Σχολή Επιστημών Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ CRISPR CAS ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

MSc Thesis

APPLICATION OF CRISPR CAS TECHNOLOGIES IN FOODBORNE BACTERIA

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ/NAME OF STUDENT

ΝΕΖΗ ΣΟΦΙΑ

NEZI SOFIA

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ ΑΝΘΙΜΙΑ

MPATRINOY ANTHIMIA

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022

Faculty of Food Sciences

Department of Food Science and Technology

Master of Science

FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY

MSc Thesis

APPLICATION OF CRISPR CAS TECHNOLOGIES IN FOODBORNE BACTERIA

NEZI SOFIA

sofianna_nezh@yahoo.gr

SUPERVISOR

MPATRINOY ANTHIMIA

AIGALEO 2022

Έγινε δεκτή

Ο Διευθυντής του ΠΜΣ:

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «Εφαρμογή Τεχνολογιών CRISPR-Cas σε Τροφιμογενή Βακτήρια» που παρουσιάσθηκε από την Νέζη Σοφία, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία Μπατρίνου Ανθιμία

Anthimia Aikaterini Batrinou

Digitally signed by Anthimia Aikaterini Batrinou
Date: 2022.07.14 13:47:37 +03'00'

Ημερομηνία Λουγκοβόης Βλαδίμηρος

Vladimiros Lougkovois

Digitally signed by Vladimiros Lougkovois
Date: 2022.07.14 17:17:16 +03'00'

Ημερομηνία Σπυρίδων Κοντελές

SPYRIDON KONTELES

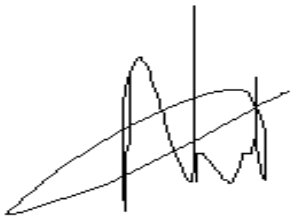
Digitally signed by SPYRIDON KONTELES
Date: 2022.07.14 14:11:37 +03'00'

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην

περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί

προϊόν λογοκλοπής.



ΝΕΖΗ ΣΟΦΙΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την βοήθεια και υποστήριξη της καθηγήτριας μου, Κα. Μπατρίνου Ανθιμίας-Επίκουρη Καθηγήτρια στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Ευχαριστώ πολύ και τους καθηγητές μου, Κος. Β.Λουγκοβόης-Καθηγητής και Κος. Σ.Κοντελές-Επίκουρος Καθηγητής.

ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Αυτή η εργασία είναι αφιερωμένη στον πιο θερμό υποστηρικτή και στήριγμά μου όλα αυτά τα χρόνια, σε ευχαριστώ για όλα μπαμπά !

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 9

ABSTRACT 10

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 11

2 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CRISPR/CAS9 13

2.1 Ιστορική Αναδρομή 13

2.2 Συστατικά Στοιχεία του Συστήματος 15

2.3 Ταξινόμηση του Συστήματος CRISPR/Cas 17

2.4 Στάδια δράσης του μηχανισμού του συστήματος 18

2.5 Διαγνωστικές μέθοδοι του συστήματος 23

2.6 Εφαρμογές του συστήματος CRISPR/Cas 28

3 ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ 32

3.1 Ασφάλεια Τροφίμων 32

3.2 Συμπτώματα και Τρόποι Μόλυνσης από Τροφιμογενείς Λοιμώξεις 34

3.3 Βακτήρια που σχετίζονται με τροφιμογενείς λοιμώξεις σε μεγάλη συχνότητα 35

3.3.1 SALMONELLA spp 37

3.3.2 CAMPYLOBACTER jejuni 39

3.3.3 ESCHERICHIA COLI 43

3.3.4 LISTERIA MONOCYTOGENES 47

3.3.5 VIBRIO spp. 49

3.3.6 YERSINIA ENTEROCOLITICA 51

3.4 Είδη ιών και παρασίτων που οδηγούν σε τροφιμογενείς λοιμώξεις 52

4 CRISPR-CAS ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ 61

4.1 Καλλιέργειες/Κτηνοτροφία 61

4.2 Εφαρμογές στη βιομηχανία 63

4.3 Γονοτυποίηση με CRISPR-Cas 64

4.4 Επεξεργασία/αναδιαμόρφωση γονιδιώματος σε βακτήρια 65

4.5 Εμβολιασμός βιομηχανικών μικροβίων 66

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 68

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 70

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τεχνολογία CRISPR/Cas9, αποτελεί πλέον μια από τις βασικές μεθόδους επεξεργασίας γονιδιώματος. Ο αμυντικός μηχανισμός ενάντια σε φάγους, καθώς και το ένζυμο Cas9 το οποίο έχει την δυνατότητα να χωρίζει το DNA και να βρίσκει την θέση στο γονιδίωμα η οποία χρειάζεται να κοπεί ή να αντικατασταθεί, οδήγησε στην εξέλιξη της μεθόδου. Η αφαίρεση γονιδίων με την μέθοδο εντοπισμού , που εμφάνιζαν παθογονικότητα οδήγησε στην εξάλειψη παθογόνων βακτηρίων. Στην επιστήμη των τροφίμων είχε καθοριστικό ρόλο, καθώς η δυνατότητα να βρίσκει τους στόχους-φάγους είχε ως αποτέλεσμα να βελτιωθούν αρκετές α' ύλες που χρησιμοποιούνταν για παραγωγές τροφίμων. Έτσι, βοήθησε στην εξάλειψη διαφόρων προβλημάτων στην παραγωγή και την δημιουργία προϊόντων με βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται ο τρόπος δράσης της CRISPR/Cas καθώς και εφαρμογές της τεχνολογίας σε τροφιμογενή βακτήρια που έχουν παίξει ρόλο στην ανθρώπινη υγεία και κατά συνέπεια έχουν δημιουργήσει παγκόσμιες κρίσεις.

ABSTRACT

CRISPR/Cas technology, is now one of the basic methods of genome processing. The defense mechanism against swords, as well as the enzyme Cas9 which has the ability to separate DNA and find its place in the genome that needs to be cut or replaced, led to the development of the method. Removal of pathogenic genes that showed pathogenicity led to the elimination of pathogenic bacteria. It played a key role in food science, as its ability to find phage targets resulted in the improvement of several raw materials used for food production. Thus, it helped to eliminate various problems in the production and creation of products with improved quality characteristics. The present study presents the mode of action of CRISPR/Cas as well as application of the technology to foodborne bacteria that have played a role in human health and consequently have created global crises.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος στον τομέα της βιοτεχνολογίας και ο κλάδος της γενετικής μηχανικής προχωρά με πρωτοφανή ρυθμό, αποφέροντας πολλά πλεονεκτήματα. Η τεχνολογία επεξεργασίας γονιδιώματος έχει φέρει επανάσταση στη γενετική και βιολογική έρευνα μέσω της νέας δυνατότητας των επιστημόνων να χειρίζονται και να τροποποιούν με ακρίβεια τα γονιδιώματα των ζωντανών οργανισμών και επιταχύνοντας τη μελέτη της λειτουργικής γονιδιωματικής (Manghwar et al., 2019; Yang & Huang, 2019).

Επίσης, διάφορα εργαλεία γονιδιωματικής επεξεργασίας έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη τόσο απλών όσο και περίπλοκων γονιδιωμάτων. Η τεχνολογία γονιδιωματικής επεξεργασίας εμφανίστηκε τη δεκαετία του '90 και έκτοτε έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για στοχευμένη γονιδιακή επεξεργασία. Γενικώς, τέσσερα βασικά συστήματα γονιδιωματικής επεξεργασίας έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορα κύτταρα και ζώα, καθένα με τα δικά του πλεονεκτήματα και αυτά είναι τα εξής: η μεγανουκλεάση (meganuclease), οι νουκλεάσες τελεστές που μοιάζουν με ενεργοποιητές μεταγραφής (Transcription Activator-Like Effectornucleases - TALENs), η νουκλεάση των δακτύλων ψευδαργύρου (Zinc Finger Nuclease - ZFN) και οι ομαδοποιημένες κανονικά κατανεμημένες βραχείες παλίνδρομες επαναλήψεις (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR) (Gaj et al., 2013; Zhang et al., 2019).

Το τελευταίο αυτό σύστημα επεξεργασίας γονιδιώματος έγινε γνωστό ως το πιο αποτελεσματικό γενετικό εργαλείο του 20ου και του 21ου αιώνα με τη χρήση της πρωτεΐνης 9 (Cas9) λόγω των εξαιρετικών πλεονεκτημάτων του, με χαρακτηριστικότερα το χαμηλό κόστος εφαρμογής του, την υψηλής απόδοσης πολυπλεξία (multiplexity) του για γονιδιωματική επεξεργασία και την ταυτόχρονη τροποποίηση πολλαπλών ιστών (Bhat et al., 2017).

Ο σκοπός επομένως της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να διερευνήσει και να αναλύσει εις βάθος το σύστημα CRISPR/Cas9, εξετάζοντας ταυτόχρονα και την

εφαρμογή του πάνω στα τροφιμογενή βακτήρια (foodborne bacteria), ένα πολύ σημαντικό θέμα για την ανθρώπινη υγεία καθώς τα βακτήρια αυτά ευθύνονται για αρκετές τροφιμογενείς λοιμώξεις και ασθένειες, παράγοντας διαφόρων τύπων ιών και παρασίτων (Khanzadi & Khan, 2020).

Η εργασία αυτή δομείται ως εξής: το παρών κεφάλαιο αποτελεί μία σύντομη εισαγωγή γύρω από το υπόβαθρο του CRISPR/Cas9. Το πρώτο κεφάλαιο που ακολουθεί μετά την εισαγωγή θα διερευνήσει με λεπτομέρεια το σύστημα CRISPR/Cas9, εξετάζοντας την ιστορικό πλαίσιο κάτω από το οποίο αναπτύχθηκε, καθώς και βασικά χαρακτηριστικά της λειτουργίας του όπως συστατικά στοιχεία, δομή, στάδια δράσης, διάγνωση και εφαρμογή του σε διαφόρους τομείς.

Το δεύτερο κεφάλαιο θα αναλύσει τη δεύτερη πτυχή της εργασίας αυτής, δηλαδή την έννοια των τροφιμογενών βακτηρίων και των λοιμώξεων που προκύπτουν από την ύπαρξη τους σε βασικά είδη τροφίμων. Ειδικότερα, θα αναφερθούν ορισμένα στοιχεία από την Ευρώπη αλλά και σε παγκόσμιο επίπεδο σχετικά με την υφιστάμενη κατάσταση της υγιεινής και ασφάλειας στα τρόφιμα. Έπειτα, θα γίνει αναφορά στα βασικά συμπτώματα από τις τροφιμογενείς λοιμώξεις και θα περιγραφούν τα βασικότερα βακτήρια που σχετίζονται με τις εν λόγω λοιμώξεις, καθώς και τα είδη των ιών και παρασίτων που προκαλούνται από αυτά. Τέλος, θα παρουσιαστούν κάποιες ιστορικά καταγεγραμμένες επιδημίες που έχουν προκληθεί από τις λοιμώξεις αυτές.

Το τρίτο κεφάλαιο θα εστιάσει στην παρουσίαση διαφόρων ερευνών και μελετών της υφιστάμενης βιβλιογραφίας σχετικά με την εφαρμογή του CRISPR/Cas9 σε διάφορες χρήσεις, συμπεριλαμβανομένων και των τροφιμογενών βακτηρίων..

Τέλος, το τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζει συμπεράσματα της εργασίας, διατυπώνοντας ταυτόχρονα και ορισμένες προτάσεις για την μελλοντική έρευνα του θέματος.

2 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CRISPR/CAS9

2.1 Ιστορική Αναδρομή

Ορίζοντας το σύστημα CRISPR/Cas9, θα λέγαμε ότι μια ιδιαίτερη τεχνολογία γονιδιώματος που δίνει τη δυνατότητα σε γενετιστές και ιατρικούς ερευνητές να επεξεργάζονται μέρη του γονιδιώματος αυτού: αφαιρώντας, προσθέτοντας ή αλλάζοντας τμήματα της αλληλουχία του DNA. Τα τελευταία χρόνια, η τεχνολογία αυτή έχει αποδειχθεί πως είναι η πιο απλή, ευέλικτη και ακριβής μέθοδος γενετικής επεξεργασίας και ως εκ τούτου προσελκύει όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον από την επιστημονική και ιατρική κοινότητα (Manghwar et al., 2019).

Έτσι, η τεχνολογία CRISPR αποτελεί επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA στα γονιδιώματα των προκαρυωτικών οργανισμών, όπως τα βακτήρια και τα αρχαία (archaea). Οι μηχανισμοί του CRISPR αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά το 1987 από τον Ιάπωνα Yoshizumi Ishino και την ερευνητική ομάδα του πάνω στο βακτήριο E. Coli, ο οποίος κλωνοποίησε κατά λάθος μια ασυνήθιστη σειρά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που διασκορπίστηκαν με αλληλουχίες διαχωρισμού ενώ ανέλυε ένα γονίδιο υπεύθυνο για τη μετατροπή της αλκαλικής φωσφατάσης. Ωστόσο, λόγω της έλλειψης επαρκών δεδομένων αλληλουχίας DNA, η λειτουργία αυτών των συστοιχιών παρέμεινε μυστήριο (Ishino et al., 2018).

Με την ανακάλυψη των συστημάτων CRISPR, θεωρήθηκε ότι ήταν ένας νέος μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA σε θερμοφιλικά αρχαία και βακτήρια (Makarova et al., 2002). Στις αρχές της δεκαετίας του 2000, ο Mojica και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι οι αλληλουχίες διαχωρισμού στο DNA ήταν παρόμοιες με τις αλληλουχίες που βρέθηκαν σε ιούς, βακτηριοφάγους και πλασμίδια. Έτσι, διαπίστωσαν ότι οι ιοί αυτοί δεν μπορούν να μολύνουν ομόλογες αλληλουχίες διαχωρισμού που φιλοξενούν βακτήρια, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι αλληλουχίες παίζουν ρόλο στο προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα των προκαρυωτικών οργανισμών (Ishino et al., 2018).

Εν συντομία, όταν ένας ιός μολύνει έναν προκαρυωτικό οργανισμό, οι αλληλουχίες διαχωρισμού στις σειρές CRISPR μεταγράφονται για να δημιουργήσουν ένα μικρό CRISPR RNA (crRNA), το οποίο καθοδηγεί τη συνδεδεμένη με την CRISPR

αλληλουχία (Cas) πρωτεΐνη για να διασπάσει τις συμπληρωματικές ιικές αλληλουχίες DNA ή RNA, ανάλογα με τον τύπο του συστήματος CRISPR-Cas. Με αυτόν τον τρόπο, τα συστήματα CRISPR-Cas λειτουργούν ως αμυντικός μηχανισμός για την πρόληψη επαναλαμβανόμενων μολύνσεων από τον ίδιο ιό (Ishino et al., 2018).

