



Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης βακτηριακού DNA και μοριακών τεχνικών για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων

Τσέτσο Γιώργος AM:71614401

Χορμόβας Χρυσοβαλάντης AM:71614406

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Χούχουλα Δήμητρα

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας τροφίμων  
Αθήνα, 2022



## Comparison of bacterial DNA extraction methods and molecular techniques for the detection of foodborne pathogens

Tsetso giorgos      71614401

Chormovas Chrysovalantis      71614406

Supervisor: Houhoula Dimitra

University of west Attica  
Department of food science and technology  
Athens,2022

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Χούγουλα Δήμητρα

Μέλος επιτροπής: Αντωνόπουλος Διονύσιος

Μέλος επιτροπής: Μπατρίνου Ανθιμία

#### ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Χορμόβας Χρυσοβαλάντης- Ιωάννης του Ταξιάρχη, με αριθμό μητρώου 71614406 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα



Χορμόβας  
Χρυσοβαλάντης-Ιωάννης

#### ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Τσέτσο Γεώργιος του Βίκτωρ, με αριθμό μητρώου 71614401 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματός.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα



Γεώργιος Τσέτσο

## Περίληψη

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια αποτελούν ακόμα και σήμερα ένα φλεγόμενο ζήτημα για την δημόσια υγεία και την κοινωνία. Ο αριθμός των ετήσιων λοιμώξεων είναι σημαντικός με αποτέλεσμα η έγκαιρη και έγκυρη ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα να θεωρείται κρίσιμο σημείο κατά την παραγωγή και επεξεργασία των τροφίμων. Οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται την σήμερον ημέρα για την εύρεση των παθογόνων βακτηρίων είναι χρονοβόρες ή και απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό. Κατά συνέπεια είναι υψίστης σημασίας η ανάπτυξη νέων, ταχέων και αξιόπιστων μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών που θα μπορούν να αξιοποιηθούν άμεσα από την βιομηχανία των τροφίμων.

Σκοπός της συγκεκριμένης πειραματικής εργασίας αποτελεί η αξιολόγηση της τεχνικής Ισοθερμικής Ενίσχυσης Μέσω Βρόγχου (LAMP) όσον αφορά την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα γάλακτος. Στη συνέχεια είναι επιθυμητή η σύγκριση της ευαισθησίας της μεθόδου LAMP με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) καθώς και η σύγκριση δύο μεθόδων απομόνωσης του βακτηριακού DNA. Τα δείγματα γάλακτος επιμολύνθηκαν με γνωστές συγκεντρώσεις *Salmonella Typhimurium* και *Listeria monocytogenes* ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του DNA. Η απομόνωση του DNA των παθογόνων βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η χρήση ενός εμπορικού kit απομόνωσης DNA ενώ η δεύτερη μέθοδος ήταν μία in-house τεχνική που περιλάμβανε την χρήση βρασμού, υπερήχων, διαλύματος χλωροφορμίου με ισοαμυλική αλκοόλη, αιθανόλη και κατάψυξη. Η μέθοδος απομόνωσης του βακτηριακού DNA φαίνεται να μην επηρεάζει σημαντικά τα όρια ανίχνευσης των μικροοργανισμών με τις δύο τεχνικές να δίνουν παραπλήσια αποτελέσματα. Η PCR και η LAMP όσον αφορά την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* φαίνεται να έχουν και αυτές παραπλήσια αποτελέσματα. Για τα δείγματα που απομονώθηκαν με τη χρήση του εμπορικού kit η PCR είχε όριο ανίχνευσης  $10^2$  CFU/mL με την LAMP να έχει  $10^3$  CFU/mL, ενώ για την in house τεχνική τα αποτελέσματα ήταν αντίστροφα, με την LAMP να έχει όρια ανίχνευσης  $10^2$  CFU/mL και την PCR να έχει  $10^3$  CFU/mL. Για την ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella Typhimurium* τα αποτελέσματα έδειξαν την LAMP να υπερτερεί ελαφρώς της PCR. Τα όρια ανίχνευσης της LAMP και με τις δύο μεθόδους

απομόνωσης ήταν  $10^2$  CFU/mL, ενώ η PCR παρουσίασε όριο ανίχνευσης  $10^2$  CFU/mL με την in house τεχνική και  $10^3$  CFU/mL με το εμπορικό kit.

Συμπερασματικά, η LAMP φαίνεται όχι μόνο να μην υστερεί αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις να υπερτερεί της PCR αφού παρουσιάζει ελαφρώς αυξημένη ευαισθησία. Επιπροσθέτως η τεχνική της LAMP έδωσε αποτελέσματα σε χρόνο που κυμαίνεται μεταξύ 30 και 60 λεπτών σε σταθερή θερμοκρασία  $65^{\circ}\text{C}$ , ενώ αντίθετα η PCR χρειάστηκε περισσότερο χρόνο για να δώσει αποτελέσματα αφού όχι μόνο απαιτεί θερμικό κύκλο που διαρκεί γύρω στις 3 ώρες αλλά και ηλεκτροφόρηση μετά το πέρας της. Τέλος η LAMP είναι πιο εύχρηστη τεχνική αφού δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμού υψηλού κόστους όπως η PCR κάνοντας την κατάλληλη για ευρεία χρήση σε εργαστήρια με χαμηλούς πόρους

## Abstract

Infections caused by foodborne bacteria still remain a controversial subject for public health and society. The number of infections per year is significant and as a result timely and valid bacteria identification is considered a key factor in the food industry. The existing methods are time consuming or demand expensive equipment. Thus an important factor is the development of a new, rapid, and reliable method of detection that can be used promptly.

The aim of this research is the evaluation of LAMP (Loop mediated isothermal amplification) for the detection of bacteria in milk samples, the comparison of the sensitivity of PCR and LAMP and the comparison of two different methods of DNA extraction. Milk samples were contaminated with known concentrations of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* and at the next step the bacterial DNA was extracted. DNA extraction was realized with two different methods. The first method that was used was a commercial kit and the second was an in house technique. The in house technique included boiling, ultrasound, chloroform with isoamyl alcohol, ethanol and freezing. The method of DNA extraction doesn't seem to affect significantly the limits of detection of PCR and LAMP. The limits of detection of PCR for *Listeria monocytogenes* that was extracted with the use of the commercial kit was  $10^2$  CFU/mL while of LAMP was  $10^3$  CFU/mL. Additionally the limits of detection of *Listeria monocytogenes* that was extracted with the in house technique was  $10^3$  CFU/mL for PCR and  $10^2$  CFU/mL for LAMP. For *Salmonella* Typhimurium the results showed that LAMP was slightly more sensitive than PCR. For this pathogen the sensitivity of LAMP was  $10^2$  CFU/mL for both extraction techniques, while the limits of detection in PCR was for the commercial kit  $10^3$  CFU/mL and for the in house technique  $10^2$  CFU/mL.

In conclusion, LAMP seems to be as good and at certain circumstances even better than PCR due to better sensitivity. Moreover LAMP provided results in 30 to 60 minutes at the steady temperature of  $65^\circ\text{C}$  while PCR needs around 4h since it demands a thermal cycle and an electrophoresis afterwards. Finally LAMP is more practical since it doesn't require expensive specialized equipment like PCR and can be used in labs with low resources



## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	6
Abstract .....	5
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή .....	11
1.1 <i>Salmonella spp.</i> .....	13
1.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	15
Κεφάλαιο 2: Βιβλιογραφική Ανασκόπηση .....	17
2.1 Μέθοδοι Ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών .....	17
2.1.1 Μέθοδοι καλλιέργειας .....	17
2.1.2 Μοριακές μέθοδοι .....	19
2.1.3 Ανοσολογικές μέθοδοι.....	32
2.1.4 Μέθοδοι ανίχνευσης με τη χρήση διαφορετικών αρχών .....	34
2.2 Επίδραση Διαφόρων Μεθόδων Επεξεργασίας Στα Βακτήρια .....	36
2.2.1 Επίδραση του βρασμού στα βακτήρια.....	36
2.2.2 Επίδραση των υπερήχων στα βακτήρια.....	36
2.3 Περίληψη ερευνών.....	37
Κεφάλαιο 3: Υλικά και μέθοδοι .....	42
3.1 Υλικά.....	42
3.2 Εξοπλισμός.....	43
3.3 Πειραματική διαδικασία.....	44
3.3.1 επιμόλυνση αρχικού δείγματος και δημιουργία των αραιώσεων ....	44
3.3.2 Μέθοδος απομόνωσης με τη χρήση υπερήχων και χλωροφορμίου	45
3.3.3 Μέθοδος απομόνωσης με τη χρήση υπερήχων σε συνδυασμό με χλωροφόρμιο και κατάψυξη .....	46
3.3.4 Μέθοδος απομόνωσης με συνδυασμό βρασμού, υπερήχων, χλωροφορμίου και κατάψυξης .....	47
3.3.5 παραλλαγή της μεθόδου απομόνωσης με συνδυασμό βρασμού, υπερήχων, χλωροφορμίου και κατάψυξης .....	47

3.3.6 πρώτη μέθοδος με την χρήση του εμπορικού kit PureLink Genomic DNA Mini kit Invitrogen (USA). .....	48
3.3.7 Απομόνωση με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel .....	50
3.3.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	52
3.3.9 Ηλεκτροφόρηση .....	53
3.3.10 Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου - LAMP (loop-mediated isothermal amplification).....	54
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα .....	56
Κεφάλαιο 5: Συμπέρασμα.....	92
Κεφάλαιο 6: Προτάσεις .....	94
Κεφάλαιο 7: Βιβλιογραφία .....	95

## Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

Οι τροφικές δηλητηριάσεις είναι ένας ευρύς και αναπτυσσόμενος παράγοντας κινδύνου της δημόσιας υγείας. Μπορούν να επηρεαστούν από αυτές τόσο αναπτυγμένες όσο και αναπτυσσόμενες χώρες. Οι μολυσμένες με μικροοργανισμούς τροφές είναι η κύρια αιτία διαρροϊκών ασθενειών. Μεταξύ των κυριότερων παθογόνων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στα τρόφιμα βρίσκονται η *Salmonella spp.*, η *Escherichia coli* O157:H7 και η *Listeria monocytogenes*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μολύνουν τους καταναλωτές μέσω της κατανάλωσης έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών, μαρουλιού, μοσχαριού, χοιρινού, κοτόπουλου καθώς και άλλων τροφίμων (Kim et al., 2020).

Ως τροφική δηλητηρίαση θεωρείται μία ασθένειά η οποία προκαλείται από την εισαγωγή στο σώμα ενός παράγοντα κινδύνου μέσω της κατάποσης ενός τροφίμου. Οι παράγοντες αυτοί εκτός από παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να είναι τοξίνες (Morya et al., 2020). Μαζικές μολύνσεις καταναλωτών από την κατανάλωση τροφίμων συνήθως συμβαίνουν σε κλειστές κοινωνίες όπου το φαγητό ετοιμάζεται και σερβίρεται για ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπων. Τέτοιες περιπτώσεις συναντάμε στην φοιτητική σίτιση, σε γηροκομεία, σε φυλακές, σε ξενοδοχεία καθώς και στην στρατιωτική σίτιση. Στην τελευταία περίπτωση ειδικά κάθε χρόνο αναφέρονται ένας σημαντικός αριθμός τροφικών δηλητηριάσεων με την αιτία αυτών να είναι ο κακός χειρισμός των τροφίμων κατά την προετοιμασία τους (Kunwar et al., 2013).

Οι τροφικές δηλητηριάσεις όχι μόνο αποτελούν μία σημαντική απειλή για την δημόσια υγεία αλλά επηρεάζουν και την οικονομία των διαφόρων χωρών. Ειδικότερα όσον αφορά την Ευρώπη παρόλο που τα προληπτικά μέτρα συνεχώς αυξάνονται το ίδιο συμβαίνει και με τον αριθμό των επιδημιών. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων (European Food Safety Authority-EFSA) από όλες τις ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνα βακτήρια η σαλμονέλλωση και η λιστερίωση ήταν υπεύθυνες για τους περισσότερους θανάτους το 2018 στην ευρωπαϊκή ένωση. Κατά συνέπεια η ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella spp.* και *Listeria monocytogenes* θεωρείται κρίσιμη (Papatheodorou et al., 2021).

Η αλυσίδα τροφίμων περιλαμβάνει την παραγωγή στην φάρμα, την μετέπειτα επεξεργασία, την μεταφορά προς το σημείο πώλησης, την λιανική πώληση και φτάνει

μέχρι και την κατάποση του τροφίμου. Κατά την πορεία του τροφίμου προς τον καταναλωτή καθώς αυτό περνάει από τα διάφορα στάδια της τροφικής αλυσίδας οι υπεύθυνοι αντιμετωπίζουν πολλούς παράγοντες κινδύνου. Αυτοί διακρίνονται στους μικροβιολογικούς παράγοντες, τους χημικούς παράγοντες, τους φυσικούς παράγοντες καθώς και στους παράγοντες που αφορούν την υγιεινή του περιβάλλοντος και του προσωπικού. Πολλά εκατομμύρια καταναλωτών αρρωσταίνουν, ενώ κάποιες χιλιάδες πεθαίνουν κάθε χρόνο. Ένας τρόπος ελέγχου των αιτιών των τροφικών δηλητηριάσεων είναι η εφαρμογή ενός συστήματος HACCP (ανάλυση κινδύνων και κρίσιμα σημεία ελέγχου). Το σύστημα HACCP λειτουργεί αποτρεπτικά και ακολουθεί μία συστηματική προσέγγιση στην ασφάλεια τροφίμων η οποία στοχεύει στην μείωση του κινδύνου μόλυνσης του καταναλωτή. Το σύστημα HACCP μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα τα στάδια της τροφικής αλυσίδας δηλαδή από την παραγωγή μέχρι την κατανάλωση (Alrasheed et al., 2021).

οι πιο σημαντικοί παράγοντες που ευθύνονται για πιθανές τροφικές λοιμώξεις είναι:

- το μη κατάλληλο μαγείρεμα
- η χρήση επιμολυσμένων σκευών για τον χειρισμό των τροφίμων
- η μη ασφαλής πηγή των πρώτων υλών
- η διατήρηση των τροφίμων σε μη ασφαλής θερμοκρασίες
- η μειωμένη υγιεινή του προσωπικού (Morya et al., 2020).



Εικόνα 1.1 Στατιστικά στοιχεία για τις τροφικές δηλητηριάσεις (World Health Organization-WHO)

### 1.1 *Salmonella spp.*

Η μόλυνση με μη τυφοειδή *Salmonella* συνήθως οδηγεί σε αυτόπεριοριζόμενη διάρροια με πολύ χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας. Εκτός από διαρροϊκές ασθένειες, η μη τυφοειδή *Salmonella* μπορεί να εισβάλει σε στείρους χώρους και να προκαλέσει βακτηριαιμία, μηνιγγίτιδα καθώς και άλλες εστιακές λοιμώξεις. Αυτές οι λοιμώξεις προέρχονται από την διεισδυτική μη τυφοειδής *Salmonella* και δεν προκαλούν συνήθως διάρροια αλλά παρουσιάζουν συμπτώματα μίας οποιαδήποτε εμπύρετης ασθένειας τα οποία δεν μπορούν να διακριθούν από τα συμπτώματα άλλων εμπύρετων ασθενειών. Η διεισδυτική μη τυφοειδής *Salmonella* έχει μεγαλύτερη θνησιμότητα από την μη διεισδυτική. Υποσιτισμένα παιδιά, ηλικιωμένοι άνθρωποι, φορείς του HIV καθώς και ασθενείς που πάσχουν από ελονοσία διατρέχουν ιδιαίτερο κίνδυνο. Τέτοιες λοιμώξεις παρουσιάζονται ιδιαίτερος στην υποσαχάρια Αφρική όπου ενδημούν οι *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Dublin και *Salmonella* Isangi (Stanaway et al., 2019).

Στην κίνα η *Salmonella* έχει αναγνωριστεί ως το δεύτερο πιο συχνό αίτιο τροφιμογενής βακτηριακής λοίμωξης προκαλώντας το 40% των λοιμώξεων αυτών. Η

*Salmonella* έχει συνδυαστεί με διάφορα είδη τροφίμων όπως για παράδειγμα το κοτόπουλο, τα αυγά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα θαλασσινά, τα λαχανικά καθώς και πολλά άλλα (Mei et al., 2019).

Στις ΗΠΑ εκτιμώνται γύρω στα 1,2 εκατομμύρια περιστατικά σαλμονέλλωσης κάθε χρόνο με πάνω από 23.000 από τα περιστατικά αυτά να νοσηλεύονται και 450 από αυτά να καταλήγουν στον θάνατο. Δεδομένα που είναι τα υψηλότερα όταν συγκρίνονται με τα δεδομένα από άλλα 31 από τα σημαντικότερα τροφιμογενή παθογόνα. Ενώ το κοτόπουλο και τα αυγά ευθύνονται για ένα ποσοστό γύρω στο 54% των λοιμώξεων από *Salmonella*, η νοσηλεία και οι θάνατοι από αυτή είναι περισσότερο συνδεδεμένη με την επιμόλυνση τροφίμων κατά την παραγωγή. Από το 1990 και μετά παρουσιάζονται όλο και περισσότερα περιστατικά από διάφορους ορότυπους *Salmonella* τα οποία έχουν αποδοθεί στην επιμόλυνση κατά την παραγωγή και έχουν συνδεθεί με διάφορα προϊόντα τροφίμων. Κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ 2005 και 2006 ωμές τομάτες επιμολυσμένες με *Salmonella* Newport, *Salmonella* Braenderup ή *Salmonella* Typhimurium οδήγησαν σε 4 κύματα έξαρσης με 459 επιβεβαιωμένα περιστατικά σε 21 πολιτείες. Το 2008 μία τεράστια έξαρση τροφολοιμώξεων με *Salmonella* Saintpaul η οποία αποδίδεται σε πιπεριές jalapeno και πιπεριές serrano οδήγησε σε 1500 περιστατικά σε 36 πολιτείες με 2 θανάτους. Το 2009 και το 2010 προκαλέθηκαν 419 περιστατικά σαλμονέλλωσης σε 36 πολιτείες από μόλυνση μέσω φύτρων alfafa. Πιο πρόσφατα το 2012 παρουσιάστηκαν 261 περιστατικά σε 24 πολιτείες μετά από την κατανάλωση κανταλούπε πεπονιού το οποίο ήταν επιμολυσμένο με *Salmonella* Typhimurium και *Salmonella* Newport (Yang et al., 2015).

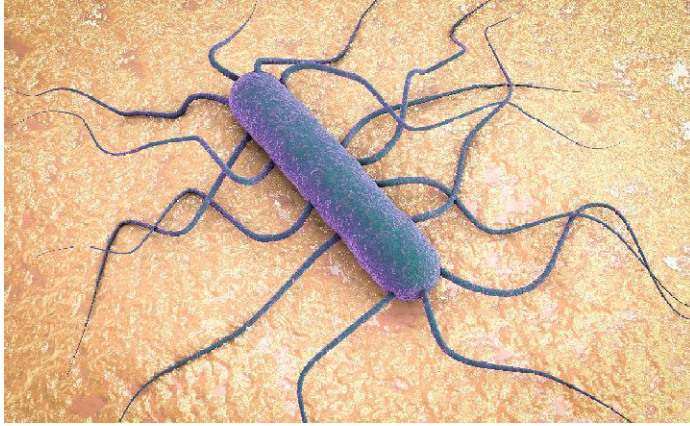


Εικόνα 1.2 Το βακτήριο της *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (<http://www.tranadiscovery.com/wp-content/uploads/2018/02/salmonella-.jpg>).

## 1.2 *Listeria monocytogenes*

Τα τελευταία χρόνια ο συνολικός αριθμός των κρουσμάτων τροφολοίμωξης από *Listeria monocytogenes* βρίσκεται σε άνοδο, με πολλές και διάφορες εστίες εκδήλωσης της νόσου της λιστερίωσης. Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα Gram-θετικό, ραβδοειδές βακτήριο. Είναι ένα ευρέως διαδεδομένο και ενδοκυτταρικό τροφιμογενές παθογόνο όπου κατά κύριο λόγο προκαλεί ανθρώπινη λιστερίωση. Η λιστερίωση χαρακτηρίζεται από σηψαιμία, μηνιγγίτιδα, γαστρεντερίτιδα, αποβολές στις εγκύους και μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας το οποίο είναι γύρω στο 20-30%. Το βακτήριο αυτό έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται σε ακραίες συνθήκες όπως είναι χαμηλές θερμοκρασίες, χαμηλό PH και υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων. Εξαιτίας του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού του καθίσταται ικανό να επιμολύνει και να επιβιώνει πάνω σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων όπως για παράδειγμα υδρόβια προϊόντα, λαχανικά, απαστερίωτο γάλα, έτοιμα για κατανάλωση τρόφιμα καθώς και μη μαγειρεμένα κρέατα. Η παθογένεια διαφέρει εντός των τύπων του ίδιου είδους ενώ ορισμένα προϊόντα διατροφής είναι συνδεδεμένα με συγκεκριμένους ορότυπους της *Listeria* (Li et al., 2021).

Τα συμπτώματα της λιστερίωσης είναι πιο πιθανό να εμφανιστούν σε άτομα μεγάλης ηλικίας, σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα καθώς και κατά την μετάδοση του βακτηρίου από τη μητέρα στο έμβryo. Η μόλυνση με το βακτήριο αποδείχτηκε ότι ήταν αίτιο της κατανάλωσης τροφίμων μόλις την δεκαετία του 1980. Παρόλο που η μόλυνση από το βακτήριο αυτό είναι σπάνια σε σχέση με την μόλυνση των ανθρώπων από άλλα παθογόνα βακτήρια, το μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας που παρουσιάζει το καθιστά υψίστης σημασίας για την δημόσια υγεία. Προσφάτως στη Νότια Αφρική 937 άτομα προσβλήθηκαν από την *Listeria monocytogenes* με το ποσοστό θνησιμότητας φτάνει το 27%. Επιπλέον το βακτήριο αυτό έχει ανιχνευτεί στα κόπρανα υγείων ανθρώπων όμως παραμένει ακόμα άγνωστο κατά πόσο συχνή είναι η παρουσία του βακτηρίου στα κόπρανα του γενικού πληθυσμού. Για τους παραπάνω λόγους η *Listeria monocytogenes* θεωρείται ένα ευκαιριακό βακτήριο (Disson et al., 2021).



Εικόνα 1.3 Το βακτήριο της *Listeria monocytogenes* ([https://www.rapidmicrobiology.com/rmbdata/userfiles/suppliers/merck\\_millipore/news/1921\\_Merck\\_Listeria.jpg](https://www.rapidmicrobiology.com/rmbdata/userfiles/suppliers/merck_millipore/news/1921_Merck_Listeria.jpg)).



## Κεφάλαιο 2: Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

### 2.1 Μέθοδοι Ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών

#### 2.1.1 Μέθοδοι καλλιέργειας

Οι μέθοδοι καλλιέργειας για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων είναι από τις παλιότερες μεθόδους αξιολόγησης της ασφάλειας ενός οποιουδήποτε προϊόντος τροφίμου. Παρά την ανάπτυξη νέων μεθόδων ανίχνευσης και παρά τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν οι μέθοδοι καλλιέργειας το πιθανότερο είναι ότι και τα επόμενα χρόνια, αυτές θα παραμείνουν οι βασικές μέθοδοι με ευρεία χρήση στην βιομηχανία τροφίμων. Έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι μέθοδοι καλλιέργειας στην Ευρώπη υπερσχύουν σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους, αφού αποτελούν ένα ποσοστό πάνω από 60% των συνολικών ελέγχων παθογόνων μικροοργανισμών. Ο λόγος που προτιμούνται οι μέθοδοι αυτοί εστιάζεται στα πλεονεκτήματα των μεθόδων αυτών. Οι μέθοδοι αυτοί:

- είναι απλοί
- έχουν χαμηλό κόστος,
- δίνουν την δυνατότητα διάκρισης μεταξύ ζωντανών και νεκρών μικροοργανισμών
- μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την απαρίθμηση των βακτηρίων του δείγματος.(Rohde et al., 2017).

