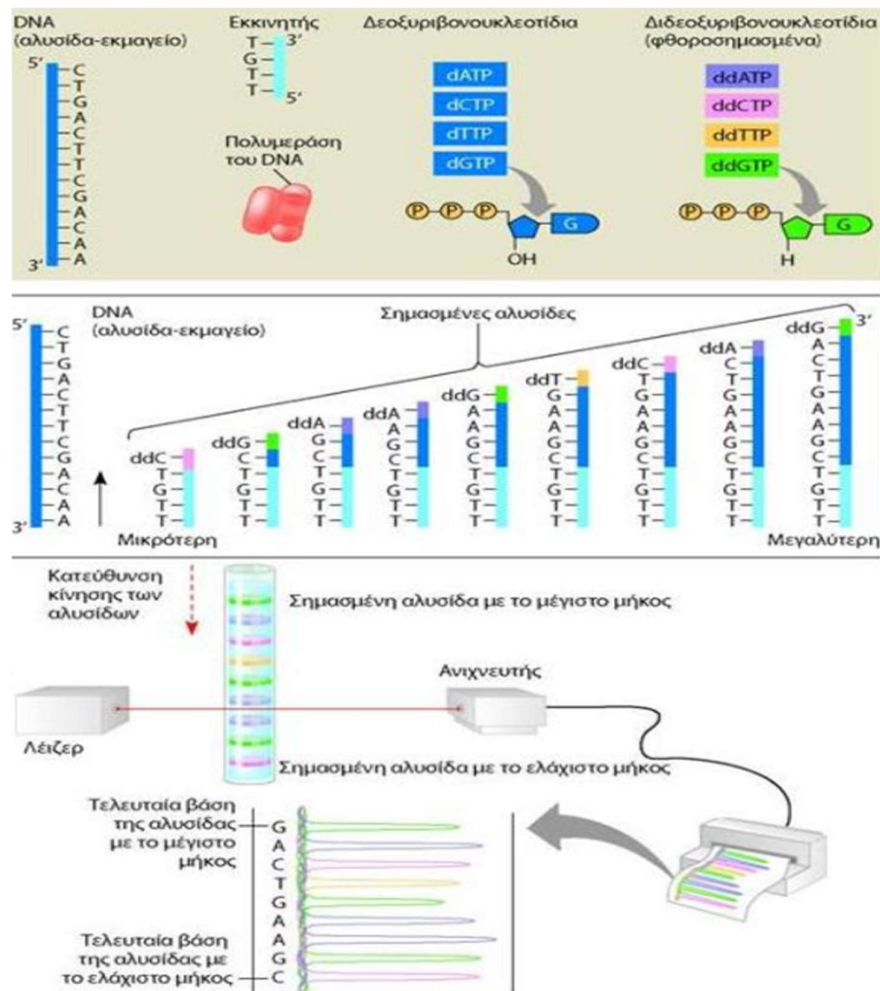
Το μέγεθος που επιτρέπει την ανάγνωση με εφαρμογή της εν λόγω τεχνικής είναι μικρότερο από 1000 βάσεις.



**Εικόνα 34** Η διαδικασία αλληλούχησης DNA με τη μέθοδο του Sanger που βασίζεται στη χρήση ραδιοσημασμένων διδεοξυνουκλεοτιδίων.

Από την πρώτη εφαρμογή της μεθόδου μέχρι σήμερα, η τεχνική τροποποιήθηκε σημαντικά. Το 1998 κυκλοφόρησε το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο αυτόματο σύστημα ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων με δύο βασικές αλλαγές:

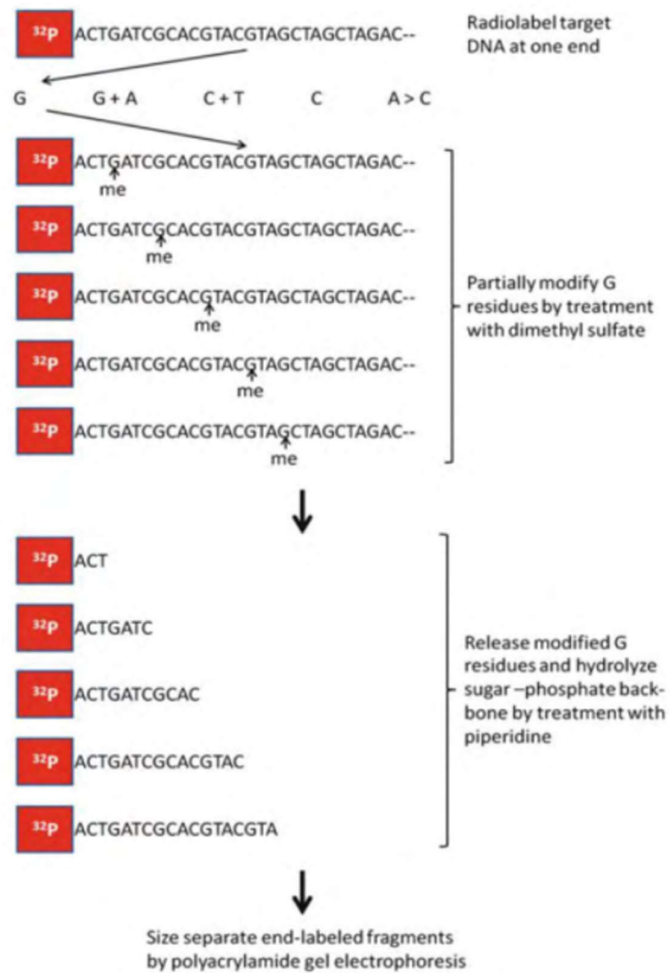
- i) Η χρήση φθοριζουσών χρωστικών ως μέσων σήμανσης των διδεοξυνουκλεοτιδίων [95]
- ii) Η χρήση τριχοειδών σωλήνων για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης



**Εικόνα 35** Η διαδικασία αλληλούχησης DNA με τη μέθοδο του Sanger που βασίζεται στη χρήση φθοριοσημασμένα διδεοξυνουκλεοτιδίων

### 2.4.2 Η μέθοδος της χημικής αποδόμησης των Maxam-Gilbert

Η δεύτερη η οποία όμως τελικά δεν βρήκε ευρεία εφαρμογή είναι η μέθοδος της χημικής αποδόμησης των Maxam-Gilbert [96]. Στην συγκεκριμένη μέθοδο αντίθετα με την μέθοδο Sanger που έχουμε σύνθεση της αλυσίδας DNA έχουμε αποδόμηση της αρχικής ακολουθίας του DNA. Αυτή η μέθοδος επέτρεπε τη χρήση απομονωμένου δείγματος δίκλωνου DNA χωρίς την περαιτέρω κλωνοποίηση. Το υπό αλληλούχιση τμήμα του DNA είναι ραδιοσημασμένο στο ένα άκρο του και σπάει σε τέσσερις ξεχωριστές χημικές αντιδράσεις. Η κάθε αντίδραση είναι ειδική για μια συγκεκριμένη βάση (A, T, G, C). Έτσι δημιουργούνται τέσσερις πληθυσμοί ραδιοσημασμένων μορίων DNA που ξεκινούν από ένα κοινό σημείο, το ραδιοσημασμένο άκρο, μέχρι τη θέση που έχει συμβεί το κόψιμο. Ο πληθυσμός αυτός αποτελείται από μόρια διαφορετικού μήκους ανάλογος της θέσης που συμβαίνει το κόψιμο στην αρχική αλυσίδα του DNA. Η ανάλυση γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τα ραδιοσημασμένα μόρια ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία. Αυτή η μέθοδος έγινε λιγότερο δημοφιλής λόγω της πολυπλοκότητάς της και της χρήσης επικίνδυνων χημικών ουσιών [97].



**Εικόνα 36** Διαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου Maxam-Gilbert

### 2.4.3 Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς - Next Generation Sequencing (NGS)

Η ανάγκη της έρευνας και της διαγνωστικής για αλληλούχηση μεγαλύτερων περιοχών DNA (ή ακόμα και ολόκληρων γονιδιωμάτων) σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, σε σύντομο χρονικό διάστημα και με λογικό κόστος, οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών αλληλούχησης. Ο προσδιορισμός αλληλουχίας επόμενης γενιάς (NGS) είναι όρος που περιγράφει μια τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας DNA που έχει φέρει επανάσταση στη γονιδιωματική έρευνα. Είναι μια σύγχρονη τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχιών DNA που επιτρέπει την ταχεία παράλληλη αλληλούχηση μεγάλων ποσοτήτων DNA. Τα πρώτα εμπορικά διαθέσιμα μηχανήματα **αλληλούχησης επόμενης γενιάς** εμφανίστηκαν το 2005. Σήμερα είναι εμπορικά διαθέσιμες αρκετές(τουλάχιστον τέσσερις) διαφορετικές πλατφόρμες. Καθεμιά από αυτές χρησιμοποιεί διαφορετική χημεία και διαφορετικό τρόπο ανίχνευσης της αλληλουχίας των βάσεων του DNA αλλά κοινό χαρακτηριστικό όλων είναι η ταυτόχρονη αλληλούχηση πολλών μορίων DNA και στη συνέχεια η συναρμολόγηση των επιμέρους αλληλουχιών. Η εφαρμογή της τεχνολογίας NGS στις διαφορετικές πλατφόρμες μετά από την συλλογή του μορίου στόχος μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερα βήματα:

#### 1. Κατακερματισμός DNA

Το μόριο στόχος κατακερματίζεται σε πολλά μικρά τμήματα συγκεκριμένου μεγέθους, συνήθως μήκους 100-300 bp. Για να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιούνται διάφοροι μέθοδοι. Το DNA μπορεί να κατακερματιστεί με τη χρήση μηχανικών μεθόδων, ενζυμικών(πέψη) ή και άλλων μεθόδων. Για παράδειγμα η χρήση υπέρηχων είναι μία από τις μεθόδους που μπορεί να διασπάσει σε μικρά τμήματα το DNA