Η χρήση του CRISPR-Cas9 για την επεξεργασία γονιδίων διαδόθηκε σε μεγάλο βαθμό το 2012 όταν οι George Church, Jennifer Doudna, Emmanuelle Charpentier και Feng Zhang το χρησιμοποίησαν ως εργαλείο για την τροποποίηση στοχευμένων περιοχών γονιδιωμάτων. Δεδομένης της δυνατότητάς του να φέρει ριζικές αλλαγές στη γονιδιακή επεξεργασία, η επιστημονική κοινότητα ανακήρυξε το CRISPR ως την Ανακάλυψη της Χρονιάς για το έτος 2015. Ως εργαλείο επεξεργασίας του DNA, το CRISPR-Cas9 μπορεί να αφαιρέσει ή να εισάγει νέα γονίδια καθώς και να σιωπήσει ή να ενεργοποιήσει γονίδια (Sharma et al., 2018). Έχει χρησιμοποιηθεί για την απενεργοποίηση γονιδίων που περιορίζουν την παραγωγή λιπιδίων στα μικροφύκη, οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή λιπιδίων και υψηλότερες αποδόσεις βιοκαυσίμου. Στο εγγύς μέλλον, το CRISPR-Cas9 μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία γενετικών διαταραχών όπως για παράδειγμα η δρεπανοκυτταρική αναιμία και η κυστική ίνωση (Kotagama et al., 2019).

Έπειτα από την ανακάλυψη του συστήματος CRISPR-Cas9, η επιστημονική κοινότητα έχει προσπαθήσει να επεκτείνει το σύστημα αυτό, τροποποιώντας τη νουκλεάση Cas9 για να εκτελέσουν μία στοχευμένη επεξεργασία του επιγονιδιώματος. Αυτό το τροποποιημένο σύστημα Cas9, γνωστό ως ενζυμικά νεκρό (dead) Cas9 (dCas9), μπορεί να συνδεθεί με ένα από τα πολλά ένζυμα που αλλάζουν το επιγονιδίωμα, π.χ., το DNA μεθυλάσες ή απομεθυλάσες. Όπως και το Cas9, έτσι και το dCas9 κατευθύνεται στη στοχευμένη γονιδιωματική επεξεργασία με έναν RNA - οδηγό. Ωστόσο, αντί να κόψει το DNA, το σύμπλεγμα ενζύμου dCas9 τροποποιεί το επιγονιδίωμα στο σημείο που γίνεται η επεξεργασία (Brocke et al., 2018).

2.2 Συστατικά Στοιχεία του Συστήματος

Το σύστημα CRISPR-Cas9 αποτελείται από δύο κύρια μόρια τα οποία εισάγουν μια αλλαγή - μετάλλαξη στην αλληλουχία του DNA. Αυτά είναι τα εξής (Sun et al., 2016):

α) **ένζυμο Cas9**, αποτελεί βιολογικό μόριο, συνήθως πρωτεΐνες. Αυτό λειτουργεί ως ένα ζεύγος «μοριακού ψαλιδιού» που μπορεί να διαχωρίσει τους δύο κλώνους του DNA σε μια συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα, έτσι ώστε στη συνέχεια να προστεθούν ή να αφαιρεθούν τμήματα του DNA.

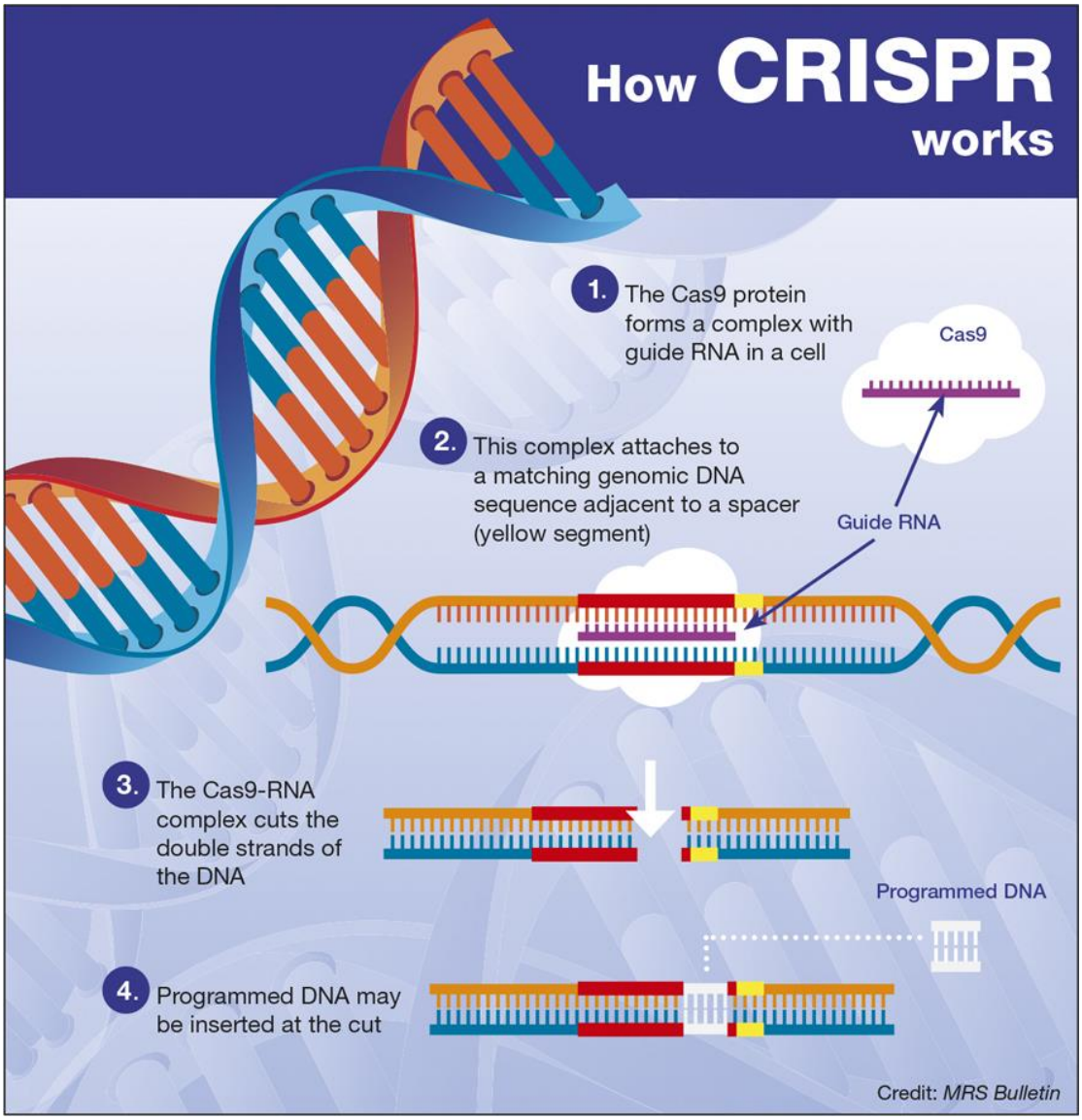
β) **τμήμα RNA**, το οποίο καλείται RNA - οδηγός (gRNA). Αυτό αποτελείται από ένα μικρό τμήμα προσχεδιασμένης αλληλουχίας RNA, μήκους περίπου 20 βάσεων που βρίσκεται μέσα σε ένα μακρύτερο ικρίωμα RNA. Το τμήμα του ικριώματος συνδέεται με το DNA και η προσχεδιασμένη αλληλουχία «οδηγεί» το Cas9 στο δεξί μέρος του γονιδιώματος. Αυτό διασφαλίζει ότι το ένζυμο Cas9 κάνει τον διαχωρισμό στο σωστό σημείο του γονιδιώματος.

Το gRNA είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε να εντοπίζει και να συνδέεται με μια συγκεκριμένη αλληλουχία στο DNA. Το gRNA περιέχει βάσεις RNA (θυμίνη, αδενίνη, κ.α.) που είναι συμπληρωματικές με αυτές της στοχευμένης αλληλουχίας DNA στο γονιδίωμα. Αυτό σημαίνει ότι, τουλάχιστον θεωρητικά, το gRNA θα συνδεθεί μόνο με την αλληλουχία-στόχο και καμία άλλη περιοχή του γονιδιώματος.

Το ένζυμο Cas9 ακολουθεί το gRNA στην ίδια θέση της αλληλουχίας DNA και κάνει μια τομή και στα δύο σκέλη του DNA. Σε αυτό το στάδιο το κύτταρο αναγνωρίζει ότι το DNA είναι κατεστραμμένο και προσπαθεί να το επιδιορθώσει. Η επιστημονική κοινότητα μπορεί να χρησιμοποιήσει τον μηχανισμό επιδιόρθωσης DNA για να εισάγει αλλαγές σε ένα ή περισσότερα γονίδια στο γονιδίωμα ενός συγκεκριμένου κυττάρου (Sun et al., 2016).

Το εν λόγω σύστημα που περιγράφηκε μπορεί να παρουσιαστεί και σχηματικά. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 παρακάτω, το πρώτο βήμα που ακολουθείται για την εφαρμογή του συστήματος είναι η δημιουργία ενός συμπλέγματος της πρωτεΐνης Cas9 με ένα RNA οδηγό σε ένα κύτταρο. Με τη βοήθεια του οδηγού αυτού, το σύμπλεγμα

συνδέεται με μία αλληλουχία γονιδιωμάτων DNA που είναι παρακείμενη με την διαχωριστική αλληλουχία που παριστάνεται με το κίτρινο χρώμα στο σχήμα. Έπειτα, το σύμπλεγμα Cas9 - gRNA διαχωρίζει τα διπλά σκέλη του DNA και έπειτα το τροποποιημένο DNA μπορεί να εισέλθει στο σημείο που επήλθε ο διαχωρισμός.



Εικόνα 1: Περιγραφή του Συστήματος CRISPR/Cas9 (**Πηγή εικόνας:** https://www.cambridge.org/core/journals/mrs-bulletin/news/crispr-implications-for-materials-science)

Η πρώτη Cas9 πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε εκτός των προκαρυωτικών κυττάρων και προγραμματίστηκε να πραγματοποιεί επεξεργασία γονιδιωμάτων σε κύτταρα θηλαστικών ζώων ήταν αυτό του γένους *Streptococcus pyogenes*. Αυτή η περίπτωση της Cas9 είναι που χρησιμοποιείται πιο συχνά τα τελευταία χρόνια και είναι γνωστή και ως SpyCas9 (Pickar-oliver & Gersbach, 2019). Ειδικότερα, πρόκειται για μια

ενδονουκλεάση μεγάλου μεγέθους με ποικιλία τομέων και λειτουργιών. Η θέση πέψης του δίκλωνου DNA βρίσκεται προς τα πάνω κατά τρία ζεύγη βάσεων σε σχέση με την στοχευόμενη αλληλουχία, ενώ η πέψη λαμβάνει χώρα μέσω των δύο διακριτών περιοχών νουκλεάσης του Cas9 (Jiang & Doudna, 2017).

Για να υλοποιηθεί η στοχευμένη δράση νουκλεάσης, οι περισσότερες παραλλαγές της Cas9 απαιτούν δύο ξεχωριστά μόρια RNA που είναι και τα συστατικά μέρη του gRNA: το crispr RNA (crRNA), που είναι μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων 17-20 συμπληρωματική στο DNA στόχο και ένα μετά-ενεργοποιητικό crispr RNA (tracrRNA), το οποίο χρησιμεύει ως συνδετικό ικρίωμα για τη νουκλεάση Cas. Σχηματίζοντας το υβριδικό μόριο που αποτελείται από τα παραπάνω είδη RNA, παράγεται στη συνέχεια ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών με ριβονουκλεοτίδια (Cas9 - RNP) (Ebrahimi & Hashemi, 2020).

2.3 Ταξινόμηση του Συστήματος CRISPR/Cas

Η συνεχώς εξελισσόμενη αλληλεξάρτηση μεταξύ των προκαρυωτών και των ιών που τους μολύνουν έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη μεγάλης ποικιλίας μεταξύ των συστημάτων CRISPR/Cas. Οι αλληλουχίες των περισσότερων πρωτεϊνών Cas, με λίγες μόνο εξαιρέσεις, όπως είναι οι Cas1 και Cas3, είναι πολύ αποκλίνουσες, πιθανώς λόγω της γρήγορης εξέλιξης που είναι χαρακτηριστική των αμυντικών συστημάτων. Έτσι, η ταξινόμηση των γονιδίων Cas με βάση τη διατήρηση της αλληλουχίας πρωτεϊνών είναι μια μη τετριμμένη εργασία που απαιτεί προσεκτική εφαρμογή των πιο ευαίσθητων διαθέσιμων μεθόδων ανάλυσης αλληλουχίας που συνήθως συγκρίνουν προφίλ με βάση τη φυλογένεση, την αλληλουχία και άλλα χαρακτηριστικά του οργανισμού, που δημιουργούνται από πολλαπλές ευθυγραμμίσεις των αναλυόμενων ειδών πρωτεϊνών παρά από μεμονωμένες αλληλουχίες. Έτσι, προκύπτουν τα συστήματα CRISPR/Cas με τύπο I, τύπο II και τύπο III, με τον τύπο II να έχει μελετηθεί περισσότερο και στον οποίο ανήκει και η πρωτεΐνη Cas9. Πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν και οι τύποι IV, V και VI, οι οποίοι όμως παρουσιάζουν προς το παρόν ελλιπή στοιχεία σχετικά με το περιεχόμενο τους (Makarova & Koonin, 2015).

Τα συστήματα Τύπου I περιλαμβάνουν τα περισσότερα γονίδια Cas και έχουν έξι υποτύπους (I-A έως και I-F), τα οποία κωδικοποιούνται από ένα ή περισσότερα οπερόνια (operons), ομάδες δηλαδή που υπόκεινται σε κοινό έλεγχο της έκφρασης

τους. Περιέχουν έξι πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της Cas3, η οποία περιέχει δραστηριότητες ελικάσης και νουκλεάσης, και είναι το κύριο ένζυμο στη φάση παρεμβολής. Πολλαπλές πρωτεΐνες Cas συνδυάζονται με το crRNA για να σχηματίσουν ένα σύμπλεγμα CRISPR για αντιϊκή άμυνα, το οποίο συνδέεται με το ξένο DNA και προάγει τη σύζευξη του crRNA και του συμπληρωματικού κλώνου του εξωγενούς DNA για να σχηματίσει έναν βρόχο R, ο οποίος αναγνωρίζεται από το Cas3 για να διαχωρίζει τόσο τους συμπληρωματικούς όσο και τους μη συμπληρωματικούς κλώνους (Makarova & Koonin, 2015).

Τα συστήματα επεξεργασίας γονιδιώματος CRISPR/Cas9 τύπου II περιλαμβάνει τη πρωτεΐνη Cas9, καθώς και τα crRNA και tracrRNA. Χωρίζονται σε δύο υποτύπους, τον II-A και τον II-B και κωδικοποιούν, εκτός από την Cas9, και τις πρωτεΐνες Cas1 και Cas2, και μερικές φορές είτε την Csn2 είτε την Cas4. Η Cas9 είναι αυτή που βοηθά στην προσαρμογή, επεξεργάζεται το crRNA και διαχωρίζει το DNA στόχο, υποβοηθούμενη από τα crRNA και tracrRNA (Gupta et al., 2019).

Όσο για τα συστήματα τύπου III, αυτά περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη Cas10 και εν αντιθέσει με τα άλλα δύο συστήματα, στοχεύουν σε DNA ή/και σε RNA. Τα συστήματα τύπου III κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις υποτύπους, A-D. Ο στόχος παρεμβολής του υποτύπου III-A είναι το mRNA, ενώ ο στόχος παρεμβολής του υποτύπου III-B είναι ο ίδιος με αυτόν των συστημάτων τύπου I και II, δηλαδή το DNA. Ωστόσο, οι στόχοι παρεμβολής των υπολοίπων υποτύπων C και D του συστήματος παραμένουν ασαφείς (Gupta et al., 2019).