Ταυτόχρονα όμως οι μέθοδοι αυτοί παρουσιάζουν και σημαντικά μειονεκτήματα. Τα βασικότερα μειονεκτήματα των μεθόδων καλλιέργειας είναι:

- Η μη επαρκής καταστολή της ανταγωνιστικής χλωρίδας
- Η δυσκολία στην διάκριση της μορφολογίας και της εμφάνισης των αποικιών του βακτηρίου στόχος από τις αποικίες των υπόλοιπων βακτηρίων
- Το μεγάλο χρονικό διάστημα που διαρκούν οι διαδικασίες της επώασης και του εμπλουτισμού
- Ο μεγάλος φόρτος εργασίας

Εξαιτίας των μειονεκτημάτων αυτών πολλές έρευνες εστιάζουν στην ανάπτυξη νέων υποστρωμάτων και τεχνικών για την βελτιστοποίηση των μεθόδων καλλιέργειας με σκοπό να αντιμετωπιστούν τα συγκεκριμένα μειονεκτήματα τους (Rohde et al., 2017)

### 2.1.1.1 Αντιμετώπιση προβλήματος μη επαρκούς καταστολής ανταγωνιστικής χλωρίδας

Η συγγενική σχέση της *Salmonella* με άλλα βακτήρια όπως για παράδειγμα με την *Escherichia coli*, τα *Cronobacter* και *Citrobacter* αποτελεί ένα μεγάλο πρόβλημα για την ανίχνευση της *Salmonella* με μεθόδους καλλιέργειας. Αυτοί οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται μεταξύ τους κατά των μη επιλεκτικό εμπλουτισμό ή και μπορούν να δώσουν λανθασμένα θετικά αποτελέσματα στα τεστ ανίχνευσης της *Salmonella*. Ειδικότερα σε τρόφιμα με υψηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο, χαμηλά επίπεδα *Salmonella* είναι πολύ πιθανό να μην καταφέρουν να αναπτυχθούν λόγω αυτού του μεγάλου ανταγωνισμού. Νέοι αναπτυσσόμενοι μέθοδοι συνδυάζουν ένα μοναδικό βήμα εμπλουτισμού σε ειδικό υπόστρωμα σε συνδυασμό με υψηλή θερμοκρασία το οποίο ακολουθείται από απομόνωση σε ένα χρωμογόνο Άγαρ. Η ειδικότητα των υποστρωμάτων καταστέλλουν την ανταγωνιστική χλωρίδα ενώ ταυτόχρονα οι αποικίες της *Salmonella* χρωματίζονται οπότε γίνεται πιο εύκολη η διάκριση τους (Margot et al., 2013).

### 2.1.1.2 Αντιμετώπιση της δυσκολίας διάκρισης της μορφολογίας και της εμφάνισης των αποικιών του βακτηρίου στόχος από τις αποικίες των υπόλοιπων βακτηρίων

Η λύση του δεύτερου μειονεκτήματος είναι παρόμοια με την λύση του πρώτου μειονεκτήματος. Τα χρωμογόνα Άγαρ όπως είναι τα RAPID agars (Bio-Rad) ή και το ChromID (bioMérieux) χρωματίζουν τις αποικίες και τις κάνουν να διακρίνονται ευκολότερα. Ο χρωματισμός αυτός οφείλεται σε ενζυματικές αντιδράσεις. Επιπροσθέτως οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν έναν επιλεκτικό εμπλουτισμό σε σύγκριση με τις ήδη υπάρχουσες μεθόδους. Το πιο πιθανό είναι ότι οι ενζυματικές αυτές αντιδράσεις οδηγούν στην κατακρήμνιση ή στην συγκέντρωση των χρωμογενών συστατικών μέσα στο κέντρο της αποικίας ή κοντά στην αποικία του βακτηρίου στόχος. Το χρωμογενές άγαρ είναι εξαιρετικά χρήσιμο σε είδη μικροοργανισμών όπως η *Escherichia coli* η οποία έχει πολλούς ορότυπους με υψηλή παθογένεια αλλά και ορότυπους που δεν μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια. Σε αυτή τη περίπτωση γίνεται εκμετάλλευση διαφορετικών ενζύμων για να επιτευχθεί η διάκριση μεταξύ των ορότυπων (Rohde et al., 2017).

### **2.1.1.3 Αντιμετώπιση του μεγάλου χρονικού διαστήματος που χρειάζεται για να δώσουν αποτελέσματα οι μέθοδοι καλλιέργειας**

Οι μέθοδοι καλλιέργειας για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών περιλαμβάνουν εμπλουτισμό, απομόνωση, βιοχημική ταυτοποίηση, επιβεβαίωση του ορότυπου και έλεγχο για τοξίνες, και μπορεί να διαρκέσουν από 3 έως 10 ημέρες (Kim et al., 2020). Όποτε γίνεται κατανοητό ότι ένα από τα βασικότερα μειονεκτήματα των μεθόδων καλλιέργειας είναι το μεγάλο χρονικό διάστημα που χρειάζεται για να δοθούν αποτελέσματα. Νέοι εναλλακτικοί μικροβιολογικοί μέθοδοι αποσκοπούν στην όσο το δυνατόν ελαχιστοποίηση του συνολικού χρόνου ανίχνευσης των μικροοργανισμών. Ως παράδειγμα αναφέρεται ο υγρός εμπλουτισμός δύο σταδίων για την ανίχνευση της *Salmonella enterica*. Το πρώτο στάδιο είναι ο μη επιλεκτικός εμπλουτισμός σε peptone water και το δεύτερο στάδιο είναι ένας εξαιρετικά επιλεκτικός εμπλουτισμός. Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται δύο επιλεκτικά άγαρ. Το ένα άγαρ είναι το XLD (xylose lysin desoxycholat agar) και το δεύτερο ένα άγαρ της επιλογής του ερευνητή. Πολλές από τις επικυρωμένες μεθόδους όπως είναι τα RAPID chromogenic plates (Bio-Rad) ή η IRIS *Salmonella/Compass Listeria* παρακάμπτουν την ανάγκη για των εμπλουτισμό δύο σταδίων καθώς και πολλαπλών άγαρ και προσφέρουν αποτελέσματα μόνο με την χρήση ενός σταδίου εμπλουτισμού και ενός άγαρ. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται εξοικονόμηση χρόνου ίσο τουλάχιστον με μία ημέρα (Rohde et al., 2017).

### **2.1.1.4 Αντιμετώπιση της επιβαρυνμένης εργασίας**

Η έλλειψη της αυτοματοποίησης είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα αυτών των τεχνικών. Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει από ερευνητές για την αντιμετώπιση αυτού του μειονεκτήματος. Μέσω αυτών των προσπαθειών, κατασκευαστές έχουν πλέον την δυνατότητα να προσφέρουν ημιαυτόματες μεθόδους, οι οποίες με την σειρά τους μειώνουν τον απαιτούμενο χρόνο και κόστος. Επιπλέον μπορούν να αυξήσουν τον αριθμό των δειγμάτων και να διευκολύνουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Ως παράδειγμα μίας τέτοιας μεθόδου αναφέρεται το TEMPO system της εταιρίας bioMerieux (Rohde et al., 2017).

## **2.1.2 Μοριακές μέθοδοι**

Οι μέθοδοι καλλιέργειας για την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων σε τρόφιμα παρόλο που είναι εξαιρετικά αξιόπιστες τεχνικές απαιτούν αρκετές ημέρες

για να δώσουν αποτελέσματα. Με την παγκόσμια παραγωγή τροφίμων να είναι σε άνοδο οι κλασσικές τεχνικές δεν μπορούν να καλύψουν τις απαιτήσεις. Σύμφωνα με τα παραπάνω η ανάπτυξη νέων μεθόδων χαμηλού κόστους και χρονικής διάρκειας θεωρείται απαραίτητη για την ταυτοποίηση των παθογόνων βακτηρίων. Ως αποτέλεσμα της προσπάθειας αυτής τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί τεχνικές βασισμένες στο DNA. Οι μοριακές αυτές τεχνικές, όπως ονομάζονται, χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση διαφόρων τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών λόγω της δυνατότητας τους να αναλύουν πολλά δείγματα ταυτόχρονα, της ταχύτητας τους, καθώς και της υψηλής ευαισθησίας τους (Paratheodorou et al., 2021).

Από την άλλη οι μοριακές τεχνικές παρουσιάζουν και ορισμένα μειονεκτήματα. Η πλειονότητα των μοριακών τεχνικών απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και εκπαιδευμένο προσωπικό, κατά συνέπεια η απομόνωση του DNA και η εκχύλιση του είναι πολύ ακριβή. Αυτό καθιστά τις τεχνικές αυτές μη κατάλληλες σε κλάδους μαζικής παραγωγής. Επιπλέον η περίπλοκη δομή ορισμένων τροφίμων μπορούν να επηρεάσουν τα τελικά αποτελέσματα (Paratheodorou et al., 2021). Τέλος ένα σημαντικό σημείο στο οποίο υστερούν οι μοριακές μέθοδοι σε σύγκριση με τις μεθόδους καλλιέργειας είναι η αδυναμία διάκρισης μεταξύ ζωντανών και νεκρών μικροοργανισμών (Rohde et al., 2017).

Ωστόσο υπάρχουν εναλλακτικές μοριακές μέθοδοι όπως είναι η Ισοθερμική Ενίσχυση μέσω Βρόγχου (LAMP) οι οποίες είναι περισσότερο ανθεκτικές στους αναστολείς. Η τεχνική της LAMP συγκεκριμένα έχει υψηλότερη ευαισθησία από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αφού χρησιμοποιεί περισσότερους εκκινητές. Επιπλέον είναι πιο απλή και λαμβάνει χώρα στη σταθερή θερμοκρασία των 65°C για 30-60 λεπτά. Αυτό σημαίνει ότι η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται ταχέως χωρίς την χρήση ακριβού εξοπλισμού (Paratheodorou et al., 2021).

Όπως προαναφέρθηκε οι μοριακοί μέθοδοι ανίχνευσης βασίζονται στο DNA και στο RNA. Αυτό συμβαίνει καθώς περιλαμβάνουν ένα πολύ μεγάλο μέγεθος πληροφοριών, το οποίο δίνει την δυνατότητα στις μεθόδους αυτές να διακρίνουν τα κύτταρα που είναι στόχοι από τα κύτταρα που δεν είναι στόχοι. Οι μοριακές μέθοδοι είναι δημοφιλή στην Βόρεια Αμερική και αποτελούν το 30% από τις συνολικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στα

τρόφιμα. Το αντίστοιχο ποσοστό στην Ευρώπη είναι κάτω από 10%. (Rohde et al., 2017).

Η επιλογή του κατάλληλου στόχου είναι εξαιρετικά κομβικό σημείο στις μοριακές τεχνικές. Για την ανίχνευση της *Salmonella* έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα γονίδια. Μερικά από αυτά είναι τα γονίδια *invA*, *hilA*, *fimA*, *fliC*, *stn* καθώς και άλλα. Όμως κάποια από αυτά δεν είναι παρόντα σε όλους τους ορότυπους του μικροοργανισμού, ενώ άλλα μπορούν να δώσουν ακόμα και ψευδή θετικά αποτελέσματα κατά τον έλεγχο άλλων μικροοργανισμών. Η έλλειψη ενός γονιδίου-στόχου που περιλαμβάνεται σε όλους τους ορότυπους της *Salmonella* και αποκλειστικά μόνο στην *Salmonella* αποτελεί ένα μεγάλο εμπόδιο για την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών στον έλεγχο των τροφίμων. Αυτό καθιστά απαραίτητη την εύρεση πιο εξειδικευμένων γονιδίων και την προσεκτική αξιολόγηση τους. Η εύρεση των κατάλληλων γονιδίων είναι όλο και πιο εύκολο να πραγματοποιηθεί λόγω της προόδου της τεχνολογίας, αφού όλο και περισσότερες ακολουθίες γονιδίων είναι διαθέσιμες στην βάση δεδομένων της NCBI(National Center For Biotechnology Information) (Shang et al., 2021).

Παρόλο που οι μέθοδοι που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα θεωρούνται συχνά ταυτόσημοι με την PCR περιλαμβάνουν και μεθόδους όπως η fluorescence in situ hybridization (FISH) και η LAMP. Τα κιτ της ANSR(amplified nucleic single reactions) της Neogen corporation μπορούν εντός 40 λεπτών να ανιχνεύσουν *Salmonella* και *Listeria* μετά από τον εμπλουτισμό. Παρομοίως η 3M μοριακή μέθοδος ανίχνευσης(3M food safety) είναι επίσης βασισμένη στην ισόθερμη ενίσχυση και οδηγεί σε αποτελέσματα μέσω αλλαγής χρωματισμού και για το οποίο χρειάζεται μόνο μία πλάκα θέρμανσης και ένα αναγνώστη φθορίζοντος φωτός. Η προαναφερθείσα μέθοδος είναι ιδανική για εργαστήρια με περιορισμένους πόρους.

#### **Οι μοριακές τεχνικές μπορούν να διακριθούν σε:**

- Τεχνικές μη ισόθερμης ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος
  - PCR
  - multiplex PCR
  - nested PCR
- Τεχνικές ισόθερμης ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος
  - LAMP (loop-mediated isothermal amplification)
  - SDA (Strand displacement amplification)

- MDA (multiple displacement amplification)
- RCA (rolling circle amplification)
- HDA (helicase displacement amplification)

### 2.1.2.1 Τεχνικές μη ισόθερμης ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος

#### PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία ταχεία και ευαίσθητη μέθοδος και χρησιμοποιείται ευρέως για την γρήγορη ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων. Η διαδικασία για την ανίχνευση των βακτηρίων περιλαμβάνει κυρίως την απομόνωση του νουκλεϊκού οξέος, τον πολλαπλασιασμό του και την ανίχνευση του. Τα τελευταία χρόνια διαφορετικές μέθοδοι της PCR χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση διάφορων βακτηρίων. Τέτοιες είναι η κλασική PCR, η real-time PCR, η multiplex PCR, η immune PCR και η microfluidic PCR. Η microfluidic PCR έρχεται όλο και περισσότερο στο επίκεντρο εξαιτίας του μικρότερου χρόνου που απαιτεί για την ανίχνευση του βακτηρίου, της αυτοματοποιημένης διαδικασίας, του χαμηλότερου κινδύνου επιμόλυνσης και του χαμηλότερου κόστους της. Όμως ακόμα δεν έχει δοθεί η απαραίτητη προσοχή στην απομόνωση του νουκλεϊκού οξέος από πολύπλοκα δείγματα τροφίμων το οποίο είναι προαπαιτούμενο για την επιτυχία της μεθόδου καθώς και επίσης επηρεάζει την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου (Zhang et al., 2018).

Ένα παράδειγμα πραγματοποίησης της αντίδρασης της PCR αναφέρεται στην παρακάτω έρευνα. Σε αυτή την έρευνα για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ήταν 95°C για 10 λεπτά το οποίο ακολουθούταν από 35 κύκλους από τα εξής στάδια:

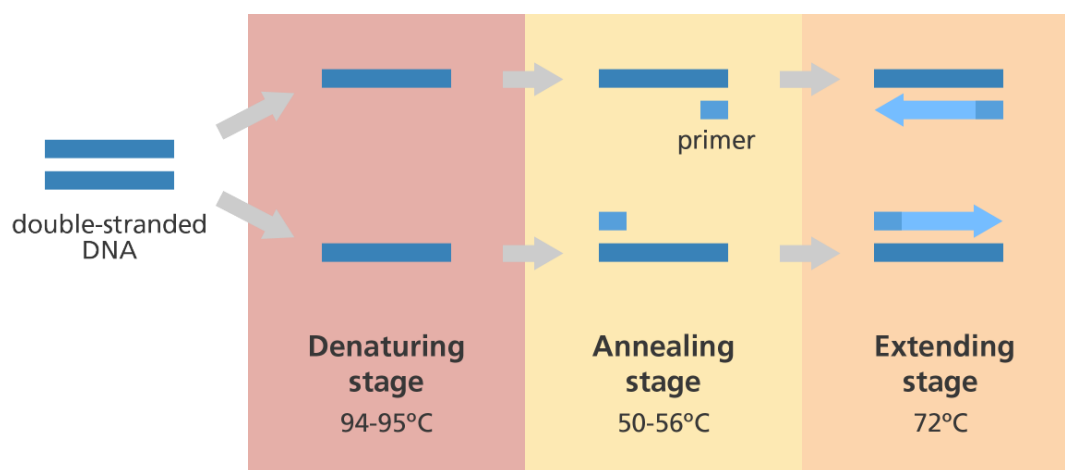
- αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα,
- προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο στους 55°C για 30 δευτερόλεπτα
- επιμήκυνση των εκκινητών στους 72°C για 1 λεπτό.

Η τελευταία επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στην ίδια θερμοκρασία για 10 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της PCR τα προϊόντα της αναλύθηκαν με την πραγματοποίηση μίας ηλεκτροφόρησης και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αναλύθηκαν κάτω από υπεριώδη φως. Ο ολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μl τα οποία αποτελούνται από 12,5 μl TB Green Premix Ex Taq II (TaKaRa, Biotech,

Dalian, China), 1 μl από τον κάθε εκκινητή, 8,5 μl απιονισμένο νερό και 2 μl από το απομονωμένο DNA του δείγματος (Li et al., 2021).

Ωστόσο πέρα από τα πολλά πλεονεκτήματα της PCR και της real-time PCR υπάρχουν και αρκετά μειονεκτήματα. Τέτοια είναι το υψηλό κόστος του εξοπλισμού, ο χρόνος που απαιτεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρηση η οποία ακολουθεί την PCR, η ανάγκη για εργαστηριακό χώρο, καθώς και η ανάγκη για εκπαιδευμένο προσωπικό. Αυτά τα μειονεκτήματα αποτρέπουν την χρήση της PCR σε χώρους με λιγοστούς πόρους (Priya et al., 2020).

Στόχο της PCR είναι να ενισχύσει το DNA-στόχο δημιουργώντας πολλά αντίτυπά του. Αυτό γίνεται με την επιλογή δύο εκκινητών. Οι δύο αυτοί εκκινητές είναι ειδικοί για κάθε βακτήριο και κάθε ένα έχει διαφορετικούς εκκινητές. Επιπλέον για την ανίχνευση ενός βακτηρίου μπορεί να προτιμηθούν διάφορα ζευγάρια εκκινητών. Η επιλογή των εκκινητών εξαρτάται από την ακολουθία του νουκλεϊκού οξέος που θέλουμε να ενισχύσουμε. Στην κλασσική PCR για την ταυτοποίηση του βακτηρίου είναι υποχρεωτική η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, η οποία όπως και αναφέρθηκε θεωρείται μία διαδικασία χρονοβόρα. Η real-time PCR ή αλλιώς ποσοτική PCR είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος έως σήμερα. Κατά την διάρκεια της PCR μετρίεται το αυξανόμενο φως φθορισμού που εκπέμπεται. Καθώς αυτή η τεχνική δεν απαιτεί ηλεκτροφόρηση, μικραίνει αρκετά ο χρόνος που χρειάζεται για να ληφθούν αποτελέσματα (Kim et al., 2020).



Εικόνα 2.1 Η αρχή λειτουργίας της PCR

([https://www.yourgenome.org/sites/default/files/illustrations/process/pcr\\_cycle\\_yourgenome.png](https://www.yourgenome.org/sites/default/files/illustrations/process/pcr_cycle_yourgenome.png))

Συνεπώς είναι φυσικό επακόλουθο την σήμερα ημέρα η PCR και η qPCR(quantitative PCR) να είναι οι μοριακές μεθόδους που χρησιμοποιούνται περισσότερο. Παρόλο που ο εξοπλισμός και τα αναλώσιμα είναι ακριβά οι τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως στα εργαστήρια των περισσότερο αναπτυγμένων χωρών και είναι σχεδιασμένα για εφαρμογές με υψηλή απόδοση. Έχουν αναπτυχθεί καινοτομίες πάνω σε αυτές τις μεθόδους που προσφέρουν την δυνατότητα να παραληφθεί η ηλεκτροφόρηση. Ως παράδειγμα αναφέρεται η Veriflow technology(invisible sentinel) όπου χρησιμοποιείται η παραδοσιακή PCR και ακολουθείται από μία οριζόντια ανάλυση ροής(vertical flow assay). Με αυτή τον τρόπο επιδιώκεται η περαιτέρω αυτοματοποίηση της PCR και η μείωση του χρόνου όπου ο ερευνητής έχει ενεργό ρόλο στην διαδικασία. Ως άλλο παράδειγμα αναφέρονται τα QIAGEN Mericon kits (Qiagen GmbH) που μπορούν να τρέξουν αυτόνομα μέσω του συστήματος QIASymphony system (Qiagen GmbH) που είναι μία ρομποτική πιπέτα για την εξαγωγή DNA/RNA. Επιπλέον μπορεί να βοηθήσει και στο σχεδιασμό της PCR και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Παρομοίως το διάλυμα IQ-check prep solution είναι συμβατό με τα επικυρωμένα IQ-Check Real-time PCR kits (Bio-Rad). Άλλο ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό είναι η ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων μικροοργανισμών μέσω ενός τεστ όπως είναι το GeneDisc technology(Pall Gene-Disc technologies)(Rohde et al., 2017).

Όσον αφορά τις κλασσικές μεθόδους PCR αυτοματοποιημένα συστήματα για την ισόθερμη ενίσχυση είναι διαθέσιμα όπως είναι το atlas system το οποίο ενισχύει το RNA με την ενίσχυση μέσω μεταγραφής(transcription-mediated amplification-TMA). Οι μέθοδοι LUMIPROBE 24 (EUROPROBE SA) και η ACCUPROBE (biomerieux) είναι συστήματα τα οποία χρησιμοποιούν τεχνικές ανίχνευσης βασισμένες στον υβριδισμό τα οποία επίσης στοχεύουν στο ριβοσωματικό RNA των βακτηρίων. Τέτοιοι μέθοδοι οι οποίοι στοχεύουν σε πιο εύθραυστες δομές από ότι οι μέθοδοι που στοχεύουν στο DNA έχουν σαν ένα πρόσθετο πλεονέκτημα την βελτιωμένη διάκριση μεταξύ νεκρών και ζωντανών κυττάρων (Rohde et al., 2017).

### ***Multiplex PCR***

Η multiplex PCR (mPCR) έχει την δυνατότητα να στοχεύει περισσότερες από μία ακολουθίες, καθώς χρησιμοποιεί επιπλέον ζευγάρια εκκινητών στην αντίδραση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εξοικονόμηση χρόνου και κόπου στο εργαστήριο χωρίς όμως να υπονομεύεται η ποιότητα και η αποτελεσματικότητα της ανάλυσης (Prabakaran et al., 2017).



Πιο συγκεκριμένα η mPCR είναι μία ανάλυση η οποία έχει μειωμένο κόστος και προσφέρει ταχεία και αποτελεσματική ανίχνευση πολλαπλών στόχων. Έχει ευρεία χρήση και βρίσκει εφαρμογή στην ανίχνευση μικροοργανισμών, στην έκφραση γονιδίων, στην αλληλουχία γονιδιώματος, στην εγκληματολογία καθώς και την διάγνωση ασθενειών. Ωστόσο για την εκπόνηση αυτής της ανάλυσης θα πρέπει να προσαρμόζεται συνεχώς η αναλογία των εκκινητών για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της άνισης ενίσχυσης των στόχων (Xu et al., 2016).

Η mPCR μπορεί να μειώσει τα συνολικό χρόνο την ανάλυσης έως και 3 ώρες. Ταυτόχρονα εκτός από την εξοικονόμηση χρόνου η συγκεκριμένη τεχνική προκαλεί και μείωση του κόστος της ανάλυσης έως και 60% σε σύγκριση με την κλασσική PCR (Aziz et al., 2021).

#### *Nested pcr*

Συχνά όταν σε ένα δείγμα το βακτηριακό φορτίο βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα είναι πολύ δύσκολο αυτό να αναλυθεί καταλλήλως. Ωστόσο το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με την χρήση της Nested PCR (nPCR) (Prabakaran et al., 2017).

