



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Διπλωματική Εργασία

«Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων
μικροοργανισμών στα τρόφιμα»

Παναγιώτης Μπούζας

Επιβλέπων καθηγητής: Ευάγγελος Μπακέας

Πάτρα, Ιούνιος 2026

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



«Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδων ανίχνευσης
παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα»

Παναγιώτης Μπούζας

Επιτροπή Επίβλεψης Πτυχιακής / Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ευάγγελος Μπακέας

«Καθηγητής

Περιβαλλοντικής Ανάλυσης

Διευθυντής

Εργ. Χημείας Περιβάλλοντος

Τμήμα Χημείας Εθνικό Καποδιστριακό

Πανεπιστήμιο Αθηνών»

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Αναστάσιος Καμπόλης

Μέλος ΣΕΠ

Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο

Πάτρα, Ιούνιος 2026

Την αφιερώνω με πολλή αγάπη στη γυναίκα μου και την κόρη μας!

Περίληψη

Η τροφή αποτελεί τους βασικούς παράγοντες της ζωής. Ωστόσο, η κατανάλωσή της μπορεί να οδηγήσει σε λοιμώξεις που ονομάζονται τροφιμογενείς λοιμώξεις. Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία, έχοντας παράλληλα και μεγάλο οικονομικό αντίκτυπο παγκοσμίως. Τα παθογόνα μικρόβια που μπορούν να προκαλέσουν αυτές τις μολύνσεις περιλαμβάνουν παράσιτα, βακτήρια, ιούς, τοξίνες και κατάλοιπα φαρμάκων που ενδέχεται να υπάρχουν στα τρόφιμα από την αρχική τους μορφή στα στάδια της συγκομιδής, μέχρι και το τελικό στάδιο της κατανάλωσης (κακώς μαγειρεμένο κρέας, ωμά λαχανικά που δεν έχουν πλυθεί επαρκώς, θαλασσινά και έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα). Τρεις από τους κυριότερους μικροοργανισμούς και συχνά εμφανιζόμενους στα τρόφιμα, είναι: *Escherichia coli*, *Salmonella* και *Listeria monocytogenes*. Τα συμπτώματα που προκαλούνται από τα παθογόνα συχνά είναι γαστροεντερικές διαταραχές και πυρετός, αλλά μπορούν επίσης να προκαλέσουν σοβαρότερες καταστάσεις, όπως νευρικές διαταραχές και επικίνδυνες επιπλοκές, ακόμη και θάνατο.

Ως εκ τούτου, η έγκαιρη ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροβίων είναι ουσιώδης για την διασφάλιση ποιοτικών και ασφαλών τροφίμων και την πρόληψη τροφιμογενών ασθενειών. Η ταυτοποίηση των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών μπορεί να γίνει με παραδοσιακές μεθόδους όπως: καλλιέργειες (που αποτελεί και το χρυσό πρότυπο ανίχνευσης), βιοχημικές δοκιμές, ανοσολογικές τεχνικές, μεθόδους βασισμένες σε νουκλεϊκά οξέα, καθώς και προηγμένες τεχνολογίες (βιοαισθητήρες) για ταχεία ανίχνευση καθώς και συνδυασμός τεχνικών μεταξύ τους που μπορούν να αξιοποιήσουν και την τεχνολογία, όπως χρήση smartphone. Επίσης, σημαντικό ρόλο αποτελούν και τα στάδια πρόληψης για την μείωση πιθανότητας εμφάνισης τροφιμογενών ασθενειών (χημικές μέθοδοι, φυσικές μέθοδοι, βακτηριοφάγοι).

Στην παρούσα εργασία, (πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση), όπου αναλύονται και παρουσιάζονται οι μέθοδοι ανίχνευσης και πρόληψης τροφιμογενών λοιμώξεων που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα στη βιομηχανία τροφίμων και γίνεται αξιολόγηση αυτών, παρουσιάζοντας πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Γίνεται αναφορά στις έξυπνες συσκευές με βάση την εξέλιξη της τεχνολογίας για ανίχνευση παθογόνων στο πεδίο και αναφέρονται πιθανές προοπτικές και βελτιώσεις.

Λέξεις κλειδιά: Τροφιμογενείς λοιμώξεις, μικροοργανισμοί, ασφάλεια τροφίμων, μέθοδοι ανίχνευσης.

«Development and evaluation of methods for detecting pathogenic microorganisms in food»

PANAGIOTIS BOUZAS

Abstract

Food constitutes one of the main factors of life. However, its consumption can lead to infections known as foodborne illnesses. These foodborne infections pose a significant public health problem and also have a substantial economic impact worldwide. The pathogenic microorganisms that can cause these infections include parasites, bacteria, viruses, toxins, and residue drugs that may be present in foods from their initial stages of harvest until the final stage of consumption (such as improperly cooked meat, raw vegetables that have not been adequately washed, seafood, and ready-to-eat meals). Three of the main microorganisms frequently found in foods are *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes*. The symptoms caused by these pathogens often include gastrointestinal disturbances and fever, but they can also lead to more severe conditions such as neurological disorders and dangerous complications, even death.

Therefore, timely detection of foodborne pathogenic microorganisms is crucial for ensuring the quality and safety of foods and for preventing foodborne diseases. Identification of these pathogens can be carried out using traditional methods such as culture techniques (which is considered the gold standard for detection), biochemical tests, immunological techniques, nucleic acid-based methods, as well as advanced technologies (biosensors) for rapid detection, often in combination with other techniques that can incorporate modern technology, such as smartphone integration. Additionally, prevention stages play an important role in reducing the likelihood of foodborne illnesses, including chemical methods, physical methods, and bacteriophages.

In this work (a literature review was conducted), the detection and prevention methods used to date in the food industry are analyzed and presented, along with their advantages and disadvantages. The review also discusses smart devices based on technological advancements for field detection of pathogens, as well as possible prospects and improvements.

Keywords: Foodborne infections, microorganisms, food safety, detection methods.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	v
Abstract	vii
Περιεχόμενα	ix
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	xi
Κατάλογος Πινάκων	xiii
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xiv
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Διεθνές εμπόριο, πρότυπα ασφαλείας, επιπτώσεις.....	3
1.1.1 Βακτήρια	5
1.1.2 Παράσιτα.....	7
1.1.3 Ιοί	7
1.1.4 Φυτοφάρμακα.....	8
1.1.5 Δολιοφθορά.....	9
1.1.6 Λανθασμένη συσκευασία.....	10
1.1.7 Πρόσθετα στα τρόφιμα.....	11
1.2 Λύσεις παγκόσμιων εμπορικών διαφορών	12
2. Συχνοί παθογόνοι μικροοργανισμοί στα τρόφιμα.....	14
2.1 Salmonella.....	15
2.1.1 Κλασσικές μέθοδοι ανίχνευσης (καλλιέργεια).....	18
2.1.2 Βιοχημικός έλεγχος.....	19
2.2 Escherichia coli	20
2.2.1 Κλασσικές μέθοδοι ανίχνευσης (καλλιέργεια).....	22
2.3 Listeria monocytogenes.....	24
2.3.1 Κλασσικές μέθοδοι ανίχνευσης.....	25
3. Μοριακές μέθοδοι με βάση τα Νουκλεϊκά οξέα	30
3.1 Συμβατική PCR.....	31
3.1.1 Συμβατική PCR συνδυαστικά με CRISPR/CAS	34
3.2 Real Time PCR	35
3.3 Multiplex PCR.....	37
3.3.1 Multiplex RT-PCR με ανιχνευτή TaqMan για ταυτόχρονη ανίχνευση Listeria monocytogenes, Salmonella spp. και Escherichia coli που παράγει τοξίνη Shiga στα τρόφιμα.....	38
3.3.2 Βελτιστοποίηση της αντίδρασης Taqman® RT-PCR uniplex για κάθε σειρά εκκινητών και ανιχνευτών.....	40
3.3.3 Βελτιστοποίηση της δοκιμασίας Taqman® mRT-PCR για την ανίχνευση τριών βακτηριακών στόχων.....	41
3.3.4 Εξειδίκευση και ευαισθησία της Taqman® mRT-PCR για την ανίχνευση τριών βακτηριακών στόχων.....	41
3.3.5 Taqman® mRT-PCR για τον έλεγχο και την ανίχνευση τεχνητά ή φυσικά μολυσμένων δειγμάτων τροφίμων σε σύγκριση με τα εμπορικά kit δοκιμών BAM και Uniplex RT-PCR.....	42
3.3.6 Βελτιστοποίηση της μονoplex Taqman® RT-PCR και της Taqman® mRT-PCR για την ειδική ανίχνευση των τριών βακτηριακών στόχων – αποτελέσματα.....	43
3.3.7 Ευαισθησία και εξειδίκευση της mRT-PCR Taqman® για την ανίχνευση τριών βακτηριακών στόχων – αποτελέσματα.....	45

3.3.8 Taqman® mRT-PCR για την ανίχνευση τεχνητά ή φυσικά μολυσμένων δειγμάτων τροφίμων σε σύγκριση με εμπορικά κιτ δοκιμών BAM ή Uniplex RT-PCR - αποτελέσματα.....	47
3.4 Βελτίωση απόδοσης PCR.....	50
3.5 LAMP (Ισοθερμική ενίσχυση βρόγχου).....	52
3.6 Digital PCR.....	56
3.7 Ενίσχυση με βάση αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων (NASBA).....	56
3.8 Σύστημα CRISPR/CAS.....	58
3.9 Συγκριτική ανάλυση των μεθόδων που βασίζονται στην ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων σε δείγματα τροφίμων.....	60
3.10 Next Generation Sequencing.....	65
4. Ανοσολογικές μέθοδοι.....	68
4.1 Ενζυμική ανοσοπροσοφνητική δοκιμασία (ELISA).....	68
4.2 Ανοσολογική δοκιμή πλευρικής ροής (LFIA).....	71
4.2.1 Παραδοσιακό υλικό.....	75
4.2.2 Νέο υλικό.....	75
5. Βιοαισθητήρες.....	77
5.1.1 Μηχανισμοί βιοαισθητήρων.....	79
5.1.2 Όρια και απαιτήσεις ανίχνευσης.....	80
5.2 Αναδυόμενες τεχνικές.....	81
5.2.1 Έξυπνα πολυμερή και υδρογέλες.....	81
5.2.2 Βιομηχανικοί υποδοχείς.....	83
5.2.3 Νανοένζυμα.....	83
5.3 Συνδυασμός με προηγμένες τεχνολογίες.....	85
5.3.1 Μικρορευστά και συσκευές εργαστηρίου σε τσιπ για την ασφάλεια τροφίμων.....	85
5.4 Smartphone και IoT για την ασφάλεια των τροφίμων.....	91
5.5 Επεκτασιμότητα, κόστος και φιλικότητα προς τον χρήστη.....	96
5.6 Εμπόδια και θέματα τυποποίησης.....	96
6. Μέθοδοι μείωσης της μικροβιακής μόλυνσης των τροφίμων.....	98
6.1 Φυσικοί μέθοδοι.....	99
6.2 Χημικές μέθοδοι.....	101
6.3 Βιολογικές μέθοδοι.....	102
6.4 Βακτηριοφάγοι.....	103
7. Συμπεράσματα.....	108
Βιβλιογραφία.....	112

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1: Διάγραμμα που απεικονίζει τη γεωργική παραγωγή, την εμπορική αλυσίδα, τους κινδύνους για την ασφάλεια των τροφίμων και τις επιπτώσεις στο διεθνές εμπόριο..4	
Εικόνα 2: Μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων.....15	
Εικόνα 3: Διαθέσιμες μέθοδοι για την ανίχνευση Σαλμονέλλας.....17	
Εικόνα 4: Χαρακτηριστικά ανάπτυξης των MRS, XLD, BPLS, MSRV.....19	
Εικόνα 5: Ανάλυση της παθογένειας EHEC.....22	
Εικόνα 6: Αποικίες E.Coli σε τρυβλίο.....23	
Εικόνα 7: Τρυβλίο ALOA με χαρακτηριστικές αποικίες Λιστέρια μπλέ-πράσινο.....28	
Εικόνα 8: Τεχνική PCR.....33	
Εικόνα 9: Σχηματική μέθοδος οπτικοποιημένης ανίχνευσης επιλεκτικού τελικού σημείου για το <i>Vibrio parahaemolyticus</i> με βάση την PCR με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή..35	
Εικόνα 10: Καμπύλες ευαισθησίας διαφορετικών συγκεντρώσεων.....46	
Εικόνα 11: Απεικόνιση της τεχνικής LAMP.....54	
Εικόνα 12: Σχεδιασμός της συσκευής.....55	
Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της ενίσχυσης NASBA.....57	
Εικόνα 14: Ένα παράδειγμα ροής εργασίας για την προετοιμασία και την αλληλούχηση βιβλιοθηκών πολλαπλής ανάλυσης (multiplex) με το ONT (Oxford Nanopore Technologies) και την αλληλούχηση.....67	
Εικόνα 15: Διάγραμμα της κατασκευής της ταινίας μέτρησης.....72	
Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση της στρατηγικής ενίσχυσης του σήματος καταρράκτη με βάση την πλατφόρμα AuNP-ICA για την υπερευαίσθητη ανίχνευση του <i>E. coli</i> O157:H7 στο γάλα.....73	
Εικόνα 17: Γραφική αναπαράσταση των τροφιμογενών βακτηριακών παθογόνων και των οδών μόλυνσής τους από το αγρόκτημα μέχρι το πιάτο, καθώς και απεικόνιση των λύσεων βιοανίχνευσης, των στρατηγικών ανίχνευσης και των λειτουργικών υλικών που χρησιμοποιούνται.....78	
Εικόνα 18: Έξυπνα πολυμερή και υδρογέλες.....82	
Εικόνα 19: Νανοένζυμα που μιμούνται ένζυμα.....84	
Εικόνα 20A,B: (A).Μικρορευστικό τσίπ, (B)Ηλεκτροχημικό σύστημα.....87	
Εικόνα 21: Ψηφιακή μικρορευστική συσκευή για ανίχνευση <i>Listeria</i> με βάση σταγονίδια, χρησιμοποιεί ισοθερμική ενίσχυση και ανάγνωση φθορισμού για ταχεία ανάλυση.....88	

Εικόνα 22D,E: (D): Μικρορευστική πλατφόρμα, (E):Δοκιμασία πλευρικής ροής με βάση νουκλειικό οξύ.....	90
Εικόνα 23Α: Απταμερής μαγνητικός νανοςύνθετος αισθητήρας με δυνατότητα Smartphone.....	92
Εικόνα 23B: Χρωματομετρική ανίχνευση με χρήση Smartphone RGB και ICP-MS.....	92
Εικόνα 24: Ενσωματωμένη σε smartphone δοκιμασία ανοσομαγνητικού φθορισμού για την ανίχνευση <i>Listeria monocytogenes</i>	94
Εικόνα 25: Μαγνητικός νανοανιχνευτής και δοκιμασία smartphone με βάση TMB για ανίχνευση <i>Listeria</i>	94

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Σημαντικές βιολογικές, χημικές και φυσιολογικές μολύνσεις των τροφίμων ..6

Πίνακας 2: Σύγκριση απόδοσης των νέων τεχνολογιών LFIA για την ανίχνευση του E.Coli τα τελευταία χρόνια.....76

Πίνακας 3: Σύγκριση κανονιστικών απαιτήσεων για κύρια τροφιμογενή παθογόνα σε όλες τις περιοχές.....81

Πίνακας 4: Αποτελεσματικότητα φάγων για τον έλεγχο διαφόρων βακτηρίων σε διάφορα στάδια παραγωγής τροφίμων.....105

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

FD:	Τροφιμογενείς ασθένειες
OIE:	Οργανισμός Υγείας Ζώων
EFSA:	Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων
GAP:	Ορθές Γεωργικές Πρακτικές
HACCP:	Σύστημα Ανάλυσης Κινδύνου και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου
PEDv:	Ιός Επιδημικής Διάρροιας των Χοίρων
TAD:	Ζωονοσογόνα Νοσήματα
ΠΟΕ:	Παγκόσμιος Οργανισμός Εμπορίου
ΠΟΥ:	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
CAC:	Επιτροπή Codex Alimentarius
NTS:	Μη Τυφοειδής σαλμονέλλα
FDA:	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων – ΗΠΑ
EPEC:	Εντεροπαθογενείς E. coli
ETEC:	Εντεροτοξιγονική E. Coli
STEC/ EHEC:	Εντεροαιμορραγική E. coli
Mag-Cds:	Μαγνητική νανοκουκίδα άνθρακα
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
LFA:	Δοκιμασία Πλευρικής Ροής
ECL:	Ηλεκτροχημειοφωταύγεια
ONT:	Oxford Nanopore Technologies
HRP:	Μόρια υπεροξειδάσης
EHA:	Ενισχυμένο Άγαρ Αιμόλυσης
ELFA:	Τεχνολογία Ενζυμικής Δοκιμασίας Φθορισμού
RTE:	Έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα
SEB:	Ζωμός ταυτόχρονου εμπλουτισμού
LAMP:	Loop-mediated isothermal amplification
mPCR:	Multiplex PCR
NASBA:	Nucleic acid sequence-based amplification
NGS:	Next Generation Sequencing
PCR:	Polymerase Chain Reaction
qPCR:	Real-Time / Quantitative PCR

SA:	Στρεπταβιδίνη
SRP:	Επιφανειακός Συντονισμός Πλασμονίου
M PAD:	Μικρορευστική συσκευή
EHP:	Enterocytozoon Hepatopenaei
POCT:	Point of Care testing
NC:	Μεμβράνη Νιτροκυτταρίνης
VHH:	Μεταβλητές Περιοχές αντισωμάτων βαριάς Αλυσίδας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή

Τα τρόφιμα είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και την ανάπτυξη του ανθρώπου, καθώς παρέχουν ενέργεια και θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για τη διατήρηση μιας φυσιολογικής ζωής. Είναι εξίσου σημαντικό να διασφαλίζεται υψηλή ασφάλεια των τροφίμων, παράλληλα με την επαρκή διατροφή. Λόγω των πλεονεκτημάτων τους, όπως η δυνατότητα κατανάλωσης χωρίς πρόσθετη προετοιμασία, όπως θέρμανση ή πλύσιμο, τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα έχουν παρουσιάσει αυξημένη ζήτηση τα τελευταία χρόνια. Επομένως, είναι ιδιαίτερα σημαντικό και αναγκαίο να υπάρχουν κατάλληλες στρατηγικές για την εξάλειψη των παθογόνων βακτηρίων κατά την επεξεργασία των τροφίμων. Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί θεμελιώδη προτεραιότητα για τη δημόσια υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο. Είναι αναπόσπαστο μέρος της επισιτιστικής ασφάλειας και συγκεντρώνει αυξανόμενη διεθνή προσοχή λόγω της αύξησης των τροφιμογενών επιπτώσεων. Τα κανονιστικά πλαίσια που αφορούν την ασφάλεια των τροφίμων πρώτη φορά ανέκυψαν όταν η NASA ζήτησε από την Pillsbury, εταιρεία επεξεργασίας τροφίμων, να διαθέσει τρόφιμα απαλλαγμένα από παθογόνα για μια διαστημική αποστολή στις αρχές της δεκαετίας του 1960 (Weinroth et al., 2018).

Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία τροφίμων παρουσιάζει ταχύτατη ανάπτυξη, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για την διασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητας των προϊόντων. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζει η τροφική αλυσίδα είναι η παρουσία βακτηρίων, όπως τα βακτήρια αλλοίωσης και παθογόνα, τα οποία προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες λόγω αλλοιώσεων τροφίμων και προβλημάτων υγείας στους καταναλωτές. Ο αποτελεσματικός έλεγχος και η πρόληψη αυτών των μικροβίων είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων, καθώς και για την παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων (Cerqueira et al., 2014).

Η επεξεργασία των τροφίμων αποτελεί ένα από τα πιο κρίσιμα στάδια της τροφικής αλυσίδας, στο οποίο πολλά προβλήματα, όπως η ανεπιθύμητη αποθήκευση σε λανθασμένες θερμοκρασίες, η διασταυρούμενη μόλυνση και ο μη καθαρός εξοπλισμός, μπορούν να οδηγήσουν σε βακτηριακή μόλυνση. Τα φαινόμενα αυτά προκαλούν αλλαγές στην υφή, τη γεύση, το χρώμα και τη θρεπτική αξία των τροφίμων. Όσον αφορά τη βακτηριακή μόλυνση, τα βακτήρια αλλοίωσης επιδρούν μεταβολικά, προκαλώντας

δυσάρεστες οσμές, γεύσεις και αλλαγές στην εμφάνιση των τροφίμων, ενώ τα παθογόνα βακτήρια έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν ασθένειες όταν εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω τροφής και νερού. Στοιχεία από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) εκτιμούν ότι περίπου 2 δισεκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο από διάρροια ή ασθένεια που προκαλείται από μολυσμένα τρόφιμα και το 30% από αυτούς είναι παιδιά κάτω των 5 ετών (Cagri et al., 2004).

Τα κριτήρια μικροβιολογικής ασφάλειας των τροφίμων, όπως ορίζονται από τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής, είναι ιδιαίτερα αυστηρά και, σε πολλές περιπτώσεις, επιβάλλουν μηδενική ανοχή στην παρουσία των πιο κοινών παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται με τροφιμογενείς ασθένειες (π.χ., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Cryptosporidium* spp. και *Salmonella* spp.). Παρά τις πιστοποιημένες αναλυτικές μεθόδους, όπως οι ISO 11290 και ISO 6579, που έχουν αναπτυχθεί για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων, εξακολουθούν να παρατηρούνται σοβαρές εστίες που συνδέονται με βακτηριακές μολύνσεις, οδηγώντας σε εκατομμύρια ανθρώπινες ασθένειες και χιλιάδες θανάτους κάθε χρόνο. (Ahovan et al., 2020)

Τα πιο κοινά παραδείγματα τροφίμων που εμπλέκονται σε κρούσματα τροφιμογενών ασθενειών είναι τα αυγά, τα πουλερικά, το νωπό γάλα και άλλα προϊόντα ζωικής προέλευσης, καθώς και μανιτάρια, φρέσκα φρούτα και λαχανικά. Το 2021, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), τα κύρια κρούσματα στην Ευρώπη είχαν συχνά σχέση με σύνθετα τρόφιμα και τρόφιμα πολλαπλών συστατικών, ενώ ακολουθούσαν τα προϊόντα κρέατος. Το παθογόνο που εντοπίστηκε πιο συχνά στα κρούσματα ήταν η σαλμονέλα, ενώ το *L. monocytogenes* ήταν το πιο θανατηφόρο. Το 2022, στις Ηνωμένες Πολιτείες, τα κρούσματα σχετίζονταν κυρίως με τη Σαλμονέλα, το *E. coli* και το *L. monocytogenes*, που βρέθηκαν σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, όπως γαλακτοκομικά προϊόντα, λαχανικά, φρούτα, σύνθετα τρόφιμα και κατεψυγμένα προϊόντα. Το κόστος των τροφιμογενών ασθενειών το 2018 εκτιμήθηκε σε 11,2 δισεκατομμύρια δολάρια στο Ηνωμένο Βασίλειο και σε 17,6 δισεκατομμύρια δολάρια στις ΗΠΑ, ενώ το 2019 το αντίστοιχο κόστος στην Αυστραλία ανήλθε σε περίπου 1,64 δισεκατομμύρια δολάρια. (U.S. Food & Drug Administration Investigations of Foodborne Illness Outbreaks|FDA). Οι αποκλίσεις στα μέτρα ασφαλείας κατά μήκος

της αλυσίδας εφοδιασμού της γεωργικής παραγωγής μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση τροφιμογενών ασθενειών (FDs) (Odetokun et al., 2022). Περίπου 600 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως, δηλαδή σχεδόν 1 στα 10 άτομα, υποφέρουν από τροφιμογενείς ασθένειες, με 420.000 θανάτους ετησίως (Afsana et al., 2022).

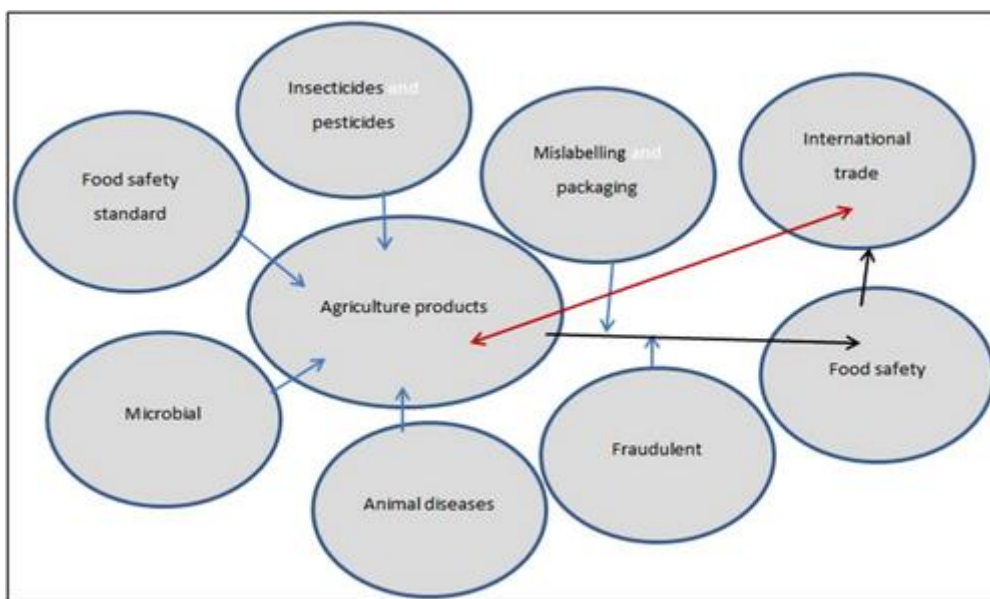
1.1 Διεθνές εμπόριο, πρότυπα ασφάλειας, επιπτώσεις

Οι ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων έχουν ενταθεί λόγω της έλλειψης διαθέσιμων εγχώριων τροφίμων, της αστάθειας στις αγορές και των περιορισμών στις εισαγωγές και εξαγωγές προϊόντων διατροφής, όπως αναφέρουν οι Salajegheh et al. (2022). Ορισμένοι αθέμιτοι έμποροι εκμεταλλεύονται τις ανεξέλεγκτες αγορές, προωθώντας πρακτικές παραπλάνησης και αθέμιτου ανταγωνισμού. Ως αποτέλεσμα, αυξάνονται οι τροφιμογενείς ασθένειες που προκαλούνται από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, τα οποία περιέχουν βακτήρια, ιούς, μυκοτοξίνες, βαρέα μέταλλα, φυτοφάρμακα και φαρμακευτικά υπολείμματα. Τέτοιες ασθένειες αποτελούν σημαντικό ζήτημα δημόσιας υγείας τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες, με τις τελευταίες να αντιμετωπίζουν συχνότερα περιστατικά τροφιμογενών νοσημάτων. Επίσης, η νοθεία, η υποκατάσταση, η ανθυγιεινή επεξεργασία και η ακατάλληλη συσκευασία τροφίμων προκαλούν ανησυχία (Kharel et al., 2022).

Το παγκόσμιο εμπόριο τροφίμων, αυξάνει τους κινδύνους για την υγεία λόγω πιθανών ελλείψεων ελέγχου. Για το λόγο αυτό, η θέσπιση αποτελεσματικών εθνικών προτύπων ελέγχου και η συμμόρφωση των εισαγόμενων τροφίμων με αυτά είναι ζωτικής σημασίας. Η διατήρηση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων προϋποθέτει αυστηρή εφαρμογή κανόνων υγιεινής σε όλα τα στάδια παραγωγής, από την προετοιμασία και τη συντήρηση μέχρι την επεξεργασία, σύμφωνα με τις ορθές γεωργικές πρακτικές (GAP) και το σύστημα ανάλυσης κινδύνου και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP), σύμφωνα με τους Wieck & Jason H. (2021). Ο ΠΟΥ συστήνει στις χώρες να υιοθετούν πολιτικές ελέγχου που βασίζονται στον κίνδυνο, ενώ ο Οργανισμός Υγείας των Ζώων (ΟΙΕ) υποστηρίζει την παρακολούθηση ζωικών νοσημάτων που απειλούν τη δημόσια υγεία. Ωστόσο, τα υγειονομικά και φυτοϋγειονομικά μέτρα που εφαρμόζουν μικροκαλλιεργητές

συχνά οδηγούν σε απόρριψη των προϊόντων στα σύνορα (Li et al., 2018). Στην εικόνα 1 απεικονίζεται η αλυσίδα της ασφάλειας και του εμπορίου τροφίμων.

Εικόνα 1: Διάγραμμα που απεικονίζει τη γεωργική παραγωγή, την εμπορική αλυσίδα, τους κινδύνους για την ασφάλεια των τροφίμων και τις επιπτώσεις στο διεθνές εμπόριο.



Παρά τις ανάγκες, τα πρότυπα ασφάλειας τροφίμων μπορεί να λειτουργήσουν και ως εμπόδια στο διεθνές εμπόριο, λόγω της κατακερματισμένης νομοθεσίας, των πολλαπλών δικαιοδοσιών και των δυσκολιών στην επιτήρηση και την επιβολή των κανόνων. Όπως αναφέρουν οι Afsana et al. (2022), η κακή διαχείριση μέτρων ασφαλείας τροφίμων στις αναπτυσσόμενες χώρες οδηγεί σε οικονομικές ζημιές και σπατάλη. Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις είναι η οικονομική επιβάρυνση που συνεπάγεται η ανάπτυξη και η υιοθέτηση λογικών και κατάλληλων προτύπων, που συχνά περιορίζει την ανταγωνιστικότητα των χωρών (Wieck & Jason H., 2021).

Επίσης, η παραβίαση των διεθνών κανόνων και προτύπων συχνά γίνεται επίτηδες, προκειμένου να μεγιστοποιηθούν τα κέρδη, ή λόγω ανεπαρκούς υποδομής και ελέγχων. Η αυξανόμενη ζήτηση για τρόφιμα σε παγκόσμιο επίπεδο, μαζί με τις προκλήσεις της πανδημίας COVID-19, τις δασμολογικές διαφορές μεταξύ Κίνας και ΗΠΑ και την περιφερειακή αστάθεια, έχουν επηρεάσει σοβαρά το διεθνές εμπόριο και το μάρκετινγκ

τροφίμων. Επίσης, η διαρκής επιβολή αυστηρών προτύπων και οι αυξανόμενες απαιτήσεις ασφάλειας τροφίμων απειλούν τη σταθερότητα και την ανάπτυξη των διεθνών αγορών τροφίμων. (Tibebu et al., 2024)

1.1.1 Βακτήρια

Τα τροφιμογενή νοσήματα (FD) μπορούν να προκληθούν από πολλούς παράγοντες, όπως η λοιμογόνος δράση των μικροοργανισμών και η ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού του ξενιστή. Τα βακτήρια είναι συχνά υπεύθυνα για απειλητικές για τη ζωή μολυσματικές ασθένειες, όπως η μηνιγγίτιδα και η σοβαρή διάρροια. Τα βακτήρια ευθύνονται για περισσότερο από το 52% των τροφιμογενών νοσημάτων. Πολλές τροφιμογενείς ασθένειες προέρχονται από βιολογική μόλυνση, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1. Ορισμένοι βακτηριακοί ρύποι έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες και θανάτους. Το ωμό κρέας μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό μικροοργανισμών, οι οποίοι αποτελούν φορείς εξάπλωσης ασθενειών. Επίσης, μικρόβια μπορούν να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν σε κατεστραμμένες ντομάτες, αυξάνοντας τον κίνδυνο FD. Οι σημαντικότερες ασθένειες που μεταδίδονται μέσω μη παστεριωμένου, μολυσμένου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων είναι η φυματίωση και η βρουκέλλωση. Τα βακτήρια που παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο για την ασφάλεια των τροφίμων περιλαμβάνουν τον σταφυλόκοκκο, τον στρεπτόκοκκο, τη σαλμονέλα, τη λιστέρια, το καμπυλοβακτηρίδιο, τον βάκιλο, το κλωστρίδιο, τη βρουκέλλα, την *Escherichia coli*, την *Klebsiella* και άλλα (Gallo et al., 2020).

Πίνακας 1: Σημαντικές βιολογικές, χημικές και φυσιολογικές μολύνσεις των τροφίμων.

Βακτηριακός	Μυκητιασικό/παρ ασιτικό	Φυτοφάρμακα/εντομοκτόνα/ δηλητήρια	Βαρέα μέταλλα	Ιογεν ής
Καμυλοβακτηρίδιο	Κρυπτοσπορίδιο	Δίσκος Gambier		
Σιγκέλα	Πρωτοπεριδίνιο crassipes	Toxicus Brevetoxin οστρακοειδή	Κάδμιο	Ροταϊός
Γερσίνια	Λάμβλια ασπεργίλλος		Υδράργυρος	Νορροϊός
Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Χρυσίζων σταφυλόκοκκος, Clostridium botulinum	Verrucosum Protoceratium,	Azaspiracid Αφλατοξίνη B1, B2, G1 και G2, M1, DDT, μικρογραμμάριο		σαπιοσύνος
Σαλμονέλα	Reticulatum Lingulodinium, Τοξίνη Fusarium Τοξίνη, Fusarium Poae, Ascaria, Trematodes			Αδενοϊός
	Κυκλόσπορα giardia			

1.1.2 Παράσιτα

Η ασκαρίαση αποτελεί μία από τις πιο συχνές παρασιτικές ασθένειες, με περίπου ένα δισεκατομμύριο περιπτώσεις ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι λοιμώξεις από τρηματώδη έχουν αναφερθεί σε περισσότερους από 40 εκατομμύρια ανθρώπους, κυρίως στην Ασία, την Αφρική και τη Λατινική Αμερική. Σε παγκόσμιο επίπεδο, το 10% του πληθυσμού διατρέχει κίνδυνο από αυτά τα παράσιτα, τα οποία μεταδίδονται μέσω της κατανάλωσης ωμών ή ανεπαρκώς μαγειρεμένων ψαριών γλυκού νερού, οστρακοειδών ή υδρόβιων φυτών. Ορισμένα παράσιτα μπορούν να εξαλειφθούν με το μαγείρεμα ή με θερμοκρασίες πολύ χαμηλότερες από αυτές που απαιτούνται για την εξόντωσή τους, ενώ άλλα μπορούν να επιβιώσουν στο ανθρώπινο σώμα για δεκαετίες, προκαλώντας σοβαρές βλάβες στην υγεία. Τα *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp. και *Entamoeba histolytica* αποτελούν σημαντικά παθογόνα εντερικά παράσιτα και συγκαταλέγονται στις κύριες αιτίες διαρροϊκών νοσημάτων στον άνθρωπο παγκοσμίως. Το *Amblyomma variegatum* είναι ένας τροπικός κρότων, ο οποίος προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες στα νησιά της Αφρικής και της Καραϊβικής. Η ικανότητα των κροτώνων αυτών να φτάσουν στην αμερικανική ήπειρο μπορεί να οδηγήσει σε οικονομική ζημιά που εκτιμάται σε ένα δισεκατομμύριο δολάρια ΗΠΑ. (Di Genova & Tonelli, 2016).

1.1.3 Ιοί

Τα ζωνοσογόνα μεταδοτικά νοσήματα (FD) μπορούν να περάσουν από ένα είδος σε ένα άλλο, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων, με ορισμένους ιούς να γίνονται επικίνδυνοι σε διαφορετικά είδη. Η ηπατίτιδα Α είναι η πιο συχνή ιογενής ασθένεια που μεταδίδεται μέσω τροφίμων και προκαλείται από την κατανάλωση μολυσμένου νερού, ωμών ή κακώς μαγειρεμένων τροφίμων και λαχανικών που πλένονται με μολυσμένο νερό. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η παθογόνος ουσία είναι ο ιός της ηπατίτιδας Α, ένας πικοναϊός που θεωρείται το πρωτότυπο του ηπατοϊού (Gallo et al., 2020).

Οι χοίροι μπορούν να λειτουργήσουν ως ενδιάμεσοι φορείς για τη διασπορά της γρίπης των πτηνών. Ανάμεσα στους ιούς που προκαλούν σοβαρή νόσο περιλαμβάνονται ο ροταϊός, ο νοροϊός, ο σποϊός και ο αδενοϊός. Δύο κοροναϊοί, ο ιός της επιδημικής διάρροιας των χοίρων (PEDv) και ο κορωνοϊός Δέλτα των χοίρων, προκάλεσαν εξαιρετικά μεταδοτικές ασθένειες το 2013 στη Βόρεια Αμερική, προκαλώντας καταστροφές στη βιομηχανία χοίρων. Το PEDv αποτέλεσε το 10% των θανάτων χοίρων στις ΗΠΑ, με απώλειες που ανήλθαν σε 1 δισεκατομμύριο δολάρια σε ένα χρόνο. Η

αφρικανική πανώλη των χοίρων, που έχει εξαπλωθεί στην Ασία και την Ευρώπη από το 2007, έχει οδηγήσει στην εξαφάνιση των οικοσίτων χοίρων στην Κίνα . Το 2007, κατά την επιδημία του πυρετού της κοιλάδας Rift στην Κένυα, η οικονομική ζημία υπολογίστηκε σε 32 εκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ . Οι λοιμώξεις από παθογόνα όπως ο αφθώδης πυρετός έχουν προκαλέσει απώλειες δισεκατομμυρίων δολαρίων στους παραγωγούς . Επιπλέον, οι επιδημίες MERS το 2003 και το 2015 στην Κίνα και τη Νότια Κορέα, αντίστοιχα, προκάλεσαν οικονομικές απώλειες ύψους 2,6 δισεκατομμυρίων και 17 δισεκατομμυρίων δολαρίων. Το 2009, οι ΗΠΑ, ο Καναδάς, το Μεξικό και το Ηνωμένο Βασίλειο έχασαν 31 εκατομμύρια, 250 εκατομμύρια και 20 εκατομμύρια δολάρια, αντίστοιχα, λόγω κρουσμάτων H1N1. Οι διασυνοριακές ζωνοσώροι έχουν κοινωνικό και οικονομικό αντίκτυπο, δημιουργώντας κινδύνους για τις χώρες, τους γείτονες και τους εμπορικούς εταίρους τους. Ο μεγάλος αντίκτυπος των ζωνοσογόνων νοσημάτων (TAD) μεταξύ των ενδιαφερόμενων μερών, καθώς και η απειλή που θέτουν στις εμπορικές σχέσεις, περιπλέκουν την εφαρμογή κατάλληλων μέτρων ελέγχου. Για τους κτηνοτρόφους, η απειλή των TAD αυξάνει τον κίνδυνο απώλειας παραγωγής και επηρεάζει τα βιοποριστικά τους μέσα, αυξάνοντας την σδυναμία τους προς τη φτώχεια, ιδιαίτερα για τους μικρομεσαίους παραγωγούς. Επιπλέον, ζητήματα ασφάλειας τροφίμων και εμπιστοσύνης των καταναλωτών προκύπτουν από τις επιπτώσεις αυτές. (Rahimi et al., 2022).

1.1.4 Φυτοφάρμακα

Τα φυτοφάρμακα έχουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των ασθενειών των καλλιεργειών και των παρασίτων των εντόμων, συμβάλλοντας στη βελτίωση της ποιότητας των προϊόντων. Τα προληπτικά μέτρα επεκτείνονται πλέον και στην προστασία φρούτων και λαχανικών στις Ηνωμένες Πολιτείες, μετά από περιστατικά τροφιμογενών ασθενειών που προκαλούνται από μικροβιακή μόλυνση. Συνήθως, τυχόν μικρόβια που έχουν αναπτυχθεί στο τρόφιμο σκοτώνονται με το θέρμανση, και το μαγείρεμα αποτελεί αποτελεσματικό τρόπο εξάλειψής τους . Ωστόσο, τα περισσότερα φυτοφάρμακα είναι δύσκολα να διασπαστούν και έχουν τοξικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα τα υπολείμματα τους στα τρόφιμα και το περιβάλλον να μπορούν να προκαλέσουν αργή δηλητηρίαση όταν εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό. Ορισμένα φυτοφάρμακα μπορούν ακόμα και να αναστείλουν άμεσα τη δραστηριότητα των ενζύμων . Τα τρόφιμα που μολύνονται με φυτοφάρμακα ή άλλες χημικές ουσίες αποτελεί σημαντική αιτία εμφάνισης καρκίνου. Οι

οργανικές αντιδράσεις, δηλαδή οι χημικές αντιδράσεις που προκαλούνται από τη χρήση φυτοφαρμάκων και ζιζανιοκτόνων στην καλλιέργεια τροφίμων, μπορούν να οδηγήσουν σε FD (Φυσικές Διεργασίες). Η έκθεση σε γεωργικές ουσίες, όπως φυτοφάρμακα, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, τρωκτικοκτόνα, λιπάσματα, υπολείμματα καθαριστικών και φυσικές τοξίνες, είναι πιθανό να συμβάλει στην πρόκληση αυτών των αντιδράσεων. Τα τρία συχνότερα φυτοφάρμακα που εμπλέκονται είναι η διαζινόνη, το μαλαθείο και το οργανοφωσφορικό . Επιπλέον, οι αγροχημικές ουσίες, όπως τα μυκητοκτόνα, τα φυτοφάρμακα και τα ζιζανιοκτόνα, αυξάνουν τα επίπεδα φυτικών τοξινών και μυκοτοξινών στα τρόφιμα (Afsana et al., 2022).

Τα φυτοφάρμακα αποτελούν τοξικές ουσίες που επηρεάζουν όχι μόνο τα παράσιτα αλλά και τον άνθρωπο, τα ζώα και το περιβάλλον. Η έκθεση σε αυτά μπορεί να οδηγήσει σε χρόνιες υγειονομικές διαταραχές, όπως καρκίνο, ασθένειες της καρδιάς, του νευρικού συστήματος, των νεφρών και του ήπατος, καθώς και σε διαταραχές της ενδοκρινικής λειτουργίας. Είναι σημαντικό να ελέγχονται τα επίπεδα υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα. Η χρήση φυτοφαρμάκων για τον έλεγχο μυκητολογικών μυκοτοξινών αποτελεί αντικείμενο συζήτησης και αμφιλεγόμενη πρακτική. Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται επίσης στην κτηνοτροφία για τη διατήρηση της υγείας των ζώων και την πρόληψη της μόλυνσης των τροφίμων . Οι καλλιεργητές κηπευτικών θα πρέπει να ρυθμίζουν την εφαρμογή φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων, ώστε να διασφαλίζεται η σωστή χρήση και η μη υπέρβαση των ανώτατων επιτρεπόμενων ορίων υπολειμμάτων. Τα κυβερνητικά προγράμματα προώθησης της βιώσιμης γεωργίας, όπως το GAP, πρέπει να εστιάζουν στην ασφαλή παραγωγή λαχανικών . Υπερβολικά υπολείμματα φυτοφαρμάκων αποτελούν σοβαρή απειλή για την ασφάλεια των τροφίμων και η ανεξέλεγκτη χρήση στα φρούτα, τα λαχανικά και τα δημητριακά είναι ανησυχητική. Αν και τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων παραμένουν στο έδαφος, η συγκέντρωσή τους στα φρούτα τείνει να είναι χαμηλή.. Η αύξηση των αποδόσεων σε περιορισμένες εκτάσεις επιτεύχθηκε με τη χρήση χημικών φυτοφαρμάκων ή την καλλιέργεια υψηλής απόδοσης . Ορισμένοι ειδικοί επισημαίνουν ότι τα φυτοφάρμακα μπορεί να προκαλέσουν ενδοκρινικές διαταραχές. Για το λόγο αυτό, η εφαρμογή καλών πρακτικών, όπως η σωστή χρήση κοπριάς και η επιλογή βιοπαρασιτοκτόνων, είναι ζωτικής σημασίας για μια βιώσιμη και ασφαλή παραγωγή λαχανικών (Kharel et al., 2022).

1.1.5 Δολιοφθορά

Η υπερβολική χρήση προσθέτων τροφίμων ή η υπερβολική κατανάλωση εξωτικών τροφίμων μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης ανεπιθύμητων αντιδράσεων. Επίσης, οι υποχρεωτικές και κερδοσκοπικές πρακτικές, όπως η απάτη και η νοθεία τροφίμων, έχουν επιδεινώσει τα προβλήματα ασφάλειας τροφίμων. Στη διεθνή αγορά, τα τρόφιμα μπορεί να είναι δόλια, καθώς διαφορετικά μέρη της αλυσίδας διανομής, όπως κατασκευαστές, συσκευαστές, διανομείς και άλλοι, εμπλέκονται στην παραπλάνηση. Οι πρακτικές τροφίμων, όπως η νοθεία, η εσφαλμένη επισήμανση και η πώληση αλλοιωμένων ή ληγμένων προϊόντων, μπορούν να προκαλέσουν μικροβιακή μόλυνση. Οι ανεπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες συνεχίζουν να αντιμετωπίζουν προκλήσεις στην εφαρμογή ομοιόμορφων προτύπων ασφάλειας τροφίμων. Όλες οι ανεπτυγμένες χώρες διαθέτουν βασικά μέτρα, όπως η ιχνηλασιμότητα, η βιωσιμότητα, η καταπολέμηση της απάτης και η άμυνα των τροφίμων, για τη μείωση των τροφιμογενών ασθενειών. Αντίθετα, οι αναπτυσσόμενες χώρες συχνά υστερούν σε τυποποίηση και συνέπεια στα συστήματα ασφάλειας τροφίμων. Τα ληγμένα τρόφιμα αποτελούν την κύρια αιτία τροφιμογενών ασθενειών σε περισσότερο από το μισό πληθυσμό του Πακιστάν (Weinroth et al., 2018).

1.1.6 Λανθασμένη συσκευασία

Περίπου το 30% των ετήσιων παγκόσμιων τροφίμων σπαταλάται ως ακατάλληλα παραγόμενα και συσκευασμένα προϊόντα. Οι συσκευασίες τροφίμων είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων και τη μείωση της σπατάλης τροφίμων, σύμφωνα με το Παγκόσμιο Επισιτιστικό Πρόγραμμα. Η συσκευασία μπορεί να μειώσει τη σπατάλη τροφίμων παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής, αποτρέποντας τη μικροβιακή αλλοίωση και μειώνοντας την κατανάλωση καυσίμου που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά πρώτων υλών. Υπάρχει κρίσιμη ανάγκη για βελτιωμένα συστήματα συσκευασίας, μεταφορά με ψύξη και ψυκτικές αλυσίδες για ευπαθή προϊόντα για καλύτερη ποιότητα προϊόντων και ασφάλεια των τροφίμων. Όλες οι πλαστικές συσκευασίες στην ΕΕ θα πρέπει είτε να επαναχρησιμοποιηθούν είτε να ανακυκλωθούν αποτελεσματικά έως το 2030. Ωστόσο, η ανακύκλωση πλαστικών για την επαναχρησιμοποίηση συσκευασιών τροφίμων μπορεί να αποτελέσει κίνδυνο, καθώς δεν μπορούν να αναπληρωθούν και δεν αποσυντίθενται με τον ίδιο τρόπο όπως το χαρτί ή το

span>metal. Τα υλικά συσκευασίας τροφίμων έχουν τη δυνατότητα να μολυνθούν, θέτοντας σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία της κοινότητας (Focker et al., 2022).

Οι μολυσματικοί παράγοντες μπορούν να διασκορπιστούν από τις αρχικές τοποθεσίες επεξεργασίας και συσκευασίας σε χιλιόμετρα μακριά, εξαιτίας της παγκοσμιοποίησης της παραγωγής, της μεταφοράς και της εμπορίας τροφίμων. Η χρήση περισσότερων ανακυκλωμένων υλικών στις συσκευασίες τροφίμων, ως προσπάθεια για βιώσιμη παραγωγή, αυξάνει τον κίνδυνο μόλυνσης από επικίνδυνες χημικές ουσίες (Jeddi et al., 2022). Κατά τη μεταφορά, ενδέχεται να προκύψουν απορρίμματα και ζητήματα που σχετίζονται με ακατάλληλες συσκευασίες. Οι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι, όπως ξένα σώματα και φυσικοί κίνδυνοι, μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες και τραυματισμούς. Επιπλέον, τα πλαστικά απόβλητα, συμπεριλαμβανομένων των νανοπλαστικών και μικροπλαστικών, μπορούν να εισέλθουν ή να επανέλθουν στην τροφική αλυσίδα. Μια ανασκόπηση των επιχειρήσεων τροφίμων στις ανεπτυγμένες χώρες έδειξε ότι η εσφαλμένη επισήμανση αποτελεί το πιο συχνό πρόβλημα όσον αφορά την ασφάλεια των τροφίμων. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, οι συσκευασίες τροφίμων συχνά είναι ανεπαρκείς λόγω χαμηλής ζήτησης και επενδύσεων. Μεταξύ της συγκομιδής και της επεξεργασίας, έως και το 40% των τροφίμων ενδέχεται να χαθεί στις αναπτυσσόμενες χώρες. Οι βιοαισθητήρες θα μπορούσαν να συμβάλλουν σημαντικά στην ανίχνευση ρύπων σε συσκευασμένα τρόφιμα (Jeddi et al., 2022).