2.4 Στάδια δράσης του μηχανισμού του συστήματος

Η γενικότερη δραστηριότητα του συστήματος CRISPR απαιτεί την παρουσία ενός συνόλου Cas γονιδίων που σχετίζονται με το εν λόγω σύστημα, που βρίσκονται συνήθως δίπλα σε αυτό, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την ανοσολογική απόκριση. Δεδομένου ότι το γονιδίωμα τροποποιείται κατά τη διαδικασία του διαχωρισμού των αλληλουχιών, οι απόγονοι κληρονομούν την προστασία. Οι νέες αλληλουχίες συνήθως προστίθενται στη μία πλευρά του CRISPR, καθιστώντας το ως μια χρονολογική καταγραφή των ιών που έχουν στο παρελθόν προσπελάσει το κύτταρο και τους προγόνους αυτού (Hille & Charpentier, 2016).

Το σύστημα CRISPR-Cas δρα έτσι με έναν ειδικό τρόπο, αναγνωρίζοντας και διασπώντας το ξένο DNA ή RNA. Ο μηχανισμός άμυνας του συστήματος μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια ή φάσεις: α) προσαρμογή ή ενσωμάτωση των διαχωριστικών αλληλουχιών CRISPR/Cas, β) έκφραση και ωρίμανση του συστήματος - βιογένεση crRNA και γ) παρεμβολή του συστήματος (Gupta et al. 2019; Barman et al., 2020).

Στο πρώτο στάδιο ή φάση, οι νέες διαχωριστικές αλληλουχίες (spacers) που προκύπτουν από τα εισβάλλοντα πλασμίδια ή ξένα DNA, έπειτα από την πρώτη μεταξύ τους επαφή, ενσωματώνονται στο σύστημα CRISPR. Έτσι, το κύτταρο έχει τη δυνατότητα να προσαρμόζεται σχεδόν αμέσως ενάντια σε οποιουσδήποτε εισβολείς που βρίσκονται στο περιβάλλον. Με άλλα λόγια, αυτό το γεγονός δίνει τη δυνατότητα στον οργανισμό-ξενιστή να απομνημονεύσει το γενετικό υλικό του εισβολέα και δείχνει την προσαρμοστική φύση αυτού του ανοσοποιητικού συστήματος (Barrangou, et al., 2007; Gupta, et al., 2019).

Η προσαρμογή αυτή των διαχωριστικών αλληλουχιών στο σύστημα λαμβάνει χώρα σε δύο βήματα: το πρώτο είναι η ταυτοποίηση του εισβολέα από τις πρωτεΐνες Cas του βακτηρίου, αποκτώντας ειδικές αλληλουχίες που προέρχονται από ξένα νουκλεϊκά οξέα, οι οποίες ονομάζονται πρωτο-διαχωριστικές αλληλουχίες (protospacers). Έπειτα, στο δεύτερο βήμα, οι τελευταίες αυτές αλληλουχίες ενσωματώνονται στο άκρο της συστοιχίας CRISPR, στην αλληλουχία-οδηγό που συμμετέχει ως διαχωριστική αλληλουχία. Οι αλληλουχίες αυτές είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία ανοσολογικής μνήμης με τα κινητά γενετικά στοιχεία (mobile genes elements, MGE), όπως τα βακτήρια και τα Αρχαία, ώστε να είναι σε θέση να αποκτήσουν μηχανισμούς άμυνας σε περίπτωση που έρθουν ξανά σε επαφή με αυτά (Barrangou, et al., 2007; Gupta, et al., 2019).

Στη φάση αυτή, οι πιο σημαντικές πρωτεΐνες για την απόκτηση των διαχωριστικών αλληλουχιών στο σύστημα CRISPR είναι οι Cas1 και Cas2. Αυτές λειτουργούν ως ένα σύμπλεγμα, στο οποίο ένα διμερές της Cas2 συνδέεται με δύο διμερή της Cas1 ώστε να εκτελεστεί η λειτουργία του (Hille & Charpentier, 2016).

Η παρουσία του λεγόμενου γειτονικού μοτίβου της πρωτο-διαχωριστικής αλληλουχίας (Proto-spacer Adjacent Modif - PAM) στο στάδιο αυτό, δηλαδή της αλληλουχίας DNA

2-6 ζευγών βάσεων η οποία ακολουθεί αμέσως μετά την αλληλουχία DNA που στοχεύει η νουκλεάση Cas9 στο CRISPR, είναι προαπαιτούμενη για την διάκριση μεταξύ της συστοιχίας και του στόχου CRISPR. Από διάφορες μελέτες αποδεικνύεται ότι οι new spacers εισάγονται στο άκρο της αλληλουχίας-οδηγού του CRISPR. Αυτή η παλίνδρομη, επαναλαμβανόμενη αλληλουχία παρέχει τον κατάλληλο προσανατολισμό και δείχνει τη θέση όπου οι spacers θα ενσωματωθούν μέσα στη συστοιχία του CRISPR (Barman, et al., 2020).

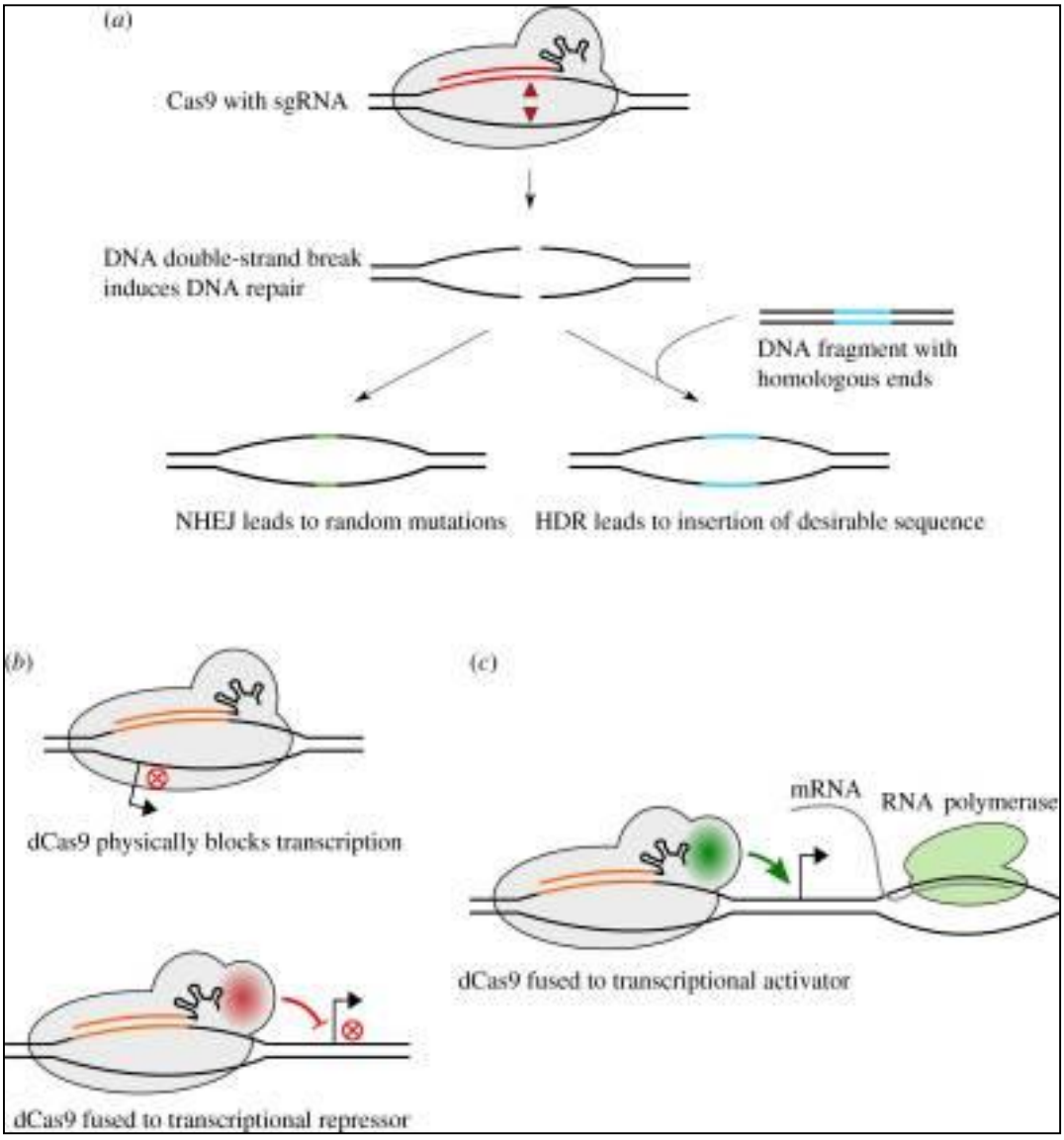
Πιστεύεται ότι μετά την επιλογή του protospacer, η Cas9 σε συνδυασμό με τις Cas1, Cas2 και πιθανώς το Csn2 ενσωματώνουν τον new spacer στη διάταξη CRISPR. Αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να διατηρηθεί σε όλα σχεδόν τα συστήματα CRISPR-Cas, αν και τα πειραματικά στοιχεία σε αυτή τη περίπτωση είναι προς το παρόν ελλιπή (Hille & Charpentier, 2016).

Αφού οι νέες διαχωριστικές αλληλουχίες έχουν προσαρμοστεί επιτυχώς στο σύστημα, το επόμενο στάδιο που ακολουθεί είναι η έκφραση και η ωρίμανση του συστήματος στα RNA (crRNA) και τις πρωτεΐνες Cas. Η αλληλουχία - οδηγός λειτουργεί ως εκκινητής του εν λόγω σταδίου, ξεκινώντας τη μεταγραφή της περιοχής που θα γίνει η πρόσδεση. Από αυτή θα παραχθεί ένα μακρύ αντίγραφο προ-RNA ή αλλιώς μακρύ πρόδρομο αντίγραφο RNA (pre-crRNA), το οποίο στη συνέχεια θα διασπαστεί κατά την επεξεργασία του σε μικρότερα ώριμα μέρη, τα crRNA. Αυτά εκδηλώνονται με την ένωση μιας διαχωριστικής περιοχής - αλληλουχίας, που είναι συμπληρωματική με ένα ξένο νουκλεϊκό οξύ, στο 5' άκρο και έπειτα με μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία στο 3' άκρο. Στη περίπτωση μάλιστα του συστήματος τύπου II, η επεξεργασία του pre-crRNA πραγματοποιείται με την πρωτεΐνη Cas9, από την οποία έπεται η αλληλεπίδραση του ώριμου crRNA με ένα μικρό tracrRNA, καθοδηγώντας έτσι τη διάσπαση του DNA-στόχου (Barman, et al., 2020).

Το τρίτο και τελευταίο στάδιο αφορά στη παρεμβολή του συστήματος CRISPR/Cas, δηλαδή στη δημιουργία ενός σύμπλεγμα Cas-crRNA αφότου έχουν αλληλεπιδράσει οι πρωτεΐνες Cas με το crRNA. Το σύμπλεγμα αυτό χρησιμεύει στην ανίχνευση ξένων κινητών γενετικών στοιχείων μέσα από τη συμπληρωματικότητα των αλληλουχιών με βάση το crRNA, ενώ το στοιχείο - στόχος αφότου ανιχνευτεί αποκόπτεται από το σύστημα. Με τη παρουσία μίας μικρού μήκους, καλά διατηρημένης αλληλουχίας PAM

με ζεύγη βάσεων 2 έως 5, το σύμπλεγμα Cas-crRNA είναι σε θέση να ταυτοποιήσει νουκλεϊκά οξέα εαυτών και μη εαυτών. Η εν λόγω αλληλουχία βρίσκεται δίπλα στη περιοχή-στόχο του εισβάλλοντος νουκλεϊκού οξέος (Barman, et al., 2020).

Τα προαναφερόμενα στάδια παρουσιάζονται αναλυτικά και στην ακόλουθη Εικόνα 2.

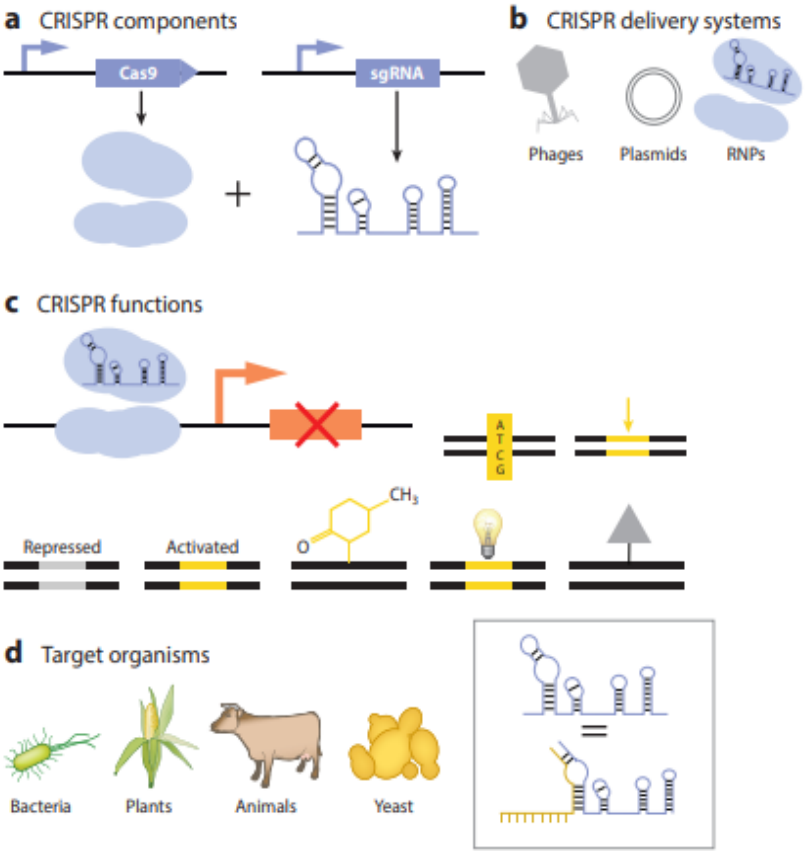


Εικόνα 2: Στάδια του συστήματος CRISPR/Cas9. **Πηγή:** Hille & Charpentier (2016).

Όπως βλέπουμε από αυτό το σύστημα και σχηματικώς, σε (α) στάδιο, το Cas9 καθοδηγείται από ένα μοναδικό RNA (sgRNA) ούτως ώστε να προκαλέσει θραύση του DNA διπλού κλώνου σε μια επιθυμητή γονιδιωματική περιοχή. Η βλάβη που προκαλεί το DNA μπορεί να επιδιορθωθεί με τη βοήθεια της Μη-ομόλογης Σύνδεσης άκρων (NHEJ) η οποία δίνει σύντομες, τυχαίες εισαγωγές ή διαγραφές στο σημείο στόχο. Το

μειονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι ότι είναι επιρρεπής σε σφάλματα και συχνά οδηγεί σε μεταλλάξεις του σημείου, διαγραφές ή προκαλεί μετατοπίσεις πλαισίου που αλλάζουν το γονιδιακό αποτέλεσμα και τελικά καταργούν τη λειτουργία του. Εναλλακτικά, μια αλληλουχία DNA που δείχνει μερική συμπληρωματικότητα με τη θέση στόχο μπορεί να εισαχθεί κατά τη διάρκεια της επιδιόρθωσης καθοδηγούμενης από την ομολογία (HDR), διαδικασία που εφαρμόζεται για ακριβείς σκοπούς επεξεργασίας γονιδιώματος. Σε αυτήν, ένα κομμάτι DNA που δείχνει ομολογία αλληλουχίας με τη θέση στόχο χρησιμοποιείται για την επιδιόρθωση του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Hille & Charpentier, 2016; Barman, et al., 2020).