Η nPCR αποτελείται από δύο διαδοχικές PCR με την δεύτερη να χρησιμοποιεί τα προϊόντα της πρώτης σαν εκμαγείο για την αντίδραση. Με αυτό τον τρόπο η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης βελτιώνεται αισθητά. Η τεχνική αυτή επίσης παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση για τους εκκινητές του δεύτερου γύρου, αφού λειτουργούν μόνο εάν η ακολουθία των εκκινητών και των προϊόντων του πρώτου γύρου ταιριάζουν απόλυτα (Zhenyan et al., 2021).

Ενώ σύγχρονα εργαστήρια χρησιμοποιούν την real-time PCR για την ανίχνευση βακτηρίων λόγω της ευαισθησίας της μεθόδου, άλλα εργαστήρια ιδιαίτερος αυτά με περιορισμένους πόρους χρησιμοποιούν την nested-PCR (nPCR). Κατά την μέθοδο η πρώτη PCR χρησιμοποιεί ένα ζευγάρι εξωτερικών εκκινητών, ενώ στη συνέχεια η δεύτερη PCR χρησιμοποιεί ένα ζευγάρι εσωτερικών εκκινητών. Συνήθως η πρώτη PCR εφαρμόζεται για να ενισχύσει την πολύ μικρή ποσότητα DNA που διατίθεται. Σε σύγκριση με την κλασσική PCR, η nPCR είναι μία πολύ ευαίσθητη τεχνική και για αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση και ανίχνευση εξαιρετικά χαμηλής ποσότητας του DNA στόχου. Όσον αφορά την ακρίβεια της μεθόδου η nPCR μειώνει πολύ την πιθανότητα να παραχθούν και να ενισχυθούν μη επιθυμητά προϊόντα. Αυτό συμβαίνει επειδή τα προϊόντα που παράγονται κατά την αρχική PCR δεν πολλαπλασιάζονται στην δεύτερη, διότι δεν περιέχουν την

ακολουθία στην οποία θα συνδεθούν οι εσωτερικοί εκκινητές (Shatleh-Rantisi et al., 2020).

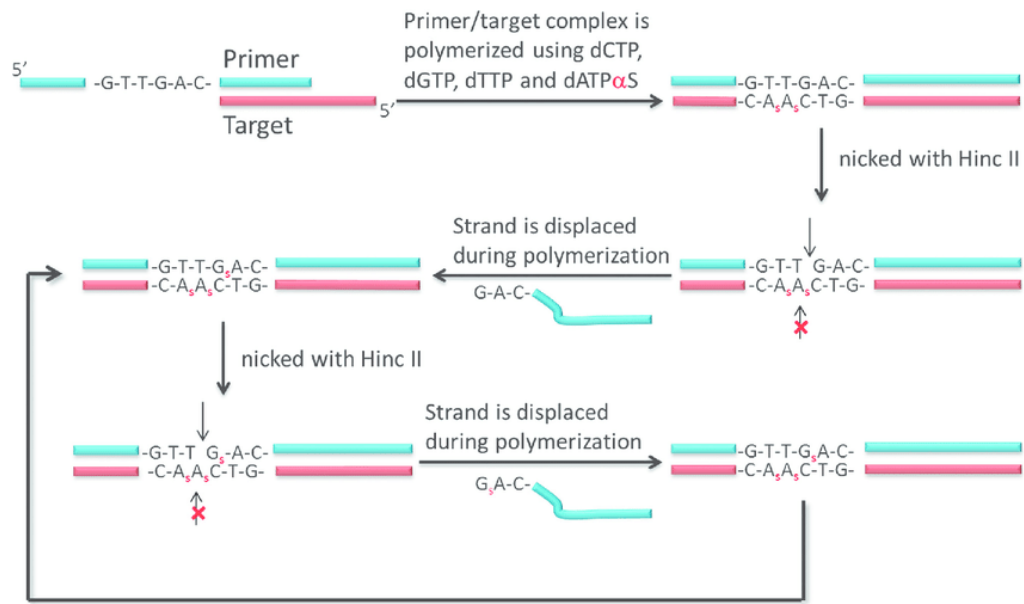
### *2.1.2.2 Τεχνικές ισόθερμης ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος*

#### *Ενίσχυση εκτόπισης αλυσίδας (SDA-Strand displacement amplification)*

Η ισόθερμη ενίσχυση εκτόπισης αλυσίδας μπορεί να παράγει πάνω από  $10^9$  αντίγραφα μιας ακολουθίας στόχος σε λιγότερο από 20 λεπτά στην θερμοκρασία των  $49^{\circ}\text{C}$ . Τα παραπάνω στοιχεία κάνουν την SDA μία από τις πιο γρήγορες ισόθερμες μεθόδους ενίσχυσης του DNA. Η εκθετική ενίσχυση της μεθόδου προκαλείτε από επαναλαμβανόμενο "κόψιμο", επέκταση και εκτόπιση ενός κλώνου του DNA (Toley et al., 2015).

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου στην ενίσχυση του στόχου μπορεί να συγκριθεί με την αποτελεσματικότητα της PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται έχουν δύο λειτουργίες. Αρχικά αναγνωρίζουν την ακολουθία του DNA στόχος καθώς επίσης και την ακολουθία της περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Σε αυτή τη μέθοδο ένα δίκλωνο μόριο DNA χωρίζεται σε δύο μονόκλωνες πολυπεπτιδικές αλυσίδες με την χρήση μιας αρχικής θερμότητας. Επειδή στη μέθοδο χρησιμοποιείται μία θειικά τροποποιημένη τριφωσφορική αδενοσίνη αντί για την κλασική τριφωσφορική αδενοσίνη ο κλώνος του DNA τροποποιείται με αυτή και δεν δρα πάνω σε αυτή το περιοριστικό ένζυμο HincII. Συνεπώς το περιοριστικό ένζυμο δρα πάνω στον κλώνο του αρχικού εκκινητή αλλά όχι στον νέοσυντιθεμένο κλώνο του DNA (Deng & Gao, 2015).

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ικανότητα κάποιων πολυμεράσων να συνθέσουν ένα κλώνο DNA προς την άκρη 3 ενώ ταυτόχρονα εκτοπίζουν τους κλώνους DNA που θα συναντήσουν κατά την σύνθεση. Επιπλέον βασίζεται στην ικανότητα του περιοριστικού ενζύμου να κόβει τον απροστάτευτο κλώνο του εκκινητή στο σημείο αναγνώρισης αφήνοντας το συμπληρωματικό του κλώνο ανέπαφο (Deng & Gao, 2015).



Εικόνα 2.2 Η αρχή λειτουργίας της SDA

(<https://www.researchgate.net/profile/Herman-Sintim/publication/260915985/figure/fig2/AS:400727328477187@1472552248366/First-generation-strand-displacement-amplification-SDA-The-primer-has-HincII.png>).

#### *Ενίσχυση πολλαπλής εκτόπισης (MDA- multiple displacement amplification)*

Η MDA αποτελεί μία παραλλαγή της SDA, αφού και οι δύο ισόθερμες τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων βασίζονται στην ίδια αρχή ενίσχυσης. Η MDA χρησιμοποιεί μία DNA πολυμεράση με μεγάλη ικανότητα εκτόπισης κλώνων DNA, ενώ επίσης χρησιμοποιεί πολλαπλούς εκκινητές. Ενώ οι εκκινητές συνδέονται με τον κλώνο εκμαγείο του DNA στόχος και επεκτείνονται με τη βοήθεια της πολυμεράσης στην 5'-3' κατεύθυνση, η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα φτάνει στο σημείο εκκίνησης της σύνθεσης της γειτονικής αλυσίδας, που επεκτείνεται παράλληλα με αυτή. Η αλυσίδα που βρίσκεται πιο κοντά στην άκρη 5' εκτοπίζει την αλυσίδα που συναντάει κατά την επέκτασή της. Στη συνέχεια η εκτοπισμένη αλυσίδα θα χρησιμοποιηθεί σαν εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου κλώνου DNA (Deng & Gao, 2015).

Η ικανότητα ενίσχυσης της MDA είναι πολύ σημαντική καθώς μπορεί από μία ελάχιστη ποσότητα νουκλεϊκού οξέος πολύ γρήγορα να συνθέσει ολόκληρο γονιδίωμα χωρίς να απαιτείται η απομόνωση και η κάθαρση του νουκλεϊκού οξέος. Η MDA χρησιμοποιείται ευρέως για την ενίσχυση γονιδιωμάτων και επιτρέπει στους ερευνητές την ανάλυση ολόκληρου γονιδιώματος για την εξέταση της παρουσίας πολλαπλών γονιδίων (Deng & Gao, 2015).

### *Ενίσχυση κυλιόμενου κύκλου (RCA-Rolling circle amplification)*

Η RCA είναι μία ισόθερμη ενζυματική διαδικασία. Σε αυτή ένα μικρός στόχος νουκλεϊκού οξέος, που μπορεί να είναι είτε DNA είτε RNA, ενισχύεται με την χρήση ενός κυκλικού DNA εκμαγείου. Η ενίσχυση γίνεται με την βοήθεια μιας DNA ή RNA πολυμεράσης και σχηματίζονται δεκάδες με εκατοντάδες αντίγραφα συμπληρωματικά του DNA του κυκλικού κλώνου εκμαγείου. Εναλλακτικά ένα γραμμικό DNA θα χρειαστεί πρώτα να μετασχηματιστεί σε κυκλικό για να ενισχυθεί με αυτή τη μέθοδο. Σε αντίθεση με την PCR που απαιτεί θερμικό κύκλο άρα και μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, η RCA πραγματοποιείται σε μία σταθερή θερμοκρασία μεταξύ των 30-65 °C. Ως μία από τις πιο δημοφιλείς ισόθερμες τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος, η RCA παρουσιάζει μεγάλες προοπτικές για χρήση σε βιοιαισθητήρες και βιοαναλύσεις. Η RCA δρα σε κυκλικά DNA ή RNA για παράδειγμα αναφέρονται το DNA πλασμιδίων, το DNA βακτηριοφάγων και το RNA των ιών. Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται την ικανότητα της πολυμεράσης για εκτόπιση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας του DNA ή RNA στόχος (Deng & Gao, 2015).

### *Ενίσχυση βασιζόμενη στην ελίκωση (HAD-Helicase-dependent amplification)*

Ο μηχανισμός ενίσχυσης της HDA παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τον μηχανισμό ενίσχυσης της PCR. Για να διενεργηθεί η ενίσχυση ισόθερμα αντί για την χρήση θερμότητας για την μετουσίωση και των διαχωρισμό των δυο αλυσίδων του DNA χρησιμοποιείται η ελικάση. Επιπλέον χρησιμοποιούνται δεσμευτικές ως προς το DNA πρωτεΐνες για να αποτραπεί ο υβριδισμός των διαχωρισμένων αλυσίδων. Η τεχνική αυτή θυμίζει την αντιγραφή του DNA στους ζωντανούς οργανισμούς αφού όπως και στην φύση χρησιμοποιείται το ίδιο ένζυμο για την ευθυγράμμιση του κατά την αντιγραφή, η ελικάση. Συνεπώς η ελικάση είναι αυτή που επιτρέπει την μέθοδο να πραγματοποιείται ισόθερμα, ενώ ταυτόχρονα διατηρεί εκθετική την δύναμη ενίσχυσης του DNA στόχος(Deng & Gao, 2015).

Κατά την τεχνική ενίσχυσης πρώτα ξεδιπλώνεται η έλικα του DNA λόγω της επίδρασης της ελικάσης. Στη συνέχεια συνδέονται οι εκκινήτες και μετά η πολυμεράση στην ακολουθία στόχος. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι πραγματοποιείται ισόθερμα χωρίς όμως να απαιτεί αρχική υψηλή θερμοκρασία. Άλλες ισόθερμες τεχνικές απαιτούν αρχική υψηλή θερμοκρασία πριν την έναρξη της διαδικασίας για τον αρχικό διαχωρισμό της αλυσίδας του DNA. Σαν

μειονέκτημα της μεθόδου αναφέρεται η απαίτηση για βελτιστοποίηση των συνθηκών του πειράματος για κάθε διαφορετική ενίσχυση πριν την διενέργεια της μεθόδου τροποποιώντας την σύνθεση του buffer και το ζευγάρι εκκινητών (Deng & Gao, 2015).

### *Ισοθερμική Ενίσχυση μέσω Βρόγχου - Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)*

Μεταξύ όλων των ισόθερμων μεθόδων ενίσχυσης του νουκλεϊκού οξέος η LAMP είναι η πιο εκτενώς μελετημένη. Με τη πάροδο του χρόνου έχει αναλυθεί σε μεγάλο βαθμό και θεωρείται μία τεχνική που μπορεί να προσφέρει αξιόπιστες λύσεις. Η LAMP προτάθηκε για πρώτη φορά το 2000 και περιγράφηκε ως μία ταχεία και με υψηλή αποδοτικότητα μέθοδο ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από το σχήμα η βασική αρχή της μεθόδου είναι η κυκλική εκτόπιση κλώνου DNA υπό παρουσία μιας DNA πολυμεράσης με ισχυρή ικανότητα εκτόπισης κλώνων DNA σε σταθερή θερμοκρασία (Deng & Gao, 2015).

Η LAMP είναι γνωστή για την απλότητα, την μεγάλη ευαισθησία που την διακατέχει καθώς και ταχύτητα της. Συγκρινόμενη με την PCR και την real-time PCR τα σημεία που φαίνεται να υπερτερεί η τεχνική της LAMP είναι η δυνατότητα να ολοκληρώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα και στο ότι απαιτεί σχετικά λίγους πόρους. Η αντίδραση της LAMP πραγματοποιείται με τη βοήθεια της Bst DNA πολυμεράση και ένα πακέτο από 4 έως 6 εκκινητές οι οποίοι μπορούν να στοχεύουν την νουκλεοτιδική αλυσίδα σε 6 ή 8 διαφορετικά σημεία, ενώ επιπλέον απαιτεί σταθερή θερμοκρασία που η τιμή αυτής θα κυμαίνεται από τους 60°C έως τους 65°C. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι έχει ανεκτικότητα απέναντι στους αναστολείς που συνήθως επιδρούν πάνω στην PCR. Επιπροσθέτως τα προϊόντα που παράγονται από την αντίδραση της LAMP μπορούν εύκολα να διακριθούν με το γυμνό μάτι με την προσθήκη μιας ποικιλίας χρωστικών οι οποίες παρεμβάλουν το DNA. Τέτοιες χρωστικές είναι η SYBR Green I, SYTO, calcein, hydroxyl naphthol blue (HNB) και επιτρέπουν στους ερευνητές να παρατηρήσουν την αλλαγή χρώματος του διαλύματος (Lee et al., 2019).

Μετά το πέρας της ενίσχυσης το γονίδιο στόχος μπορεί να παρατηρηθεί είτε από την ύπαρξη ενός άσπρου ιζήματος στον πυθμένα (πυροφωσφορικό μαγνήσιο) είτε από την αλλαγή χρώματος. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η αλλαγή χρώματος θα πραγματοποιηθεί με τη προσθήκη της κατάλληλης χρωστικής. Η αρχική θέρμανση για την μετουσίωση του DNA δεν είναι πάντα απαραίτητη. Αφού οι εκκινητές

υβριδιστούν με τις συμπληρωματικές τους ακολουθίες πραγματοποιείται η ενίσχυση του DNA σε σταθερή θερμοκρασία των 65°C. Η εν λόγω ενίσχυση μπορεί εύκολα να τερματιστεί με την άνοδο της θερμοκρασίας του μείγματος στους 80°C για 2 λεπτά. Η μέθοδος αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε RNA στόχο με την προϋπόθεση στο μείγμα να είναι παρών και το ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης. Η αντίστροφη μεταγραφάση προκαλεί την μετατροπή του RNA σε cDNA με αποτέλεσμα να μπορεί να ενισχυθεί με την τεχνική της LAMP(Deng & Gao, 2015).

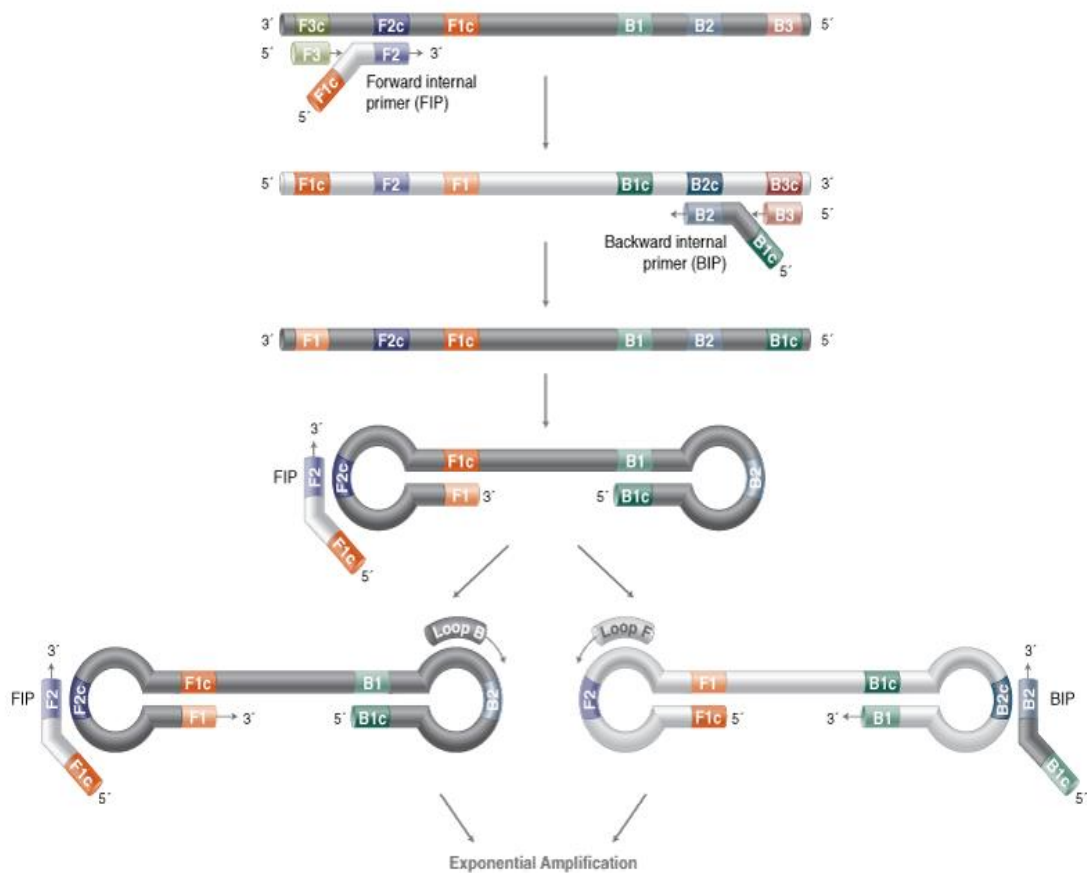
Με την βοήθεια των 4 με 6 εκκινητών της η τεχνική της LAMP έχει την δυνατότητα να παράγει έως και 10<sup>9</sup> αντίγραφα της ακολουθίας του DNA στόχος εντός της πρώτης ώρας. Όπως αναφέρθηκε και πριν η μεγαλύτερη διαφορά της τεχνικής αυτής από την μέθοδο της PCR είναι ότι πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία. Μέχρι στιγμής έχουν αναπτυχθεί πολλές αναλύσεις LAMP για την ανίχνευση της *Salmonella*. Αυτές οι αναλύσεις έχουν εξεταστεί και με την χρήση κάποιων τροφίμων. Συγκεκριμένα τα τρόφιμα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι κυρίως αυγά και αγροτικά προϊόντα όπως είναι τα φρούτα και τα λαχανικά. Παρόλα αυτά η τεχνική αυτή δεν έχει αξιολογηθεί χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών ορότυπων της *Salmonella*, ενώ επιπλέον δεν έχει αξιολογηθεί χρησιμοποιώντας διαφορετικά τρόφιμα κάτω από συνθήκες που μιμούνται τις πραγματικές συνθήκες επιμόλυνσης (Yang et al., 2015).

Η τεχνική της LAMP πρώτα εφαρμόστηκε για την ανίχνευση μικροοργανισμών και ιών όπως ο ιός H-5. Επιπλέον έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του φύλλου εμβρύων ενώ επίσης έχει βρει εφαρμογή σε αναλύσεις ιών, βακτηρίων, παρασίτων και μυκήτων. Σε ορισμένες περιπτώσεις το όριο ανίχνευσης φτάνει τα 5 αντίγραφα με αποτέλεσμα η ευαισθησία της ανάλυσης να μπορεί να συγκριθεί ή και να ξεπεράσει ανοσολογικές αναλύσεις καθώς και αναλύσεις PCR. Το γεγονός ότι η τεχνική της LAMP γίνεται ισόθερμα σε χαμηλότερη θερμοκρασία από την τεχνική της PCR έχει ως αποτέλεσμα την δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε κλινικά δείγματα όπως ορούς καθώς και δείγματα ολικού αίματος με ελάχιστη ή και μηδαμινή προετοιμασία δείγματος. Στα αρνητικά περιλαμβάνονται η πολυπλοκότητα στον σχεδιασμό των εκκινητών η οποία παρεμποδίζει την ευρεία εφαρμογή της. Για τον σχεδιασμό των εκκινητών σημαντική είναι η συμβολή της βιοπληροφορικής(Deng & Gao, 2015).

Η χρήση της Bst DNA πολυμεράση είναι αυτή που επιτρέπει την πραγματοποίηση της τεχνικής σε σταθερή θερμοκρασία εξαλείφοντας την ανάγκη για

θερμικό κύκλο. Επομένως δίνεται η δυνατότητα να πραγματοποιηθεί απλά σε ένα υδατόλουτρο ή σε ένα θερμικό μπλοκ. Η αντίδραση δίνει  $10^6$ - $10^9$  αντίγραφα του DNA-στόχου μέσα σε 30 με 60 λεπτά κάτω από σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 60-65°C. Επιπλέον η θετική αντίδραση της LAMP δίνει μία μεγάλη ποσότητα λευκού ιζήματος του πυροφωσφορικού μαγνησίου που επιτρέπει την εύκολα οπτική ανάγνωση των αποτελεσμάτων της. Εξαιτίας την εξαιρετικής απόδοσης η τεχνική LAMP είναι κατάλληλη για την ανίχνευση συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών σε έναν μεγάλο εύρος δειγμάτων (Shang et al., 2021).

Εργαλεία για την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο την διαδικασίας της LAMP είναι εμπορικώς διαθέσιμα. Αυτά τα εργαλεία βασίζονται στην μέτρηση του σχηματιζόμενου ιζήματος του πυροφωσφορικού μαγνησίου στο δείγμα το οποίο είναι ένα από τα παραπροϊόντα της αντίδρασης. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η τεχνική επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την δραστηριότητα της πολυμεράσης και ακολούθως επηρεάζει και της αποδοτικότητά της. Επομένως η LAMP απαιτεί ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας και προσεχτική προσαρμογή της σε κάθε ανάλυση. Αυτό κάνει την LAMP ακατάλληλη για χρήση σε περιοχές με περιορισμένους πόρους. Παρόλα αυτά η δημοτικότητα της τεχνικής είναι δεδομένη με πολλές έρευνες να έχουν πραγματοποιηθεί και ένα μεγάλο αριθμό εμπορικά διαθέσιμων kit να βασίζονται πάνω σε αυτή. Όλα αυτά προδιαθέτουν περαιτέρω έρευνα πάνω στη μέθοδο για τη δημιουργία και την ανάπτυξη νέων πιο αποτελεσματικών αναλύσεων στο προσεχές μέλλον (Deng & Gao, 2015).



Εικόνα 2.3 Απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της LAMP ([https://international.neb.com/-/media/nebus/page-images/products/isothermal-amplification/lamp\\_overview\\_1119.png?h=571&w=800&rev=2f2f12faab3548f0b9e2672612efb5a9&hash=F3061A209BE58FEDC7AD8BD6042825B3](https://international.neb.com/-/media/nebus/page-images/products/isothermal-amplification/lamp_overview_1119.png?h=571&w=800&rev=2f2f12faab3548f0b9e2672612efb5a9&hash=F3061A209BE58FEDC7AD8BD6042825B3)).