1.1.7 Πρόσθετα στα τρόφιμα

Οι ουσίες που γενικά θεωρούνται ασφαλείς μπορούν να χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων. Ωστόσο, η υπερβολική ή ακατάλληλη χρήση, δηλαδή η εφαρμογή της μέγιστης επιτρεπτής συγκέντρωσης, η χρήση μη επιτρεπτών ουσιών και η ανάμειξη επιτρεπόμενων και μη επιτρεπτών ουσιών, ενέχει κινδύνους για την υγεία. Τα πρόσθετα τροφίμων χρησιμοποιούνται για διάφορους σκοπούς, όπως η δημιουργία γλυκιάς γεύσης και οσμής, η προσθήκη χρωμάτων, η αύξηση της διάρκειας ζωής μέσω συντήρησης, η δράση ως αντιοξειδωτικά, η στερεοποίηση του προϊόντος (αύξηση ιξώδους), η διατήρηση της οξύτητας, η διαλυτοποίηση, η αραίωση ή η τήξη των προϊόντων, καθώς και η αποτροπή σχηματισμού συσσωματωμάτων στα δοχεία συσκευασίας και στα αέρια συσκευασία. Επιπλέον, η αλόγιστη χρήση πρόσθετων τροφίμων και αντιβιοτικών έχει συμβάλει στην

αύξηση της εμφάνισης μη μεταδοτικών ασθενειών, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης και η παχυσαρκία. (Gallo et al., 2020).

1.2 Λύσεις παγκόσμιων εμπορικών διαφορών

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Εμπορίου (ΠΟΕ) περιέγραψε μια μέθοδο επίλυσης εμπορικών διαφορών, εάν μια χώρα επιβάλει βίαια περιοριστικά μέτρα σε άλλα κράτη. Ο οργανισμός διαπραγματεύεται με σκοπό την ελαχιστοποίηση των εμπορικών πολέμων, χρησιμοποιώντας τα άρθρα του πλέον ευνοούμενου έθνους, την αρχή της αμοιβαιότητας και τους μηχανισμούς επίλυσης διαφορών. Σημαντικές στρατηγικές που προτείνονται από πολιτικούς και διεθνείς διαπραγματευτές περιλαμβάνουν τη διαφάνεια και τη συμμετοχικότητα στις διαδικασίες πολιτικής, την αποζημίωση των ηττημένων και τις μεγάλες μεταβατικές περιόδους. Τα πρότυπα του Οργανισμού Παγκόσμιων Οργανώσεων Υγείας των Ζώων (ΟΙΕ) αναγνωρίζονται από τον ΠΟΕ ως διεθνείς αναφορές για υγειονομικούς κανόνες. Ο ΟΙΕ διαθέτει ένα δίκτυο εργαστηρίων και συνεργαζόμενων κέντρων που παρέχουν επιστημονική και τεχνική υποστήριξη, καθώς και συμβουλές εμπειρογνομόνων σχετικά με την επιτήρηση και τον έλεγχο των ζωνοδόων. Η αυξανόμενη σημασία του παγκόσμιου εμπορίου και η διεύρυνση της πρόσβασης των αναπτυσσόμενων χωρών στις διεθνείς αγορές έχουν επίσης τραβήξει την προσοχή του ΠΟΕ. Η Συμφωνία ΥΦΠ του ΠΟΕ επιτρέπει στα μέλη να λαμβάνουν νόμιμα μέτρα για την προστασία της ζωής και της υγείας του κοινού, απαιτώντας οι κίνδυνοι να διατηρούνται σε αποδεκτά επίπεδα. Τα κράτη-μέλη καλούνται να αποδεχθούν τα μέτρα ασφαλείας τροφίμων που εφαρμόζουν άλλα μέλη, εφόσον παρέχουν ισοδύναμο επίπεδο προστασίας. Οι κανονισμοί και τα πρότυπα σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων επηρεάζουν όλο και περισσότερο την πρόσβαση των αναπτυσσόμενων χωρών στις αγορές γεωργικών προϊόντων και τροφίμων, ιδίως σε βιομηχανικές χώρες. Οι περισσότερες επιπτώσεις των απαιτήσεων αυτών προέρχονται από κυβερνητικούς κανονισμούς, αλλά μπορεί να προέρχονται και από τη βιομηχανία και άλλες πηγές. Για το εμπόριο ζώων και ζωικών προϊόντων, οι χώρες πρέπει επίσης να τηρούν τα πρότυπα, τις κατευθυντήριες γραμμές και τις συστάσεις του ΟΙΕ. Η Επιτροπή Codex Alimentarius (CAC) διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη διαμόρφωση διεθνών προτύπων για την ασφάλεια των τροφίμων, επηρεάζοντας την εθνική νομοθεσία και τις εμπορικές διαφορές που σχετίζονται με αυτά. Τα πρότυπα, οι κατευθυντήριες γραμμές και οι κώδικες πρακτικής

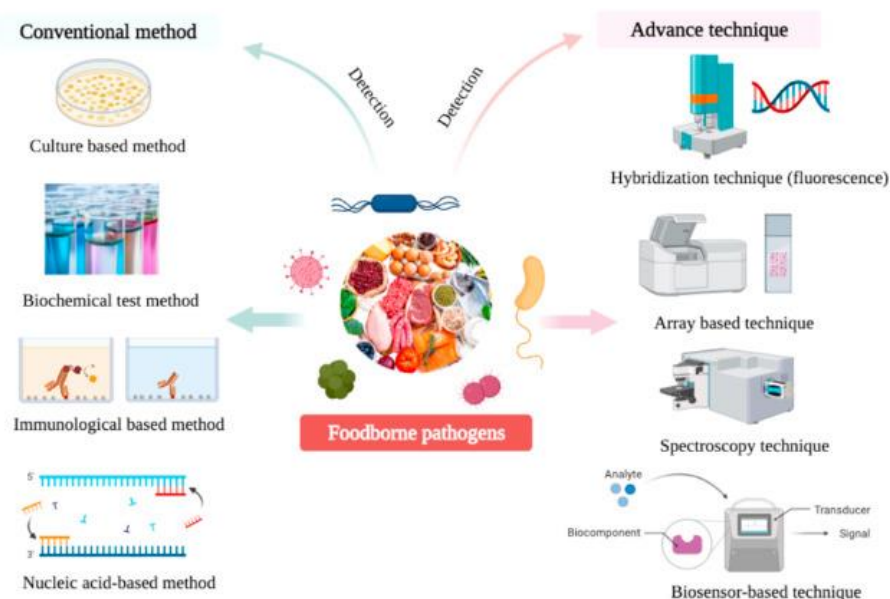
του CAC συμβάλλουν στην ασφάλεια, την ποιότητα και τη δικαιοσύνη στο διεθνές εμπόριο τροφίμων. Οι καταναλωτές εμπιστεύονται την ασφάλεια και την ποιότητα των προϊόντων τους, ενώ οι εισαγωγείς μπορούν να βασίζονται στις προδιαγραφές που τίθενται. Τα ζητήματα σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων, όπως τα κτηνιατρικά φάρμακα, τα φυτοφάρμακα, τα πρόσθετα τροφίμων και οι μολυσματικές ουσίες, συζητούνται στις συνεδριάσεις του Codex. Τα πρότυπα βασίζονται σε επιστημονικά δεδομένα που παρέχουν οργανώσεις όπως ο FAO και ο ΠΟΥ, διασφαλίζοντας την αξιοπιστία και την εγκυρότητά τους. Το διεθνές εμπόριο ζωικών προϊόντων, όπως το κρέας και τα γαλακτοκομικά, επηρεάζεται σημαντικά από μέτρα ΥΦΠ που σχετίζονται με την υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Παρ' ότι τα μέτρα αυτά αποτελούν συχνά εμπόδιο στις αναπτυσσόμενες χώρες, το μεγαλύτερο μέρος του εμπορίου και της κατανάλωσης γίνεται στις αναπτυγμένες χώρες. Η διαφορά εντοπίζεται στο ότι οι τελευταίες είναι πιο ανοιχτές και καταναλωτικά προσανατολισμένες, ενώ απαιτούν εμπιστοσύνη ότι τα πρότυπα ασφάλειας τροφίμων στις χώρες εξαγωγής παρέχουν ισοδύναμο επίπεδο προστασίας με τα εγχώρια συστήματα. Ωστόσο, ο ρυθμιστικός φορέας του ΠΟΕ/SPS συχνά αντιμετωπίζει δυσπιστία από τις αναπτυσσόμενες χώρες, γεγονός που ευνοεί τα πλούσια κράτη. Οι περιορισμοί στην κινητικότητα και το εμπόριο έχουν διαταράξει τις αγορές ζώων και την πρόσβαση στους καταναλωτές. Τέλος, τόσο οι ανεπτυγμένες όσο και οι αναπτυσσόμενες χώρες πρέπει να εξισορροπήσουν την ανάγκη για μείωση των κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία με την επιδίωξη οικονομικών οφελών από τα πρότυπα ασφάλειας τροφίμων, τα οποία διαφέρουν ανάλογα με το στάδιο παραγωγής και το εμπόριο. Η συνεργασία και η κατανόηση μεταξύ αυτών των χωρών είναι κρίσιμη για την αποτελεσματική διαχείριση των κινδύνων και την προώθηση δίκαιου και ασφαλούς εμπορίου (Tibebu et al., 2024).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

Συχνοί Παθογόνοι Μικροοργανισμοί στα τρόφιμα

Η παγκόσμια αύξηση στην κατανάλωση φρέσκων, ωμών και RTE φρούτων και λαχανικών οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην αυξανόμενη ευαισθητοποίηση του κοινού σχετικά με τα οφέλη τους για την υγεία. Αυτά τα τρόφιμα είναι πλούσια σε απαραίτητες βιταμίνες, μέταλλα, φυτοχημικά και διαιτητικές ίνες, και συσχετίζονται στενά με μειωμένους κινδύνους καρδιαγγειακών παθήσεων, διαβήτη τύπου 2, εγκεφαλικού επεισοδίου και γενικής θνησιμότητας. Ωστόσο, αυτή η θετική διατροφική τάση συνοδεύτηκε από μια σημαντική αύξηση στα κρούσματα τροφιμογενών ασθενειών που σχετίζονται με φρέσκα προϊόντα, κυρίως λόγω μικροβιακής μόλυνσης. Αντίθετα με τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, τα οποία συχνά δέχονται θερμική επεξεργασία, τα φρούτα και τα λαχανικά καταναλώνονται συχνά ωμά, χωρίς προηγούμενα βήματα μικροβιακής αδρανοποίησης. Αυτό αυξάνει την πιθανότητα κατάποσης τροφιμογενών παθογόνων. Βακτηριακά παθογόνα όπως η *Escherichia coli* (E. coli) O157:H7, η *Salmonella enterica* (S. enterica) και η *Listeria monocytogenes* (L. monocytogenes) εμπλέκονται συχνότερα σε εστίες που σχετίζονται με την παραγωγή, η πρόληψη και η αντιμετώπισή τους παραμένουν κρίσιμες για την ασφαλή κατανάλωση αυτών των προϊόντων. (Olaimat & Holley, 2012) Οι μέθοδοι και τρόποι ανίχνευσης των μικροοργανισμών ποικίλουν και ορισμένες από αυτές φαίνονται στην παρακάτω εικόνα 2

Εικόνα 2: Μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων (Kabiraz et al., 2023a).



2.1 Salmonella

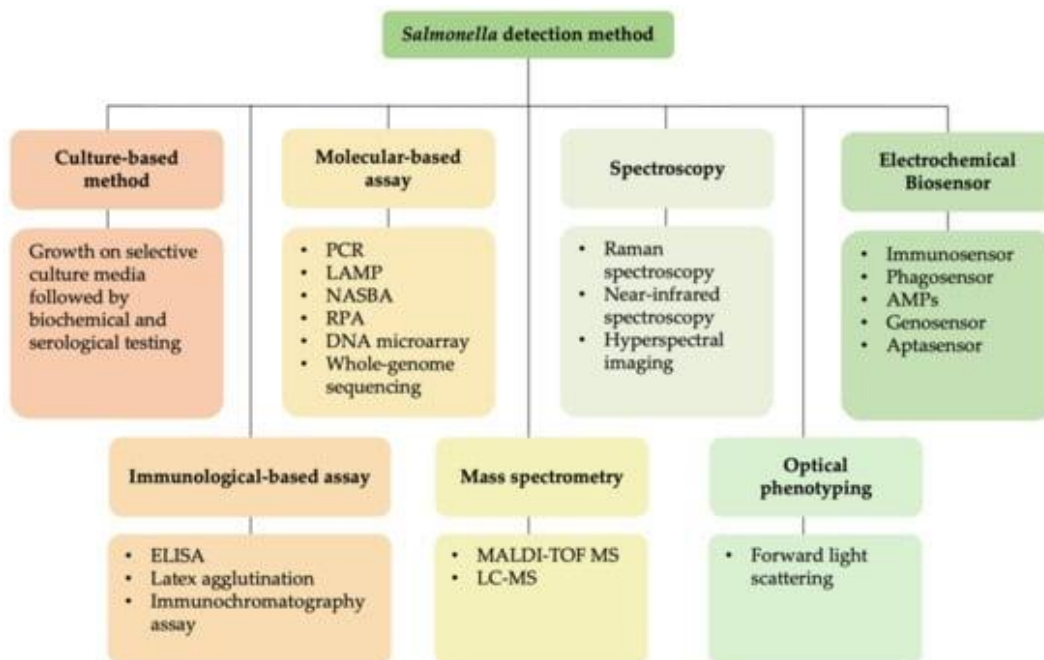
Η μη τυφοειδής σαλμονέλα (NTS) αποτελεί ένα πανταχού παρόν Gram-αρνητικό βακτηριακό παθογόνο και συγκαταλέγεται ανάμεσα στα κύρια αίτια ασθενειών που μεταδίδονται μέσω τροφίμων και νερού παγκοσμίως. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, προκαλεί περίπου 1,35 εκατομμύρια μολύνσεις ετησίως, καθιστώντας τη τη δεύτερη πιο συχνή αιτία τροφιμογενούς νόσου μετά τον νοροϊό. Η NTS είναι η κύρια αιτία νοσηλείων και θανάτων που σχετίζονται με τροφιμογενείς λοιμώξεις στις Ηνωμένες Πολιτείες, ευθυνόμενη για περίπου 26.500 νοσηλείες και περίπου 420 θανάτους ετησίως. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) έχει εκτιμήσει ότι η συνολική οικονομική επιβάρυνση από τη σαλμονέλωση στον άνθρωπο μπορεί να φθάσει τα 3 δισεκατομμύρια ευρώ ετησίως. Το βακτηριακό γένος *Salmonella* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και αποτελείται από δύο είδη: *Salmonella enterica* και *Salmonella bongori*. Το *Salmonella enterica* χωρίζεται περαιτέρω σε έξι υποείδη, με το υποείδος *Salmonella enterica subsp. enterica* να περιλαμβάνει τουλάχιστον 1.531 ορούς. Το NTS βρίσκεται στα έντερα και τα κόπρανα των ζώων και μεταδίδεται κυρίως μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων, όπως μη μαγειρεμένο κρέας, ωμά αυγά, γαλακτοκομικά προϊόντα και φρέσκα λαχανικά και φρούτα. Ιδιαίτερη σημασία δίνεται στα προϊόντα πουλερικών, καθώς τα κοτόπουλα αποτελούν σημαντική δεξαμενή για το

NTS . Οι πιο συχνοί οροί που εμπλέκονται στην ανθρώπινη σαλμονέλλωση, σύμφωνα με το CDC, είναι ο ορότυπος Typhimurium (*S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium), ο *S. Enteritidis* και ο *S. Newport*. Η σαλμονέλλωση εκδηλώνεται συχνά ως γαστρεντερίτιδα, η οποία χαρακτηρίζεται από διάρροια, κοιλιακούς κράμπες, ναυτία, έμετο και πυρετό. Τα άτομα με ανοσοκαταστολή, τα παιδιά κάτω των πέντε ετών και οι ηλικιωμένοι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη μόλυνση. Η περίοδος επώασης της μόλυνσης κυμαίνεται από 6 έως 96 ώρες. Στους περισσότερους υγιείς ενήλικες, η ασθένεια είναι αυτοπεριοριζόμενη και υποχωρεί μέσα σε 10 ημέρες. (Aayushi et al,2024)

Κατά την κατάποση, η σαλμονέλα επιβιώνει από τη διέλευσή της μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα, εισβάλλει στα Μ-κύτταρα του εντερικού επιθηλίου και αναπαράγεται ενδοκυτταρικά, με τη βοήθεια συστημάτων έκκρισης τύπου 3 (T3SS), που κωδικοποιούνται σε νησιά παθογένειας σαλμονέλας (SPI) . Σε περίπου 5% των λοιμώξεων από σαλμονέλα, τα βακτήρια μπορούν να διασχίσουν το έντερο και να εξαπλωθούν στην κυκλοφορία του αίματος, προκαλώντας βακτηραιμία. Επιπλέον, σε περίπου 1,8% των περιπτώσεων βακτηραιμίας, ενδέχεται να εμφανιστούν εξωεντερικές επιπλοκές, λόγω της επιμονής της σαλμονέλας στα μακροφάγα των ιστών . Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, η παρουσία σαλμονέλας σε 1 CFU/mL σε μια μερίδα 25 g έτοιμου προς κατανάλωση τροφίμου είναι επαρκής για να προκαλέσει ασθένεια στον άνθρωπο. Η έγκαιρη ανίχνευση των ειδών σαλμονέλας στα μολυσμένα τρόφιμα είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη ανθρώπινων λοιμώξεων, καθώς το 2024 αναμένονται τουλάχιστον 27 ανακλήσεις τροφίμων από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA). Το παθογόνο αυτό αποτελεί σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία και την ασφάλεια του εφοδιασμού τροφίμων. Επιπλέον, η έγκαιρη ανίχνευση του συγκεκριμένου παθογόνου συμβάλλει στην αποφυγή σημαντικών οικονομικών απωλειών που προκύπτουν από ανακλήσεις προϊόντων, ιατρικά έξοδα και τη μείωση της εμπιστοσύνης των καταναλωτών στην ασφάλεια των τροφίμων . Το 2022,στην ΕΕ καταγράφηκαν συνολικά 65.208 επιβεβαιωμένα περιστατικά σαλμονέλλωσης, με μέσο ποσοστό επίπτωσης 15,3 ανά 100.000 κατοίκους. Ο αριθμός των περιπτώσεων αυτών ήταν πολύ υψηλότερος σε σύγκριση με τα έτη 2020 και 2021. Από τους ασθενείς, το 38,9% χρειάστηκε νοσηλεία, ενώ δυστυχώς 81 από αυτούς απεβίωσαν. Τα βακτήρια της σαλμονέλας ανιχνεύονται στα περισσότερα ομοιόθερμα ζώα, με τους πιο συνηθισμένους φορείς να είναι διάφορα είδη πουλερικών, ειδικά κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, καθώς και όρνιθες και γαλοπούλες

ωοτοκίας. Παρακολούθηση των κοπαδιών αναπαραγωγής κοτόπουλων σε όλες τις χώρες της ΕΕ έδειξε ότι το ποσοστό μόλυνσης με ορούς *S. enteritidis*, *S. typhimurium* (συμπεριλαμβανομένης της μονοφασικής παραλλαγής), *S. virchow*, *S. infantis* και *S. hadar* σε πολλά από αυτά τα κοπάδια έφτασε τουλάχιστον το 1%, επίπεδο το οποίο σύμφωνα με τις νομικές ρυθμίσεις θεωρείται ακατάλληλο και ενέχει κίνδυνο για την υγεία. Επιπλέον, οι δοκιμές τροφίμων ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένου του ωμού κρέατος πουλερικών, έδειξαν ότι περίπου το 7,0% έως 8,9% των προϊόντων μπορεί να είναι μολυσμένα με σαλμονέλα, αποτελώντας έτσι σοβαρή απειλή για την υγεία των καταναλωτών (Urban-Chmiel et al.,2025).. Η ακριβής ταυτοποίηση του γένους *Salmonella* σε τρόφιμα διασφαλίζει επίσης τη συμμόρφωση με διάφορους κανονισμούς και πρότυπα σε διαφορετικές χώρες, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ακεραιότητας της βιομηχανίας τροφίμων και αποφεύγοντας νομικές συνέπειες. Στην εικόνα 3 απεικονίζονται παραδοσιακές καθώς και νέες μέθοδοι ανίχνευσης.

Εικόνα 3: Διαθεσιμες μέθοδοι για την ανίχνευση σαλμονέλλας(Awang.,2021)



Στις Ηνωμένες Πολιτείες, η επικύρωση μιας μεθόδου ανίχνευσης σαλμονέλλας περιλαμβάνει μια αυστηρή διαδικασία που ακολουθεί τις κατευθυντήριες γραμμές των ρυθμιστικών φορέων όπως ο FDA, το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ (USDA) και, σε ορισμένες περιπτώσεις, η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος (EPA) (U.S. Food

and Drug Administration.). Επιπλέον, οι απαιτήσεις αυτές πρέπει να ευθυγραμμίζονται με τα διεθνή πρότυπα, όπως ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (ISO), ειδικά το ISO 16140, που παρέχει το πλαίσιο για την επικύρωση μικροβιολογικών μεθόδων δοκιμών τροφίμων . Αντίστοιχα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), η επικύρωση μιας μεθόδου ανίχνευσης σαλμονέλας πρέπει να πληροί τα πρότυπα που ορίζονται από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), τον κανονισμό (ΕΚ) 2017/625 και το ISO 16140 <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/625/2022-01-28/eng>

.

2.1.1 Κλασσικές μέθοδοι ανίχνευσης(καλλιέργεια)

Η ανίχνευση βάσει καλλιέργειας εξακολουθεί να θεωρείται το «χρυσό πρότυπο» για τη μικροβιολογική ανάλυση, λόγω του υψηλού ποσοστού επιτυχίας και της καλής σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας . Μπορεί να ανιχνεύσει βιώσιμη σαλμονέλα σε δείγμα 25 g με όριο ανίχνευσης 1 CFU. Δεδομένου ότι η καλλιέργεια έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση βακτηρίων για τόσες δεκαετίες, συχνά απαιτείται από τη νομοθεσία η ανίχνευση τροφιμογόνων παθογόνων μέσω αυτής της μεθόδου, παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πιο σύγχρονες και ταχύτερες τεχνικές. Οι μέθοδοι βασιζόμενες στην καλλιέργεια είναι ευαίσθητες, οικονομικές και μπορούν να προσδιορίσουν τον αριθμό και τον τύπο των βιώσιμων μικροοργανισμών σε δείγματα τροφίμων. Ωστόσο, η ανίχνευση με βάση την καλλιέργεια παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς, όπως οι αργοί ρυθμοί ανάπτυξης (24-72 ώρες) και η απαιτητική διαδικασία εργασίας (Aayushi et al,2024)

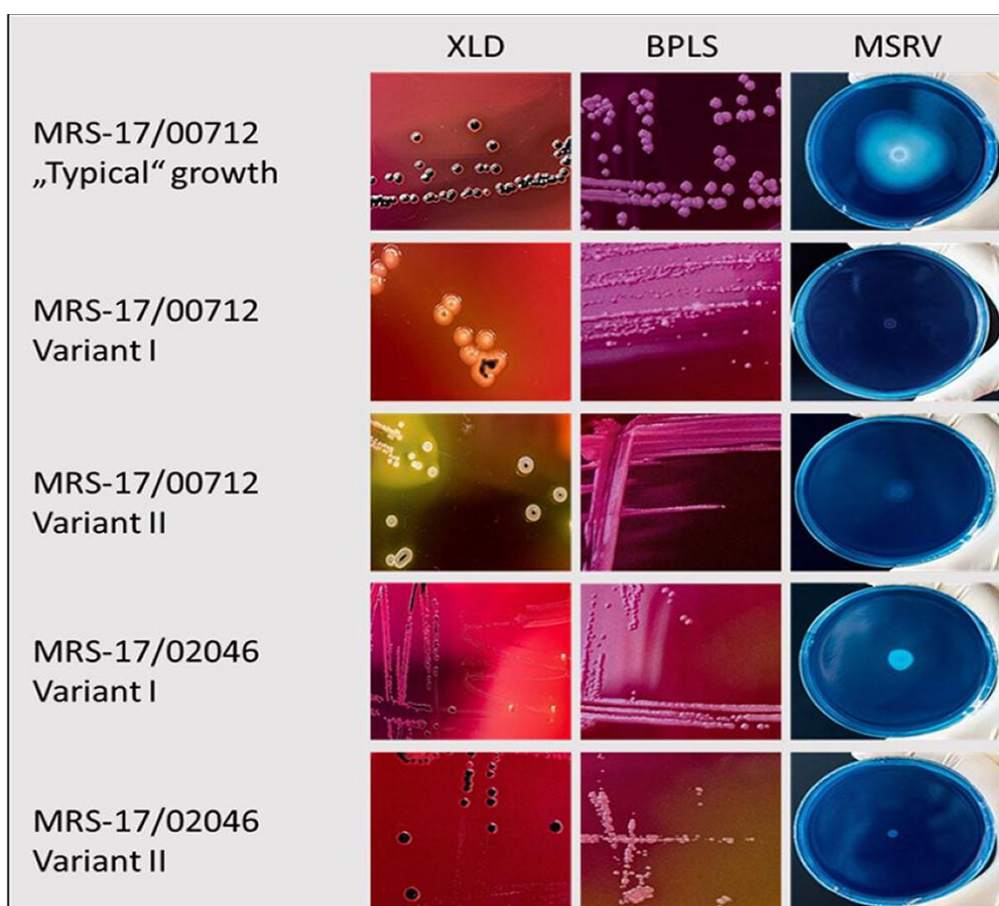
Η τρέχουσα διαδικασία που περιγράφεται από τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης, ISO 6579-1:2017, περιλαμβάνει αρχική μη επιλεκτική εμπλουτιστική καλλιέργεια σε ρυθμισμένο νερό πεπτόνης για περίπου 18 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επιλεκτικός εμπλουτισμός σε ζυμό Rappaport Βασιλειάδη(MSRV) ή ζυμό Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin για περίπου 24 ώρες . Η απομόνωση των αποικιών σαλμονέλας γίνεται με επιμετάλλωση σε άγαρ δεοξυχολικής λυσίνης ξυλόζης (XLD) και σε ένα δεύτερο επιλεκτικό άγαρ, συμπληρωματικό του άγαρ XLD, όπως περιγράφεται στο παράρτημα Ε του ISO 6579-1:2017(<https://www.iso.org/standard/56712.html>) . Αυτό το

στάδιο διαρκεί περίπου 24 ώρες.

Στην εικόνα 4 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα

χαρακτηριστικά των αποικιών που αναπτύχθηκαν στις καλλιέργειες. Τα θρεπτικά μέσα συμπεριλαμβανομένου και των προηγούμενων που περιγράφηκαν είναι: άγαρ δεσοξυχολικής λυσίνης ξυλόζης(XLD), εντερικό άγαρ Hektoen και άγαρ θειώδους βισμούθιου, άγαρ Salmonella Shigella και άγαρ McConkey, στους 37 °C για 24 ώρες. (S.-H. Park et al.,2012).

Εικόνα 4: Χαρακτηριστικά ανάπτυξης των MRS-17/00712 και MRS-17/02046 σε άγαρ XLD (24 ώρες), BPLS (24 ώρες) και MSR/V (48 ώρες).



2.1.2 Βιοχημικός και ορολογικός έλεγχος

Στη συνέχεια, ακολουθεί βιοχημική ταυτοποίηση και ορολογικός έλεγχος, διαδικασίες που μπορεί να χρειαστούν επιπλέον τρεις ημέρες. Ωστόσο, η χρήση κιτ ταχείας βιοχημικής ανάλυσης επιτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή πολλαπλών αναλύσεων και

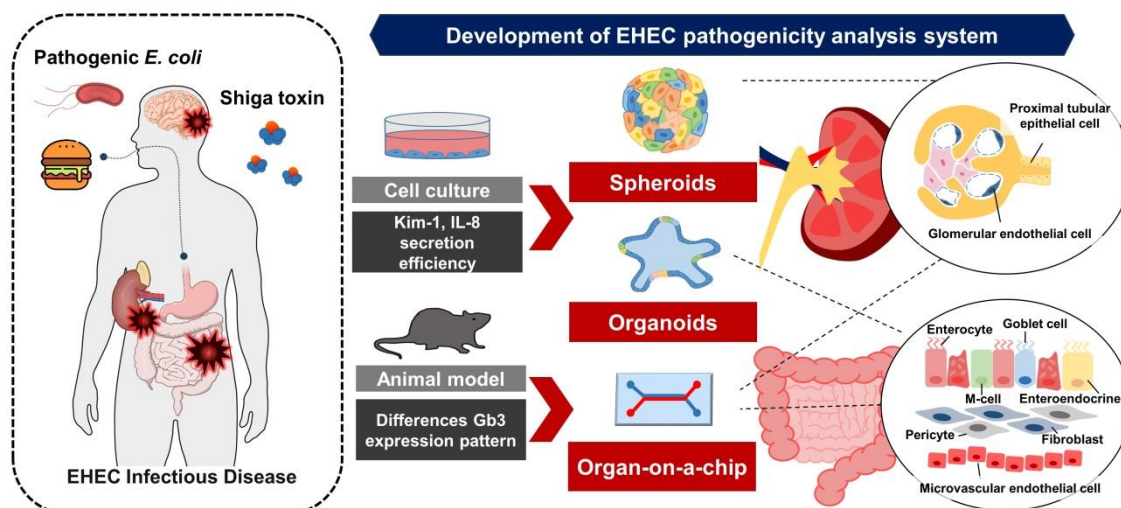
την απόκτηση αποτελεσμάτων εντός μιας ημέρας από τον εμβολιασμό. Επιπλέον, πρόσφατα έχει αναπτυχθεί ένα αυτοματοποιημένο σύστημα μικροβιακής ταυτοποίησης, το Biolog, το οποίο αξιοποιεί δείκτες οξειδοαναγωγής και τεχνολογία απεικόνισης για τον ταυτόχρονο εντοπισμό πολλαπλών βακτηριακών στελεχών. Για περαιτέρω τυποποίηση των στελεχών σαλμονέλας, εφαρμόζεται ορότυπος σύμφωνα με το ISO/TR 6579-3:2014, ο οποίος περιλαμβάνει τη χρήση τυπικών μεθόδων συγκόλλησης με πολυκλωνικά αντισώματα κατά αντιγόνων O, αντιγόνων μαστιγίων H και καψικών αντιγόνων Vi, προκειμένου να προσδιοριστεί η οροομάδα των σαλμονελλών. Ωστόσο, η ανίχνευση σε τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση ή θερμική επεξεργασία αποτελεί πρόκληση, καθώς τα επιφανειακά αντιγόνα συχνά τροποποιούνται ή λείπουν, με αποτέλεσμα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Οι δοκιμές συγκόλλησης είναι επίπονες και η απόκτηση των απαιτούμενων αντισωμάτων συχνά απαιτεί χρόνο και προσπάθεια, γεγονός που καθυστερεί περαιτέρω τη διαδικασία (Awang, et al, 2021).

2.2 Esherichia coli

Το E. coli O157:H7 αποτελεί τον πρωτότυπο ορότυπο του E. coli που παράγει την τοξίνη Shiga (STEC). Με μόλυνση από μόλις 10-100 κύτταρα, συχνά προκαλεί σοβαρές ασθένειες όπως αιμορραγική κολίτιδα και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, καθιστώντας το μια σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία. Η μόλυνση τροφίμων (όπως βόειο κρέας, φρέσκα λαχανικά, γαλακτοκομικά προϊόντα) και του περιβαλλοντικού νερού από το E. coli O157:H7 μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλης κλίμακας εστίες τροφιμογενών λοιμώξεων, υπογραμμίζοντας την επείγουσα ανάγκη για γρήγορες, ευαίσθητες και ειδικές μεθόδους ανίχνευσης. Σύμφωνα με τον ΠΟΥ, οι τροφιμογενείς λοιμώξεις από το STEC προκάλεσαν παγκοσμίως περισσότερες από ένα εκατομμύριο ασθένειες και περίπου 13.000 έτη ζωής προσαρμοσμένα στην αναπηρία (DALYs) το 2020. Η πλειονότητα των εστιών εντοπίστηκε στην Αμερική (78%) και την Ευρώπη (18%), ενώ το ποσοστό στις περιοχές του Δυτικού Ειρηνικού ανέρχεται στο 4%. Αν και έχουν εντοπιστεί πάνω από 400 ορότυποι STEC, το EHEC O157:H7 παραμένει το πιο κοινό και λοιμογόνο, προκαλώντας επανειλημμένα μεγάλες τροφιμογενείς εστίες από τη δεκαετία του 1980. Ωστόσο, το ξέσπασμα του 2011 στη Γερμανία, λόγω του υβριδικού στελέχους EHEC O104:H4, ανέδειξε σημαντικά κενά στην επιτήρηση και τη διάγνωση. Το συγκεκριμένο στέλεχος

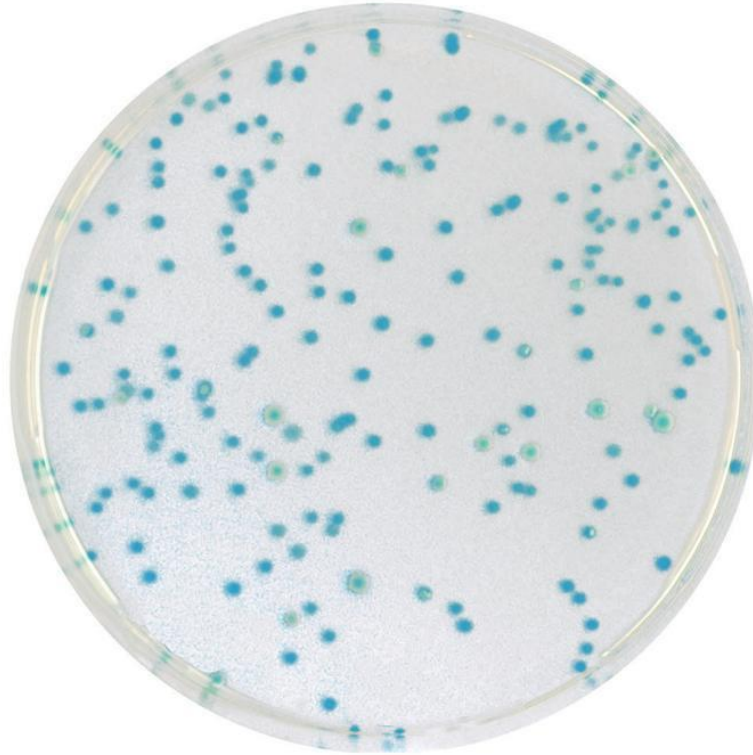
συνδύαζε εντεροσυσσωματωτικά χαρακτηριστικά (όπως κροσσούς AAF/I, ισχυρή προσκόλληση στα κύτταρα HEp-2 και σχηματισμό βιοφίλμ) με την παραγωγή τοξίνης Shiga, γεγονός που το καθιστούσε μη ανιχνεύσιμο με τις συμβατικές διαγνωστικές μεθόδους. Το γεγονός αυτό, το οποίο οδήγησε σε χιλιάδες κρούσματα και δεκάδες θανάτους, υπογράμμισε την εμφάνιση νέων υβριδικών παραλλαγών και την άμεση ανάγκη για βελτιωμένα διαγνωστικά εργαλεία και περαιτέρω έρευνα σχετικά με την ποικιλομορφία της παθογένεσης του EHEC (So-Hyeon et al., 2025). Τα προηγούμενα χρόνια, η λοίμωξη οφειλόταν συχνότερα σε απομονώσεις που ανήκαν στον ορότυπο O157:H7, ωστόσο πρόσφατα, ιδιαίτερα στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, έχουν εντοπιστεί κυρίως στελέχη VTEC που ανήκουν στις ορολογικές ομάδες O26, O157, O80 και O145. Σύμφωνα με την τελευταία έκθεση για τις ζωνόσους, το 2022 καταγράφηκαν 7.117 εργαστηριακά επιβεβαιωμένα κρούσματα μόλυνσης από VTEC σε 27 κράτη-μέλη της ΕΕ, με μέσο ποσοστό επίπτωσης 2,1 ανά 100.000 κατοίκους. Στην έκθεση αναφέρεται ότι το 38,5% των ασθενών χρειάστηκαν νοσηλεία, ενώ 28 άτομα υπέκυψαν. Οι περισσότερες περιπτώσεις καταγράφηκαν σε παιδιά ηλικίας έως 4 ετών (7 άτομα) και σε άτομα άνω των 65 ετών (12 άτομα). Το σύνδρομο HUS επιβεβαιώθηκε σε 562 ασθενείς όλων των ηλικιών, με την πλειονότητα να ανήκει στην ηλικιακή ομάδα 0-4 ετών. Οι φορείς του βακτηρίου VTEC περιλαμβάνουν διάφορα ζώα της φάρμας και άγρια ζώα, με τα βοοειδή και τα μικρά μηρυκαστικά να αποτελούν συχνότερους φορείς. Το 2022, καταγράφηκε ασυμπτωματική μεταφορά σε ποσοστό 41,5% των βοοειδών και 1,3% των αιγοπροβάτων. Τα βακτήρια αυτά έχουν επίσης ανιχνευθεί σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως βόειο κρέας και γάλα, καθώς και σε φυτικά προϊόντα, όπως φρούτα, λαχανικά και χυμούς, συχνά δευτερογενώς μολυσμένα κατά την παραγωγή και το εμπόριο. Η μόλυνση με VTEC μπορεί να προκληθεί και από ακατάλληλα παρασκευασμένα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, όπως σούπες, σάλτσες, επεξεργασμένα προϊόντα πουλερικών. (Urban-Chmiel et al., 2025)..Στην παρακάτω εικόνα5 απεικονίζεται περιληπτικά η λοίμωξη.

Εικόνα 5: Ανάλυση της παθογένειας EHEC



2.2.1 Κλασσική μέθοδος ανίχνευσης (καλλιέργεια)

Είναι η παλαιότερη μέθοδος ανίχνευσης μικροοργανισμών. Η μέθοδος αυτή παρέχει επιβεβαιωμένα αποτελέσματα όσον αφορά στην παρουσία ενός συγκεκριμένου παθογόνου. Το ποσοστό επιτυχίας της είναι υψηλό και οι μέθοδοι αυτές χαρακτηρίζονται οικονομικά αποδοτικές. Ωστόσο, το μεγαλύτερο μειονέκτημα που παρουσιάζει η μέθοδος βασισμένη στην καλλιέργεια είναι η αργή ανάπτυξή της, η οποία απαιτεί υπερβολικό χρόνο για την απόδοση τελικού αποτελέσματος, κάτι που μπορεί να αποβεί μοιραίο. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλα αυτά τα μέσα χρειάζονται έως και 18-24 ώρες για να παράγουν το ακριβές αποτέλεσμα, γεγονός που υποδηλώνει τον αργό χρόνο διεκπεραίωσης. Ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα, που παρουσιάζει υψηλό ποσοστό επιτυχίας και καταδεικνύει ότι η μέθοδος είναι ιδιαίτερα αποδοτική, είναι η καλλιέργεια *E. coli* O157:H7 σε Sorbitol MacConkey agar (SMAC), η οποία βασίζεται στην αρχή της ζύμωσης της σορβιτόλης. Ωστόσο, ο σημαντικότερος περιορισμός αυτής της μεθόδου είναι ο αργός χρόνος διεκπεραίωσης και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν λόγω των αναδυόμενων ορότυπων μη 157 και 157 STEC που ζυμώνουν τη σορβιτόλη. Στην εικόνα 6 φαίνονται οι αποικίες σε τρυβλίο.

Εικόνα 6: Αποικίες *E.Coli* σε τρυβλίο(Boyer,2021)

Τα μειονεκτήματα του άγαρ SMAC μπορούν να ξεπεραστούν με τη χρήση χρωμογόνου μέσου για την απομόνωση STEC, το οποίο διαθέτει αυξημένη εξειδίκευση και ευαισθησία. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα αυτού είναι η ευκολότερη διάκριση βάσει του χρώματος. Χάρη στη χρήση της χρωμογόνου ουσίας, το μέσο αυτό είναι περισσότερο γνωστό ως CHROMagar. Αν και είναι συγκριτικά αποτελεσματικότερο από το SMAC, ένα αξιοσημείωτο μειονέκτημα του CHROMagar είναι ότι δεν είναι ευαίσθητο σε όλα τα στελέχη(Παπαθεοδώρου ,2024). Υπάρχουν και άλλα θρεπτικά συστατικά που μπορεί να αναπτυχθεί η *E.Coli* όπως τα παρακάτω: Τρυπτικός ζωμός σόγιας (TSB), έγχυμα εγκεφάλου-καρδιάς (BHI), άγαρ μπλε μεθυλενίου ηωσίνης (EMB) και άγαρ δεξτρόζης λυσίνης ξυλόζης (XLD) με χρόνο επώασης 35-37 °C για 18-48 ώρες. (E. Omiccioli, et al. 2009)

2.3 *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* αποτελεί το κύριο παθογόνο που συνδέεται με τροφιμογενείς ασθένειες σε όλο τον κόσμο, παρουσιάζοντας υψηλό ποσοστό θνησιμότητας και νοσηλείας. Πρόκειται για ένα gram-θετικό, αερόβιο, μη σπορομορφικό, ραβδόμορφο βακτήριο, το οποίο ανήκει στο γένος *Listeria firmicida*. Από τα 17 περιγραφέντα είδη λιστέριας, είναι το μοναδικό παθογόνο είδος, αποτελώντας τον αιτιολογικό παράγοντα της λιστερίωσης. Μπορεί να μολύνει πολλαπλά όργανα του ξενιστή, όπως το ήπαρ, τον σπλήνα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και το αίμα, με το ήπαρ να αποτελεί το κύριο σημείο μόλυνσης. Συχνά σε ασθενείς με λιστέρια εμφανίζονται μηνιγγίτιδα, σήψη και άλλες λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος. Σε υγιείς ενήλικες, τα κύρια συμπτώματα είναι η διάρροια και ο πυρετός. Σε έγκυες γυναίκες, η λιστερίωση μπορεί να προκαλέσει πυρετό, διάρροια, αυτόματα αποβολή ή θνησιγένεια. Στα νεογνά, η λιστερίωση ενδέχεται να οδηγήσει σε σηψαιμία, πνευμονία και μηνιγγίτιδα. Η λιστερίωση μπορεί επίσης να εκδηλωθεί ως μια μη επεμβατική μορφή, γνωστή και ως εμπύρετη γαστρεντερίτιδα ή μη επεμβατική γαστρεντερίτιδα, η οποία συσχετίζεται με μολυσμένα τρόφιμα όπως αλλαντικά, σοκολατούχο γάλα, τυρί, καπνιστό ψάρι και καλαμπόκι. Οι ομάδες υψηλού κινδύνου περιλαμβάνουν τις έγκυες γυναίκες, τα έμβρυα και τα νεογνά, τους ηλικιωμένους και τα άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης σοβαρών επιπλοκών όπως σήψη, μηνιγγίτιδα ή γαστρεντερίτιδα. Γενικά, η θεραπεία συνίσταται στη χρήση αμινοπενικιλίνης ή βενζυλοπενικιλίνης, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με αμινογλυκοσίδες, οι οποίες θεωρούνται τα αντιβιοτικά επιλογής για τη μόλυνση από *Listeria monocytogenes*. Οι παθογόνοι παράγοντες της λιστερίωσης βρίσκονται σε όλη τη φύση και μπορούν να εισβάλουν στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων. Η λιστερίωση στον άνθρωπο είναι σχετικά σπάνια, αλλά παρουσιάζει υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Το 2022, διαγνώστηκαν 2.738 περιπτώσεις στην Ευρωπαϊκή Ένωση (μέσο ποσοστό επίπτωσης 0,62 ανά 100.000 κατοίκους), σημειώνοντας αύξηση σε σύγκριση με το 2021 (2.183 περιπτώσεις). Συνολικά, 1.330 άτομα νοσηλεύτηκαν, αποτελώντας το μεγαλύτερο ποσοστό τροφιμογενών ζωονοσογόνων ασθενειών. Ένας μεγάλος αριθμός περιπτώσεων ήταν θανατηφόρος (286 θάνατοι). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων εκτιμούν ότι περίπου 1.600 άτομα πάσχουν από διεισδυτική λοίμωξη με *L.*

monocytogenes κάθε χρόνο, με ποσοστό νοσηλείας περίπου 94% και περίπου 260 θανάτους.