Έπειτα, στο (β) στάδιο, οι μεταλλάξεις στις καταλυτικές περιοχές του Cas9 αποδίδουν μια νεκρή παραλλαγή της πρωτεΐνης (dCas9) που δεσμεύεται μεν αλλά δεν διασπά το DNA. Το dCas9 χρησιμοποιείται για μεταγραφική καταστολή, δεσμεύοντας την περιοχή που προωθεί ένα γονίδιο και έτσι εμποδίζοντας την πρόσβαση για την RNA πολυμεράση για την μεταγραφή της ακολουθίας του. Ομοίως, το dCas9 μπορεί να συγχωνευθεί με έναν μεταγραφικό καταστολέα, με τα κόκκινα X στην εικόνα να αντιπροσωπεύουν την αναστολή της μεταγραφής. Τέλος, στο (γ) στάδιο, η σύντηξη του dCas9 σε έναν μεταγραφικό ενεργοποιητή διεγείρει τη μεταγραφή ενός γειτονικού γονιδίου, ενσωματώνοντας την πολυμεράση RNA (Hille & Charpentier, 2016; Barman, et al., 2020).



Εικόνα 3 : α) Συστατικά στοιχεία CRISPR-Cas, β) Παροχή CRISPR-Cas, γ) Χρήση CRISPR-Cas για αδρανοποίηση, επιγενετική τροποποίηση, καταστολή, δ) Αποτελεσματικότητα σε βακτήρια, φυτά, ζώα, ζυμομύκητες. Η τελευταία εικόνα δείχνει την αντικατάσταση του συμπλέγματος crRNA:tracrRNA με ένα μόνο sgRNA για την επεξεργασία γονιδιώματος. **Πηγή εικόνας** : www.annualreviews.org **CRISPR Across the Food Supply Chain**

2.5 Διαγνωστικές μέθοδοι του συστήματος

Η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση μιας ασθένειας είναι ένα πολύ σημαντικό θέμα για την αποτελεσματική θεραπεία και για την πρόληψη μακροχρόνιων επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία. Όλοι οι βιο-δείκτες που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα που σχετίζονται με μία ασθένεια είναι απαραίτητοι για τη διάγνωση, επειδή το DNA και το RNA μπορούν να ενισχυθούν από διάφορα ιχνοστοιχεία, γεγονός που επιτρέπει την ειδική ανίχνευσή τους μέσω του ζευγαρώματος συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων (Neal et al., 2015). Στην πραγματικότητα, οι διαγνωστικοί δείκτες που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα έχουν γίνει ένα κύριο πρότυπο αναφοράς για διάφορες

οξείες και χρόνιες παθήσεις, ειδικά εκείνες που προκαλούνται από μολυσματικές ασθένειες (Yang & Rothman, 2004).

Πράγματι, κατά τη διάρκεια διαφόρων επιδημιών μολυσματικών ασθενειών στο παρελθόν, όπως για παράδειγμα με την υφιστάμενη πανδημία της νόσου του νέου κορωνοϊού (COVID-19), ο γρήγορος και ακριβής διαγνωστικός έλεγχος με βάση το νουκλεϊκό οξύ είναι ζωτικής σημασίας για τον αποτελεσματικό έλεγχο της νόσου. Η ανίχνευση βιοδεικτών νουκλεϊκού οξέος είναι επίσης σημαντική για τη γεωργία και την ασφάλεια των τροφίμων, για την παρακολούθηση του περιβάλλοντος και για την ανίχνευση παραγόντων βιολογικού πολέμου (Weissleder et al., 2020; Burki, 2020).

Επομένως, με κριτήριο το ότι τα νουκλεϊκά οξέα είναι αποτελεσματικοί βιοδείκτες για τις ασθένειες, οι διαγνωστικές μέθοδοι του συστήματος CRISPR βασίζονται κυρίως στον εντοπισμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας που σχετίζεται με μια ασθένεια και στη συνέχεια στη διάσπασή της προκειμένου να παραχθεί ένα αναγνώσιμο σήμα. Παραδείγματα τέτοιων αλληλουχιών-στόχων περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες ογκογονικής μετάλλαξης ή τις ιικές και βακτηριακές αλληλουχίες που προέρχονται από τον μολυσματικό παράγοντα. Ο στόχος έτσι των συστημάτων CRISPR είναι να αναγνωρίσουν τους συγκεκριμένους παθογόνους οργανισμούς, καθώς και να επιδιορθώσουν τα αλληλόμορφα που προκαλούν ασθένειες μέσω ειδικής επεξεργασίας αλληλουχιών DNA σε ακριβείς θέσεις στο χρωμόσωμα (Foss et al., 2019; Jolany vangah et al., 2021).

Τα διαγνωστικά κριτήρια με βάση το νουκλεϊκό οξύ που βασίζονται στην ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (q-PCR) ή στον προσδιορισμό της αλληλουχίας έχουν υιοθετηθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια και χρησιμοποιούνται συχνά σε κλινικά εργαστήρια. Η τεχνολογία της PCR χαρακτηρίζεται από ευελιξία, στιβαρότητα και ευαισθησία και για αυτό την έχουν καταστήσει ως την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την ανίχνευση βιοδεικτών DNA και RNA που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα. Ωστόσο, το κόστος εφαρμογής της PCR είναι υψηλό και η τεχνική της απαιτεί εξελιγμένο εργαστηριακό εξοπλισμό και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό (Mahony et al., 2009).

Υπάρχει βέβαια η εναλλακτική τεχνική της ενίσχυσης ισοθερμικού νουκλεϊκού οξέος, που είναι πιο οικονομική και παρακάμπτει την ανάγκη για θερμικούς κυκλοποιητές του PCR, η μη ειδική ενίσχυση όμως μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερη ικανότητα ανίχνευσης. Η ικανότητα μπορεί να βελτιωθεί μέσω πρόσθετων ενδείξεων, ιδιαίτερα με φθορίζοντες ανιχνευτές, ολίγο-ανιχνευτές μετατόπισης κλώνου ή μοριακούς φάρους (ειδικά συνθετικά στοιχεία του DNA που εντοπίζουν και τη παραμικρή αλλαγή στα γονίδια) (Zhou et al., 2018).

Όπως και να 'χει, σήμερα υπάρχει ανάγκη για εφαρμογή τεχνολογιών που συνδυάζουν την ευκολία χρήσης και την οικονομική αποδοτικότητα της ισοθερμικής ενίσχυσης με τη διαγνωστική ακρίβεια της PCR. Στην ιδανική περίπτωση, τέτοιες διαγνωστικές μέθοδοι θα πρέπει επίσης να έχουν εξειδίκευση σε ένα μοναδικό νουκλεοτίδιο, η οποία είναι αναπόσπαστο μέρος της ανίχνευσης μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή έναντι των αντιβιοτικών ή των αντιιικών φαρμάκων (Gunasegar & Neela, 2021). Τα συστήματα CRISPR έχουν τη δυνατότητα να ικανοποιήσουν τις προαναφερόμενες ανάγκες καθώς αποτελούν θεμελιώδη μέρη ενός μικροβιακού προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος που αναγνωρίζει τα ξένα νουκλεϊκά οξέα με βάση την αλληλουχία τους για να τα εξαλείψει στη συνέχεια μέσω της δραστηριότητας ενδονουκλεάσης που σχετίζεται με το ένζυμο (Cas) που με τη σειρά του σχετίζεται με το CRISPR (Mojica et al., 2005).

Διάφορες ιδιότητες του συστήματος CRISPR έχουν οδηγήσει στην δημιουργία και υιοθέτηση διαφόρων διαγνωστικών μεθόδων. Ενώ ορισμένοι διαγνωστικοί έλεγχοι χρησιμοποιούν τόσο την ταυτοποίηση όσο και τη διάσπαση του στόχου, άλλοι έλεγχοι λειτουργούν μεμονωμένα με βάση την αναγνώριση του RNA-οδηγού και της πρωτεΐνης Cas του στόχου. Η εφαρμογή του συστήματος CRISPR σε παθογόνα βακτήρια συγκεκριμένα έχει γίνει ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο, λόγω του ότι αποτελεί μέρος των περισσότερων βακτηριακών αμυντικών συστημάτων. Ορισμένες διαγνωστικές μέθοδοι που βασίζονται σε αυτούς τους μηχανισμούς είναι ο CRISPR - ορότυπος/υποτύπος, ο διαγνωστικός προσδιορισμός βασισμένος σε μοναδικό RNA-οδηγό (SgRNA) και η διάγνωση βασισμένη στην παρεμβολή CRISPR (dCas9) (3ο στάδιο του μηχανισμού) (Guk et al., 2017).

Οι πρώτες διαγνωστικές μέθοδοι που αναπτύχθηκαν με τη χρήση της τεχνολογίας CRISPR χρησιμοποίησαν σχεδόν αποκλειστικά τις πρωτεΐνες Cas9 (τύπου II), οι οποίες αναγνωρίζουν το δίκλωνο DNA (dsDNA) (Ma et al., 2015). Οι κυριότερες διαγνωστικές μέθοδοι που εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία είναι οι εξής:

α) Ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος (NASBA): Η μέθοδος αυτή είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA ή RNA. Τα ενισχυμένα RNA και DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μια ποικιλία εφαρμογών, όπως ο προσδιορισμός γονότυπου, η αλληλούχιση και η ανίχνευση βακτηρίων ή ιών. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι ενίσχυσης σε αυτή τη περίπτωση, ο ισοθερμικός (isothermal) και ο μη ισοθερμικός (non-isothermal). Η ισοθερμική ενίσχυση παράγει πολλαπλά αντίγραφα DNA και RNA σε σταθερή θερμοκρασία αντίδρασης ενώ η μη ισοθερμική ενίσχυση παράγει πολλαπλά αντίγραφα DNA και RNA μέσω μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας διαφορετικών θερμοκρασιών. Η NASBA λαμβάνει το μονόκλωνο RNA, ανόπτει τους εκκινητές σε αυτό στους 65°C και στη συνέχεια το ενισχύει στους 41 ^{o}C για να παράγει πολλαπλά αντίγραφα μονόκλωνου RNA. Η ειδική μέθοδος που βασίζεται στο Cas9 (NASBACC) συνδυάζει την ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος για την ισοθερμική προενίσχυση των στόχων με τη διάσπαση Cas9 για την ανίχνευση στόχου που εξαρτάται από το PAM και έναν αισθητήρα για την ανάγνωση. Με την ανίχνευση θέσεων PAM ειδικών για το στέλεχος, η μέθοδος επιτρέπει τη διάκριση ιικής γενεαλογίας, όπως φάνηκε και πρακτικά με την ανίχνευση του ιού Ζίκα (ZIKV) στην Αφρικανική και Αμερικανική Ήπειρο, σε μολυσμένο πλάσμα πιθήκου (Pardee et al., 2016).

β) Μέθοδος CRISPR με ηλεκτρονικές ενδείξεις (CRISPR-Chip): Είναι μία σύγχρονη μέθοδος διάγνωσης που επιτρέπει την ψηφιακή ανίχνευση μιας αλληλουχίας στόχου εντός ανέπαφου γονιδιωματικού υλικού. Ειδικότερα, ένας βιοαισθητήρας χρησιμοποιεί την ικανότητα γονιδιακής στόχευσης της καταλυτικά απενεργοποιημένης πρωτεΐνης 9 (Cas9) που σχετίζεται με το CRISPR που συμπλέκεται με ένα συγκεκριμένο μοναδικό RNA-οδηγό και ακινητοποιείται σε ένα τρανζίστορ για να δώσει μια συσκευή δοκιμής νουκλεϊκών οξέων χωρίς ετικέτα, της οποίας το σήμα εξόδου μπορεί να μετρηθεί με μια απλή συσκευή ανάγνωσης χειρός. Έχει χρησιμοποιηθεί ιδιαίτερα στην ανίχνευση γονιδιωματικού DNA (gDNA) από

κυτταρικές γραμμές, καθώς και σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με μυϊκή δυστροφία (DMD) (Hajian et al., 2019).

γ) Μέθοδος ενίσχυσης μετατόπισης κλώνου που προκαλείται από το CRISPR-Cas9 (CRISDA): Η μέθοδος αυτή φαίνεται ότι αναπτύχθηκε από τους Zhou et al. (2018) εξαιτίας του ότι, παρόλο που η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ενίσχυση του DNA, η απαίτηση της θερμοκυκλοποίησης περιορίζει τις μη εργαστηριακές εφαρμογές της. Οι τεχνικές ισοθερμικής ενίσχυσης του DNA είναι επομένως πολύ σημαντικές για επιτόπιες διαγνωστικές εφαρμογές αντί της παραδοσιακής PCR. Έτσι, η μέθοδος αυτή αξιοποιεί την υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση που έχει για την αναγνώριση του DNA-στόχου. Σε συνδυασμό με μια ισχυρή μέτρηση τελικού σημείου με τη μεσολάβηση της εισβολής πεπτιδίου νουκλεϊκού οξέος (PNA), η μέθοδος CRISDA επιτυγχάνει μία ατομοριακή ευαισθησία/εξειδίκευση. Επιπλέον, με την ενσωμάτωση της τεχνικής με τη μεσολάβηση του Cas9, το CRISDA εμφανίζει υποατομοριακή ευαισθησία. Η μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως για την ανίχνευση του gDNA, καθώς και σε πολυμορφισμούς απλού νουκλεοτιδίου (SNPs) που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού σε διάφορες κυτταρικές σειρές.

δ) Μέθοδος εύρεσης αλληλουχιών χαμηλής αφθονίας με υβριδισμό (FLASH): Αυτή περιλαμβάνει τον αποκλεισμό του gDNA με τις διαδικασίες της φωσφατάσης και της πέψης μέσω της Cas9 που συμπλέκεται σε ένα σύνολο crRNA που στοχεύουν σε συγκεκριμένα γονίδια, ακολουθούμενη από τη σύνδεση προσαρμογέων, καθώς και την ενίσχυση και τον προσδιορισμό αλληλουχίας. Αυτή η τεχνική ανιχνεύεται κυρίως σε γονίδια αντιμικροβιακής αντοχής σε κλινικά δείγματα (Quan et al., 2019).

ε) Μέθοδος ισοθερμικής αντίδρασης εκθετικής ενίσχυσης (CAS-EXPAR): Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τους Huang et al. (2018) ως μία στρατηγική ισοθερμικής αντίδρασης εκθετικής ενίσχυσης (CAS-EXPAR) που προκαλείται από την CRISPR/Cas9, βασισμένη στη διάσπαση CRISPR/Cas9 και την ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων που προκαλείται από τη μεσολάβηση της ενδονουκλεάσης (NEase) για ταχεία και ειδική ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων. Αυτή η μέθοδος προέκυψε από τη διάσπαση του DNA-στόχου που παρήχθη με διάσπαση του CRISPR/Cas9 και η αντίδραση ενίσχυσης εκτελέστηκε κυκλικά για να δημιουργηθεί ένας μεγάλος αριθμός

αντιγράφων DNA που ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας μια μέθοδο παρακολούθησης φθορισμού (fluorescence) σε πραγματικό χρόνο. Αυτή η στρατηγική που συνδυάζει τα πλεονεκτήματα του CRISPR/Cas9 και της εκθετικής ενίσχυσης δείχνει υψηλή εξειδίκευση καθώς και ταχεία ενίσχυση. Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές αντιδράσεις ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων όπως η PCR, η CAS-EXPAR δεν απαιτεί εξωγενείς εκκινητές, οι οποίοι συχνά προκαλούν ενίσχυση ανεξάρτητη από το DNA-στόχο. Πρακτικά, εφαρμόζεται στην ανίχνευση μεθυλιωμένου DNA και στο mRNA του βακτηρίου *L. monocytogenes*.