### 2.1.3 Ανοσολογικές μέθοδοι

Οι ανοσολογικές μέθοδοι στις μικροβιολογία τροφίμων βασίζονται στην εξειδικευμένη σύνδεση μεταξύ αντισώματος και του αντιστοιχού στόχου του. Σε αντίθεση με τις μοριακές τεχνικές ο στόχος αυτών των μεθόδων δεν είναι συνήθως το DNA και RNA αλλά πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Αυτό τους επιτρέπει να μπορούν να διακρίνουν στενά συγγενικούς ορότυπους, το οποίο είναι ένα πολύ δύσκολο εγχείρημα στις μοριακές μεθόδους. Οι γενικοί περιορισμοί που ισχύουν στις μοριακές μεθόδους ισχύουν και στις ανοσολογικές μεθόδους. Ένας τέτοιος περιορισμός είναι ο διαχωρισμός μεταξύ νεκρών και ζωντανών μικροοργανισμών, αφού μετά το θάνατο οι στόχοι των μεθόδων αυτών παραμένουν ανέπαφοι. Επιπλέον η ειδικότητα των αντισωμάτων είναι πολύ δύσκολο να καθοριστεί καθώς πιθανή διασταυρούμενη



αντιδραστικότητα δεν μπορεί να προβλεφθεί εύκολα. Κάτι τέτοιο δεν ισχύει και στις μοριακές μεθόδους όπου μελετώντας την βάση δεδομένων των νουκλεοτιδίων δίνεται η δυνατότητα επιλογής εκκινητών με εξαιρετική εξειδίκευση προς την ακολουθία στόχος. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ανίχνευσης βακτηρίων με την βοήθεια ανοσολογικών μεθόδων. Μεταξύ αυτών των μεθόδων η πιο γνωστή από όλες είναι η ELISA(enzyme-linked immunosorbent assays). Στην ELISA ένα αντίσωμα συνδέεται με το αντίστοιχο ένζυμο. Άλλα τεστ χρησιμοποιούν αντισώματα καλυμμένα από μαγνητικές σφαίρες για την συγκέντρωση του βακτηρίου στόχος και των διαχωρισμό του από άλλα βακτήρια(Rohde et al., 2017).

Οι ανοσολογικές μέθοδοι επιπλέον μπορούν να μειώσουν τον χρόνο που απαιτούν οι μοριακές μέθοδοι και οι μέθοδοι καλλιέργειας μέσω την μείωσης του χρόνου του εμπλουτισμού. Εμπορικά kit όπως τα pathatrix kits(life technologies corporation) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εμπλουτισμό των βακτηρίων τα οποία στη συνέχεια ανιχνεύονται μέσω των προαναφερθεισών μεθόδων. Τα LFA(lateral flow assays) είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα αφού είναι πολύ βολικά και εύκολα στην χρήση. Τα singlepath(merck kgaA/EMD chemical inc.), rapidchek select(Romer labs) και το DuPont lateral flow system (DuPont Nutrient & Health) προσφέρουν την δυνατότητα για την ταχεία ανίχνευση διάφορων τροφιμογενών παθογόνων. Ενώ το Duopath Verotoxins δίνει την επιπλέον δυνατότητα για τη ανίχνευση και των στελεχών που παράγουν τοξίνες. Τέλος τα Rapidchek Select *Salmonella* kits εκμεταλλεύονται τους βακτηριοφάγους οι οποίοι μειώνουν των ποσότητα συνοδευτικών και ανταγωνιστικών βακτηριακών ειδών με αποτέλεσμα να βελτιώνουν την επιτυχή ανίχνευση του βακτηρίου στόχος (Rohde et al., 2017).

Πίνακας 2.1 Περιγραφή βασικών μεθόδων ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα (Rohde et al., 2017)

Μέθοδοι ανίχνευσης	Μέθοδοι καλλιέργειας	Μοριακές μέθοδοι	Ανοσολογικές μέθοδοι
Αρχή μεθοδολογίας	Εμπλουτισμός και βακτηριακή ανάπτυξη σε ειδικό υπόστρωμα	Εμπλουτισμός και ανίχνευση συγκεκριμένης ακολουθίας DNA και RNA ενός βακτηρίου	Εμπλουτισμός και ανίχνευση συγκεκριμένων ειδικών αντιγόνων από αντισώματα
Πλεονεκτήματα	Ανίχνευση μόνο ζωντανών βακτηρίων, ταυτοποίηση συγκεκριμένου είδους	Ταχύτερες από τις μεθόδους καλλιέργειας και αξιόπιστες μέθοδοι	Γρήγορη και εύκολη ανίχνευση
Μειονεκτήματα	Χρονοβόρες με υψηλό φόρτο εργασίας	Μη δυνατή η διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών μικροοργανισμών. Χρήση ακριβού εξοπλισμού	Μη δυνατή η διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών μικροοργανισμών, διασταυρούμενη αντίδραση των αντισωμάτων

#### 2.1.4 Μέθοδοι ανίχνευσης με τη χρήση διαφορετικών αρχών

Εκτός από τις αρχές ανίχνευσης και την πληθώρα επικυρωμένων μεθόδων που αναφέρθηκαν υπάρχουν και άλλες τεχνολογίες που έχουν αναπτυχθεί οι οποίες βασίζονται σε διαφορετικές αρχές ανίχνευσης από αυτές που έχουν αναφερθεί. Τρεις από αυτές τις μεθόδους φαίνεται να έχουν ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και είναι άξιες αναφοράς. Αυτές είναι η ταυτοποίηση απομονωμένων βακτηρίων μέσω φασματομετρίας μάζας, η χρήση μικροσυστοιχιών και οι μέθοδοι ανίχνευσης βασισμένοι στους βακτηριοφάγους.

### *Φασματομετρία μάζας*

Τα τελευταία χρόνια η τεχνική της φασματοφωτομετρίας μάζας έχει αναπτυχθεί ραγδαία. Αυτή επιτρέπει την ταχεία ταυτοποίηση του βακτηρίου καθώς επίσης δίνει την δυνατότητα στους ερευνητές να ταυτοποιήσουν ακόμα και το στέλεχος ενός συγκεκριμένου βακτηρίου. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σαν εναλλακτική στις κλασσικές μοριακές τεχνικές. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, το αποτέλεσμα της φασματοφωτομετρίας μάζας συγκρίνεται με τα αποτελέσματα μίας βάσης δεδομένων. Κατασκευαστές όπως η Bruker Daltonics (MALDI Biotyper) προσφέρουν εμπορικά συστήματα που είναι γενικά εύκολα στον χειρισμό. Ωστόσο η τεχνική αυτή παρουσιάζει και ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα. Τα μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών εστιάζονται στο κόστος των συστημάτων, την προετοιμασία των δειγμάτων, την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων της καθώς και ειδικότερα στα προβλήματα ανίχνευσης βακτηρίων στην περίπτωση ανάλυσης μείγματος διάφορων βακτηρίων (Rohde et al., 2017).

### *Μικροσυστοιχίες*

Οι κλασσικές μέθοδοι συνήθων στοχεύουν ένα παθογόνο ανά ανάλυση. Σε αντίθεση με την πλειονότητα των μεθόδων καλλιέργειας οι μικροσυστοιχίες καλύπτουν ακολουθίες χιλιάδων μικροοργανισμών. Με την χρήση των μικροσυστοιχιών όχι μόνο η μικροβιακή ταυτοποίηση είναι δυνατή αλλά και ο έλεγχος για την αντοχή στα αντιβιοτικά καθώς και ο έλεγχος για την παρουσία ικών παραγόντων. Αυτή η μέθοδος θεωρείται η γέφυρα μεταξύ των φθηνών μεθόδων PCR και των ακριβών μεθόδων προσδιορισμού αλληλουχίας υψηλής απόδοσης (high-throughput sequencing). Εξαιτίας των υψηλών δυνατοτήτων και του συνεχούς μειωμένου κόστους των μεθόδων προσδιορισμού αλληλουχίας υψηλής απόδοσης είναι εξαιρετικά πιθανή η ολική αντικατάσταση των μεθόδων των μικροσυστοιχιών από αυτές (Rohde et al., 2017).

### *Μέθοδοι που βασίζονται στην χρήση των βακτηριοφάγων*

Αυτές οι μέθοδοι εκμεταλλεύονται την φυσική ιδιότητα των βακτηριοφάγων να μολύνουν τα κύτταρα στόχους. Αυτή η ιδιότητα δίνει ένα τεράστιο πλεονέκτημα στην μέθοδο αυτή αφού η δυνατότητα διάκρισης ζωντανών και νεκρών βακτηρίων φτάνει στα επίπεδα των μεθόδων καλλιέργειας. Οι βακτηριοφάγοι που χρησιμοποιούνται μπορούν να εκπέμπουν φθορίζον φως ή να έχουν βιοφωτάγεια. Στις μεθόδους αυτές το δείγμα αναμειγνύεται με τους βακτηριοφάγους και αφήνεται για ένα μικρό χρονικό διάστημα έτσι ώστε να γίνει η επιμόλυνση των βακτηρίων από

αυτούς. Στη συνέχεια προστίθεται ένας ιοκτόνος παράγοντας για να καταστραφούν οι βακτηριοφάγοι που περισσεύουν αλλά όχι αυτοί που έχουν μολύνει τα βακτήρια. Αυτές είναι μέθοδοι είναι φθηνές ωστόσο η αντίσταση των βακτηρίων στους βακτηριοφάγους αποτελεί πρόβλημα και απαιτεί την χρήση ενός μείγματος αυτών(Rohde et al., 2017).

## **2.2 Επίδραση Διαφόρων Μεθόδων Επεξεργασίας Στα Βακτήρια**

### **2.2.1 Επίδραση του βρασμού στα βακτήρια**

Οι υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να προκαλέσουν μεταβολές στις εξωτερικές μεμβράνες των βακτηρίων. Στα Gram-αρνητικά βακτήρια μπορεί να προκληθεί βλάβη στις εξωτερικές μεμβράνες ακόμα και με ένα ήπιο θερμικό σοκ. Μορφολογικές και δομικές μεταβολές καθώς και απώλεια λιποπολυσακχαριτών (LPS) των εξωτερικών μεμβρανών έχουν αναφερθεί ,λόγω υψηλών θερμοκρασιών, με αποτέλεσμα την απώλεια της ελεγχόμενης διαπερατότητας τους. Επιπλέον μετουσιώνονται οι μορφολογικές και δομικές πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να προκαλείται θερμική απενεργοποίηση του κυττάρου . Η μετουσίωση των πρωτεϊνών των μεσόφιλων βακτηρίων σχετίζεται άμεσα με τον θάνατο τους (Russell, 2003).

### **2.2.2 Επίδραση των υπερήχων στα βακτήρια**

Όταν υγρά σώματα επεξεργάζονται με υπερήχους συμβαίνουν σε αυτά χημικές και φυσικές μεταβολές ως αποτέλεσμα ενός φαινομένου που ονομάζεται σπηλαιώση. Σπηλαιώση είναι ο σχηματισμός, η διόγκωση και η ενδόρρηξη μικροσκοπικών φυσαλίδων στο υγρό, εξαιτίας της ενέργειας που απορροφούν μόρια του υγρού από τους υπερήχους. Αν τα ηχητικά κύματα είναι αρκετά ισχυρά θα αντισταθμίσουν τις δυνάμεις έλξης μεταξύ των μορίων και θα σχηματίσουν φυσαλίδες αερίων. Εάν συνεχίζει να εισέρχεται μέσα στο υγρό ενέργεια από τους υπέρηχους οι φυσαλίδες θα διογκώνονται μέχρι να φτάσουν ένα κρίσιμο μέγεθος. Σε αυτό το κρίσιμο μέγεθος οι φυσαλίδες θα καταρρεύσουν εσωτερικά . Η ενέργεια που θα απελευθερωθεί από την ενδόρρηξη της φυσαλίδας θα προκαλέσει φυσικές και χημικές μεταβολές στο υγρό. Όταν το φαινόμενο της σπηλαιώσης είναι αρκετά ισχυρό προκαλούνται φυσικές μεταβολές όπως η ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, η απελευθέρωση σωματιδίων από στερεές επιφάνειες καθώς και η

καταστροφή σωματιδίων και οργανισμών μέσω της σύγκρουσης τους ή με το βίαιο διαχωρισμό των οργανισμών (Dehghani, 2005).

Η ενδόρρηξη των φυσαλίδων είτε καταστρέφει τα βακτήρια με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω, είτε τα καταστρέφει χημικά εξαιτίας του σχηματισμού ελεύθερων ριζών( $H^+$  και  $OH^-$ ) στο εσωτερικό των φυσαλίδων. Οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται πάνω στην χημική δομή του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και το εξασθενούν, οδηγώντας το στην αποσύνθεση (Al Bsoul et al., 2010).

Επιπλέον όταν σχηματίζονται και καταστρέφονται φυσαλίδες μέσα σε υγρό δημιουργούνται ακραίες συνθήκες σε αυτό. Αυτές οι ακραίες συνθήκες επιδρούν μηχανικά στο υγρό με αποτέλεσμα την δημιουργία κρουστικών κυμάτων και υψηλών διατμητικών δυνάμεων. Η δημιουργία των παραπάνω φαινομένων βλάπτουν την φυσική δομή των βακτηρίων με αποτέλεσμα να αποδυναμώνουν ή ακόμα και να καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα αυτών. Επιπροσθέτως η κατάρρευση των φυσαλίδων μπορεί να προκαλέσει τοπικά ακραίες θερμοκρασίες σε διάφορα σημεία του υγρού. Οι ακραίες αυτές θερμοκρασίες επιδρούν πάνω στην ακεραιότητα του εξωτερικού στρώματος των βακτηρίων κάνοντας τα πιο ευαίσθητα στην επίδραση των ελεύθερων ριζών πάνω σε αυτά (Zuranc et al., 2019).

## 2.3 Περίληψη ερευνών

Στην βιβλιογραφία έχουν μελετηθεί αρκετά οι μέθοδοι ανίχνευσης του βακτηριακού DNA. Οι Sharif & Tayeb, (2021) στην εργασία τους είχαν ως σκοπό την εύρεση του  $LOD_{50}$  της *Salmonella* Typhimurium σε τεχνητά επιμολυσμένο κοτόπουλο με ταυτόχρονη σύγκριση των ορίων ανίχνευσης δύο διαφορετικών μεθόδων, των κλασσικών μεθόδων καλλιέργειας και της μεθόδου PCR. Με τον όρο  $LOD_{50}$  εννοείται το επίπεδο μόλυνσης κατά το οποίο 50% των δειγμάτων δίνουν θετικό αποτέλεσμα κατά την ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν διάφορες αραιώσεις της *Salmonella* Typhimurium για την επιμόλυνση του τροφίμου, ενώ στην συνέχεια έγινε εμπλουτισμός του βακτηρίου. Η μέθοδος καλλιέργειας παρουσίασε  $LOD_{50}=1,76$  CFU/ml, ενώ η μοριακή μέθοδος  $LOD_{50}=0,18$  CFU/ml. Επιπλέον η μοριακή μέθοδος της PCR έδωσε αποτελέσματα σε μικρότερο χρόνο από την μέθοδο καλλιέργειας παρουσιάζοντας πολλαπλά οφέλη κατά την ανάλυση των δειγμάτων κοτόπουλου.

Αυτή η σύγκριση των μεθόδων ανίχνευσης συνεχίστηκε και μεταξύ μοριακών τεχνικών. Στην έρευνα τους οι Vichaibun & Kanchanaphum (2020) είχαν ως σκοπό την σύγκριση της αποδοτικότητας τεσσάρων διαφορετικών μοριακών μεθόδων κατά την ανάλυση δειγμάτων κοτόπουλου. Οι μέθοδοι που συγκρίθηκαν ήταν η LAMP, η ποσοτική LAMP (qLAMP), η PCR και η qPCR. Τα δείγματα κοτόπουλου συλλέχθηκαν από τοπικές αγορές της Ταϊλάνδης και επιμολύνθηκαν. Επωάστηκαν για 6 ώρες και έγινε ο εμπλουτισμός τους για 2 ώρες, ώστε να προσομοιωθούν καλύτερα οι πραγματικές συνθήκες επιμόλυνσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας η LAMP, η qLAMP και η qPCR ανίχνευσαν το βακτήριο της *Salmonella* σε όλα τα δείγματα κοτόπουλου, σε αντίθεση με την κλασική PCR η οποία ανίχνευσε τον μικροοργανισμό μόνο στα 8 από τα 30 δείγματα. Ειδικότερα η μέθοδος της LAMP και της qLAMP φάνηκαν να είναι περισσότερο γρήγορες και αξιόπιστες μέθοδοι με μεγάλες μελλοντικές προοπτικές. Από όλες τις μεθόδους που αναλύθηκαν, η μέθοδος της qLAMP ξεχώρισε περισσότερο αφού παρουσίασε καλύτερη αποδοτικότητα σε θέματα ευαισθησίας και ταχύτητας.

Εξαιτίας των εξαιρετικών προοπτικών της LAMP υπάρχουν αρκετές έρευνες στην βιβλιογραφία οι οποίες επικεντρώθηκαν στην απόπειρα ανάπτυξης μιας αποτελεσματικής ισοθερμικής ενίσχυσης μέσω βρόγχου. Ως παράδειγμα αναφέρεται η έρευνα του Chen et al., (2015) που είχε ως σκοπό την ανάπτυξη και μελέτη μίας μεθόδου LAMP για την γρήγορη ανίχνευση διάφορων ορότυπων του παθογόνου βακτηρίου της *Salmonella*, καθώς και την σύγκριση της με την μοριακή μέθοδο PCR. Οι τρεις ορότυποι που μελετήθηκαν ήταν η *Salmonella* Typhimurium, η *Salmonella* Choleraesuis και η *Salmonella* Entititidis. Για την ανίχνευση των παραπάνω ορότυπων οι ακολουθίες του DNA της *Salmonella* που επιλέχθηκαν ως στόχοι της μεθόδου ήταν η *invE*, η *fliC*, η *lygD* και η STM4495. Η χρήση του γονιδίου *invE* ως στόχου της LAMP έδωσε θετικά αποτελέσματα αφού πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η ανίχνευση των ορότυπων της *Salmonella*, ενώ ταυτόχρονα δεν δόθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα μέσω της ανίχνευσης άλλων βακτηρίων. Με βάση αυτό φαίνεται ότι η μέθοδος της LAMP παρουσιάζει υψηλή ακρίβεια. Τα όρια ανίχνευσης της *Salmonella* στην LAMP ήταν  $2.0 \times 10^1$  CFU/mL ενώ στην PCR ήταν  $2.33 \times 10^3$  CFU/mL. Αυτό σημαίνει ότι η LAMP παρουσιάζει καλύτερα όρια ανίχνευσης από την PCR και επομένως μεγαλύτερη ευαισθησία. Ταυτόχρονα η LAMP παρουσιάζει επιπλέον πλεονεκτήματα, όπως είναι το γεγονός ότι πραγματοποιείται σε ισόθερμες συνθήκες, ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί απλά σε ένα υδατόλουτρο και δεν απαιτεί

εξειδικευμένα εργαστηριακά όργανα ενώ επιπλέον δίνει την δυνατότητα για οπτική ανάγνωση των αποτελεσμάτων μέσω χρωματικής μεταβολής των δειγμάτων. Η έρευνα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η LAMP για την ανίχνευση της *Salmonella* είναι μία απλή μέθοδος με μεγάλη ακρίβεια, μεγάλη ευαισθησία και χαμηλό κόστος.

Εκτός από την ανάπτυξη μιας τεχνικής LAMP για το βακτήριο της *Salmonella* έγιναν επίσης προσπάθειες για ανάπτυξη τεχνικών LAMP οι οποίες στοχεύουν σε άλλους μικροοργανισμούς. Ως μέρος της προσπάθειας αυτής αναφέρονται οι παρακάτω δύο έρευνες. Ο Tang et al., (2011) έθεσε ως στόχο το σχεδιασμό και την αξιολόγηση μίας ισοθερμικής ενίσχυσης μέσω βρόγχου (LAMP) για την ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*. Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που είχαν ως στόχο το γονίδιο *hlyA* του βακτηρίου. Η μέθοδος ανίχνευσης έλαβε χώρα σε ένα υδατόλουτρο θερμοκρασίας 65°C για 40 λεπτά. Η μέθοδος LAMP παρουσίασε όριο ανίχνευσης 2.0 CFU/ml, ενώ η PCR  $2 \times 10^2$  CFU/ml δηλαδή παρουσίασε 100 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία. Σε μία άλλη έρευνα Ο Khan et al., (2018) σύγκρινε τις δύο μεθόδους για την ανίχνευση του παθογόνου *Alternaria solani*. Επιπλέον στην εργασία εκτός από την LAMP και την PCR μελετήθηκαν και η nested PCR (nPCR) καθώς και η quantitative real-time PCR (RT-qPCR). Οι παραπάνω μέθοδοι συγκρίθηκαν όσον αφορά την διάρκεια τους, την ευαισθησία τους και την αξιοπιστία τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος LAMP ήταν ταχύτερη αφού ολοκληρώθηκε σε λιγότερο από 60 λεπτά στην θερμοκρασία των 63°C, πιο αξιόπιστη και με 10 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από την κλασσική PCR. Η nPCR έδειξε 100 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από την LAMP και 1000 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από την PCR, ενώ η μέθοδος με την μέγιστη ευαισθησία ήταν η qPCR αφού είχε 10 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από την nPCR. Παρόλο που η LAMP δεν ήταν η πιο ευαίσθητη μέθοδος, ήταν η πιο απλή και η πιο ταχεία μέθοδος, ενώ παράλληλα ήταν και πιο ακριβής από την qPCR. Όλα τα παραπάνω οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η LAMP φαίνεται να έχει την μεγαλύτερη προοπτική συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους που μελετήθηκαν.

Όμως η αποτελεσματικότητα της μεθόδου δεν εξαρτάται μόνο από τον μικροοργανισμό που μελετείται αλλά και από το τρόφιμο. Η Birmpa et al., (2015) στην έρευνα της επιμόλυνε με τα βακτήρια *Salmonella* Enteritidis και *Listeria monocytogenes* 4 διαφορετικά είδη τροφίμων. Τα τρόφιμα που επιμόλυνε ήταν μαρούλι, φράουλες, πράσινα κρεμμύδια και βύσσινο. Ο σκοπός της έρευνας ήταν να

αξιολογηθεί σε τι βαθμό επηρεάζουν τα τρόφιμα τα όρια ανίχνευσης των μικροοργανισμών, καθώς και κατά πόσο η ύπαρξη ενός σταδίου εμπλουτισμού μπορεί να βελτιώσει την ευαισθησία της LAMP. Με τη χρήση της LAMP τα παθογόνα βακτήρια ανιχνεύθηκαν σε χρονικό διάστημα χαμηλότερο των 60 λεπτών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα όρια ανίχνευσης επηρεάστηκαν από το είδος του τροφίμου που επιμολύνθηκε καθώς και ότι η ύπαρξη ενός βήματος εμπλουτισμού βελτίωσε τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου αφού το σύνολο των δειγμάτων έδωσαν θετικό αποτέλεσμα ακόμα και στις αρχικά μικρότερες αραιώσεις. Όπως και οι προηγούμενες έρευνες έτσι και αυτή έδειξε ότι είναι η μέθοδος LAMP είναι φθηνή, γρήγορη, καινοτόμα και με προοπτικές για μελλοντική εκτεταμένη χρήση στην βιομηχανία τροφίμων.