Μελέτες σχετικά με την παρουσία του *L. monocytogenes* στα ζώα έχουν δείξει ότι ο επιπολασμός είναι υψηλότερος στα αιγοπρόβατα (5,8%) και στα βοοειδή (1,2%) . Επιπλέον, η *Listeria monocytogenes* έχει ανιχνευθεί σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως σε έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα ψαριών και θαλασσινών, επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος, καθώς και γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι ποσοτικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι ορισμένες κατηγορίες τροφίμων RTE μπορεί να περιέχουν *L. monocytogenes* σε αριθμούς που υπερβαίνουν το αποδεκτό επίπεδο cfu/g (Urban-Chmiel et al.,2025). Σύμφωνα με μια διετή έρευνα η *Listeria monocytogenes* παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό μόλυνσης στη βιομηχανία τροφίμων της Κίνας, φτάνοντας περίπου το 20%. Επιπλέον, το 99% των περιπτώσεων λιστερίωσης προκλήθηκε από την κατανάλωση τροφίμων μολυσμένων με *Listeria monocytogenes*, ενώ μόνο ένα μικρό ποσοστό από αυτές οφείλεται σε παθογόνα που εντοπίστηκαν στο περιβάλλον . Η μόλυνση μέσω της επεξεργασίας τροφίμων αποτελεί την κύρια οδό μετάδοσης της λιστερίωσης . Επομένως, η πρώτη γραμμή άμυνας για την πρόληψη και τον έλεγχο της λιστερίωσης είναι η τήρηση αυστηρών διαδικασιών καθαρισμού και απολύμανσης, καθώς και η εφαρμογή κατάλληλων προτύπων υγιεινής κατά την προετοιμασία των τροφίμων. Τα βιοκτόνα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την καταπολέμηση της *Listeria monocytogenes* είναι οι ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου και τα χλωριούχα βιοκτόνα. Όταν εφαρμόζονται στις συνιστώμενες δόσεις, αυτά τα βιοκτόνα είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά κατά της συγκεκριμένης παθογόνου βακτηριακής μορφής (Xiaoli et al.,2023)

2.3.1 Κλασσικές μέθοδοι ανίχνευσης

Διάφορες μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των *Listeria*, βασιζόμενες στον επιλεκτικό προεμπλουτισμό, τον εμπλουτισμό και την επιμετάλλωση σε πλάκες άγαρ. Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός των απομονώσεων μέσω συμβατικών μικροβιολογικών μεθόδων, όπως η μορφολογία της αποικίας, η ζύμωση σακχάρου και οι αιμολυτικές ιδιότητες. Αυτές οι κλασσικές μέθοδοι είναι συνήθως πολύ ευαίσθητες, τυποποιημένες και εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται σε πολλά εργαστήρια, ιδιαίτερα όταν το βακτηριακό προϊόν απομόνωσης απαιτείται για περαιτέρω χαρακτηρισμό ή

σύγκριση. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά βακτηριολογικά μέσα επιλεκτικού εμπλουτισμού και επιμετάλλωσης που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και την απομόνωση του *Listeria monocytogenes* από δείγματα τροφίμων και περιβάλλοντος παραγωγής τροφίμων. Σύμφωνα με αρκετούς διεθνώς αποδεκτούς κανονισμούς, οι συμβατικές μέθοδοι απομόνωσης πρέπει να μπορούν να ανιχνεύσουν έναν οργανισμό *Listeria* σε 25 g τροφής . Για την επίτευξη αυτού του στόχου, τα δείγματα τροφίμων υποβάλλονται σε εμπλουτισμό, στάδιο που επιτρέπει στα βακτήρια να αναπτυχθούν μέχρι ένα ανιχνεύσιμο επίπεδο περίπου 10^4 – 10^5 κύτταρα ανά ml, πριν από την επιμετάλλωση της καλλιέργειας σε επιλεκτικά μέσα. Δεδομένου ότι το *L. monocytogenes* είναι ένας βραδέως αναπτυσσόμενος μικροοργανισμός, στα μέσα εμπλουτισμού χρησιμοποιούνται αντιμικροβιακοί παράγοντες, προκειμένου να κατασταλεί η ανταγωνιστική μικροχλωρίδα που υπάρχει στα δείγματα. Για το σκοπό αυτό, συχνά προστίθενται ακριφλαβίνη, ναλιδιξικό οξύ και κυκλοεξιμίδιο . Η ακριφλαβίνη αναστέλλει τη σύνθεση RNA και τη μιτοχονδριογένεση, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηρίων εκτός από το *L. monocytogenes*. Το ναλιδιξικό οξύ αναστέλλει τη σύνθεση του DNA και εμποδίζει την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηρίων, ενώ το κυκλοεξιμίδιο εμποδίζει την πρωτεϊνοσύνθεση στα ευκαρυωτικά κύτταρα, δεσμεύοντας το 80S rRNA, και χρησιμοποιείται για την πρόληψη της ανάπτυξης των περισσότερων ζυμομυκήτων και μούχλας . Επίσης, το *L. monocytogenes* μπορεί να υδρολύει τον υδατάνθρακα *esculin*, ο οποίος, παρουσία σιδήρου, σχηματίζει μια μαύρη φαινολική ένωση από το *aglucon*. Για το λόγο αυτό, η εσουλίνη προστίθεται συχνά στα μέσα εμπλουτισμού και επιμετάλλωσης της *Listeria*, όπως ο ζωμός Fraser . Υπάρχουν επίσης άλλοι αντιμικροβιακοί παράγοντες που μπορούν να προστεθούν στα μέσα αναγνώρισης της *Listeria*, όπως η κεφταζιδίμη ευρέος φάσματος, η μοξαλακτάμη και το χλωριούχο λίθιο.(Jacek,2022)

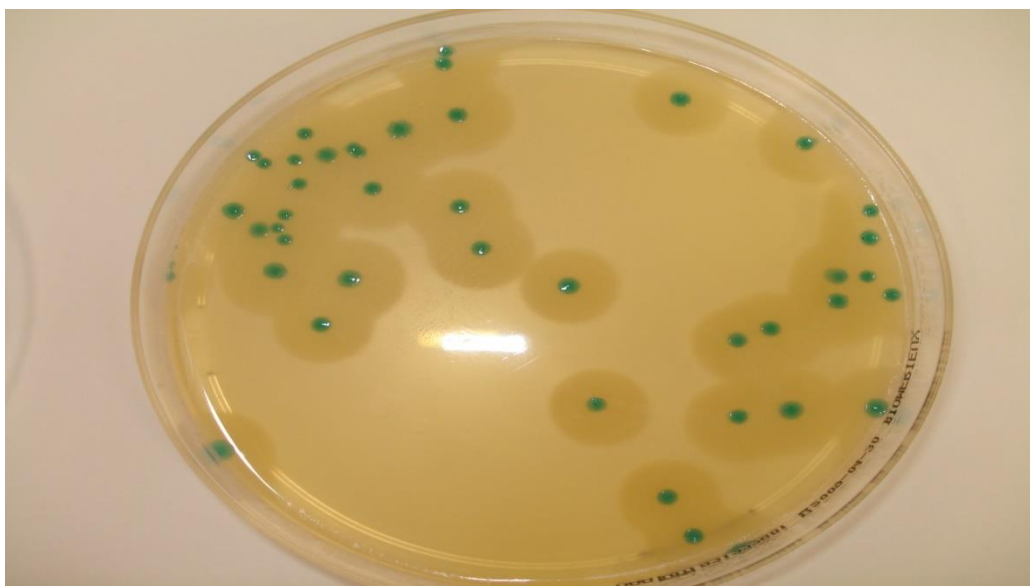
Τα επιλεκτικά μέσα επιμετάλλωσης PALCAM και Oxford, που συχνά χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του *L. monocytogenes*, συνιστώνται από τον ISO και τον FDA . Η επιλεκτικότητα του άγαρ PALCAM εξαρτάται από την παρουσία χλωριούχου λιθίου, πολυμυξίνης B, ακριφλαβίνης και κεφταζιδίμης, ενώ η διαφοροποίηση του οργανισμού στόχου βασίζεται στην υδρόλυση της εσουλίνης και στη ζύμωση μαννιτόλης . Όλα τα *Listeria* spp. είναι ικανοί να υδρολύουν την εσουλίνη, με αποτέλεσμα οι αποικίες τους να εμφανίζονται γκριζοπράσινες με μαύρο κέντρο και μαύρο φωτοστέφανο. Εάν, περιστασιακά, παρουσιαστούν στο μικροβίωμα του δείγματος *Enterococcus* spp. ή

Staphylococcus spp., μπορούν να διακριθούν από τη *Listeria* μέσω της ζύμωσης μαννιτόλης, η οποία αλλάζει το χρώμα της αποικίας ή του περιβάλλοντος μέσου από γκρι ή κόκκινο σε κίτρινο, λόγω παραγωγής οξέων. Οι αποικίες της μολυσμένης μικροχλωρίδας, που αποτελούνται μικροοργανισμούς ζυμώνοντας μαννιτόλη, εμφανίζονται κίτρινες με κίτρινο φωτοστέφανο ή γκρι με καφέ-πράσινο φωτοστέφανο .

Το άγαρ της Οξφόρδης, αρχικά αναπτυγμένο για την απομόνωση του *L. monocytogenes* από κλινικά δείγματα, χρησιμοποιείται επίσης για την ανίχνευση του μικροοργανισμού αυτού σε διάφορα δείγματα τροφίμων. Περιέχει πολλά εκλεκτικά συστατικά, όπως χλωριούχο λίθιο, ακριφλαβίνη, θειική κολιστίνη, κυκλοεξιμίδιο, κεφοτετάνη και φωσφομυκίνη, που αναστέλλουν την ανάπτυξη πιθανώς υπάρχουσας μικροχλωρίδας μη στόχου. Η διαφοροποίηση του *Listeria* βασίζεται στην υδρόλυση της εσκουλίνης, παρόμοια με το μέσο PALCAM. Στο μέσο της Οξφόρδης, οι αποικίες του *L. monocytogenes* είναι λαδοπράσινες με μαύρο φωτοστέφανο και μετά από 48 ώρες επώασης γίνονται πιο σκούρες, με μαύρο κέντρο και περιβάλλονται από μαύρες ζώνες. Αποικίες άλλων *Listeria* spp. εμφανίζονται μαύρες με μαύρο φωτοστέφανο μετά από 24 ώρες επώασης και παραμένουν αμετάβλητες μετά τις 48 ώρες . Τόσο τα μέσα PALCAM όσο και τα μέσα της Οξφόρδης είναι χρήσιμα για την απομόνωση του *Listeria* από δείγματα τροφίμων πλούσια σε ανταγωνιστική μικροχλωρίδα και από επεξεργασμένα προϊόντα, όπου τα κύτταρα *Listeria* συχνά καταστρέφονται ή καταπονούνται . Ωστόσο, ένας σημαντικός περιορισμός αυτών των μέσων είναι η αδυναμία τους να διακρίνουν μεταξύ παθογόνων *L. monocytogenes* και μη παθογόνων *Listeria* ειδών . Παρόλο που τα μέσα PALCAM και Oxford περιέχουν εκλεκτικούς παράγοντες που αναστέλλουν την ανάπτυξη των περισσότερων άλλων μικροοργανισμών, ορισμένα βακτήρια, όπως το *Enterococcus* και το *Bacillus*, μπορούν να αναπτυχθούν και να χρησιμοποιήσουν την εσκουλίνη, εμφανίζοντας παρόμοια μορφολογία αποικιών. Επομένως, απαιτούνται περαιτέρω βιοχημικές εξετάσεις για την οριστική ταυτοποίηση των αποικιών *Listeria*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι θετικοί κατά Gram ράβδοι, αερόβιοι ή προαιρετικά αναερόβιοι, μη σπορογόνοι, και η πλειονότητά τους είναι θετική στην καταλάση και αρνητική στην οξειδάση . Τα περισσότερα στελέχη εμφανίζουν κινητικότητα στους 28°C και είναι ακίνητα στους 37°C. (Beata,2022). Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα βιοχημικά κιτ, που έχουν επικυρωθεί και χρησιμοποιούνται ευρέως στην τυπική μικροβιολογική πρακτική, όπως το ISO (ISO, 2017).

Η ανάπτυξη μέσων που περιέχουν αίμα επέτρεψε τον διαχωρισμό των αιμολυτικών ειδών του είδους *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri* και *L. ivanovii*) από τα μη αιμολυτικά και μη παθογόνα είδη, όπως *L. innocua*, *L. grayi* και *L. welshimeri*. Αυτό το χαρακτηριστικό του *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίησή του, π.χ., σε ενισχυμένο άγαρ αιμόλυσης (EHA), ή σε άγαρ αίματος για *L. monocytogenes* (LMBA), που χρησιμοποιείται ειδικά μετά τον εμπλουτισμό του δείγματος. Ένα ορόσημο στη βελτίωση της απομόνωσης του *L. monocytogenes* έγινε όταν εισήχθησαν χρωμογόνα μέσα. Ένα από τα πρώτα τέτοια άγαρ ήταν το Agar *Listeria* σύμφωνα με τους Ottaviani και Agosti (ALOA). Το μέσο αυτό περιέχει 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γλυκοπυρανοσίδη (X-γλυκοσίδη), μια χρωμογόνο ένωση που αποτελεί υπόστρωμα για την ανίχνευση της β-γλυκοσιδάσης. Το ένζυμο αυτό καταλύει την υδρόλυση των γλυκοσιδικών δεσμών σε τερματικά μη αναγωγικά υπολείμματα σε β-D-γλυκοζίτες και ολιγοσακχαρίτες, με απελευθέρωση γλυκόζης (Ottaviani et al., 1997). Η β-γλυκοσιδάση είναι κοινή σε όλα τα είδη της *Listeria*, τα οποία εμφανίζονται ως αποικίες πράσινου-μπλε χρώματος(εικόνα 7) στις πλάκες άγαρ ALOA.

Εικόνα 7: Τρυβλίο ALOA με χαρακτηριστικές αποικίες *Listeria monocytogenes* χρώματος μπλε – πράσινο.(Boyer,2021)



Η εκλεκτικότητα του μέσου επιτυγχάνεται με την προσθήκη χλωριούχου λιθίου και αντιμικροβιακών, όπως η κεφταζιδίμη, η πολυμυξίνη Β, το ναλιδιξικό οξύ και το

κυκλοεξιμίδιο. Ένα επιπλέον χρωμογόνο μέσο που συχνά χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του *L. monocytogenes* είναι το CHROMagar™ *Listeria* (Becton Dickinson Diagnostics), το οποίο αποτελεί μια παραλλαγή του ALOA. Στο συγκεκριμένο μέσο, οι αποικίες του *L. monocytogenes* εμφανίζονται μπλε με λευκό φωτοστέφανο, ενώ οι αποικίες άλλων *Listeria* spp. είναι επίσης μπλε, αλλά χωρίς φωτοστέφανο. Πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένα στελέχη του *L. ivanovii* μπορούν επίσης να αναπτυχθούν στο CHROMagar™ *Listeria* ως μπλε αποικίες με λευκό φωτοστέφανο .

Όλα τα χρωμογόνα μέσα είναι χρήσιμα για την ταχεία απομόνωση και διάκριση του *L. monocytogenes* από άλλα μη παθογόνα είδη *Listeria*. Ωστόσο, η ειδικότητά τους μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τα δείγματα τροφίμων που εξετάζονται . Συνεπώς, για την ταχεία και ταυτόχρονα ειδική ταυτοποίηση του *L. monocytogenes*, συστήνεται η χρήση συνδυασμού εκλεκτικών και χρωμογόνων μέσων, λαμβάνοντας υπόψη την εμπειρία του εργαστηρίου και τον τύπο του δείγματος. Δεν υπάρχει, ωστόσο, κάποιο «χρυσό πρότυπο» μέσο για την απομόνωση του *L. monocytogenes* από διάφορα δείγματα τροφίμων (Kinga, 2022).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

Μοριακές μέθοδοι με βάση τα Νουκλεϊκά οξέα

Η ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων αποτελεί μια μοριακή μέθοδο που βασίζεται στον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων γονιδιωμάτων παθογόνων οργανισμών (DNA/RNA). Είναι μια από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους ανίχνευσης παθογόνων σε τρόφιμα, καθώς ξεπερνά άλλες συμβατικές μεθόδους όσον αφορά την ταχύτητα, την ευαισθησία, την ακρίβεια, την ειδικότητα, την αξιοπιστία, το μικρό κίνδυνο μόλυνσης και την ικανότητα ανίχνευσης ακόμα και μικρών ποσοτήτων νουκλεϊκού οξέος στο δείγμα. Η αρχή αυτής της μεθόδου στηρίζεται στην ενίσχυση των γονιδιωμάτων διαφόρων παθογόνων μέσω της χρήσης συγκεκριμένων εκκινητών, οι οποίοι επιτρέπουν την αντιγραφή των στόχων σε τρία βασικά στάδια θερμοκρασίας: μετουσίωση, υβριδισμός και επιμήκυνση. Τα στάδια αυτά πραγματοποιούνται σε μηχανές θερμικού κυκλώματος που ρυθμίζουν τις κατάλληλες θερμοκρασίες. Η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται μέσω ηλεκτροφόρησης σε γέλη αгарόζης και χρώσης με βρωμιούχο αιθίδιο, που επιτρέπει την οπτική ταυτοποίηση των νουκλεϊκών αλυσιδών. Το πρώτο βήμα στη μέθοδο ανίχνευσης με βάση το νουκλεϊκό οξύ είναι η επιλογή των συγκεκριμένων αλληλουχιών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση παθογόνων. Ένα διατηρημένο γονίδιο με καθορισμένες αλληλουχίες χρησιμοποιείται για την επιλογή μιας αλληλουχίας στόχου των βακτηρίων. Οι ριβοσωμικές αλληλουχίες χρησιμοποιούνται ευρέως ως στόχοι για την ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης, καθώς περιέχουν ένα βακτηριακό ριβοσωμικό RNA (rRNA), συγκεκριμένα το γονίδιο 16S rRNA, το γονίδιο 23S rRNA και μια περιοχή διαγονιδιακού διαχωριστή (IGS). Γενικά, το γονίδιο 16S rRNA χρησιμοποιείται συχνά στη μοριακή βακτηριακή ανίχνευση λόγω της διατήρησής του και της ποικιλομορφίας που παρουσιάζει μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών ειδών. Μια μέθοδος που βασίζεται σε νουκλεϊκά οξέα απαιτεί έγκαιρη παρακολούθηση και αποτελεσματική επιτήρηση. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες δυσκολίες στην ανίχνευση, καθώς τα σωματίδια τροφής μπορούν να αναστέλλουν την τεχνική και να δυσχεραίνουν τη διαφοροποίηση μεταξύ DNA από ζωντανά και νεκρά κύτταρα. Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων, είναι αναγκαία η ανάπτυξη μεθόδων που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα, όπως ο καθαρισμός, η λύση των κυττάρων, η εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων, η αποτυχία της

αντίδρασης, η αποτροπή διασταυρούμενης μόλυνσης, ο ανταγωνισμός του DNA μη στόχων και η αντιμετώπιση ψευδώς θετικών σημάτων. Είναι ζωτικής σημασίας η σχεδίαση ενός καλά δομημένου primer που να μην ενισχύει τις αλληλουχίες μη στόχων. (Kabiraz et al., 2023) Οι διάφορες μέθοδοι που βασίζονται στα νουκλειικά οξέα είναι οι εξής: Συμβατική PCR, RealTime PCR, DIGITAL PCR, Multiplex PCR, LAMP, NASBA

3.1 Συμβατική PCR

τεχνική ενίσχυσης θερμικών κύκλων

Η συμβατική PCR χρησιμοποιεί ως ένζυμο την DNA πολυμεράση, δυο εκκινητές και ο χρόνος αντίδρασης κυμαίνεται από 50 – 120 λεπτά. Στην εικόνα 8 παρουσιάζεται ο σχηματικός μηχανισμός της τεχνικής PCR, μια διαδικασία που περιλαμβάνει τα εξής **στάδια** σε κάθε κύκλο:

1.αποδιάταξη αρχικού δείγματος: Το δείγμα θερμένεται στους 95°C για 15 min περίπου, ώστε να γίνει η αποδιάταξη του DNA με τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και την καταστροφή των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών έτσι ώστε να ανοίξει σε δυο μονόκλωνες αλυσίδες η διπλή έλικα.

2.υβριδίσωση:Υπάρχει μείωση της θερμοκρασίας που κειμένεται από 50-71°C για 30 με 60 sec ώστε οι εκκινητές να προσδεθούν στο DNA εκμαγείο στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας. Η θερμοκρασία εξαρτάται από τη βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών, η οποία για εκκινητές μήκους περίπου 20 βάσεων προσεγγίζεται από τον τύπο: $T_m = (A+T) \cdot 2 + (G+C) \cdot 4$ °C. **Θερμοκρασία τήξης (Tm)** είναι η θερμοκρασία κατά την οποία γίνεται μετάβαση κατά 50% από το δίκλωνο DNA στο μονόκλωνο.

3.Προέκταση ή επιμήκυνση: Η θερμοκρασία φτάνει σε επίπεδο 72 °C όπου είναι η μέγιστη θερμοκρασία για την θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, όπου γίνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA με τη χρήση δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) του διαλύματος. Σε αυτό το στάδιο ο χρόνος επώασης είναι 0,5-3 min και εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος του DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε.

4.Αποδιάταξη: Υπάρχει αύξηση της θερμοκρασίας στο επίπεδο των 94 °C για 30-60 sec , έτσι ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA που δημιουργήθηκαν, να αποχωριστούν πάλι και να είναι εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA

Τα στάδια 2 έως 4 επαναλαμβάνονται 25-40 κύκλοι. Η χρονική διάρκεια προέκτασης του τελευταίου κύκλου είναι περίπου 10 min έτσι ώστε να υπάρχει χρόνος για να επεκταθούν όλα τα προϊόντα από την DNA πολυμεράση (Σκορίλας Α., 2020).

Η συμβατική PCR για την *Escherichia coli* έχει γονίδιο στόχο το *STX2B* μέγεθος ενισχυμένου προϊόντος 300 ζεύγη βάσεων (Bahadoripour & Jahandar., 2019) και primers:

Forward TATACGATGACACCGGAAGAAG

Reverse CCTGCGATTCAGAAAAGCAGC

Ενώ για το παθογόνο *Salmonella typhimurium* γονίδιο στόχο *MDH* μέγεθος ενισχυμένου προϊόντος 291 ζεύγη βάσεων (Y.-C. Chiang, et al. 2018). και primers

Forward CGCATTCCACCACGCCCTTC

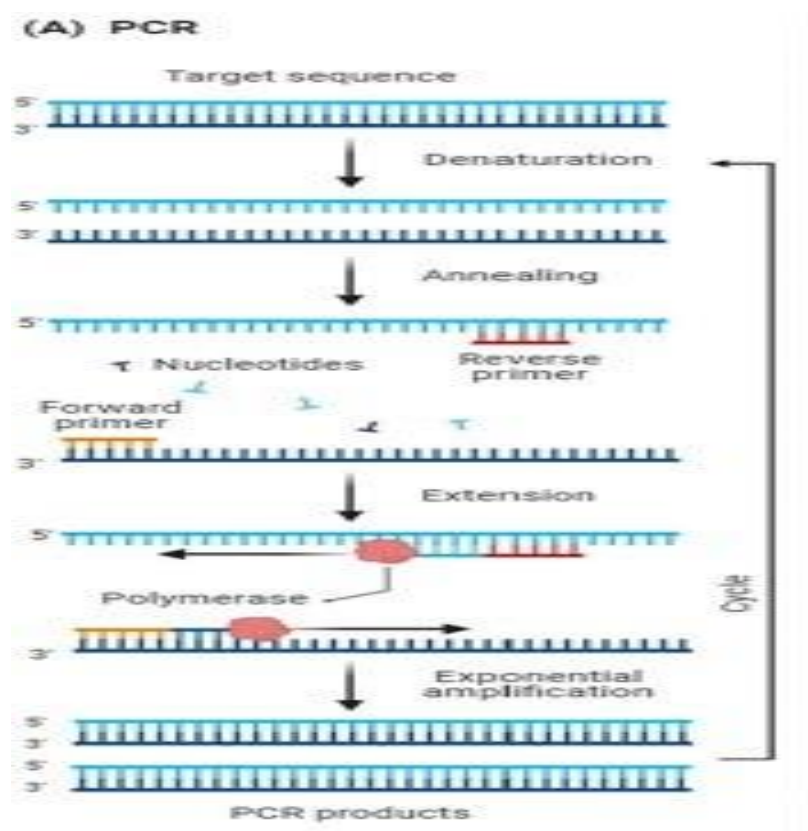
Reverse TGCCAACGGAAGTTGAAGTG

Η συμβατική PCR έχει μεγάλη εφαρμογή στην ανίχνευση διαφόρων παθογόνων σε δείγματα τροφίμων, όπως θαλασσινά, γάλα, ρύζι, αυγά και λαχανικά, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες. Το όριο ανίχνευσης (LOD) της μεθόδου ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο τροφίμου και το είδος παθογόνου. Οι Fang et al. (2021) ανέφεραν ότι η συμβατική PCR μπορούσε να ανιχνεύσει το *V. cholerae* σε γαρίδες σε συγκέντρωση 10^3 cfu/mL, ενώ οι Liu et al. (2022) διαπίστωσαν ότι η μέθοδος αυτή μπορούσε να εντοπίσει το *Salmonella Pullorum* σε αυγά σε συγκέντρωση 10^5 cfu/mL. Επιπλέον, η Sun et al. (2022) ανέφεραν ότι το όριο ανίχνευσης για το *L. monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος ήταν περίπου 10^4 cfu/mL μετά από εμπλουτισμό των δειγμάτων για 9 ώρες.

Πρόσφατα, συνεχίστηκαν οι προσπάθειες ανάπτυξης προσεγγίσεων για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων σε έναν μόνο δοκιμαστικό σωλήνα. Οι Hernández et al. (2022) πραγματοποίησαν μελέτη για την ταυτόχρονη ανίχνευση *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* σε λαχανικά, φράουλες και βατόμουρα, χρησιμοποιώντας μια αντίδραση σε ένα σωλήνα. Ανέφεραν ότι το όριο ανίχνευσης για τον νοροϊό ήταν 1-100 pfu/mL χωρίς εμπλουτισμό δείγματος, ενώ για τη *Salmonella* spp., τη *Shigella* spp. και το *E. coli* ήταν 1-10 cfu/mL μετά από 24 ώρες εμπλουτισμού. Το ίδιο είπαν, Liu et al. (2022b) ανέφεραν την ταυτόχρονη ανίχνευση *Salmonella Pullorum* και *Salmonella Enteritidis* σε αυγά

κοτόπουλου με συγκέντρωση 10^4 cfu/mL μετά από εμπλουτισμό για 2 ώρες· επιπλέον, έδειξαν ότι ο εμπλουτισμός των δειγμάτων για 6 ώρες και 10-12 ώρες επέτρεπε την ανίχνευση αυτών των παθογόνων σε συγκέντρωση 10 και 1 cfu/mL, αντίστοιχα.

Εικόνα 8: Τεχνική PCR (Kabiraz et al., 2023)



Ενώ ο εμπλουτισμός μπορεί να ενισχύσει την ευαισθησία της ανίχνευσης παθογόνων, δεν είναι πάντα ιδανικός για την επίτευξη έγκαιρων αποτελεσμάτων. Έτσι, πρόσφατες μελέτες έχουν αναπτύξει καινοτόμες προσεγγίσεις για τη βελτίωση της απόδοσης της συμβατικής PCR στην ανίχνευση παθογόνων σε δείγματα τροφίμων, συνδυάζοντάς την με άλλες βασικές τεχνολογίες, όπως νέες τεχνικές διαχωρισμού με ηλεκτροφόρηση, τεχνολογίες που βασίζονται σε νανοϋλικά και τεχνολογίες που στηρίζονται σε CRISPR/Cas. Οι μέθοδοι αυτές περιορίζουν ή εξαλείφουν την ανάγκη εμπλουτισμού του δείγματος,

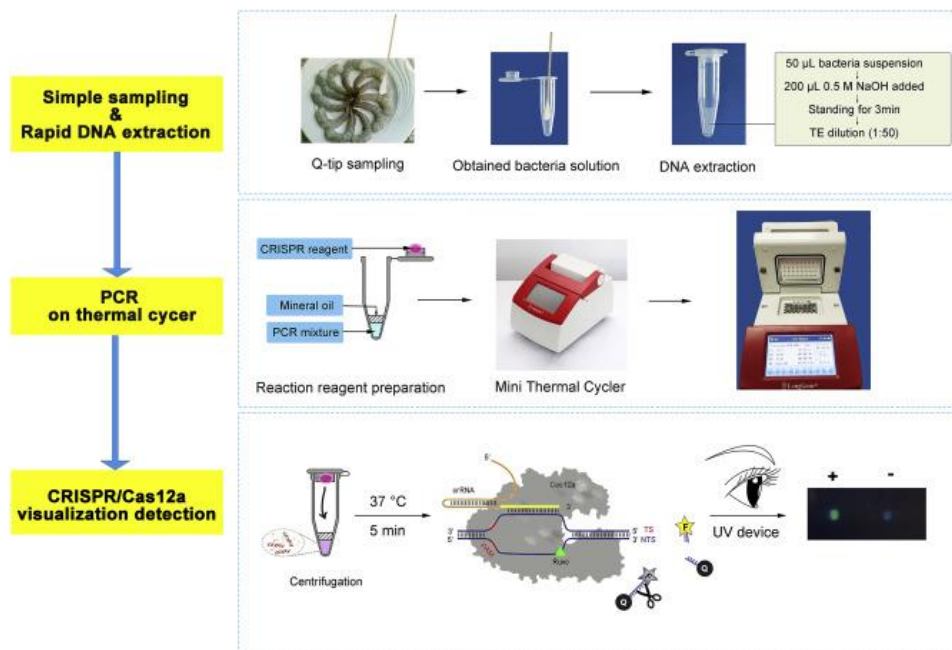
μειώνοντας σημαντικά τον απαιτούμενο χρόνο. Οι He et al. (2022) συνδύασαν την PCR με τη χρήση μαγνητικών νανοκουκκίδων άνθρακα (Mag-Cds) και με τεχνική ηλεκτροκινητικού διαχωρισμού, τη λεγόμενη τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE), για την ανίχνευση παθογόνων σε δείγματα τροφίμων. Στη μελέτη τους, τα Mag-Cds χρησιμοποιήθηκαν για τη σύλληψη των βακτηριακών κυττάρων του παθογόνου πριν από την εξαγωγή DNA, ενώ το CE επέτρεψε την ανάλυση αμπλικονίου. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η μέθοδος τους μπορούσε να ανιχνεύσει ταυτόχρονα την παρουσία *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* και *L. monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος με συγκέντρωση 10 cfu/mL, χωρίς την ανάγκη εμπλουτισμού των δειγμάτων. Επιπλέον, τόνισαν ότι η μέθοδος ήταν 6 φορές ταχύτερη από τις παραδοσιακές καλλιεργητικές μεθόδους. Αντίστοιχα, μια πρόσφατη μελέτη από τους Campàs et al. (2023) χρησιμοποίησε μια συστοιχία PCR σε συνδυασμό με έναν ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα για την ανίχνευση παθογόνων σε δείγματα τροφίμων. Αν και η μέθοδος τους μπορούσε να ανιχνεύσει την παρουσία 1 cfu/mL *V. parahaemolyticus* σε στρείδια, τα δείγματα απαιτούσαν εμπλουτισμό για 6-24 ώρες πριν από την ανάλυση.

3.1.1 Συμβατική PCR συνδιαστικά με CRISPR/CAS

Η ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων σε δείγματα τροφίμων μέσω συμβατικής PCR έχει επίσης συνδυαστεί με την τεχνολογία που βασίζεται σε CRISPR/Cas, προκειμένου να βελτιωθούν η ειδικότητα και η ευαισθησία της ανίχνευσης. Η συγκεκριμένη τεχνολογία αναφέρεται σε ένα επαναστατικό σύστημα γονιδιακής επεξεργασίας που αξιοποιεί τις ομαδοποιημένες τακτικά διακεκομμένες επαναλήψεις (CRISPR) και τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με το CRISPR (Cas). Σε αυτή την προσέγγιση, το ενισχυμένο προϊόν που προκύπτει από την PCR υπόκειται σε ανάλυση βάσει της τεχνολογίας CRISPR/Cas, επιτρέποντας την ταυτοποίηση του παθογόνου στόχου (εικ 9). Οι Zhang et al. (2020) χρησιμοποίησαν μια συστοιχία PCR σε συνδυασμό με τεχνολογία CRISPR/Cas για την ανίχνευση ενός παθογόνου σε δείγματα θαλασσινών. Η μέθοδος τους αξιοποίησε το Cas12a για να πραγματοποιήσει διάσπαση του διπλού κλώνου DNA (dsDNA) υπό την καθοδήγηση του ριβονουκλεϊκού οξέος CRISPR (crRNA). Συνδέοντας τη συστοιχία PCR με την τεχνική βασισμένη σε CRISPR/Cas, μπόρεσαν να ανιχνεύσουν το *V.*

parahaemolyticus σε συγκέντρωση 100 cfu/ml σε γαρίδες, χωρίς την ανάγκη εμπλουτισμού του δείγματος. Αξιοσημείωτο είναι πως το αναπτυγμένο σύστημά τους θα μπορούσε ενδεχομένως να εφαρμοστεί στην επιτόπια ανίχνευση, καθώς παρέχει μια οπτικοποίηση τελικού σημείου που μπορεί να παρατηρηθεί με γυμνό μάτι. (Kabiraz et al., 2023).

Εικόνα 9: Σχηματική μέθοδος οπτικοποιημένης ανίχνευσης επιλεκτικού τελικού σημείου για το *Vibrio parahaemolyticus* με βάση την PCR με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή.



3.2 Real Time –PCR

Τεχνική ενίσχυσης θερμικών κύκλων

Η Real-time PCR (γνωστή και ως qPCR) μετρά την ενίσχυση του DNA κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου της PCR χρησιμοποιώντας φθορίζουσες χρωστικές ή ανιχνευτές TaqMan. Χρειάζεται δυο εκκινητές και ο χρόνος αντίδρασης κυμαίνεται από 50 – 120 λεπτά. Στη διαδικασία της qPCR, το σήμα φθορισμού αυξάνεται καθώς συσσωρεύεται το ενισχυμένο DNA. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για να διασχίσει ο φθορισμός ένα καθορισμένο κατώφλι (Ct) χρησιμοποιείται για την ποσοτική εκτίμηση της αρχικής ποσότητας του προτύπου DNA. Σε πρόσφατες μελέτες, η qPCR έχει αξιοποιηθεί για την

ανίχνευση και την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση παθογόνων σε διάφορους τύπους τροφίμων, όπως αυγά, κρέας, θαλασσινά και φρέσκα λαχανικά. Παρόμοια με τη συμβατική PCR, η ευαισθησία της qPCR διαφέρει ανάλογα με το είδος του παθογόνου, τον τύπο του τροφίμου και το χρόνο εμπλουτισμού. Σύμφωνα με τους Kim et al. (2020) η μέθοδος qPCR μπορούσε να ανιχνεύσει την παρουσία του *E. coli* O157:H7 σε μαρούλι και βόειο κρέας σε συγκέντρωση 10^3 cfu/mL. Στην ίδια μελέτη, χρησιμοποιώντας τον ίδιο τύπο δειγμάτων τροφίμων, οι συγγραφείς διαπίστωσαν επίσης ότι η συγκεκριμένη μέθοδος ήταν ικανή να ανιχνεύσει την παρουσία του *L. monocytogenes* και του *Salmonella Typhimurium* σε συγκέντρωση 10^2 cfu/mL. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική qPCR για την ανίχνευση της παρουσίας των *S. aureus*, *S. capitis*, *S. caprae* και *S. epidermidis* στο γάλα. Διαπιστώθηκε ότι το όριο ανίχνευσης για αυτά τα τέσσερα είδη σταφυλόκοκκου ήταν περίπου 10^2 cfu/mL. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος ήταν ικανή να ανιχνεύσει μόνο την παρουσία *Campylobacter* spp. σε δείγματα κοτόπουλου σε συγκέντρωση $3,2 \times 10^5$ cfu/mL, ακόμη και μετά τον εμπλουτισμό των δειγμάτων για 24–48 ώρες. Αντίθετα, η ίδια μέθοδος μπορούσε να ανιχνεύσει την παρουσία *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. και *E. coli* σε χοιρινό, βοδινό, κοτόπουλο και φυτό φασιολιών mung σε συγκέντρωση 1 cfu/25 g, μετά από εμπλουτισμό των δειγμάτων για 18 ώρες (Bundidamorn et al., 2021). Σε μια άλλη μελέτη, οι Garrido-Maestu et al. (2020) ανέφεραν ότι μπορούσαν να ανιχνεύσουν την παρουσία του *E. coli* O157 σε μοσχάρι κιμά και φυλλώδη λαχανικά σε συγκεντρώσεις 3,9 cfu/25 g και 3,3 cfu/25 g, αντίστοιχα, μετά από εμπλουτισμό των δειγμάτων για 3 ώρες. Ακολουθεί περιγραφή εκκινητών για γονίδια στόχους στα παθογόνα βακτήρια (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*).

Escherichia coli *uidA gene*

Forward CGGAAGCAACGCGTAAACTC

Reverse TGAGCGTCGCAGAACATTACA 1300 Taq Man probe

(Silkie et al., 2008)

Listeria monocytogenes *hlyA gene*

Forward GCAACAACTGAAGCAAAGGAT

Reverse CGATTGGCGTCTTAGGACTTGC 2000 hly specific probe

(A. Garrido-Maestu, et al.,2018)

Salmonella enterica *ssaN* gene

Forward GCCAGAAGCGTGCTTTTCC

Reverse GGGCAACGAGTGGGTATTTTT IAC probe

(J. Chen, et al.,2010)

3.3 Multiplex PCR

Αυτή η μέθοδος αποτελείται από δύο ή περισσότερα σύνολα εκκινητών που χρησιμοποιούνται σε μία μόνο αντίδραση για την παραγωγή πολλαπλών αμπλικονίων ειδικά για διάφορες αλληλουχίες DNA. Επιτρέπει την ενίσχυση πολλαπλών αλληλουχιών στόχων σε μία μόνο αντίδραση . Αυτή η ανάλυση μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ πραγματικών και ψευδών αποτελεσμάτων όπου ορισμένοι εκκινητές στοχεύουν στην ανίχνευση της παρουσίας παθογόνων και άλλοι εκκινητές χρησιμοποιούνται για τη στόχευση της ενδιαφέρουσας αλληλουχίας. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην ενίσχυση θα πρέπει να έχουν διακριτό μέγεθος σχεδιασμένο για ξεχωριστή ενίσχυση, η οποία εξαρτάται από τα βασικά συστατικά-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοσίδια (dNTPs), ενζυμική δραστηριότητα, MgCl₂ συγκέντρωση και τη φύση του DNA στόχου . Η δυνατότητα αυτής της μεθόδου είναι να εξοικονομήσει χρόνο, κόστος και προσπάθεια για τον εντοπισμό βακτηρίων, ιών και παρασίτων. Ωστόσο, δημιουργεί ορισμένες δυσκολίες στην ευαισθησία, την ειδικότητα, τη διαδικασία βελτιστοποίησης και την προνομιακή ενίσχυση συγκεκριμένων στόχων (Y.-G. Xu, et al .,2016).

3.3.1 Multiplex RT-PCR με ανιχνευτή TaqMan για ταυτόχρονη ανίχνευση *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. και *Escherichia coli* που παράγει τοξίνη Shiga στα τρόφιμα

Η τρέχουσα τάση στην ανάπτυξη μεθόδων ταχείας ανίχνευσης επικεντρώνεται στην ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών παθογόνων βακτηρίων σε έναν μόνο σωλήνα αντίδρασης. Ωστόσο, δεν υπάρχουν έως τώρα μελέτες που να έχουν αναπτύξει μια μονοσωληνική mRT-PCR με ανιχνευτή TaqMan® για την ταυτόχρονη ποιοτική ανίχνευση *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. και STEC σε τροφικές μήτρες. Οι (Bundidamorn et al., 2021) είχαν σκοπό την ανάπτυξη μιας γρήγορης και ολοκληρωμένης πλατφόρμας, η οποία θα χρησιμοποιεί εμπλουτισμό σε έναν μόνο ζωμό και απλή εκχύλιση DNA με μέθοδο βρασμού, ακο λουθούμενη από μια mRT-PCR με ανιχνευτή TaqMan® σε έναν σωλήνα, για την ανίχνευση της παρουσίας ή απουσίας βιώσιμων *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. και STEC σε δείγματα τροφίμων, τόσο τεχνητά όσο και φυσικά μολυσμένα. Η προσέγγιση αυτή στοχεύει να αποτελέσει μια εναλλακτική μέθοδος που είναι απλή, γρήγορη, οικονομική, μειώνει τον φόρτο εργασίας και είναι κατάλληλη για δοκιμές διαλογής. Επιπλέον, περιελάμβανε σύγκριση της απόδοσης της αναπτυγμένης mRT-PCR με ανιχνευτή TaqMan® σε σχέση με δύο αναφοράμεθόδους: τις παραδοσιακές μικροβιολογικές μεθόδους και τα εμπορικά κιτ RT-PCR uniplex που βασίζονται σε ανιχνευτή TaqMan®.

Υλικά και μέθοδοι

Ελήφθησαν 131 βακτηριακά στελέχη *Λιστέρια*, *Σαλμονέλλα* και *E.Coli* από διάφορες πηγές και παρασκευάστηκαν.

Εξαγωγή DNA

το καθαρό DNA για τις αξιολογήσεις ειδικότητας και ευαισθησίας των εκκινητών και των ανιχνευτών λήφθηκε από 1 mL καθαρών βακτηριακών καλλιιεργειών, χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό κιτ εξαγωγής DNA (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Γερμανία), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση του DNA μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). Το εξαγόμενο DNA αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

Επιπλέον, επιλέχθηκε η μέθοδος βρασμού, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται από το έργο των Trevanich et al. (2010), για την εξαγωγή DNA από κάθε καθαρή

βακτηριακή καλλιέργεια ή εμπλουτισμένα δείγματα τροφίμων μετά από καλλιέργεια 18 ωρών σε ζωμό ταυτόχρονου εμπλουτισμού (SEB). Συγκεκριμένα, 1 mL βακτηριακών κυττάρων ή εμπλουτισμένων δειγμάτων τροφίμων συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στους 12.000 rpm για 3 λεπτά. Τα σφαιρίδια κυττάρων πλύθηκαν δύο φορές με 100 µL ρυθμιστικού διαλύματος TE και φυγοκεντρήθηκαν ξανά στις 12.000 rpm για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 µL ρυθμιστικού διαλύματος TE και βράστηκε για 5 λεπτά. Μετά το βρασμό, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε ξανά στις 12.000 rpm για 3 λεπτά, και το υπερκείμενο που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε απευθείας ως πρότυπο DNA για την περαιτέρω mRT-PCR.

Το ληφθέν DNA χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της ευαισθησίας της βελτιστοποιημένης μεθόδου mRT-PCR, σε σύγκριση με το DNA που εξήχθη χρησιμοποιώντας εμπορικό κιτ.

Γονίδια-στόχοι, εκκινητές και ανιχνευτές

Οι εκκινητές των ανιχνευτών που είναι κατάλληλοι για κάθε γονίδιο στόχο φαίνονται στον πίνακα 2

Πίνακας 2: Γονίδια-στόχοι, εκκινητές και ανιχνευτές για πολλαπλή PCR ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο των *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. και *STEC*.

Target bacterium	Target gene	Primer/Probe	Sequence (5'→3')
<i>L. monocytogenes</i>	hlyA	HlyA-F	AAATCATCGACGGCAACCT
		HlyA-R	GGACGATGTGAAATGAGC
		HlyA-Pa	[HEX]CACCAGGAGTTCCCATTCGC[BHQ1]
<i>Salmonella</i> spp.	invA	InvA-F	GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA
		InvA-R	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC
		InvA-P	[CY5]AAAGGTTTCAGAACGCGTCGCGGAAGT[BHQ3]
<i>STEC</i>	stx1,	Stx1,2-Fb	TTGARCGAAATAATTTATATGTG

	stx2		
		Stx1,2-R	ACGAAATCCCCTCTGTATCTGCC
		Stx1,2-P	[FAM]GCTTCTGCTGTCACAGTGACAAA[BH Q1]

3.3.2 Βελτιστοποίηση της αντίδρασης Taqman® RT-PCR uniplex για κάθε σειρά εκκινητών και ανιχνευτών

Βελτιστοποιήθηκε η αντίδραση Uniplex Taqman® RT-PCR για κάθε σετ εκκινητών και ανιχνευτών. Δέκα ng από κάθε DNA στόχο, που προέρχεται από τα στελέχη *L. monocytogenes* DMST 17303, *S. Enteritidis* DMST 15676 και *E. coli* O26 CDC 03–3014, εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό κιτ δοκιμής και χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπο ανά αντίδραση των 10 µL. Για τη βελτιστοποίηση των εκκινητών, τα μίγματα αντίδρασης περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις κατάταξης εκκινητή από 250 έως 900 nM, ενώ η συγκέντρωση του ανιχνευτή διατηρήθηκε σταθερή στα 250 nM. Αντίστοιχα, για τη βελτιστοποίηση του ανιχνευτή, τα μίγματα αντίδρασης περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ανιχνευτή στην περιοχή 150–250 nM, ενώ οι συγκεντρώσεις των εμπρόσθιων και αντίστροφων εκκινητών ορίστηκαν στα 200 nM το καθένα.

Πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο θερμικού κύκλου χρησιμοποιώντας το σύστημα Mx3005p Real-Time PCR (Agilent Technologies, CA, USA), με τις εξής θερμοκρασίες και χρόνους: 94 °C για 3 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους των 94 °C για 5–15 δευτερόλεπτα, 50–65 °C για 10–60 δευτερόλεπτα, και 72 °C για 30 δευτερόλεπτα. Τα αποτελέσματα και οι τιμές του κατωφλίου κύκλου (CT) προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό MxPro™ έκδοσης 4.10 (Stratagene, CA).

Για να επιτευχθεί αποτελεσματικότητα άνω του 90% σε κάθε αντίδραση μονής όψης Taqman® RT-PCR, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA στόχου (0,00001, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 και 10 ng) με τη βελτιστοποιημένη αντίδραση κάθε σετ εκκινητών και ανιχνευτή. Η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης της αντίδρασης Taqman® RT-PCR αξιολογήθηκε με την εξίσωση $E = (10^{(-1/\kappa\lambda\iota\sigma\eta)} - 1) \times 100$.

3.3.3 Βελτιστοποίηση της δοκιμασίας Taqman® mRT-PCR για την ανίχνευση τριών βακτηριακών στόχων

Για να επιτευχθούν παρόμοιες τιμές CT σε κάθε Uniplex Taqman® RT-PCR για κάθε βακτήριο-στόχο, η αντίδραση βελτιστοποιήθηκε σε όγκο 10 µL, συμπεριλαμβάνοντας 1 × SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA), τρία σετ ειδικών εκκινητών και ανιχνευτών σε καθορισμένες τελικές συγκεντρώσεις (HlyA-F και HlyA-R: 0,2 µM το καθένα, InvA-F και InvA-R: 0,1 µM το καθένα, Stx1,2-F και Stx1,2-R: 0,4 µM το καθένα, και όλοι οι ανιχνευτές Taqman®: 0,15 µM το καθένα). Επιπλέον, προστέθηκε 1 µL από κάθε πρότυπο DNA στόχου (10 ng) από καθαρή καλλιέργεια και δείγματα εμπλουτισμού. Η αντίδραση Taqman® mRT-PCR για βακτήρια με μονο-, διπλό και τριπλό στόχο πραγματοποιήθηκε σε διπλά αντιγράφων με το ακόλουθο πρόγραμμα: αρχική θερμοκρασία 94 °C για 3 λεπτά, και στη συνέχεια 40 κύκλοι από 94 °C για 10 δευτερόλεπτα, 50 °C για 30 δευτερόλεπτα και 72 °C για 30 δευτερόλεπτα. Τα αποτελέσματα και οι τιμές CT αναλύθηκαν σύμφωνα με την προηγούμενη περιγραφή.

3.3.4 Εξειδίκευση και ευαισθησία της Taqman® mRT-PCR για την ανίχνευση τριών βακτηριακών στόχων

Συνολικά, επιλέχθηκαν 131 βακτηριακά στελέχη για την αξιολόγηση της ειδικότητας της βελτιστοποιημένης Taqman® mRT-PCR. Το πρότυπο DNA εξήχθη με τη χρήση ενός εμπορικού κιτ δοκιμής και χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ειδικότητας. Σε κάθε ανάλυση Taqman® mRT-PCR πραγματοποιούνταν δοκιμές με δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων.

Για τον έλεγχο ευαισθησίας, χρησιμοποιήθηκαν τρία αντιπροσωπευτικά στελέχη: το *L. monocytogenes* DMST 17303, το *S. Enteritidis* DMST 15676 και το *E. coli* O26 CDC 03–3014. Κάθε βακτήριο καλλιεργήθηκε ξεχωριστά σε SEB στους 37 °C για 18 ώρες ώστε να επιτευχθούν περίπου 10^8 – 10^9 CFU/mL. Από κάθε καλλιέργεια, εξήχθη το DNA με το DNeasy Blood and Tissue Kit και παράγονται σειριακές αραιώσεις DNA σε συγκεντρώσεις 10 ng, από 0,0001 έως 10 ng, με στόχο την αξιολόγηση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το DNA από κάθε παθογόνο βακτήριο αξιολογήθηκε ξεχωριστά, καθώς και σε μείγματα DNA που περιείχαν ίσες αναλογίες από τα τρία στελέχη, υπό τις βελτιστοποιημένες συνθήκες Taqman® mRT-PCR.

Επιπλέον, παρασκευάστηκαν αραιώσεις βακτηριακού εναιωρήματος σε συγκεντρώσεις από 100 έως 10^8 CFU/mL, χρησιμοποιώντας ένα μείγμα 1:1:1 των *L. monocytogenes* DMST 17303, *S. Enteritidis* DMST 15676 και *E. coli* O26 CDC 03–3014, διαλυμένο σε αποστειρωμένο αλατούχο διάλυμα 0,85%. Από κάθε αραιωμένο εναιώρημα, εκχυλίστηκε το DNA με τη μέθοδο βρασμού, και ένα μικρολίτρο του υπερκείμενου εφαρμόστηκε ως πρότυπο DNA στη δοκιμασία Taqman® mRT-PCR.

3.3.5 Taqman® mRT-PCR για τον έλεγχο και την ανίχνευση τεχνητά ή φυσικά μολυσμένων δειγμάτων τροφίμων σε σύγκριση με τα εμπορικά kit δοκιμών BAM και Uniplex RT-PCR

Για την ανάλυση τεχνητά μολυσμένων δειγμάτων τροφίμων, συλλέχθηκαν τυχαία τέσσερα διαφορετικά είδη ωμών τροφίμων (χοιρινό, βοδινό, κρέας κοτόπουλου και φύτρα φασολιών) από διάφορα σούπερ μάρκετ και τοπικές αγορές στην περιοχή γύρω από την Μπανγκόκ της Ταϊλάνδης. Τα δείγματα συλλέχθηκαν με ασηπτικές συνθήκες σε αποστειρωμένες πλαστικές σακούλες, διατηρήθηκαν σε ψυγείο στους περίπου 4 °C και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο εντός τριών ωρών για περαιτέρω ανάλυση.