στ) Μέθοδος Cas9nAR: Τέλος, μία άλλη σύγχρονη μέθοδος διάγνωσης που ανιχνεύεται στον φθορισμό αναπτύχθηκε από τους Wang et al. (2019) είναι αυτή που χρησιμοποιεί ένα σύμπλοκο sgRNA και Cas9n με μία μονόκλωνη ιδιότητα εγκοπής, μία πολυμεράση DNA που εκτοπίζει τους κλώνους και δύο εκκινητές (primers) που φέρουν την αλληλουχία διάσπασης του Cas9n, για την προώθηση των κύκλων αντιγραφής του DNA μέσω των σταδίων αντίδρασης εκκίνησης, επέκτασης, εγκοπής και μετατόπισης. Η βασική ωφέλεια της Cas9nAR προσφέρει απλότητα στο σχεδιασμό του εκκινητή και καθολικότητα στην εφαρμογή της. Χρησιμεύει στην ανίχνευση βακτηρίων όπως *S. typhimurium, E. coli, M. smegmatis* και *S. erythraea*, καθώς και στην ανίχνευση SNPS σε κυτταρικές σειρές του ιού σαρκώματος αρουραίων Kirsten (KRAS).

2.6 Εφαρμογές του συστήματος CRISPR/Cas

Μέσα σε λίγα μόλις χρόνια, το CRISPR είχε τεράστιο αντίκτυπο στην επιστημονική έρευνα, συμβάλλοντας σε καινοτομίες στην ιατρική και τη βιοτεχνολογία. Η τεχνολογία του συστήματος έχει έτσι βρει σημαντική εφαρμογή σε κυτταρικές και γονιδιακές θεραπείες. με τη δυνατότητα να θεραπεύει μια σειρά γενετικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, των διαταραχών του αίματος, του καρκίνου και των οφθαλμικών διαταραχών (El-Mounadi, et al., 2020). Η πρώτη δοκιμή κυτταροθεραπείας CRISPR πραγματοποιήθηκε το 2019, για τη θεραπεία ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Η θεραπεία αυτή οδήγησε στην

αποκατάσταση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, εξαλείφοντας την ανάγκη για λειτουργικό αντίγραφο της αιμοσφαιρίνης ενηλίκων[1].

Επίσης, το 2021, μια σημαντική εφαρμογή του CRISPR για την αμυλοείδωση της τρανσθυρετίνης, μιας νευροεκφυλιστικής νόσου, έδειξε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα[2]. Ιδιαίτερα το CRISPR/Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί για τη περίπτωση του προϊού HIV-1 (Ebina et al., 2013), των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων (Kennedy et al., 2014) και του ιού της ηπατίτιδας B (Kennedy et al., 2015). Επιπλέον, το CRISPR-Cas9 έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη στόχευση των ανθρώπινων κληρονομικών ηπατικών ασθενειών και έχει δείξει μεγάλη υποσχόμενη αποδοτικότητα για τη θεραπεία του καρκίνου (Chen et al., 2019) και του συνδρόμου προγηρίας Hutchinson-Gilford (Beyret et al., 2019).

Το CRISPR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία T - κυττάρων χιμαιρικού υποδοχέα αντιγόνου (CAR), μια μορφή ανοσοθεραπείας που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου. Τα T κύτταρα εξάγονται από ασθενείς και κατασκευάζονται για να εκφράζουν χιμαιρικούς υποδοχείς αντιγόνου πριν εγχυθούν εκ νέου στο σώμα. Οι υποδοχείς επιτρέπουν στα T κύτταρα να στοχεύουν και να καταστρέφουν πιο αποτελεσματικά τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου από τον οποίο πάσχει ο ασθενής (Nature Research, 2019).

Ακόμη, κατά τη διάρκεια της πανδημίας του κορωνοϊού COVID-19, το CRISPR χρησιμοποιήθηκε τόσο ως πιθανό θεραπευτικό εργαλείο όσο και ως διαγνωστικό εργαλείο για τον νέο αυτόν κορωνοϊό, τύπου SARS-Cov-2. Το εργαλείο δοκιμών γνωστό ως SHERLOCK CRISPR SARS-CoV-2, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τις ΗΠΑ ως πείραμα έκτακτης ανάγκης για χρήση σε εργαστηριακά περιβάλλοντα (Joung et al., 2020). Επιπροσθέτως, η εταιρεία βιοτεχνολογίας Mammoth Biosciences έχει επίσης αναπτύξει μια διαγνωστική μέθοδο που βασίζεται στο CRISPR, γνωστή ως DETECTR. Όπως το SHERLOCK, έτσι και το DETECTR χρησιμοποιεί τη λειτουργία αναζήτησης του Cas9 για την ανίχνευση γενετικού υλικού από τον ιό, χρησιμοποιώντας διάφορες Cas νουκλεάσες, όπως οι Cas12 και Cas13. Παρόμοιες διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούν τη λειτουργία αναζήτησης του Cas9 έχουν επίσης σχεδιαστεί για

[1] https://www.synthego.com/blog/sickle-cell-ctx001
[2] https://www.science.org/content/article/crispr-injected-blood-treats-genetic-disease-first-time

τον εντοπισμό άλλων ασθενειών, τόσο μολυσματικών όσο και γενετικών (Mammoth Biosciences, 2020).

Ακόμη, η τεχνολογία CRISPR έχει τεράστιες δυνατότητες στη γεωργία και οι ειδικοί προτείνουν ότι τα τροποποιημένα τρόφιμα με CRISPR θα είναι διαθέσιμα σε διάστημα 10 ετών. Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία καλλιεργειών που είναι ανθεκτικές στις ασθένειες και στην ξηρασία. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να παρατείνει τη διάρκεια ζωής άλλων ευπαθών τροφίμων, μειώνοντας τη σπατάλη τροφίμων και επιτρέποντας την πρόσβαση σε υγιεινά τρόφιμα με σχετικά χαμηλό κόστος (Zhu et al., 2020).

Εξίσου σημαντική είναι η εφαρμογή της στον κλάδο της βιοενέργειας. Όντας μία από τις κορυφαίες εναλλακτικές λύσεις στα ορυκτά καύσιμα, η βιοενέργεια βρίσκεται στο επίκεντρο εδώ και κάποια χρόνια εξαιτίας της κλιματικής αλλαγής. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά εμπόδια στην παραγωγή μαζικών βιοκαυσίμων. Χρησιμοποιώντας το CRISPR, οι επιστήμονες μπόρεσαν τα τελευταία χρόνια να κάνουν κάποιες σημαντικές προόδους σε αυτόν τον τομέα (Javed et al., 2019). Για παράδειγμα, οι παράγοντες μεταγραφής που ελέγχουν την παραγωγή λιπιδίων στα φύκια οδήγησαν με τη τεχνολογία CRISPR σε τεράστια αύξηση της παραγωγής λιπιδίων για την παραγωγή βιοντίζελ. Ομοίως, η γονιδιακή επεξεργασία μπορεί να βελτιώσει την ανθεκτικότητα της μαγιάς (yeast) σε σκληρές συνθήκες κατά την παραγωγή βιοκαυσίμων. Η μαγιά παίζει σημαντικό ρόλο στη ζύμωση των σακχάρων στα βιοκαύσιμα. Οι ερευνητές έχουν ανακαλύψει έτσι έναν τρόπο να προστατεύεται η μαγιά από αλλοιώσεις κατά τη διαδικασία παραγωγής βιοκαυσίμων χρησιμοποιώντας το CRISPR (Higgins et al., 2018).

Έχει επίσης αυξήσει την αποτελεσματικότητα επεξεργασίας σε βακτηριακά είδη που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αιθανόλης, όπως για παράδειγμα τα ακετογόνα βακτήρια (π.χ. *Clostridium autoethanogenum*) . Σε μια πρόσφατη μελέτη, το CRISPR έδειξε βελτιωμένη αποτελεσματικότητα της διαγραφής γονιδίων σε αυτό το βακτήριο, καθιστώντας το ένα βιώσιμο εργαλείο για την κατασκευή αυτού του μικροσκοπικού οργανισμού (Nagaraju et al., 2016).

Τέλος, άλλες εφαρμογές που μπορούν να παρατηρηθούν στην τεχνολογία CRISPR είναι στην επιδιόρθωση γονιδιακών μεταλλάξεων στον άνθρωπο, που οδηγούν σε

ασθένειες, τόσο σε βλαστοκύτταρα για γονιδιακή θεραπεία όσο και απευθείας σε έμβρυα και γαμέτες (Lea & Niakan, 2019), στην επεξεργασία γονιδιώματος με σκοπό τη βελτίωση των φυσικών ή πνευματικών χαρακτηριστικών του ανθρώπου (human enhancement), τόσο σε ενήλικες όσο και σε έμβρυα ("designer babies") ή ακόμη και γαμέτες[3], στην δημιουργία ζωικών μοντέλων εργαστηρίου για τη μελέτη ασθενειών του ανθρώπου, στη δημιουργία ζώων με επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως μεγαλύτερη μάζα σώματος και καλύτερη παραγωγή γάλακτος, για εμπορικούς λόγους (Shrock & Güell, 2017) και στη δημιουργία φυτών με επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως η ευκολότερη και μαζικότερη καλλιέργεια και η αντοχή σε παράσιτα (Nadakuduti & Enciso-Rodríguez, 2020).

[3] https://interestingengineering.com/designer-babies-gene-editing-and-the-controversial-use-of-crispr

3 ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

3.1 Ασφάλεια Τροφίμων

Η πρόσβαση σε επαρκείς ποσότητες ασφαλών και θρεπτικών τροφίμων είναι μία πολύ σημαντική προϋπόθεση για τη διατήρηση της ανθρώπινης ζωής και την βελτίωση της υγείας του παγκόσμιου πληθυσμού. Οι **τροφιμογενείς λοιμώξεις (food borne diseases)** είναι συνήθως μολυσματικές ή τοξικές ασθένειες που προκαλούνται από βακτήρια, ιούς, παράσιτα ή χημικές ουσίες που εισέρχονται στο σώμα μέσω μολυσμένων τροφίμων ή από τη πόση νερού. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που προσβάλλουν τις τροφές μπορεί να προκαλέσουν σοβαρή διάρροια ή εξουθενωτικές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένης της μηνιγγίτιδας. Η χημική μόλυνση από την άλλη μπορεί να οδηγήσει σε οξεία δηλητηρίαση ή μακροχρόνιες ασθένειες, όπως ο καρκίνος (WHO, 2015).

Γενικώς, οι τροφιμογενείς ασθένειες μπορεί να οδηγήσουν σε μακροχρόνια αναπηρία και θάνατο. Παραδείγματα μη ασφαλών τροφίμων περιλαμβάνουν τα άψητα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, φρούτα και λαχανικά μολυσμένα με κόπρανα και ωμά οστρακοειδή που περιέχουν θαλάσσιες βιοτοξίνες.

Η έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) του 2015 σχετικά με τις εκτιμήσεις της παγκόσμιας επιβάρυνσης των τροφιμογενών ασθενειών παρουσίασε τις πρώτες εκτιμήσεις της επιβάρυνσης ασθενειών που προκαλούνται από 31 τροφιμογενείς παράγοντες (βακτήρια, ιούς, παράσιτα, τοξίνες και χημικές ουσίες) σε παγκόσμιο και περιφερειακό επίπεδο. Επιπροσθέτως, η έκθεση της Παγκόσμιας Τράπεζας του 2018 σχετικά με την οικονομική επιβάρυνση των τροφιμογενών ασθενειών ανέφερε ότι η συνολική απώλεια παραγωγικότητας που σχετίζεται με τροφιμογενείς ασθένειες σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος εκτιμάται ότι κοστίζει 95,2 δις δολάρια ΗΠΑ ετησίως και το ετήσιο κόστος της θεραπείας των τροφιμογενών ασθενειών υπολογίζεται σε 15 δις δολάρια ΗΠΑ (WHO, 2015).

Σύμφωνα με τον ΠΟΥ, με βάση τη πρόσφατη έκθεση του τον Απρίλιο του 2020, τα μη ασφαλή (ή ανθυγιεινά) τρόφιμα που περιέχουν επιβλαβή βακτήρια, ιούς, παράσιτα ή διάφορες χημικές ουσίες μπορούν να προκαλέσουν περισσότερες από 200 διαφορετικές ασθένειες, από διάρροια έως καρκίνους διαφόρων τύπων. Σε παγκόσμιο

επίπεδο, υπολογίζεται ότι περίπου 600 εκατομμύρια άνθρωποι (1 στους 10 περίπου) νοσούν εξαιτίας του ότι τρώνε μολυσμένα τρόφιμα κάθε χρόνο, με αποτέλεσμα αυτό να οδηγεί σε 420.000 θανάτους και απώλεια 33 εκατομμυρίων ετών υγιούς ζωής, σύμφωνα με το μέτρο των ετών ζωής προσαρμοσμένων στην αναπηρία (DALYs) [4].

Ακόμη, με βάση την έκθεση αυτή, 110 δις δολάρια ΗΠΑ χάνονται κάθε χρόνο σε παραγωγικότητα και ιατρικά έξοδα που προκύπτουν από μη ασφαλή τρόφιμα σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος, ενώ παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών φέρουν το 40% του φορτίου των τροφιμογενών ασθενειών, με 125.000 θανάτους κάθε χρόνο. Επίσης, οι διαρροϊκές ασθένειες είναι οι πιο κοινές ασθένειες που οφείλονται στην κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, με αποτέλεσμα 550 εκατομμύρια άνθρωποι κάθε χρόνο να αρρωσταίνουν και να πεθαίνουν περίπου 230.000 (WHO, 2015).

Η ασφάλεια των τροφίμων, η υγιεινή διατροφή και η επισιτιστική ασφάλεια συνδέονται στενά μεταξύ τους. Τα μη ασφαλή τρόφιμα δημιουργούν έναν φαύλο κύκλο ασθενειών και υποσιτισμού, που επηρεάζουν ιδιαίτερα τα βρέφη, τα μικρά παιδιά, τους ηλικιωμένους και τους ασθενείς. Εκτός από τη συμβολή στην ασφάλεια των τροφίμων και της διατροφής, ο ασφαλής εφοδιασμός των τροφίμων ενισχύει σημαντικά τις εθνικές οικονομίες, το εμπόριο και τον τουρισμό, τονώνοντας τη βιώσιμη ανάπτυξη. Η παγκοσμιοποίηση του εμπορίου τροφίμων, ο αυξανόμενος παγκόσμιος πληθυσμός, η κλιματική αλλαγή και τα ταχέως μεταβαλλόμενα συστήματα τροφίμων έχουν αντίκτυπο στην ασφάλεια των τροφίμων. Ο ΠΟΥ στοχεύει να ενισχύσει σε παγκόσμιο επίπεδο αλλά και σε επίπεδο χώρας την ικανότητα πρόληψης, ανίχνευσης και αντιμετώπισης απειλών για τη δημόσια υγεία που σχετίζονται με τα μη ασφαλή τρόφιμα (WHO, 2015).