Επιπλέον στην βιβλιογραφία υπάρχουν έρευνες οι οποίες αξιολόγησαν πως ένα στάδιο επώασης μπορεί να επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα μιας μεθόδου ανίχνευσης του βακτηριακού DNA, ως παράδειγμα αναφέρεται η παρακάτω εργασία Στην εργασία του ο Tirfoni et al., (2017) είχε ως σκοπό τον έλεγχο της απόδοσης μιας μεθόδου ανίχνευσης η οποία βασίζεται σε μία ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου(LAMP). Η μέθοδος αυτή αξιολογήθηκε με βάση την ακρίβεια και την ευαισθησία της κατά ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε διάφορα γαλακτοκομικά τρόφιμα. Η ακρίβεια της μεθόδου αξιολογήθηκε με την χρήση 42 διαφορετικών στελεχών της *Listeria monocytogenes*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας όλα τα στελέχη της *Listeria monocytogenes* ανιχνεύθηκαν με επιτυχία. Αυτό σημαίνει ότι ήταν σωστή η επιλογή του γονιδίου *hlyA* του παθογόνου βακτηρίου ως το γονίδιο στόχο της LAMP. Η ευαισθησία της μεθόδου αξιολογήθηκε μελετώντας 4 διαφορετικά στελέχη *Listeria monocytogenes* προερχόμενα από διαφορετικές πηγές. Όσον αφορά την ευαισθησία η έρευνα αυτή έδειξε ότι το όριο ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes* διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος που μελετάτε και διακυμαίνεται μεταξύ 10-400 CFU/ml. Επιπλέον μελετήθηκε και η ανίχνευση σε δείγματα τροφίμων πολύ χαμηλών αρχικών φορτίων με την προσθήκη ενός βήματος επώασης μετά από την επιμόλυνση των δειγμάτων. Η επώαση διήρκησε 18, 24 και 48 ώρες. Το μικροβιακό φορτίο μετά από επώαση 18 και 24 ωρών δεν ήταν αρκετό για την ανίχνευση του μικροοργανισμού στην πλειονότητα των δειγμάτων, ενώ μετά από 48 ώρες σχεδόν όλα τα δείγματα έδωσαν θετικό αποτέλεσμα κατά την ανάλυση. Το όριο ανίχνευσης που παρουσίασε η μέθοδος μετά την προσθήκη του βήματος της επώασης είναι 5 CFU/ml



Πέρα από τις μεθόδους ανίχνευσης είναι εξίσου σημαντικές και οι μέθοδοι απομόνωσης του βακτηριακού DNA. Η Dimitrakopoulou et al., (2020) στην έρευνα της είχε ως σκοπό την σύγκριση 5 εμπορικών kit που είναι διαθέσιμα στην αγορά με μία πιο φθηνή και ταχεία εναλλακτική μέθοδο απομόνωσης του DNA την μέθοδο του βρασμού. Για την σύγκριση των παραπάνω μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά τρόφιμα τα οποία ήταν ελιές, αυγοτάραχο, σταφίδες και μπέικον. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η μέθοδος βρασμού ήταν αποτελεσματική στην εξαγωγή του DNA και στα 4 τρόφιμα, υπερσχύοντας των εμπορικών kit. Επιπλέον ήταν φθηνότερη αυτών, απλούστερη και ταχεία.

Τέλος μία έρευνα που αξίζει να αναφερθεί είναι η έρευνα του Paratheodorou et al., (2021). Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν πρώτων η ανάπτυξη μιας καινοτόμου, απλής και με χαμηλό κόστος μέθοδο εξαγωγής βακτηριακού DNA από δείγματα τροφίμων και νερού επιμολυσμένα με τα παθογόνα βακτήρια *Listeria monocytogenes* και *Salmonella Typhimurium*. Δεύτερον η σύγκριση τους με δύο εμπορικά kit εξαγωγής DNA(Qiagen, Macherey-Nagel) και τρίτων η σύγκριση δύο μοριακών μεθόδων ανίχνευσης του βακτηριακού DNA (PCR με ηλεκτροφόρηση και LAMP), ώστε να βρεθεί ο καλύτερος συνδυασμός μεθόδου εξαγωγής και ανίχνευσης DNA. Οι μέθοδοι θα συγκριθούν με βάση την ευαισθησία, το κόστος, την ταχύτητα και την απλότητα τους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εργασίας και με βάση τα παραπάνω κριτήρια η καλύτερη μέθοδος εξαγωγής βακτηριακού DNA ήταν μία in-house τεχνική η οποία βασίζεται στη χρήση χλωροφορμίου με ισοαμυλική αλκοόλη. Η τεχνική αυτή συγκρινόμενη με τα εμπορικά kit παρουσίασε στατιστικά παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά την ευαισθησία, έχοντας ωστόσο υψηλότερη ταχύτητα και χαμηλότερο κόστος. Τέλος όσον αφορά τις τεχνικές ανίχνευσης του βακτηριακού DNA, η μέθοδος LAMP υπερίσχυσε της PCR εξαιτίας της απλότητας, του μικρότερου χρόνου διάρκειας και της ευαισθησίας της. Συμπερασματικά ο συνδυασμός της in-house τεχνικής με την μέθοδο ανίχνευσης LAMP φάνηκε να είναι ο προτιμότερος.

## Κεφάλαιο 3: Υλικά και μέθοδοι

Πίνακας 3.1 Οι μέθοδοι απομόνωσης και ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Μέθοδοι απομόνωσης DNA	Μέθοδοι ανάλυσης αποτελεσμάτων
5.2 Συνδυασμός υπερήχων και χλωροφορμίου	5.8,5.9 Μοριακή ανίχνευση με PCR-Ηλεκτροφόρηση
5.3 Συνδυασμός υπερήχων, χλωροφορμίου και κατάψυξης	
5.4 Μέθοδος 5.3 με την προσθήκη βρασμού κατά την επεξεργασία του δείγματος	
5.5 Παραλλαγή του 5.4	
5.6 Χρήση του εμπορικού kit: Pure Link Genomic DNA Mini kit (invitrogen)	
5.7 Χρήση του εμπορικού kit: MN Nucleospin Food-Macherey-Nagel	
	5.10 Ανάλυση με την χρήση της LAMP-ισόθερμης ενίσχυσης μέσω βρόγχου

### 3.1 Υλικά

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- Γάλα

- Γνωστές συγκεντρώσεις των βακτηρίων *Salmonella* Typhimurium και *Listeria monocytogenes* από καλλιέργειες σε Άγαρ τρυπτόνης και σόγιας (Tryptone Soy Broth)
- Απιονισμένο νερό
- Χλωροφόρμιο
- Αιθανόλη
- Ισοαμυλική Αλκοόλη
- Οξικό Νάτριο 3M
- Elution Buffer
- Απιονισμένο Νερό
- Εμπορικό kit PureLink Genomic DNA Mini kit Invitrogen (USA) με όλα τα αντιδραστήρια του
- Εμπορικό kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel και τα αντιδραστήρια του
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- 10x Loading Buffer
- TBE

### 3.2 Εξοπλισμός

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω εξοπλισμός:

- Θερμοκυκλοποιητής για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler)
- Συσκευή υπερήχων (ELMASONIC S10 - Ultrasonic Cleaning Device 800ml 37kHz 30W, Elma Ultrasonic Technology)
- Φυγόκεντρος (MSE Sanyo Micro Centaur Centrifuge)
- Vortex (V-1 plus)
- Ηλεκτροφόρηση (Mini Single Cell Electrophoresis Chamber)
- Θερμομπλόκ (THERMOBLOCK TD 200-1)
- Θερμική πλάκα
- Υάλινα σκεύη ( ποτήρι ζέσεως, κωνική φιάλη)
- Πιπέτες

- Συσκευή UV
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Υδατόλουτρο
- Ζυγός

### 3.3 Πειραματική διαδικασία

#### 3.3.1 επιμόλυνση αρχικού δείγματος και δημιουργία των αραιώσεων

Στην αρχή επιμολύνθηκε το δείγμα τροφίμου με πρότυπα στελέχη *Salmonella* Typhimurium ή *Listeria monocytogenes* και στην συνέχεια αραιώθηκε σε υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις μέχρι τελικής συγκέντρωσης  $10^1$  CFU/mL για την αξιολόγηση των ορίων ανίχνευσης κάθε μεθόδου. Το δείγμα μπορεί να είναι είτε γάλα είτε νερό και οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν για να είναι δυνατή η μελέτη των ορίων ανίχνευσης της κάθε μεθόδου. Σε 900 μl γάλακτος προστέθηκε 100μl καλλιέργειας και στη συνέχεια έγιναν οι αραιώσεις. Από το πρώτο δείγμα και αφότου αυτό αναδεύτηκε με την χρήση του vortex μεταφέρθηκαν 1ml σε 9 ml γάλακτος. Το vortex χρησιμοποιήθηκε έτσι ώστε να γίνει σωστή κατανομή του δείγματος σε όλο τον όγκο του γάλακτος. Επιπροσθέτως μετά την ανάδευση της δεύτερης αραιώσεως με τη χρήση του vortex πάρθηκε με την βοήθεια πιπέτας 1μl από την δεύτερη αραιώση και μεταφέρθηκε όπως κι η πρώτη σε 9μl γάλακτος. Για την δημιουργία επιπλέον αραιώσεων επαναλήφθηκε η ίδια μέθοδος. Παρόμοια πραγματοποιήθηκε η δημιουργία αραιώσεων με την χρήση νερού αντί για γάλακτος.

Μετά την δημιουργία των απαιτούμενων αραιώσεων που τα δείγματά οδηγήθηκαν στην φυγόκεντρο όπου φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 στροφές για 10 λεπτά. Αμέσως μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Κατά την φυγοκέντρωση το DNA του μικροοργανισμού οδηγείται προς τα κάτω ενώ το υδατικό μέρος προς τα πάνω με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύθηκαν ακόμα μία φορά με την χρήση του vortex.



Εικόνα 3.1 Ο φυγόκεντρος MSE Sanyo Micro Centaur Centrifuge ([https://salfordscientific.co.uk/wp-content/uploads/2020/04/IMG\\_3590.jpg](https://salfordscientific.co.uk/wp-content/uploads/2020/04/IMG_3590.jpg)).

### 3.3.2 Μέθοδος απομόνωσης με τη χρήση υπερήχων και χλωροφορμίου

Κατά την μέθοδο αυτή αρχικά τα δείγματα επεξεργάστηκαν όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.1. Έπειτα οδηγήθηκαν στους υπέρηχους όπου αφέθηκαν για 10 λεπτά. Με την χρήση των υπερήχων γίνεται η διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων του μικροοργανισμού. Μετά το πέρας των υπέρηχων προστέθηκαν 100μl απιονισμένο νερό και 100μl χλωροφόρμιο, ενώ τα δείγματα αναδεύτηκαν με το vortex και φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 στροφές για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωση λήφθηκε η πάνω φάση όπου περιείχε το DNA.



Εικόνα 3.2 Το μηχάνημα των υπερήχων- ELMASONIC S10 - Ultrasonic Cleaning Device 800ml 37kHz 30W, Elma Ultrasonic Technology (<https://www.digas.gr/image/cache/data/uploads/202104/2014012415232321035871014500x400-800x600.jpg>).

### **3.3.3 Μέθοδος απομόνωσης με τη χρήση υπερήχων σε συνδυασμό με χλωροφόρμιο και κατάψυξη**

Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο το επιμολυσμένο γάλα επεξεργάζεται με την χρήση υπερήχων για 10 λεπτά με σκοπό της λύση της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων του βακτηρίου. Πριν επεξεργαστούν τα δείγματα με υπέρηχους έχει ακολουθηθεί η διαδικασία που αναφέρθηκε στο 3.1 . Μετά τους υπέρηχους σε κάθε αραιώση προστέθηκαν 0,96μl χλωροφόρμιο και 0,04μl ισοαμυλικής αλκοόλης, ενώ στη συνέχεια οδηγήθηκαν για φυγοκέντρηση. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης μεταφέρθηκε η πάνω φάση του κάθε δείγματος σε καινούργιο eppendorf microtube και προστέθηκε ξανά χλωροφόρμιο σε ίση ποσότητα με την ποσότητα του κάθε δείγματος. Έπειτα από την χρήση του vortex και της φυγοκέντρησης μεταφέρθηκε ξανά η πάνω φάση σε νέο eppendorf microtube. Στη συνέχεια κατακρημνίσθηκε το DNA με την προσθήκη 50μl οξικού νατρίου 3M και προστέθηκε διπλός όγκος κρύας

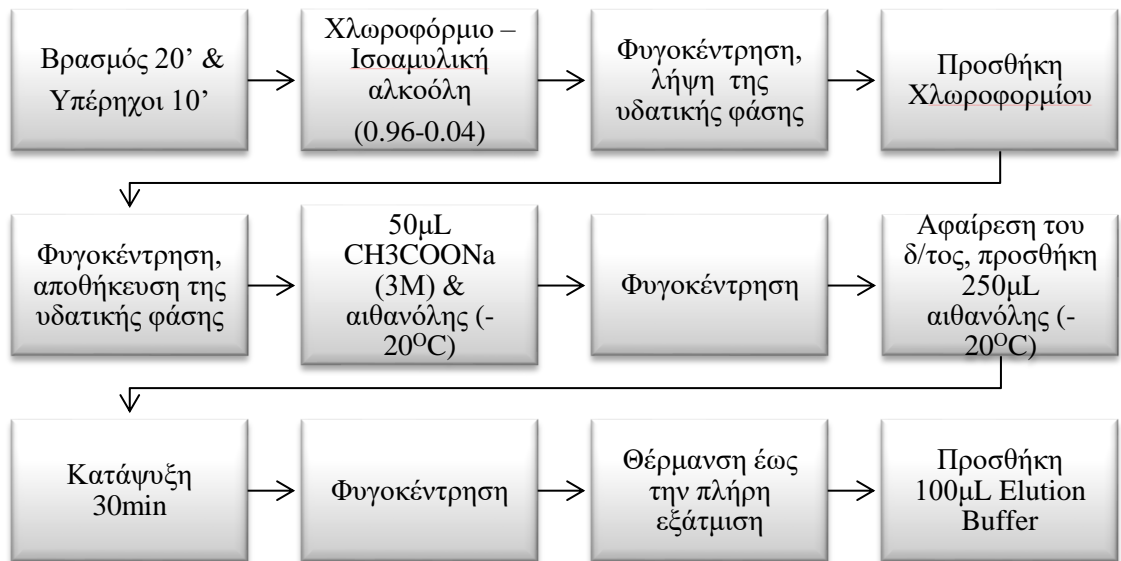
αιθανόλης. Η προσθήκη του οξικού νατρίου θα συμβεί ώστε να διασπαστεί το γαλάκτωμα και να κατακρημνιστεί το DNA. Η θερμοκρασία της κρύας αιθανόλης θα πρέπει να είναι γύρω στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Τα δείγματα αφέθηκαν στην κατάψυξη για 30 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 στροφές για 10 λεπτά. Αφαιρέθηκε η αιθανόλη από κάθε δείγμα και προστέθηκε 250μl 70% κρύα αιθανόλη. Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση καθώς και απομακρύνθηκε ξανά η περιττή αιθανόλη. Τα δείγματα αφέθηκαν στο υδατόλουτρο μέχρι να μην παρατηρείται οπτικά καθόλου αιθανόλη στον πυθμένα των microtubes αλλά να έχει παραμείνει μόνο το ίζημα. Τέλος προστέθηκαν σε όλα τα tubes 100μl elution buffer

### **3.3.4 Μέθοδος απομόνωσης με συνδυασμό βρασμού, υπερήχων, χλωροφορμίου και κατάψυξης**

Αυτή η μέθοδος αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου 3.3. Σε αυτή χρησιμοποιήθηκε ο βρασμός ώστε να επιτευχθεί πιο βίαιη και αποτελεσματική λύση της κυτταρικής μεμβράνης. Τα δείγματα επεξεργάστηκαν αρχικά με την χρήση του βρασμού για 20 λεπτά και στη συνέχεια οδηγήθηκαν στο μηχάνημα των υπερήχων όπου αφέθηκαν για άλλα 10 λεπτά. Στη συνέχεια η μέθοδος είναι πανομοιότυπη με την μέθοδο 3.3

### **3.3.5 παραλλαγή της μεθόδου απομόνωσης με συνδυασμό βρασμού, υπερήχων, χλωροφορμίου και κατάψυξης**

Σε αυτή την μέθοδο η οποία αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου 3.4 τα δείγματα επεξεργάστηκαν με 20 λεπτά βρασμό και 10 λεπτά υπερήχους. Στη συνέχεια η διαδικασία της μεθόδου 3.4 ακολουθείται όπως έχει μέχρι την προσθήκη της κρύας αιθανόλης. Σε εκείνο το σημείο αντί για να αφεθούν τα δείγματά στην κατάψυξη οδηγήθηκαν κατευθείαν για φυγοκέντρηση για να απομακρυνθεί η αιθανόλη. Έπειτα προστέθηκε 250μl 70% κρύα αιθανόλη και οδηγήθηκαν τα δείγματα ξανά για φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια και μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης τα δείγματα αφέθηκαν στην κατάψυξη για 30 λεπτά. Τέλος τα δείγματά αφέθηκαν στο υδατόλουτρο για να εξατμιστεί όλη η ποσότητα της αιθανόλης που είχε παραμείνει μέσα σε αυτά.



Σχήμα 3.1 Σχεδιάγραμμα ροής της τελικής in house τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του βακτηριακού DNA

### 3.3.6 πρώτη μέθοδος με την χρήση του εμπορικού kit PureLink Genomic DNA Mini kit Invitrogen (USA).



Εικόνα 3.3 Το εμπορικό kit PureLink Genomic DNA Mini kit Invitrogen (USA)(<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/product-images/K182002.jpg-650.jpg>).

Το συγκεκριμένο εμπορικό kit είναι σχεδιασμένο για τον καθαρισμό του DNA σε συνολικό χρόνο 10-15 λεπτών. Πριν την αρχή της διαδικασίας προστίθεται και

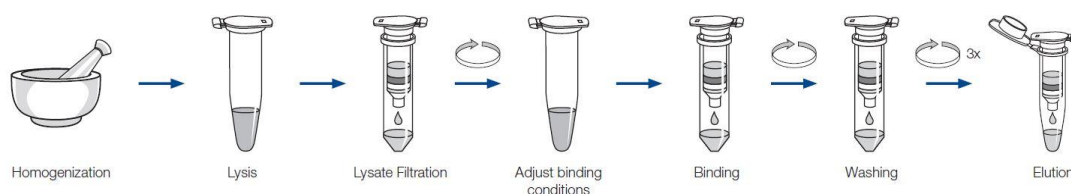


αναδεύεται 96-100% αιθανόλη στο PureLink Genomic Wash Buffer 1 και στο PureLink Genomic Wash Buffer 2 ανάλογα με τις οδηγίες που αναγράφονται στο κάθε ένα. Η διαδικασία ξεκινά με την λύση της κυτταρικής μεμβράνης. Στα δείγματα προστέθηκαν 200μL PureLink Genomic Digestion Buffer και 20μL πρωτεϊνάση K και αφέθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 55°C για 4 ώρες. Στη συνέχεια προστίθεται 20μL Rnase A αναδεύεται καλά με το μίγμα και αφήνεται να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προστίθεται 200 μL PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer και 200 μL 96–100% αιθανόλη. Το μίγμα αναδεύεται καλά για να ομογενοποιηθεί. Μετά την λύση της κυτταρικής μεμβράνης είναι το στάδιο δέσμευσης του DNA. Η δέσμευση του DNA συμβαίνει με την μεταφορά του διαλύματος σε μία στήλη PureLink® Spin Column η οποία έχει τοποθετηθεί μέσα σε ένα eppendorf microtube. Γίνεται φυγοκέντρηση στο διάλυμα στις 10000 στροφές για 1 λεπτό και το υγρό που έχει εξέλθει στο eppendorf microtube απορρίπτεται. Στη συνέχεια η στήλη τοποθετείται σε ένα καθαρό PureLink® Collection Tube και η διαδικασία περνάει στη φάση της έκπλυσης του DNA. Η έκπλυση πραγματοποιείται με την προσθήκη 500 μL Wash Buffer 1 και την φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 1 λεπτό. Ενώ μετά την απόρριψη του διαλύματος που συγκεντρώθηκε σε ένα eppendorf microtube προστίθεται 500 μL Wash Buffer 2 και το διάλυμα φυγοκεντρείται σε μέγιστη ταχύτητα για τρία λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση απορρίπτεται ξανά το διάλυμα που συλλέχτηκε στον eppendorf microtube. Όπως έχει προαναφερθεί τα Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2 έχουν προετοιμαστεί πριν από την αρχή της διαδικασίας με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας αιθανόλης. Το τελευταίο στάδιο του εμπορικού kit είναι η έκλυση του DNA. Αρχικά η στήλη που περιέχει το DNA τοποθετείται σε καθαρό eppendorf microtube και προστίθεται σε αυτήν 100μL PureLink® Genomic Elution Buffer. Πρέπει να τονιστεί ότι το Elution Buffer θα πρέπει να είναι στην θερμοκρασία των 70°C. Γίνεται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα και το υγρό που συσσωρεύεται σε ένα eppendorf microtube περιέχει το βακτηριακό DNA.

Κατά την πειραματική πορεία έγιναν ορισμένες μετατροπές για να δώσει η διαδικασία καλύτερα αποτελέσματα. Καταρχάς μετά την προσθήκη 200μL Lysis Buffer και 200μL αιθανόλης αφέθηκε το διάλυμα για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Επιπλέον μετά την προσθήκη των Washing Buffer 1 και Washing Buffer 2 η φυγοκέντρηση και στις δύο περιπτώσεις διήρκεσε για 2 λεπτά. Τέλος κατά την

έκλυση του DNA το Elution Buffer προστέθηκε σε δύο δόσεις των 50μL για την ανάκτηση μεγαλύτερης ποσότητας DNA.

### 3.3.7 Απομόνωση με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel

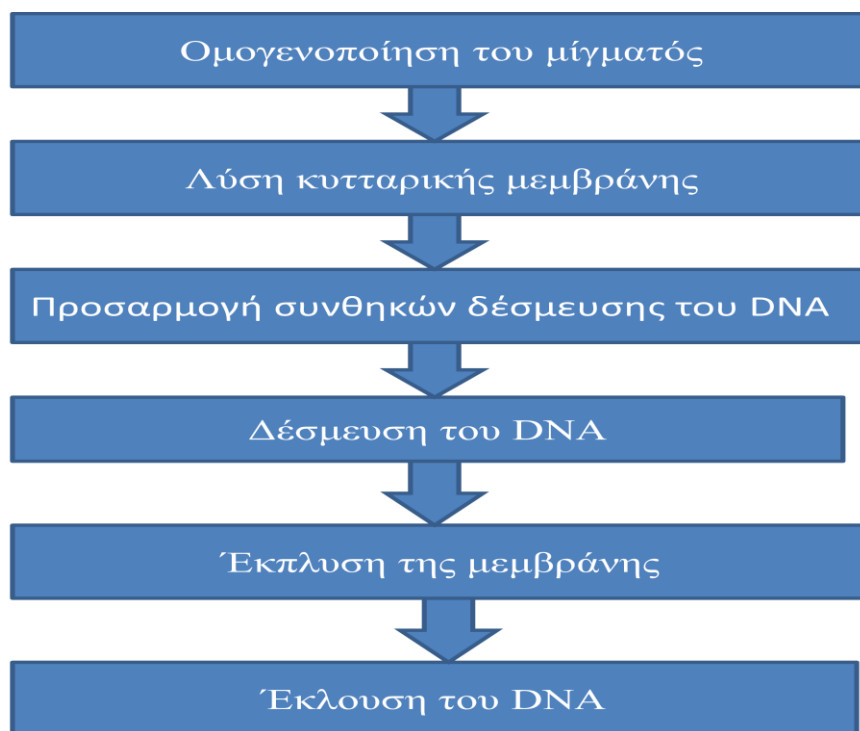


Εικόνα 3.4 Σχεδιάγραμμα του εμπορικού kit MN Nucleospin Food-Macherey-Nagel ([https://www.andrewalliance.com/wp-content/uploads/2021/06/figure-1\\_workflow\\_ns\\_plant\\_ii.jpg](https://www.andrewalliance.com/wp-content/uploads/2021/06/figure-1_workflow_ns_plant_ii.jpg)).