Χρησιμοποιήθηκε η συμβατική μέθοδος καλλιέργειας (Βακτηριολογικό Αναλυτικό Εγχειρίδιο, BAM) για την επιβεβαίωση ότι τα δείγματα δεν περιείχαν τους τρεις βακτηριακούς στόχους που υπήρχαν σε τεχνητά μολυσμένα δείγματα. Κάθε δείγμα τροφίμου των 25 g προετοιμάστηκε και ομογενοποιήθηκε με Stomacher σε 225 mL SEB. Συνολικά, δημιουργήθηκαν 32 δείγματα τροφίμων, κάθε ένα μολυσμένο είτε με έναν είτε με περισσότερους από τρεις βακτηριακούς στόχους (*L. monocytogenes* DMST 17303, *S. Enteritidis* DMST 15676 και *E. coli* O26:H11 CDC 03–3014) σε διαφορετικές αναλογίες ($10^0:0:0$, $0:10^0:0$, $0:0:10^0$, $10^0:10^0:10^0$, $10^1:10^1:10^1$, $10^2:10^2:10^2$, $10^3:10^3:10^3$ και $10^3:10^3:10^0$ CFU/25 g). Επιπλέον, συμπεριλήφθηκαν 32 δείγματα τροφίμων χωρίς μόλυνση (αρνητικό ελεγχόμενο δείγμα) για κάθε είδος τροφίμου.

Τα ομογενοποιημένα δείγματα τροφίμων επωάστηκαν απευθείας, χωρίς ανακίνηση, στους 37 °C για 18 ώρες. Για το δείγμα φύτρων φασολιών mung, ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με ανακίνηση χειρός αντί για ομογενοποίηση με στομάχι. Από κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση DNA από 1 mL του καλλιεργημένου δείγματος μετά από χρονικά διαστήματα 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 και 18 ωρών επώσεων, με τη μέθοδο

βρασμού. Το εξαγόμενο DNA χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία Taqman® mRT-PCR. Σε κάθε ανάλυση, συμπεριλήφθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες.

Παράλληλα, το μείγμα των τριών βακτηριακών στόχων σε διαφορετικές αναλογίες μεταφέρθηκε απευθείας σε SEB και καλλιεργήθηκε σε στατική καλλιέργεια στους 37 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα. Το DNA που εξήχθη από τα καλλιεργημένα δείγματα υποβλήθηκε και αυτό σε δοκιμασία Taqman® mRT-PCR.

Επίσης, κάθε βακτηριακός στόχος που υπήρχε σε τεχνητά μολυσμένα δείγματα επιβεβαιώθηκε με τη συμβατική μέθοδο καλλιέργειας (BAM) και με τη χρήση κιτ ανίχνευσης iQ-check® *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. ή STEC RT-PCR (BIO-RAD, Hercules, CA).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε 92 φυσικά μολυσμένα δείγματα τροφίμων (χοιρινό, βοδινό, κρέας κοτόπουλου και φύτρα φασολιών) χρησιμοποιώντας τόσο την αναπτυγμένη μέθοδο Taqman® mRT-PCR όσο και τη συμβατική καλλιεργητική μέθοδο.

3.3.6 Βελτιστοποίηση της μονoplex Taqman® RT-PCR και της Taqman® mRT-PCR για την ειδική ανίχνευση των τριών βακτηριακών στόχων – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι συνθήκες βελτιστοποίησης των uniplex Taqman® RT-PCR και Taqman® mRT-PCR δοκιμάστηκαν με τρία αντιπροσωπευτικά βακτήρια-στόχους: *L. monocytogenes* DMST 17303, *S. Enteritidis* DMST 15676 και *E. coli* O26 CDC 03–3014. Για το uniplex Taqman® RT-PCR, η βελτιστοποιημένη συγκέντρωση κάθε σετ εκκινητών και ανιχνευτή για κάθε βακτήριο-στόχο ήταν η ίδια (200 nM και 150 nM, αντίστοιχα). Ωστόσο, οι θερμοκρασίες ανόπτησης που βρέθηκαν βελτιστοποιημένες για κάθε ζεύγος εκκινητή και ανιχνευτή, καθώς και το γονίδιο στόχος κάθε βακτηρίου, διαφέρουν: 57 °C για το *L. monocytogenes*, 55 °C για το *Salmonella* spp. και 50 °C για το STEC. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η % αποτελεσματικότητα κάθε ζεύγους εκκινητή και ανιχνευτή υπό βελτιστοποιημένης συνθήκες uniplex Taqman® RT-PCR ήταν $90,15 \pm 0,12\%$, $91,13 \pm 0,74\%$ και $90,62 \pm 0,31\%$ για τα *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. και STEC αντίστοιχα, με υψηλούς συντελεστές συσχέτισης (R^2) άνω του 0,99. Οι τιμές CT που λήφθηκαν σε αυτήν τη δοκιμασία ήταν $15,92 \pm 1,52$ για το *L. monocytogenes*, $17,83 \pm 1,43$ για το *Salmonella* spp. και $18,72 \pm 1,67$ για το STEC.

Για το Taqman® mRT-PCR, η αντίδραση βελτιστοποιήθηκε με παρόμοια διαδικασία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η % αποτελεσματικότητα κάθε βακτηρίου-στόχου υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες ήταν $90,26 \pm 0,19\%$ (*L. monocytogenes*), $90,58 \pm 0,34\%$ (*Salmonella* spp.) και $90,45 \pm 0,33\%$ (STEC), με υψηλούς συντελεστές συσχέτισης ($R^2 > 0,99$). Οι τιμές CT σε αυτήν τη δοκιμασία ήταν $16,52 \pm 2,77$ για το *L. monocytogenes*, $17,45 \pm 2,52$ για το *Salmonella* spp. και $18,35 \pm 2,39$ για το STEC.

Σε αυτή τη μελέτη, αναπτύχθηκε mRT-PCR με βάση έναν ανιχνευτή υδρόλυσης Taqman®. Αυτή η τεχνική, η οποία βασίζεται σε ανιχνευτή Taqman®, θεωρείται πιο συγκεκριμένη και πιο εύκολα επικυρώσιμη σε σύγκριση με τη mRT-PCR που χρησιμοποιεί φθορογόνο χρωστική, όπως το SYBR Green, το SYTO9 και το EvaGreen. Ο σχεδιασμός των εκκινητών και ανιχνευτών είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς η παρουσία πολλών ζευγών στο μείγμα μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Για το λόγο αυτό, η συμβατότητα μεταξύ των εκκινητών και ανιχνευτών αποτελεί κρίσιμη παράμετρος. Επιπλέον, η επιλογή γονιδίων-στόχων που είναι ειδικά για τα παθογόνα είναι ζωτικής σημασίας.

Ο υπολογισμός του ΔG (Delta G) χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη της συμβατότητας μεταξύ εκκινητών και ανιχνευτών, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός δομών φουρκέτας (mFold) και διμερών δεσμών τόσο μεταξύ ομόλογων όσο και ετεροζεύγων εκκινητών κατά τη διάρκεια της αντίδρασης στον θερμοκυκλοποιητή. Η χρήση της mRT-PCR που βασίζεται σε ανιχνευτή Taqman® απλοποιεί την ανάπτυξη, καθώς η τιμή ΔG αποτέλεσε τον κύριο παράγοντα επιλογής εκκινητών και ανιχνευτών, σε αντίθεση με τη mRT-PCR βασισμένη στη φθορογόνο χρωστική που απαιτεί επίσης τον έλεγχο θερμοκρασίας τήξης. Παρόλο που η ανάλυση με βάση τον ανιχνευτή Taqman® είναι αρκετά ακριβής, θεωρείται ανώτερη από αυτήν που βασίζεται σε EvaGreen, καθώς συνήθως δεν σχηματίζονται μη ειδικά ενισχυμένα προϊόντα.

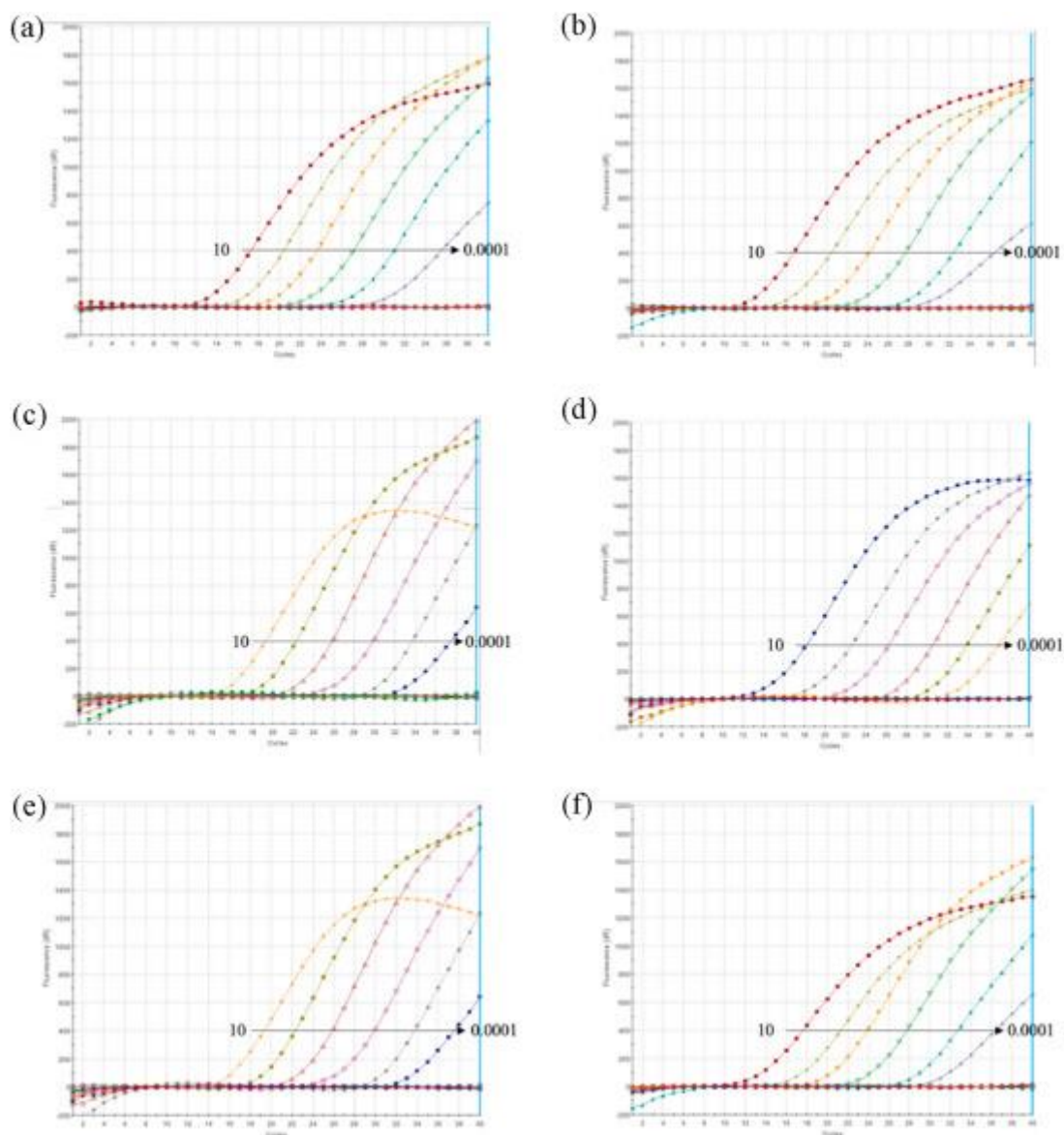
Η εταιρεία Integrated DNA Technologies προτείνει η τιμή ΔG να λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό εκκινητών και ανιχνευτών, προκειμένου να αποφεύγονται δομές φουρκέτας και διμερείς αλληλεπιδράσεις. Συγκεκριμένα, προτιμάται η τιμή ΔG να είναι πιο θετική από $-9,0$ kcal/mol, ώστε να μειωθεί η πιθανότητα σχηματισμού μη ειδικών δομών (<https://sg.idtdna.com/pages/support/faqs/how-do-i-use-the-oligoanalyzer-tool-to-analyze-possible-hairpins-and-dimers-formed-by-my-oligo>). Όλα τα ζεύγη εκκινητών και ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη είχαν τιμές ΔG στην περιοχή από $-3,52$

έως $-10,14$ kcal/mol. Αυτές οι τιμές ήταν αποδεκτές, καθώς δεν ήταν πολύ αρνητικές και δεν εμπόδιζαν την αποτελεσματική αντίδραση PCR. Αυτό δείχνει πως η ανάπτυξη της mRT-PCR με τέτοιους εκκινητές και ανιχνευτές ήταν επιτυχής, καθώς επιτεύχθηκε η ανίχνευση του σήματος του προϊόντος στόχου.

3.3.7 Ευαισθησία και εξειδίκευση της mRT-PCR Taqman® για την ανίχνευση τριών βακτηριακών στόχων – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ευαισθησία της Taqman® mRT-PCR για την ειδική ανίχνευση όλων των ενισχυμένων προϊόντων από τα τρία βακτηριακά DNA-στόχους που λήφθηκαν με τη χρήση εμπορικού κιτ και μεθόδου βρασμού ήταν η ίδια, φτάνοντας σε επίπεδο χαμηλής συγκέντρωσης DNA, δηλαδή $0,0001$ ng/αντίδραση (Εικ. 10a–f). Αυτό το επίπεδο συγκέντρωσης DNA αντιστοιχεί γενικά σε περίπου $1 \log$ CFU βακτηρίων. Η δοκιμασμένη Taqman® mRT-PCR μας παρείχε παρόμοια ευαισθησία ανίχνευσης σε σύγκριση με αυτή που αναπτύχθηκε από τους Li et al. (2017). Η βελτιστοποιημένη μέθοδος mRT-PCR Taqman® επέδειξε υψηλή ειδικότητα και για τα τρία βακτηριακά στελέχη-στόχους που δοκιμάστηκαν, ενώ όλα τα βακτηριακά στελέχη μη στόχοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αρνητικά. Όταν κάθε βακτηριακό DNA στόχος που εξήχθη χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό κιτ δοκιμής και τη μέθοδο βρασμού δοκιμάστηκε με βελτιστοποιημένη Taqman® RT-PCR, χρησιμοποιώντας μεμονωμένα, διπλά και τριπλά δείγματα του βακτηριακού DNA στόχου, οι τιμές CT και η % απόδοσης ήταν παρόμοιες με αυτές που προέκυψαν κατά την εκτέλεση της βελτιστοποιημένης Taqman® RT-PCR για κάθε εκκινητή και ανιχνευτή ξεχωριστά για κάθε βακτήριο-στόχο.

ΕΙΚΟΝΑ 10: Εναισθησία διαφορετικών συγκεντρώσεων στην περιοχή 10–0,0001 ng κάθε βακτηριακού DNA στόχου που εξάγεται με DNeasy Blood and Tissue Kit (a, c και e) και μέθοδο βρασμού (b, d και f). Καμπύλες ενίσχυσης που λαμβάνονται με χρήση Taqman® mRT-PCR από δείγματα DNA των *L. monocytogenes* DMST 17303 (a και b), *S. Enteritidis* DMST 15676 (c και d) και *E. coli* O26:H11 CDC 03–3014 (e και f).



3.3.8 Taqman® mRT-PCR για την ανίχνευση τεχνητά ή φυσικά μολυσμένων δειγμάτων τροφίμων σε σύγκριση με εμπορικά κιτ δοκιμών BAM ή Uniplex RT-PCR - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη, το SEB επιλέχθηκε ως ζωμός ταυτόχρονου εμπλουτισμού. Όταν ξεκίνησε η εμβολιασμός κάθε μεμονωμένου βακτηριακού στόχου σε συγκέντρωση 1 CFU σε SEB, η ανίχνευση των *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. και STEC μετά από καλλιέργεια διαρκεί 8, 4 και 4 ώρες αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Taqman® mRT-PCR. Τα μείγματα των βακτηρίων *L. monocytogenes* DMST 17303, *S. Enteritidis* DMST 15676 και *E. coli* O26 CDC 03–3014 αναμίχθηκαν σε αναλογίες $10^0:10^0:10^0$, $10^1:10^1:10^1$, $10^2:10^2:10^2$ και $10^3:10^3:10^3$. Οι CFU ανιχνεύθηκαν μετά από επώαση 10, 8, 6 και 4 ωρών στο SEB, αντίστοιχα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, σε ειδικά σήματα φθορισμού σε διαγράμματα ενίσχυσης, οι στόχοι *L. monocytogenes* DMST 17303, *S. Enteritidis* DMST 15676 και *E. coli* O26:H11 CDC 03–3014 σε αναλογία $10^0:10^3:10^3$ CFU μπορούσαν να ανιχνευθούν εντός 12 ωρών καλλιέργειας στο SEB. Συνεπώς, οι τρεις βακτηριακοί στόχοι, ακόμα και στη χειρότερη αναλογία, επιβεβαιώθηκαν ταυτόχρονα μετά από 12 ώρες καλλιέργειας σε SEB.

- Στην περίπτωση δείγματος τροφίμου που έχει τεχνητά μολυνθεί με το μείγμα τριών βακτηριακών στόχων, τα δείγματα τροφίμου με επτά διαφορετικές αναλογίες ($100:0:0$, $0:10^0:0$, $0:0:10^0$, $10^0:10^0:10^0$, $10^1:10^1:10^1$, $10^2:10^2:10^2$ και $10^3:10^3:10^0$ CFU/25 g) του *L. monocytogenes* DMST 17303, που είναι τεχνητά μολυσμένο με *S. Enteritidis* DMST 15676 και *E. coli* O26:H11 CDC 03–3014, ανιχνεύθηκαν κατά τη διάρκεια 18 ωρών καλλιέργειας σε SEB. Παράλληλα, το δείγμα τροφίμου που εμβολιάστηκε αρχικά με αναλογία $10^3:10^3:10^3$ CFU/25 g των τριών βακτηριακών στόχων, κατάφερε να ανιχνευθεί μετά από 4 ώρες επώασης. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν έδειξαν ότι η διάρκεια επώασης των 18 ωρών σε SEB είναι ο ιδανικός χρόνος για την αποτελεσματική ανίχνευση όλων των βακτηριακών στόχων με τη χρήση του Taqman® mRT-PCR. Η βελτιστοποιημένη κατάσταση του Taqman® mRT-PCR ήταν απλή, εξοικονόμηση κόστους, αξιόπιστη και

αποτελεσματική για την ανίχνευση των τριών βακτηριακών στόχων που υπάρχουν στα τρόφιμα μετά την καλλιέργεια σε SEB στους 37 °C 18 ώρες.

- Από τα αποτελέσματα των δειγμάτων τροφίμων που είχαν τεχνητά μολυνθεί με τους τρεις βακτηριακούς στόχους σε διάφορες αναλογίες, προέκυψε ότι το Taqman® mRT-PCR που αναπτύχθηκε σε αυτή την εργασία ήταν σε θέση να ανιχνεύσει ταυτόχρονα και τους τρεις βακτηριακούς στόχους σε αναλογία $10^3:10^3:10^3$ CFU μετά από 4 ώρες εμπλουτισμού σε SEB. Αντίθετα, όλες οι αναλογίες των τριών βακτηριακών στόχων που περιελάμβαναν το *L. monocytogenes* σε συγκέντρωση μικρότερη των 10^3 CFU, μπορούσαν να ανιχνευθούν αποτελεσματικά μετά από 18 ώρες καλλιέργειας σε SEB. Οι πληθυσμοί των *L. monocytogenes* DMST 17303, *S. Enteritidis* DMST 15676 και *E. coli* O26 CDC 03–3014, σε διαφορετικές αναλογίες αρχικού εμβολιασμού ($100:0:0$, $0:100:0$, $0:0:100$, $10^0:10^0:10^0$, $10^1:10^1:10^1$, $10^2:10^2:10^2$ και $10^3:10^3:10^3$ CFU), μετά από 18 ώρες εμπλουτισμού στο SEB, έφτασαν περίπου τα 10^5 , 10^5 και 10^8 CFU, αντίστοιχα. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το φαινόμενο είναι ότι τα σάκχαρα και οι υδατάνθρακες χαμηλού μοριακού βάρους που υπάρχουν στα δείγματα τροφίμων μεταβολίζονται γρήγορα σε πυροσταφυλικό και οξικό οξύ από το STEC, τη *Salmonella* spp. και κάποια φυσιολογική χλωρίδα, οδηγώντας σε καταστολή της ανάπτυξης του *L. monocytogenes*, το οποίο είναι λιγότερο ανθεκτικό στα οξέα και δεν μπορεί να αναπτυχθεί καλά σε χαμηλό pH κατά την αρχική φάση του εμπλουτισμού. Η ανάπτυξη του *L. monocytogenes*, επομένως, καθυστερεί μέχρι τις 18 ώρες εμπλουτισμού στο SEB. Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός φυσιολογικής χλωρίδας που μολύνθηκε φυσικά στα τρόφιμα μπορεί να καθυστέρησε την ανάπτυξη του *L. monocytogenes*, γεγονός που αναφέρεται ως ένδειξη ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί αποτελούν κακούς ανταγωνιστές.

Συνολικά, δοκιμάστηκαν 32 δείγματα τροφίμων τεχνητά μολυσμένα με διαφορετικές αναλογίες τριών βακτηριακών στόχων, χρησιμοποιώντας το κιτ ανίχνευσης Taqman® mRT-PCR, καθώς και τα κιτ BAM και iQ-Check® RT-PCR. Τα αποτελέσματα ανίχνευσης των τριών βακτηριακών στόχων με τις τρεις μεθόδους ήταν πανομοιότυπα. Για κάθε βακτήριο-στόχο, εκτιμήθηκαν οι δείκτες ευαισθησίας (SE), ειδικότητας (SP) και ακρίβειας (AC), βασιζόμενοι σε δείγματα τροφίμων τεχνητά μολυσμένα με οκτώ διαφορετικές αναλογίες των στελεχών: *L. monocytogenes* DMST 17303, *S. Enteritidis*

DMST 15676 και E. coli O26:H11 CDC 03–3014. Η αναπτυγμένη μέθοδος Taqman® mRT-PCR επέδειξε υψηλή ικανότητα ανίχνευσης, ανιχνεύοντας με ακρίβεια την παρουσία αυτών των βακτηριακών στόχων σε όλες τις αναλογίες μόλυνσης, συμπεριλαμβανομένης της ελάχιστης συγκέντρωσης των 1 CFU σε όλα τα δείγματα τροφίμων που δοκιμάστηκαν. Σε σύγκριση με τα kit BAM και iQ-Check® RT-PCR, η ανάλυση των τεχνητά μολυσμένων δειγμάτων με το αναπτυγμένο Taqman® mRT-PCR έδωσε 100% ευαισθησία, ειδικότητα και ακρίβεια. Για τον έλεγχο επιλεκτικότητας, η μέθοδος Taqman® mRT-PCR παρήγαγε 100% θετικά και 100% αρνητικά αποτελέσματα, διασφαλίζοντας τόσο την περιεκτικότητα όσο και την αποκλειστικότητα. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι η αναπτυγμένη Taqman® mRT-PCR δείχνει ίδια ευαισθησία, ειδικότητα και ακρίβεια με τα kit ανίχνευσης BAM και iQ-Check® RT-PCR.

Για την αξιολόγηση της πρακτικής εφαρμογής της αναπτυγμένης δοκιμασίας Taqman® mRT-PCR στην ανίχνευση τριών βακτηριακών στόχων στα τρόφιμα, δοκιμάστηκαν 92 δείγματα διαφορετικών τύπων τροφίμων, τα οποία περιελάμβαναν 23 δείγματα χοιρινού, βοείου και κοτόπουλου κρέατος, καθώς και φύτρα φασολιών mung. Στόχος ήταν η ειδική και ευαίσθητη ανίχνευση των βακτηρίων *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. και STEC (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*). Από τα δείγματα αυτά, 35 ήταν θετικά για *L. monocytogenes* ($CT = 32 \pm 2,42$), 43 για *Salmonella* spp. ($CT = 14 \pm 2,32$) και 41 για STEC ($CT = 14 \pm 2,31$). Το STEC εντοπίστηκε σε 41 από τα 69 δείγματα βοείου, χοιρινού και κοτόπουλου, ενώ δεν υπήρξαν μολυσμένα δείγματα φύτρων mung. Επιπλέον, 15 από τα 23 δείγματα κοτόπουλου και 15 από τα 23 δείγματα χοιρινού κρέατος ήταν μολυσμένα με *L. monocytogenes* και *Salmonella* spp., αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της Taqman® mRT-PCR συμφωνούν με αυτά των συμβατικών μεθόδων καλλιέργειας, καταδεικνύοντας την αξιοπιστία της μεθόδου.

Το κύριο πλεονέκτημα της αναπτυγμένης Taqman® mRT-PCR σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους είναι η ταχύτητα. Ενώ η τυπική καλλιέργεια απαιτεί τουλάχιστον 48 ώρες για την ανίχνευση STEC και πάνω από τρεις ημέρες για *L. monocytogenes* και *Salmonella* spp., η νέα μέθοδος παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα σε περίπου 20 ώρες. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω της χρήσης μιας απλής μεθόδου εξαγωγής DNA με βρασμό, σε αντίθεση με τις πιο χρονοβόρες εμπορικές λύσεις. Επιπλέον, η αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα μόνο σωλήνα, μειώνοντας το φόρτο εργασίας και το κόστος

χημικών αντιδραστηρίων, σε σύγκριση με τις εμπορικές kits όπως το iQ-check® RT-PCR, που συνήθως απαιτούν ξεχωριστές αντιδράσεις για κάθε βακτηριακό στόχο.

Επιπλέον, η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης και των τριών βακτηρίων σε μία αντίδραση (multiplex) αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των uniplex kits, τα οποία ανιχνεύουν κάθε βακτήριο χωριστά. Η μέθοδος απλοποιεί περαιτέρω την προετοιμασία των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας το ίδιο μέσο εμπλουτισμού (SEB) και την ίδια τεχνική εξαγωγής DNA, σε αντίθεση με άλλες μεθόδους που βασίζονται σε διαφορετικές συνθέσεις και τεχνικές. Αυτό οδηγεί σε μείωση του χρόνου, του κόστους και της πιθανότητας διασταυρούμενης μόλυνσης κατά την προετοιμασία.

Σε σύγκριση με προηγούμενες μεθόδους, όπως αυτή των Li et al. (2017) που στόχευε μόνο στην ομάδα STEC, η παρούσα τεχνική επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση των τριών βακτηριακών στόχων, παρέχοντας πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την κατάσταση των τροφίμων. Όσον αφορά την ευαισθησία, και οι δύο μέθοδοι έδειξαν παρόμοια όρια ανίχνευσης, ενώ η χρήση απλού βρασμού για την εξαγωγή DNA μείωσε το χρόνο και το κόστος σε σύγκριση με άλλες πιο σύνθετες τεχνικές.

Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η αναπτυγμένη Taqman® mRT-PCR αποτελεί μια αξιόπιστη, γρήγορη, απλή και οικονομική εναλλακτική λύση έναντι των παραδοσιακών μεθόδων καλλιέργειας, ιδανική για εφαρμογές ρουτίνας στην ανίχνευση και ταυτοποίηση των τριών βακτηριακών στόχων στα τρόφιμα. (Bundidamorn et al., 2021).

3.4 Βελτίωση απόδοσης PCR

Για να βελτιώσουν την απόδοση ανίχνευσης της qPCR, οι ένευνες έχουν εστιάσει κυρίως στη βελτίωση της προεπεξεργασίας και της προετοιμασίας του δείγματος, η οποία περιλαμβάνει την απομόνωση βακτηρίων, τη συγκέντρωση των βακτηρίων και την απόκτηση υψηλής συγκέντρωσης DNA. Ακολουθούν αποτελέσματα διάφορων ερευνών:

- Το έργο των Park et al. (2020) συνέδεσε την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (qPCR) με τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό (IMS-qPCR) για την ανίχνευση του E. coli O157:H7 σε διάφορα δείγματα τροφίμων. Χρησιμοποιώντας IMS, βελτίωσαν

την απομόνωση των βακτηριακών κυττάρων από τις πολύπλοκες μήτρες τροφίμων, αξιοποιώντας ανοσομαγνητικά σφαιρίδια. Με αυτήν την προσέγγιση, οι ερευνητές πέτυχαν την επιτυχή ανίχνευση του *E. coli* O157:H7 σε δείγματα γάλακτος, μοσχαρίσιου κιμά και λάχανου, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 10 έως 10^2 cfu/mL. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η μέθοδος τους απαιτούσε μόνο 1 ώρα εμπλουτισμού και η συνολική διαδικασία ολοκληρωνόταν σε λιγότερο από 3 ώρες.

- Επίσης, μια άλλη μελέτη των Lee et al. (2022b), ο οποίος χρησιμοποίησε επίσης IMS-qPCR ανιχνεύει *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* Typhimurium σε φρεσκοκομμένα μήλα, ανέφερε επιτυχή ανίχνευση αυτών των παθογόνων σε συγκεντρώσεις $2,7 \times 10$ cfu/mL και $1,8 \times 10^2$ cfu/mL, αντίστοιχα, χωρίς να απαιτείται εμπλουτισμός του δείγματος. Ωστόσο, ε πρέπει να επισημανθεί ότι η απόδοση του IMS-qPCR μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το συγκεκριμένο δείγμα τροφής που αναλύεται. Μια συνθήκη που αποδεικνύεται από έρευνα των Dhital & Mustapha (2023) με παρόμοια στρατηγική και διαπίστωσαν ότι το όριο ανίχνευσης για το *E. coli* O157:H7 σε στήθος κοτόπουλου, μοσχαρίσιο κιμά, ντομάτα και μαρούλι romaine ήταν τόσο χαμηλό όσο 10 cfu/mL, αν και με μεγαλύτερο χρόνο εμπλουτισμού που κυμαίνεται από 4 έως 8 ώρες.

Η συγκέντρωση DNA αποτελεί μια επιπλέον προσέγγιση που θα μπορούσε να βελτιώσει την απόδοση της qPCR. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση DNA συνήθως περιλαμβάνει την ελάττωση του όγκου του διαλύτη ελευθέρωσης κατά την εκχύλιση του καθαρισμένου DNA. Σε πρόσφατη μελέτη από τους Kim et al. (2020) αναφέρθηκε ότι η συνδυασμένη χρήση της qPCR με την συγκέντρωση DNA μπορούσε να ανιχνεύσει *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* και *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα μαρουλιού σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 10^2 cfu/mL, χωρίς την ανάγκη για εμπλουτισμό δείγματος. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν η μέθοδος εφαρμόστηκε για την ανίχνευση *C. sakazakii* σε ρύζι και σε σκόνη γάλακτος, καθώς και *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* και *L. monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος (Shi et al., 2021). Αναφέρθηκε ότι η ίδια μέθοδος μπορούσε να ανιχνεύσει την παρουσία *E. coli* O157:H7 σε κοτόπουλο και μαρουλοσαλάτα, καθώς και *S. aureus* σε ρύζι και PIF, σε συγκεντρώσεις της τάξης των 10 cfu/mL. Ωστόσο, η ανίχνευση των 10 cfu/mL *E. coli* O157:H7 σε κιμά, γαλοπούλα και ντομάτες μέσω αυτής της μεθόδου απαιτούσε 4 ώρες εμπλουτισμού δείγματος (Dhital & Mustapha, 2023). Αξιοσημείωτο είναι το ότι ένα χαμηλότερο όριο ανίχνευσης επιτεύχθηκε όταν η qPCR συνδυάστηκε με διαδικασία φιλτραρίσματος δείγματος και συγκέντρωση DNA. Σε αυτή τη μέθοδο, τα βακτήρια συγκεντρώνονταν μέσω μεμβράνης φιλτραρίσματος πριν από την εξαγωγή του DNA, και αναφέρθηκε η επιτυχής ανίχνευση

της παρουσίας 1 cfu/25 g *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα μαρουλιού και λάχανου, καθώς και 10 cfu/mL *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* και *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα μαρουλιού και κρέατος (Kim et al., 2020), χωρίς την ανάγκη εμπλουτισμού. Σε μια άλλη μελέτη, η μέθοδος αυτή ανίχνευσε *E. coli* O157:H7 σε cabbage σε συγκέντρωση ≤ 7 cfu/25 g, αν και τα δείγματα χρειάστηκε να υποβληθούν σε εμπλουτισμό διάρκειας 2 ωρών.

3.5 LAMP (Ισοθερμική ενίσχυση βρόγχου)

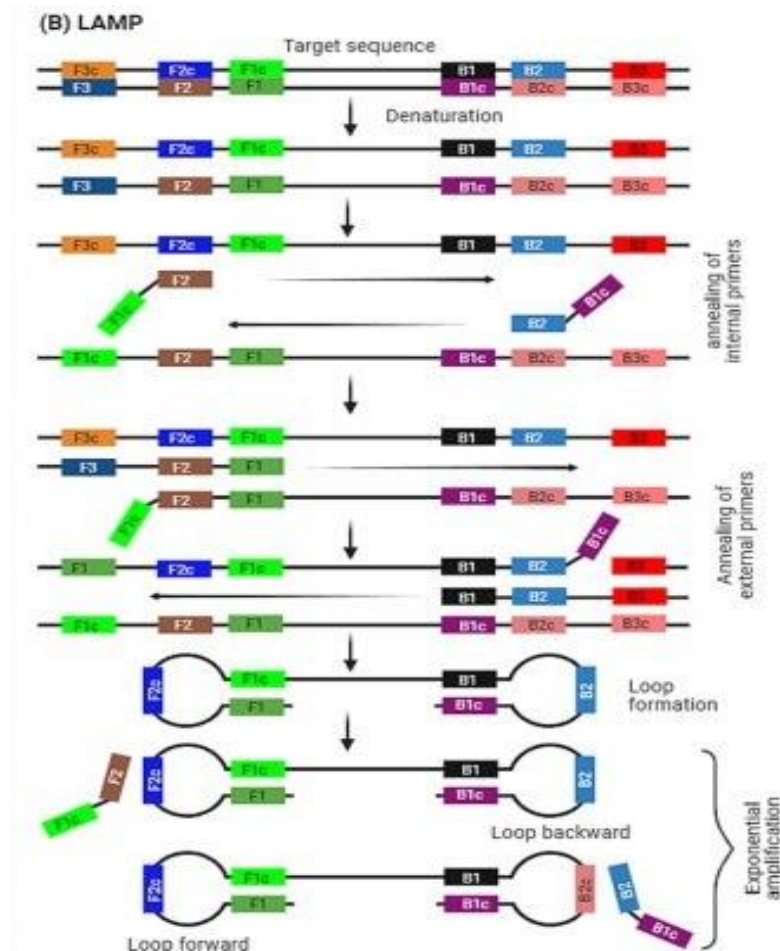
Τεχνική ισοθερμικής ενίσχυσης

Η εικόνα 11 παρουσιάζει τη σχηματική αναπαράσταση της ενίσχυσης με την τεχνική LAMP. Το σετ εκκινητών LAMP περιλαμβάνει εσωτερικούς εκκινητές (FIP και BIP) καθώς και εξωτερικούς εκκινητές (F3 και B3). Ο εκκινητής FIP περιλαμβάνει τις περιοχές F1c και F2, ενώ ο BIP περιλαμβάνει τις περιοχές B1c και B2. Ο εκκινητής FIP, που βρίσκεται αντίθετα, περιέχει την περιοχή F2, η οποία συμπληρώνει την περιοχή F2c στο 3' άκρο του γονιδίου-στόχου και μοιράζεται την ίδια αλληλουχία με την περιοχή F1c στο 5' άκρο του γονιδίου-στόχου. Ο εκκινητής F3, ένας εξωτερικός εκκινητής αντίθετος, περιλαμβάνει την περιοχή F3, η οποία ταιριάζει με την περιοχή F3c του γονιδίου-στόχου. Από την άλλη πλευρά, ο εκκινητής BIP, τοποθετημένος καθοδικά, περιλαμβάνει την περιοχή B2, συμπληρώνοντας την περιοχή B2c στο 3' άκρο του γονιδίου-στόχου και μοιράζεται μια πανομοιότυπη αλληλουχία με την περιοχή B1c στο 5' άκρο του γονιδίου-στόχου. Τέλος, ο εκκινητής B3, ένας καθοδικός εξωτερικός εκκινητής, περιέχει την περιοχή B3, η οποία είναι συμπληρωματική της περιοχής B3c του γονιδίου-στόχου. Η ενίσχυση με την τεχνική αυτή απαιτεί σταθερή θερμοκρασία μεταξύ 60 και 65 °C, και η ολοκλήρωση της συνήθως διαρκεί 30-60 λεπτά. Τυπικά, τέσσερις διαφορετικοί εκκινητές χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση έξι διαφορετικών περιοχών στο γονίδιο στόχο, γεγονός που αυξάνει την ειδικότητα. Ένα άλλο ζεύγος «κυκλικών εκκινητών» μπορεί να επιταχύνει περαιτέρω την αντίδραση. Εκτός από τη δραστηριότητα αντιγραφής, απαιτούνται πολυμεράσες με υψηλή δραστηριότητα μετατόπισης αλυσίδας για ενίσχυση (Xiong et al. 2020)

Τα τελευταία χρόνια, μεγάλο μέρος ερευνών έχει εστιάσει στην αξιολόγηση της τεχνολογίας LAMP στην ανίχνευση διαφόρων παθογόνων σε προϊόντα διατροφής, όπως

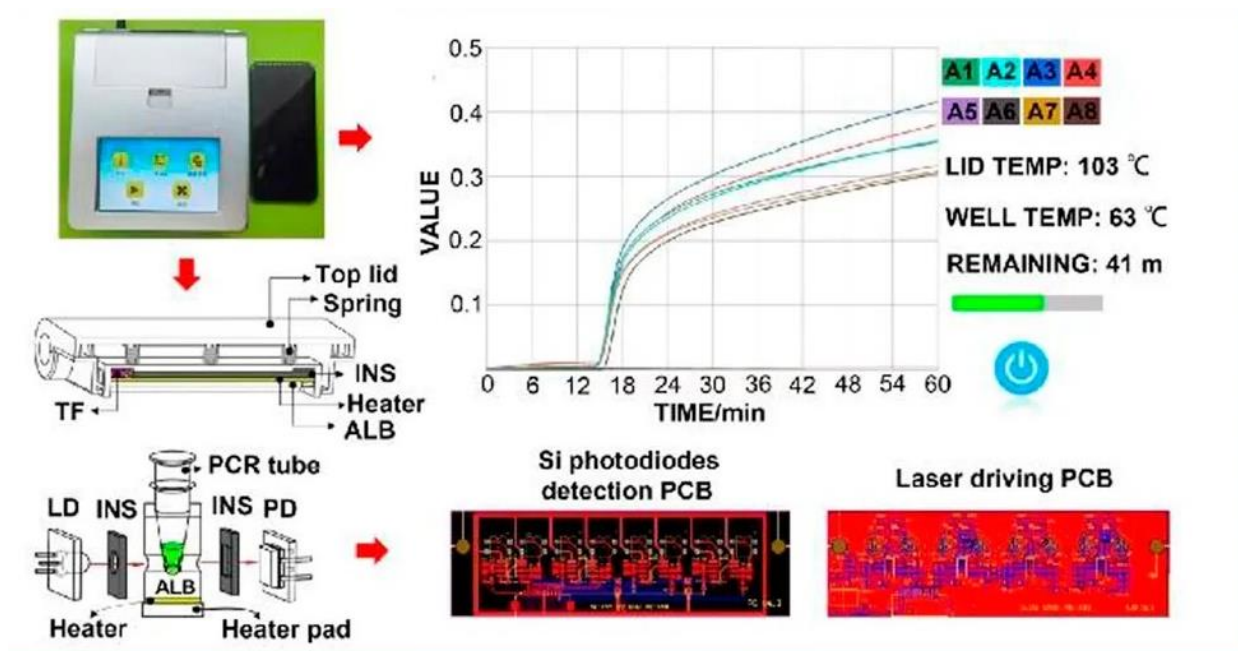
γάλα, θαλασσινά και κρέατα . Οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποίησαν φθορισμό για την ένδειξη παρουσίας παθογόνων στα ενισχυμένα δείγματα και ορισμένες από αυτές προχώρησαν σε προεπεξεργασία των δειγμάτων πριν από την ενίσχυση του DNA. Είναι αξιοσημείωτο ότι αρκετές έρευνες ανέφεραν ότι η τεχνολογία LAMP επιτρέπει την άμεση αναγνώριση σημάτων με γυμνό μάτι, καθιστώντας την κατάλληλη για επιτόπια ανίχνευση. Η παρουσία σαλμονέλας ή καμπυλοβακτηριδίου στο κρέας κοτόπουλου μπορεί να εντοπιστεί παρατηρώντας αλλαγές θολότητας ή χρωματομετρικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης. Οι Chen et al. (2022) ανέπτυξαν μια νέα συσκευή ταχείας ανίχνευσης πεδίου Enter cytozoon hepatopenaei (EHP) (μέγεθος $18,8 \times 16,7 \times 6,6 \text{ cm}^3$) με βάση την κατακρήμνιση πυροφωσφορικού μαγνησίου και το LAMP (Εικόνα 12). Το όριο ανίχνευσης για το EHP ήταν $0,1 \text{ fg}/\mu\text{l}$. Επιπλέον, Jin et al. (2020) ανέπτυξε μια μικροσυσκευή βασισμένη σε LAMP για την εκτέλεση οπτικής ανίχνευσης υψηλής απόδοσης. Η προσέγγιση μπόρεσε να πραγματοποιήσει ταυτόχρονη ταυτοποίηση έξι τροφιμογενών παθογόνων μέσα σε 1 ώρα.. Ομοίως, ο Li et al. (2021) ανέφερε ότι η τεχνική LAMP επιτρέπει την ανίχνευση της σαλμονέλας στο χοιρινό κρέας, απλώς παρατηρώντας χρωματομετρικές αλλαγές με γυμνό μάτι. Αυτές οι έρευνες δείχνουν ότι η τεχνολογία LAMP μπορεί να ανιχνεύσει χαμηλές συγκεντρώσεις παθογόνων σε δείγματα τροφίμων, συχνά χωρίς την ανάγκη εμπλουτισμού. Για παράδειγμα, η παρουσία *Salmonella Typhimurium* σε κρέας chevron και κοτόπουλο έχει ανιχνευθεί σε συγκεντρώσεις $8,5 \text{ cfu/g}$ και 55 cfu/mL αντίστοιχα, χωρίς εμπλουτισμό.

Εικόνα 11: Απεικόνιση της τεχνικής LAMP (Ndraha et al.,2023)



Εντυπωσιακά, η μέθοδος LAMP μπορεί να έχει συγκρίσιμα ή και καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την PCR. Σε μελέτη διαπίστωσαν ότι η τεχνική LAMP ήταν δέκα φορές πιο ευαίσθητη από την PCR στην ανίχνευση του *S. aureus* σε δείγματα ψαριών. Σε μια άλλη μελέτη, αναφέρθηκε ότι τόσο η LAMP όσο και η PCR μπορούν να ανιχνεύσουν σαλμονέλα και καμπυλοβακτηρίδιο σε κοτόπουλο σε συγκεντρώσεις έως 10 cfu/g και 10³ cfu/g αντίστοιχα, χωρίς εμπλουτισμό. Ωστόσο, μια μελέτη σημείωσε ότι, αν και η LAMP δεν παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία από την PCR, μπορεί να αυξήσει το κόστος λειτουργίας διπλάσια. (Nodali Ndraha et al.,2023)

Εικόνα 12: σχεδιασμός της συσκευής(Chen et al., 2022)



Για να βελτιώσουν τη χρηστικότητα της LAMP ως εργαλείου πεδίου, αρκετοί ερευνητές έχουν ενσωματώσει την τεχνολογία με άλλες διαγνωστικές μεθόδους, όπως η δοκιμασία πλευρικής ροής (LFA) και τα απταμερή. Σε πρόσφατη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η LAMP σε συνδυασμό με LFA για την ταυτόχρονη ανίχνευση *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. και *S. aureus* σε PIF και διαπίστωσε ότι τα παθογόνα αυτά μπορούσαν να εντοπιστούν σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 4,2, 2,6 και 3,4 cfu/g, αντίστοιχα, χωρίς εμπλουτισμό. Σε μια άλλη αναφορά, χρησιμοποίησαν την LAMP μαζί με απταμερή και ένζυμο RNase H2 για την ανίχνευση της *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα κοτόπουλου. Τα απταμερή χρησιμοποιήθηκαν για τη σύλληψη βακτηριακών κυττάρων, ενώ το ένζυμο RNase H2 επέτρεψε την οπτική ανίχνευση. Αυτή η προσέγγιση επέτρεψε την ανίχνευση σε συγκεντρώσεις μόλις 5,5 cfu/mL (100 φορές χαμηλότερη από τις συμβατικές μεθόδους LAMP) χωρίς εμπλουτισμό δείγματος. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η τεχνική LAMP μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική λύση στις μεθόδους PCR και ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην επιτόπια ανίχνευση (Ndraha et al.,2023) .

3.6 DIGITAL PCR

Στην ψηφιακή PCR, το δείγμα DNA κατανέμεται σε πολυάριθμες μεμονωμένες αντιδράσεις και κάθε διαμέρισμα αναλύεται ξεχωριστά για ενίσχυση DNA στόχου (He et al., 2020, Lei et al., 2020). Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει τρία βήματα σε κάθε διαμέρισμα: κατάτμηση του δείγματος, εκτέλεση PCR σε κάθε διαμέρισμα και ανάλυση των αποτελεσμάτων. Χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση περιοριστικής αραιώσης, η παρουσία ή η απουσία DNA στόχου προσδιορίζεται με βάση τον αριθμό των θετικών κατατμήσεων. Αυτή η τεχνική επιτρέπει τον απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό των μορίων DNA στόχου στο αρχικό δείγμα, προσφέροντας υψηλότερη ευαισθησία και ακρίβεια σε σύγκριση με τις παραδοσιακές ποσοτικές μεθόδους PCR. Σε αντίθεση με την παραδοσιακή qPCR, η οποία βασίζεται στις μετρήσεις της Ct, η ψηφιακή PCR χρησιμοποιεί στατιστική ανάλυση Poisson για την εκτίμηση της αρχικής συγκέντρωσης των παθογόνων-στόχων. Η ψηφιακή PCR θα μπορούσε να επιδείξει μια αξιοσημείωτη ικανότητα στην ανίχνευση στόχων χαμηλού επιπέδου και να είναι πιο ανθεκτική στους αναστολείς PCR. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι αυτή η μέθοδος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση χαμηλού αριθμού παθογόνων στα θαλασσινά και τους χυμούς φρούτων (He et al., 2020, Lei et al., 2020).

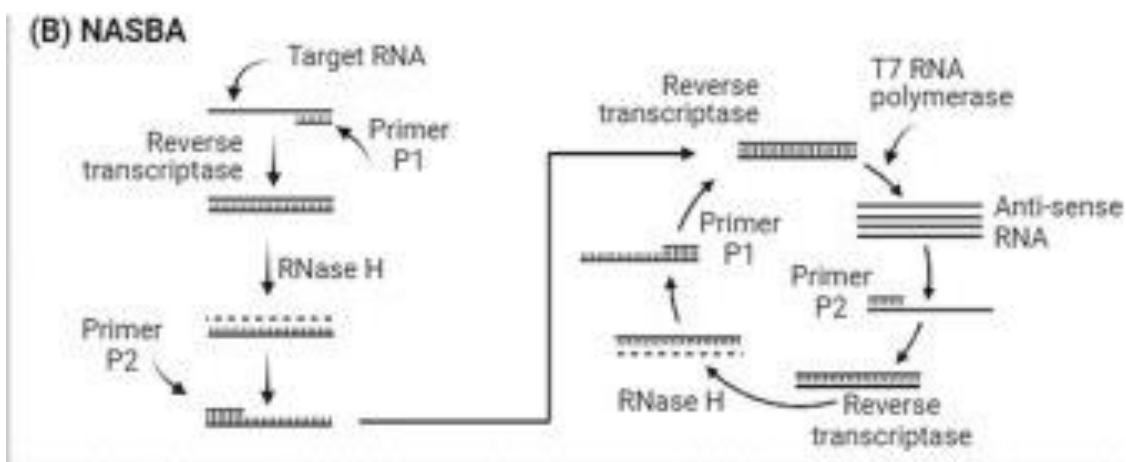
Οι Lei et al. (2020) ανέφεραν ότι αυτή η μέθοδος θα μπορούσε να ανιχνεύσει την παρουσία του *V. parahaemolyticus* σε μύδια σε συγκέντρωση 15 cfu/mL. Σε μια ξεχωριστή μελέτη, οι He et al. (2020) χρησιμοποίησε αυτή την τεχνολογία για να ανιχνεύσει την παρουσία εντεροαιμορραγικού *E. coli* O157:H7 στον χυμό μήλου. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν αυτό το παθογόνο στα δείγματά τους σε συγκέντρωση 2 cfu/mL.