## **2. Δημιουργία γονιδιωματικής βιβλιοθήκης**

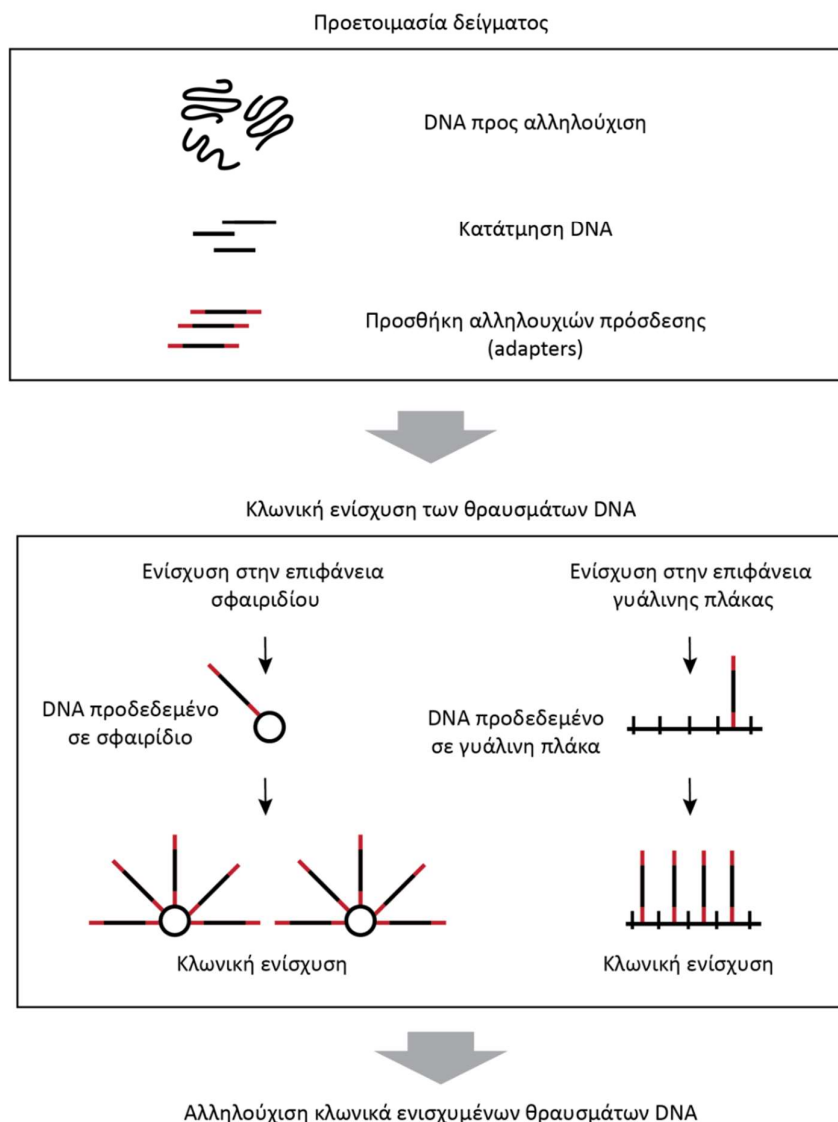
Κατά την δημιουργία γονιδιωματικής βιβλιοθήκης στα άκρα των θραυσμάτων DNA που δημιουργήθηκαν από τον κατακερματισμό του μορίου στόχος προστίθενται αλληλουχίες πρόσδεσης (adapters) με γνωστή αλληλουχία. Στη συνέχεια τα θραύσματα αυτά προσδένονται σε ένα στερεό υπόστρωμα όπου και ενισχύονται. Το υπόστρωμα μπορεί να είναι είτε η επιφάνεια ενός σφαιριδίου (emulsion PCR) είτε η επιφάνεια μιας γυάλινης πλάκας (bridge amplification). Κάθε προσδεμένο μόριο DNA αποτελεί μια ανεξάρτητη θέση ενίσχυσης.

## **3. Αλληλούχηση**

Μετά την πρόσδεση και την ενίσχυση των θραυσμάτων DNA που απαρτίζουν τη βιβλιοθήκη θραυσμάτων ακολουθεί η διαδικασία της αλληλούχησης ταυτόχρονα για όλα τα θραύσματα DNA. Γίνεται προσθήκη κάθε φορά ενός διαφορετικού νουκλεοτιδίου και έπειτα ανίχνευση όσων νουκλεοτιδίων ενσωματώθηκαν σε κάθε θραύσμα. Στη συνέχεια ακολουθεί έκπλυση των μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων και κυκλική επανάληψη των παραπάνω βημάτων μέχρι την ολοκλήρωση της αλληλούχησης των θραυσμάτων DNA.

## **4. Βιοπληροφορική ανάλυση και ερμηνεία δεδομένων**

Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας γίνεται ανάλυση των αλληλουχιών που προκύπτουν γίνεται με ειδικούς αλγόριθμους και οι πληροφορίες αλληλούχησης συγκρίνονται με μια αλληλουχία αναφοράς.



**Εικόνα 37** Αλληλούχιση επόμενης γενιάς. Διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων προκειμένου να υποβληθούν σε αλληλούχιση επόμενης γενιάς. Το DNA κατατμύεται σε θραύσματα επιθυμητού μεγέθους. Στα άκρα των θραυσμάτων προστίθενται γνωστές αλληλουχίες πρόσδεσης. Τα θραύσματα ακινητοποιούνται μέσω των αλληλουχιών πρόσδεσης σε στερεό υπόστρωμα (επιφάνεια σφαιριδίου ή γυάλινη πλάκα). Τα ακινητοποιημένα θραύσματα υφίστανται πολλαπλασιασμό (κλωνική ενίσχυση) με τη μέθοδο της PCR. Τα ενισχυμένα θραύσματα είναι έτοιμα προς αλληλούχιση.



Στον τομέα της ανίχνευσης και ταυτοποίησης παθογόνων μικροοργανισμών με τη χρήση της τεχνολογίας NGS υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί. Συγκεκριμένα το κόστος, η πολυπλοκότητα, ο μεγαλύτερος χρόνος διεκπεραίωσης σε σχέση με άλλες τεχνικές (PCR), η ευαισθησία στη μόλυνση, η έλλειψη τυποποιημένων πρωτοκόλλων είναι κάποιοι από αυτούς.

Από τις πλατφόρμες NGS που ξεχωρίζουν μέχρι σήμερα είναι:

#### **i) Roche 454 pyrosequencing**

Το Roche 454 pyrosequencing by synthesis (SBS) ήταν το πρώτο εμπορικά επιτυχημένο σύστημα αλληλούχισης δεύτερης γενιάς που αναπτύχθηκε από την 454 Life Sciences το 2005 [98]. Η συγκεκριμένη τεχνολογία στηρίζεται στον υπολογισμό της φωταύγειας που δημιουργείται κατά τη διάρκεια σχηματισμού πυροφωσφορικών αλάτων κατά την διάρκεια της αλληλούχισης με την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA [99]. Όταν ένα νουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό με την μήτρα, ενσωματώνεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα από την πολυμεράση συνοδευόμενη από ισομοριακή απελευθέρωση ενός πυροφωσφορικού. Το μεγάλο πλεονέκτημα του pyrosequencing είναι το μέγεθος των διαβασμάτων [100]. Αν και η συγκεκριμένη τεχνολογία έχει υψηλή απόδοση το υψηλό κόστος των αντιδραστηρίων, η αδυναμία αλληλούχισης ομοπολυμερών ακολουθιών όπως τα polyAs και η απόφαση της εταιρείας να μην υποστηρίζει από το 2016 την συγκεκριμένη πλατφόρμα είναι από τα βασικά μειονεκτήματα [101].

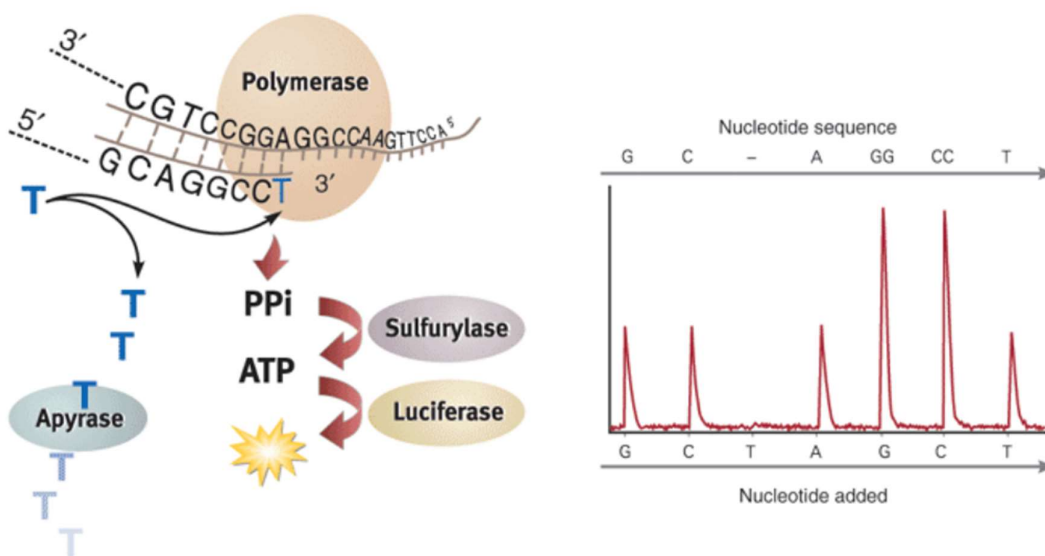
#### **ii) Illumina (Solexa) HiSeq and MiSeq sequencing**