[4] https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety

3.2 Συμπτώματα και Τρόποι Μόλυνσης από Τροφιμογενείς Λοιμώξεις

Πολλά διαφορετικά μικρόβια που προκαλούν ασθένειες μπορούν να μολύνουν τα τρόφιμα, επομένως υπάρχουν πολλές διαφορετικές τροφιμογενείς λοιμώξεις (ονομάζονται επίσης τροφιμογενείς ασθένειες ή τροφική δηλητηρίαση). Οι ερευνητές έχουν εντοπίσει στη πράξη περισσότερες από 250 τροφιμογενείς λοιμώξεις, οι περισσότερες από τις οποίες προκαλούνται από μια ποικιλία βακτηρίων, ιών και παρασίτων. Οι επιβλαβείς τοξίνες και οι χημικές ουσίες μπορούν επίσης να μολύνουν τα τρόφιμα και να προκαλέσουν τροφιμογενείς λοιμώξεις (Matthews, 2021).

Τα πιο κοινά συμπτώματα των τροφιμογενών ασθενειών είναι η ναυτία, ο έμετος, οι κοιλιακές κράμπες και η διάρροια. Ωστόσο, τα συμπτώματα μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων τύπων τροφιμογενών ασθενειών. Τα συμπτώματα μπορεί μερικές φορές να είναι σοβαρά και ορισμένες τροφιμογενείς ασθένειες μπορεί να είναι ακόμη και απειλητικές για την ανθρώπινη ζωή. Μερικοί άνθρωποι επίσης είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν μια ασθένεια, κυρίως οι υπερήλικες, τα νεαρά παιδιά, άτομα με ανοσοποιητικό σύστημα εξασθενημένο από ιατρικές παθήσεις, όπως διαβήτη, ηπατίτιδα, νεφρική ανεπάρκεια, HIV/AIDS ή από τη λήψη χημειοθεραπείας/ακτινοθεραπείας και οι έγκυες γυναίκες (Matthews, 2021).

Τα περισσότερα άτομα που πάσχουν από κάποια τροφιμογενή λοίμωξη βελτιώνονται στην υγεία τους χωρίς κάποια ιατρική θεραπεία, αλλά τα άτομα με σοβαρά συμπτώματα θα πρέπει να υποβληθούν σε κάποια τέτοια θεραπεία για την ανάρρωση τους (Βανταράκης, 2015).

Η κατανάλωση μολυσμένων τροφών ακολουθείται από την περίοδο επώασης η οποία λαμβάνει χώρα πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων. Η περίοδος επώασης ποικίλλει από μερικές ώρες έως μερικές ημέρες και εξαρτάται τόσο από το είδος του μικροβίου όσο και από τον αριθμό των μικροβίων που έχουν εισέλθει στον οργανισμό. Κατά την περίοδο επώασης, τα μικρόβια εισέρχονται μέσω του στομάχου στο έντερο και προσκολλώνται έπειτα στα κύτταρα και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Μερικοί τύποι μικροβίων παραμένουν στο έντερο, άλλοι παράγουν τοξίνες οι οποίες περνούν στην κυκλοφορία του αίματος, ενώ άλλοι μεταφέρονται σε άλλους ιστούς.

Αρκετοί παθογόνοι μικροοργανισμοί ζουν στο έντερο υγιών ζώων οι οποίοι χρησιμεύουν για την παραγωγή τροφίμων. Έτσι, σε φαγητά όπως κρέας και πουλερικά, αυτά μολύνονται κατά τη σφαγή του ζώου λόγω της επαφής του με συστατικά του εντερικού σωλήνα. Τα φρέσκα φρούτα και τα λαχανικά μολύνονται κατά το πλύσιμο με νερό που είναι μολυσμένο με ζωικά ή ανθρώπινα απόβλητα. Τα αυγά κατά κύριο λόγο προσβάλλονται από ορισμένα στελέχη του γνωστού βακτηρίου Salmonella και μπορούν να μολύνουν την ωοθήκη της κότας και κατά συνέπεια τα αυγά της. Τέλος, τα οστρακοειδή τρέφονται με διήθηση και έτσι συλλέγουν τόσο τα βακτήρια Vibrio που βρίσκονται στο θαλασσινό νερό όσο και άλλα μικρόβια που βρίσκονται στα θαλάσσια απορρίμματα και καταλήγουν στη θάλασσα.

Η μόλυνση των τροφίμων μπορεί επίσης να συμβεί από τα ανθρώπινα χέρια καθώς και στην κουζίνα με τη μεταφορά μικροβίων από το ένα τρόφιμο στο άλλο (Βανταράκης, 2015).

3.3 Βακτήρια που σχετίζονται με τροφιμογενείς λοιμώξεις σε μεγάλη συχνότητα

Η αλλοίωση των τροφίμων από μικροοργανισμούς είναι η προσπάθεια του τροφίμου να πετύχει την ανοργανοποίηση της ύλης. Τα γένη βακτηρίων που απαντώνται στα τρόφιμα παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία και θα αναφερθούν αναλυτικά παρακάτω.

Αρχικά, σύμφωνα με τον ΠΟΥ, τα βακτήρια *Salmonella, Campylobacter* και η *Escherichia coli* είναι από τα πιο κοινά τροφιμογενή βακτήρια που επηρεάζουν εκατομμύρια ανθρώπους κάθε χρόνο. Επίσης, η μόλυνση από *Listeria* οδηγεί σε αποβολή εμβρύων σε έγκυες γυναίκες ή θάνατο νεογέννητων μωρών. Αν και η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι σχετικά χαμηλή, εντούτοις οι σοβαρές και μερικές φορές θανατηφόρες συνέπειες της στην υγεία, ιδιαίτερα στα νεογνά, τα παιδιά και τους ηλικιωμένους, τη καθιστούν ως από τις πιο σοβαρές τροφιμογενείς λοιμώξεις. Ακόμη, το *Vibrio cholerae* είναι βακτήριο που μολύνει τους ανθρώπους μέσω μολυσμένου νερού ή τροφής σε σχετικά μέτριου επιπέδου συχνότητα[5].

[5] ό.π.

Περιγράφοντας πιο ειδικά τα παραπάνω τροφιμογενή βακτήρια, τα γένη βακτηρίων που απαντώνται στα τρόφιμα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Montville & Matthews, 2010).

Acetobacter	*Enterobacter*	*Pediococcus*
Acinetobacter	*Erwinia*	*Proteus*
Aeromonas	*Escherichia*	*Pseudomonas*
Alcaligenes	*Hanfia*	*Psychrobacter*
Alteromonas	*Kocuria*	*Salmonella*
Bacillus	*Lactococcus*	*Serraita*
Brochothrix	*Lactobacillus*	*Shewanella*
Campylobacter	*Leuconostoc*	*Shigella*
Carnobacterium	*listeria*	*Staphylococcus*
Citrobacter	*micrococcus*	*Vagococcus*
Clostridium	*Moraxella*	*Vibrio*
Corynebacterium	*Pantonea*	*Weisella*
Enterococcus	*Flavobacterium*	*Yersinia*

Παρακάτω, θα εξεταστούν μόνο όσα εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα.

3.3.1 SALMONELLA spp

ΠΗΓΗ:FDA,

https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/salmonella-salmonellosis

Credit: sveta - stock.adobe.com/Copyright: ©sveta - stock.adobe.com

Η *Salmonella spp* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο, gram αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο, που ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Η σαλμονέλα ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από έναν Αμερικανό επιστήμονα ονόματι Dr. Daniel E. Salmon το 1885. Οι σαλμονέλες μπορούν να χρησιμοποιούν ένα μεγάλο εύρος οργανικών υποστρωμάτων, καθώς μπορούν να μεταβολίζουν τα θρεπτικά συστατικά μέσω της αναπνευστικής και ζυμωτικής οδού. Τα βακτήρια αναπτύσσονται ιδανικά στους 37 βαθμούς κελσίου και καταβολιάζουν την D-γλυκόζη και άλλους υδατάνθρακες με την παραγωγή οξέος και αερίου. Είναι αρνητικές στην οξειδάση και την καταλάση και χρησιμοποιούν το κιτρικό οξύ ως πηγή άνθρακα. Παράγουν υδρόθειο, αποκαρβοξυλιώνουν τη λυσίνη και την ορνιθίνη και δεν υδρολύουν την ουρία (Matthews, 2021).

Η *Salmonella spp* είναι ένας από τους κύριους λόγους πρόκλησης ασθενειών που προκαλούνται στους ανθρώπους από τροφιμογενή βακτήρια σύμφωνα με τα εθνικά επιδημιολογικά στοιχεία. Παραδείγματα τροφίμων που εμπλέκονται σε κρούσματα σαλμονέλωσης είναι τα αυγά, τα πουλερικά και άλλα προϊόντα ζωικής προέλευσης. Παρακάτω παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα κρουσμάτων σαλμονέλωσης παγκοσμίως από το 1973 (Montville & Matthews, 2010).

Έτος	Περιοχή	Φορέας	Ορότυπος	Αριθμός περιστατικών	Αριθμός θανάτων
1973	Τρινιδάδ	Γάλα σε σκόνη	Derby	3.000[1]	ΜΠ[2]
1977	Σουηδία	Dressing μουστάρδας	Enteritidis PT4	2.865	0
1985	ΗΠΑ	Παστεριωμένο γάλα	Typhimurium	16.284	7
1988	Ιαπωνία	Μαγειρεμένα αυγά	Salmonella spp	10.476	ΜΠ
1999	Ιαπωνία	Chips σουπιάς	Oranienburg	>1.500	ΜΠ
2000	ΗΠΑ	Χυμός Πορτοκαλιού	Enteritidis	>74	0

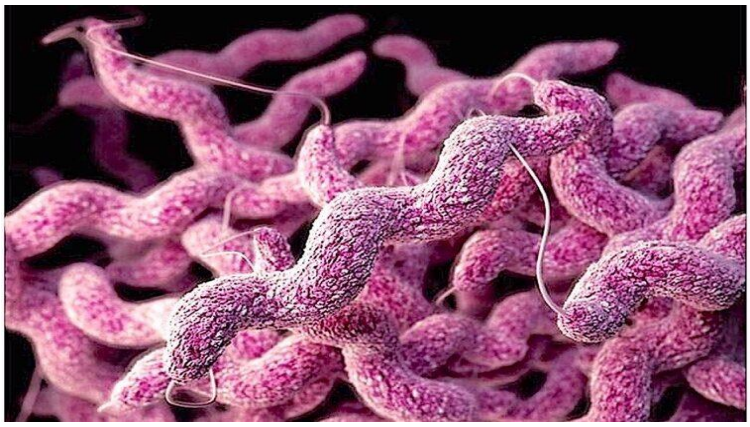
[1] Εκτιμώμενος αριθμός περιστατικών

[2] Μη Προσδιορισμένος

Οι μολύνσεις από *Salmonella* έχουν διάφορες κλινικές καταλήξεις, όπως ο τυφοειδής πυρετός, η εντεροκολίτιδα και οι συστηματικές μολύνσεις από μη τυφοειδείς μικροοργανισμούς. Τα συμπτώματα του τυφοειδή πυρετού εμφανίζονται ύστερα από 7-28 μέρες και μπορεί να περιλαμβάνουν διάρροια, οξύ και με διάρκεια πυρετό, κοιλιακό πόνο και εξάντληση.

Η θεραπεία γίνεται με χρήση χλωρανφενικόλης, αμπικιλλίνης ή trimethoprim-sulfamethoxazole για την εξαφάνιση της συστηματικής μόλυνσης. Η αύξηση της ανθεκτικότητας των τυφοειδών και παρατυφοειδών οργανισμών στα αντιβακτηριακά φάρμακα έχει περιορίσει την αποτελεσματικότητα τους στον ανθρώπινο οργανισμό.

3.3.2 CAMPYLOBACTER jejuni



Το *Campylobacter* είναι ένα γένος αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Εμφανίζονται συνήθως σε σχήμα κόμματος ή s και είναι κινητικά (Matthews, 2021). Είναι η πιο κοινή βακτηριακή αιτία της διαρροϊκής νόσου στις ΗΠΑ. Στοιχεία από το Δίκτυο Ενεργής Επιτήρησης Τροφίμων Ασθενειών (FoodNet) δείχνουν ότι περίπου 20 περιπτώσεις από *Campylobacter* διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο για κάθε 100.000 άτομα[6].

Το *C.jejuni* και το *C.coli* είναι τα πιο συνήθη είδη *Campulobacter* που σχετίζονται με διάρροια. Κατά την διάρκεια της μόλυνσης ο ασθενής μπορεί να είναι από ασυμπτωματικός μέχρι και βαριά ασθενής. Τα συμπτώματα μπορεί να είναι, πυρετός, κοιλιακοί σπασμοί και η διάρροια με ή χωρίς αίμα, η οποία διαρκεί από μέρες μέχρι και περισσότερο από μια εβδομάδα. Οι μολύνσεις που εμφανίζουν συμπτώματα συνήθως είναι αυτοπεριοριζόμενες όμως έχει αποδειχτεί πως ένα ποσοστό 5-10% μπορεί να υποτροπιάσει αν δεν δεχτεί την κατάλληλη θεραπεία. Άλλες ασθένειες που μπορεί να επηρεάσουν είναι η βακτηραιμία, η θυλακίτιδα, η μόλυνση του ουροποιητικού συστήματος, η μηνιγγίτιδα, η ενδοκαρδίτιδα, περιτονίτιδα, το σύνδρομο Guillain-Barre (GBS), κ.α.. Σπάνια αναφέρεται κάποιος θάνατος ο οποίος οφείλεται στο *C. jejuni* (Matthews, 2021).

Πολλά πουλερικά, μοσχαρίσια κρέατα και άλλα ζώα που δεν παρουσιάζουν σημάδια ασθένειας δύνανται να φέρουν μέσα τους το *Campylobacter*. Κυριότερες πηγές του *C. jejuni* επίσης είναι τα ζώα όπως κουνέλια, τρωκτικά, πτηνά, πρόβατα, άλογα, αγελάδες, χοίροι, πουλερικά και τα κατοικίδια. Επίσης, τα μολυσμένα θαλασσινά και λαχανικά μπορεί να αποτελούν πηγές μόλυνσης. Το βακτήριο αυτό μπορεί να μεταφερθεί στα

[6] https://www.cdc.gov/campylobacter/index.html

έντερα, στο συκώτι και σε άλλα όργανα των ζώων, καθώς και σε άλλα βρώσιμα μέρη κατά τη σφαγή ενός ζώου. Επίσης, το γάλα μπορεί να μολυνθεί όταν μια αγελάδα παρουσιάζει λοίμωξη στους μαστούς της ή όταν το γάλα που παράγει έχει μολυνθεί με κοπριά. Η παστερίωση καθιστά έτσι το γάλα ασφαλές για τη κατανάλωση του. Τα φρούτα και τα λαχανικά μπορούν να μολυνθούν επίσης μέσω της επαφής με χώμα ή νερό που περιέχει περιττώματα ζώων, που μπορούν να μολύνουν λίμνες και άλλους υδάτινους πόρους. Το πλύσιμο ή το τρίψιμο φρούτων και λαχανικών και η απολύμανση του μη επεξεργασμένου πόσιμου νερού βοηθά επίσης στην πρόληψη ασθενειών (Βανταράκης, 2015; Matthews, 2021).