Σύμφωνα με το δεύτερο εμπορικό kit αρχικά ομογενοποιείται 200mg του δείγματος τροφίμου που πρόκειται να αναλυθεί και στη συνέχεια πραγματοποιείται η λύση της κυτταρικής μεμβράνης. Για την λύση της κυτταρικής μεμβράνης πρώτα μεταφέρεται 2ml από το δείγμα που ομογενοποιήθηκε σε ένα eppendorf microtube και προσθέτονται 550μL Buffer CF το οποίο έχει προθερμανθεί στους 65°C. Μετά από 15 δευτερόλεπτα ανάδευσης γίνεται η προσθήκη 10μL πρωτεΐνασης K και γίνεται ξανά ανάδευση για 2-3 δευτερόλεπτα. Γίνεται επώαση στους 65°C για 30 λεπτά και μετά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά (>10,000 x g). Μετά την λύση της κυτταρικής μεμβράνης προσαρμόζονται οι συνθήκες για την καλύτερη δέσμευση του DNA. Για την βελτιστοποίηση των συνθηκών μεταφέρεται αρχικά το υπερκείμενο του μίγματός μετά την φυγοκέντρηση σε ένα eppendorf microtube και προσθέτονται ίση ποσότητα με το μίγμα Buffer C4 και αιθανόλη. Αναδεύεται το μίγμα για 30 δευτερόλεπτα στο vortex. Επόμενο βήμα είναι η δέσμευση του DNA. Για την δέσμευση του DNA μεταφέρονται 700μL από το δείγμα σε ένα microtube Nucleospin Food Column ο οποίος είναι τοποθετημένος σε ένα eppendorf microtube. Γίνεται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 στροφές και το μίγμα που πέρασε στον eppendorf microtube απορρίπτεται. Πραγματοποιείται ξανά η φυγοκέντρηση και η απόρριψη. Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση του DNA μέσα από τρεις διαδικασίες. Πρώτα 400μL Buffer CQW προστέθηκαν στο Nucleospin Food Column, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε και απορρίφθηκε αυτό που διαπέρασε στο eppendorf

microtube. Επιπλέον Παρόμοια φυγοκέντρηση και απόρριψη έγινε για 700μL Buffer C5 και στη συνέχεια για την προσθήκη άλλων 200μL Buffer C5. Οι πρώτες δύο φυγοκεντρήσεις έγιναν για 1 λεπτό στις 11000 στροφές, ενώ η τρίτη για 2 λεπτά στις ίδιες στροφές. Τελευταίο βήμα της διαδικασίας είναι η έκλουση του DNA. Για την έκλουση αρχικά θα γίνει αλλαγή του eppendorf microtube και θα προστεθεί 100μL Elution Buffer CE το οποίο έχει προθερμανθεί στους 70°C. Γίνεται επώαση για 5 λεπτά στην θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 στροφές.

Η διαδικασία του εμπορικού kit πραγματοποιήθηκε με συγκεκριμένες μετατροπές. Αρχικά δεν πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση του δείγματος αλλά επιμόλυνση του γάλακτος με γνωστή ποσότητα *Salmonella Typhimurium* ή *Listeria monocytogenes*. Μετά την επιμόλυνση έγινε φυγοκέντρηση και απομακρύνθηκε η πάνω φάση. Επιπλέον στην δεύτερη φάση η επώαση στους 65°C αντί για 30 λεπτά πραγματοποιήθηκε για ένα βράδυ ώστε να γίνει καλύτερη λύση της κυτταρικής μεμβράνης. Τέλος στην τελευταία φάση της διαδικασίας για την καλύτερη έκλουση του DNA πραγματοποιήθηκε σε δύο δόσεις των 50μL η προσθήκη των 100μL Elution Buffer CE.



Σχήμα 3.2 Διάγραμμα ροής της μεθόδου απομόνωσης του βακτηριακού DNA με το εμπορικό kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel

### 3.3.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

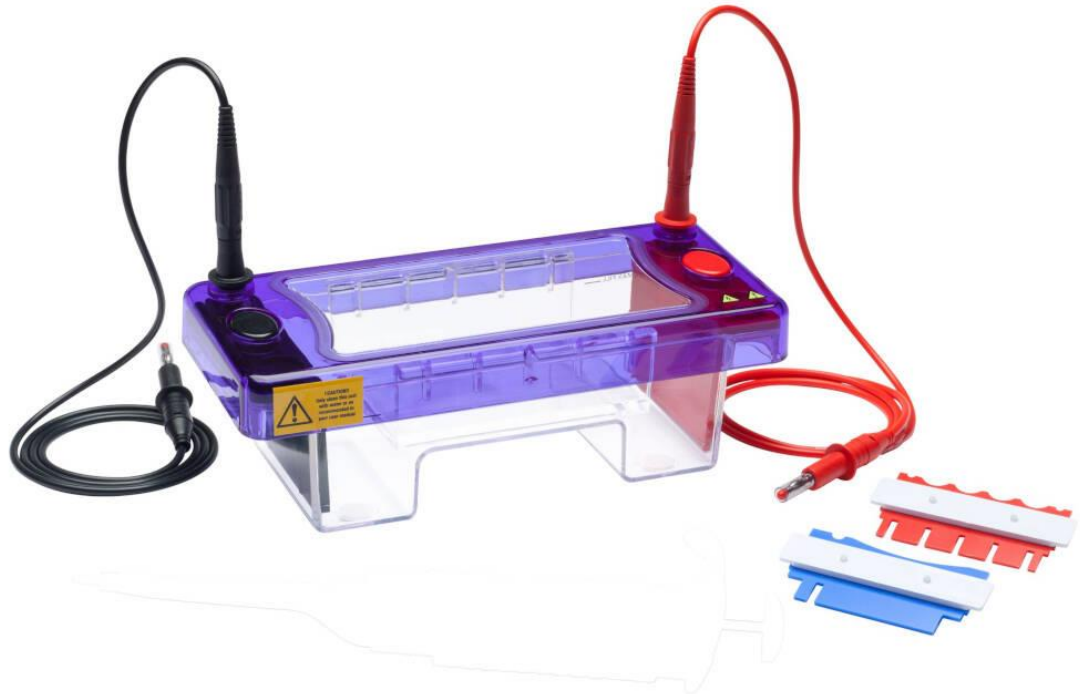
Πριν από την αρχή της διαδικασίας της PCR δημιουργήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις. Δηλαδή για κάθε αραιώση που πραγματοποιήθηκε μετά το στάδιο της επιμόλυνσης δημιουργούνται άλλες δύο. Αυτό συμβαίνει ώστε να αραιωθούν οι αναστολείς του DNA που περιέχονται στα δείγματα. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 50μL. Αυτά αποτελούνται από 25μL 2x PCRBIO Ultra Mix Red, από 0,4 μM από τον κάθε εκκινητή και από 8,5 μL UltraPure™ DNase/RNase-Free Water. Τα υπόλοιπα 15μL είναι το DNA στόχος. Οι εκκινητές θα είναι οι κατάλληλες ανάλογα με τον παθογόνο μικροοργανισμό στόχο. Τέλος πραγματοποιήθηκε η PCR με την χρήση του μηχανήματος Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler της Applied Biosystems που απεικονίζεται στην εικόνα 3.4.



Εικόνα 3.4 Το μηχανήμα της PCR- Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems)(<https://hylandscientific.com/wp-content/uploads/2020/06/AB-Virity-Thermocycler-2-1050x1050.jpg>)

### 3.3.9 Ηλεκτροφόρηση

Μετά το πέρας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης τα δείγματα οδηγούνται στο μηχάνημα της ηλεκτροφόρησης. Αρχικά ογκομετρήθηκαν σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο 90μl νερό αναμίχτηκε με 10μl TBE και τοποθετήθηκαν σε μία κωνική φιάλη. Στη συνέχεια ζυγίστηκε σε έναν αναλυτικό ζυγό 15g αγαρόζη και προστέθηκε στην κωνική φιάλη. Έπειτα με την χρήση του φούρνου μικροκυμάτων διαλύθηκε η αγαρόζη και προστέθηκε στο ζεστό διάλυμα 10μl βρωμιούχο αιθίδιο. Το τελικό διάλυμα μεταφέρθηκε στο ειδικό δίσκο του μηχανήματος ηλεκτροφόρησης. Στο ειδικό δίσκο πριν την μεταφορά του διαλύματος σε αυτό κολλήθηκε περιφερειακά χάρτινη ή πλαστική ταινία ενώ επιπλέον προστέθηκε σε αυτό το κατάλληλο χτενάκι και αφέθηκε στο ψυγείο για 30 λεπτά μέχρι να στερεοποιηθεί το gel. Το χτενάκι προστέθηκε έτσι ώστε μετά την στερεοποίηση του διαλύματος να έχουν δημιουργηθεί τα κατάλληλα κενά για την προσθήκη του DNA. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε η ταινία και το χτενάκι και στα κενά που δημιουργήθηκαν προστέθηκαν 7μl από τα δείγματα καθώς και 15μl ladder. Το ladder που προστέθηκε εξαρτάται από τον μικροοργανισμό στόχο. Προ της προσθήκης των δειγμάτων προστέθηκε στο κάθε ένα από αυτά 2μl 10X Loading buffer. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε UV ακτινοβολία για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 3.5 Η συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini Single Cell Electrophoresis Chamber που χρησιμοποιήθηκε ([https://cdn1.cleaverscientific.com/wp-content/uploads/2021/03/26022728/MSMINI-5.WEB\\_.jpg](https://cdn1.cleaverscientific.com/wp-content/uploads/2021/03/26022728/MSMINI-5.WEB_.jpg))

### **3.3.10 Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου - LAMP (loop-mediated isothermal amplification)**

Για την μοριακή ανίχνευση με την χρήση της ισοθερμικής ενίσχυσης μέσω βρόγχου(LAMP) χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές με συγκεντρώσεις: F3= 0,1μM, B3= 0,1μM, FIP= 0,8μM, BIP= 0,8μM, LF= 0,4μM και LB= 0,2μM. Έπειτα προετοιμάστηκε το μείγμα της LAMP το οποίο αποτελείται από: 12,5μL WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (NEB), 5μL UltraPure DNase/RNase-Free Water, 5μL βακτηριακό DNA και τους εκκινητές που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ο συνολικός όγκος του κάθε eppendorf microtube θα είναι 25μL. Το μείγμα του PCR

αφέθηκε στους 65°C για 45 λεπτά. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται οπτικά με την αλλαγή του χρώματος του μείγματος. Στην εικόνα 3.6 παρατηρείται η αλλαγή του χρώματος της LAMP όταν η τεχνική είναι επιτυχής. Τα δείγμα κάτω δεξιά είναι το αρνητικό δείγμα ενώ όλα τα άλλα δείγματα που διαφέρουν από το αρνητικό έχουν δώσει θετικό αποτέλεσμα. Στην εικόνα 3.6 παρατηρείται επίσης ότι δεν έχουν όλα τα θετικά δείγματα ίδια αλλαγή χρώματος αλλά αυτή διαφέρει.



Εικόνα 3.6 Η αλλαγή χρώματος που παρατηρείται μετά το πέρας της διαδικασίας της LAMP

## Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

### Πείραμα 1:

Απομόνωση *Listeria monocytogenes* σε δείγματα νερού, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 10' υπερήχους και προσθήκη χλωροφορμίου για την απομάκρυνση της λιπαρής φάσης. Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται όπου Α το πρώτο δείγμα νερού που επιμολύνθηκε και όπου Β το δεύτερο δείγμα νερού που επιμολύνθηκε

Πίνακας 4.1: Δείγματα νερού τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Listeria monocytogenes*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	A 10 <sup>8</sup>	+
2	A 10 <sup>8</sup> 1/10	+
3	A10 <sup>8</sup> 1/100	+
4	B 10 <sup>8</sup>	+
5	B 10 <sup>8</sup> 1/10	+
6	B10 <sup>8</sup> 1/100	+
7	Πρότυπο θετικό δείγμα	+

Κατά την πρώτη πειραματική πορεία επιμολύνθηκαν δύο δείγματα νερού με παρόμοιες συγκεντρώσεις *Listeria monocytogenes* και δημιουργήθηκαν οι απαιτούμενες αραιώσεις. Στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με υπερήχους για 10 λεπτά και προστέθηκε χλωροφόρμιο, ενώ έπειτα οδηγήθηκαν για φυγοκέντρηση. Μετά την φυγοκέντρηση απομονώθηκε η υδατική φάση των δειγμάτων που περιέχει το βακτηριακό DNA. Ως τελικό στάδιο έγινε η ανίχνευση του DNA με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης. Η χρήση δύο παρόμοιων δειγμάτων νερού πραγματοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων της μεθόδου. Η επεξεργασία με υπερήχους είχε ως σκοπό τη διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου, ενώ η προσθήκη του χλωροφορμίου αποσκοπούσε στον διαχωρισμό των δειγμάτων σε λιπαρή και υδατική φάση. Ο λόγος που έγινε αυτό



ήταν για να απομακρυνθούν οι αναστολές και να μην εμποδίσουν την διαδικασία της PCR και της ηλεκτροφόρησης να αποδώσουν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.1 παρατηρείται ότι η διαδικασία στέφθηκε με επιτυχία και η PCR έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

### **Πείραμα 2:**

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 10' υπερήχους και την προσθήκη χλωροφορμίου για την απομάκρυνση της λιπαρής φάσης. Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης

Πίνακας 4.2: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	10 <sup>3</sup>	-
2	10 <sup>3</sup> 1/10	-
3	10 <sup>3</sup> 1/100	-
4	10 <sup>6</sup>	-
5	10 <sup>6</sup> 1/10	-
6	10 <sup>6</sup> 1/100	-
7	10 <sup>8</sup>	-
8	10 <sup>8</sup> 1/10	-
9	10 <sup>8</sup> 1/100	-
10	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
11	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Το πείραμα 2 βασίστηκε στην πειραματική πορεία του πειράματος 1. Σε σύγκριση με το προηγούμενο πείραμα στο συγκεκριμένο χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γάλακτος αντί για νερού καθώς και *Salmonella* Typhimurium αντί για *Listeria monocytogenes*. Από τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στον πίνακα 4.2 προκύπτει ότι το πείραμα δεν ήταν επιτυχές, καθώς δεν επιτεύχθηκε η ανίχνευση του βακτηριακού DNA με την διαδικασία της PCR και της ηλεκτροφόρησης. Αυτό μπορεί να συμβαίνει για διάφορους λόγους. Καταρχάς θα μπορούσε το χλωροφόρμιο να μην ήταν επαρκές να

απομακρύνει τους αναστολείς που περιέχονται στο γάλα σε επιθυμητό βαθμό, με αποτέλεσμα ένα ποσοστό αυτών να παραμείνουν στα δείγματα και να εμποδίσουν την ανίχνευση του βακτηριακού DNA. Επιπλέον υπάρχει η πιθανότητα της αποτυχίας του πειράματος λόγω πειραματικού σφάλματος.

### **Πείραμα 3:**

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 10' υπερήχους και την προσθήκη χλωροφορμίου για την απομάκρυνση της λιπαρής φάσης. Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης

Πίνακας 4.3: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	10 <sup>8</sup> 1/10	-
2	10 <sup>8</sup> 1/100	-
3	10 <sup>8</sup> 1/1000	-
4	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
5	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Στο πείραμα 3 έγινε επανάληψη της μεθοδολογίας του πειράματος 2 έτσι ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα αποτυχίας του πειράματος λόγω ανθρώπινου σφάλματος κατά την πειραματική πορεία. Όπως απεικονίζετε στον πίνακα 4.3 η απόπειρα αυτή δεν στέφθηκε με επιτυχία.

### **Πείραμα 4:**

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 10' υπερήχους και την προσθήκη χλωροφορμίου και ισοαμλικής αλκοόλης για την απομάκρυνση της λιπαρής φάσης. Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης

Πίνακας 4.4: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$ 1/10	-
2	$10^8$ 1/100	-
3	$10^7$ 1/10	-
4	$10^7$ 1/100	-
5	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
6	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Σε αυτό το πείραμα επαναλήφθηκε η μεθοδολογία του πειράματος 3 με την διαφορά ότι προστέθηκε ισοαμυλική αλκοόλη μετά την προσθήκη του χλωροφορμίου. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα όπου απεικονίζονται στον πίνακα 4.4 προκύπτει ότι, ακόμα και η προσθήκη της ισοαμυλικής αλκοόλης δεν ήταν ικανή να απομακρύνει τους αναστολείς που περιέχονται στο γάλα αφού δεν έγινε η ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου στα δείγματα.

#### Πείραμα 5:

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με  $10'$  υπερήχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμυλικής αλκοόλης και κρύας αιθανόλης. Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης.

Πίνακας 4.5: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	-
2	$10^8$ 1/10	-
3	$10^8$ 1/100	-
4	$10^7$	-

---

5	$10^7$ 1/10	-
6	$10^7$ 1/00	-
7	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
8	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

---

Στο συγκεκριμένο πείραμα επαναλήφθηκε η μεθοδολογία των προηγούμενων πειραμάτων, με την διαφορά ότι σε αυτό πραγματοποιήθηκε και η προσθήκη της κρύας αιθανόλης μετά από αυτή του χλωροφορμίου και της ισοαμυλικής αλκοόλης. Η προσθήκη της αιθανόλης είχε ως σκοπό την κατακρήμνιση του DNA του μικροοργανισμού και την δημιουργία ιζήματος στον πυθμένα του eppendorf microtube. Με την δημιουργία του ιζήματος αποπειράθηκε να γίνει η σωστή απομάκρυνση των συστατικών που περιέχονται στο γάλα και λειτουργούν σαν αναστολείς στην διαδικασία της PCR και της ηλεκτροφόρησης. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.5 το πείραμα δεν παρείχε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Η αποτυχία του πειράματος μπορεί να συνδεθεί, είτε ξανά με την μη επαρκή απομάκρυνση των αναστολών του γάλακτος, είτε εξαιτίας της αδυναμίας διάσπασης της κυτταρική μεμβράνης του βακτηρίου.

### Πείραμα 6:

Απομόνωση *Salmonella Typhimurium* σε δείγματα γάλακτος και νερού με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους, και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμλικής αλκοόλης και κρύας αιθανόλης. Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης.

Όπου WS1 και WS2 το πρώτο και το δεύτερο δείγμα νερού που επιμολύνθηκαν αντίστοιχα.

Πίνακας 4.6: Δείγματα γάλακτος και νερού τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella Typhimurium*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^3$	-
2	$10^3$ 1/10	-
3	$10^3$ 1/100	-
4	$10^4$	-
5	$10^4$ 1/10	-
6	$10^4$ 1/100	-
7	$10^5$	-
8	$10^5$ 1/10	-
9	$10^5$ 1/100	-
10	$10^6$	-
11	$10^6$ 1/10	-
12	$10^6$ 1/100	-
13	WS 1	+
14	WS 1 1/10	+
15	WS 1 1/100	+
16	WS 2	+
17	WS 2 1/10	+
18	WS 2 1/100	+
19	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
20	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Ακολουθώντας τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος έγινε η προσπάθεια πιο βίαιης λύσης της κυτταρικής μεμβράνης. Για να πραγματοποιηθεί αυτό στο

παρών πείραμα ακολουθήθηκε η πειραματική πορεία του πειράματος 6 με την διαφορά της προσθήκης 20' βρασμού πριν την επεξεργασία με τους υπερήχους. Επιπλέον για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων έγινε η χρήση δειγμάτων νερού και όχι μόνο δειγμάτων γάλακτος. Από τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στον πίνακα 4.6 παρατηρείται ότι ενώ τα δείγματα νερού έδωσαν θετικά αποτελέσματα, τα δείγματα γάλακτος έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα και έτσι προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα. Αρχικά το γεγονός ότι έγινε η ανίχνευση του DNA του βακτηρίου στα δείγματα νερού σημαίνει ότι δεν έγινε κάποιο σφάλμα στη πειραματική πορεία και ότι αυτή επαρκή για την διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου και την απομάκρυνση των αναστολών που βρίσκονται στο νερό. Επιπλέον η αδυναμία ανίχνευσης του βακτηρίου του DNA στο γάλα επιβεβαιώνει την αδυναμία της πειραματικής πορείας να απομακρύνει τους αναστολείς που περιέχονται σε αυτό όπως προβλέφθηκε στα προηγούμενα πειράματα. Τέλος πρέπει να τονιστεί η πιθανότητα της χρήσης μη λειτουργικών βακτηρίων *Salmonella Typhimurium*.

#### **Πείραμα 7:**

Απομόνωση *Salmonella Typhimurium* από ζωμό και από τρυβλία σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμυλικής αλκοόλης και κρύας αιθανόλης. Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης

Όπου Α και Β τα δείγματα γάλακτος που επιμολύνθηκαν από *Salmonella Typhimurium* που προήλθε από τρυβλία, ενώ όπου α και β τα δείγματα του γάλακτος που επιμολύνθηκαν από *Salmonella Typhimurium* που προήλθε από ζωμό. Η συγκέντρωση των όλων δειγμάτων σε *Salmonella Typhimurium* είναι  $10^8$ .

Πίνακας 4.7: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella Typhimurium* διαφορετικής προέλευσης.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	α	-
2	α 1/10	-
3	β	-

4	β 1/10	-
5	A	-
6	A 1/10	-
7	B	-
8	B 1/10	-
9	Πρότυπο θετικό δείγμα	+

Σε αυτό το πείραμα επαναλήφθηκε η πειραματική πορεία του πειράματος 6 με την διαφορά ότι σε αυτό χρησιμοποιήθηκε *Salmonella* Typhimurium από δύο διαφορετικές πηγές. Η επιμόλυνση του γάλακτος έγινε με *Salmonella* Typhimurium που προήλθε από τρυβλίο και *Salmonella* Typhimurium που προήλθε από ζωμό. Αυτό το πείραμα πραγματοποιήθηκε για να γίνει έλεγχος της λειτουργικότητας του βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκε στα προηγούμενα πειράματα. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.7 η προέλευση του βακτηρίου δεν επηρέασε τα αποτελέσματα του πειράματος αφού και στις δύο περιπτώσεις τα δείγματα ήταν αρνητικά. Οπότε η αποτυχία των προηγούμενων πειραμάτων δεν είχε σχέση με την καταλληλότητα του βακτηρίου αλλά με την πειραματική πορεία.

#### Πείραμα 8:

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium που προήλθε από τρυβλίο σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμυλικής αλκοόλης και κρύας αιθανόλης. Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης.

Πίνακας 4.8: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	10 <sup>8</sup>	-
2	10 <sup>8</sup> 1/10	-

3	$10_1^7$	-
4	$10_1^7$ 1/10	-
5	$10_2^7$	-
6	$10_2^7$ 1/10	-
7	$10^6$	-
8	$10^6$ 1/10	-
9	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
10	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Στο παρόν πείραμα έγινε επαλήθευση του συμπεράσματος του πειράματος 7 καθώς χρησιμοποιήθηκε *Salmonella* Typhimurium από τρυβλίο. Με αυτό τον τρόπο έγινε ο έλεγχος της καταλληλότητας του βακτηρίου που έχει χρησιμοποιηθεί στα προηγούμενα πειράματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στον πίνακα 4.8, το πείραμα δεν ήταν πετυχημένο αφού δεν ανιχνεύθηκε το DNA του μικροοργανισμού στα δείγματα. Οπότε η υπόθεση ότι η αποτυχία των προηγούμενων πειραμάτων έχει σχέση με την καταλληλότητα της *Salmonella* Typhimurium που χρησιμοποιήθηκε απορρίφθηκε.

#### **Πείραμα 9:**

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος με την χρήση του εμπορικού kit PureLink Genomic DNA Mini kit Invitrogen (USA). Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης

Πίνακας 4.9: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	-



2	$10^8$ 1/10	-
3	$10^8$ 1/100	-
4	$10^7$	-
5	$10^7$ 1/10	-
6	$10^7$ 1/100	-
7	$10^6$	-
8	$10^6$ 1/10	-
9	$10^6$ 1/100	-
10	$10^5$	-
11	$10^5$ 1/10	-
12	$10^5$ 1/100	-
13	Πρότυπο θετικό δείγμα	+

---

Σε αυτό το πείραμα έγινε η χρήση του πρώτου εμπορικού kit για την απομόνωση του DNA του βακτηρίου και για την απομάκρυνση των αναστολών του γάλακτος που παρεμποδίζουν την ανίχνευση του. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στον πίνακα 4.9 το πείραμα δεν στέφθηκε με επιτυχία. Η αποτυχία του πειράματος είναι πολύ πιθανό να συνέβη είτε λόγω σφάλματος στην πειραματική πορεία, είτε λόγω μη καταλληλότητας του εμπορικού kit του εργαστηρίου.