3.7 Ενίσχυση με βάση αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων (NASBA)

Η εικόνα 13 παρουσιάζει τη σχηματική αναπαράσταση της ενίσχυσης NASBA. Αυτή η μέθοδος στοχεύει 16 s rRNA γονίδια ή μεταγραφές αγγελιοφόρου (m)RNA για την ανίχνευση βακτηρίων, επιτρέποντας την ανάλυση της βακτηριακής βιωσιμότητας. Η διαδικασία NASBA περιλαμβάνει την ενίσχυση του μονόκλωνου RNA χρησιμοποιώντας

δύο εκκινητές και τρία ένζυμα: αντίστροφη μεταγραφάση του ιού της μυελοβλάστωσης των πτηνών (AMV-RT), RNase H και εξαρτώμενη από το DNA RNA πολυμεράση T7 (DdRp). Σε αυτή την τεχνική, το AMV-RT επεκτείνει τους εκκινητές για να δημιουργήσει συμπληρωματικό DNA και η RNase H σχηματίζει δίκλωνο DNA. Το T7 DdRp αναγνωρίζει τον εκτεθειμένο προαγωγέα T7 του δίκλωνου DNA και ξεκινά τη μεταγραφή, ξεκινώντας έτσι την αντίδραση. Δεδομένου ότι τα ένζυμα NASBA είναι ασταθή στη θερμότητα, οι ενισχύσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, με βέλτιστες συνθήκες ρυθμισμένες στους 41 °C για 1,5–2 ώρες. Μετά την ενίσχυση, τα προϊόντα μπορούν να ανιχνευθούν χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους, όπως ηλεκτροφόρηση γέλης, ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA), ενζυμική δοκιμασία γέλης, τεχνικές ηλεκτροχημειοφωταύγειας (ECL) και παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο με μοριακούς φάρους.

Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της ενίσχυσης NASBA (Nodali Ndraha et al., 2023)



Τα τελευταία χρόνια, η εφαρμογή της τεχνικής NASBA για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων σε δείγματα τροφίμων έχει αποδειχθεί λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία μικροχλωρίδας υποβάθρου, η οποία είναι σημαντική για την ακριβή απεικόνιση της πραγματικής κατάστασης των δειγμάτων τροφίμων. Σύμφωνα με τους Zhai et al. (2019) ανέφεραν ότι ανίχνευσαν σαλμονέλα στο χοιρινό κρέας σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο $9,5 \times 10^3$ cfu/mL χρησιμοποιώντας μια τεχνική NASBA σε πραγματικό χρόνο, μετά από εμπλουτισμό 12 ωρών των δειγμάτων τους με μικροχλωρίδα χοιρινού υποβάθρου. Σε

μια μεταγενέστερη μελέτη, οι Zhai et al. (2022) εισήγαγε ένα διπλό NASBA σε πραγματικό χρόνο με μια προσέγγιση μοριακού φάρου για την ταυτόχρονη αναγνώριση βιώσιμων κυττάρων *Salmonella* spp. και ορότυπος Paratyphi C σε δείγματα χοιρινού και κοτόπουλου. Συγκεκριμένα, η μέθοδος ανίχνευσε αυτά τα παθογόνα και τους ορούς τους σε ελεγμένα δείγματα τροφίμων σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 5 cfu/25 g, μετά από εμπλουτισμό δείγματος 12 ωρών. Επιπλέον, η τεχνική NASBA μπορεί να συνδυαστεί συνεργιστικά με άλλες βασικές μεθόδους, όπως το σύστημα που βασίζεται σε CRISPR/Cas, για την ενίσχυση των δυνατοτήτων ανίχνευσης παθογόνων. Σε μια πρόσφατη έρευνα, αποδείχθηκε ότι η ενσωμάτωση του NASBA με το σύστημα που βασίζεται σε CRISPR/Cas13 διευκόλυνε την ανίχνευση της σαλμονέλας σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 1,5 cfu/mL σε καθαρές καλλιέργειες. Στη μέθοδό τους, το CRISPR/Cas13a χρησιμοποιήθηκε για να χρησιμεύσει ως ρεπόρτερ της NASBA. Ωστόσο, εξακολουθεί να υπάρχει έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τη χρήση αυτής της καινοτόμου προσέγγισης για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων σε δείγματα τροφίμων, ειδικά λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία μικροχλωρίδας υποβάθρου (Ndraha et al., 2023).

3.8 Σύστημα CRISPR/Cas

Το σύστημα CRISPR-Cas (ομαδοποιημένες τακτικά διακεκομμένες σύντομες επαναλήψεις-πρωτεΐνη που σχετίζεται με το CRISPR) αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές ανακαλύψεις στη μοριακή βιολογία των τελευταίων ετών. Αρχικά εντοπίστηκε σε βακτήρια και αρχαία και λειτουργούσε ως μια προσαρμοστική άμυνα απέναντι σε εξωτερικά νουκλεϊκά οξέα, ενώ γρήγορα άρχισε να χρησιμοποιείται στην ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων λόγω της υψηλής εξειδίκευσης στην αναγνώριση και τη διακοπή τους. Τα τελευταία χρόνια, τα συστήματα CRISPR-Cas έχουν δείξει μεγάλο δυναμικό στην ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων, και αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο ως γρήγορα διαγνωστικά εργαλεία βασισμένα σε νουκλεϊκά οξέα. Τα συστήματα CRISPR-Cas που χρησιμοποιούνται συχνότερα σε τεχνολογίες ανίχνευσης περιλαμβάνουν τα Cas9, Cas12 και Cas13. Το Cas9, που κυρίως αναγνωρίζει και διασπά συγκεκριμένες αλληλουχίες δίκλωνου DNA, χρησιμοποιείται ευρέως στην επεξεργασία γονιδιώματος, τη γονιδιακή θεραπεία και τη βελτίωση των καλλιεργειών. Από την άλλη

πλευρά, τα Cas12 και Cas13 έχουν γίνει ιδιαίτερα ελκυστικά για διαγνωστικές εφαρμογές λόγω της δραστηριότητάς τους «παράπλευρης διάσπασης». Το Cas12 διασπά το δίκλωνο DNA, ενώ το Cas13 στοχεύει το μονοκλωνικό RNA. Με την αναγνώριση του στόχου, αυτά τα ένζυμα προκαλούν μη ειδική διάσπαση αναφορών, παράγοντας γρήγορα και ευαίσθητα σήματα ανίχνευσης. Οι δοκιμασίες που βασίζονται σε CRISPR προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η υψηλή εξειδίκευση που επιτρέπει τη διαφοροποίηση μιας βάσης, μειώνοντας τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Επιπλέον, η αντίδραση εξελίσσεται ταχύτατα, συχνά μέσα σε λίγα λεπτά και παράγει ανιχνεύσιμα σήματα. Το Cas12 χρησιμοποιείται ευρέως για την αναγνώριση και διάσπαση DNA από παθογόνα, ενώ το Cas13 διακρίνεται στην ανίχνευση RNA παθογόνων. Ωστόσο, υπάρχουν προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν. Οι αναλύσεις CRISPR συχνά απαιτούν την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων, και η προετοιμασία πολύπλοκων δειγμάτων μπορεί να επηρεάσει την ταχύτητα και την απλότητα της δοκιμής στο πεδίο. Επιπλέον, η ευαισθησία και η ακρίβεια μπορεί να επηρεαστούν από παρεμβολές σε πολύπλοκα δείγματα τροφίμων, οδηγώντας σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Για την υπέρβαση αυτών των περιορισμών, έχουν αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές, όπως ο ορθολογικός σχεδιασμός του crRNA, η ανάπτυξη συστημάτων ανίχνευσης χωρίς ανάγκη εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων και η ενσωμάτωση με νανοϋλικά ή μικρορευστικές συσκευές, που βελτιώνουν τη σταθερότητα και την απόδοση. Με την εξαιρετική ευαισθησία, την υψηλή ειδικότητα, την ταχύτητα και την φορητότητα που προσφέρουν, τα συστήματα CRISPR-Cas έχουν καταστεί πολλά υποσχόμενα εργαλεία για την ανίχνευση παθογόνων. Οι μελλοντικές προσπάθειες θα πρέπει να εστιάσουν στην ενίσχυση της αξιοπιστίας τους σε πολύπλοκα δείγματα τροφίμων πραγματικού κόσμου και στην προώθηση της αυτοματοποίησης και της ενσωμάτωσής τους, ώστε να διευκολυνθεί η ευρεία και αποτελεσματική χρήση στην επιτόπια παρακολούθηση της ασφάλειας των τροφίμων (Wang Guo et al., 2025).

3.9 Συγκριτική ανάλυση των μεθόδων που βασίζονται στην ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων σε δείγματα τροφίμων.

Συμβατική PCR

Πλεονεκτήματα

- Υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία
- Γρηγορότερη από τη μέθοδο της καλλιέργειας
- Δυνατότητα πολυπλεξίας
- Ικανότητα διάκρισης μεταξύ των βακτηριακών στελεχών του ίδιου είδους
- Τα κιτ του εμπορίου υπάρχουν σε αφθονία
- Το λογισμικό σχεδιασμού Primer είναι διαθέσιμο εκτός σύνδεσης και προσβάσιμο στο διαδίκτυο

Μειονεκτήματα

- Απαιτεί μηχανή θερμικής ανακύκλωσης
- Χρονοβόρο καθώς μπορεί να απαιτεί ακόμα βήμα εμπλουτισμού και καθαρισμό DNA
- Χειροκίνητες λειτουργίες και δυσκίνητος περιφερειακός εξοπλισμός
- Το Amplicon μπορεί να αναλυθεί μόνο μετά από διαδικασία PCR
- Εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα των δειγμάτων που περιέχουν νουκλεϊκά οξέα για ενίσχυση
- Επιρρεπείς σε αναστολές PCR
- Μπορεί να εμφανιστεί διασταυρούμενη μόλυνση
- Έλλειψη ποσοτικής ικανότητας
- Η βελτιστοποίηση για πολυπλεξία είναι δύσκολη και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο κόστος

Πιθανές βελτιώσεις

- Αυτοματοποιημένο όργανο που αντικαθιστά τις χειροκίνητες λειτουργίες από την προετοιμασία του δείγματος έως την ανίχνευση

- Σχεδιασμός αντιδραστηρίων που αυξάνουν την ειδικότητα και την ικανότητα πολυπλεξίας της PCR καθώς και μειώνουν τη διασταυρούμενη μόλυνση, λιγότερο ευαίσθητα στον αναστολέα PCR
- Ενσωμάτωση με πλατφόρμες μικρορευστοποίησης ή άλλες προηγμένες τεχνολογίες

Real Time – PCR

Πλεονεκτήματα

- Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα
- Ταχύτερη από την καλλιεργημένη και συμβατική μέθοδο PCR
- Δεν απαιτεί διαδικασία μετά την ενίσχυση
- Επιτρέψτε την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο για ενίσχυση
- Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παθογόνων-στόχων
- Υψηλή απόδοση λόγω λειτουργίας βάσει λογισμικού

Μειονεκτήματα

- Απαιτεί μηχανή θερμικής ανακύκλωσης
- Εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα των δειγμάτων που περιέχουν νουκλεϊκά οξέα για ενίσχυση
- Υψηλό κόστος για όργανο, αντιδραστήριο, φθορίζουσα χρωστική ή ανιχνευτή φθορισμού
- Επιρρεπείς σε αναστολές PCR
- Αναγκαιότητα δημιουργίας τυπικής καμπύλης
- Επικάλυψη φασμάτων εκπομπής και μη ειδική δέσμευση
- Η βελτιστοποίηση για πολυπλεξία είναι δύσκολη και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο κόστος
- Απαιτούμενο εκπαιδευμένο προσωπικό

Πιθανές βελτιώσεις

- Αυτοματοποιημένο όργανο που αντικαθιστά τις χειροκίνητες λειτουργίες από την προετοιμασία του δείγματος έως την ανίχνευση

- Σχεδιασμός αντιδραστηρίων που αυξάνουν την ειδικότητα και την ικανότητα πολυπλεξίας της PCR καθώς και μειώνουν τη διασταυρούμενη μόλυνση, λιγότερο ευαίσθητα στον αναστολέα PCR
- Σχεδιασμός προσιτού και φιλικού προς τον χρήστη οργάνου

Digital PCR

Πλεονεκτήματα

- Εξαιρετικά ακριβής και ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός των μορίων-στόχων σε πολύπλοκα δείγματα
- Πιο ακριβές και αναπαραγώγιμο από το qPCR
- Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παθογόνων-στόχων
- Υψηλή απόδοση λόγω λειτουργίας βάσει λογισμικού
- Ικανός να διακρίνει το DNA από τα νεκρά και βιώσιμα κύτταρα χρησιμοποιώντας φθορίζουσες χρωστικές που δεσμεύουν το DNA

Μειονεκτήματα

- Απαιτεί μηχανή θερμικής ανακύκλωσης
- Υψηλό κόστος οργάνων
- Εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα των δειγμάτων που περιέχουν νουκλεϊκά οξέα για ενίσχυση
- Απαίτηση για θερμικό κυκλοποιητή
- Επιρρεπείς σε αναστολές PCR
- Ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω της παρουσίας μη στοχευόμενου DNA ή RNA
- Απαιτεί αναλυτικά σταγονίδια ή θαλάμους για την εφαρμογή της κατανομής Poisson
- Πολυπλοκότητα στο σχεδιασμό της κατάλληλης αραίωσης του δείγματος για την παραγωγή ακριβών δεδομένων
- Περιορισμένες δυνατότητες πολυπλεξίας σε σύγκριση με την qPCR
- Απαιτούν τεχνική εξειδίκευση

Πιθανές βελτιώσεις

- Βελτιστοποίηση και τυποποίηση των συνθηκών αντίδρασης, προετοιμασία δειγμάτων και ανάλυση δεδομένων
- Βελτιστοποίηση της ικανότητας πολυπλεξίας
- Βελτίωση κατανομής με μικρορευστοποιημένες συσκευές

LAMP

Πλεονεκτήματα

- Κατάλληλο για ενίσχυση και ανίχνευση μεγαλύτερων νουκλεϊκών οξέων
- Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα
- Ταχεία ανίχνευση (λιγότερο από 1 ώρα)
- Πιο ευαίσθητο ή τουλάχιστον συγκρίσιμο με τη συμβατική PCR ή qPCR
- Υψηλή απόδοση ενίσχυσης
- Δεν απαιτεί ακριβό όργανο θερμοκύκλωσης
- Φθινό όργανο ενίσχυσης
- Ανθεκτικό στους αναστολείς LAMP
- Υποστήριξη για multiplex
- Γρήγορη και απλή διαδικασία σε σύγκριση με τις μεθόδους PCR
- Φθινότερο από τις μεθόδους που βασίζονται σε PCR
- Τα αποτελέσματα ενίσχυσης μπορούν να προσπελαστούν χρησιμοποιώντας φθορίζουσες παρεμβαλλόμενες χρωστικές ή χρωματομετρική μέτρηση

Μειονεκτήματα

- Απαιτεί πολλαπλούς εκκινητές
- Η αλληλεπίδραση των εκκινητών θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα
- Σχηματισμός μη ειδικής ενίσχυσης και διμερισμού εκκινητή
- Η οπτική επιθεώρηση ή η μέτρηση θολότητας του προϊόντος LAMP μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη εκτίμηση
- Ρύπανση από αεροζόλ κατά την αντίδραση LAMP
- Διατήρηση της σταθερότητας των αντιδραστηρίων και των εκκινητών LAMP
- Κουραστική προετοιμασία δειγμάτων

Πιθανές βελτιώσεις

- Βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης
- Η χρήση της τεχνητής νοημοσύνης (AI) για την αξιολόγηση του διαφορετικού χρώματος στην οπτική ανίχνευση
- Αυτοματοποιημένο όργανο που αντικαθιστά τις χειροκίνητες λειτουργίες με ενσωμάτωση με συσκευές μικρορευστοποίησης για τη μείωση της διασταυρούμενης μόλυνσης

NASBA

Πλεονεκτήματα

- Ευαίσθητο και ειδικό
- Δεν απαιτείται για στάδια μετουσίωσης
- Μπορεί να ενισχύσει άμεσα θραύσματα RNA
- Τα υπολείμματα DNA στα δείγματα δεν θα δώσουν ψευδώς θετικό σήμα
- Πιθανή μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιώσιμων βακτηρίων

Μειονεκτήματα

- Δυσκολίες στο χειρισμό του RNA
- Απαιτείται πολύπλοκος εξοπλισμός για την ανίχνευση των προϊόντων ενισχυμένου RNA
- Ορισμένα υποστρώματα τροφίμων αναστέλλουν την αντίδραση
- Περιορίζεται από τη δευτερογενή δομή RNA
- Περιορισμένο μήκος αλληλουχίας στόχου
- Απαιτεί πολλαπλά ένζυμα
- Τα ένζυμα δεν είναι θερμοσταθερά
- Λιγότερο αποτελεσματικό στην ενίσχυση μεγαλύτερων στόχων RNA
- Απαιτεί ακριβή έλεγχο θερμοκρασίας

Πιθανές βελτιώσεις

- Φιλικός προς το χρήστη σχεδιασμός για την ανάλυση αμπλικονίων
- Φιλική προς το χρήστη εφαρμογή για σχεδιασμό εκκινητών

- Σχεδιασμός προσιτών αντιδραστηρίων που αυξάνουν την ικανότητα πολυπλεξίας του NASBA

3.10 Next generation sequencing

Στη μοριακή βιολογία, η ανάλυση της αλληλουχίας του DNA αποτελεί τη βάση για περαιτέρω έρευνα και γενετικές τροποποιήσεις.. Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι τεχνολογιών για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας: η πρώτη γενιά, η παραδοσιακή τεχνολογία αλληλούχισης, αντιπροσωπεύεται από τη μέθοδο Sanger , και η δεύτερη γενιά, γνωστή και ως τεχνολογία υψηλής απόδοσης, που αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια και βασίζεται σε παράλληλη και ταυτόχρονη αλληλουχία μορίων. Συγκεκριμένα, η τεχνολογία δεύτερης γενιάς, γνωστή και ως τεχνολογία αλληλούχισης σύνθεσης, περιλαμβάνει συστήματα όπως το 454 της Roche, το Solexa της Illumina, το HiSeq και το Solid της ABI. Η τρίτη γενιά αλληλούχισης, η οποία εστιάζει στην ανάλυση ενός μορίου, βασίζεται σε συστήματα όπως το HeliScope της Helicos Bioscience, το PacBio RS της Pacific Biosciences και το Nanopore της Oxford Nanopore, με παραδείγματα τις πλατφόρμες GridION και MinION . Η τεχνολογία αλληλούχισης ενός κυττάρου επιτρέπει την ανάλυση κάθε μεμονωμένου κυττάρου μέσω προηγμένων τεχνικών υψηλής απόδοσης, προσφέροντας λεπτομερείς γενετικές πληροφορίες (Sha Liu.et.,al 2022).

Η αρχή της μεθόδου Sanger βασίζεται στη τυχαία κοπή του γονιδιώματος σε μικρά θραύσματα, τα οποία κλωνοποιούνται σε φορείς πλασμιδίου και μεταφέρονται σε βακτήρια E. coli. Τα καλλιεργημένα βακτήρια εκχυλίζουν το πλασμίδιο, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την ανάλυση αλληλουχίας, με τις αντιδράσεις να πραγματοποιούνται σε μικρές ποσότητες. Η Syromyatnikov.,et al (2020) χρησιμοποίησαν υψηλής απόδοσης αλληλουχία και τεχνική Sanger σε μεμονωμένες βακτηριακές αποικίες ώστε να αναλύσουν το μικροβιακό περιεχόμενο βουτύρου, εντοπίζοντας 94 παραλλαγές αλληλουχίας που αντιστοιχούν σε διαφορετικά μικροβιακά taxa. Η τεχνολογία αυτή είναι συχνά χρησιμοποιούμενη για την ανάλυση μικρού γονιδιώματος, πλασμιδίων και σε άλλα ερευνητικά πεδία, παρά το ότι παρουσιάζει περιορισμούς σε μεγάλες κλίμακες λόγω χαμηλής απόδοσης, υψηλού κόστους και αργής ταχύτητας . Αντίθετα, η τεχνολογία αλληλούχισης υψηλής απόδοσης, η οποία μπορεί να παράγει εκατομμύρια ή και

δισεκατομμύρια αλληλουχίες ταυτόχρονα, αποτελεί μια σημαντική βελτίωση στην ιστορία της μοριακής ανάλυσης (Sha Liu et al., 2022).

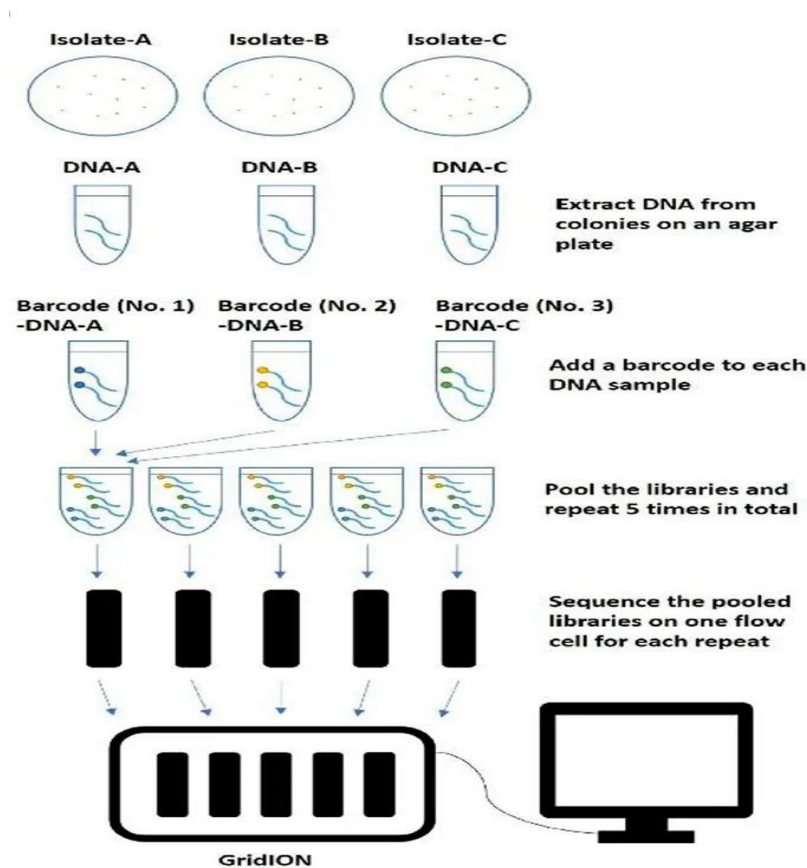
H Muriuki et al (2021) χρησιμοποίησαν πυροαλληλουχία 454 και τεχνική Illumina για την ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA σε μικροβιακές κοινότητες, αποκαλύπτοντας διαφορές στη δομή των μικροβιακών πληθυσμών μεταξύ δειγμάτων. Μια ομάδα ανέλυσε 62 περιπτώσεις E. coli που παρήγαγαν τοξίνη Shiga (STEC), χωρίς να ανιχνεύσει μοριακούς δείκτες, ενώ η Wu et al (2021) χρησιμοποίησαν δεδομένα από την πολυπλεξία ολόκληρου του γονιδιώματος με την τεχνολογία πολλαπλής ONT (Εικ.14), επιτυγχάνοντας ακριβή πρόβλεψη, πέντε ή λιγότερων τύπων σαλμονέλλας, με μέσο όρο 6 ώρες πολλαπλής αλληλουχίας, όπου κάθε πολυπλεξικό στέλεχος έλαβε τουλάχιστον 50× βάθος γονιδιώματος κάλυψης δεδομένων αλληλουχίας μετά την αποπολυπλεξία. (Wu et al., 2021).

Η εξέλιξη της τεχνολογίας μακράς ανάγνωσης, όπως αυτή που προσφέρουν η Pacific Biosciences (PacBio) και η Oxford Nanopore Technologies (ONT), έχει φέρει σημαντικές αλλαγές στον ερευνητικό τομέα. Ιδιαίτερα η τεχνολογία ONT έχει καταστήσει δυνατή την τακτική χρήση μαζικής αλληλουχίας σε εργαστήρια ασφάλειας τροφίμων, τόσο για την ταυτοποίηση όσο και για τον χαρακτηρισμό παθογόνων μικροοργανισμών, χάρη στο χαμηλό αρχικό κόστος επένδυσης που απαιτείται για την εγκατάσταση της τεχνολογίας στα εργαστήρια, μέσω της συσκευής MinION. Πολλά άρθρα στο παρόν ερευνητικό πεδίο έχουν επικεντρωθεί στην εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας. Σε εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα μονοχρησιμοποιήσιμα κύτταρα ροής ONT Flongle σε συνδυασμό με την online πλατφόρμα Galaxy, προκειμένου να πραγματοποιηθεί γρήγορος οροτύπος απομονώσεων Salmonella και να γίνει ανάλυση της γονιδιωματικής μικροβιακής αντοχής και της λοιμογόνου ικανότητας. (Lamas & Garrido-Maestu, 2024)

Το πλεονέκτημα της δεύτερης γενιάς αλληλούχισης είναι η σημαντική μείωση του κόστους και η βελτίωση της ροής εργασίας σε σύγκριση με την πρώτη γενιά, αν και παρουσιάζει μειονεκτήματα, όπως η ανάγκη για PCR που αυξάνει το ποσοστό σφαλμάτων, η συστηματική προκατάληψη και η σχετικά μικρή διάρκεια ανάγνωσης. Η τρίτη γενιά έχει αναπτυχθεί προκειμένου να αντιμετωπίσει αυτές τις αδυναμίες. Το βασικό χαρακτηριστικό της είναι η δυνατότητα αλληλούχισης ενός μορίου χωρίς την ανάγκη για PCR, γεγονός που συμβάλλει στην αποφυγή σφαλμάτων που προκύπτουν από μεροληψία

PCR, ενώ παράλληλα βελτιώνει το μήκος ανάγνωσης και διατηρεί τα πλεονεκτήματα της δεύτερης γενιάς, όπως το χαμηλό κόστος και την υψηλή απόδοση (Sha Liu et al., 2022).

Εικόνα 14: Ένα παράδειγμα ροής εργασίας για την προετοιμασία και την αλληλούχηση βιβλιοθηκών πολλαπλής ανάλυσης (multiplex) με το ONT (Oxford Nanopore Technologies) και την αλληλούχηση. (Wu et al., 2021).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.

Ανοσολογικές Μέθοδοι

Οι παραδοσιακές ανοσολογικές μέθοδοι, όπως η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) και η ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής (LFIA), εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως στην ανίχνευση του *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* λόγω των καθιερωμένων πλατφορμών και της ευρείας βάσης εφαρμογής τους (Zou et al., 2026).

4.1 Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA)

Η τεχνική ELISA αποτελεί μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες ανοσοδοκιμασίες στην αξιολόγηση της ασφάλειας των τροφίμων, και περιλαμβάνει τέσσερις βασικές μορφές: *άμεση, έμμεση, σάντουιτς και ανταγωνιστική*. Η θεμελιώδης αρχή στηρίζεται στην ακινητοποίηση ειδικών αντιγόνων ή αντισωμάτων σε μια σταθερή επιφάνεια, επιτρέποντας την επίτευξη συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος που αναζητούνται. Η ανίχνευση πραγματοποιείται μέσω μετατροπής του υποστρώματος με τη βοήθεια ενζύμου, παράγοντας ένα μετρήσιμο σήμα. Λόγω της πλούσιας έκφρασης των αντιγονικών επιφανειών στο *E. coli* O157:H7, συχνά επιλέγεται η μορφή **ELISA σάντουιτς**. Η τεχνική αυτή προσφέρει πλεονεκτήματα όπως η απλότητα, το χαμηλό κόστος και η δυνατότητα υψηλής διαλογής. Ωστόσο, η παραδοσιακή ELISA παρουσιάζει μειονεκτήματα, όπως τα μακρά στάδια επώασης (συνήθως αρκετές ώρες), την έντονη διαδικασία και περιορισμένη ευαισθησία. Τα τελευταία δέκα χρόνια, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στη μείωση του χρόνου ανίχνευσης και στη βελτίωση της ευαισθησίας της μεθόδου. Έχουν εξερευνηθεί στρατηγικές για την τροποποίησή της. (Zou et al., 2026).

1. Αύξηση του ωφέλιμου φορτίου του ενζύμου για ενίσχυση της καταλυτικής απόδοσης. Τα συμβατικά αντισώματα μπορούν τυπικά να συζεύξουν μόνο 2-3 μόρια υπεροξειδάσης χρένου (HRP), περιορίζοντας την ενίσχυση του σήματος. Τα συστήματα βιοτίνης-στρεπταβιδίνης έχουν εισαχθεί για την ενίσχυση της ευαισθησίας ανίχνευσης. Η στρεπταβιδίνη (SA) είναι μια τετραμερής πρωτεΐνη, με κάθε υπομονάδα ικανή να δεσμεύει ένα μόριο βιοτίνης. Αυτή η σύνδεση είναι γρήγορη, σταθερή και ανεπηρέαστη

από ακραίες συνθήκες, παρέχοντας μια αξιόπιστη βάση για την ενίσχυση του σήματος. Η βιοτίνη συνδέεται ομοιοπολικά με το αντίσωμα που μας ενδιαφέρει, σχηματίζοντας έναν βιοτινυλιωμένο ανιχνευτή. Το SA μπορεί στη συνέχεια να συζευχθεί με μόρια αναφοράς σήματος όπως ένζυμα, φθοροφόρα ή κολλοειδή χρυσό για να σχηματιστούν σύμπλοκα. Τελικά, κάθε βιοτινυλιωμένος ανιχνευτής μπορεί να δεσμεύσει πολλαπλά σύμπλοκα μορίων σήματος SA, επιτυγχάνοντας γεωμετρική ενίσχυση του σήματος.

Οι Guo et al. χρησιμοποίησαν ένα σύστημα ενίσχυσης βιοτίνης-στρεπταβιδίνης για εξαιρετικά ευαίσθητη ανίχνευση *E. coli* O157:H7, με το όριο ανίχνευσης να είναι $1,08 \times 10^2$ CFU/mL σε καθαρή καλλιέργεια. Ωστόσο, καθώς ένα μόνο μόριο SA μπορεί να δεσμεύσει μόνο τέσσερα μόρια βιοτίνης, έχουν χρησιμοποιηθεί συζεύγματα πολυ-HRP (PolyHRP) για την περαιτέρω ενίσχυση των σημάτων. Το PolyHRP είναι ένα υπερμοριακό πολυμερές HRP που περιέχει έως και 400 μόρια ενζύμου το πολύ που μπορούν να συζευχθούν με διάφορους συνδέτες και υποδοχείς. Οι Zhang et al. αντικατέστησε το SA-PolyHRP με το SA-HRP, βελτίωσε σημαντικά την ευαισθησία ανίχνευσης, επιτυγχάνοντας όρια ανίχνευσης (LOD) $1,4 \times 10^4$ CFU/mL για *E. coli* O157:H7, με βελτιώσεις ευαισθησίας 7,86 φορές. (Zhang et al.,2026)

2. Η χρήση νανοενζύμων ως υποκατάστατων των φυσικών ενζύμων έχει αναδειχθεί ως μια αποτελεσματική στρατηγική για την ενίσχυση της καταλυτικής απόδοσης. Σε σύγκριση με τα παραδοσιακά ένζυμα, τα νανοενζύματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή στο περιβάλλον και αυξημένη σταθερότητα. Η εφαρμογή διμεταλλικών νανοενζύμων PdRu ως υποκατάστατα της HRP στην ELISA, πέτυχαν βελτίωση 288 φορές στην ευαισθησία σε σχέση με την κλασική ELISA που βασίζεται στην HRP. Αντίστοιχα, η χρησιμοποίηση νανοενζύμων Pd@Pt στην ELISA, είχε αποτέλεσμα το όριο ανίχνευσης (LOD) να είναι 100 φορές χαμηλότερο σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μορφές. (Zou et al.,2026).

3. Η ενσωμάτωση νέων στοιχείων εξόδου σήματος έχει οδηγήσει στη βελτίωση της καταλυτικής απόδοσης. Τα φθορίζοντα νανοϋλικά και οι σχετικές πλατφόρμες βιοαισθητήρων έχουν αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία στην ανίχνευση παθογόνων, φτάνοντας έως και τρεις τάξεις μεγέθους, με ορισμένα συστήματα να είναι ικανά να ανιχνεύουν μεμονωμένα βακτηριακά κύτταρα. Οι Xue et al. ανέπτυξαν έναν φορητό βιοαισθητήρα που χρησιμοποιεί ανοσομαγνητικά σφαιρίδια και κβαντικές κουκκίδες, ο

οποίος μπορεί να ανιχνεύσει το *E. coli* O157:H7 με ευαισθησία έως 14 CFU/mL μέσα σε δύο ώρες.

4. Η ενίσχυση της ευαισθησίας ανίχνευσης επιτυγχάνεται μέσω της εισαγωγής νανοσωμάτων. Τα νανοσώματα είναι μεταβλητές περιοχές αντισωμάτων βαριάς αλυσίδας (VHH) που προέρχονται από καμήλες και αποτελούν τα μικρότερα γνωστά λειτουργικά θραύσματα δέσμησης αντιγόνου, με μέγεθος περίπου 15 kDa . Διαθέτουν πολλά εξαιρετικά χαρακτηριστικά, όπως μικρό μοριακό μέγεθος, υψηλή σταθερότητα (ανθεκτικά στη θερμότητα και σε ακραία pH), εξαιρετική διαλυτότητα και χαμηλό κόστος παραγωγής. Συγκριτικά με τα συμβατικά αντισώματα, τα νανοσώματα μπορούν να αναγνωρίσουν ευαίσθητους στη διαμόρφωση ή μερικώς κρυμμένους επιτόπους σε βακτηριακά επιφανειακά αντιγόνα. Η ικανότητά τους να αναδιπλώνονται μετά από θερμική ή χημική μετουσίωση καθιστά τα νανοσώματα ιδιαίτερα κατάλληλα για επιτόπιες εφαρμογές διαλογής (Zou et al.,2026). Οι He et al. ανοσοποίησαν αλπικά για την παραγωγή νανοσωμάτων που στοχεύουν ειδικά το *E. coli* O157:H7 και ανέπτυξαν μια ανοσοδοκιμασία σάντουιτς σε συνδυασμό με πολυκλωνικά αντισώματα, πετυχαίνοντας όριο ανίχνευσης (LOD) $8,7 \times 10^3$ CFU/mL. Το ίδιο και οι Xue et al. εντόπισαν δύο νανοσώματα με διαφορετικές ειδικότητες δέσμησης μέσω διαλογής εμφάνισης φάγου. Συνδυάζοντας μονοκλωνικά αντισώματα ως στοιχεία σύλληψης με τα νανοσώματα ως ιχνηθέντες, ανέπτυξαν μια ανοσοδοκιμασία σάντουιτς τριπλού αντισώματος με μεσολάβηση φάγου, που πέτυχε LOD $1,89 \times 10^3$ CFU/mL, παρουσιάζοντας ελάχιστη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με άλλα βακτηριακά είδη και βελτιώνοντας κατά 41,8 φορές την ευαισθησία σε σχέση με τις συμβατικές δοκιμασίες σάντουιτς με βάση μονοκλωνικά αντισώματα (Xue et al.,2025)

Παρά τις συνεχείς βελτιώσεις, η τεχνολογία ELISA εξακολουθεί να περιορίζεται από τις χρονοβόρες και απαιτητικές διαδικασίες της (συνήθως διαρκούν 2 έως 6 ώρες), καθώς και από την ανάγκη εκτεταμένης προεπεξεργασίας του δείγματος λόγω παρεμβολών από συστατικά τροφίμων. Η εξάρτησή της από εξειδικευμένο προσωπικό και ειδικό εξοπλισμό περιορίζει περαιτέρω τη δυνατότητά της για γρήγορες και επιτόπιες δοκιμές. Επιπλέον, η ευαισθησία και η ειδικότητά της είναι χαμηλότερες σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, με όριο ανίχνευσης περίπου 10^4 CFU/mL, το οποίο είναι πολύ πάνω από τη χαμηλή παθογόνο δόση του O157:H7 (10–100 κύτταρα). Αυτή η ανεκπλήρωτη ανάγκη οδήγησε

στην ανάπτυξη του LFIA, που αποτελεί ένα απλό, γρήγορο και εύχρηστο εργαλείο για επιτόπιο έλεγχο σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων. (Zou et al.,2026).

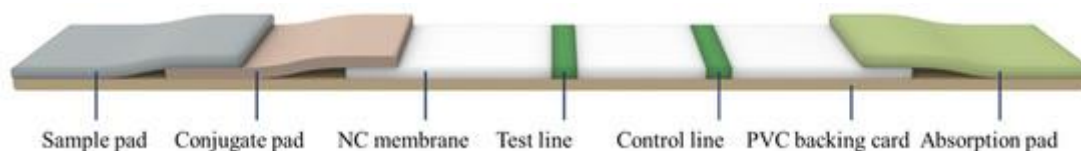
4.2 Ανοσολογική δοκιμή πλευρικής ροής (LFIA)

Το LFIA αποτελεί μια γρήγορη και εύχρηστη τεχνική που συνδυάζει την ανοσολογική αναγνώριση με τον χρωματογραφικό διαχωρισμό. Η βασική αρχή της στηρίζεται στην ακινητοποίηση ειδικών αντισωμάτων ή αντιγόνων σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (NC). Καθώς το δείγμα δοκιμής μεταναστεύει κατά μήκος της μεμβράνης μέσω τριχοειδούς δράσης, η αναλυόμενη ουσία στόχος αλληλεπιδρά με το ακινητοποιημένο αντίσωμα ή αντιγόνο, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ετικετών σήματος και τη δημιουργία είτε χρωματομετρικών είτε φθορίζοντων σημάτων, που επιτρέπουν ποιοτική ανίχνευση της ουσίας. Στην περίπτωση της σαλμονέλλας η αναλυτέα ουσία τοποθετείται στο επίθεμα δείγματος και διηθείται. Στη συνέχεια, μπορεί να δεσμεύσει νανοσωματίδια στη λωρίδα Lateral Flow Assay (LFA) και να ρέει μέσω της μεμβράνης, φτάνοντας στα αντισώματα κατά της σαλμονέλας. Κατά τη δέσμευση ενός αντιγόνου σαλμονέλας, παράγεται μια αλλαγή χρώματος, σχηματίζοντας τη γραμμή δοκιμής. Πέρα από τη γραμμή δοκιμής, υπάρχουν επιπλέον βιοϋποδοχείς που χρησιμοποιούνται για την επικύρωση της συσκευής LFA, οι οποίοι ανιχνεύουν νανοσωματίδια ανεξάρτητα από τη δεσμευμένη αναλυόμενη ουσία και σχηματίζουν τη γραμμή ελέγχου. Το 2021, σε μια πειραματική διαδικασία, αναπτύχθηκαν ταινίες LFA που ενσωματώνουν απταμερή-μαγνητικό διαχωρισμό και νανοσωματίδια για βελτιωμένη ανίχνευση της *Salmonella Typhimurium* στο γάλα, με όριο ανίχνευσης $4,1 \times 10^2$ CFU/ml, χωρίς την ανάγκη στάδιου προεμπλουτισμού (Patel et al.,2024).

Για την ανίχνευση του *E. coli* O157:H7, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί συνήθως αντισώματα ειδικά για επιφανειακά αντιγόνα (π.χ. λιποπολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες μαστιγώσεων) που είναι ακινητοποιημένα στη μεμβράνη NC. Δεδομένου ότι η μολυσματική δόση του O157:H7 είναι εξαιρετικά χαμηλή (μόλις 10-100 κύτταρα), η ευαισθησία του συμβατικού LFIA συχνά δεν είναι επαρκής, καθιστώντας αναγκαία την ενσωμάτωση στρατηγικών ενίσχυσης σήματος, όπως η χρήση νανοϋλικών ή ενζυματικών αντιδράσεων, για την αξιόπιστη ανίχνευση. Επίσης, η πολυπλοκότητα των μητρών τροφίμων απαιτεί την προσεκτική λήψη υπόψη των βημάτων προεπεξεργασίας του

δείγματος, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι παρεμβολές της μήτρας και να διασφαλιστεί η ακρίβεια στην αναγνώριση του παθογόνου στόχου. Η εικόνα 15 παρουσιάζει το διάγραμμα συναρμολόγησης της ταινίας μέτρησης. Σε σύγκριση με την ELISA, η LFIA αποφεύγει χρονοβόρα βήματα όπως ο αποκλεισμός και το πλύσιμο, ενώ τα αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευτούν με γυμνό μάτι, καθιστώντας την ιδιαίτερα κατάλληλη για επιτόπιες γρήγορες δοκιμές (Zou et al.,2026).

Εικόνα 15: Διάγραμμα κατασκευής της ταινίας μέτρησης. (Zou et al.,2026).

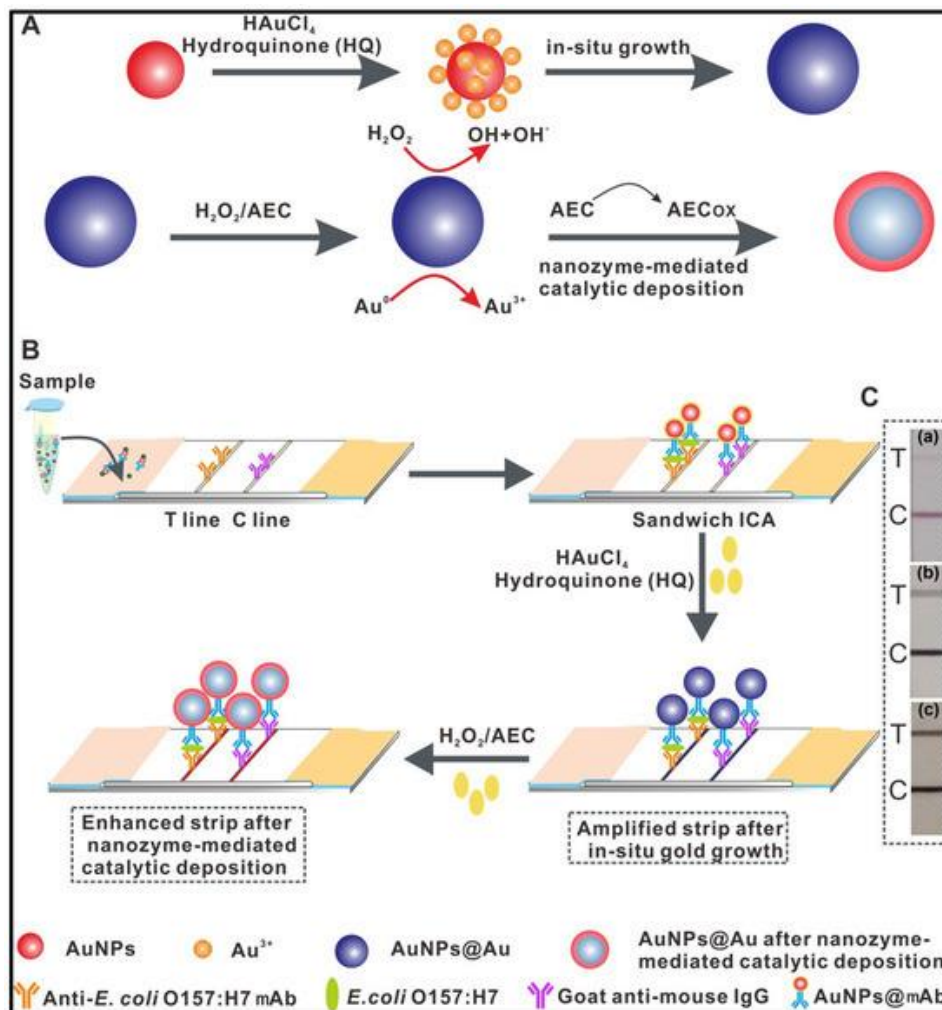


Οι πρόσφατες εξελίξεις έχουν σημαντικά βελτιώσει την ευαισθησία της τεχνικής LFIA, μέσω της ενσωμάτωσης νέων νανοϋλικών, νανοσωμάτων και στρατηγικών ενίσχυσης του σήματος. Σύμφωνα με τους Shao et al. όπου ανέπτυξαν μια διπλής λειτουργίας χρωματομετρική και φθορίζουσα λωρίδα LFIA, η οποία βασίζεται σε νανοσωματίδια χρυσού τροποποιημένα με ντοπαμίνη (AuNPs). Αυτή η προσέγγιση επέτρεψε την ευαίσθητη ανίχνευση του *E. coli* O157:H7, με όριο ανίχνευσης (LOD) $9,06 \times 10^1$ CFU/mL, που ήταν 46 φορές χαμηλότερο από αυτό που επιτεύχθηκε με την παραδοσιακή χρήση 40 nm AuNP με μειωμένο κιτρικό (Shao et al.,2023).

Ταυτόχρονα, οι Fu et al. πρότειναν μια καινοτόμο στρατηγική ενίσχυσης του σήματος, η οποία συνδύαζε την *in situ* ανάπτυξη κολλοειδούς χρυσού με καταλυτική εναπόθεση μέσω νανοενζύμων. Αυτή η προσέγγιση οδήγησε στη δημιουργία μιας λωρίδας LFIA με διπλό σήμα, επιτυγχάνοντας LOD $1,25 \times 10^1$ CFU/mL. Η συγκεκριμένη στρατηγική επέτρεψε την ανίχνευση ενός παθογόνου και επέδειξε μια 400 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία σε σύγκριση με την παραδοσιακή LFIA που βασίζεται σε AuNP (LOD 5×10^3 CFU/mL). Η σχηματική απεικόνιση αυτής της στρατηγικής παρουσιάζεται στο Σχήμα 16.(Fu et al.,2020). Σε άλλη μελέτη, ανέπτυξαν διμεταλλικές κοίλες νανοσφαίρες που μοιάζουν με αχινό, Ag–Au, ως ετικέτες σήματος για διπλής λειτουργίας LFIA

(χρωματομετρική και φωτοθερμική). Με αυτήν την τεχνική, επιτεύχθηκαν LOD $2,48 \times 10^3$ και $5,5 \times 10^2$ CFU/mL αντίστοιχα. (Zou et al.,2026).

Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση της στρατηγικής ενίσχυσης του σήματος καταρράκτη με βάση την πλατφόρμα AuNP-ICA για την υπερευαίσθητη ανίχνευση του *E. coli* O157:H7 στο γάλα. α) αρχή και ανάλυση της ενισχυμένης μεθόδου AuNP-ICA για την ανίχνευση *E. coli* O157:H7 με τη χρήση της προτεινόμενης ενίσχυσης σήματος καταρράκτη δύο σταδίων· β) προτεινόμενη ανοσοδοκιμασία ενίσχυσης σήματος καταρράκτη δύο σταδίων· (γ) 104 CFU/mL *E. coli* O157:H7 δοκιμάστηκαν χρησιμοποιώντας τις τρεις ταινίες με ή χωρίς ενίσχυση σήματος. Το "a" σημαίνει συμβατική λωρίδα AuNP-ICA, το "b" σημαίνει ενισχυμένη λωρίδα μετά την *in Situ* ανάπτυξη χρυσού και το "c" σημαίνει ενισχυμένη λωρίδα μετά την καταλυτική εναπόθεση με τη μεσολάβηση νανοενζύμων (Fu et al.,2020)



Αυτά τα ευρήματα καταδεικνύουν ότι η τεχνική LFIA έχει γίνει μια ευρέως εφαρμόσιμη μέθοδος για την ταχεία και ευαίσθητη ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων. Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη προηγμένων νανοετικετών, ο σχεδιασμός συστημάτων ανίχνευσης πολυπλεξίας και η ενσωμάτωση ποσοτικής ανάλυσης που βασίζεται σε smartphone έχουν οδηγήσει σε σημαντικά βήματα προόδου στην απόδοση της LFIA, ενισχύοντας την εφαρμογή της στην παρακολούθηση της ασφάλειας των τροφίμων. Παρόλα αυτά, οι παραδοσιακές ανοσοχρωματογραφικές δοκιμασίες με βάση τον κολλοειδή χρυσό (LFIA) για την ανίχνευση του *E. coli* O157:H7 εξακολουθούν να παρουσιάζουν ορισμένους σημαντικούς περιορισμούς που περιορίζουν την πρακτικότητά τους. Η κύρια πρόκληση αφορά στην ανεπαρκή ευαισθησία και την ημιποσοτική ικανότητα ανίχνευσης: το συμβατικό LFIA με κολλοειδή χρυσό συνήθως επιτυγχάνει όρια ανίχνευσης της τάξης 10^4 – 10^5 CFU/mL, γεγονός που καθιστά ανεπαρκή την ανίχνευση χαμηλών μολυσματικών δόσεων του παθογόνου. Ένα ακόμη σημαντικό ζήτημα αποτελεί η μη προσανατολισμένη ακινητοποίηση των αντισωμάτων, η οποία οδηγεί σε αναποτελεσματική δέσμευση αντιγόνου και μπορεί να μειώσει την ευαισθησία κατά περίπου μία τάξη μεγέθους σε σύγκριση με τις βέλτιστα προσανατολισμένες μορφές (Sun et al.,2020). Επιπλέον, η παρουσία παρεμβολών από πολύπλοκα δείγματα τροφίμων προκαλεί συχνά μη ειδική προσρόφηση και αυτοφθορισμό του υποβάθρου, επηρεάζοντας την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Αυτοί οι περιορισμοί υπογραμμίζουν την ανάγκη συνεχούς καινοτομίας στις στρατηγικές ενίσχυσης του σήματος, στη βελτίωση της μηχανικής ακινητοποίησης αντισωμάτων και στην ανάπτυξη συστημάτων ποσοτικής ανάγνωσης. (Sun et al.,2020).