Από το 1978 μέχρι και το 1996 αναφέρθηκαν στα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών των Η.Π.Α., 11 επιδημίες εντερίτιδας του *Campylobacter*, οι οποίες επηρέασαν 9.913 άτομα. Το νερό καθώς και το μη παστεριωμένο γάλα ήταν υπεύθυνα για τις περισσότερες επιδημίες.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τροφογενείς και υδατογενείς επιδημίες μολύνσεων του *Campylobacter*, από το 1978 έως το 1996 στις Η.Π.Α (Montville & Matthews, 2010).

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	*ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΠΙΔΙΜΙΩΝ*	*ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ*
ΤΡΟΦΟΓΕΝΕΙΣ		
Γάλα	30	1.212
Κοτόπουλο	2	16
Γαλοπούλα	1	11
Βοδινό	1	24
Άλλο κρέας	2	30
Αυγά	1	26
Φρούτα	4	227
Άλλα τρόφιμα	4	251
Πολλαπλά τρόφιμα	10	411
Άγνωστα τρόφιμα	42	2.775
ΥΔΑΤΟΓΕΝΕΙΣ		
Νερό δικτύου ύδρευσης	8	5.068
Άλλα αποθέματα νερού	4	104
ΣΥΝΟΛΟ	109	10.155

Σε νεότερα επιδημιολογικά στοιχεία σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (ECDC), τις χρονιές 2016-2020, οι περιπτώσεις λοιμώξεων καμπυλοβακτηρίωσης ξεπερνούσαν στο σύνολό τους το 1.000.000.

	2016	2017	2018	2019	2020	ΠΗΓΗ
Κρούσματα						
Συνολικός αριθμός/κρουσμάτων	246.980	246.194	246.570	220.639	120.946	ECDC
Λοίμωξη εντός ΕΕ	122.219	122.280	116.246	109.937	70.769	ECDC
Λοίμωξη εκτός ΕΕ.	15.966	6.583	7.685	109.937	1.586	ECDC
Άγνωστη προέλευση	118.195	117.331	122.693	104.188	48.591	ECDC

ΠΗΓΗ: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2021.6971

Άλλες περιπτώσεις έκθεσης σε μόλυνση περιλαμβάνουν την κατανάλωση ακατέργαστου γάλακτος ή μολυσμένου επιφανειακού νερού καθώς και την επαφή με κατοικίδια ζώα.

Παρακάτω παρουσιάζεται ένας πίνακας της απομόνωσης του *Campylobacter* από διαφορετικές πηγές τροφίμων (Montville & Matthews, 2010).

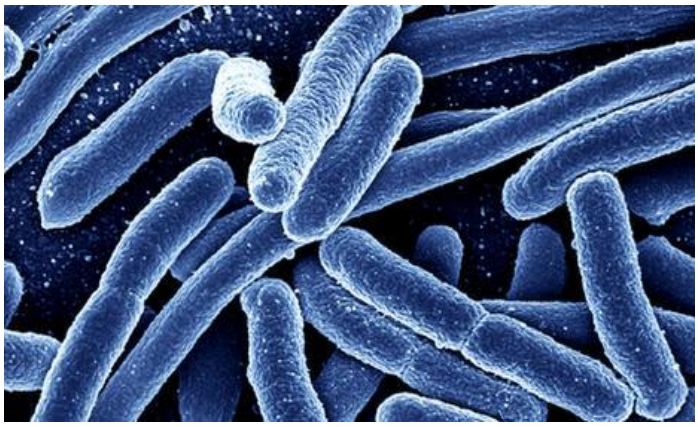
ΠΡΟΙΟΝ	% ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Κοτόπουλο	14-98
Γαλοπούλα	3-25
Πάπια	48
Χήνα	38
Αγελαδινό γάλα	0-12,3
Κατσικίσιο γάλα	0
Πρόβειο γάλα	0
Βοδινό	0-23,6
Χοίρος	1-23,5
Αρνί	0-15,5
Πρόβατο	3
Εντόσθια	47
Μύδια	47-69

Στρείδια	6-27
Λαχανικά	<5

Η λοίμωξη από *C. jejuni* διαγιγνώσκεται κατά τη διάρκεια εργαστηριακής εξέτασης στα κόπρανα, στον ιστό του σώματος ή στα υγρά. Η εξέταση αυτή θα μπορούσε να είναι μια καλλιέργεια που απομονώνει τα βακτήρια ή μια ταχεία (rapid) διαγνωστική εξέταση που ανιχνεύει το γενετικό υλικό των βακτηρίων.

Οι περισσότεροι άνθρωποι θεραπεύονται από τη λοίμωξη από *C. jejuni* χωρίς κάποια αντιβιοτική θεραπεία, ενώ οι ασθενείς με διάρροια θα πρέπει να πίνουν επιπλέον υγρά όσο αυτή διαρκεί. Ωστόσο, μερικά άτομα που διατρέχουν κίνδυνο για σοβαρή ασθένεια μπορεί να χρειαστούν αντιβιοτική θεραπεία. Αυτά τα άτομα περιλαμβάνουν άτομα ηλικίας 65 ετών και άνω, έγκυες γυναίκες και άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως άτομα με διαταραχή του αίματος, με AIDS ή που λαμβάνουν χημειοθεραπεία. Το *C. jejuni* και το *C.coli* είναι ευαίσθητα σε αρκετά αντιβιοτικά όπως τα μακρολίδια (λακτόνες), τις φθοροκινόλες, τα αμυνογλυκοσίδια, τη χλωραμφενικόλη και την τετρακυκλίνη. Η ερυθρομυκίνη είναι το φάρμακο που επιλέγεται για την καταπολέμηση του *Campylobacter* (Βανταράκης, 2015; Matthews, 2021).

3.3.3 ESCHERICHIA COLI



Τα βακτήρια *Escherichia coli (E. coli)* ζουν κανονικά στα έντερα των ανθρώπων και των ζώων. Τα περισσότερα E. coli είναι ακίνδυνα και στην πραγματικότητα αποτελούν σημαντικό μέρος ενός υγιούς ανθρώπινου εντερικού σωλήνα. Ωστόσο, ορισμένα E. coli είναι παθογόνα, που σημαίνει ότι μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες, είτε διάρροια είτε ασθένεια έξω από την εντερική οδό. Οι τύποι του *E. coli* που μπορούν να προκαλέσουν διάρροια μπορούν να μεταδοθούν μέσω μολυσμένου νερού ή τροφής ή μέσω επαφής με ζώα ή άτομα (Βανταράκης, 2015; Matthews, 2021).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, τον Καναδά, την Ιαπωνία και το Ηνωμένο Βασίλειο έχουν υπάρξει εκατοντάδες περιστατικά από E. coli O157:H7.

Η διαρροϊκή *E. coli* κατηγοριοποιείται σε συγκεκριμένες ομάδες με βάση τις μολυσματικές ιδιότητες, του μηχανισμούς παθογένειας, τα κλινικά σύνδρομα και τους διαφορετικούς οροτύπους O:H. Οι κατηγορίες της διαρροϊκής *E.coli* είναι η *εντεροπαθογόνος (EPEC), η εντεροτοξική (ETEC), η εντεροιεσδυτική (EIEC), η εντεροδιαχεόμενη (DAEC), η εντεροσυσσωρευόμενη (EAEC) και η εντεροαιμορραγική (EHEC)*. Η EHEC είναι εκείνη η οποία προκαλεί και τις πιο σοβαρές ασθένειες (Βανταράκης, 2015; Matthews, 2021).

EPEC: Προκαλεί διάρροια σε μικρότερες ηλικίες, κυρίως νήπια. Έχει αποδειχτεί ότι οι οργανισμοι EPEC προκαλούν σοβαρές βλάβες στα κύτταρα και μπορούν να διεισδύσουν στα επιθηλιακά κύτταρα.

ETEC: Είναι η κύρια αιτία διάρροιας στα παιδιά, καθώς επίσης ευθύνεται για την διάρροια των ταξιδιωτών. Οι άνθρωποι είναι η βασική πηγή στελεχών ETEC που προκαλούν ασθένειες στους ανθρώπους.

EIEC: Η EIEC προκαλεί μη αιματώδη διάρροια και δυσεντερία, παρόμοια με την *Shigella spp*. με την εισβολή. Η βασική περιοχή που εντοπίζεται το βακτήριο είναι το παχύ έντερο, αναπτύσσονται μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα και στη συνέχεια προκαλούν κυτταρικό θάνατο.

DAEC: Έχει συνδεθεί με την διάρροια σε μικρά παιδιά περίπου από το 1^{ο} μέχρι και το 5^{ο} έτος. Τα συμπτώματα είναι διάρροια χωρίς αίμα.

EAEC: Συνδέεται με επίμονη διάρροια, σε νήπια και παιδιά. Τα συγκεκριμένα στελέη διαφέρουν από τα υπόλοιπα λόγω της ικανότητας τους να προκαλούν προσκόλληση στα κύτταρα Help-2.

EHEC: Όλα τα στελέχη της EHEC παράγουν κυτοτοξικούς παράγοντες- θανατηφόρους- για τα νεφρικά κύτταρα (Vero) του πράσινου αφρικανικού πιθήκου. Ονομάζονται βεροτοξίνες ή Shiga-τοξίνες (Stxs), λόγω της Shigella dysenteriae. Οι μολύνσεις της E. coli, που παράγουν Stx συνδέονται με μια σοβαρή και ορισμένες φορές θανατηφόρα κατάσταση το αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο (HUS).

Η *E.coli* ανήκει στην φυσιολογική μικροχλωρίδα του οργανισμού μας και βρίσκεται στον εντερικό σύστημα με τα περισσότερα στελέχη να είναι αβλαβή, ορισμένα στελέχη είναι παθογόνα και προκαλούν διάρροια. Έχουν βρεθεί και αναγνωριστεί 167 Ο-αντιγόνα, 53 Η-αντιγόνα και 74 Κ-αντιγόνα. Το αντιγόνο Ο αναγνωρίζει την ορομάδα ενός στελέχους, ενώ το αντιγόνο Η αναγνωρίζει τον ορότυπό του.

Η *E. coli O157:H7* έχει αναγνωριστεί από τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών ως τροφογενές παθογόνο. Τα στελέχη της *E. coli O157:H7*, δεν αναπτύσσονται αρκετά ή και καθόλου σε θερμοκρασίες $\geq$ 44,5°C σε υγρό θρεπτικό για *E.coli*, η ανικανότητα να υδρολύουν το 4-methyl-umbelliferyl-D-glucuronide (MUG), έχουν ένα γονίδιο πρόσδεσης και συρρίκνωσης (AE) (eae) και ότι φέρουν ένα πλασμίδιο μεγέθους 60 MDa.

Άλλα χαρακτηριστικά είναι τα εξής (Matthews, 2021):

- ***Ανθεκτικότητα σε οξέα***: Τρία συστήματα εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στα οξέα: ένα οξυεπαγώμενο οξειδωτικό σύστημα, ένα οξυεπαγώμενο σύστημα εξαρτημένο από την αργινίνη και ένα σύστημα εξαρτώμενο από γλουταμινικό οξύ.
- ***Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά***: Έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε περισσότερα από ένα αντιβιοτικά με συνηθέστερα την στρεπτομυκίνη, την σουφλιζοξαζόλη και την τετρακυκλίνη.
- ***Αδρανοποίηση μέσω θέρμανσης και ακτινοβόλησης:*** Η κατάλληλη θέρμανση διαφόρων τροφίμων ζωικής προέλευσης με εσωτερική θερμοκρασία 68,3°C για δευτερόλεπτα, αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου για την διασφάλιση της απενεργοποίησης της E.coli O157:H7. Η ακτινοβόληση θανατώνει τα τροφογενή παθογόνα και παράλληλα διατηρεί την φρεσκότητα του προϊόντος.

Κύριες πηγές της *E.coli O157:H7* είναι οι εξής:

- Σε αγροκτήματα: Σε έρευνα που έχει διεξαχθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες, 31 από τα 965 μοσχάρια γαλακτοπαραγωγής (3,2%) και 191 από τα 11.881 βοοειδή κρεατοπαραγωγής (1,6%), ήταν θετικά ως προς την *παρουσία E.coli O157:H7*. Τα νεαρά βοοειδή είναι συχνότερα φορείς σε σχέση με τα ενήλικα.
- Διατροφικοί/Περιβαλλοντικοί Παράγοντες: Ορισμένα προγράμματα διατροφής που τηρούνται στα νεαρά μοσχάρια, όπως για παράδειγμα ο σπόρος βαμβακιού βοηθάει στη μείωση της *E.coli O157:H7*. Όμως, όταν τα μοσχάρια διατηρούνται ομαδοποιημένα η από κοινού χρήση των σκευών χωρίς να καθαρίζονται/πλένονται εντατικά και το πρώιμο τάισμα με δημητριακά συνδέονται με αυξημένη παρουσία της *E.coli O157:H7*.
- Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως είναι το νερό και η τροφή ή η διαχείριση των αγροκτημάτων για παράδειγμα η διαχείριση της κοπριάς βοηθούν στην επικράτηση της *E.coli O157:H7*. Το παθογόνο εντοπίζεται στις ταΐστρες και μπορεί να παραμείνει εκεί για μήνες και στα περιττώματα και στο νερό.
- Κατοικίδια/Άγρια ζώα: Η *E.coli O157:H7* έχει απομονωθεί από πρόβατο σε ποσοστό 66,6%, γλάρους και ποντίκια.

- Άνθρωποι: Όταν ο άνθρωπος είναι φορέας της *E.coli O157:H7*, μπορεί να το μεταδώσει και σε άλλους. Η χαμηλή μολυσματική δόση του βακτηρίου ευθύνεται για την εξαιρετικά εύκολη μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο. Μικρά ποσοστά κυττάρων, 100 ή ακόμα και 10 κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια. Η προσωπική υγιεινή παίζει σημαντικό ρόλο στην μετάδοση του βακτηρίου, η απροσεξία ιδιαίτερα μετά την χρήση της τουαλέτας λόγω των μολυσμένων χεριών, καταλήγει σε δευτερογενείς μεταδόσεις, επιμολύνσεις.

Η *E.coli* O157:H7 είναι αιτία για πολλά κρούσματα παγκοσμίως. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται ορισμένα κρούσματα στις Ηνωμένες Πολιτείες τα έτη 1982 μέχρι 1998 (Montville & Matthews, 2010).