#### **Πείραμα 10:**

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμλικής αλκοόλης, κρύας αιθανόλης, οξικού νατρίου και παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη. Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης.

Όπου WS1 το δείγμα νερού που επιμολύνθηκε με *Salmonella* Typhimurium

Πίνακας 4.10: Δείγματα γάλακτος και νερού τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella Typhimurium*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	-
2	$10^7$	-
3	$10^6$	-
4	$10^5$	-
5	$10^4$	-
6	$10^3$	-
7	WS1	+
8	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
9	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Στο πείραμα αυτό έγινε επέκταση της πειραματικής πορείας των προηγούμενων πειραμάτων με την προσθήκη νέων βημάτων όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.3. Με βάση τον πίνακα 4.10 προκύπτει ότι το πείραμα δεν στέφθηκε με επιτυχία αφού τα δείγματα γάλακτος δεν έβγαλαν θετικά αποτελέσματα σε αντίθεση με το δείγμα νερού. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα βγαίνει το συμπέρασμα ότι το πείραμα δεν ήταν επιτυχές είτε επειδή το γάλα δεν έχει καθαριστεί επαρκώς από τους αναστολείς που περιέχει, είτε επειδή στο γάλα η κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου διασπάτε πιο δύσκολα. Επιπλέον υπάρχει η πιθανότητα η το πείραμα να καθίσταται μη επιτυχές λόγω κάποιου πειραματικού λάθους.

#### **Πείραμα 11:**

Απομόνωση *Salmonella Typhimurium* σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμυλικής αλκοόλης, κρύας αιθανόλης, οξικού νατρίου και

παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη. Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης.

Όπου SW1 και SW2 τα δείγματα νερού που επιμολυνθήκανε.

Πίνακας 4.11: Δείγματα γάλακτος και νερού τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	-
2	$10^8$ 1/10	-
3	$10^8$ 1/100	-
4	$10^7$	-
5	$10^7$ 1/10	-
6	$10^7$ 1/100	-
7	$10^6$	-
8	$10^6$ 1/10	-
9	$10^6$ 1/100	-
10	SW1	+
11	SW1 1/10	+
12	SW1 1/100	+
13	SW2	+
14	SW2 1/10	+
15	SW2 1/100	+
16	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
17	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Στο πείραμα αυτό επαναλήφθηκε η μεθοδολογία του πειράματος 10 για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Όπως και στο παραπάνω πείραμα έτσι και σε αυτό επανελήφθησαν τα ίδια αποτελέσματα όπως παρατηρείται στον πίνακα 4.11. Έτσι σύμφωνα με το παραπάνω πίνακα στα δείγματα γάλακτος δεν έγινε η ανίχνευση του παθογόνου μικροοργανισμού, ενώ στα δείγματα νερού έγινε. Οπότε με βάση αυτά τα αποτελέσματα όχι μόνο αποκλείεται η πιθανότητα της αποτυχίας του πειράματος λόγω κάποιου πειραματικού σφάλματος αλλά και ενισχύεται η πιθανότητα της ευθύνης των αναστολών του γάλακτος για την αποτυχία αυτή

### **Πείραμα 12:**

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμυλικής αλκοόλης, κρύας αιθανόλης, οξικού νατρίου και παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη. Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης.

Όπου α και β τα δύο διαφορετικά δείγματα γάλακτος που επιμολύνθηκαν και SW1 και SW2 τα δύο δείγματα νερού που επιμολύνθηκαν

Πίνακας 4.12: Δείγματα γάλακτος και νερού τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10_{\alpha}^8$	-
2	$10_{\alpha}^8$ 1/10	-
3	$10_{\alpha}^8$ 1/100	-
4	$10_{\beta}^8$	-
5	$10_{\beta}^8$ 1/10	-
6	$10_{\beta}^8$ 1/100	-
7	$10_{\alpha}^7$	-
8	$10_{\alpha}^7$ 1/10	-
9	$10_{\alpha}^7$ 1/100	-
10	$10_{\beta}^7$	-
11	$10_{\beta}^7$ 1/10	-
12	$10_{\beta}^7$ 1/100	-
13	SW1	+
14	SW1 1/10	+
15	SW1 1/100	+
16	SW2	+
17	SW2 1/10	+
18	SW2 1/100	+
19	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
20	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε παρόμοια μεθοδολογία με το προηγούμενο με την διαφορά της τροποποίησης της πειραματικής πορείας όπως αναφέρεται αυτή στην παράγραφο 3.5. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.12 παρατηρείται ότι δεν έγινε ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου παρά την τροποποίηση της πειραματικής

πορείας στα δείγματα γάλακτος, ενώ έγινε η ανίχνευση του στα δείγματα νερού. Οπότε βγαίνει το συμπέρασμα ότι η κυτταρική μεμβράνη του μικροοργανισμού διασπάτε πιο δύσκολα σε δείγματα γάλακτος επιμολυσμένα με *Salmonella* Typhimurium σε αντίθεση με δείγματα νερού επιμολυσμένα με *Salmonella* Typhimurium.

### Πείραμα 13:

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμυλικής αλκοόλης, κρύας αιθανόλης, οξικού νατρίου και παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη. Ανίχνευση με την χρήση της PCR και της ηλεκτροφόρησης.

Πίνακας 4.13: Δείγματα γάλακτος και νερού τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^4$	-
2	$10^4$ 1/10	-
3	$10^4$ 1/100	-
4	$10^8$	-
5	$10^8$ 1/10	-
6	$10^8$ 1/100	-
7	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
8	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Σε αυτό το πείραμα επαναλήφθηκε η πειραματική πορεία του πειράματος 12 για επαλήθευση των αποτελεσμάτων και την απόκλιση κάποιου πειραματικού σφάλματος κατά την διενέργεια του πειράματος. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.13 τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος επαληθεύτηκαν και σε αυτό. Οπότε αποκλείεται η μη επιτυχία του πειράματος λόγω κάποιου πειραματικού σφάλματος.

#### Πείραμα 14:

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα νερού, με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Ανίχνευση με LAMP.

Πίνακας 4.14: Δείγματα νερού τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^6$	+
2	$10^6$ 1/10	+
3	$10^5$	+
4	$10^5$ 1/10	+
5	$10^4$	+
6	$10^4$ 1/10	+
7	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά η μέθοδος της LAMP για την ανίχνευση του βακτηριακού DNA. Επιπλέον για την καλύτερη διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης και απομάκρυνση των αναστολέων χρησιμοποιήθηκε και το εμπορικό kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφηκε στις παραγράφους 3.7 και 3.10. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.14 η ανίχνευση του μικροοργανισμού ήταν επιτυχής.

#### Πείραμα 15:

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Ανίχνευση με LAMP.

Πίνακας 4.15: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	-
2	$10^8$ 1/10	+

3	$10^8$ 1/100	+
4	$10^7$	-
5	$10^7$ 1/10	+
6	$10^7$ 1/100	+
7	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Σε αυτό το πείραμα έγινε επανάληψη της πειραματικής πορείας του πειράματος 14 με την διαφορά ότι τα δείγματα που επιμολύνθηκαν ήταν δείγματα γάλακτος και όχι νερού. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.15 παρατηρούμε ότι παρόλο που στις αραιώσεις των δειγμάτων έγινε η ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών στα πιο πυκνά δείγματα παρατηρείται πολύ μικρή έως και μηδαμινή αλλαγή χρώματος. Ένας πιθανός λόγος που συμβαίνει αυτό έχει να κάνει με τους εκκινητές. Οι εκκινητές όταν δεν είναι αρκετά αραιωμένοι υβριδίζονται μεταξύ τους με αποτέλεσμα η LAMP να μην παρουσιάσει αλλαγή χρώματος. Συμπερασματικά η μέθοδος αυτή που ακολουθήθηκε είχε επιτυχία πέρα από τα δείγματα νερού και στα δείγματα γάλακτος.

#### **Πείραμα 16:**

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Ανίχνευση με LAMP.

Πίνακας 4.16: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^6$	+
2	$10^6$ 1/10	+
3	$10^5$	+
4	$10^5$ 1/10	+
5	$10^4$	+



6	10 <sup>4</sup> 1/10	+
7	10 <sup>3</sup>	-
8	10 <sup>3</sup> 1/10	-
9	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Αυτό το πείραμα είχε ως στόχο την εύρεση των ορίων ανίχνευσης της LAMP όταν έχει γίνει απομόνωση του βακτηριακού DNA από το εμπορικό kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.16 έγινε η ανίχνευση του μικροοργανισμού μέχρι την αραιώση 10<sup>4</sup>. Η αραιώση 10<sup>3</sup> δεν είχε εμφανείς αλλαγή χρώματος με αποτέλεσμα να δώσει αρνητικό αποτέλεσμα. Ένα άλλο αξιοσημείωτο γεγονός που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι όσο μειωνόταν η συγκέντρωση του βακτηριακού DNA στο δείγμα τόσο έφθινε και η αλλαγή χρώματος κατά την διενέργεια της LAMP. Οπότε το δείγμα με την περισσότερη ποσότητα του μικροοργανισμού είχε πιο έντονη αλλαγή χρώματος συγκρινόμενο με τα υπόλοιπα δείγματα. Συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί ότι τα όρια ανίχνευσης της LAMP όταν έχει απομονωθεί το DNA της *Salmonella* Typhimurium με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel είναι 10<sup>4</sup>.

#### **Πείραμα 17:**

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμλικής αλκοόλης, κρύας αιθανόλης, οξικού νατρίου και παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη. Ανίχνευση με την LAMP.

Πίνακας 4.17: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	+
2	$10^8$ 1/10	+
3	$10^7$	+
4	$10^7$ 1/10	+
5	$10^6$	+
6	$10^6$ 1/10	+
7	$10^5$	+
8	$10^5$ 1/10	+
9	$10^4$	+
10	$10^4$ 1/10	+
11	$10^3$	-
12	$10^3$ 1/10	-
13	$10^2$	-
14	$10^2$ 1/10	-
15	$10^1$	-
16	$10^1$ 1/10	-
17	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Σε αυτό το πείραμα έγινε επανάληψη της πειραματικής πορείας του πειράματος 13 αλλά με την χρήση της LAMP για την ανίχνευση του βακτηριακού DNA αντί για την PCR. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4.17 το πείραμα στέφθηκε με επιτυχία μέχρι το δείγμα  $10^4$ . Από την αραιώση  $10^3$  και μετά η LAMP έδωσε αρνητικά αποτελέσματα. Ο λόγος που το πείραμα αυτό ήταν επιτυχές έχει να κάνει με το γεγονός ότι η LAMP είναι λιγότερο ευαίσθητη στους αναστολείς σε σύγκριση με την PCR. Επομένως βγαίνει το συμπέρασμα ότι το πείραμα 13 δεν ήταν επιτυχές

λόγω των αναστολών και όχι λόγω της μη επαρκούς διάσπασης της κυτταρικής μεμβράνης. Όπως και στο προηγούμενο πείραμα έτσι και σε αυτό παρατηρήθηκε ότι η μεταβολή του χρώματος ήταν πιο έντονη σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και έφθινε όσο αραιώνονταν τα δείγματα. Σαν συμπέρασμα από το παρόν πείραμα βγαίνει ότι τα όρια ανίχνευσης της LAMP όταν έχει απομονωθεί το DNA της *Salmonella Typhimurium* με την χρήση της in house μεθόδου που αναπτύχθηκε είναι  $10^4$ .

### Πείραμα 18:

Απομόνωση *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμλικής αλκοόλης, κρύας αιθανόλης, οξικού νατρίου και παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη. Ανίχνευση με την LAMP.

Πίνακας 4.18: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Listeria monocytogenes*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	-
2	$10^8$ 1/10	-
3	$10^7$	-
4	$10^7$ 1/10	-
5	$10^6$	-
6	$10^6$ 1/10	-
7	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Στο παρόν πείραμα επαναλήφθηκε η διαδικασία του πειράματος 17 με την διαφορά ότι αντί για επιμόλυνση με *Salmonella Typhimurium* έγινε επιμόλυνση με *Listeria monocytogenes*. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4.18 σε αντίθεση την *Salmonella Typhimurium* η *Listeria monocytogenes* δεν ανιχνεύθηκε με την τεχνική της LAMP. Είναι πιθανό λοιπόν ότι είτε η μέθοδος της LAMP είναι ακατάλληλη για το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο όταν αυτό βρίσκεται στο γάλα, είτε ότι το DNA του βακτηρίου χρειάζεται καλύτερη απομόνωση ώστε να δώσει η LAMP θετικά

αποτελέσματα. Επιπλέον δεν θα πρέπει να αποκλειστεί η πιθανότητα του πειραματικού σφάλματος κατά την διενέργεια της επεξεργασίας.

### Πείραμα 19:

Απομόνωση *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος, με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Ανίχνευση με LAMP.

Πίνακας 4.19: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Listeria monocytogenes*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	-
2	$10^8$ 1/10	-
3	$10^7$	-
4	$10^7$ 1/10	-
5	$10^6$	-
6	$10^6$ 1/10	-
7	$10^5$	-
8	$10^5$ 1/10	-
9	$10^4$	-
10	$10^4$ 1/10	-
11	$10^3$	-
12	$10^3$ 1/10	-
13	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Στο παρόν πείραμα έγινε η απόπειρα καλύτερης απομόνωσης του βακτηριακού DNA σε γάλα με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.19 κατά την διενέργεια της LAMP δεν

υπήρξε η επιθυμητή αλλαγή του χρώματος στα δείγματα. Επομένως δεν μπόρεσε με αυτή την μέθοδο να ανιχνευθεί ο παθογόνος μικροοργανισμός. Τα αποτελέσματα του πειράματος οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος LAMP ίσως δεν είναι κατάλληλη για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος. Φυσικά δεν πρέπει να αποκλειστεί η αποτυχία του πειράματος λόγω κάποιου πειραματικού σφάλματος.

### **Πείραμα 20:**

Απομόνωση *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος, με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Ανίχνευση με LAMP.

Πίνακας 4.20: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Listeria monocytogenes*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	-
2	$10^8$ 1/10	-
3	$10^7$	-
4	$10^7$ 1/10	-
5	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Σε αυτό το πείραμα πραγματοποιήθηκε η ίδια πειραματική πορεία με το πείραμα 19 με σκοπό να αποκλειστεί η πιθανότητα αποτυχίας του προηγούμενου πειράματος λόγω κάποιου πειραματικού σφάλματος. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.20 όλα τα δείγματα βγήκαν αρνητικά, δηλαδή δεν επιτεύχθηκε η ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου με την μέθοδο της LAMP. Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος συνάδουν με αυτά του προηγούμενου. Επομένως θα πρέπει να αποκλειστεί η αποτυχία αυτών των δύο πειραμάτων λόγω κάποιου πειραματικού σφάλματος. Τα αποτελέσματα των δύο τελευταίων πειραμάτων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος LAMP ίσως δεν είναι κατάλληλη για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος. Ενώ υπάρχει η πιθανότητα της αποτυχίας της ανίχνευσης λόγω του υβριδισμού των εκκινητών μεταξύ τους.

### **Πείραμα 21:**

Απομόνωση *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος, με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Ανίχνευση με LAMP.

Πίνακας 4.21: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Listeria monocytogenes*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	+
2	$10^8$ 1/10	+
3	$10^7$	+
4	$10^7$ 1/10	+
5	$10^6$	+
6	$10^6$ 1/10	+
7	$10^5$	+
8	$10^5$ 1/10	+
9	$10^4$	+
10	$10^4$ 1/10	+
11	$10^3$	+
12	$10^3$ 1/10	+
13	$10^2$	+
14	$10^2$ 1/10	+
15	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Στο πείραμα αυτό έγινε η ίδια μεθοδολογία με το πείραμα 20 με την διαφορά ότι στο συγκεκριμένο οι εκκινητές της LAMP αραιώθηκαν στο 1/10 της αρχικής τους συγκέντρωσης. Αυτή η αραιώση πραγματοποιήθηκε για να αποκλειστεί η πιθανότητα αποτυχίας των προηγούμενων πειραμάτων λόγω υβριδισμού των εκκινητών μεταξύ τους. Με βάση τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στον πίνακα 4.21 φαίνεται ότι

πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση του παθογόνου μικροοργανισμού σε δείγματα γάλακτος με την τεχνική της LAMP καθώς και φαίνεται ότι τα όρια ανίχνευσης της είναι  $10^2$ . Σαν συμπέρασμα προέκυψε ότι η αποτυχία των προηγούμενων πειραμάτων είχε άμεση σχέση με τον υβριδισμό των εκκνητών μεταξύ τους και ότι με την αραιώση τους μπόρεσε το πείραμα να στεφθεί με επιτυχία.

### Πείραμα 22:

Απομόνωση *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος, με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Ανίχνευση με LAMP.

Πίνακας 4.22: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Listeria monocytogenes*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	+
2	$10^8$ 1/10	+
3	$10^7$	+
4	$10^7$ 1/10	+
5	$10^6$	+
6	$10^6$ 1/10	+
7	$10^5$	+
8	$10^5$ 1/10	+
9	$10^4$	+
10	$10^4$ 1/10	+
11	$10^3$	+
12	$10^3$ 1/10	+
13	$10^2$	+
14	$10^2$ 1/10	-

Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε με σκοπό να γίνει επαλήθευση των αποτελεσμάτων που απεικονίζονται στον πίνακα 4.21. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.22 που απεικονίζει τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος η ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* ήταν επιτυχής. Σε σύγκριση όμως με τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος παρατηρείται μία μικρή διαφοροποίηση στα όρια ανίχνευσης με το βακτήριο να μην ανιχνεύεται στην αραιώση  $10^2$  1/10. Αυτή η διαφορά των αποτελεσμάτων είναι πιθανό να συνδέεται με κάποιο πειραματικό σφάλμα. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία η επανάληψη της μεθοδολογίας του πειράματος.

### Πείραμα 23:

Απομόνωση *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος, με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Ανίχνευση με LAMP.

Πίνακας 4.23: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Listeria monocytogenes*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	+
2	$10^8$ 1/10	+
3	$10^7$	+
4	$10^7$ 1/10	+
5	$10^6$	+
6	$10^6$ 1/10	+
7	$10^5$	+
8	$10^5$ 1/10	+
9	$10^4$	+



10	$10^4$ 1/10	+
11	$10^3$	+
12	$10^3$ 1/10	+
13	$10^2$	-
14	$10^2$ 1/10	-
15	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Στα συμπεράσματα του προηγούμενου πειράματος κρίθηκε αναγκαία η επανάληψη του για να βρεθούν τα όρια ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes* με την τεχνική της LAMP. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.23 στο πείραμα έγινε η ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου έως την αραιώση  $10^3$ , με την αραιώση  $10^2$  να μην έχει προφανής οπτική μεταβολή χρώματος οπότε και να μην δίνει θετικό αποτέλεσμα. Επομένως τα όρια ανίχνευσης του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* με την τεχνική της LAMP όταν αυτό έχει απομονωθεί από δείγματα γάλακτος με το εμπορικό kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel είναι  $10^3$ .

#### Πείραμα 24:

Απομόνωση *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμλικής αλκοόλης, κρύας αιθανόλης, οξικού νατρίου και παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη. Ανίχνευση με την LAMP.

Πίνακας 4.24: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Listeria monocytogenes*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	+
2	$10^8$ 1/10	+
3	$10^7$	+
4	$10^7$ 1/10	+

5	$10^6$	+
6	$10^6$ 1/10	+
7	$10^5$	+
8	$10^5$ 1/10	+
9	$10^4$	+
10	$10^4$ 1/10	+
11	$10^3$	+
12	$10^3$ 1/10	-
13	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Μετά την εύρεση των ορίων ανίχνευσης με την χρήση του εμπορικού kit καθίσταται αναγκαία και η εύρεση των ορίων ανίχνευσης και με την in house τεχνική που αναπτύχθηκε. Σε αυτό το πείραμα οι εκκινητές της LAMP χρησιμοποιήθηκαν στο 1/10 της αρχικής συγκέντρωσης τους όπως και στο παραπάνω πείραμα. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.24 η μέθοδος στέφθηκε με επιτυχία με όριο ανίχνευσης της μεθόδου να είναι η αραιώση  $10^3$ . Κρίνεται αναγκαία η επανάληψη του πειράματος ώστε να επαληθευτούν τα αποτελέσματα αυτού.

#### Πείραμα 25:

Απομόνωση *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμλικής αλκοόλης, κρύας αιθανόλης, οξικού νατρίου και παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη. Ανίχνευση με την LAMP.

Πίνακας 4.25: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Listeria monocytogenes*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	+

2	$10^8$ 1/10	+
3	$10^7$	+
4	$10^7$ 1/10	+
5	$10^6$	+
6	$10^6$ 1/10	+
7	$10^5$	+
8	$10^5$ 1/10	+
9	$10^4$	+
10	$10^4$ 1/10	+
11	$10^3$	+
12	$10^3$ 1/10	+
13	$10^2$	+
14	$10^2$ 1/10	-
15	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Το πείραμα αυτό έγινε με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων του προηγούμενου πειράματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού που παρουσιάζονται στον πίνακα 4.25, τα όρια ανίχνευσης του μικροοργανισμού επεκτάθηκαν αφού πραγματοποιήθηκε ανίχνευση του βακτηρίου μέχρι και στην αραιώση  $10^2$ . Επομένως σαν συμπέρασμα προκύπτει ότι τα όρια ανίχνευσης του βακτηρίου της *Listeria monocytogenes* με την τεχνική της LAMP όταν αυτό έχει απομονωθεί από δείγματα γάλακτος με την in house τεχνική που αναπτύχθηκε είναι  $10^2$ .

#### **Πείραμα 26:**

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Ανίχνευση με LAMP.

Πίνακας 4.26: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	+
2	$10^8$ 1/10	+
3	$10^7$	+
4	$10^7$ 1/10	+
5	$10^6$	+
6	$10^6$ 1/10	+
7	$10^5$	+
8	$10^5$ 1/10	+
9	$10^4$	+
10	$10^4$ 1/10	+
11	$10^3$	+
12	$10^3$ 1/10	+
13	$10^2$	+
14	$10^2$ 1/10	-
15	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Καθώς η αραιώση των εκκινητών της LAMP στα προηγούμενα πειράματα βελτίωσε τα αποτελέσματα της τεχνικής, κρίνεται αναγκαία η απόπειρα βελτίωσης των ορίων ανίχνευσης και στο βακτήριο της *Salmonella* Typhimurium. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα 4.26 με την χρήση των αραιωμένων εκκινητών, το όριο ανίχνευσης του βακτηρίου με την τεχνική της LAMP και τη χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel είναι  $10^2$ . Οπότε είναι προφανής η

βελτίωση των ορίων ανίχνευσης με την χρήση των αραιωμένων εκκινητών αφού με τους προηγούμενους εκκινητές που χρησιμοποιούνταν το όριο ανίχνευσης ήταν  $10^4$ .

### Πείραμα 27:

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμλικής αλκοόλης, κρύας αιθανόλης, οξικού νατρίου και παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη. Ανίχνευση με την LAMP.