Σε σύγκριση με τις αναδυόμενες τεχνολογίες, οι οποίες βρίσκονται ακόμη υπό ανάπτυξη, ορισμένες εμπορικές ανοσοδοκιμασίες έχουν καθιερωθεί ως βιομηχανικά πρότυπα, προσφέροντας σημεία αναφοράς για την ανθεκτικότητα και την αξιοπιστία που πρέπει να πληρούν οι μελλοντικές μέθοδοι. Για παράδειγμα, η ανάλυση [π.χ. VIDAS UP *E. coli* O157 (ECPT)] αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη αυτοματοποιημένη λύση. Η εν λόγω μέθοδος, που βασίζεται στην τεχνολογία ενζυμικής δοκιμασίας φθορισμού (ELFA), έχει επικυρωθεί από την AOAC International (π.χ. Performance Tested Method 060903) και έχει λάβει πιστοποίηση από την AFNOR σύμφωνα με το πρότυπο ISO 16140 . Όσον αφορά τις επιδόσεις, παρουσιάζει υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, με όριο ανίχνευσης (LOD) που επιτρέπει την αναγνώριση 1 CFU σε δείγμα τροφίμου 25 g μετά από περίοδο εμπλουτισμού περίπου 8–24 ωρών. Οι μελέτες επικύρωσης έχουν δείξει ευαισθησία και

ειδικότητα άνω του 98% σε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς ISO. Τέτοιες επικυρωμένες αναλύσεις λειτουργούν ως κρίσιμο σημείο αναφοράς για την αξιολόγηση της πρακτικής αποτελεσματικότητας των αναδυόμενων τεχνολογιών ανοσοανίχνευσης. (Zou et al.,2026).

4.2.1 Παραδοσιακό υλικό

Τα νανοσωματίδια κολλοειδούς χρυσού (AuNPs) αποτελούν τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες ετικέτες σήματος στα δοκιμαστικά συστήματα LFIA λόγω των καθιερωμένων πρωτοκόλλων σύνθεσής τους και των εξαιρετικών οπτικών ιδιοτήτων τους. Το συμβατικό LFIA που βασίζεται σε AuNPs συνήθως χρησιμοποιεί AuNPs με μειωμένο κιτρικό άλας (Cit-AuNPs, $-35,4$ mV), στα οποία η επιφάνεια των νανοσωματιδίων σταθεροποιείται από ισχυρά ιονισμένους συνδέτες κιτρικού, δημιουργώντας μια αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια. Οι οπτικές ιδιότητες των AuNPs επηρεάζονται σημαντικά από το μέγεθος των σωματιδίων, με διαφορετικές διαμέτρους να παρουσιάζουν διακριτά χρωματικά χαρακτηριστικά. Με την προσαρμογή της μοριακής αναλογίας κιτρικού νατρίου προς χλωροαυρικό οξύ, οι διαδικασίες πυρήνωσης και ανάπτυξης των AuNPs μπορούν να ρυθμιστούν με ακρίβεια, επιτρέποντας την παραγωγή νανοσωματιδίων με ελεγχόμενες διαμέτρους ώστε να καλύπτουν διαφορετικές απαιτήσεις ανίχνευσης. Σε σύγκριση με άλλα υλικά επισήμανσης, τα AuNPs διαθέτουν ξεχωριστά πλεονεκτήματα, όπως βιοσυμβατότητα, σταθερότητα, εύκολη οπτικοποίηση, απλή παρασκευή και χαμηλό κόστος, καθιστώντας τα ιδανικά για μαζική παραγωγή. Συνεπώς, έχουν ευρεία εφαρμογή στην κλινική διάγνωση, την περιβαλλοντική παρακολούθηση και τις δοκιμές ασφάλειας τροφίμων (Khan et al.,2025).

4.2.2 Νέο υλικό

Κατά την τελευταία δεκαετία, η απόδοση των δοκιμασιών LFIA έχει βελτιωθεί σημαντικά με την ανάπτυξη νέων υλικών επισήμανσης. Οι κβαντικές κουκκίδες (QD), λόγω των μοναδικών οπτικών ιδιοτήτων τους, όπως τα ευρέα φάσματα διέγερσης, τα στενά φάσματα εκπομπής, η υψηλή κβαντική απόδοση φθορισμού, η ισχυρή φωτοσταθερότητα, η αντοχή στη φωτοδιάβρωση και η καλή βιοσυμβατότητα όταν συζευγνύονται με βιομόρια, έχουν ευρεία χρήση στην τεχνολογία LFIA. Οι Qiao et al ανέπτυξαν μια

χαρτο-βασισμένη συσκευή με QD για την οπτική και ποσοτική ανίχνευση του *E. coli* O157:H7, ενσωματώνοντας ανοσομαγνητικό διαχωρισμό και ενίσχυση σήματος μέσω διάλυσης νανοσωματιδίων. Αυτή η πλατφόρμα πέτυχε όριο οπτικής ανίχνευσης έως και 500 CFU/mL, λόγω της υψηλής απόδοσης λήψης και της αποτελεσματικής ενίσχυσης του σήματος. (Qiao et al.,2021)

Πίνακας 2: Σύγκριση απόδοσης των νέων τεχνολογιών LFIA για την ανίχνευση του *E. coli* O157:H7 τα τελευταία χρόνια. (Zou et al.,2026).

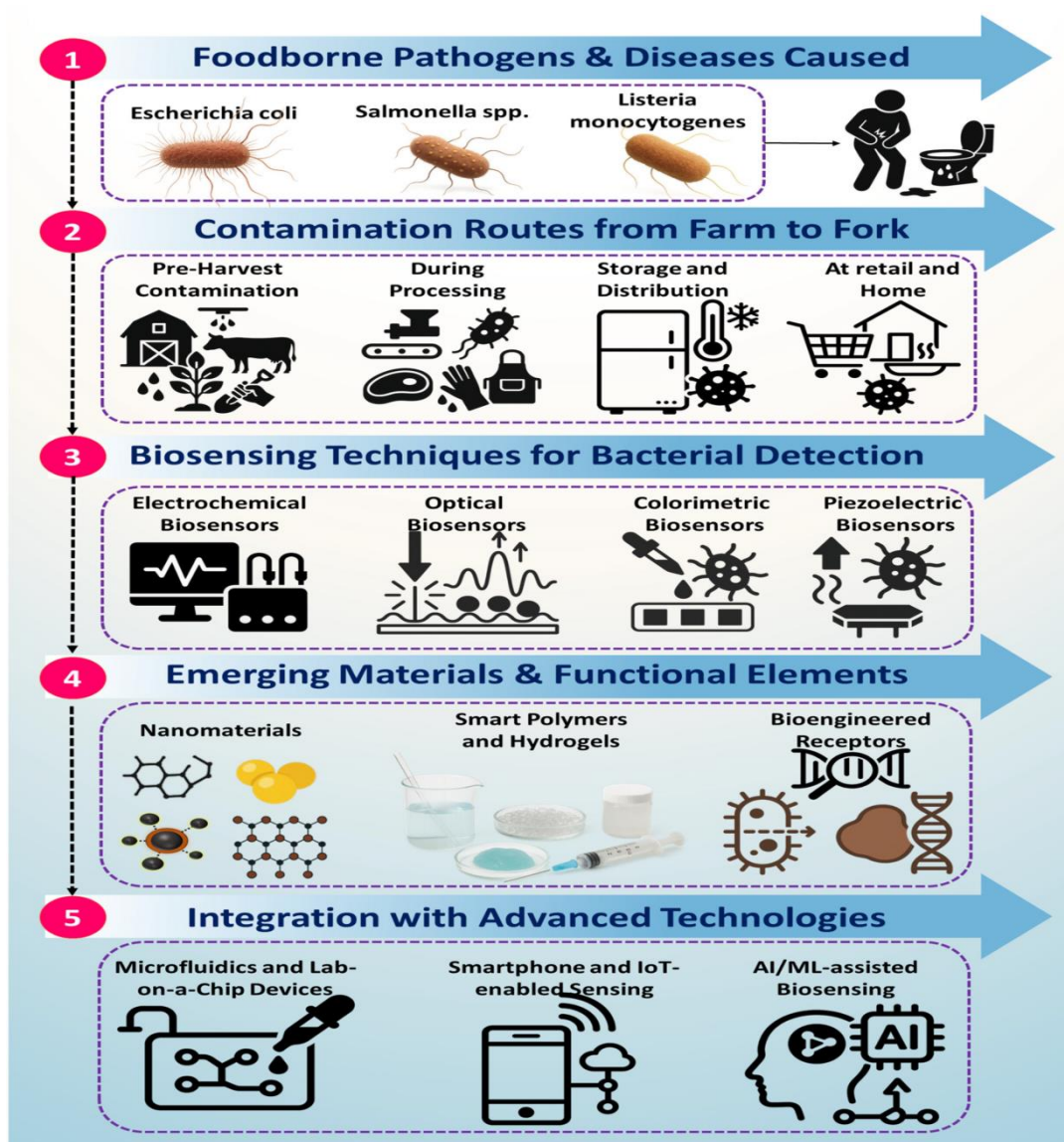
Detection Technologies	Labeling Material	Limit Detection	Detection Technologies	Labeling Material
Multiplex AuNP-LFIA	AuNPs	106 (direct); 4 (after enrichment)	10 h enrichment+ <30 min	Bread, milk, jelly
Dual-mode LFIA (colorimetric/photothermal)	Ag-Au sea-urchin-like hollow nanospheres	2.4×10^3 (colorimetric) 5.5×10^2 (photothermal)	<30 min	Food samples
AI-Egen-based LFIA	AI-EFMs	3.06×10^2	<30 min	Food samples
Dual-mode LFIA (colorimetric/fluorescent)	Dopamine-modified AuNPs	9.06×10^1	<30 min	Food samples
Dual-signal enhanced LFIA	In situ growth of AuNPs + nanozyme catalytic deposition	1.25×10^1	<30 min	Food samples
QD-based ICA	QDs + immunomagnetic separation	500	<1 h	Food

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.

Βιοαισθητήρες

Η πολύπλοκη κατάσταση των συστημάτων μόλυνσης στην αλυσίδα από το αγρόκτημα μέχρι το πιάτο τονίζει τις δυνατότητες ανάπτυξης κατανεμημένων πλατφορμών βιοαισθητήρων, οι οποίες θα πρέπει να προσφέρουν ταχεία ανίχνευση και υψηλή ανθεκτικότητα στη μήτρα. Αυτές οι πλατφόρμες οφείλουν να λειτουργούν αποτελεσματικά σε διάφορα περιβάλλοντα που επηρεάζονται από μόλυνση. Στα προ-συγκομιδής στάδια, απαιτούνται αισθητήρες που να είναι ικανοί να ανιχνεύουν χαμηλά επίπεδα μολυσματικών παραγόντων στο έδαφος ή το νερό. Τα στάδια επεξεργασίας και αποθήκευσης μπορούν να ωφεληθούν από την παρακολούθηση της επιφάνειας και την ανίχνευση βιοφίλμ. Στο λιανικό εμπόριο και τα σπίτια των καταναλωτών, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν φορητοί βιοαισθητήρες ή smartphones για την άμεση αξιολόγηση της παρουσίας ρύπων. Οπότε, η αποτελεσματική επιτήρηση της ασφάλειας των τροφίμων απαιτεί συστήματα βιοανίχνευσης προσαρμοσμένα στις διαφορετικές οδούς μόλυνσης, τις ποικιλίες τροφίμων και τους λειτουργικούς περιορισμούς, ενισχύοντας την ανάγκη για ολοκληρωμένες προσεγγίσεις ανίχνευσης όπως φαίνονται στην εικόνα 17.(Assudani et al.,2026)

Εικόνα 17: Γραφική αναπαράσταση των τροφιμογενών βακτηριακών παθογόνων και των οδών μόλυνσής τους από το αγρόκτημα μέχρι το πιάτο, καθώς και απεικόνιση των λύσεων βιοανίχνευσης, των στρατηγικών ανίχνευσης και των λειτουργικών υλικών που χρησιμοποιούνται. Επιπλέον, ενσωμάτωση τεχνολογιών αιχμής όπως η Τεχνητή Νοημοσύνη (AI), το Διαδίκτυο των Πραγμάτων (IoT), η μικρορευστοποίηση και άλλες προηγμένες τεχνολογίες για τη βελτίωση της διαχείρισης και ανίχνευσης των τροφιμογενών παθογόνων. (Assudani et al., 2026)



Οι βιοαισθητήρες έχουν καταστεί αναπόσπαστα εργαλεία για την ενίσχυση της ασφάλειας των τροφίμων, καθώς επιτρέπουν την ταχεία, ευαίσθητη και εξαιρετικά συγκεκριμένη

ανίχνευση τροφιμογενών βακτηριακών παθογόνων, όπως *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes*. Αυτές οι προηγμένες αναλυτικές πλατφόρμες λειτουργούν ως σύνδεσμοι μεταξύ εργαστηριακών διαγνωστικών και εφαρμογών επιτόπιας παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο. Ένας βιοαισθητήρας αποτελείται από ένα βιολογικά ενεργό στοιχείο αναγνώρισης και ένα σύστημα μεταγωγής σήματος. Το στοιχείο αυτό αναγνώρισης διασυνδέεται με το παθογόνο ή το βιομόριο που μας ενδιαφέρει, επιτρέποντας μια εξειδικευμένη αλληλεπίδραση. Η δέσμευση αυτή μεταφράζεται σε ένα σήμα, το οποίο μπορεί να είναι ηλεκτρικό, οπτικό, ακουστικό ή χρωματομετρικό. Η ικανότητα μετατροπής ενός βιολογικού γεγονότος σε ένα ποσοτικοποιήσιμο σήμα αποτελεί τη βάση για τη χρησιμότητά των βιοαισθητήρων κατά μήκος της αλυσίδας εφοδιασμού τροφίμων.(Assudani et al.,2026)

5.1.1 Μηχανισμοί βιοαισθητήρων

Μόλις το παθογόνο αναγνωριστεί από το στοιχείο ανίχνευσης, ο μορφοτροπέας παράγει το σήμα. Οι περισσότερες πλατφόρμες που μελετήθηκαν εστιάζουν σε *ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες*, οι οποίοι μετρούν τις αλλαγές στο ρεύμα, το δυναμικό ή την αντίσταση κατά την αλληλεπίδραση του στόχου. Λόγω της συμβατότητάς τους με μικροσκοπικές μορφές και της χαμηλής κατανάλωσης ενέργειας, αυτοί οι βιοαισθητήρες υπόσχονται πολλά για φορητά κιτ ανίχνευσης που μπορούν να αναπτυχθούν σε πεδία εφαρμογής. Οι *οπτικοί βιοαισθητήρες* βασίζονται σε διακυμάνσεις των ιδιοτήτων του φωτός, όπως ο φθορισμός, η απορρόφηση και ο επιφανειακός συντονισμός πλασμονίου (SPR), για την παρακολούθηση συμβάντων δέσμευσης. Η επιφανειακά ενισχυμένη σκέδαση Raman (SERS), μια εξελιγμένη τεχνική, έχει φτάσει σε επίπεδα ευαισθησίας λίγων κυττάρων και ενσωματώνεται όλο και περισσότερο με νανοϋλικά για πολύπλοκη ανίχνευση. Οι *πιεζοηλεκτρικοί βιοαισθητήρες*, συμπεριλαμβανομένων των συστημάτων μικροζυγού κρυστάλλων χαλαζία, ανιχνεύουν μικρές αλλαγές στη μάζα κατά τη δέσμευση του παθογόνου, μετρώντας τις αλλαγές στη συχνότητα ταλάντωσης, προσφέροντας ανίχνευση χωρίς ετικέτα και υψηλή ευαισθησία. Οι *χρωματομετρικοί βιοαισθητήρες* έχουν γίνει δημοφιλείς λόγω της απλότητας, του χαμηλού κόστους και της ευκολίας οπτικής ανάγνωσης. Ιδιαίτερα, οι μορφές που βασίζονται σε χαρτί έχουν μεγάλη ζήτηση σε περιβάλλοντα με περιορισμένους πόρους, συχνά χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια

χρυσού, νανοενζύμα ή άλλα υλικά που αλλάζουν χρώμα ορατά ως απόκριση στην παρουσία βακτηρίων. (Mei et al.,2022)

5.1.2 Όρια και απαιτήσεις ανίχνευσης

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) εφαρμόζει πολιτική μηδενικής ανοχής για σοβαρά παθογόνα όπως η *Salmonella* spp., η *Listeria monocytogenes* και το *E. coli* O157:H7 σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (RTE), όπου η ανίχνευση ακόμα και λίγων κυττάρων αυτών των παθογόνων σε δείγμα 25 g θεωρείται απαράδεκτη. Ωστόσο, στο πλαίσιο του FSMA, η έμφαση δίνεται κυρίως στην πρόληψη της μόλυνσης με τέτοια παθογόνα. Αντίθετα, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) υιοθετεί ένα πλαίσιο βασισμένο στον κίνδυνο και την κατηγορία προϊόντων για την αντιμετώπιση των κινδύνων που σχετίζονται με τη *Listeria monocytogenes*. Για ορισμένα RTE τρόφιμα που δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, η EFSA επιτρέπει επίπεδα αυτού του βακτηρίου κάτω από 100 CFU/g στο τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Ωστόσο, η Εθνική Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων και Διατροφής (EAAT) επιβάλλει απόλυτη απαγόρευση της *L. monocytogenes* σε τρόφιμα που προορίζονται για ευαίσθητους πληθυσμούς. Επίσης, η Αρχή Ασφάλειας και Προτύπων Τροφίμων της Ινδίας (FSSAI) συμμορφώνεται κυρίως με τις κατευθυντήριες γραμμές του Codex Alimentarius, δίνοντας έμφαση στα αρνητικά κριτήρια για παθογόνα υψηλού κινδύνου που βασίζονται στη μη ανίχνευση. Παρ' όλα αυτά, η FSSAI έχει εντοπίσει και άλλους παράγοντες, όπως η οικονομική προσιτότητα, η επεκτασιμότητα και η ευκολία δοκιμής, για τη δημιουργία μιας πλατφόρμας βιοαισθητήρων και τη συνεργασία με άλλες χώρες που διαθέτουν διαφορετικά και αποκεντρωμένα συστήματα ελέγχου τροφίμων. Λόγω των διαφορών στα ρυθμιστικά περιβάλλοντα, υπάρχει αυξημένη ζήτηση για πλατφόρμες βιοαισθητήρων που προσφέρουν συνδυασμό ευελιξίας, ποσοτικοποίησης, εξαιρετικά χαμηλών ορίων ανίχνευσης, οικονομικής προσιτότητας και δυνατότητας επικύρωσης σε διάφορες ρυθμιστικές δικαιοδοσίες. Μια σύγκριση των προσεγγίσεων που υποστηρίχθηκαν από τον FDA, την EFSA και την FSSAI και τις επιπτώσεις τους στην απόδοση των βιοαισθητήρων συνοψίζεται στον Πίνακα 4. .(Assudani et al.,2026)

Πίνακας 3: Σύγκριση κανονιστικών απαιτήσεων για κύρια τροφιμογενή παθογόνα σε όλες τις περιοχές. (Assudani et al., 2026)

Ρυθμιστική αρχή	Ρυθμιστική προσέγγιση	Τυπικά όρια για βασικά παθογόνα	Δειγματοληπτική βάση	Βασικές επιπτώσεις για το σχεδιασμό βιοαισθητήρων
FDA (USA)	Μηδενική ανοχή; με γνώμονα τον προληπτικό έλεγχο (FSMA)	Salmonella, E. coli O157:H7, L. monocytogenes: απουσία σε 25 g (τρόφιμα RTE)	Ποιοτική (παρουσία/απουσία)	Εξαιρετικά χαμηλό LOD (< 1–10 CFU/25 g), υψηλή ειδικότητα, συμβατότητα με επιβεβαιωτικές μεθόδους
EFSA (European Union)	Με βάση τον κίνδυνο εξαρτάται από το προϊόν και τη διάρκεια ζωής	Σαλμονέλα: απουσία σε 25 g. L. monocytogenes: απουσία σε 25 g (υψηλού κινδύνου) ή < 100 CFU/g (τρόφιμα χαμηλού κινδύνου RTE)	Ποσοτική ή ημιποσοτική	Ποσοτικοί βιοαισθητήρες που επιτρέπουν την εκτίμηση κινδύνου με επίγνωση της διάρκειας ζωής
FSSAI (India)	Ευθυγραμμισμένο με τον Codex. με επίκεντρο την υγιεινή και τη σκοπιμότητα	Σαλμονέλα, E. coli O157:H7: απουσία σε 25 g. Λιστέρια: απουσία σε τρόφιμα RTE (εξελισσόμενα πρότυπα)	Κυρίως ποιοτική	Προσιτοί, γρήγοροι, φορητοί βιοαισθητήρες κατάλληλοι για αποκεντρωμένες δοκιμές

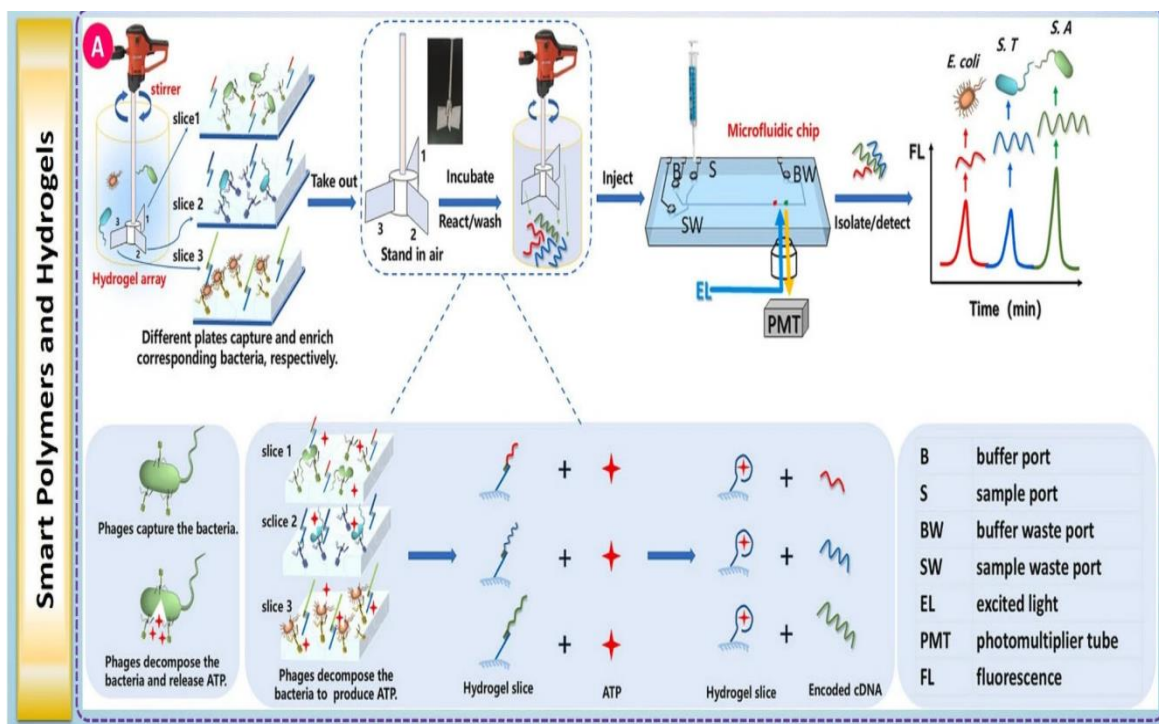
5.2 Αναδυόμενες τεχνικές

5.2.1. Έξυπνα πολυμερή και υδρογέλες

Η ενσωμάτωση έξυπνων πολυμερών και υδρογέλης που έχουν ανταπόκριση σε ερεθίσματα έχει προσθέσει ένα δυναμικό στοιχείο στους στόχους σχεδιασμού βιοαισθητήρων μαζί με νανοϋλικά. Τα πολυμερή αυτά έχουν τη δυνατότητα να ανταποκριθούν σε συνθήκες περιβάλλοντος όπως το pH και η θερμοκρασία ή να

στοχεύσουν συμβάντα δέσμευσης που επιτρέπουν φυσικές ή χημικές αλλαγές. Όπως, π.χ. οι θερμοανταποκρινόμενες υδρογέλες με συγκεκριμένα απταμερή θα μπορούσαν μετά την αναγνώριση του παθογόνου να διογκωθούν ή να συρρικνωθούν ανάλογα με την πρόσληψη νερού καθώς αναγνωρίζει το παθογόνο-στόχο ή το μη δεσμευμένο παθογόνο, επιτρέποντας τη διαμόρφωση του φθορισμού ή του ηλεκτροχημικού σήματος (Εικ. 18). Αυτές οι πλατφόρμες επιτρέπουν σε πραγματικό χρόνο, αναστρέψιμη και αυτορυθμιζόμενη ανίχνευση χρήσιμη σε έξυπνες συσκευασίες και συστήματα παρακολούθησης ψυχρής αλυσίδας. Μοριακά αποτυπωμένες υδρογέλες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της επιλεκτικότητας και της επαναχρησιμοποίησης, ιδιαίτερα για την ανίχνευση *Listeria* σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Xu et al.,2025).

Εικόνα 18: Έξυπνα πολυμερή και υδρογέλες: Μια συστοιχία υδρογέλης που λειτουργεί με βακτηριοφάγο συλλαμβάνει διαφορετικά βακτήρια σε ξεχωριστές φέτες. Η λύση φάγου απελευθερώνει ATP, το οποίο δρομολογείται σε ένα μικρορευστικό τσιπ για ανάγνωση φθορισμού. Αντιπροσωπευτικά ίχνη πολυπλεξίας δείχνουν διακριτά σήματα για *E. coli*, *S. Typhimurium* και *S. aureus*(Xu et al.,2025).



5.2.2 Βιομηχανικοί υποδοχείς

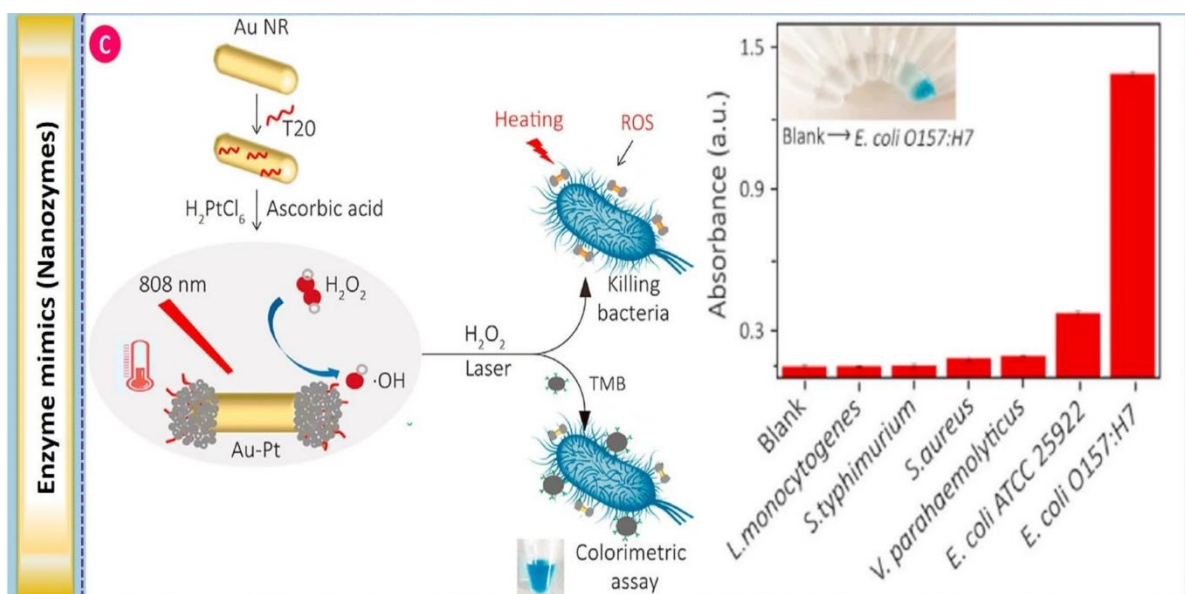
Οι πρόσφατες εξελίξεις στη συνθετική βιολογία και τη μοριακή μηχανική έχουν διευρύνει την εργαλειοθήκη των στοιχείων αναγνώρισης που διατίθενται στους βιοαισθητήρες, περιλαμβάνοντας συστήματα ανίχνευσης βασισμένα σε CRISPR/Cas. Αυτά προσφέρουν προγραμματιζόμενη εξειδίκευση σε επίπεδο αλληλουχίας, ενσωματωμένη ενίσχυση σήματος και συμβατότητα με οπτικές, ηλεκτροχημικές και μικρορευστικές τεχνολογίες μεταγωγής. Η ταυτοποίηση των στόχων νουκλεϊκών οξέων επιτυγχάνεται μέσω οδηγών RNA που βοηθούν στην αναγνώριση, ενώ η διάσπαση των στοχευμένων νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιείται από τα ένζυμα Cas (όπως Cas12a ή Cas13a), τα οποία παράγουν μετρήσιμα σήματα αναφοράς. Ο μηχανισμός αυτός επιτρέπει την υπερευαίσθητη ανίχνευση τροφικών παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των *Escherichia coli* και *Salmonella*, συχνά επιτυγχάνοντας ευαισθησία σε επίπεδο αντιγραφής χωρίς την ανάγκη θερμικού κύκλου, υποστηρίζοντας έτσι γρήγορες και φορητές διαγνωστικές εφαρμογές. (Assudani et al., 2026)

5.2.3 Νανοένζυμα

Παράλληλα, τα μιμητικά ενζύμων, γνωστά και ως νανοένζυμα, αποκτούν ολοένα και μεγαλύτερη σημασία λόγω της καταλυτικής τους δράσης και της σταθερότητάς τους κάτω από σκληρές συνθήκες, που ξεπερνούν τους περιορισμούς των φυσικών ενζύμων. Νανοένζυμα όπως νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου, οξειδίου του δημητρίου και σύνθετα υλικά με βάση τον άνθρακα παρουσιάζουν δράση παρόμοια με την υπεροξειδάση και έχουν ενσωματωθεί σε χρωματομετρικούς και ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες. Για παράδειγμα, Au@Pt νανοένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί για την καταλυτική αποδόμηση του H₂O₂ παρουσία βακτηριακών κυττάρων, διευκολύνοντας την ανίχνευση του *E. coli* σε λιγότερο από 20 λεπτά (Εικ.19) μέσω ενίσχυσης των χρωματομετρικών σημάτων. Οι βιοαισθητήρες αυτοί, ενισχυμένοι με νανοένζυμα, είναι ιδιαίτερα πολύτιμοι για την ανίχνευση βακτηρίων σε αδιαφανείς ή έγχρωμες μήτρες τροφίμων, όπου η οπτική διαύγεια διακυβεύεται. Ο συνδυασμός αυτών των προηγμένων υλικών για την υποστήριξη της απόδοσης των βιοαισθητήρων αναμένεται να οδηγήσει στην ανάπτυξη πλατφορμών επόμενης γενιάς, που θα είναι προσαρμόσιμες, πολυλειτουργικές και λειτουργικές σε ευρύ φάσμα εφαρμογών στον τομέα των τροφίμων. Ορισμένα από αυτά τα υλικά είναι συμβατά με τεχνικές υψηλής απόδοσης, όπως η εκτύπωση ή η επίστρωση,

καθιστώντας τα κατάλληλα για διαγνωστικά κιτ μιας χρήσης και για εφαρμογές στο σημείο φροντίδας. Η δυνατότητά τους να χρησιμοποιούνται σε εύκαμπτα υποστρώματα και μικροσκοπικά ηλεκτρονικά μέσα σε βιοαισθητήρες τα καθιστά πολλά υποσχόμενους υποψηφίους για την ανάπτυξη φορητών αισθητήρων, έξυπνων συσκευασιών τροφίμων και συσκευών ανάγνωσης μέσω κινητών τηλεφώνων (Yin et al.,2023).

Εικόνα 19: Νανοένζυμα που μιμούνται ένζυμα: Τα σύνθετα πλασμονικά/μεταλλικά νανοένζυμα συνδυάζουν φωτοθερμική θέρμανση (808 nm) με κατάλυση παρόμοια με υπεροξειδάση για να σκοτώσουν/εμπλουτίσουν τα βακτήρια και να ενισχύσουν τις χρωματομετρικές δοκιμασίες. Ο μαγνητικός διαχωρισμός επιτρέπει την ταχεία και επιλεκτική ανίχνευση, που απεικονίζεται εδώ για το *E. coli* O157:H7 έναντι κοινών παρεμβολών (Lu et al.,2021)



Συνολικά, η εξέλιξη των βιοαισθητήρων για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων έχει επιτευχθεί μέσω της χρήσης νανοϋλικών, έξυπνων πολυμερών, στοιχείων βιοαναγνώρισης με βάση το CRISPR και νανοενζύμων, δημιουργώντας συστήματα με βελτιωμένη ευαισθησία, μειωμένους χρόνους ανάλυσης, αυξημένη ειδικότητα και μεγαλύτερη ευελιξία. Καθώς η έρευνα προχωρά στην ανακάλυψη νέων συνδυασμών και υβριδικών υλικών, οι μελλοντικοί βιοαισθητήρες αναμένεται να διαθέτουν ακόμη μεγαλύτερη

λειτουργικότητα, προσαρμοστικότητα και ετοιμότητα για εφαρμογές πεδίου, ανοίγοντας το δρόμο για αποτελεσματικά συστήματα παρακολούθησης της ασφάλειας των τροφίμων σε πραγματικό χρόνο. (Yin et al.,2023).

5.3 Συνδυασμός με προηγμένες τεχνολογίες

Η ενσωμάτωση υφιστάμενων και αναδυόμενων ψηφιακών, μικροκατασκευαστικών και αναλυτικών προσεγγίσεων είναι επιτακτικές. Επιτρέπουν να ξεπεραστούν τα λειτουργικά όρια του τι μπορούν να επιτύχουν οι βιοαισθητήρες, ενώ συλλέγουν τα πλεονεκτήματα της φορητότητας και της πολυπλεξίας, όπως και της εύκολης πρόσβασης και χρήσης, λογικών αποφάσεων σε πραγματικό χρόνο. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τρεις κρίσιμες τεχνολογικές προσεγγίσεις ενεργοποίησης που προωθούν την πρόοδο στη βιοανίχνευση. Αρχικά, εστιάζουμε στη μικρορευστοποίηση και τις συσκευές lab-on-a-chip, περιγράφοντας αναλυτικά πώς τέτοιες συμπαγείς και ολοκληρωμένες πλατφόρμες βελτιστοποιούν τον χειρισμό, την ανάλυση και τη λήψη αποφάσεων σχετικά με δείγματα, εξασφαλίζοντας αποτελεσματικότητα και ακρίβεια. Στη συνέχεια, εξετάζονται οι καινοτόμες προσεγγίσεις ανίχνευσης που αξιοποιούν τα smartphones και τις δυνατότητες του Διαδικτύου των Πραγμάτων (IoT), τονίζοντας πώς αυτές οι τεχνολογίες διευρύνουν την εμβέλεια των διαγνωστικών, επιτρέπουν τη συλλογή δεδομένων σε πραγματικό χρόνο και προάγουν την απομακρυσμένη παρακολούθηση. Κάθε μια από αυτές τις ενεργοποιητές συμβάλλει στην ανάπτυξη πλατφορμών βιοαισθητήρων επόμενης γενιάς, και εξηγείται πώς μπορούν να γεφυρωθούν τα υπάρχοντα κενά στην ευαισθησία, την ειδικότητα και τη χρηστικότητα, προωθώντας την υιοθέτηση έξυπνων, αποκεντρωμένων και προγνωστικών διαγνωστικών λύσεων για την ασφάλεια των τροφίμων. (Assudani et al.,2026).

5.3.1 Μικρορευστά και συσκευές εργαστηρίου σε τσιπ για την ασφάλεια των τροφίμων.

Η σύζευξη της μικρορευστοποίησης και της τεχνολογίας lab-on-a-chip αποτελεί μια καινοτόμο προσέγγιση στη βακτηριακή βιοανίχνευση, ειδικά για εφαρμογές στην

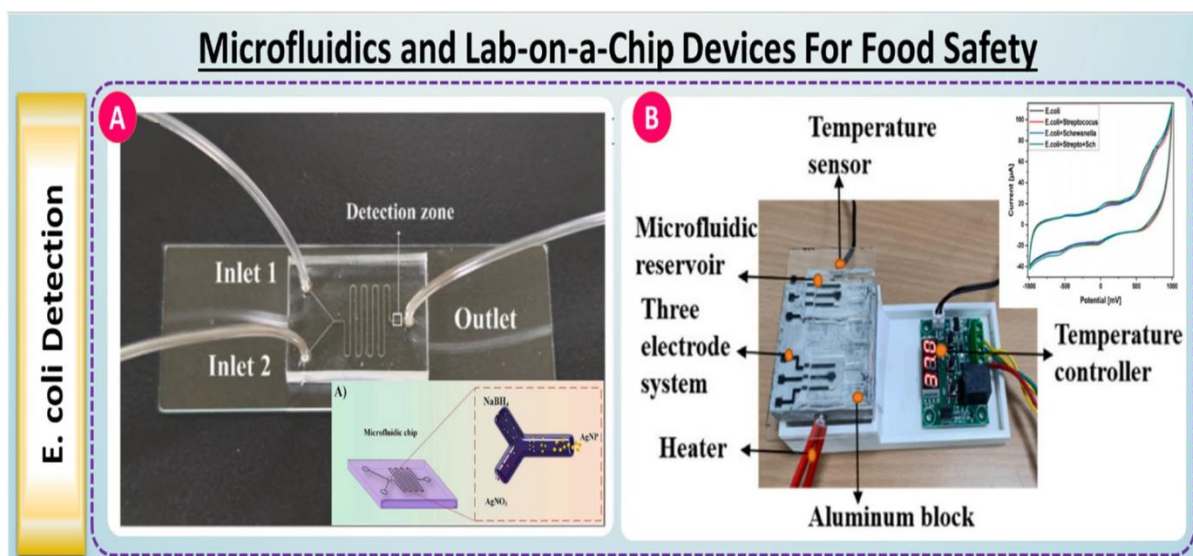
ασφάλεια των τροφίμων, προσφέροντας συμπαγή, αυτόνομη και γρήγορη διάγνωση. Σε αυτήν την τεχνολογία, η διαχείριση υγρών γίνεται σε κλίμακα μικρολίτρων έως νανολίτρων, γεγονός που μπορεί να μειώσει σημαντικά την κατανάλωση αντιδραστηρίων και να επιταχύνει τον χρόνο ανίχνευσης, αυξάνοντας παράλληλα την ευαισθησία της ανάλυσης. Τα συστήματα αυτά μπορούν να εκτελέσουν πολλαπλές λειτουργίες (όπως φιλτράρισμα, εμπλουτισμό, ανάμειξη, αντίδραση και ανίχνευση) όλα σε ένα μοναδικό τσιπ, μειώνοντας τις πιθανότητες μόλυνσης και ανθρώπινου λάθους. Η ανάγκη για sample-in-answer-out λειτουργικότητα, που αποδίδει αποτελέσματα γρήγορα και αξιόπιστα ακόμη και σε περιβάλλοντα χαμηλών πόρων ή αποσύνδεσης, είναι ζωτικής σημασίας για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων όπως το *E. coli*, η σαλμονέλα και η *Listeria monocytogenes*. Αυτή η μετατόπιση από τις κεντρικές εργαστηριακές αναλύσεις σε φορητές, επιτόπιες διαγνωστικές λύσεις σε πραγματικό χρόνο συμφωνεί με τις απαιτήσεις των παγκόσμιων πλαισίων για την ασφάλεια των τροφίμων, που θέλουν γρήγορες, ευαίσθητες και εύχρηστες μεθόδους (Lonchamps et al., 2022).

Για την αντιμετώπιση των προκλήσεων αυτών, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι καινοτόμοι μικρορευστοί βιοαισθητήρες για την ανίχνευση βακτηρίων σε διαφορετικές μήτρες τροφίμων. Όπως, μια πλατφόρμα microfluidic-SERS για την ανίχνευση *E. coli*, που αναπτύχθηκε από τους Heera Jayan et al., επιδεικνύει την επιτόπια σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου μέσω ενός σερπεντινικού διαύλου διασταύρωσης Y, όπως φαίνεται στην εικ. 20Α. Με στόχευση μέσω σύνθεσης νανοσωματιδίων καθοδηγούμενη από απταμερές, ο βιοαισθητήρας κατάφερε να ανιχνεύσει όρια μέχρι 1,1 CFU/mL και επέδειξε καλή απόδοση σε δείγματα μαρουλιού, αποτελώντας μια από τις πιο σημαντικές προόδους στη βακτηριακή βιοανίχνευση με βάση το Raman. Τέτοιες υψηλής ευαισθησίας αρχιτεκτονικές μικρορευστών-SERS μπορούν να μεταφραστούν σε κλινικές εφαρμογές, όπου η ανίχνευση χαμηλών βακτηριακών φορτίων σε βιολογικά υγρά είναι ζωτικής σημασίας για την έγκαιρη διάγνωση και τον έλεγχο λοιμώξεων (Jayan et al., 2025).

Επίσης, σε μια άλλη παρουσίαση, ένα μικρορευστό ηλεκτροχημικό τσιπ ενισχυμένο με γραφίτη-πορώδη ηλεκτρόδια άνθρακα, που επέτρεψε την καλλιέργεια σε πραγματικό χρόνο χωρίς θερμοκοιτίδα και την ηλεκτροχημική παρακολούθηση της ανάπτυξης του *E. Coli* όπως εμφανίζεται στην εικ. 20Β. Το σύστημα πέτυχε εξαιρετικό όριο ανίχνευσης (LOD) 0,35 CFU/mL και επικυρώθηκε επιτυχώς σε χυμό μάνγκο. Μαζί με αυτά, οι Puju και Bala ανέπτυξαν και περιέγραψαν πλατφόρμες μικρορευστοποίησης που

ενσωματώνουν τεχνολογίες SPR, SERS και πλευρικής ροής, προσφέροντας φορητές διαγνωστικές λύσεις για τρόφιμα στο σημείο φροντίδας, δείχνοντας τη μεγάλη ευελιξία και προσαρμοστικότητα της μικρορευστοποίησης σε εφαρμογές χαμηλών πόρων και πεδίου (Puii & Bala.,2020).

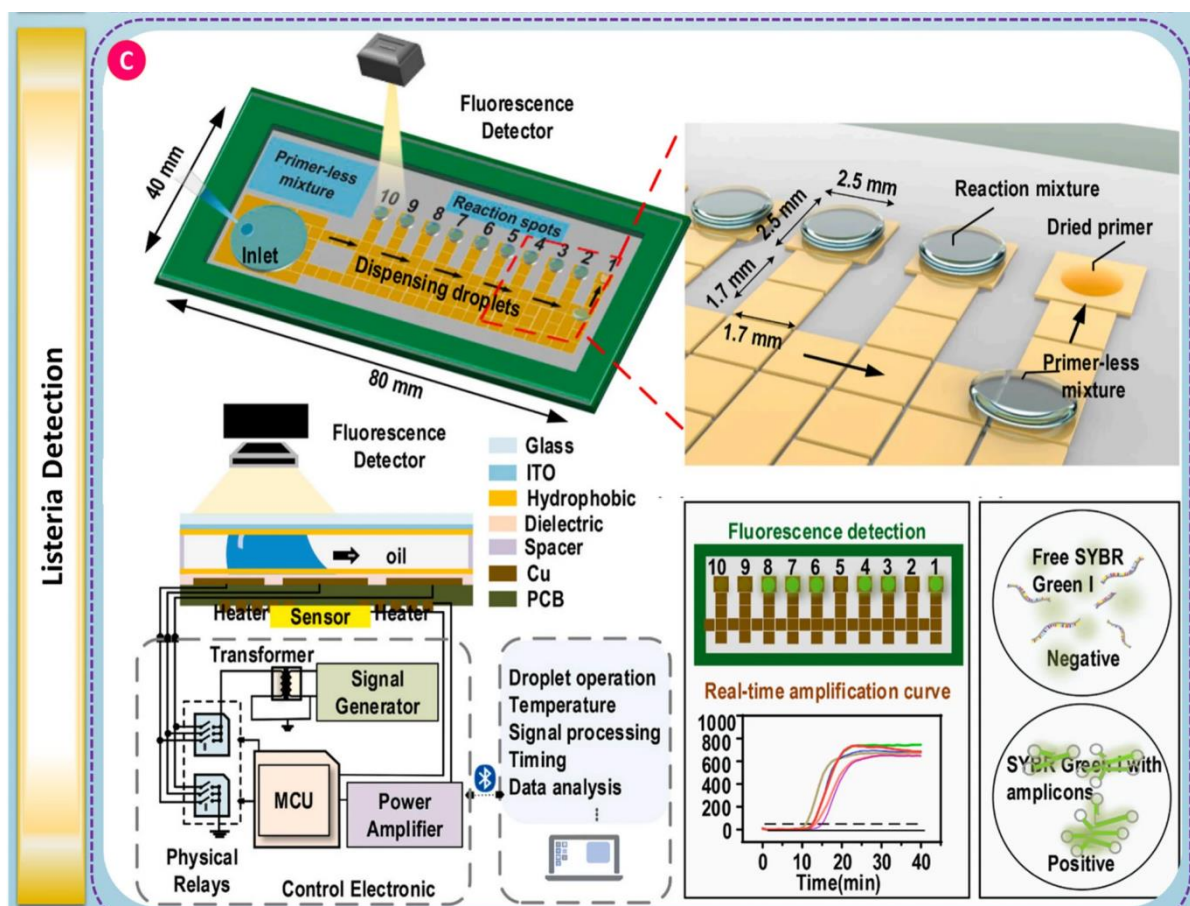
Εικόνα 20 A,B: (A)Μικρορευστικό τσιπ σχεδιασμένο με διπλές εισόδους και ενσωματωμένη ζώνη ανίχνευσης, επιτρέπει τον ακριβή χειρισμό δειγμάτων για αποτελεσματική ανίχνευση *E. coli*(Jayan et al.,2025).(B): Ένα ηλεκτροχημικό σύστημα με ρύθμιση τριών ηλεκτροδίων και έλεγχο θερμοκρασίας διευκολύνει την ευαίσθητη ανίχνευση *E. coli* υπό ρυθμιζόμενες θερμικές συνθήκες, (Fande et al.,2023).