Η τεχνολογία αλληλούχισης της Solexa, διαθέσιμη από το 2006. Η Illumina αγόρασε το Solexa Genome Analyzer το 2006 και το έκανε εμπορικά διαθέσιμο το 2007. Η αρχή βασίζεται στην αλληλούχιση «κατά την σύνθεση» χρησιμοποιώντας φθορίζοντα, σημασμένα νουκλεοτίδια τερματισμού αλυσίδας που είναι σε θέση να παράγουν μεγαλύτερη απόδοση με χαμηλότερο κόστος αντιδραστηρίου και σε πολύ λιγότερο χρόνο. Ένας σημαντικός περιορισμός της μεθόδου είναι τα μικρά μήκη ανάγνωσης, συνήθως μέχρι 300 ζεύγη βάσεων, τα οποία περιπλέκουν τη

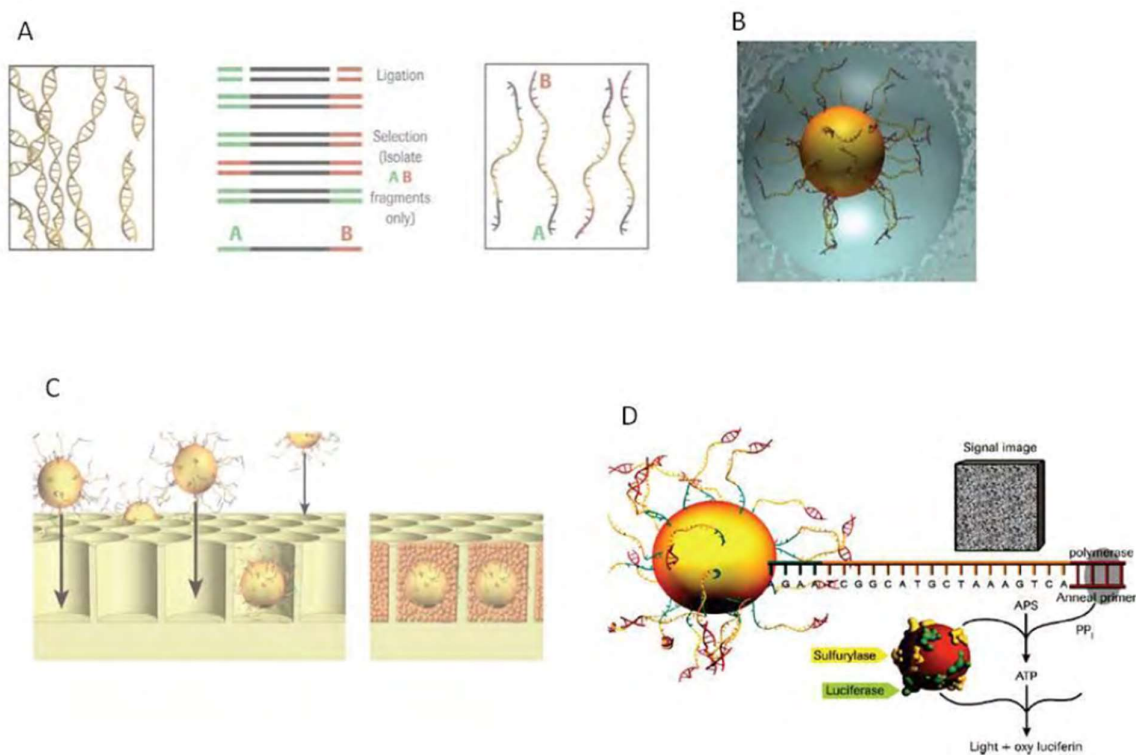
συναρμολόγηση των γονιδιωμάτων με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και το υψηλό κόστος για τη δημιουργία μιας πλατφόρμας Illumina.

### iii) Ion Torrent Sequencing

Η τεχνολογία Ion Torrent αναπτύχθηκε από τους εφευρέτες της 454 sequencing [102]. Το 2010, η Ion Torrent κυκλοφόρησε στην αγορά το PGM (Personal Genome Machine). Χρησιμοποιεί την τεχνολογία αλληλούχισης ημιαγωγού (semiconductor sequencing technology). Λειτουργεί με βάση μια μοναδική αρχή που περιλαμβάνει την ανίχνευση ιόντων υδρογόνου που απελευθερώνονται κατά τη σύνθεση του DNA μέσω αλλαγών που παρατηρούνται στο pH (κατά την ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου από την πολυμεράση στην έλικα του DNA απελευθερώνεται ένα πρωτόνιο). Η αντίδραση προσδιορισμού αλληλούχισης πραγματοποιείται εντός ενός microchip που συνδυάζεται με κυψελίδες ροής και ηλεκτρονικούς αισθητήρες στο κάτω μέρος κάθε κυψέλης. Η κάθε ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων μετατρέπεται σε ηλεκτρονικό σήμα για να ανιχνευθεί από τους ηλεκτρονικούς αισθητήρες της κυψέλης. Δεν χρειάζονται κάμερες για την ανίχνευση των νουκλεοτιδίων, ούτε χρωστικές για την αλληλούχιση των τμημάτων, ούτε τροποποιήσεις των νουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα να μειώνεται το κόστος και να γίνεται πιο απλή η διαδικασία της αλληλούχισης.

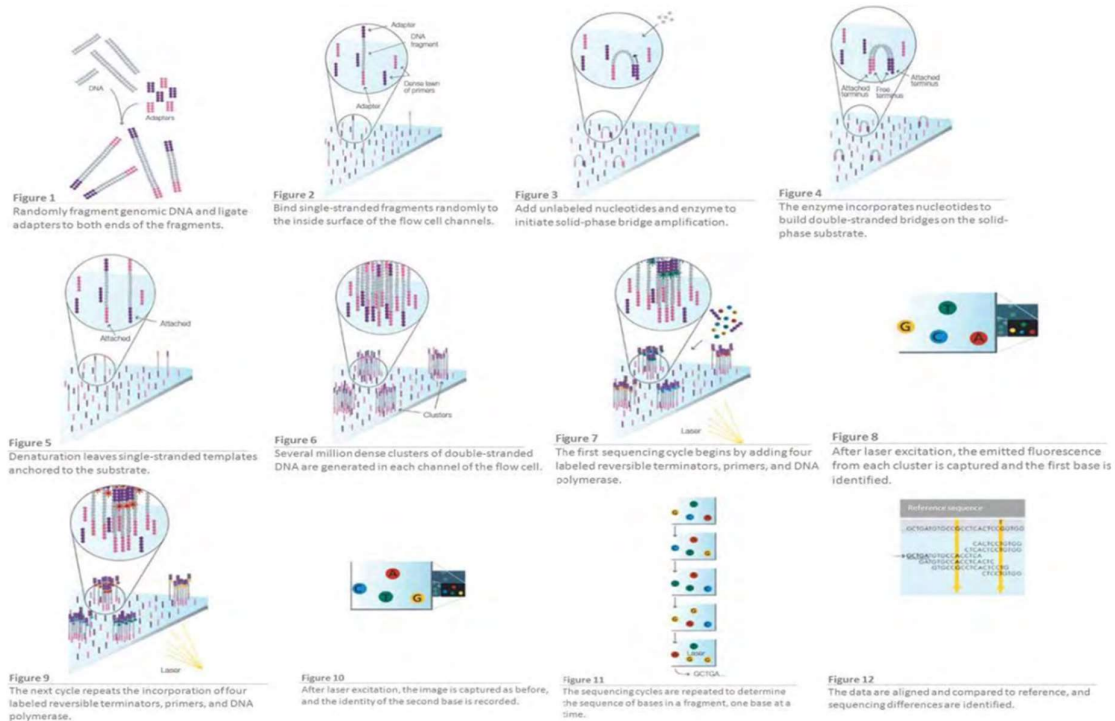


**Εικόνα 38** Πυροαλληλούχιση



**Εικόνα 39** Σύνοψη της λειτουργίας του Roche/454

- A** Προετοιμασία της ss cDNA βιβλιοθήκης,
- B** Μοναδιαία ενίσχυση των τμημάτων σε γαλάκτωμα,
- C** Εναπόθεση των σφαιριδίων στην πλάκα PicoTiterPlate,
- D** Αλληλούχιση κατά την σύνθεση ([www.454.com](http://www.454.com))



## Εικόνα 40 Σύνοψη της λειτουργίας της πλατφόρμας Illumina

1. Προετοιμασία του δείγματος DNA, 2. Προσκόλληση των τμημάτων στην επιφάνεια, 3. Ενίσχυση με bridge PCR, 4. Δημιουργία δίκλωνων τμημάτων, 5. Αποδιάταξη αυτών, 6. Ενίσχυση, 7. Προσδιορισμός πρώτης βάσης, 8. Καταγραφή σήματος, 9. Προσδιορισμός δεύτερης βάσης, 10. Καταγραφή σήματος, 11. Αλληλούχηση μετά από πολλούς κύκλους, 12. Στοιχισμός αποτελεσμάτων. (www.illumina.com)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ

### ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ *Shigella* και *Listeria*

### *monocytogenes*

#### Σύγκριση μεταξύ Καλλιέργειας και Multiplex PCR για την ανίχνευση και αναγνώριση των ειδών *Shigella*

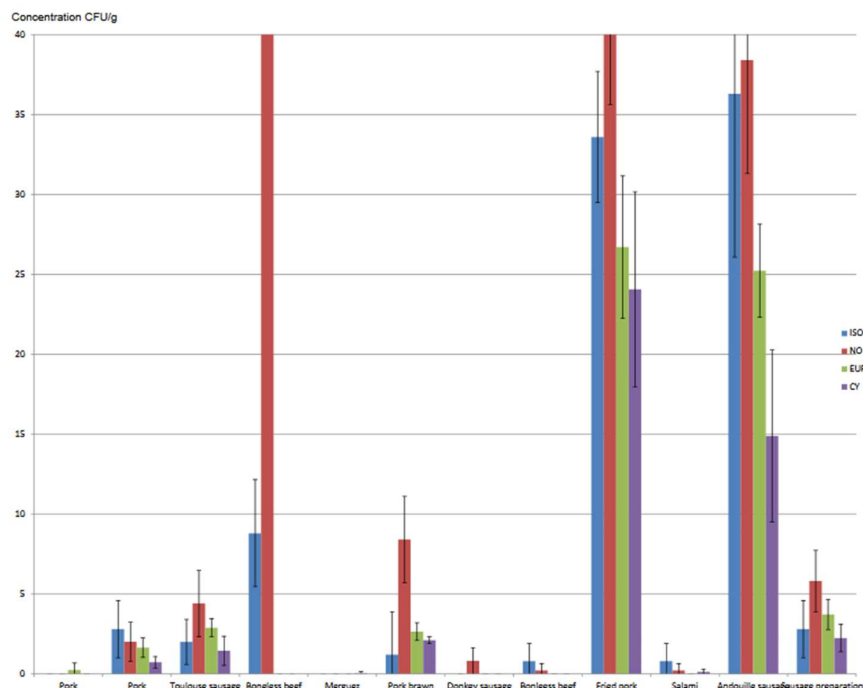
Bacterial strains	No. of specimen tested (%)	No. of specimen tested (%)
	PCR Method	Culture Method
<i>Shigella</i> genus	260 (86.7%)	240 (80%)
<i>S. flexneri</i>	200 (77%)	184 (76.6%)
<i>S. sonnei</i>	50 (19.2%)	46 (19.1%)
<i>S. dysenteriae</i>	10 (3.8%)	10 (4%)
Unidentified	40 (13.3%)	20 (6.6%)
Other Gram-negative	-	40 (13.4%)
Total No.	300	300

Η γνώση των ειδών *Shigella* έχει ιδιαίτερη σημασία για την αντιμετώπιση μιας επιδημίας, τον έλεγχο της και τη θεραπεία των ασθενών. Στον παραπάνω πίνακα βλέπουμε τα αποτελέσματα μεταξύ της καλλιεργητικής μεθόδου για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των ειδών *shigella*. Σε σύνολο 300 δειγμάτων από ασθενείς που αναλύθηκαν 240 *Shigella* που απομονώθηκαν (80%) ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο καλλιέργειας και την οροτυποποίηση, ενώ 260 (86,6%) χρησιμοποιώντας

τη μέθοδο PCR. Επιπλέον 20 δείγματα στη μέθοδο καλλιέργειας αλλά δεν αναγνωρίστηκαν μέσω της οροτυποποίησης ωστόσο, στη μέθοδο PCR αναγνωρίστηκαν ως *S. flexneri* (n=16) και *S. sonnei* (n=4)[103]. Λαμβάνοντας υπόψιν και τον χρόνο που χρειάζεται η κάθε μέθοδος για την αναγνώριση και ταυτοποίηση των παθογόνων βακτηρίων (καλλιεργητική μέθοδος 4-7 ημέρες, PCR 2-3 ώρες) κατανοούμε τον λόγο για την ανάπτυξη και χρήση νέων τεχνικών σε ευρεία κλίμακα και πιο συγκεκριμένα για την μέθοδο της PCR. Παρόλα τα πλεονεκτήματα της PCR όμως η χρήση της περιορίζεται ακόμη στο 10% περίπου έναντι 90% περίπου της καλλιεργητικής μεθόδου για λόγους κόστους (η PCR είναι περίπου 10 φορές πιο ακριβή).

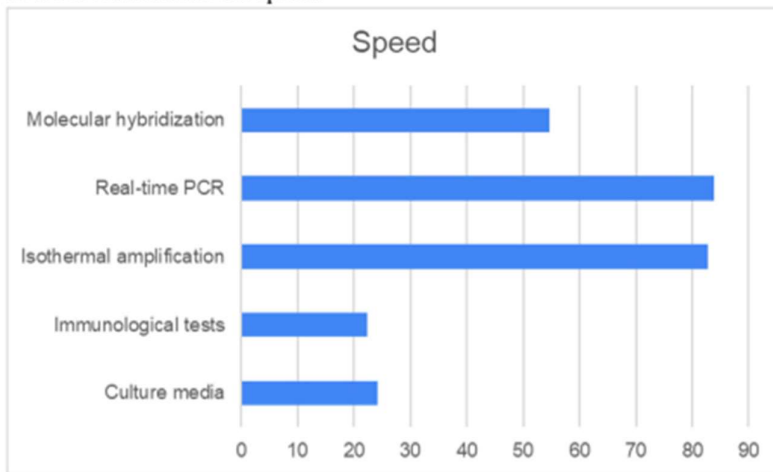
## Σύγκριση μεθόδων για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes*

Comparison of enumeration results for *Listeria monocytogenes* obtained using the alternative methods (EURL, Cyprus (CY) and Norway (NO)) and the modified reference method (ISO) on naturally contaminated meat products (mean and standard deviation).



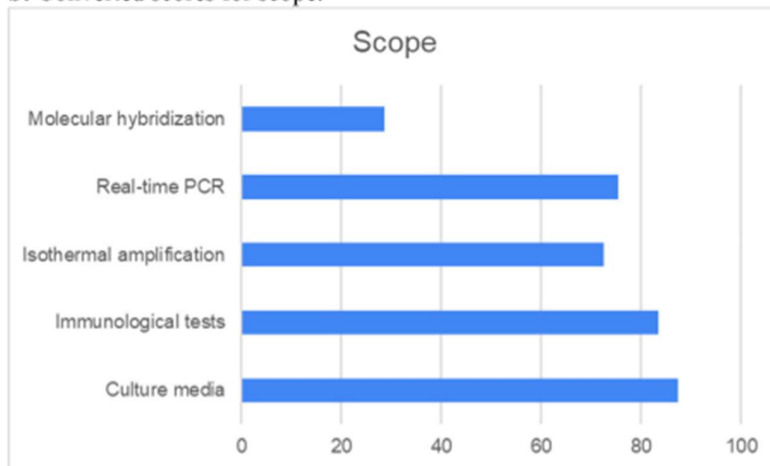
Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε τη σύγκριση της μεθόδου ISO και τριών τροποποιήσεων της για την απαρίθμηση χαμηλών συγκεντρώσεων του *Listeria monocytogenes* σε φυσικά μολυσμένα τρόφιμα (0,2-80 CFU/g). Όλες οι τέσσερις δοκιμασμένες μέθοδοι παρήγαγαν έγκυρα αποτελέσματα με καλή επαναληψιμότητα. Το πρωτόκολλο Norway λειτουργεί δίνοντας καλύτερα αποτελέσματα και είναι πιο γρήγορο σε χρόνο [104]. Στα παρακάτω διαγράμματα παρατηρούμε συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ μεθόδων για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes*

**a:** Converted scores for speed.



### a. Σκορ για την ταχύτητα

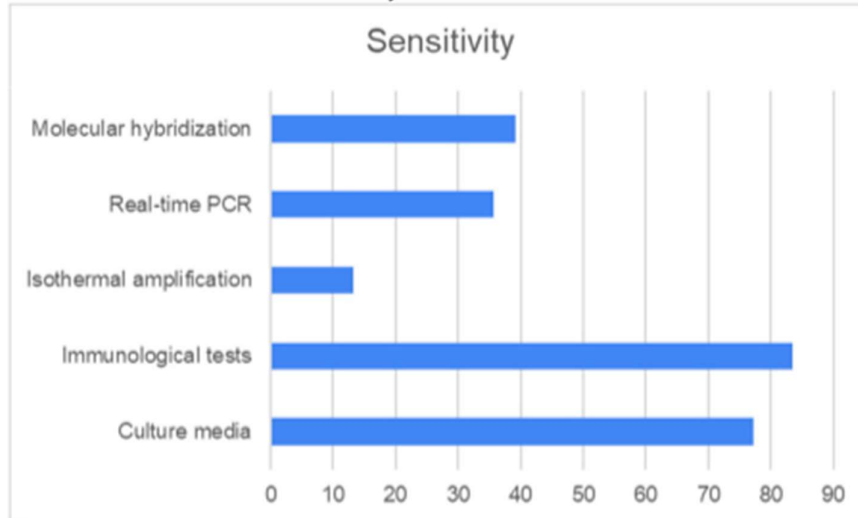
**b:** Converted scores for scope.



### b. Σκορ για το εύρος

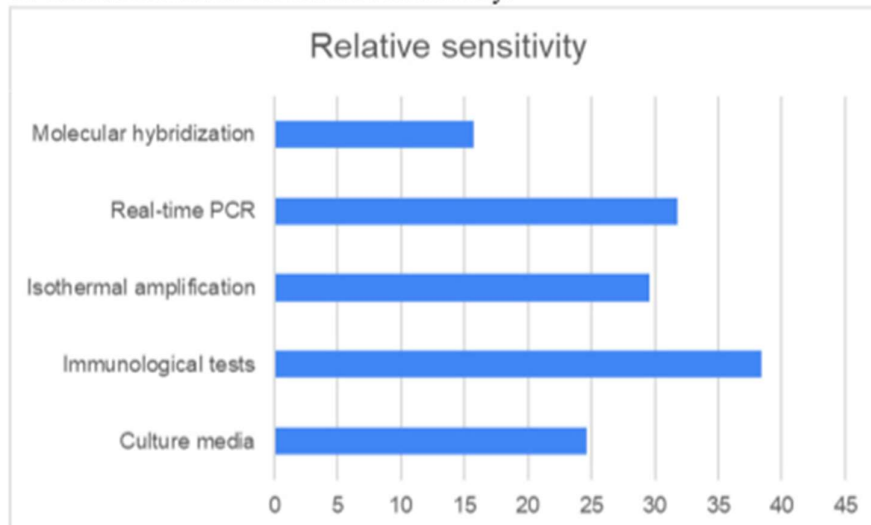


c: Converted scores for sensitivity.