Πίνακας 4.27: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	+
2	$10^8$ 1/10	+
3	$10^7$	+
4	$10^7$ 1/10	+
5	$10^6$	+
6	$10^6$ 1/10	+
7	$10^5$	+
8	$10^5$ 1/10	+
9	$10^4$	+
10	$10^4$ 1/10	+
11	$10^3$	+
12	$10^3$ 1/10	+
13	$10^2$	+
14	$10^2$ 1/10	-

Σε αυτό το πείραμα έγινε η απόπειρα βελτίωσης των ορίων ανίχνευσης της *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος. Η απόπειρα βελτίωσης έγινε με την χρήση των εκκινητών της LAMP αραιωμένων στο 1/10 της αρχικής συγκέντρωσης τους. Επίσης σε αυτή την μέθοδο η απομόνωση του βακτηριακού DNA πραγματοποιήθηκε με την in house τεχνική που αναπτύχθηκε. Σύμφωνα με τον πίνακα αποτελεσμάτων 4.27 το όριο ανίχνευσης αυτής της τεχνικής είναι η αραιώση  $10^2$ . Σε σύγκριση με τον πίνακα 4.17 υπήρξε προφανής βελτίωση των ορίων ανίχνευσης αφού στο πείραμα 17 βρέθηκε όριο ανίχνευσης  $10^4$ . Σαν συμπέρασμα από το παρών πείραμα βγαίνει ότι η αραιώση των εκκινητών βελτιώνουν τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου. Επομένως το όριο ανίχνευσης του βακτηρίου της *Salmonella* Typhimurium με την τεχνική της LAMP και με απομόνωση του βακτηριακού DNA με την in house τεχνική που αναπτύχθηκε είναι  $10^2$ , όταν γίνεται χρήση των αραιωμένων εκκινητών της LAMP

#### Πείραμα28:

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμυλικής αλκοόλης, κρύας αιθανόλης, οξικού νατρίου και παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη. Ανίχνευση με PCR και ηλεκτροφόρηση

Πίνακας 4.28: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	+
2	$10^8$ 1/10	+
3	$10^7$	-
4	$10^7$ 1/10	+
5	$10^6$	-

6	$10^6$ 1/10	+
7	$10^5$	+
8	$10^5$ 1/10	+
9	$10^4$	+
10	$10^4$ 1/10	+
11	$10^3$	+
12	$10^3$ 1/10	+
13	$10^2$	+
14	$10^2$ 1/10	-
15	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
16	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε η in house τεχνική που αναπτύχθηκε, σε συνδυασμό με την μέθοδο της PCR. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον πίνακα 4.28. Σαν συμπέρασμα προκύπτει ότι, η αραιώση  $10^8$  και η  $10^8$  1/10 βγήκαν θετικά, δηλαδή υπήρχε αρκετή ποσότητα DNA του μικροοργανισμού για να ανιχνευθεί στην ηλεκτροφόρηση. Ωστόσο τα δείγματα  $10^7$  και  $10^6$  βγήκαν αρνητικά παρόλο που οι αραιώσεις τους έδωσαν θετικό αποτέλεσμα. Αυτό μπορεί να προέκυψε λόγω κάποιου πειραματικού σφάλματος κατά την πειραματική πορεία. Επιπλέον το δείγμα  $10^5$  έως και το δείγμα  $10^3$  έδωσαν θετικό αποτέλεσμα. Τέλος λόγω της μικρής ποσότητας του βακτηριακού DNA που περιείχε, η αραιώση του δείγματος  $10^2$  έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα. Επομένως το όριο ανίχνευσης του βακτηρίου της *Salmonella Typhimurium* με την μέθοδο της PCR και με απομόνωση του βακτηριακού DNA με την in house τεχνική που αναπτύχθηκε είναι  $10^2$ .

#### **Πείραμα 29:**

Απομόνωση *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος, με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Ανίχνευση με PCR και ηλεκτροφόρηση.

Πίνακας 4.29: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Listeria monocytogenes*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	+
2	$10^8$ 1/10	+
3	$10^7$	+
4	$10^7$ 1/10	+
5	$10^6$	+
6	$10^6$ 1/10	+
7	$10^5$	+
8	$10^5$ 1/10	+
9	$10^4$	+
10	$10^4$ 1/10	+
11	$10^3$	+
12	$10^3$ 1/10	+
13	$10^2$	+
14	$10^2$ 1/10	-
15	Πρότυπο θετικό δείγμα	+

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel ενώ στη συνέχεια έγινε η απόπειρα ανίχνευσης του μικροοργανισμού με την PCR. Τα αποτελέσματα του πειράματος, τα οποία απεικονίζονται στον πίνακα 4.29 δείχνουν ότι το πείραμα στέφθηκε με επιτυχία. Από τον πίνακα προέκυψε ότι τα δείγματα από  $10^8$  έως και  $10^2$  καθώς και οι αντίστοιχες αραιώσεις τους εκτός από την αραιώση του δείγματος  $10^2$  έδωσαν θετικό αποτέλεσμα. Τα σφάλματά κατά την πειραματική πορεία είναι ο λόγος που το



πείραμα αυτό πέτυχε ενώ στις προηγούμενες απόπειρες που πραγματοποιήθηκαν με την ίδια πειραματική πορεία τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά. Οπότε τα όρια ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel για την απομόνωση του μικροβιακού DNA και την PCR για την ανίχνευση του μικροοργανισμού είναι το  $10^2$ .

### Πείραμα 30:

Απομόνωση *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος , με λύση της κυτταρικής μεμβράνης με 20' βρασμό και 10' υπέρηχους και την προσθήκη χλωροφορμίου, ισοαμλικής αλκοόλης, κρύας αιθανόλης, οξικού νατρίου και παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη. Ανίχνευση με PCR και ηλεκτροφόρηση.

Πίνακας 4.30: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Listeria monocytogenes*.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	$10^8$	+
2	$10^8$ 1/10	+
3	$10^6$	+
4	$10^6$ 1/10	+
5	$10^5$	+
6	$10^5$ 1/10	+
7	$10^4$	+
8	$10^4$ 1/10	+
9	$10^3$	+
10	$10^3$ 1/10	+
11	$10^2$	-

12	10 <sup>2</sup> 1/10	-
13	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
14	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Στο παρόν πείραμα αναλύθηκαν δείγματα γάλακτος που είχαν επιμολυνθεί με γνωστή συγκέντρωση *Listeria monocytogenes*. Όπως απεικονίζεται στον πίνακα 4.30 το πείραμα στέφθηκε με επιτυχία. Τα δείγματα 10<sup>8</sup> έως και 10<sup>3</sup> έδωσαν θετικό αποτέλεσμα ενώ το δείγμα 10<sup>2</sup> και η αραιώση του έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα όρια ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος με την απομόνωση του DNA με την in-house τεχνική και τη ανίχνευση του μικροοργανισμού με την PCR είναι 10<sup>3</sup>.

### Πείραμα 31

Απομόνωση *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος, με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Ανίχνευση με PCR και ηλεκτροφόρηση.

Πίνακας 4.31: Δείγματα γάλακτος τα οποία έχουν επιμολυνθεί με γνωστές υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις *Salmonella* Typhimurium.

Αριθμός	Δείγματα	Αποτελέσματα
1	10 <sup>8</sup>	+
2	10 <sup>8</sup> 1/10	+
3	10 <sup>7</sup>	+
4	10 <sup>7</sup> 1/10	+
5	10 <sup>6</sup>	+
6	10 <sup>6</sup> 1/10	+

7	$10^5$	+
8	$10^5$ 1/10	+
9	$10^4$	+
10	$10^4$ 1/10	+
11	$10^3$	+
12	$10^3$ 1/10	+
13	$10^2$	-
14	$10^2$ 1/10	-
15	Πρότυπο θετικό δείγμα	+
16	Αρνητικό δείγμα (νερό)	-

Στο τελικό πείραμα αναλύθηκαν δείγματα γάλακτος που είχαν επιμολυνθεί με γνωστή συγκέντρωση *Salmonella* Typhimurium. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στον πίνακα 4.31 προκύπτει το συμπέρασμα ότι και η συγκεκριμένη μέθοδος στέφθηκε με επιτυχία. Συγκεκριμένα σε όλες τις αραιώσεις μέχρι και στην αραιώση  $10^3$  έγινε η ανίχνευση του βακτηριακού DNA. Συνεπώς τα όρια ανίχνευσης της *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος όταν έχει απομονωθεί το DNA με την χρήση του εμπορικού kit MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel και έχει γίνει ανίχνευση με την PCR είναι  $10^3$ .

## Κεφάλαιο 5: Συμπέρασμα

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ερευνήθηκαν τα όρια ανίχνευσης δύο τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων σε δείγματα γάλακτος χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους απομόνωσης και ανίχνευσης του μικροβιακού DNA. Τα παθογόνα βακτήρια που μελετήθηκαν είναι η *Listeria monocytogenes* και η *Salmonella* Typhimurium. Η απομόνωση του βακτηριακού DNA πραγματοποιήθηκε μέσω μιας in house τεχνικής που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ενός εμπορικού kit. Το εμπορικό kit που χρησιμοποιήθηκε είναι το MN Nucleospin Food – Macherey- Nagel. Επιπλέον οι μέθοδοι ανίχνευσης που μελετήθηκαν είναι ο συνδυασμός PCR και ηλεκτροφόρησης και η μέθοδος της LAMP. Τα όρια ανίχνευσης των διαφόρων μεθόδων απεικονίζονται στον πίνακα 5.1

Πίνακας 5.1: Μέθοδοι και όρια ανίχνευσης για *Salmonella* Typhimurium και *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος

Μέθοδοι	<i>Salmonella</i> Typhimurium σε γάλα(CFU/mL)	<i>Listeria</i> Monocytogenes σε γάλα(CFU/mL)
PCR-in house τεχνική	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
PCR-kit Nucleospin	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
LAMP-in house τεχνική	10 <sup>4</sup>	-
LAMP-kit Nucleospin	10 <sup>4</sup>	-
LAMP με αραίωση εκκινητών- in house τεχνική	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
LAMP με αραίωση εκκινητών- kit Nucleospin	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>

Σύμφωνα με τον πίνακα 5.1 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα. Για το βακτήριο *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα γάλακτος η τεχνική της LAMP έχει ελαφρώς καλύτερα όρια ανίχνευσης από την PCR όσον αφορά το εμπορικό kit απομόνωσης του DNA, ενώ για τη απομόνωση του DNA με την in house τεχνική οι δύο μέθοδοι δεν παρουσιάζουν κάποια διαφορά. Τα όρια ανίχνευσης της LAMP είναι 10<sup>2</sup> CFU/mL και στις δύο περιπτώσεις, ενώ τα όρια της PCR είναι 10<sup>2</sup> CFU/mL με την in house τεχνική και 10<sup>3</sup> CFU/mL με το εμπορικό kit. Αυτό που επηρεάζει το

όριο ανίχνευσης της LAMP είναι ο υβριδισμός των εκκινητών, αφού φαίνεται από τα αποτελέσματα ότι όταν οι εκκινητές είναι αραιωμένοι στο 1/10 της αρχικής συγκέντρωσης τους, δεν υβριδίζονται μεταξύ τους κάνοντας την τεχνική πιο ευαίσθητη. Όσον αφορά την PCR η οποία σαν τεχνική είναι πιο ευαίσθητη στους αναστολείς που περιέχονται στο DNA, η in house τεχνική οδηγεί σε καλύτερα όρια ανίχνευσης.

Για το βακτήριο της *Listeria monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος προκύπτουν συμπεράσματα παραπλήσια με αυτά για την *Salmonella Typhimurium*. Η τεχνική της LAMP και εδώ φαίνεται να είναι παραπλήσια της PCR αφού τα όρια ανίχνευσης παρουσιάζουν μικρή διαφορά. Για την απομόνωση με το εμπορικό kit τα όρια ανίχνευσης και των δύο τεχνικών έχουν μικρή διαφορά αφού η PCR παρουσίασε όριο ανίχνευσης  $10^2$  CFU/mL, ενώ η LAMP παρουσίασε  $10^3$  CFU/mL. Για την απομόνωση με την in house τεχνική η LAMP παρουσίασε ελαφρώς καλύτερα όρια ανίχνευσης από την PCR, με την LAMP να έχει όριο ανίχνευσης  $10^2$  CFU/mL και την PCR να έχει  $10^3$  CFU/mL. Η διαφορά αυτή μπορεί να συμβαίνει λόγω της ευαισθησίας που έχει η PCR στους αναστολείς του DNA σε αντίθεση με την LAMP, η οποία δεν επηρεάζεται από αυτούς. Για το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο φαίνεται ότι οι τεχνικές απομόνωσης δεν επηρεάζουν σημαντικά τα όρια ανίχνευσης του. Επιπροσθέτως η LAMP έχει καλύτερα όρια ανίχνευσης με την in house τεχνική σε σύγκριση με την PCR, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με το εμπορικό kit. Για να είναι λειτουργική η τεχνική της LAMP πρέπει πρώτα να αραιωθούν οι εκκινητές της στο 1/10 της αρχική συγκέντρωσης τους αφού ο μεταξύ τους υβριδισμός είναι πολύ έντονος.

Συμπερασματικά για την ανίχνευση των δύο παθογόνων βακτηρίων που μελετηθήκαν σε γάλα, η μέθοδος της LAMP φαίνεται να μην υστερεί από την τεχνική της PCR ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις είναι και ανώτερη. Παράλληλα η LAMP δεν επηρεάζεται σημαντικά από την τεχνική απομόνωσης του βακτηριακού DNA που χρησιμοποιήθηκε, ενώ το ίδιο συμβαίνει και με την PCR. Όποτε με τον συνδυασμό της χρήσης της in house τεχνικής για την απομόνωση του DNA ενός βακτηρίου και της LAMP για την ανίχνευση του, μειώθηκε πολύ ο χρόνος και το κόστος επεξεργασίας των δειγμάτων χωρίς να μειωθεί η αξιοπιστία του αποτελέσματος.

## Κεφάλαιο 6: Προτάσεις

Οι τροφικές δηλητηριάσεις συνεχίζουν να αποτελούν πραγματικότητα παρά την ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας στις μέρες μας. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας αποδεικνύουν ξανά την σημαντικότητα της περαιτέρω μελέτης της μεθόδου LAMP. Η μέθοδος αυτή συνεχίζει να είναι πολλά υποσχόμενη, αφού μπορεί όχι μόνο να μειώσει τον χρόνο της λήψης των αποτελεσμάτων προλαμβάνοντας τροφολοιμώξεις, αλλά επίσης και το κόστος των αναλύσεων στην βιομηχανία. Επιπλέον δεν απαιτεί την αγορά ακριβών μηχανημάτων, ούτε την χρήση ακριβών εμπορικών kit απομόνωσης του μικροβιακού DNA προ αυτής. Αυτό συμβαίνει καθώς δεν είναι ευαίσθητη στους σύνθετες αναστολές που περιέχονται στο βακτηριακό DNA. Όλα αυτά τα στοιχεία κάνουν την LAMP ιδανική για την χρήση σε εργαστήρια με περιορισμένους πόρους.

Για την ευρεία χρήση στην βιομηχανία τροφίμων είναι όμως αναγκαία περαιτέρω έρευνα της μεθόδου. Πρέπει να εξεταστούν και άλλα είδη τροφίμων σε συνδυασμό με διάφορους άλλους μικροοργανισμούς για να φανεί αν τα όρια ανίχνευσης και σε άλλα τρόφιμα πέρα από το γάλα είναι αποδεκτά. Επιπλέον περαιτέρω έρευνα και της in house τεχνική θεωρείται αναγκαία, αφού τυχόν αντικατάσταση των εμπορικών kit με μία τέτοια τεχνική θα βοηθούσε στην μείωση του κόστους των αναλύσεων.

## Κεφάλαιο 7: Βιβλιογραφία

- Al Bsoul, A., Magnin, J. P., Commenges-Bernole, N., Gondrexon, N., Willison, J., & Petrier, C. (2010). Effectiveness of ultrasound for the destruction of *Mycobacterium* sp. strain (6PY1). *Ultrasonics Sonochemistry*, *17*(1), 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.04.005>
- Alrasheed, A., Connerton, P., Alshammari, G., & Connerton, I. (2021). Cohort study on the food safety knowledge among food services employees in Saudi Arabia state Hospitals. *Journal of King Saud University - Science*, 101500. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101500>
- Aziz, A., Abbas, M. A., Siddique, N., Shah, A., Rahim, A., Rafique, S., Khan, A., Midrarullah, Khan, S., Rashid, F., Hui, Y., & Suleman, M. (2021). Development of multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of *E. coli* (APEC), *Salmonella*, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma Synoviae*. *Gene Reports*, *24*(February), 101216. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101216>
- Dehghani, M. H. (2005). Effectiveness of Ultrasound on the Destruction of *E. coli* Mohammad Hadi Dehghani Department of Environmental Health Engineering , School of Public Health Center for Environmental Health Research , Tehran University of Medical Sciences , Tehran , Iran. *American Journal of Environmental Science*, *1*(3), 187–189.
- Deng, H., & Gao, Z. (2015). Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques. *Analytica Chimica Acta*, *853*(1), 30–45. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.037>
- Disson, O., Moura, A., & Lecuit, M. (2021). Making Sense of the Biodiversity and Virulence of *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.008>
- Kim, J. H., Jung, S., & Oh, S. W. (2020). Combination of bacteria concentration and DNA concentration for rapid detection of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, and *S. Typhimurium* without microbial enrichment. *Lwt*, *117*(September 2018), 108609. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108609>
- Kunwar, R., Singh, H., Mangla, V., & Hiremath, R. (2013). Outbreak investigation:

- Salmonella food poisoning. *Medical Journal Armed Forces India*, 69(4), 388–391. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2013.01.005>
- Lee, S., Khoo, V. S. L., Medriano, C. A. D., Lee, T., Park, S. Y., & Bae, S. (2019). Rapid and in-situ detection of fecal indicator bacteria in water using simple DNA extraction and portable loop-mediated isothermal amplification (LAMP)PCR methods. *Water Research*, 160, 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.049>
- Li, F., Ye, Q., Chen, M., Shang, Y., Zhang, J., Ding, Y., Xue, L., Wu, S., Wang, J., Pang, R., Lei, T., Zeng, H., & Wu, Q. (2021). Real-time PCR identification of *Listeria monocytogenes* serotype 4c using primers for novel target genes obtained by comparative genomic analysis. *LWT*, 138(August 2020), 110774. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110774>
- Margot, H., Stephan, R., O'Mahony, E., & Iversen, C. (2013). Comparison of rapid cultural methods for the detection of *Salmonella* species. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2–3), 47–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.013>
- Mei, X., Zhai, X., Lei, C., Ye, X., Kang, Z., Wu, X., Xiang, R., Wang, Y., & Wang, H. (2019). Development and application of a visual loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick (LAMP-LFD)method for rapid detection of *Salmonella* strains in food samples. *Food Control*, 104(April), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.014>
- Morya, S., Amoah, A. E. D. D., & Snaebjornsson, S. O. (2020). Food poisoning hazards and their consequences over food safety. In *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819001-2.00019-x>
- Papatheodorou, S. A., Halvatsiotis, P., & Houhoula, D. (2021). A comparison of different dna extraction methods and molecular techniques for the detection and identification of foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 7(3), 304–316. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2021019>
- Prabakaran, S. R., Kalaiselvi, V., Chandramouleeswaran, N., Deepthi, K. N. G.,



- Brahmadathan, K. N., & Mani, M. (2017). Molecular diagnosis of *Salmonella typhi* and its virulence in suspected typhoid blood samples through nested multiplex PCR. *Journal of Microbiological Methods*, *139*(March), 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.05.013>
- Rohde, A., Hammerl, J. A., Boone, I., Jansen, W., Fohler, S., Klein, G., Dieckmann, R., & Al Dahouk, S. (2017). Overview of validated alternative methods for the detection of foodborne bacterial pathogens. *Trends in Food Science and Technology*, *62*, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.006>
- Russell, A. D. (2003). Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. *Science Progress*, *86*(Pt 1-2), 115–137. <https://doi.org/10.3184/003685003783238699>
- Shang, Y., Ye, Q., Cai, S., Wu, Q., Pang, R., Yang, S., Xiang, X., Wang, C., Zha, F., Ding, Y., Zhang, Y., Wang, J., Sun, X., & Zhang, J. (2021). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Salmonella* in foods based on new molecular targets. *Lwt*, *142*(February), 110999. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110999>
- Shatleh-Rantisi, D., Tamimi, A., & Ashhab, Y. (2020). Improving sensitivity of single tube nested PCR to detect fastidious microorganisms. *Heliyon*, *6*(1), e03246. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03246>
- Toley, B. J., Covelli, I., Belousov, Y., Ramachandran, S., Kline, E., Scarr, N., Vermeulen, N., Mahoney, W., Lutz, B. R., & Yager, P. (2015). Isothermal strand displacement amplification (iSDA): A rapid and sensitive method of nucleic acid amplification for point-of-care diagnosis. *Analyst*, *140*(22), 7540–7549. <https://doi.org/10.1039/c5an01632k>
- Xu, Y. G., Liu, Z. M., Zhang, B. Q., Qu, M., Mo, C. S., Luo, J., & Li, S. L. (2016). Development of a novel target-enriched multiplex PCR (Tem-PCR) assay for simultaneous detection of five foodborne pathogens. *Food Control*, *64*, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.12.022>
- Yang, Q., Wang, F., Jones, K. L., Meng, J., Prinyawiwatkul, W., & Ge, B. (2015). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid, reliable, and

- robust detection of Salmonella in produce. *Food Microbiology*, *46*, 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.011>
- Zhang, H., Huang, F., Cai, G., Li, Y., & Lin, J. (2018). Rapid and sensitive detection of Escherichia coli O157:H7 using coaxial channel-based DNA extraction and microfluidic PCR. *Journal of Dairy Science*, *101*(11), 9736–9746. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14730>
- Zhenyan, C., Yihua, Y., Yang, S., Xuping, S., & Xiaoping, Y. (2021). Simultaneous detection of four pathogens in Dendrobium officinale by nested multiplex PCR assay. *Crop Protection*, *140*(October 2020), 105445. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105445>
- Zupanc, M., Pandur, Ž., Stepišnik Perdih, T., Stopar, D., Petkovšek, M., & Dular, M. (2019). Effects of cavitation on different microorganisms: The current understanding of the mechanisms taking place behind the phenomenon. A review and proposals for further research. *Ultrasonics Sonochemistry*, *57*(April), 147–165. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.05.009>
- Birmpa, A., Kalogeropoulos, K., Kokkinos, P., & Vantarakis, A. (2015). Evaluation of two loop-mediated isothermal amplification methods for the detection of Salmonella Enteritidis and Listeria monocytogenes in artificially contaminated ready-to-eat fresh products. *Italian Journal of Food Safety*, *4*(3). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.5383>
- Chen, Z., Zhang, K., Yin, H., Li, Q., Wang, L., & Liu, Z. (2015). Detection of Salmonella and several common Salmonella serotypes in food by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Science and Human Wellness*, *4*(2), 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.05.001>
- Dimitrakopoulou, M.-E., Stavrou, V., Kotsalou, C., & Vantarakis, A. (2020). Boiling Extraction Method VS Commercial Kits for Bacterial DNA Isolation from Food Samples. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, *03*(04), 311–319. <https://doi.org/10.26502/jfsnr.2642-11000057>
- Khan, M., Wang, R., Li, B., Liu, P., Weng, Q., & Chen, Q. (2018). Comparative evaluation of the LAMP assay and PCR-based assays for the rapid detection of Alternaria solani. *Frontiers in Microbiology*, *9*(SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02089>

- Sharif, Y. H., & Tayeb, B. A. (2021). Estimation of limit of detection of salmonella typhimurium in artificially contaminated chicken meat by cultured-based and polymerase chain reaction techniques. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35(4), 621–625. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2020.127328.1496>
- Tang, M. J., Zhou, S., Zhang, X. Y., Pu, J. H., Ge, Q. L., Tang, X. J., & Gao, Y. S. (2011). Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by loop-mediated isothermal amplification. *Current Microbiology*, 63(6), 511–516. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0013-3>
- Tirloni, E., Bernardi, C., Drago, S., Stampone, G., Pomilio, F., Cattaneo, P., & Stella, S. (2017). Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Listeria monocytogenes* in dairy food. *Italian Journal of Food Safety*, 6(4), 179–184. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2017.6890>
- Vichaibun, V., & Kanchanaphum, P. (2020). Quantitative LAMP and PCR Detection of *Salmonella* in Chicken Samples Collected from Local Markets around Pathum Thani Province, Thailand. *International Journal of Food Science*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8833173>