Σε ένα πείραμα παρουσιάστηκε ένα χρωματομετρικό μπαρ-χαρτιού (μPAD) για την παρακολούθηση της επιφανειακής μόλυνσης και την ανίχνευση της *Listeria*. Επιτεύχθηκε ευαίσθητη ανίχνευση 10^2 CFU/κουπόνι *L. monocytogenes* μετά τον εμπλουτισμό, με έμφαση στις επιφάνειες επαφής με τρόφιμα από ανοξείδωτο ατσάλι και πλαστικό. Ταυτόχρονα, ένα ψηφιακό μικρορευστό τσιπ που περιελάμβανε ενσωμάτωση ισοθερμικής ενίσχυσης με βρόχο μεσολάβησης για την πολυπλεξική ανίχνευση *Listeria*, *E. coli* και *Salmonella* εισήχθη από το , όπως φαίνεται στην εικόνα 21. Αυτό το τσιπ επεξεργάστηκε

ταυτόχρονα 10 διαφορετικούς στόχους με όριο ανίχνευσης (LOD) 10^2 CFU/mL και ολοκλήρωσε την ανάλυση σε λιγότερα από 50 λεπτά. (Xie et al.,2022).

Εικόνα 21: Ψηφιακή μικρορευστική συσκευή για ανίχνευση *Listeria* με βάση σταγονίδια, χρησιμοποιεί ισοθερμική ενίσχυση και ανάγνωση φθορισμού για ταχεία ανάλυση(Xie et al.,2022).

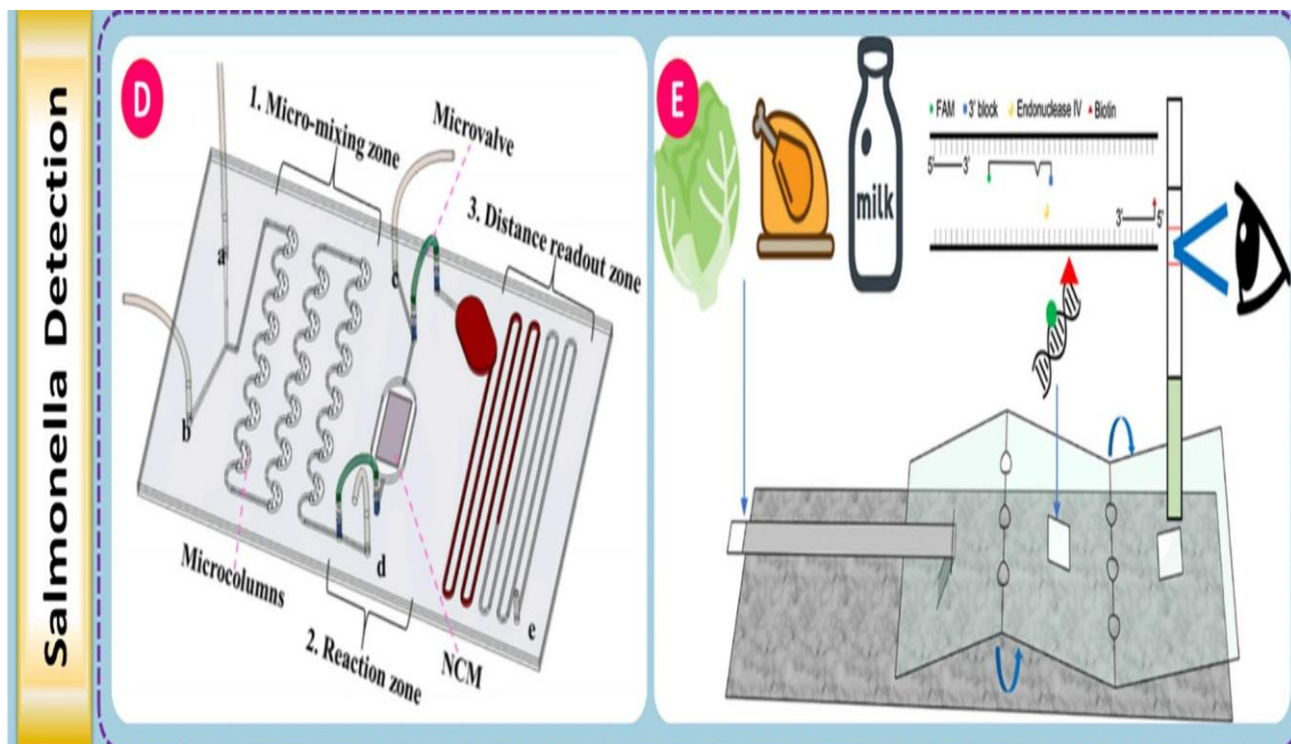


Οι (Man et al.,2023) προτείνουν ένα μικρορευστό αισθητήριο βασισμένο στην απόσταση aptasensor, το οποίο παρέχει οπτική ανάγνωση χωρίς την ανάγκη παροχής ηλεκτρικής ισχύος, φτάνοντας σε όριο ανίχνευσης (LOD) $3,7 \times 10^1$ CFU/mL μέσω μετατόπισης νανοσωματιδίων χρυσού με ενδιάμεση αέρια μεταφορά όπως φαίνεται στην εικόνα 22D. Επίσης, αναφέρθηκε ένα υψηλής απόδοσης μικρορευστό τσιπ, το οποίο βασίζεται σε ενίσχυση με χρήση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης για την ανίχνευση οροομάδων σαλμονέλας, επιτρέποντας την ταυτοποίηση πέντε κλινικά σημαντικών οροομάδων με

LOD 10^1 CFU/mL σε μόλις 15-40 λεπτά. Αν και κυρίως έχουν χρησιμοποιηθεί σε μήτρες τροφίμων, αυτά τα συστήματα αντικατοπτρίζουν μικρορρευτικές πλατφόρμες με βάση νουκλεϊκά οξέα, που βρίσκουν εφαρμογή στην κλινική μικροβιολογία, ενισχύοντας τη δυνατότητά τους για γρήγορους ελέγχους λοιμώξεων και επιτήρηση της δημόσιας υγείας. (Assudani et al., 2026)

.Οι Chen et al. περιέγραψαν ένα μικρορρευστό τσιπ από πολυαιθεροσουλφόνη, σχεδιασμένο με τεχνική origami, το οποίο ενσωματώνει στάδιο εξαγωγής DNA μέσω χαρτιού, ενίσχυση RPA και ανάγνωση μέσω πλευρικής ροής, επιτυγχάνοντας πλήρη ενσωμάτωση ανίχνευσης *Salmonella enterica* από δείγμα σε γάλα και μαρούλι, με LOD < 10 CFU/g. Αυτό το σύστημα πληροί πολλά από τα κριτήρια ASSURED, όπως προσιτότητα, ευαισθησία, εξειδίκευση, φιλικότητα προς το χρήστη, ταχύτητα, χωρίς ανάγκη για εξοπλισμό και δυνατότητα παράδοσης. Έτσι, αποτελεί όχι μόνο ένα εργαλείο για την ασφάλεια τροφίμων, αλλά και μια δυναμική διαγνωστική πλατφόρμα σημείου φροντίδας για εφαρμογές υγείας σε περιοχές χαμηλού πόρου, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 22E (Chen et al., 2023).

Εικόνα 22D,E: (D) Μια μικρορευστική πλατφόρμα με ζώνες ανάμειξης, αντίδρασης και ανάγνωσης υποστηρίζει ολοκληρωμένη επεξεργασία και ανίχνευση σαλμονέλα. (Man et al.,2023). (E) Η δοκιμασία πλευρικής ροής με βάση νουκλεϊκό οξύ για την ταυτοποίηση της σαλμονέλας παρέχει οπτική έξοδο μέσω ανίχνευσης ανιχνευτή με σήμανση φθορισμού(Chen et al., 2023).



Όλες οι αναφερόμενες μελέτες αποκαλύπτουν ότι οι βιοαισθητήρες μικρορευστοποίησης και εργαστηρίου σε τσιπ, που έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών, είναι ζωτικής σημασίας για την υγειονομική περίθαλψη. Πράγματι, η φορητότητα, η ταχύτητα ανίχνευσης, η δυνατότητα πολλαπλής ανίχνευσης, η συμβατότητα με ισοθερμική ενίσχυση και η εύκολη ανάγνωση μέσω smartphone καθιστούν αυτές τις πλατφόρμες κατάλληλες για διαγνωστικά σε σημεία φροντίδας, έρευνα επιδημιών και παρακολούθηση της δημόσιας υγείας. Η δυνατότητα έγκαιρης ανίχνευσης παθογόνων βακτηρίων πριν από την ευρεία έκθεση ή την κλινική εμφάνιση παρέχει στις πλατφόρμες μικρορευστοποίησης έναν κρίσιμο ρόλο: τόσο στην ενίσχυση της ασφάλειας των τροφίμων όσο και στην υποστήριξη της προληπτικής ιατρικής και του ελέγχου των μολυσματικών ασθενειών.(Assudani et al.,2026).

5.4 Smartphone και IoT για την ασφάλεια των τροφίμων

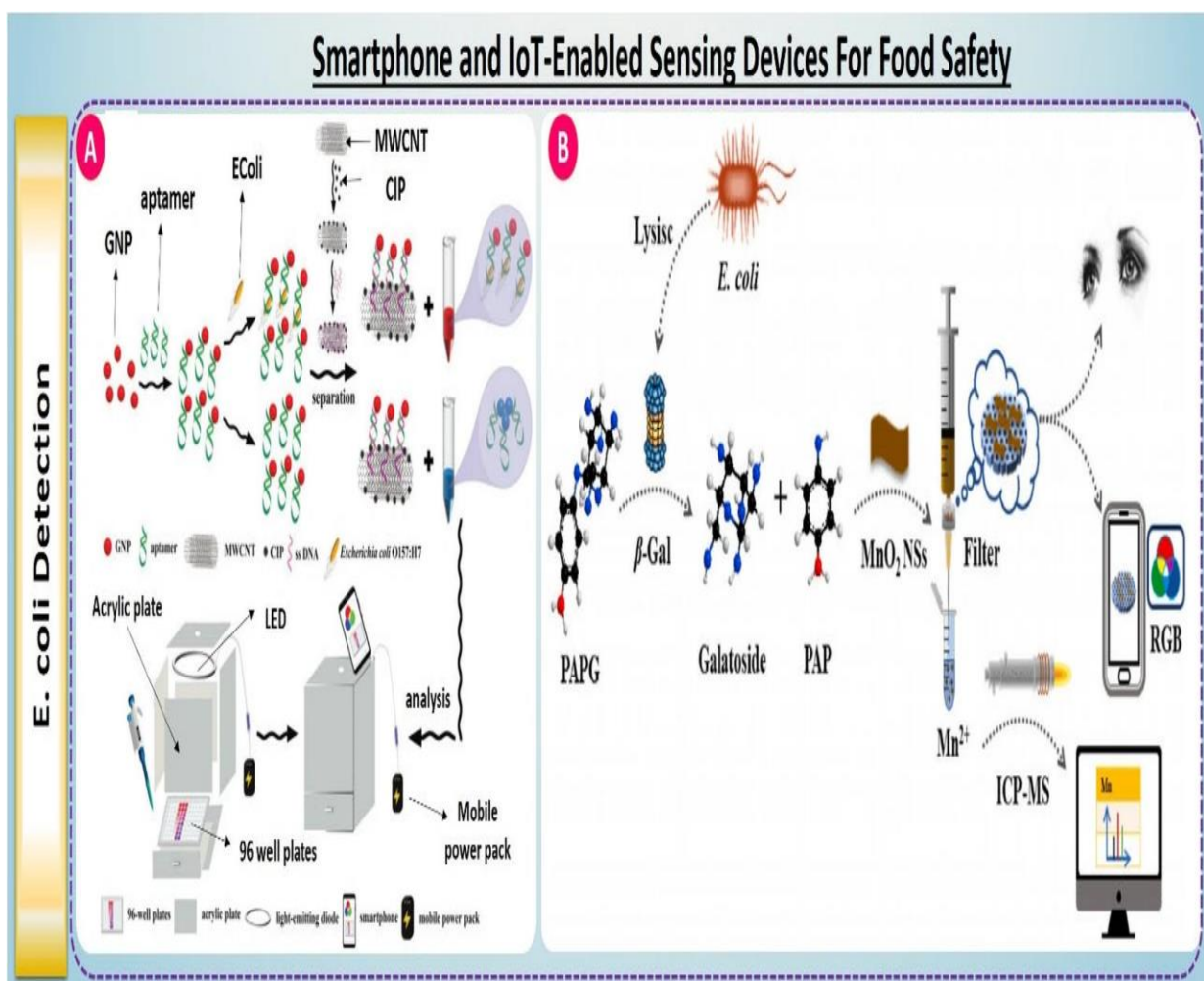
Με τις ενσωματωμένες κάμερες, επεξεργαστές, δυνατότητες συνδεσιμότητας και εύκολη χρήση, τα smartphones γίνονται ολοένα και πιο σημαντικά ως πλατφόρμες βιοαισθητήρων για την επιτόπια παρακολούθηση της ασφάλειας των τροφίμων. Οι παραδοσιακές ανοσοδοκιμασίες μπορούν πλέον να μετατραπούν σε φορητές, οικονομικές διαγνωστικές δοκιμές σε πραγματικό χρόνο, κατάλληλες για βιομηχανική χρήση ακόμη και σε απομακρυσμένες περιοχές. Σε συνδυασμό με υπηρεσίες cloud ανάλυσης δεδομένων, αλγόριθμους μηχανικής μάθησης και τεχνολογίες Bluetooth ή εφαρμογές, τα smartphones μπορούν να διευκολύνουν την άμεση ποσοτικοποίηση, την απομακρυσμένη πρόσβαση και την ανταλλαγή δεδομένων μεταξύ των ενδιαφερομένων φορέων στην αλυσίδα ασφάλειας τροφίμων. Οι βιοαισθητήρες, σε συνδυασμό με την αρχιτεκτονική του Διαδικτύου των Πραγμάτων (IoT), επεκτείνουν τις δυνατότητές τους από την απλή ανίχνευση σε προγνωστική ανάλυση, ιχνηλασιμότητα βασισμένη σε blockchain και συστήματα έγκαιρης προειδοποίησης καθ' όλη την αλυσίδα διακίνησης, από το αγρόκτημα μέχρι το πιάτο. (Assudani et al., 2026).

Οι Yang et al., (2021) πρότειναν ένα καινοτόμο χρωματομετρικό aptasensor βασισμένο σε smartphone για τον προσδιορισμό του *Escherichia coli*, το οποίο χρησιμοποιεί μικτά λειτουργικά νανοσωματίδια χρυσού σε συνδυασμό με μαγνητισμένους νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (Εικ. 23Α). Οι ερευνητές κατάφεραν να ανιχνεύσουν το *E. coli* με όριο ανίχνευσης 524 CFU/mL μέσα σε λιγότερο από 1 ώρα σε δείγματα γάλακτος, διευκολύνοντας τόσο τον διαχωρισμό όσο και την οπτική καταγραφή του σήματος μέσω μιας εξατομικευμένης φορητής συσκευής. Εκτός από την ασφάλεια των τροφίμων, αυτή η πλατφόρμα έχει σημαντικές εφαρμογές στην υγειονομική περίθαλψη ως πρότυπο διαγνωστικό σημείο, επιτρέποντας την άμεση ανίχνευση βακτηριακών μολύνσεων σε νερό και βιολογικά υγρά. Αυτή η προσέγγιση συμβάλλει στην έγκαιρη αξιολόγηση κινδύνων μόλυνσης και στην αποτελεσματική πρόληψη ασθενειών (Yang et al., 2021).

Βασισμένοι σε αυτή την πλατφόρμα οι Yu et al., (2023) εισήγαγαν επιπλέον έναν βιοαισθητήρα, διπλής λειτουργίας σύστημα, που συνδυάζει χρωματομετρία, αναγνώσιμη από smartphone, και ανίχνευση με ICP-MS, αξιοποιώντας τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης για τη μετατροπή νανοφύλλων MnO_2 σε ιόντα Mn^{2+} . Διαθέτει όριο

ανίχνευσης (LOD) $5,6 \times 10^3$ CFU/mL για τη χρωματομετρία και 35 CFU/mL για το ICP-MS, με χρόνο ανίχνευσης κάτω από 1 ώρα σε διαφορετικούς τύπους δειγμάτων, όπως παρουσιάζεται στην εικ 23 (B). Όσον αφορά την ενοποίηση πεδίου, και τα δύο συστήματα επέδειξαν αποτελεσματική λήψη σήματος μέσω καμερών κινητών τηλεφώνων, δυνατότητα λήψης αποφάσεων σε πραγματικό χρόνο και συμβατότητα με οπτικά αδιαφανείς μήτρες τροφίμων. (Yu et al., (2023).

Εικόνα 23 : (A):Απταμερής-μαγνητικός νανοςύνθετος αισθητήρας με δυνατότητα *smartphone* για ανίχνευση *E. coli* O157:H7, (B) Χρωματομετρική ανίχνευση *E. coli* με βάση τη β-γαλακτοσιδάση με χρήση *smartphone* RGB και ICP-MS, (Assudani et al.,2026).

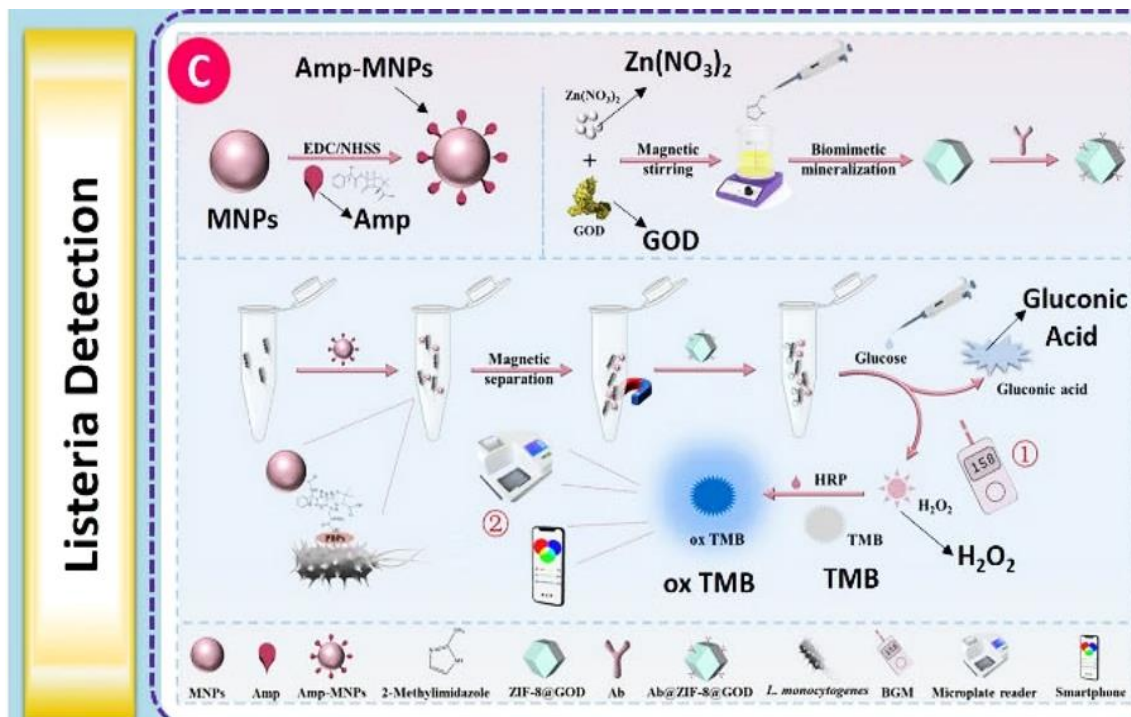


Σε μια άλλη μελέτη προωθήθηκε το πεδίο με έναν μικρορευστικό ανιχνευτή *smartphone* βασισμένο σε FRET, ο οποίος είναι ικανός να ανιχνεύει ταυτόχρονα το ssDNA τεσσάρων

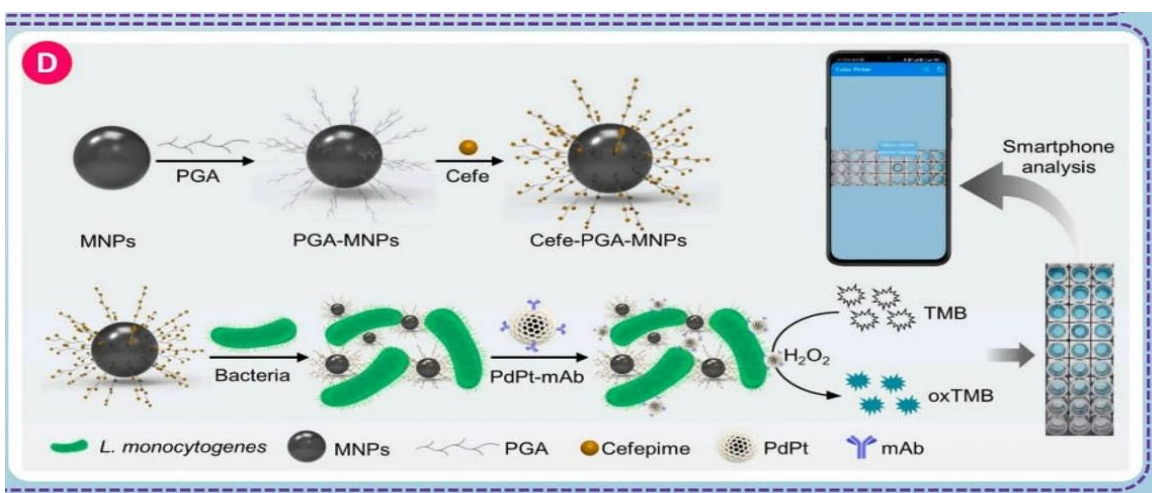
τροφογενών παθογόνων, συμπεριλαμβανομένου του *E. coli*. Το σύστημα επιτυγχάνει πολλαπλά επίπεδα ανίχνευσης (LOD) έως και 0,17 nM σε λιγότερο από 5 λεπτά. Επιπλέον, υποστηρίζει ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο χωρίς την ανάγκη πλυσίματος, προσφέροντας μια λύση υψηλής απόδοσης IoT για διαγνωστικά ασφάλειας τροφίμων. Αυτές οι εξαιρετικά γρήγορες, πολυπλεξίες ανάγνωσης μέσω smartphone μπορούν να αξιοποιηθούν για επείγουσα και επιτόπια διαλογή λοιμώδων γαστρεντερίτιδων, μειώνοντας τους χρόνους καθυστέρησης στην απομόνωση και τη στοχευμένη θεραπεία. (Assudani et al.,2026).

Για τη *Listeria monocytogenes*, παρουσιάστηκε ένας βιοαισθητήρας διπλής λειτουργίας που συνδυάζει χρωματομετρία μέσω smartphone και ένδειξη οξειδάσης γλυκόζης βασισμένη σε γλυκόμετρο, με ευαισθησία 10^1 CFU/mL τόσο στο νερό όσο και στον χυμό της λίμνης, όπως φαίνεται στην εικ 24. Η επαναχρησιμοποίηση της υποδομής του γλυκόμετρου, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην υγειονομική περίθαλψη για την παρακολούθηση της γλυκόζης, αναδεικνύει τις μεταφραστικές δυνατότητες αυτής της προσέγγισης για τη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών σε περιβάλλοντα χαμηλών πόρων (Bai et al.,2023). Επίσης σε άλλη μελέτη, σχεδιάστηκε μια χρωματομετρική δοκιμασία smartphone με βάση μαγνητικά νανοένζυμα (Εικ. 25) ικανό να συλλάβει πάνω από το 90% των κυττάρων *Listeria* σε πραγματικά δείγματα και να ανιχνεύσει έως και 31 CFU/mL. Τέλος, οι Liu et al. χρησιμοποίησε χρώση SYTO9 με απεικόνιση smartphone και ενίσχυση LAMP, επιτυγχάνοντας ανίχνευση *Listeria* στα 6 αντίγραφα/μL μέσω ανάλυσης φθορισμού βάσει εικόνας. (Liu et al.,2022).

Εικόνα 24 : Ενσωματωμένη σε smartphone δοκιμασία ανοσομαγνητικού φθορισμού για την
ανίχνευση *Listeria monocytogenes* (Bai et al., 2023)



Εικόνα 25: Μαγνητικός νανοανιχνευτής και δοκιμασία smartphone με βάση TMB για
ανίχνευση *Listeria* (Xiao et al., 2023).



Για την ανίχνευση σαλμονέλας, οι Mahari et al. ανέπτυξαν μια ανοσοχρωματογραφική ανάλυση ενσωματωμένη στην εφαρμογή smartphone ColorGrab, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση σε δείγματα κοπράνων και τροφίμων με όριο ανίχνευσης (LOD) 10^3 - 10^4 CFU/mL σε διαφορετικά στελέχη σαλμονέλας μέσα σε 10 λεπτά. Η διαμόρφωση αυτή παρουσίασε εξαιρετική χρηστικότητα όταν διατηρούνταν αποθηκευμένη σε κρύο ή σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ η ανάπτυξη πεδίου διευκολύνθηκε περαιτέρω μέσω της χρήσης χρωματικής ερμηνείας με τη βοήθεια του smartphone. Ο γρήγορος χρόνος απόκρισης και η ευκολία στη χρήση καθιστούν την πλατφόρμα κατάλληλη τόσο για επιθεωρήσεις ασφάλειας τροφίμων όσο και για έλεγχο υγειονομικής περίθαλψης σε επίπεδο κοινότητας. (Mahari et al.,2023).

Επίσης, πρότάθηκε ένας αισθητήρας φθορισμού που βασίζεται σε smartphone και χρησιμοποιεί μαγνητικά COF-AuNPs για στόχευση απταμερούς, επιτυγχάνοντας ευαισθησία 4 CFU/mL για το *S. typhimurium* σε 33 λεπτά (Wei et al.,2023) Η απεικόνιση μέσω smartphone επέτρεψε την πραγματική ανάγνωση της απόσβεσης φθορισμού, συνδυάζοντας την εργαστηριακή ευαισθησία με τη φορητότητα των συστημάτων. Σύμφωνα με άλλη πρόταση σε μια δοκιμασία πλευρικής ροής που ερμηνεύεται μέσω smartphone, αξιοποιώντας αλγόριθμους μηχανικής μάθησης (ML) και βελτιώνοντας την ακρίβεια ταξινόμησης από ασαφείς γραμμές δοκιμής μέσω ταξινομητών SVM και KNN κατά 95,6%, ενώ παράλληλα μείωσε τα σφάλματα οπτικής επιθεώρησης στις συγκεντρώσεις των κυττάρων. Αυτή η προσέγγιση αντιμετωπίζει ένα από τα βασικά μειονεκτήματα της οπτικής διάγνωσης, που είναι η υποκειμενική ερμηνεία. Επιπλέον, αντικατοπτρίζει τις τάσεις των διαγνωστικών συστημάτων υγειονομικής περίθαλψης, όπου η υποστήριξη αποφάσεων με τη βοήθεια αλγορίθμων γίνεται ολοένα και πιο σημαντική για τη μείωση της μεροληψίας του χειριστή και την αύξηση της αξιοπιστίας των διαγνώσεων. (Min et al.,2021).

Τα smartphones και οι πλατφόρμες βιοαισθητήρων με δυνατότητα IoT συγκλίνουν σε ένα κεντρικό σημείο, επιτρέποντας την αποτελεσματική παρακολούθηση της ασφάλειας των τροφίμων. Με την φορητότητα, τη διασύνδεση, τον ταχύ χρόνο απόκρισης και την ικανότητα ενσωμάτωσης αναλυτικών δεδομένων που βασίζονται σε τεχνητή νοημοσύνη, αυτές οι πλατφόρμες ανίχνευσης είναι ιδανικές τόσο για δοκιμές στο πεδίο και για επιτήρηση της δημόσιας υγείας όσο και για την πρόληψη εστιών. Δεν είναι μόνο ότι ενισχύουν την ασφάλεια των αλυσίδων εφοδιασμού τροφίμων, αλλά συμβάλλουν και

στην προληπτική δημόσια υγεία και τον έλεγχο των μολυσματικών νοσημάτων, μέσω της έγκαιρης ανίχνευσης παθογόνων στη διασύνδεση μεταξύ συστημάτων τροφίμων και ανθρώπινης έκθεσης. (Assudani et al., 2026).

5.5 Επεκτασιμότητα, κόστος και φιλικότητα προς τον χρήστη

Παρά τα σημαντικά βήματα που έχουν γίνει στην αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας των βιοαισθητήρων, τα ζητήματα που σχετίζονται με τη μεταφορά αυτών από το εργαστήριο σε πραγματικές βιομηχανικές εφαρμογές παραμένουν εμπόδιο. Γενικά, οι βιοαισθητήρες καλούνται να αντιμετωπίσουν προκλήσεις σχετικά με την επεκτασιμότητα της κατασκευής, το κόστος παραγωγής και την ευκολία χρήσης από μη ειδικούς. Οι περισσότεροι υψηλής απόδοσης βιοαισθητήρες ενσωματώνουν υλικά όπως νανοσωματίδια χρυσού, κβαντικές κουκκίδες, γραφένιο και πολύπλοκες χημικές επιφάνειες, καθώς και βιολογικές δομές που καθιστούν δύσκολη την μαζική, στιβαρή και αναπαραγωγίμη κατασκευή. Επιπλέον, τεχνικές κατασκευής όπως η φωτολιθογραφία, η εναπόθεση μέσω δέσμης ηλεκτρονίων ή η μικρορευστική ολοκλήρωση απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό, υποδομές καθαρού δωματίου και ειδικευμένο προσωπικό, γεγονός που αυξάνει το κόστος και επιβραδύνει την εμπορική τους διάδοση. Το οικονομικό κόστος ανά μονάδα βιοαισθητήρα παραμένει χαμηλό, καθιστώντας δύσκολη την ευρεία εφαρμογή σε απλές δοκιμές τροφίμων, ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα χαμηλών πόρων ή σε αποκεντρωμένες εγκαταστάσεις, όπως αγροκτήματα, σφαγεία ή τοπικές μονάδες επεξεργασίας τροφίμων. (Assudani et al., 2026).

5.6 Εμπόδια και θέματα τυποποίησης

Ο ρυθμιστικός χώρος και το πλαίσιο προτύπων για τους βιοαισθητήρες στην ασφάλεια των τροφίμων παραμένουν αναπτυσσόμενα και αποσπασματικά, γεγονός που δυσχεραίνει την αποτελεσματική εφαρμογή τους σε πραγματικές συνθήκες. Παρόλο που οι βιοαισθητήρες έχουν αποδείξει εξαιρετικές αναλυτικές δυνατότητες σε εργαστηριακό επίπεδο, η μετάβαση από το εργαστήριο στην πρακτική εφαρμογή αντιμετωπίζει σοβαρές προκλήσεις. Αυτές σχετίζονται με την έλλειψη ενιαίων και αποδεκτών κατευθυντήριων

γραμμών για την επικύρωση της απόδοσής τους σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων, τροφίμων και περιβαλλοντικών συνθηκών. Επιπλέον, οι ρυθμιστικές αρχές όπως ο FDA των ΗΠΑ, η EFSA και ο Codex Alimentarius απαιτούν αυστηρές δοκιμές επικύρωσης, συμπεριλαμβανομένων δοκιμών αναπαραγωγιμότητας σύμφωνα με πρότυπα όπως το ISO 16140, καθώς και συγκρίσεις με τις παραδοσιακές μεθόδους βασισμένες σε καλλιέργειες χρυσού προτύπου. Αυτές οι διαδικασίες είναι συχνά χρονοβόρες, δαπανηρές και τεχνικά απαιτητικές, καθιστώντας δύσκολη την ευρεία υιοθέτησή τους από ακαδημαϊκά εργαστήρια και μικρής κλίμακας προγραμματιστές. Μια άλλη σημαντική πλευρά αναφέρεται στην πιθανότητα οι έξοδοι του βιοαισθητήρα να μην συνάδουν πλέον με τα ρυθμιστικά όρια και τη λήψη αποφάσεων βάσει ορίου. Ενώ η παραδοσιακή ανάλυση οδηγεί σε CFU ή τιμές κατωφλίου κύκλου PCR, οι έξοδοι βιοαισθητήρων είναι συνήθως σε σχετικές μονάδες (ρεύμα, ένταση φθορισμού, λόγοι απορρόφησης κ.λπ.). Αυτά δεν ταυτίζονται πολύ εύκολα μεταξύ τους, καθιστώντας τη ρυθμιστική συγκριτική αξιολόγηση δύσκολη. (Balakrishnan et al., 2025).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.

Μέθοδοι Μείωσης της Μικροβιακής Μόλυνσης των Τροφίμων

Η διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων για τους καταναλωτές αποτελεί μια από τις βασικές προτεραιότητες τόσο της Ευρωπαϊκής Ένωσης όσο και άλλων χωρών σε παγκόσμιο επίπεδο. Αυτό επιτυγχάνεται εν μέρει μέσω της παραγωγής τροφίμων από υλικά με χαμηλό επίπεδο μικροβίων, τα οποία δεν είναι παθογόνα ή δυνητικά παθογόνα για τον άνθρωπο. Ένας ακόμα σημαντικός και εξίσου κρίσιμος στόχος είναι η διατήρηση της ασφάλειας των τροφίμων και ο ποιοτικός έλεγχος, μέσω της αδρανοποίησης παθογόνων μικροοργανισμών και μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση. Για την παραγωγή ασφαλών τροφίμων, αναπτύσσονται πολλά προγράμματα που στοχεύουν στην καταπολέμηση των παθογόνων βακτηρίων στην αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων, με έμφαση στο στάδιο της πρωτογενούς παραγωγής. Σύμφωνα με αυτή τη στρατηγική, η παρουσία σαλμονέλας σε κοπάδια πουλερικών, όπως τα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής (*Gallus gallus*), πρέπει να περιορίζεται. Σύμφωνα με τη νομοθεσία της ΕΕ, το ποσοστό πτηνών που φέρουν σαλμονέλα από τις συγκεκριμένες οροομάδες (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, συμπεριλαμβανομένων των μονοφασικών στελεχών, *S. infantis*, *S. virchow* και *S. hadar*) δεν μπορεί να υπερβαίνει το 1% σε κάθε σμήνος (Κανονισμός 2160/2003). Αντίστοιχα, για τις γαλοπούλες κρέατος, το ποσοστό μολυσμένων πτηνών με *S. typhimurium* και/ή *S. enteritidis* δεν πρέπει να ξεπερνά το 1%. Τα προγράμματα ελέγχου περιλαμβάνουν λεπτομερείς διαδικασίες δειγματοληψίας και εργαστηριακής ανίχνευσης σαλμονέλας, καθώς και κανόνες βιοασφάλειας, όπως η αποχή από τη μεταφορά, την εξαγωγή ή την πώληση κρέατος, σφαγίων κοτόπουλων, ζωοτροφών, περιττωμάτων, απορριμμάτων και άλλων αντικειμένων που σχετίζονται με τα πουλερικά, ώστε να μειωθεί η διασπορά των παθογόνων. Για την προστασία των καταναλωτών, έχουν θεσπιστεί μικροβιολογικά κριτήρια για ορισμένα τρόφιμα και παθογόνα βακτήρια. Ένα από αυτά είναι το *L. monocytogenes*, για το οποίο έχουν οριστεί όρια είτε ποσοτικά (έως 100 cfu/g) είτε ποιοτικά (απουσία σε 25 g). Όσον αφορά τη σαλμονέλα, το επιτρεπτό επίπεδο είναι μηδέν, δηλαδή η παρουσία σαλμονέλας σε 25 g τροφίμου απαγορεύεται. Αυτές οι νομικές απαιτήσεις διασφαλίζουν ότι τα τρόφιμα που συμμορφώνονται με τα κριτήρια αυτά είναι ασφαλή για τους καταναλωτές. Η ανάπτυξη μεθόδων για τη μείωση της μικροβιολογικής μόλυνσης στα τρόφιμα αποτελεί βασικό πυλώνα για την εξασφάλιση

της ασφάλειας των προϊόντων προς όφελος των καταναλωτών. Διαφόρων ειδών φυσικές, χημικές και βιολογικές προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται για την αναστολή της ανάπτυξης βακτηρίων ή την πλήρη εξάλειψή τους από τα τρόφιμα. Στόχος είναι ο έλεγχος της ανάπτυξης βακτηρίων που προκαλούν αποσύνθεση των τροφίμων, καθώς και η καταπολέμηση παθογόνων και δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών που ενδέχεται να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία του καταναλωτή. (Urban-Chmiel et al.,2025).

6.1 Φυσικές μέθοδοι

Μια φυσική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των μικροβίων στα τρόφιμα είναι η *ιονίζουσα ακτινοβολία*. Έγινε αποδεκτή ως μέθοδος από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων και εγκρίθηκε ως μέθοδος επεξεργασίας τροφίμων στις ΗΠΑ το 1997. Ωστόσο αυτή η μέθοδος δεν επιφέρει πλήρως επιθυμητά αποτελέσματα διότι δεν εξαλείφει όλα τα βακτήρια. Επίσης, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα χαρακτηριστικά και την εμφάνιση ορισμένων τροφίμων, καθιστώντας αυτά λιγότερο επιθυμητά από τους καταναλωτές. Μια ακόμα συχνά χρησιμοποιούμενη φυσική μέθοδος για την εξασφάλιση ασφαλών τροφίμων είναι η *παστερίωση*, η οποία περιλαμβάνει θερμική επεξεργασία σε θερμοκρασίες από 65 έως 75 °C με σκοπό την αδρανοποίηση και μείωση του αριθμού των βακτηρίων. Η διαδικασία αυτή εφαρμόζεται κυρίως σε υγρά προϊόντα, όπως ο χυμός φρούτων, η μπύρα, το γάλα και τα αυγά. Μια παρόμοια μέθοδος που επίσης βασίζεται στη θερμική επεξεργασία είναι η *λεύκανση*, η οποία χρησιμοποιείται στην επεξεργασία φρούτων και λαχανικών. Κατά τη διάρκεια της λεύκανσης, τα προϊόντα θερμαίνονται προκειμένου να απενεργοποιηθούν τα ένζυμα που προκαλούν την αποσύνθεση των συστατικών των τροφίμων. Η *αποστείρωση*, από την άλλη πλευρά, είναι η διαδικασία αδρανοποίησης διαφόρων μορφών μικροοργανισμών (βλαστικών και σπορίων) σε θερμοκρασίες άνω των 100 °C. (Amit et al.,2017).

Τόσο η παστερίωση όσο και η επεξεργασία υψηλής πίεσης (αποστείρωση) δεν προτείνονται για τη συντήρηση φρέσκων προϊόντων ή προϊόντων κρέατος, καθώς μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τις οργανοληπτικές ιδιότητες και τη διατροφική αξία των τροφίμων. Η αποστείρωση σε υψηλή θερμοκρασία κυμαίνεται από 135 έως 140 βαθμούς ή και στους 150 βαθμούς, καταστρέφοντας όλους τους βιώσιμους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ζυμομυκήτων, των μούχλας, της βλαστικής μορφής βακτηρίων και των σποριοδών βακτηρίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα

την παρατεταμένη διάρκεια ζωής των τροφίμων και την υψηλότερη ασφάλειά τους για τους καταναλωτές. (Urban-Chmiel et al.,2025). Η κατάψυξη, που βασίζεται στη χαμηλή θερμοκρασία (-18 °C έως -30 °C), χρησιμοποιείται συχνά για τη διατήρηση τροφίμων, αλλά έχει μειονεκτήματα, όπως η υποβάθμιση της ποιότητας των τροπικών φρούτων και οργανοληπτικές αλλαγές λόγω κρυστάλλων υδατανθράκων. Αντίθετα, η ψύξη είναι πιο ασφαλής για ευαίσθητα προϊόντα, καθώς δεν αλλοιώνει σημαντικά τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες, αλλά δεν σκοτώνει τα βακτήρια, περιορίζοντας μόνο τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. (Urban-Chmiel et al.,2025).

Η χρήση της *υψηλής υδροστατικής πίεσης (HPP)* αποτελεί μέθοδο συντήρησης και αδρανοποίησης μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Το HPP μειώνει τον αριθμό των μικροβίων που προκαλούν αλλοίωση και παθογόνων, παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής και βελτιώνοντας την ασφάλεια των τροφίμων. Η επεξεργασία στα 600 MPa αποενεργοποιεί τις περισσότερες μορφές βακτηρίων και μυκητιακά σπόρια, αλλά όχι τα βακτηριακά σπόρια όπως του *Clostridium botulinum*. Η πίεση εφαρμόζεται συνήθως μεταξύ 250 και 700 MPa για λίγα δευτερόλεπτα έως 10 λεπτά, ανάλογα με το είδος του τροφίμου και τους μικροοργανισμούς. Το HPP προκαλεί αλλαγές στα κυτταρικά κύτταρα των μικροβίων, όπως αύξηση διαπερατότητας μεμβράνης και διαταραχές στις πρωτεΐνες, οδηγώντας στην αναστολή της δραστηριότητάς τους. Επιπλέον, το HPP μειώνει τις χημικές και ενζυματικές διεργασίες αλλοίωσης, ενισχύει το αντιοξειδωτικό σύστημα στα ζωικά προϊόντα και διατηρεί τα φυσικά συστατικά των τροφίμων. Ωστόσο, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά ορισμένες βιταμίνες, όπως το ασκορβικό οξύ στα φρέσκα φρούτα. Το HPP είναι αποτελεσματικό στην αποστείρωση, ειδικά σε υγρά και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, προσφέροντας πλεονεκτήματα χαμηλής θερμοκρασίας επεξεργασίας και διατήρησης των βιοδραστικών συστατικών (Wolbang et al.,2008).

Το παλμικό υπεριώδες φως (PUV) αποτελεί μια μη θερμική μέθοδο συντήρησης και απολύμανσης τροφίμων, νερού και αέρα, μέσω εκπομπής ευρυζωνικού UV-C φωτός (200–280 nm) με παλμούς υψηλής ενέργειας. Αυτή η τεχνική προκαλεί βακτηριακή αδρανοποίηση, κυρίως μέσω βλάβης στο DNA και διαρροής κυτταρικών περιεχομένων, με πιο ανθεκτικό το *L. monocytogenes* σε σύγκριση με άλλα βακτήρια όπως το *E. coli*. Η αποτελεσματικότητά της επηρεάζεται από παράγοντες όπως το είδος του τροφίμου, η απόσταση από την πηγή φωτός, η ενέργεια και η διάρκεια των παλμών, το επίπεδο μόλυνσης και η παρουσία οργανικών υλικών ή αλατότητας, τα οποία περιορίζουν τη διείσδυση και αποδοτικότητα της υπεριώδους ακτινοβολίας. Η υπεριώδης ακτινοβολία

έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στην παράταση της διάρκειας ζωής του υγρού ασπράδι αυγού και διαφόρων χυμών φρούτων, όπως μήλου, πορτοκαλιού, ανανά, σταφυλιού, κράνμπερι και ροδιού. Η εφαρμογή υπεριώδους ακτινοβολίας μειώνει τον αριθμό των βακτηρίων στα τρόφιμα και ταυτόχρονα αυξάνει την αντοχή των φρέσκων προϊόντων διατροφής, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, έναντι βακτηριακής μόλυνσης, ιδιαίτερα από παθογόνα όπως η σαλμονέλα, η λιστέρια, ο σταφυλόκοκκος, το κλωστρίδιο και το βάκιλλο, παρατείνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής τους .

Η αποτελεσματικότητα της υπεριώδους ακτινοβολίας στην συντήρηση και ασφάλεια των τροφίμων εξαρτάται από τον τύπο των μικροβίων που υπάρχουν στα προϊόντα. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόζονται διαφορετικές δόσεις και χρόνοι έκθεσης σε UV-C. Η συνιστώμενη δόση υπεριώδους ακτινοβολίας, η οποία χρησιμοποιείται για την αδρανοποίηση παθογόνων που επηρεάζουν την ασφάλεια και την αποθήκευση των τροφίμων, μετράται σε mJ/cm^2 και διαφέρει ανάλογα με το μικρόβιο: 1–10 mJ/cm^2 για βακτήρια, 2–8 mJ/cm^2 για ζύμες, 20–200 mJ/cm^2 για άλλους μύκητες, 100–150 mJ/cm^2 για πρωτόζωα και 300–400 mJ/cm^2 για φύκια. Επίσης, η υπεριώδης ακτινοβολία χρησιμοποιείται και για την απολύμανση συσκευασιών τροφίμων, τόσο φυτικής όσο και ζωικής προέλευσης, όπως χαρτοκιβώτια, κουτιά, μπουκάλια και δίσκους, συμβάλλοντας στην περαιτέρω διασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων (Pala,et al.,2011).

6.2 Χημικές μέθοδοι

Η χημική μέθοδος συντήρησης, περιλαμβάνει φυσικά και τεχνητά πρόσθετα. Τα φυσικά συντηρητικά, όπως αλάτι, ζάχαρη, ξύδι και εκχύλισμα δεντρολίβανου, χρησιμοποιούνται συχνότερα σε φρέσκα τρόφιμα, ενώ τα τεχνητά, όπως βενζοϊκό και σορβικό οξύ, νιτρικά άλατα και διοξείδιο του θείου, κυρίως σε επεξεργασμένα προϊόντα. Αν και αποτελούν αποτελεσματικά μέσα διατήρησης, μπορούν να προκαλέσουν αρνητικές επιδράσεις στην υγεία, όπως διαταραχές στη φυσική κατάσταση, προβλήματα ανάπτυξης και αυξημένο κίνδυνο για διάφορες ασθένειες, ιδίως σε ευαίσθητες ομάδες όπως οι έγκυοι. (Amit et al.,2017).

Για τον έλεγχο της μικροβιακής μόλυνσης σε φρούτα, λαχανικά και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, χρησιμοποιούνται ισχυρές ενώσεις χλωρίου ή οξέα, κυρίως

υπεροξικό οξύ . Ένας από τους αντιμικροβιακούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση των τροφίμων είναι το γαλακτικό οξύ, το οποίο παράγεται από βακτήρια γαλακτικού οξέος. Ο ρόλος του περιλαμβάνει τη ρύθμιση του pH του προϊόντος, γεγονός που αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων που προκαλούν μόλυνση των τροφίμων. Για τη διατήρηση του βοείου κρέατος, χοιρινού κρέατος, πουλερικών και ψαριών, χρησιμοποιείται το γαλακτικό νάτριο, το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων όπως *Clostridium* spp., *Yersinia* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus* και *E. coli*. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η ταυτόχρονη προσθήκη γαλακτικού νατρίου και ασβεστίου έχει ευεργετική δράση στην αναστολή της ανάπτυξης του *Listeria monocytogenes* στα θαλασσινά (McDowell et al.,2021).

Η μέθοδος *οζονισμού* είναι μια ενδιαφέρουσα τεχνική βιοσυντήρησης τροφίμων. Ο οζονισμός χρησιμοποιείται κυρίως για την επεξεργασία νερού και λυμάτων, λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του, όπως η μείωση της διαλυτότητας με αύξηση της θερμοκρασίας. Η δράση του στα βακτήρια βασίζεται στην καταστροφή πρωτεϊνικών δομών και της κυτταρικής μεμβράνης, περιορίζοντας την εξάπλωσή τους. Επιπλέον, ο οζονισμός χρησιμοποιείται για την επιφανειακή απολύμανση φρούτων και λαχανικών και την καταπολέμηση εντόμων και μυκήτων στα δημητριακά. Ωστόσο, η χρήση χημικών συντηρητικών έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, όπως αυξημένο κίνδυνο καρκίνου, δερματικές και γαστρεντερικές παθήσεις, επιδείνωση άσθματος, και νευροτοξικές ή εμβρυοτοξικές επιδράσεις. Ορισμένες ουσίες, όπως E211, E220, E221 και E249, που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά, φαίνεται να είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς, καθώς προκαλούν βλάβες στο DNA και μεταλλάξεις (Amit et al.,2017).

6.3 Βιολογικές μέθοδοι

Μία εναλλακτική και ασφαλής μέθοδος για τη διατήρηση των τροφίμων και τη μείωση των επιπέδων βακτηρίων είναι η ζύμωση. Πρόκειται για μια βιολογική διαδικασία κατά την οποία οι υδατάνθρακες διασπώνται από μικροοργανισμούς και ένζυμα. Στη ζύμωση, χρησιμοποιούνται συχνότερα βακτήρια, ζυμομύκητες και μούχλες, και εφαρμόζεται σε προϊόντα όπως γαλακτοκομικά, δημητριακά και προϊόντα κρέατος. Ανάλογα με τον μεταβολικό κύκλο και τα μικρόβια που συμμετέχουν, μπορούμε να παράγουμε ζύμωση αλκοολικού, οξικού οξέος ή γαλακτικού οξέος. Η αλκοολική ζύμωση είναι η διαδικασία κατά την οποία οι ζυμομύκητες μετατρέπουν απλά σάκχαρα σε αλκοόλη και διοξείδιο του

άνθρακα, με την παρουσία αλκοόλης να λειτουργεί και ως συντηρητικό. Μετά την αλκοολική ζύμωση, ακολουθεί η ζύμωση με οξικό οξύ από βακτήρια τύπου *Acetobacter*, που μετατρέπουν την αλκοόλη σε οξικό οξύ. Η ζύμωση γαλακτικού οξέος γίνεται κυρίως αναερόβια από βακτήρια όπως τα *Lactobacillus*, και συμβάλλει στη διατήρηση τροφίμων όπως λαχανικά και φρούτα. Η προπιονική ζύμωση, που πραγματοποιείται από βακτήρια προπιονικού οξέος σε τυριά, παράγει προπιονικό οξύ και βιταμίνες, βελτιώνοντας τη θρεπτική αξία των προϊόντων, αν και μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ανάπτυξη ορισμένων προβιοτικών βακτηρίων. Το οργανικό προπιονικό οξύ που προκύπτει, έχει πολύ ισχυρή αντιβακτηριακή δράση σε πολλά Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια (Urban-Chmiel et al., 2025).