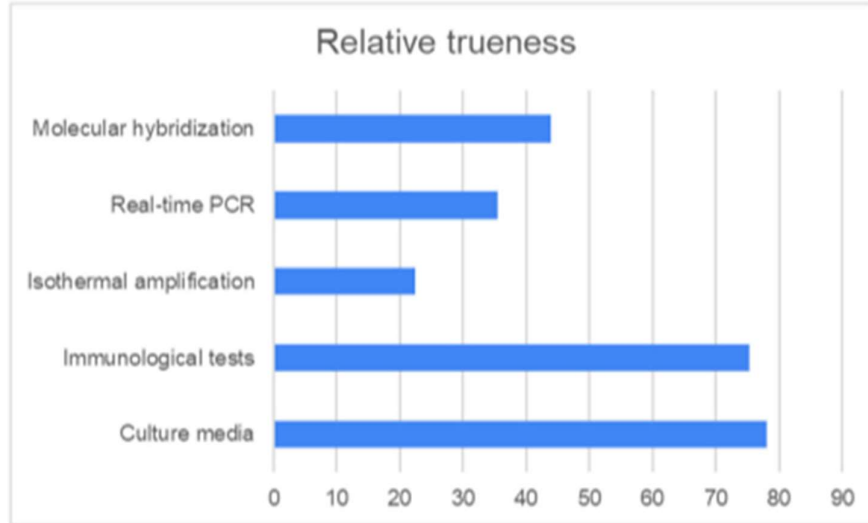
c. Σκορ για την ευαισθησία

d: Converted scores for relative sensitivity.



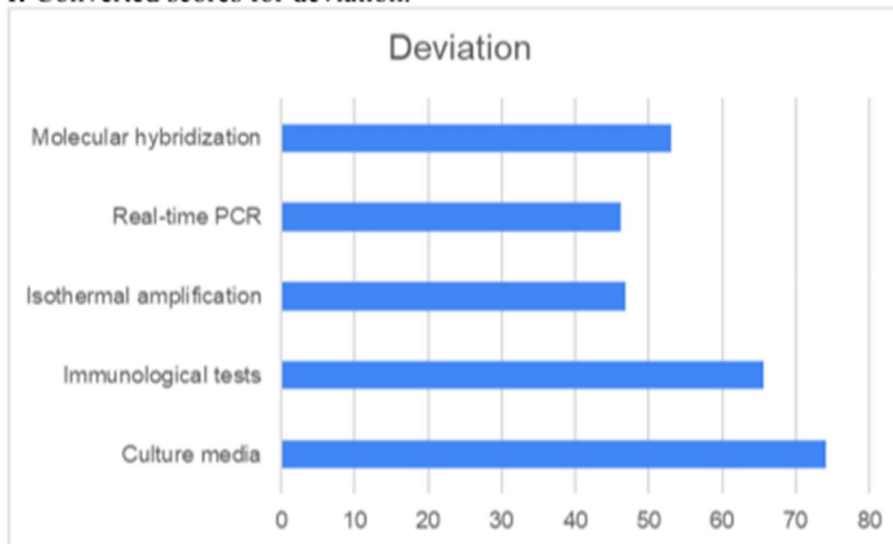
d. Σκορ για τη σχετική ευαισθησία

**e:** Converted scores for relative trueness.



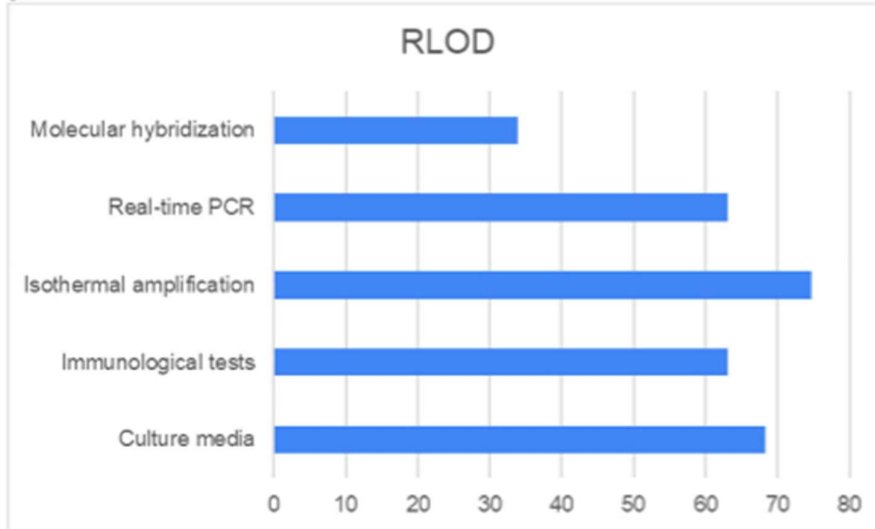
**ε.** Σκορ για τη σχετική αλήθεια

**f:** Converted scores for deviation.



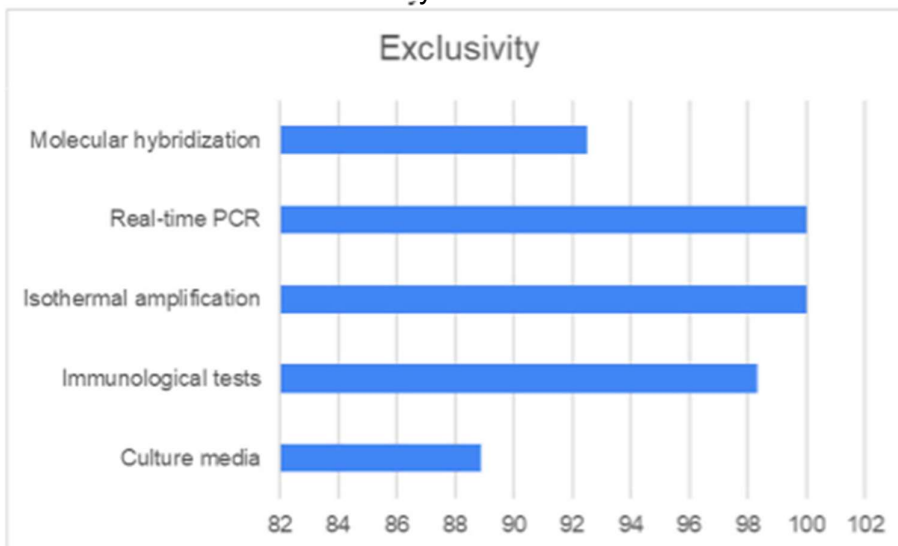
**φ.** Σκορ για την απόκλιση

g: Converted scores for RLOD.



g. Σκορ για το RLOD.

i: converted score for exclusivity



ι. Σκορ για την αποκλειστικότητα.

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η επιβίωση του ανθρώπου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την κατανάλωση τροφής. Η ασφάλεια των τροφίμων είναι αυτή που μπορεί να δώσει στον άνθρωπο τη δυνατότητα να μπορεί να καταναλώνει άφοβα τα απαραίτητα για την επιβίωση του στοιχεία απαλλαγμένα από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στη βιομηχανία μας θυμίζει διαρκώς τη σημασία της συνεχούς παρακολούθησης και ανίχνευσης τους με σκοπό τη διασφάλιση της ασφάλειας τροφίμων. Τόσο η ανίχνευση όσο και η πρόληψη των παθογόνων μικροοργανισμών στη βιομηχανία τροφίμων είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία της δημόσιας υγείας. Ο έγκαιρος και έγκυρος προσδιορισμός των τροφιμογενών παθογόνων είναι ζωτικής σημασίας προκειμένου να αποφευχθούν τροφικές λοιμώξεις. Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί στη διάρκεια του χρόνου είναι πολλές και μας παρέχουν τεράστιες δυνατότητες στην ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση παθογόνων που μπορούν να προκαλέσουν αυτές τις λοιμώξεις. Τόσο οι συμβατικές όσο και οι προηγμένες μέθοδοι φέρουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Έτσι η επιλογή της εκάστοτε μεθόδου πρέπει να γίνεται πάντοτε με γνώμονα την ακρίβεια, την αξιοπιστία, το κόστος, την αποδοτικότητα την επιλεκτικότητα ως προς ένα συγκεκριμένο παθογόνο, καθώς και να είναι ταχύτατη με σκοπό τη λήψη ορθών αποτελεσμάτων. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην καλλιέργεια μικροοργανισμών αναφορικά με τον προσδιορισμό τους καθίστανται αρκετά χρονοβόρες. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί και αναπτύσσονται ταχύτατες μέθοδοι ανίχνευσης. Οι γρήγορες μέθοδοι είναι απαραίτητες για τον ταχύτατο προσδιορισμό των τροφιμογενών παθογόνων. Οι μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων που αναφέρθηκαν, διαθέτουν υψηλή ευαισθησία και εφαρμόζονται σε ευρεία κλίμακα για τον προσδιορισμό παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Παρόλα αυτά οι συγκεκριμένες μέθοδοι απαιτούν άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό καθώς και εξειδικευμένα όργανα αυξάνοντας το κόστος. Εναλλακτική μέθοδος ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων που εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό τροφιμογενών παθογόνων είναι η LAMP. Η LAMP είναι εξειδικευμένη μέθοδος, ευαίσθητη και οικονομικά αποδοτικότερη.

Οι ανοσολογικές μέθοδοι (ELISA, ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής) εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό παθογόνων βακτηρίων παρέχοντας μας γρήγορη και εύκολη ανίχνευση. Οι μικροσυστοιχίες είναι μέθοδος ευαίσθητη και μας δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης δειγμάτων παράλληλα με άλλα δείγματα προς εξέταση. Είναι μέθοδος αυτοματοποιημένη γεγονός το οποίο καθιστά ελάχιστα τα σφάλματα από λάθος ανθρώπινο χειρισμό. Τα εύθραυστα υλικά και το μεγάλο κόστος της μεθόδου αποτελούν κάποια από τα μειονεκτήματα της. Η NGS μας έχει δώσει σημαντικά στοιχεία για τις αλληλουχίες DNA και RNA των παθογόνων και θεωρείται πολλά υποσχόμενη τεχνική για το μέλλον. Αυτή η μέθοδος έχει τη δυνατότητα να παρέχει γρήγορα αποτελέσματα με υψηλή ακρίβεια. Στα μειονεκτήματα της συγκαταλέγονται το κόστος της μεθόδου, το εξειδικευμένο προσωπικό και οι υποδομές που χρειάζονται για την χρήση της. Στο μέλλον και περιμένουμε να αναπτυχθούν ακόμα πιο ευαίσθητες μέθοδοι, πολύ πιο γρήγορες και με μικρότερο κόστος, οι οποίες θα επιτρέπουν την ανίχνευση των παθογόνων ακόμα και εκτός εργαστηρίου. Βέβαια για την αποφυγή των εξάρσεων τροφιμογενούς φύσης σημαντικό ρόλο έχει η πρόληψη και για αυτό το λόγο θα πρέπει τα τρόφιμα προς κατανάλωση, από την καλλιέργεια, την συλλογή, την επεξεργασία και την διάθεση τους, να πληρούν όλες τις υγειονομικές προϋποθέσεις, ο χειρισμός τους να γίνεται βάση των οδηγιών δημόσιας υγείας, ώστε να ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες έκθεσης των καταναλωτών σε παθογόνα.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- [1] Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας. 2015. Εκτιμήσεις ΠΟΥ για το παγκόσμιο βάρος των τροφιμογενών ασθενειών: Ομάδα αναφοράς επιδημιολογικής επιβάρυνσης τροφιμογενών νοσημάτων 2007–2015 . Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, Γενεύη, Ελβετία. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf)
- [2] CDC, Τι είναι η επιδημία τροφιμογενούς ασθένειας και γιατί εμφανίζονται, 2012. Διαθέσιμο από: <http://www.cdc.gov/foodsafety/facts.html#whatisanoutbreak>.
- [3] Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. (1999): Ασθένειες και θάνατος που σχετίζονται με τα τρόφιμα στις Ηνωμένες Πολιτείες . *Emerg Infect Dis* 5: 607–625. doi: 10.3201/eid0505.990502
- [4] FDA, Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, Second Edition, 2012. Διαθέσιμο από: <http://www.cdc.gov/foodsafety/facts.html#whatisanoutbreak>.
- [5] IFT (2004) Βακτήρια που σχετίζονται με τροφιμογενείς ασθένειες. Ινστιτούτο Τεχνολόγων Τροφίμων-Περίληψη Επιστημονικής Κατάστασης. Αύγουστος 2004: 1–25.
- [6] Κινητικότητα του *Shigella flexneri* 2a εντός κυττάρου ιστοκαλλιέργειας
- [7] Trofa AF, Ueno-Olsen H, Oiwa R, Yoshikawa M. 1999. Dr. Kiyoshi Shiga: ανακάλυψε τον βάκιλο της δυσεντερίας. *Clin Infect Dis* 29: 1303–1306 10.1086/313437.
- [8] Sasakawa C. 2010. Ένα νέο παράδειγμα αλληλεπίδρασης βακτηρίων-εντέρου που προέκυψε μέσω της μελέτης του *Shigella* . *Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci* 86: 229–243.
- [9] Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. 2010. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* , 7η έκδ. Churchill Livingstone/Elsevier, Φιλαδέλφεια, PA.
- [10] Muthuirulandi Sethuvel DP, Devanga Ragupathi NK, Anandan S, Veeraraghavan B. 2017. Ενημέρωση σχετικά με: *Shigella* new serogroups/serotypes and their antimicrobialproof. *Lett Appl Microbiol* 64: 8–18 10.1111/lam.12690
- [11] DuPont HL, Levine MM, Hornick RB, Formal SB. 1989. Μέγεθος εμβολίου στη σιγκέλλωση και επιπτώσεις για τον αναμενόμενο τρόπο μετάδοσης. *J Infect Dis* 159: 1126–1128.
- [12] Bardhan P, Faruque a SG, Naheed A, Sack D a. Μείωση των θανάτων που σχετίζονται με σιγκέλλωση χωρίς ειδικές παρεμβάσεις *Shigella* spp., Ασία. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:1718–1723.

**[13]** Kotloff KL, Blackwelder WC, Nasrin D, et al. Η Παγκόσμια Εντερική Πολυκεντρική Μελέτη (GEMS) της διαρροϊκής νόσου σε βρέφη και μικρά παιδιά στις αναπτυσσόμενες χώρες: επιδημιολογικές και κλινικές μέθοδοι της μελέτης περίπτωσης/ελέγχου. *Clin Infect Dis* 2012; 55 Suppl 4:S232–S245.

**[14]** Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, et al. Επιβάρυνση και αιτιολογία της διαρροϊκής νόσου σε βρέφη και μικρά παιδιά στις αναπτυσσόμενες χώρες (η Παγκόσμια Εντερική Πολυκεντρική Μελέτη, GEMS): μια προοπτική, μελέτη περίπτωσης ελέγχου. *Lancet* 2013; 382:209-222.

**[15]** Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omoro R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM. 2013. Επιβάρυνση και αιτιολογία της διαρροϊκής νόσου σε βρέφη και μικρά παιδιά στις αναπτυσσόμενες χώρες (η Παγκόσμια Εντερική Πολυκεντρική Μελέτη, GEMS): μια προοπτική, μελέτη περίπτωσης ελέγχου. *Lancet* 382: 209–222. 10.1016/S0140-6736(13)60844-2.

**[16]** Indrawattana N., Nibaddhasobon T., Sookrung N., Chongsanguan M., Tungtrongchitr A., Makino S., et al. , 2011, «Επικράτηση της *Listeria monocytogenes* σε ωμά κρέατα που διατίθενται στο εμπόριο στη Μπανγκόκ και χαρακτηρισμός των απομονώσεων με φαινοτυπικές και μοριακές μεθόδους», *Journal of Health, Population and Nutrition* 29(1), 26–38. 10.3329/jhpn.v29i1.7565

**[17]** Cepeda JA, Millar M., Sheridan EA, Warwick S., Raftery M., Bean DC et al. , 2006, «Λιστερίωση λόγω μόλυνσης με ένα αρνητικό στην καταλάση στέλεχος της *Listeria monocytogenes* », *Journal of Clinical Microbiology* 44(5), 1917–1918. 10.1128/JCM.44.5.1917-1918.2006

**[18]** De Vasconcelos Byrne V., Hofer E., Vallim DC & De Castro Almeida RC, 2016, «Πρότυπα εμφάνισης και αντιμικροβιακής αντοχής της *Listeria monocytogenes* απομονωμένης από λαχανικά», *Brazilian Journal of Microbiology* 47(2), 438–443. 10.1016/j.bjm.2015.11.033

**[19]** Holch A., Webb K., Lukjancenko O., Ussery D. & Rosenthal BM, 2013, «Η αλληλουχία γονιδιώματος προσδιορίζει δύο σχεδόν αμετάβλητα στελέχη επίμονης *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκαν σε δύο διαφορετικά εργοστάσια επεξεργασίας ψαριών που ελήφθησαν δείγματα με διαφορά 6 ετών», *Microbiron* 79(9), 2944–2951. 10.1128/AEM.03715-12

- [20] Ducey TF, Page B., Usgaard T., Borucki MK, Pupedis K. & Ward TJ, 2006, 'A single-nucleotide-polymorphism-based multilocus genotyping assay for subtyping lineage I Isolates of *Listeria monocytogenes*', *Applied and Environmental* 7 (1), 133–147. 10.1128/AEM.01453-06
- [21] Moledo de Vasconcelos R, Castro A, Ernesto Hofer E, Matias da Silva M, Marín V. Multiplex-PCR ορότυπος της *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκε από ανθρώπινα κλινικά δείγματα. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103 (8): 836–8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000800016> .
- [22] Weiman, S., & Fox, J. (2015c). Figure 5. Gram stain of *Salmonella typhimurium*. Retrieved from [www.ncbi.nlm.nih.gov/website/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519801/figure/fig5/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/website/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519801/figure/fig5/)
- [23] Compliant Detection of *Listeria monocytogenes* in Food &. (n.d.). Retrieved from [www.rapidmicrobiology.com/website/https://www.rapidmicrobiology.com/news/compliant-detection-of-listeriamonocytogenes-in-food-environmental-samples](http://www.rapidmicrobiology.com/website/https://www.rapidmicrobiology.com/news/compliant-detection-of-listeriamonocytogenes-in-food-environmental-samples)
- [24] Hülphers G., 1911, «Νέκρωση ήπατος σε κουνέλια που προκαλείται από ένα μέχρι τώρα αδιευκρίνιστο βακτήριο», *Swedish Veterinary Journal* 16(1911), 265–273.
- [25] Murray EGD, Webb RA & Swann MBR, 1926, «Μια ασθένεια των κουνελιών που χαρακτηρίζεται από μια μεγάλη μονοπύρηνη λευκοκυττάρωση, που προκαλείται από έναν μέχρι τώρα αδιευκρίνιστο *βάκιλο* *Bacterium monocytogenes* (n. sp.)», *The Journal of Pathology and Bacteriology* 29(4), 407–439. 10.1002/path.1700290409
- [26] Mitchell JA, Pirie JH & Ingram A., 1927, «Το πρόβλημα της πανώλης στη Νότια Αφρική: Ιστορικές, βακτηριολογικές και εντομολογικές μελέτες», *Δημοσιεύσεις του South African Institute for Medical Research* 3(20), 309–384.
- [27] Nyfeldt A., 1929, 'Etiologie de la mononucleose infectieuse', *PubMed Journal* 101 (1929), 590-591.
- [28] Schlech, WF, 3rd , Lavigne, PM , Bortolussi, RA , Allen, AC , Haldane, EV , Wort, AJ , ... Broome, CV ( 1983 ). Επιδημική λιστερίωση - στοιχεία για μετάδοση μέσω τροφής . *The New England Journal of Medicine* , 308 ( 4 ), 203 – 206 .
- [29] Jemmi T, Stephen R (2006) *Listeria monocytogenes* : τροφιμογενής παθογόνος παράγοντας και δείκτης υγιεινής. *Rev Sci Tech* 25: 571–580. doi: 10.20506/rst.25.2.1681