6.4 Βακτηριοφάγοι

Ένα ακόμα ζήτημα στον τομέα της παραγωγής τροφίμων είναι η ανάγκη περιορισμού ή πλήρους απαγόρευσης της χρήσης ορισμένων αντιβιοτικών στη ζωική παραγωγή, λόγω του παγκόσμιου προβλήματος της αντοχής των βακτηρίων στα φάρμακα και της έλλειψης νέων αντιμικροβιακών παραγόντων. Η μείωση της χρήσης αντιβιοτικών με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας και της υγείας των καταναλωτικών προϊόντων, καθώς και τον περιορισμό της αύξησης της αντοχής στα φάρμακα μεταξύ των παθογόνων, αποτελεί αντικείμενο διαφόρων νομικών ρυθμίσεων που τροποποιούνται συνεχώς, όπως στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Ως αποτέλεσμα, υιοθετήθηκε η Οδηγία 2019/6 του Συμβουλίου της ΕΕ, η οποία τέθηκε σε ισχύ από την 1η Ιανουαρίου 2022 και περιορίζει σημαντικά τον αριθμό των αντιβιοτικών ομάδων που επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται στη ζωική παραγωγή. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη και η εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων αντί της χρήσης αντιβιοτικών στην παραγωγή τροφίμων, με στόχο την διατήρηση υψηλών προτύπων ασφαλείας για την καταπολέμηση των τροφιμογενών παθογόνων και την ελαχιστοποίηση των αρνητικών επιπτώσεών τους σε ανθρώπους και ζώα (European Commission).

Ένα παράδειγμα αυτής της μεθόδου αποτελεί η χρήση βακτηριοφάγων, γνωστών και ως βακτηριακών ιών, οι οποίοι βρίσκονται φυσικά στο περιβάλλον. Τα πολλά ελπιδοφόρα αποτελέσματα που έχουν επιτευχθεί σε διάφορα ερευνητικά κέντρα παγκοσμίως έχουν οδηγήσει στην εισαγωγή πολλών σκευασμάτων που περιέχουν βακτηριοφάγους στην εμπορική αγορά. Αυτά έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά στον έλεγχο ορισμένων

σημαντικών τροφιμογενών παθογόνων, όπως η *Listeria monocytogenes*, το *Escherichia coli*, η *Salmonella* και η *Campylobacter*. Πολλά από τα εμπορικά προϊόντα που κυκλοφορούν σήμερα έχουν λάβει τη διαπίστωση GRAS (Γενικά Αναγνωρισμένο ως Ασφαλές), καθώς και πιστοποιήσεις από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA), για χρήση στις Ηνωμένες Πολιτείες, καθώς και από τα Πρότυπα Τροφίμων της Αυστραλίας και της Νέας Ζηλανδίας. Αυτά περιλαμβάνουν την εξάλειψη παθογόνων μικροοργανισμών από τρόφιμα ζωικής προέλευσης (όπως κρέατα, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα) ή φυτικής προέλευσης (φρέσκα φρούτα και λαχανικά). Ορισμένα εμπορικά παρασκευάσματα φάγων έχουν εγκριθεί για χρήση και σε χώρες της ΕΕ, για τον έλεγχο της μόλυνσης των τροφίμων (π.χ. Listex™ P100 και ListShield™ από την Intralytix Inc., Baltimore, MD, USA) και ως πρόσθετα ζωοτροφών για τη διατροφή ζώων, για τον έλεγχο παθογόνων όπως η *S. enteritidis*, η *S. typhimurium*, η *E. coli* και η *L. Monocytogenes* (Dec et al., 2020).

Οι βακτηριοφάγοι είναι ευρέως διαδεδομένοι στο φυσικό περιβάλλον, τόσο στο γλυκό όσο και στο θαλασσινό νερό. Στο γλυκό νερό, ο αριθμός τους φτάνει περίπου τα 10^9 φάγοι ανά mL, ενώ στο θαλασσινό νερό περίπου τα 10^7 φάγοι ανά mL. Αυτοί οι ιικοί παράγοντες μπορούν να αποτελέσουν εργαλείο ελέγχου βακτηρίων που μολύνουν τρόφιμα, τόσο φρέσκα (όπως κρέας, γάλα, λαχανικά και φρούτα) όσο και επεξεργασμένα (όπως αλλαντικά και προϊόντα έτοιμα προς κατανάλωση). Επιπλέον, είναι ασφαλείς και φυσικά παρούσες στο περιβάλλον. Η παρουσία τους έχει επιβεβαιωθεί σε τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, φρέσκα λαχανικά, χόμα και προϊόντα *delicatessen*, υποδηλώνοντας ότι τόσο τα ζώα όσο και οι άνθρωποι εκτίθενται συνεχώς σε βακτηριοφάγους ή ακόμη και τους καταπίνουν. (Urban-Chmiel et al., 2025).

Στην εποχή της αυξανόμενης ζήτησης για βιολογικά προϊόντα και της ευαισθητοποίησης σχετικά με την υγιεινή διατροφή, οι φυσικοί παράγοντες προστασίας των τροφίμων κερδίζουν ολοένα και μεγαλύτερη σημασία στην παραγωγή. Λόγω της υψηλής εξειδίκευσης της δράσης των βακτηριοφάγων, τα κοκτέιλ φάγων, που πληρούν όλα τα κριτήρια ως οικολογικές μέθοδοι ελέγχου των τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων, έχουν τη δυνατότητα να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο. Η χρήση βακτηριοφάγων ως συμπληρωματικό μέσο για την αντιμετώπιση της μικροβιακής μόλυνσης των τροφίμων παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. **Πρώτον**, οι φάγοι είναι εξαιρετικά εξειδικευμένοι και συνήθως μπορούν να μολύνουν μόνο ένα γένος, είδος ή ακόμα και ορότυπο βακτηρίων, γεγονός που σημαίνει ότι, σε αντίθεση με τις χημικές ουσίες, δεν καταστρέφουν την κοινή

μικροχλωρίδα του πεπτικού συστήματος. **Δεύτερον**, μέχρι στιγμής δεν έχει αποδειχθεί ότι έχουν τοξικές επιδράσεις στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι βακτηριοφάγοι παρουσιάζουν υψηλή αντοχή σε παράγοντες που προκύπτουν κατά τη διαδικασία επεξεργασίας των τροφίμων, όπως υψηλές θερμοκρασίες και πίεση, και, όπως επιβεβαιώνεται από πολλές μελέτες, δεν επηρεάζουν αρνητικά τις αισθητηριακές ιδιότητες των τροφίμων. **Τρίτον**, πολλές μελέτες έχουν επίσης επιβεβαιώσει ότι οι βακτηριοφάγοι μπορούν να αξιοποιηθούν ως πιθανά εργαλεία για τη ρύθμιση της φυσικής ανθρώπινης εντερικής μικροχλωρίδας. Σύμφωνα με τον Francino, οι βακτηριοφάγοι τροποποιούν επιλεκτικά την εντερική μικροχλωρίδα χωρίς να προκαλούν δυσβίωση. Αυτό οφείλεται εν μέρει στον επιπολασμό τους στο περιβάλλον του πεπτικού σωλήνα ή στην παραγωγή τους από εντερικά κοινά βακτήρια, όπως το *E. coli*, που περιέχουν γενετικό υλικό προφάγων, το οποίο μειώνει σημαντικά τον ανταγωνισμό μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών ειδών που αποικίζουν το έντερο. Οι βακτηριοφάγοι βρίσκονται αυτήν τη στιγμή στο επίκεντρο έρευνας σε πολλά ερευνητικά κέντρα παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένης της Πολωνίας (Francino, 2016).

Υπάρχουν πλεονεκτήματα και προκλήσεις της χρήσης βακτηριοφάγων ως αντιβακτηριακών παραγόντων στα τρόφιμα. Παρότι έχουν αποδειχθεί οφέλη, υπάρχουν περιορισμοί όπως η ανάπτυξη αντοχής των βακτηρίων στους φάγους, η χαμηλή αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους, οι δυσκολίες στην προσαρμογή των συνθηκών αποθήκευσης (π.χ. θερμοκρασία, pH), η μείωση του τίτλου των φάγων με το χρόνο, και η πιθανή ανοσολογική αντίδραση λόγω της πρωτεϊνικής δομής τους. Επιπλέον, η μόλυνση τροφίμων με βακτηριοφάγους μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στη ζυμωτική βιομηχανία, και οι καταναλωτές ενδέχεται να μην είναι διατεθειμένοι να δεχτούν την παρουσία τους στα τρόφιμα (Urban-Chmiel et al., 2025).

Πίνακας 4: Αποτελεσματικότητα φάγων για τον έλεγχο διαφόρων βακτηρίων σε διάφορα στάδια παραγωγής τροφίμων (Urban-Chmiel et al., 2025).

Τροφιμογενή παθογόνα	Τύπος κοκτέιλ φάγου	Προϊόν διατροφής	Εταιρεία ή Πειραματικό Προϊόν.	Τροφιμογενή παθογόνα
Salmonella spp., <i>E. coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> ,	Οικολογικοκτόνο PX™	Βόειο κρέας, πουλερικά, φρούτα, λαχανικά,	Intralaytix, A.E.; (Βαλτιμόρη, MD, ΗΠΑ)	Σημαντική μείωση (3 log ₁₀ CFU/g) σε <i>E. coli</i>

Shigella spp.		γαλακτοκομικά προϊόντα (συμπεριλαμβανομένου του τυριού), ψάρια, άλλα θαλασσινά	GRAS (GRN Αρ. 000834)	O157:H7 στο δέρμα ζώων ζώων
E. coli O157:H7 O45:H2 O103:H2 O111:H-O121 :H19	Κοκτέιλ τεσσάρων φάγων ειδικά για STEC	Βοδινό κρέας	Πειραματικό κοκτέιλ φάγου	Μείωση του αριθμού των βακτηρίων E. coli κατά 0,4–0,7 log ₁₀ CFU/cm ² σε κομμάτια δέρματος αγελάδας Διακύμανση φάνηκε στην ευαισθησία του E. coli στους φάγους που χρησιμοποιήθηκαν
EPEC E. coli Nmr-2	Κοκτέιλ με πέντε φάγους: K EPEC, BI EPEC, BL EPEC, CI EPEC και CS EPEC 106 CFU/μ	Γαρίδες, κρέας κοτόπουλου, γάλα, μαρούλι, τόφου	Πειραματικά κοκτέιλ φάγων	Μείωση του αριθμού των EPEC κατά 0,24 log ₁₀ CFU σε μαρούλι και 1.84 κούτσουρο ₁₀ στο γάλα Καμία μείωση των βακτηρίων στο τόφου, το κρέας κοτόπουλου ή τις γαρίδες
Salmonella spp.	PhageGuard S Φάγοι σαλμονέλας S16 και FO1a	Αλεσμένο και χοντρό βόειο κρέας και κρέας πουλερικών. τροφή για κατοικίδια	PhageGuard.com; FDA, ΕΕ, Καναδάς, Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, Ελβετία, Ισραήλ	είωση της σαλμονέλας κατά περίπου > 1–2,4 log Θανάτωση σαλμονέλας (90– 99,6%), log ₁₀ H

				CFU
Salmonella enteritidis, Typhimurium, Paratyphi A, San Diego και Typhi	Κοκτέιλ τεσσάρων φάγων σαλμονέλας (CAU-SEP-1, CAU-SEP-2, CAU-SEP-3 και CAU-SEP-4) τίτλος 108 PFU/mL	Κρέας στήθους κοτόπουλου	Πειραματικό κοκτέιλ φάγου	Μείωση του αριθμού των βακτηρίων έως και 3,12 log CFU/mL μετά από 6 ώρες θεραπείας
Salmonella Enteritidis	Τίτλος LSE7621 βακτηριοφάγου (~108 PFU/mL)	Μαρούλι, τόφου	Πειραματικό διάλυμα φάγου	Για το τόφου - μείωσε σημαντικά τα βακτήρια κατά 3,55 log10 CFU/mL Για μαρούλι— μείωση κατά 1,02 log10 CFU/mL
Listeria spp.	Φάγος Λ.	Έτοιμα προς κατανάλωση κρέατα (χοιρινό λουκάνικο που έχει υποστεί ζύμωση, ζαμπόν ξηρής ωρίμανσης). μαγειρεμένη γαλοπούλα και ψητό μοσχάρι. φρέσκα ή κατεψυγμένα φρούτα και λαχανικά	Φάγος; Ο FDA	Μείωση της λιστέριας >1 από επισημονικούς ερευνητές σε διάφορα έτοιμα προς κατανάλωση κρέατα Μείωση βακτηρίων έως 2 log10 CFU από φρέσκα ή κατεψυγμένα λαχανικά

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων αυξάνονται συνεχώς σε παγκόσμιο επίπεδο. Οποιαδήποτε ασυνέπεια ή πρόβλημα στην αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων, από την παραγωγή και τη συλλογή μέχρι την αποθήκευση και τη συντήρηση, μπορεί να οδηγήσει σε τροφιμογενείς ασθένειες. Οι βασικοί ρύποι που συναντώνται στα τρόφιμα περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς, φυτοφάρμακα, υπολείμματα φαρμάκων και βαρέα μέταλλα. Ο οικονομικός αντίκτυπος και οι κίνδυνοι για τη δημόσια υγεία που συνδέονται με τα τρόφιμα και ποτά (FD) αποτελούν αυξανόμενες ανησυχίες, τόσο από θεωρητική όσο και από πρακτική άποψη. Ως εκ τούτου, τα πρότυπα ασφάλειας τροφίμων μπορούν να μετατραπούν σε εμπόδια στο διεθνές εμπόριο. Οι ανεπτυγμένες χώρες διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα να αναπτύσσουν και να εφαρμόζουν αποτελεσματικά πρότυπα ασφάλειας τροφίμων. Αντίθετα, τα μέτρα για την ασφάλεια των τροφίμων που υιοθετούνται σε αναπτυσσόμενες χώρες συχνά προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες και διαταραχές. Το GAP (Good Agricultural Practices) και η ανάλυση κινδύνου είναι κρίσιμες τεχνικές για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων.

Τα τελευταία πέντε χρόνια, έχει διεξαχθεί σημαντική έρευνα για την περαιτέρω βελτίωση της ευαίσθητης, ειδικής και αποτελεσματικής ανίχνευσης τροφιμογενών παθογόνων σε δείγματα τροφίμων, μέσω χρήσης μοριακών μεθόδων όπως PCR, LAMP, NASBA, παραδοσιακών μεθόδων όπως καλλιέργεια, ανοσολογικών και βιοαισθητήρων. Ωστόσο, οι περισσότερες πρόσφατες μελέτες έχουν εστιάσει σε συγκεκριμένα παθογόνα, όπως η σαλμονέλα, η λιστέρια και το E. coli.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι που βασίζονται στην καλλιέργεια παραμένουν οι σημαντικότερες μέθοδοι της ανίχνευσης παθογόνων, προσφέροντας αξιόπιστα αποτελέσματα, καλή σχέση κόστους αποτελεσματικότητας και προσδιορίζουν τον τύπο των βιώσιμων μικροοργανισμών και θεωρούνται εδώ και καιρό ως το «χρυσό πρότυπο». Αυτές οι τεχνικές στηρίζονται στην ανάπτυξη βακτηρίων σε επιλεκτικά μέσα, ακολουθούμενη από ταυτοποίηση με βάση μορφολογικά, μεταβολικά ή βιοχημικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, η ανίχνευση με βάση την καλλιέργεια είναι αρκετά χρονοβόρα, συχνά απαιτεί αρκετές ημέρες έως μία εβδομάδα, και επομένως δεν ανταποκρίνεται στις ανάγκες για ταχεία ανταπόκριση στη διαχείριση της ασφάλειας των τροφίμων. Επιπλέον, ορισμένα παθογόνα αναπτύσσονται αργά ή ακόμα και δεν καλλιεργούνται σε

εργαστηριακές συνθήκες, γεγονός που περιορίζει τη δυνατότητα εφαρμογής αυτής της προσέγγισης.

Όσον αφορά τις μοριακές μεθόδους, αξίζει να σημειωθεί ότι μπορεί να χρειάζονται περισσότερο χρόνο για την παροχή αποτελεσμάτων, να απαιτούν εξειδικευμένη κατάρτιση και εξοπλισμό, και ενδέχεται να μην είναι πρακτικές για επιτόπιες δοκιμές στην τρέχουσα κατάσταση αλλά έχουν υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια, ειδικότητα, αξιοπιστία, μικρό κίνδυνο μόλυνσης καθώς και δυνατότητα ανίχνευσης μικρής ποσότητας νουκλειικού οξέος και πολλών μικροοργανισμών ταυτόχρονα σε μια αντίδραση. Επίσης, η ταχύτητα τους είναι μεγαλύτερη από τις συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας. Η ανάπτυξη μεθόδων ισοθερμικής ενίσχυσης, κατάλληλων και για επιτόπιες δοκιμές (πχ LAMP) θα μπορούσε να διασφαλίσει την έγκαιρη ανίχνευση και απόκριση. Είναι σημαντικό ότι οι ισοθερμικές μέθοδοι ενίσχυσης έχουν αποδειχθεί ως εναλλακτικές λύσεις στις μεθόδους PCR, καθώς μπορούν να προσφέρουν γρήγορη, ειδική και ευαίσθητη ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα τροφίμων. Παρόλο που αυτές οι μέθοδοι (μοριακές) έχουν σημειώσει σημαντικές βελτιώσεις τα τελευταία χρόνια, η υιοθέτησή τους στη βιομηχανία τροφίμων και στα κυβερνητικά εργαστήρια επιθεώρησης, ιδιαίτερα σε αναπτυσσόμενες χώρες, παραμένει περιορισμένη. Αυτό οφείλεται κυρίως στην εξάρτηση από χειροκίνητες διαδικασίες και πολύπλοκο εξοπλισμό για την προεπεξεργασία, την προετοιμασία, την ενίσχυση και την ανίχνευση δειγμάτων. Για την αντιμετώπιση αυτής της πρόκλησης, η ενσωμάτωση αυτών των τεχνικών με άλλες τεχνολογίες είναι απαραίτητη, ώστε να απλουστευτούν οι διαδικασίες όπως η κυτταρική λύση, η εξαγωγή DNA, η ενίσχυση και η ανίχνευση. Μια τέτοια ενοποίηση θα μπορούσε να δημιουργήσει πιο γρήγορα, αξιόπιστα και εύχρηστα εργαλεία επιτόπιας ανίχνευσης, που θα απαιτούν μικρότερο κόστος, λιγότερη εργασία, λιγότερο χρόνο και λιγότερη ενέργεια. Η προώθηση της ευρείας εφαρμογής των μεθόδων που βασίζονται σε αυτές τις τεχνικές απαιτεί συνεργασία και συνέργεια μεταξύ των ενδιαφερόμενων φορέων. Μέσω συλλογικών προσπαθειών, η πρακτικότητα και η προσβασιμότητα αυτών των μεθόδων μπορούν να βελτιωθούν, οδηγώντας σε καλύτερες πρακτικές ασφάλειας τροφίμων και βελτιωμένα αποτελέσματα για τη δημόσια υγεία.

Οι ανοσολογικές μέθοδοι (elisa), χαρακτηρίζονται από την απλότητα, το χαμηλό κόστος και την ικανότητα υψηλής διαλογής απαιτώντας όμως αρκετό χρόνο προεπιξεργασίας του δείγματος λόγω παρεμβολών από δείγματα τροφίμων. Απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και προσφέρει μειωμένη ευαισθησία και μεγάλο κίνδυνο για ψευδώς θετικά

αποτελέσματα λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος. Αντίθετα η LFIA(δοκιμασία πλευρικής ροής) είναι μια γρήγορη εύχρηστη τεχνική που συνδυάζει την ανοσολογική αναγνώριση με τον χρωματογραφικό διαχωρισμό και χρησιμοποιείται ευρέως με μεγάλη ευαισθησία μεθόδου. Είναι ταχύτερη από την ELISA και δίνει τη δυνατότητα για επιτόπιες δοκιμές και οπτικά αποτελέσματα .

Οι μέθοδοι που βασίζονται στους βιοαισθητήρες, αποτελούν αναπόσπαστα εργαλεία για την ενίσχυση της ασφάλειας των τροφίμων και υπόσχονται την ταχεία,αυτοματοποιημένη, ευαίσθητη και εξαιρετικά συγκεκριμένη ανίχνευση τροφιμογενών μικροοργανισμών και αποτελούν σύνδεσμο εργαστηριακού διαγνωστικού και εφαρμογής επιτόπιας παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο. Η χρήση των βιοαισθητήρων γίνεται και συνδυαστικά όπως για έξυπνες δοκιμές με smartphones, μικρορευστά, νανουλικά για επιτόπια ανίχνευση. Αυτές οι μεθοδολογίες αποτελούν πολύτιμα εργαλεία πρόληψης για τον περιορισμό της εξάπλωσης εστιών ασθενειών που μεταδίδονται μέσω του νερού και των τροφίμων, ιδιαίτερα σε απομακρυσμένες περιοχές ή περιοχές με περιορισμένους πόρους. Επιπλέον, αναγνωρίζονται για την αποτελεσματικότητά τους, την ταχύτητα και την ευκολία χρήσης τους σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους, όπως η καλλιέργεια. Παρά τις πρόσφατες εξελίξεις και καινοτομίες σε αυτές τις τεχνολογίες, υπάρχουν ακόμα ανεκμετάλλευτες δυνατότητες για περαιτέρω ενσωμάτωση, ειδικά σε σχέση με την πολυπλοκότητα και το κόστος ανά δοκιμή. Το κόστος ανά δοκιμή γίνεται ιδιαίτερα σημαντικό όταν απαιτούνται πολλαπλές αναλύσεις για την ανίχνευση κοινών παθογόνων σε διάφορα δείγματα. Επιπλέον, κατά την αξιολόγηση του κόστους, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως η βελτίωση της ευαισθησίας, της ειδικότητας, καθώς και η απλότητα του σχεδιασμού και της μεθοδολογίας. Για να διαπιστωθεί η απουσία παθογόνου σε ένα δείγμα, πιθανόν να χρειαστούν πολλαπλές δοκιμές σε διάφορα δείγματα. Οι επιτόπιες τεχνολογίες συνεχίζουν να επηρεάζουν σημαντικούς τομείς δημόσιας υγείας, όπως η γεωργία, η ασφάλεια και η επεξεργασία τροφίμων. Η ανάπτυξη γρήγορων και εύκολων στη χρήση μεθόδων για τον εντοπισμό μόλυνσης θα ενίσχυε την ανταπόκριση σε βακτηριακές εστίες και θα μπορούσε να συμβάλει στη μείωση του συνολικού αριθμού εστιών. Η ταχεία ανίχνευση θα μπορούσε να περιορίσει την εξέλιξη μιας επιδημίας προτού αυτή εξαπλωθεί ευρέως, μειώνοντας τόσο το βάρος της υγειονομικής περίθαλψης και το οικονομικό κόστος όσο και τον αντίκτυπο της επιδημίας. Οι επιτόπιες τεχνολογίες έχουν τη δυνατότητα να αντιμετωπίσουν σημαντικές παγκόσμιες απειλές για την υγεία, ενώ παράλληλα μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση της

ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Μέσω συνεχών βελτιώσεων και συνδυαστικών προσεγγίσεων αυτών των τεχνολογιών, η άμεση ανίχνευση θα μπορούσε να γίνει μια κανονική πρακτική στον ποιοτικό έλεγχο τροφίμων και νερού σε πολλούς κλάδους.

Τέλος, σημαντικό ρόλο έχουν διάφορες μέθοδοι (χημικές, φυσικές και βιολογικές) που έχουν αναπτυχθεί για την αποτελεσματική απολύμανση των τροφίμων που έχουν ήδη παραχθεί. Αν και αυτή η διαδικασία διασφαλίζει την ασφάλεια των τροφίμων, ορισμένα από τα μέσα μείωσης ή εξάλειψης μικροοργανισμών ενδέχεται να έχουν ανεπιθύμητες επιπτώσεις, όπως οργανοληπτικές αλλαγές ή δυσκολία στην αποδοχή από τους καταναλωτές, που μπορεί να μην επιθυμούν τρόφιμα που έχουν υποστεί τέτοιες επεξεργασίες.

Η ανάπτυξη φυσικών και οικολογικών μεθόδων συντήρησης τροφίμων αποτελεί προτεραιότητα στον τομέα της παραγωγής τροφίμων. Είναι αβέβαιο εάν οι μελλοντικές προσεγγίσεις θα είναι εντελώς καινούριες ή θα βασίζονται σε εκσυγχρονισμούς υφιστάμενων μεθόδων. Η συνεχής έρευνα σχετικά με τη χρήση φυσικών και οικολογικών τεχνικών, όπως η αξιοποίηση βακτηριοφάγων που είναι ειδικοί για παθογόνα μικρόβια, μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην παραγωγή ασφαλέστερων τροφίμων με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Σκορίλας Α., 2020, Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική, Αθήνα, Broken Hill Pub-lishers

Σπυρίδων – Ανδρεας Κωνσταντίνος Παπαθεοδώρου Διδακτορική διατριβή . Ανάπτυξη καινοτόμου εθοδολογίας Για Την Ανίχνευση Παθογόνων Βακτηρίων Στα Τρόφιμα , 2024

Afsana, K., Jolly, S. P., & Akhter, F. (2022). Nutrition, Food Safety and Global Health. In Handbook of global health (pp. 1–28). Springer.

A. Garrido-Maestu, et al..Rapid and sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* in food products by a filtration-based protocol and qPCR.Food Microbiol., 73 (2018), pp. 254-263

Abebe Tibebu, Habtamu Tamrat, Adane Bahiru Review: Impact of food safety on global tradeFirst published: 19 August 2024 <https://doi.org/10.1002/vms3.1585>Digital Object Identifier

Alexandre Lamas , Alejandro Garrido-Maestu (2024) Editorial: Next generation sequencing: applications in foodborne pathogens PMID: 38756736 PMCID: PMC11097681 DOI: 10.3389/fmicb.2024.1415863

Ahovan, Z.A.; Hashemi, A.; De Plano, L.M.; Gholipourmalekabadi, M.; Seifalian, A. Bacteriophage based biosensors: Trends, outcomes and challenges. Nanomaterials 2020, 10, 501.

Aayushi Patel , Andrew Wolfram , Taseen S Desin Advancements in Detection Methods for Salmonella in Food: A Comprehensive Review.Affiliations ExpandPMID: 39770335 PMCID: PMC11728791 DOI: 10.3390/pathogens13121075

Amit, S.K.; Uddin, M.M.; Rahman, R.S.M.; Rezwanul Islam, R.; Khan, M.S. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. Agricult. Food Sec. 2017, 6, 51.

Boyer, M. (2021, July 20). *Listeria sp. et Listeria monocytogenes*. Paris. doi:<https://www.vigilab.com/documentation/fiches-microbiologie/listeria-sp-et-l>
Monocytogenes

- Bai X, Huang J, Li W, Song Y, Xiao F, Xu Q, Xu H (2023) Portable dual-mode biosensor based on smartphone and glucometer for on-site sensitive detection of *Listeria monocytogenes*. Sci Total Environ 874:162450. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162450>
- Balakrishnan P, Anny Leema A, Jothiaruna N, Assudani PJ, Sankar K, Kulkarni MB, Bhaiyya M (2025) Artificial intelligence for food safety: From predictive models to real-world safeguards. Trends Food Sci Technol 163:105153. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2025.105153>
- Cerqueira, M.A. Costa, M.J. Rivera, M.C. Ramos, O.L. Vicente, A.A. Flavouring and Coating Technologies for Preservation and Processing of Foods. In Conventional and Advanced Food Processing Technologies; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2014; Volume 9781118406, ISBN 9781118406281.
- Cagri, A.; Ustunol, Z.; Ryser, E.T. Antimicrobial Edible Films and Coatings. J. Food Prot. 2004, 67, 833–848.
- ChenZ.ZhaoK.HeZ.LuoX.QinZ.TanY.et al (2022). Development and evaluation of a thermostatic nucleic acid testing device based on magnesium pyrophosphate precipitation for detecting *Enterocytozoon hepatopenaei*. Chin. Chem. Lett.33, 4053–4056. 10.1016/j.cclet.2022.01.072
- Chen Y, Hu Y, Lu X (2023) Polyethersulfone-Based Microfluidic Device Integrated with DNA Extraction on Paper and Recombinase Polymerase Amplification for the Detection of *Salmonella enterica*. ACS Sens 8:2331–2339. <https://doi.org/10.1021/acssensors.3c00387>
- Di Genova, B. M., & Tonelli, R. R. (2016). Infection strategies of intestinal parasite pathogens and host cell responses. Frontiers in Microbiology, 7, 256.
- Damkerng Bundidamorn ,Wannakarn Supawasit ,Sudsai Trevanich (2021).Taqman® probe based multiplex RT-PCR for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods.LWT, 147 (2021), Article 111696, 10.1016/j.lwt.2021.111696
- Dec, M.; Wernicki, A.; Urban-Chmiel, R. Efficacy of experimental phage therapies in livestock. Anim. Health Res. Rev. 2020, 21, 69–83.
- European Union. Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on Official Controls and Other Official Activities Carried Out to Ensure the Application of Food and Feed Law, Rules on Animal Health and Welfare,

Plant Health and Plant Protection Products. EUR-Lex. 2017. Available online: <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/625/2022-01-28/eng> (accessed on 29 October 2024).

European Commission. Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on Veterinary Medicinal Products and Repealing Directive 2001/82/EC. Off. J. Eur. Union 2019, 43–167

E. Omiccioli, et al. (2009) A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *Food Microbiol.*, 26 (6) (2009), pp. 615-622

Focker, M., Asselt, E. D. Van, Berendsen, B. J. A., Van De Schans, M. G. M., Leeuwen, S. P. J. V., Visser, S. M., & Fels-Klerx, H. J. V. D. (2022). Review of food safety hazards in circular food systems in Europe. *Food Research International*, 158, 111505.

Fu, J.M.; Zhou, Y.F.; Huang, X.L.; Zhang, W.J.; Wu, Y.H.; Fang, H.; Zhang, C.Z.; Xiong, Y.H. (2020). Dramatically Enhanced Immunochromatographic Assay Using Cascade Signal Amplification for Ultrasensitive Detection of *Escherichia coli* O157:K7 in Milk. *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 1118–1125.

Francino, M. Antibiotics and the human gut microbiome: Dysbioses and accumulation of resistances. *Front. Microbiol.* 2016, 6, 164577.

Gallo, M., Ferrara, L., Calogero, A., Montesano, D., & Naviglio, D. (2020). Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety, *Food Research International*, 137, 109414.

Guo, Q.; Han, J.J.; Shan, S.; Liu, D.F.; Wu, S.S.; Xiong, Y.H.; Lai, W.H. DNA-based hybridization chain reaction and biotin-streptavidin signal amplification for sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 through ELISA. *Biosens. Bioelectron.* 2016, 86, 990–995.

ISO 6579-1:2017; Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of *Salmonella*—Part 1: Detection of *Salmonella* spp. [WWW Document]. ISO: Geneva, Switzerland, 2017. Available online: <https://www.iso.org/standard/56712.html>

ISO (2017). 11290-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part 1: Detection method. International Standard Organization

- Jeddi, M. Z., Boon, P. E., Cubadda, F., Hoogenboom, R., Mol, H., Verhagen, H., & Sijm, D. T. H. M. (2022). A vision on the ‘future’ role of dietary exposure sciences in the interplay between food safety and nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 120, 288–300.
- J.Y. Park, M.-C. Lim, K. Park, G. Ok, H.-J. Chang, N. Lee, S.-W. Choi(2020)Detection of E. coli O157: H7 in food using automated immunomagnetic separation combined with real-time PCR Processes, 8 (2020), p. 908, 10.3390/pr8080908
- Jacek Osek , Beata Lachtara , Kinga Wieczorek (,2022).Listeria monocytogenes in foods- From culture identification to whole-genome characteristicsPMID: 36171778 PMCID: PMC9469866 DOI: 10.1002/fsn3.2910
- JinZ. J.DingG. T.LiG. Y.YangG. X.HanY. H.HaoN.et al (2020). Rapid detection of foodborne bacterial pathogens using visual high-throughput microfluidic chip. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*95, 1460–1466. 10.1002/jctb.6331
- J. Xiong, B. Huang, J. Xu, W. Huang(2020).A closed-tube loop-mediated isothermal amplification assay for the visual detection of Staphylococcus aureus,Applied Biochemistry and Biotechnology, 191 (2020), pp. 201-211, 10.1007/s12010-020-03278-x
- J. Chen, et al..A real-time PCR method for the detection of Salmonella enterica from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis.Int. J. Food Microbiol., 137 (2–3) (2010), pp. 168-174
- Jayan H, Zhou R, Zheng Y, Xue S, Yin L, El-Seedi HR, Zou X, Guo Z (2025) Microfluidic-SERS platform with in-situ nanoparticle synthesis for rapid E. coli detection in food. *Food Chem* 471:142800. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.142800>
- Kharel, M., Dahal, B. M., & Raut, N. (2022). Good agriculture practices for safe food and sustainable agriculture in Nepal. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10, 100447.
- Khan, S.; Dasari, V.V.; Paila, B.; Asok, S.; Nshimiyimana, W.; Bhatt, C.S.; Korupalli, C.; Mishra, A.; Suresh, A.K. Next-Generation Theragnostic Gold Nanoparticles: Sustainable Bioengineering Strategies for Enhanced Stability and Biocompatibility. *Coord. Chem. Rev.* 2025, 543, 216925.
- Li, Y., Li, Y., Zheng, G., Zhu, L., Wang, J., Mu, S., Ren, Q., & Feng, F. (2018). Cytochrome P450 1A1 and 1B1 promoter CpG island methylation Regulates rat liver injury induced by isoniazid. *Medicine Reports*, 17(1), 753–762.
- L. Zhai, H. Liu, J. Li, Z. Lu, X. Bie (2022). A duplex real-time NASBA assay targeting a serotype-specific gene for rapid detection of viable Salmonella Paratyphi C in retail foods

of animal origin. Canadian Journal of Microbiology, 68 (2022), pp. 259-268, 10.1139/cjm-2021-0054

Linqing Zou , Chang Xue , Mingyu Tao , Qin Ouyang , Cunzheng Zhang (2026). Advances in Immunological Methods for the Detection of Escherichia coli O157:H7: A Review DOI: 10.3390/s26061894

Lonchamps P-L, He Y, Wang K, Lu X (2022) Detection of pathogens in foods using microfluidic lab-on-chip: A mini review. J Agric Food Res 10:100430. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100430>

L. He, D.J. Simpson, M.G. Gänzle. Detection of enterohaemorrhagic Escherichia coli in food by droplet digital PCR to detect simultaneous virulence factors in a single genome Food Microbiology, 90 (2020), Article 103466, 10.1016/j.fm.2020.103466

Linqing Zou , Chang Xue , Mingyu Tao, Qin Ouyang , Cunzheng Zhang(2026) Advances in Immunological Methods for the Detection of Escherichia coli O157:H7: A Review DOI: 10.3390/s26061894

M.P. Kabiraz, P.R. Majumdar, M.M.C. Mahmud, S. Bhowmik, A. Ali. Conventional and advanced detection techniques of foodborne pathogens: A comprehensive review Heliyon, 9 (2023), p. e15482

M. Campàs, S. Leonardo, A. Ferré-Gode, A.A. Chowdhury, A. Toldrà, K.B. Andree, A. Roque. Duplex electrochemical biosensor for the detection of the tdh and trh virulence genes of Vibrio parahaemolyticus in oysters Food Control, 109689 (2023)

M. Zhang, C. Liu, Y. Shi, J. Wu, J. Wu, H. Chen. Selective endpoint visualized detection of Vibrio parahaemolyticus with CRISPR/Cas12a assisted PCR using thermal cycler for on-site application Talanta, 214 (2020)

Mei Y, He C, Zeng W, Luo Y, Liu C, Yang M, Kuang Y, Lin X, Huang Q (2022) Electrochemical Biosensors for Foodborne Pathogens Detection Based on Carbon Nanomaterials: Recent Advances and Challenges. Food Bioprocess Technol 15:498–513. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02759-7>

M. Li, Z. Luan, Y. Liu, C. Yang, Y. Wang, C. Ma, C. Shi (2021). Ultrafast bacterial cell lysis using a handheld corona treater and loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foodborne pathogens. Food Control, 128 (2021), Article 108178, 10.1016/j.foodcont.2021.108178

- Muriuki S. W., Rengan M. S., Budambula N. L. M. (2021). Prokaryotic diversity and potentially pathogenic bacteria in vended foods and environmental samples. *Ann. Microbiol.* 71, 27. 10.1186/s13213-021-01640-w
- Man Y, Ban M, Jin X, Li A, Tao J, Pan L (2023) An integrated distance-based microfluidic aptasensor for visual quantitative detection of Salmonella with sample-in-answer-out capability. *Sens Actuators B Chem* 381:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.133480>
- Mahari S, Prakashan D, Gandhi S (2023) Immunochromatographic assay for the point-of-care diagnosis of food borne Salmonella strains using smartphone application. *Colloids Surf B Biointerfaces* 226:113319. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113319>
- Min HJ, Mina HA, Deering AJ, Bae E (2021) Development of a smartphone-based lateral-flow imaging system using machine-learning classifiers for detection of Salmonella spp. *J Microbiol Methods* 188:106288. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106288>
- McDowell, R.H.; Sands, E.M.; Friedman, H. *Bacillus cereus*; StatPearls: Treasure Island, FL, USA. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/> (accessed on 20 January 2021).
- M. Bahadoripour, M.H. Jahandar. Detection of E. coli O157: H7 in meat using polymerase chain reaction method and culture method. *Int. J. Basic Sci. Med.* [online], 4 (3) (2019), pp. 102-107
- Nodali Ndraha, Hung-Yun Lin, Chen-Yow Wang, Hsin-I Hsiao, Han-Jia Lin (2023). Rapid detection methods for foodborne pathogens based on nucleic acid amplification: Recent advances, remaining challenges, and possible opportunities, *Food Chemistry: Molecular Sciences* Volume 7, 30 December 2023, 100183
- Odetokun, I. A., Mercy, Z., Nuhu, A. A., Borokinni, B. O., Ghali-Mohammed, I., Cisse, H., & Bida, N. (2022). Dialogues in health knowledge and self-reported food safety practices among meat consumers in Ilorin, Nigeria. *Dialogues in Health*, 1, 100039.
- Olaimat, A.N.; Holley, R.A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiol.* 2012, 32, 1–19.
- O.H. Hernández, A.L. Gutiérrez-Escolano, C. Cancio-Lonches, M.H. Iturriaga, J.R. Pacheco-Aguilar, R. Morales-Rayas, S.M. Arvizu-Medrano. Multiplex PCR method for the detection of human norovirus, Salmonella spp., Shigella spp., and shiga toxin producing Escherichia coli in blackberry, coriander, lettuce and strawberry *Food Microbiology*, 102 (2022)

- Purshottam J Assudani , Balakrishnan P , Anny Leema A , Gina George , Ankita Avthankar , Aditya Tiwari , Manish Bhaiyya , Madhusudan B Kulkarni (2026). Biosensing technologies for foodborne pathogen detection and healthcare: principles, emerging materials, and intelligent platforms DOI: 10.1007/s00604-026-07976-x
- Puiu M, Bala C (2020) Microfluidics-integrated biosensing platforms as emergency tools for on-site field detection of foodborne pathogens. TrAC - Trends Anal Chem 125:115831. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115831>
- Pala, C.U.; Toklucu, A.K. Effect of UV-C on anthocyanin content and other quality parameters of pomegranate juice. J. Food Comp. Analysis 2011, 24, 790–795.
- Q. Sun, J. Cheng, R. Lin, J. Li, Y. Zhang, X. Liang, J. Zhang (2022). A novel multiplex PCR method for simultaneous identification of hypervirulent *Listeria monocytogenes* clonal complex 87 and CC88 strains in China. International Journal of Food Microbiology, 366 (2022), Article 109558
- Qiao, Z.H.; Cai, Q.Q.; Fu, Y.C.; Lei, C.Y.; Yang, W.G. Visual and quantitative detection of *E. coli* O157:H7 by coupling immunomagnetic separation and quantum dot-based paper strip. Anal. Bioanal. Chem. 2021, 413, 4417–4426.
- Rahimi, P., Islam, M. S., Duarte, P. M., Tazerji, S. S., Sobur, M. A., El Zowalaty, M. E., Ashour, H. M., & Rahman, M. T. (2022). Impact of the COVID-19 pandemic on food production and animal health. Trends in Food Science and Technology, 121, 105–113.
- R. Dhital, A. Mustapha(2023). DNA concentration by solid phase reversible immobilization improves its yield and purity, and detection time of *E. coli* O157: H7 in foods by high resolution melt curve qPCR. Food Control, 145 (2023), Article 109456, 10.1016/j.foodcont.2022.109456
- Renata Urban-Chmiel, Jacek Osek and Kinga Wieczorek (2025). Methods of Controlling Microbial Contamination of Food Pathogens 2025, 14(5), 492 <https://doi.org/10.3390/pathogens14050492>
- So-Hyeon Park, Mirim Kim, Yu-Jin Jeong, and Moo-Seung Lee(2024). Advanced Three-Dimensional Cell Culture Models for Investigating Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* Pathogenesis and Shiga Toxin-Mediated Injury .PMID: 40915656 PMCID: PMC12420955 DOI: 10.4014/jmb.2507.07021
- S.Sha Liu ,K.Kaixuan Zhao,M.Meiyuan Huang ,M.Meimei Zeng, Y.Yan Deng ,S.Song Li, Hui Chen,Wen Li ,Zhu Chen Research progress on detection techniques for point-of-care

testing of foodborne pathogens REVIEW article Front. Bioeng. Biotechnol., 08 August 2022 Volume 10 - 2022 | <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.958134>

Syromyatnikov M. Y., Kokina A. V., Solodskikh S. A., Panevina A. V., Popov E. S., Popov V. N. et al (2020). High-throughput 16S rRNA gene sequencing of butter microbiota reveals a variety of opportunistic pathogens. Foods, 608. 10.3390/foods9050608

S.S. Silkie, M.P. Tolcher, K.L. Nelson. Reagent decontamination to eliminate false-positives in Escherichia coli qPCR. J. Microbiol. Methods, 72 (3) (2008), pp. 275-282

Shao, Y.N. Wang, Z.Z. Xie, J.H. Zhu, Z.J. Feng, Y. Yu, S.B.; Xue, L.; Wu, S.; Gu, Q.H.; Zhang, J.M. (2023) Dual-mode immunochromatographic assay based on dendritic gold nanoparticles with superior fluorescence quenching for ultrasensitive detection of E. coli O157:H7. Food Chem. 2023, 424, 136366.

S. Lei, X. Gu, Q. Zhong, L. Duan, A. Zhou. Absolute quantification of Vibrio parahaemolyticus by multiplex droplet digital PCR for simultaneous detection of tlh, tdh and ureR based on single intact cell. Food Control, 114 (2020), Article 107207, 10.1016/j.foodcont.2020.107207

Sun, Y.-L.; Kuo, C.-M.; Lu, C.-L.; Lin, C.-S. Review of recent advances in improved lateral flow immunoassay for the detection of pathogenic Escherichia coli O157:H7 in foods. J. Food Saf. 2020, 41, e12867.

S.-H. Park, S. Ryu, D.-H. Kang. (2012). Development of an improved selective and differential medium for isolation of Salmonella spp. J. Clin. Microbiol., 50 (10) (2012), pp. 3222-3226

U.S. Food & Drug Administration Investigations of Foodborne Illness Outbreaks|FDA. Available online: <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/investigations-foodborne-illness-outbreaks> (accessed on 8 February 2023).

U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Testing for Salmonella Species in Human Foods and Direct-Human-Contact Animal Foods. 2012. Available online: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-testing-salmonella-species-human-foods-and-direct-human-contact-animal-foods> (accessed on 30 October 2024).

Weinroth, M. D., Belk, A. D., & Belk, K. E. (2018). History, development, and current status of food safety systems worldwide. Animal Frontiers, 8(4), 9–15.

W. Fang, Y. Cai, L. Zhu, H. Wang, Y. Lu. Rapid and highly sensitive detection of toxigenic *Vibrio cholerae* based on recombinase-aided amplification combining with lateral flow assay. *Food Analytical Methods*, 14 (2021), pp. 687-696

Wolbang, C.M.; Fitos, J.L.; Treeby, M.T. The effect of high pressure processing on nutritional value and quality attributes of *Cucumis melo* L. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol. J.* 2008, 9, 196–200.

Wang Guo , Meifeng Jiang , Yunkai Xie , Hong Xu , Zongbao Sun (2025). Recognition Element-Based Strategies for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: Recent Progress and Perspectives PMID: 41294729 PMCID: PMC12650562 DOI: 10.3390/bios15110717

WuX.LuoH.XuF.GeC.LiS.DengX.et al (2021). Evaluation of *Salmonella* serotype prediction with multiplex nanopore sequencing. *Front. Microbiol.*12, 637771. 10.3389/fmicb.2021.637771

Xie M, Chen T, Xin X, Cai Z, Dong C, Lei B (2022) Multiplex detection of foodborne pathogens by real-time loop-mediated isothermal amplification on a digital microfluidic chip. *Food Control* 136:108824. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108824>

Xiaoli Liu , Huaiying Yao , Xihong Zhao , Chaorong Ge .,2023. Biofilm Formation and Control of Foodborne Pathogenic Bacteria. DOI: 10.3390/molecules28062432

Xu J, Zhou S, Zhang Y, Wu H, Li T, Tan L, Gan N, He J (2025) Phage/aptamer dual-encoded hydrogel arrays integrated with microfluidic platforms for simultaneous detection of multiple food pathogens. *Talanta* 294:128209. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128209>

Y.-G. Xu, et al. Development of a novel target-enriched multiplex PCR (Tem-PCR) assay for simultaneous detection of five foodborne pathogens, *Food Control*, 64 (2016), pp. 54-59

Yin L, Li Y, Zhang W, Han X, Wu Q, Xie Y, Fan J, Ma L (2023) Detection Methods for Foodborne Viruses: Current State-of-Art and Future Perspectives. *J Agric Food Chem* 71:3551–3563. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06537>

Yang T, Wang Z, Song Y, Yang X, Chen S, Fu S, Qin X, Zhang W, Man C, Jiang Y (2021) A novel smartphone-based colorimetric aptasensor for on-site detection of

Escherichia coli O157:H7 in milk. J Dairy Sci 104:8506–8516.
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19905>

Yu Q, Chen X, Qi L, Yang H, Wang Y, Zhang M, Huang K, Yuan X (2023) Smartphone readable colorimetry and ICP-MS dual-mode sensing platform for ultrasensitive and label-free detection of Escherichia coli based on filter-assisted separation. Talanta 251:123760.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123760>

Y.-C. Chiang, et al.(2018). Designing a biochip following multiplex polymerase chain reaction for the detection of Salmonella serovars Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Hadar, and Virchow in poultry products. J. Food Drug Anal., 26 (1) (2018), pp. 58-66

Z. Liu, Y. Yu, T. Fotina, R. Petrov, Z. Klishchova, A. Fotin, J. Ma.(2022).Multiplex PCR assay based on the citE2 gene and intergenic sequence for the rapid detection of Salmonella Pullorum in chickens.Poultry Science, 101 (2022)

Zhang, Y.J.; Pan, J.K.; He, Q.Y.; Xu, Z.H.; Hammock, B.D.; Li, D.Y. Development of Immunoassays for Foodborne Pathogenic Bacteria Detection Using PolyHRP for Signal Enhancement. Biosensors 2025, 15, 318.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

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