**[30]** Charlier C, Perrodeau E, Leclercq A, Cazenave B, Pilimis B, Henry B, Lopes A, Maury MM, Moura A, Goffinet F, Dieye HB, Thouvenot P, Ungeheuer MN, Tourdjman M, Goulet V, de Valk H, Lortholary O, Ravaud P, Lecuit M, ομάδα Ms. 2017. Κλινικά χαρακτηριστικά και προγνωστικοί παράγοντες της λιστερίωσης: η εθνική προοπτική μελέτη κοόρτης MONALISA. *Lancet Infect Dis* 17: 510–519. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30521-7.

**[31]** Κέντρα για τη νόσο C, Πρόληψη. 2013. Ζωτικά σημάδια: ασθένειες λιστερίας, θάνατοι και επιδημίες–Ηνωμένες Πολιτείες, 2009–2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 62:448–452.

**[32]** Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14:584–640. doi: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.

**[33]** *Microbiol Spectr* 2019 17 Μαΐου 7(3):10.1128/microbiolspec.gpp3-0014-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0014-2018

**[34]** Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ.* 1999;77:651–66.

**[35]** Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. 1999. Ασθένειες και θάνατος που σχετίζονται με τρόφιμα στις Ηνωμένες Πολιτείες. *Emerg Infect Dis* 5:607–625. doi: 10.3201/eid0505.990502.

**[36]** Livio S, Strockbine NA, Panchalingam S, Tennant SM, Barry EM, Marohn ME, Antonio M, Hossain A, Mandomando I, Ochieng JB, Oundo JO, Qureshi S, Ramamurthy T, Tamboura B, Adegbola RA, Hossain MJ, Saha , Sen S, Faruque AS, Alonso PL, Breiman RF, Zaidi AK, Sur D, Sow SO, Berkeley LY, O'Reilly CE, Mintz ED, Biswas K, Cohen D, Farag TH, Nasrin D, Wu Y, Blackwelder WC, Kotloff KL, Nataro JP, Levine MM. 2014. Απομονώσεις *Shigella* από την παγκόσμια εντερική πολυκεντρική μελέτη πληροφορούν την ανάπτυξη εμβολίων. *Clin Infect Dis* 59:933–941. doi: 10.1093/cid/ciu468.

**[37]** von Seidlein L, Kim DR, Ali M, Lee H, Wang X, Thiem VD, Canh DG, Chaicumpa W, Agtini MD, Hossain A, Bhutta ZA, Mason C, Sethabutr O, Talukder K, Nair GB, Deen JL, Kotloff K, Clemens J. 2006. Μια πολυκεντρική μελέτη της διάρροιας *Shigella* σε έξι ασιατικές χώρες: επιβάρυνση ασθενειών, κλινικές εκδηλώσεις και μικροβιολογία. *PLoS Med* 3:e353. doi: 10.1371/journal.pmed.0030353.

**[38]** Gupta A, Polyak CS, Bishop RD, Sobel J, Mintz ED. 2004. Εργαστηριακά επιβεβαιωμένη σιγκέλλωση στις Ηνωμένες Πολιτείες, 1989–2002: επιδημιολογικές τάσεις και πρότυπα. *Clin Infect Dis* 38:1372–1377. doi: 10.1086/386326.

- [39] Nygren BL, Schilling KA, Blanton EM, Silk BJ, Cole DJ, Mintz ED. 2013. Τροφογενείς επιδημίες σιγκέλωσης στις ΗΠΑ, 1998–2008. *Epidemiol Infect* 141:233-241. doi: 10.1017/S0950268812000222.
- [40] Vinh H, Nhu NT, Nga TV, Duy PT, Campbell JI, Hoang NV, Boni MF, My PV, Parry C, Nga TT, Van Minh P, Thuy CT, Diep TS, Phuong LT, Chinh MT, Loan HT, Tham NT, Lanh MN, Mong BL, Anh VT, Bay PV, Chau NV, Farrar J, Baker S. 2009. Μια μεταβαλλόμενη εικόνα της σιγκέλωσης στο νότιο Βιετνάμ: μεταβαλλόμενη κυριαρχία ειδών, αντιμικροβιακή ευαισθησία και κλινική παρουσίαση. *BMC Infect Dis* 9:204. doi: 10.1186/1471-2334-9-204.
- [41] Ud-Din AI, Wahid SU, Latif HA, Shahnaij M, Akter M, Azmi IJ, Hasan TN, Ahmed D, Hossain MA, Faruque AS, Faruque SM, Talukder KA. 2013. Μεταβαλλόμενες τάσεις στον επιπολασμό των ειδών *Shigella*: εμφάνιση ανθεκτικού σε πολλά φάρμακα βιοτύπου g *Shigella sonnei* στο Μπαγκλαντές. *PLoS One* 8:e82601. doi: 10.1371/journal.pone.0082601.
- [42] Lamba K, Nelson JA, Kimura AC, Poe A, Collins J, Kao AS, Cruz L, Inami G, Vaishampayan J, Garza A, Chaturvedi V, Vugia DJ. 2016. Μολύνσεις *Shigella sonnei* που παράγουν τοξίνη Shiga 1, Καλιφόρνια, Ηνωμένες Πολιτείες, 2014–2015. *Emerg Infect Dis* 22:679–686. doi: 10.3201/eid2204.151825.
- [43] Bowen A, Hurd J, Hoover C, Khachadourian Y, Traphagen E, Harvey E, Libby T, Ehlers S, Ongpin M, Norton JC, Bicknese A, Kimura A, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2015. Εισαγωγή και εγχώρια μετάδοση *Shigella sonnei* ανθεκτικής στη σιπροφλοξασίνη – Ηνωμένες Πολιτείες, Μάιος 2014–Φεβρουάριος 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 64:318–320.
- [44] Rahaman MM, Khan MM, Aziz KM, Islam MS, Kibriya AK. Ένα ξέσπασμα δυσεντερίας που προκαλείται από *Shigella dysenteriae* τύπου 1 σε ένα κοραλλιογενές νησί στον Κόλπο της Βεγγάλης. *J Infect Dis*. 1975, 132:15–9. doi: 10.1093/infdis/132.1.15.
- [45] Sheriff MHR. Lessons to learn from my Maldivian experience with the *Shigella* dysentery. *Sri Lankan Family Physician*. 1982;5:117–20.
- [46] Pal SC, Sengupta PG, Sen D, Bhattacharya SK, Deb BC. Επιδημική σιγκέλλωση λόγω *Shigella dysenteriae* τύπου 1 στη νότια Ασία. *Indian J Med Res*. 1989; 89:57-64.
- [47] Naheed A, Kalluri P, Talukder KA, Faruque AS, Khatun F, Nair GB, et al. Ανθεκτικό στη φθοριοκινολόνη *Shigella dysenteriae* τύπου 1 στο βορειοανατολικό Μπαγκλαντές. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4:607-8. doi: 10.1016/S1473-3099(04)01143-0.
- [48] Mathan VI, Bhat P, Kapadia CR, Ponniah J, Baker SJ. Επιδημική δυσεντερία που προκαλείται από τον βάκιλο Shiga σε ένα χωριό της νότιας Ινδίας. *J Diarrheal Dis Res*. 1984; 2:27-32.

- [49] Jesudason MV. Απομόνωση *Shigella* στο Vellore, νότια Ινδία (1997-2001) *Indian J Med Res.* 2002; 115:11-3.
- [50] Pal SC. Επιδημική βακτηριακή δυσεντερία στη Δυτική Βεγγάλη, Ινδία, 1984. *Lancet.* 1984; 1:1462. doi: 10.1016/s0140-6736(84)91948-2.
- [51] Dutta P, Bhattacharya SK, Dutta D, Sen D, Saha MR, Nair GB, et al. Κλινική παρουσίαση της σιγκέλωσης κατά τη διάρκεια της επιδημίας του 1984 της βακτηριακής δυσεντερίας στη Δυτική Βεγγάλη. *J Assoc Physicians Ινδία.* 1987; 35:195-7.
- [52] Taneja N, Lyngdoh V, Vermani A, Mohan B, Rao P, Singh M, et al. Επανεμφάνιση ανθεκτικών σε πολλά φάρμακα *Shigella dysenteriae* με πρόσθετη αντοχή στη σιπροφλοξασίνη στη βόρεια Ινδία και τα προφίλ πλασμιδίων τους. *Indian J Med Res.* 2005; 122:348-54.
- [53] Saha T, Murhekar M, Hutin YJ, Ramamurthy T. Ένα αστικό, υδατογενές ξέσπασμα διάρροιας και σιγκέλωσης σε μια περιοχή της πόλης στην ανατολική Ινδία. *Natl Med J Ινδία.* 2009; 22:237–9.
- [54] Nandy S, Dutta S, Ghosh S, Ganai A, Rajahamsan J, Theodore RB, et al. Foodborne-associated *Shigella sonnei*, Ινδία, 2009 και 2010. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:2072–4. doi: 10.3201/eid1711.110403.
- [55] Steffen R. Epidemiology of traveler's diarrhea. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: S536–40. doi: 10.1086/432948.
- [56] Aureli, P.; Fiorucci, GC; Caroli, D.; Marchiaro, G.; Novara, O.; Leone, L.; Salmaso, S. Ένα ξέσπασμα πυρετικής γαστρεντερίτιδας που σχετίζεται με καλαμπόκι μολυσμένο από τη *Listeria monocytogenes*. *N. Engl. J. Med.* 2000, 342, 1236–1241.
- [57] Εθνικό Ινστιτούτο Μεταδοτικών Ασθενειών. 2017. Έκθεση κατάστασης σχετικά με την επιδημία λιστερίωσης, Νότια Αφρική, 2017. 4 Δεκεμβρίου 2017: 1–3 <https://www.who.int/csr/don/02-may-2018-listeriosis-south-africa/en/>.
- [58] Zhu, Q., Gooneratne, R., & Hussain, M. (2017). *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods*, 6(3), 21. <https://doi.org/10.3390/foods6030021>
- [59] CDC. Πολυπολιτειακή εστία λιστερίωσης που συνδέεται με εμπορικά παραγόμενα, προσυσκευασμένα καραμελωμένα μήλα 2015. Διαθέσιμο στο διαδίκτυο: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html>.
- [60] Wu, V. C. H. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*, 25, 735-744.
- [61] Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but non-culturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 415-425.

- [62] Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., & Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: 731 An overview and selection criteria. *Food Microbiology*, 27(6), 710-730.
- [63] Mandal, P. K., Biswas, A. K., Choi, K., & Pal, U. K. (2011). Methods for rapid detection of foodborne pathogens: An overview. *American Journal of Food Technology*, 6(2), 87-102.
- [64] Elbehiry, A., Abalkhail, A., Marzouk, E., Elmanssury, A. E., Almuzaini, A. M., Alfheaid, H., ... Abu-Okail, A. (2023). An Overview of the Public Health Challenges in Diagnosing and Controlling Human Foodborne Pathogens. *Vaccines*, 11(4), 725. <https://doi.org/10.3390/vaccines11040725>
- [65] Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5(770). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>
- [66] Yalow RS, Berson SA (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39:1157–1175
- [67] Alhaji M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. [Updated 2021 Feb 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
- [68] Gaastra, W. Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELBA). *Proteins*. 1984; 349-356. DOI: 10.1385/0-89603-062-8:349
- [69] Nakane PK, Kawaoi A (1974) σημασμένο με υπεροξειδάση αντίσωμα. Μια νέα μέθοδος σύζευξης. *J Histochem Cytochem* 22:1084–1091
- [70] Avrameas S, Ternynck T, Guesdon JL (1978) Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Scand J Immunol* 8:7–23
- [71] Craven GR, Steers E, Anfinsen CB (1965) Καθαρισμός, σύνθεση και μοριακό βάρος της β-γαλακτοσιδάσης της *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* 240:2468-2477
- [72] Dray F, Andrieu JM, Renaud F (1975) Ενζυμική ανοσοδοκιμασία της προγεστερόνης σε επίπεδο εικονογράμματος χρησιμοποιώντας β-γαλακτοσιδάση ως επισήμανση. *Biochim Biophys Acta* 403:131-138
- [73] Comoglio S, Celada F (1976) Ανοσο-ενζυματική δοκιμασία κορτιζόλης χρησιμοποιώντας *E. coli* β-γαλακτοσιδάση ως σήμα. *J Immunol Methods* 10:161-170
- [74] Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quant Assay immunoglobul G *Immunochem* 8:871-874

- [75] Van Weemen BK, Schuurs AH (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* 15:232–236
- [76] Crowther JR (2009) Στάδια στην ELISA. *Methods Mol Biol* 516:43-78
- [77] Ghannam MG, Varacallo MA. StatPearls [Διαδίκτυο]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): 30 Ιουλίου 2023. Biochemistry, Polymerase Chain Reaction.
- [78] Ramesh R, Munshi A, Panda SK. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. *Natl Med J Ινδία*. 1992 Μάιος-Ιούνιος; 5 (3):115-9.
- [79] Kabiraz, M. P., Majumdar, P. R., Mahmud, M. M. C., Bhowmik, S., & Ali, A. (2023). Conventional and advanced detection techniques of foodborne pathogens: A comprehensive review. *Heliyon*, 9(4), e15482 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15482>.
- [80] Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002 15 Μαρτίου; 30 (6):1292-305.
- [81] [98] Digital PCR: A brief history, Alexander A Morley , 2014 Aug 15;1(1):1-2.doi: 10.1016/j.bdq.2014.06.001. eCollection 2014 Sep.
- [82] Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation, Yiqi Cao 1, Miao Yu 1, Guihua Dong 1, Bing Chen 1, Baiyu Zhang., 2020 Feb 6;25(3):706. doi: 10.3390/molecules25030706.
- [83] Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Αμιο, N. Ισοθερμη ενίσχυση DNA με μεσολάβηση βρόχου. *Nucleic Acids Res*. **2000** , 28 , E63.
- [84] Parida, M.; Sannarangaiah, S.; Παύλα, PK; Rao, PV; Morita, K. Loop μεσολαβούμενη ισοθερμική ενίσχυση (LAMP): Μια νέα γενιά καινοτόμων τεχνικών γονιδιακής ενίσχυσης. προοπτικές στην κλινική διάγνωση μολυσματικών ασθενειών. *Rev. Med. Virol*. **2008** , 18 , 407–421.
- [85] Nzelu, CO; Gomez, EA; Cáceres, AG; Sakurai, T.; Martini-Robles, L.; Uezato, H.; Mimori, T.; Κατάκουρα, K.; Hashiguchi, Y.; Kato, H. Ανάπτυξη μιας μεθόδου ισοθερμικής ενίσχυσης με τη μεσολάβηση βρόχου για ταχεία μαζική εξέταση των μυγών της άμμου για τη μόλυνση από *Leishmania*. *Acta Trop*. **2014** , 132 , 1–6.
- [86] Tomita, N.; Mori, Y.; Kanda, H.; Notomi, T. Ισοθερμική Ενίσχυση με Μεσολάβηση Βρόχου (LAMP) γονιδιακών ακολουθιών και απλή οπτική ανίχνευση προϊόντων. *Nat. Πρωτοκ*. **2008** , 3 , 877–882.
- [87] Ibarra-Meneses, AV; Κρουζ, I.; Chicharro, C.; Sánchez, C.; Biéler, S.; Broger, T.; Moreno, J.; Carrillo, E. Evaluation of Fluorimetry and Direct Visualization to Interpret Results of a Loop-mediated Isothermal Amplification Kit to Detect *Leishmania* DNA. *Parasites Vectors* **2018** , 11 , 250.

- [88] Mori, Y.; Nagamine, K.; Tomita, N.; Notomi, T. Ανίχνευση Ισοθερμικής Ενίσχυσης Μεσολαβούμενης Βρόχου με Θολότητα Προερχόμενη από Σχηματισμό Πυροφωσφορικού Μαγνησίου. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001** , 289 , 150-154.
- [89] Mori, Y.; Kitao, M.; Tomita, N.; Notomi, T. Θολρότητα σε πραγματικό χρόνο της αντίδρασης LAMP για ποσοτικό προσδιορισμό του DNA προτύπου. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004** , 59 , 145-157.
- [90] Tomita, N.; Mori, Y.; Kanda, H.; Notomi, T. Ισοθερμική Ενίσχυση με Μεσολάβηση Βρόχου (LAMP) γονιδιακών ακολουθιών και απλή οπτική ανίχνευση προϊόντων. *Nat. Πρωτοκ.* **2008** , 3 , 877–882.
- [91] Tanner, NA; Evans, TC Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Nucleic Acids. *Curr. Πρωτοκ. Mol. Biol.* **2013**
- [92] DNA Microarray-Based Diagnostics, Mahsa Gharibi Marzancola , Abootaleb Sedighi , and Paul C. H. Li, *Methods Mol Biol.* 2016;1368:161-78.doi: 10.1007/978-1-4939-3136-1\_12.
- [93] Lars Hagsholm Pedersen, Pernille Skouboe, Boysen, M., Soule, J., & Rossen, L.(1997). Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 35(2),169–177. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(96\)01216-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01216-0)
- [94] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12):5463–5467.
- [95] L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, *et al.*, “Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis,” *Nature*, vol. 321, no. 6071, pp. 674–679, 1986. doi: 10.1038/321674a0.
- [96] Maxam AM, Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(2):560–564
- [97] Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human immunology*, 82(11), 801–811.<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>.
- [98] Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., & Volkmer, G. A. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376-380.
- [99] Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- [100] Metzker, M. L. (2009). Sequencing in real time. *Nature biotechnology*, 27(2), 150.



**[101]** Kulski, J. K. (2016). Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges, 3–60. <https://doi.org/10.5772/61964>

**[102]** Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature, 475(7356), 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature10242>

**[103]** A Comparison between Culture and Multiplex PCR for Detection and Identification of *Shigella* Species in Patients with Shigellosis from Isfahan Province in 2014-2015

**[104]** Comparison of the ISO method and three modifications of it for the enumeration of low concentrations of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated foods. DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.3730899>