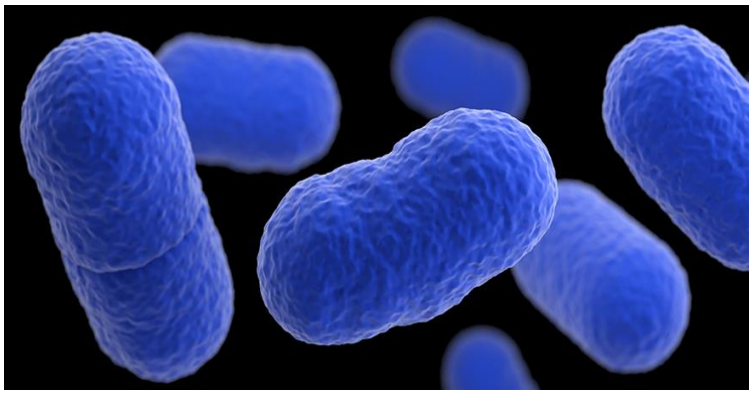
Έτος	*Αριθμός κρουσμάτων*	*Αριθμός περιστατικών*
1982	2	47
1984	2	70
1986	2	52
1987	1	52
1988	3	153
1989	2	246
1990	2	75
1991	4	54
1992	4	75
1993	17	1000
1994	32	543
1995	32	455
1996	29	488
1997	22	298
1998	42	477
Σύνολο	196	4.085

Τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών εκτιμούν ότι η *E.coli O157:H7*, προκαλεί 73.480 δηλητηριάσεις και 61 θανάτους ετησίως στις Η.Π.Α. .

Σύμφωνα με πηγές *P.M. Griffin* μεταξύ 196 επιδημιών που έχουν αναφερθεί στις Η.Π.Α. , 48 (33,1%) σχετιζόταν με το αλεσμένο βοδινό, 4 (2,8%) με το ακατέργαστο γάλα και 3 (2,1%) με το ψητό βοδινό. Οι επιδημίες που αποδίδονται από άνθρωπο σε άνθρωπο αποτελούν το 22,5% και στην μετάδοση νερού το 12,4%, συγκεκριμένα σε νερό πισίνας (Montville & Matthews, 2010).

Κατάταξη	Φορέας	Αριθμός Κρουσμάτων
1	Αλεσμένο βοδινό	48 (33,1%)
2	Από άτομο σε άτομο	37 (25,5%)
3	Λαχανικά	18 (12,4%)
4	Νερό, νερό πισίνας	18 (12,4%)
5	Ακατέργαστο γάλα, γάλα	4 (2,8%)
6	Μηλίτης, χυμός μήλου	4 (2,8%)
7	Ψητό βοδινό	3 (2,1%)
	Άλλοι	13% (9,0%)
	Άγνωστοι	51

3.3.4 LISTERIA MONOCYTOGENES



Το μικρόβιο *Listeria monocytogenes* είναι η αιτία δημιουργία της ασθένειας της λιστερίωσης. Είναι ένα προαιρετικό αναερόβιο βακτήριο, ικανό να επιβιώσει με παρουσία ή απουσία οξυγόνου. Η ασθένεια της λιστερίωσης επηρεάζει κυρίως τις έγκυες γυναίκες, τα νεογέννητα, τους ηλικιωμένους και άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Η λιστερίωση είναι συνήθως μια ήπια ασθένεια για τις εγκύους, αλλά προκαλεί σοβαρές επιπλοκές στο έμβρυο ή στο νεογέννητο μωρό. Μερικά άτομα με λοιμώξεις από *Listeria,* πιο συχνά ενήλικες 65 ετών και άνω και άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, αναπτύσσουν σοβαρές λοιμώξεις της

κυκλοφορίας του αίματος (προκαλώντας σήψη) ή του εγκεφάλου (μηνιγγίτιδα/εγκεφαλίτιδα)[7]. Ορισμένα τρόφιμα στα οποία εντοπίζεται η *Listeria Monocytogenes* είναι το μη παστεριωμένο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. βούτυρο, νωπό γάλα, μαλακά τυριά κ.α.), νωπά ή κατεψυγμένα κρέατα και πουλερικά, πατέ, ωμά λαχανικά όπως λάχανο και μαρούλι, ωμά θαλασσινά και έτοιμες σαλάτες που περιέχουν μαγιονέζα (Βανταράκης, 2015).

Στις ΗΠΑ καταγράφονται κατά μέσο όρο 2000 κρούσματα ετησίως και 500 θάνατοι. Ειδικότερα (Βανταράκης, 2015):

- 1985 - Καλιφόρνια των ΗΠΑ: 142 κρούσματα & 48 θάνατοι από κατανάλωση Μεξικάνικου τυριού.
- 1983-1987 – Ελβετία: πάνω από 122 κρούσματα & 34 θάνατοι.
- 1987 - ΗΠΑ: 1600 κρούσματα & 415 θάνατοι.
- 1999 – ΗΠΑ: 11 κρούσματα από κατανάλωση πατέ, 6 κρούσματα από άγνωστη αιτιολογία σε νοσοκομείο και 4 κρούσματα από κατανάλωση hot dog.

Στην Ευρώπη το 2020 καταγράφτηκαν, 1.876 κρούσματα Listerias monocytogenes, από αυτά τα 780 χρειάστηκαν νοσηλεία ενώ τα 167 οδηγήθηκαν στον θάνατο. Λόγω της πανδημίας COVID-19 τα ποσοστά ήταν πιο χαμηλά, ωστόσο από το 2016 έως το 2020 δεν υπήρχε κάποια σημαντική αλλαγή. Αυτό μας δείχνει ότι η λιστερίωση συνεχίζει να είναι μία από τις πιο σοβαρές τροφιμογενείς λοιμώξεις σύμφωνα με την ΕΕ. Τα περισσότερα κρούσματα είχαν να κάνουν με κατανάλωση ψαριών ή προϊόντων τους, ενώ κάποιες χώρες ανέφεραν και τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα (RTE).

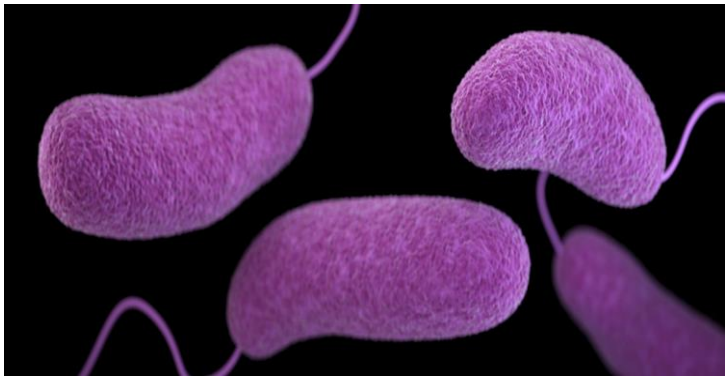
Η λιστερίωση μπορεί να προκαλέσει ποικίλα συμπτώματα, ανάλογα με το άτομο και το μέρος του σώματος που επηρεάζεται. Η Listeria μπορεί να προκαλέσει πυρετό και διάρροια παρόμοια με άλλα τροφιμογενή βακτήρια, αν και διαγιγνώσκονται πιο σπάνια λόγω της λιστερίωσης. Οι έγκυες γυναίκες παρουσιάζουν συνήθως μόνο πυρετό και άλλα συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη, όπως κόπωση και μυϊκούς πόνους. Ωστόσο, οι λοιμώξεις κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να οδηγήσουν σε αποβολή, θνησιγένεια, πρόωρο τοκετό ή απειλητική για τη ζωή μόλυνση του νεογνού. Τα

[7] https://www.cdc.gov/listeria/index.html

συμπτώματα μπορεί επίσης να περιλαμβάνουν πονοκέφαλο, δυσκαμψία του αυχένα, σύγχυση, απώλεια ισορροπίας και σπασμούς, πέρα από πυρετό και μυϊκούς πόνους.

Η λιστερίωση συνήθως διαγιγνώσκεται όταν μια βακτηριακή καλλιέργεια όπως αναφέρθηκε παραπάνω αναπτύσσει τη *Listeria monocytogenes* από ιστό ή υγρό του σώματος, όπως αίμα, νωτιαίο υγρό ή πλακούντα. Η λιστερίωση αντιμετωπίζεται συνήθως με αντιβιοτικά.

3.3.5 VIBRIO spp.



Η *Vibrio spp.* είναι μια ομάδα κοινών, αρνητικών κατά Gram, βακτηρίων σε σχήμα ράβδου που είναι φυσικά συστατικά του γλυκού νερού, των εκβολών ποταμών και του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Τα βακτήρια αυτά ζουν φυσικά σε ορισμένα παράκτια ύδατα και υπάρχουν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταξύ Μαΐου και Οκτωβρίου, όταν οι θερμοκρασίες του νερού είναι υψηλότερες. Για τον λόγο αυτό εντοπίζονται κυρίως στα οστρακοειδή, τα οποία καταναλώνονται είτε ωμά είτε με πολύ ήπια θέρμανση (Matthews, 2021).

Οι ανθρώπινες ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνα βακτήρια του γένους *Vibrio* μπορούν γενικώς να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις λοιμώξεις από χολέρα και τις λοιμώξεις εκτός χολέρας. Έτσι, η *V. cholerae* είναι η κύρια τοξίνη που παράγει τη χολέρα, μιας σοβαρής διαρροϊκής νόσου που συνήθως προκαλείται από την κατάποση μολυσμένων τροφών ή νερού, αν και είναι επίσης δυνατή η μετάδοση από άτομο σε άτομο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η *V. cholerae* μπορεί να βρεθεί και σε γλυκό νερό (Baker-Austin et al., 2018).

Οι υπόλοιπες λοιμώξεις της *Vibrio spp.*, όπως οι *V. parahaemolyticus* και οι *V. vulnificus*, είναι μια ομάδα λοιμώξεων με διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις ανάλογα με το είδος του παθογόνου, την οδό μόλυνσης και την ευαισθησία του ξενιστή. Για παράδειγμα, η κατάποση βακτηρίων που δεν προκαλούν χολέρα μπορεί να προκαλέσει ήπια γαστρεντερίτιδα ή πρωτοπαθή σηψαιμία (δηλαδή σηψαιμία μετά από κατάποση ωμής ή κακώς μαγειρεμένης μολυσμένης τροφής), ενώ η έκθεση των τραυμάτων του δέρματος σε μολυσμένο νερό μπορεί να προκαλέσει μόλυνση του τραύματος που μπορεί να οδηγήσει σε δευτερογενή σηψαιμία. Επομένως, τα *non-cholera Vibrio spp*. καταλαμβάνουν ενδιαιτήματα μέτριας ή υψηλής αλατότητας και μπορούν να βρεθούν στο θαλασσινό νερό και στα θαλασσινά (Baker-Austin et al., 2018).

Σοβαρές επιδημίες από Vibrio καταγράφτηκαν το 1999 στις ΗΠΑ με το γένος *V. Cholerae*, καταγράφοντας 2 κρούσματα σε εστιατόριο από κατανάλωση ωμών οστρακοειδών, ενώ την ίδια χρονιά, με το γένος *V. parahaemolyticus*, 3 κρούσματα από κατανάλωση καβουριών, 4 κρούσματα από κατανάλωση ωμών οστρακοειδών και 7 κρούσματα από κατανάλωση καβουριών σε σπίτι (Βανταράκης, 2015).

Τα άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, ειδικά εκείνοι με χρόνια ηπατική νόσο, είναι πιο πιθανό να νοσήσουν από την *vibriosis*. Η κατανάλωση ωμών θαλασσινών, ιδιαίτερα στρειδιών, και η έκθεση ανοιχτών πληγών σε αλμυρό νερό ή υφάλμυρο νερό μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα ενός ατόμου για νοσηλεία (Βανταράκης, 2015).

Προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα ένα άτομο να νοσήσει από αυτή την ασθένεια, θα πρέπει να μην καταναλώνει ωμά ή κακοψημένα οστρακοειδή, όπως π.χ. στρείδια. Επίσης, ωμά θαλασσινά ή ωμούς χυμούς θαλασσινών.

3.3.6 YERSINIA ENTEROCOLITICA

Το *Y. enterolitica* είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο σε σχήμα βάκιλλου, που ανήκει στην οικογένεια *Yersiniaceae*. Είναι το πιο κοινό είδος βακτηρίων που προκαλεί την ανθρώπινη εντερική (εντερική) γερσινίωση. Οι χοίροι είναι η κύρια δεξαμενή ζώων που περιέχουν λίγα στελέχη του *Y. enterocolitica* που προκαλούν γερσινίωση, αλλά τα τρωκτικά, τα κουνέλια, τα πρόβατα, τα βοοειδή, τα άλογα, οι σκύλοι και οι γάτες μπορούν επίσης να φέρουν στελέχη που προκαλούν γερσινίωση[8].

Τα συμπτώματα της γερσινίωσης εξαρτώνται από την ηλικία του ατόμου που έχει μολυνθεί. Η μόλυνση εμφανίζεται συχνότερα σε μικρά παιδιά. Συνήθη συμπτώματα στα παιδιά είναι πυρετός, κοιλιακό άλγος και διάρροια, η οποία είναι συχνά αιματηρή. Τα συμπτώματα συνήθως αναπτύσσονται 4 έως 7 ημέρες μετά την μόλυνση και μπορεί να διαρκέσουν 1 έως 3 εβδομάδες ή περισσότερο. Σε μεγαλύτερα παιδιά και ενήλικες, ο δεξιός κοιλιακός πόνος και ο πυρετός μπορεί να είναι τα κυρίαρχα συμπτώματα και μπορεί να συγχέονται με τη σκωληκοειδίτιδα. Οι επιπλοκές είναι σπάνιες και μπορεί να περιλαμβάνουν δερματικό εξάνθημα, πόνους στις αρθρώσεις ή εξάπλωση βακτηρίων στην κυκλοφορία του αίματος.

Οι περισσότεροι άνθρωποι μολύνονται από αυτό το βακτήριο τρώγοντας μολυσμένα τρόφιμα, ειδικά ωμό ή μισομαγειρεμένο χοιρινό, ή μέσω επαφής με ένα άτομο που έχει παρασκευάσει ένα προϊόν χοιρινού κρέατος. Οι άνθρωποι περιστασιακά μολύνονται μετά από κατανάλωση μολυσμένου γάλακτος ή μη επεξεργασμένου νερού ή μετά από επαφή με μολυσμένα ζώα ή τα περιττώματά τους.

[8] https://www.cdc.gov/yersinia/index.html

Το 1999 στις ΗΠΑ καταγράφτηκαν 32 κρούσματα από κατανάλωση χοιρινού κρέατος σε εστιατόριο (Βανταράκης, 2015).

Το 2020 στην ΕΕ καταγράφτηκαν 5.668 επιβεβαιωμένα κρούσματα ανθρώπινης γερσινίωσης, 5 χώρες ανέφεραν 766 δείγματα με παρουσία *Yersinia* σε έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα καθώς ακόμα 40 θετικά δείγματα σε κρέατα και προϊόντα τους. Το 2016, είχαμε 6.888 κρούσματα στην Ευρώπη, αυτό μας δείχνει μια εξαιρετικά μικρή μείωση μέσα σε αυτά τα τέσσερα χρόνια αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο ότι ακόμη η συγκεκριμένη λοίμωξη είναι δύσκολο να περιοριστεί στα στάδια παραγωγής. Αυτό έχει ως απότοκο να θεωρείται μία από τις σοβαρότερες τροφιμογενείς λοιμώξεις στην επιστήμη των τροφίμων. (https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2021.6971)

Η γερσινίωση συνήθως διαγιγνώσκεται ανιχνεύοντας τα βακτήρια στα κόπρανα ενός μολυσμένου ατόμου. Πολλά εργαστήρια δεν κάνουν τακτικά τεστ για την ασθένεια, επομένως είναι σημαντικό ο κλινικός ιατρός να ειδοποιεί το εργαστήριο όταν υπάρχει υποψία γερσινίωσης, ώστε να μπορούν να γίνουν ειδικές εξετάσεις. Η γερσινίωση συνήθως υποχωρεί μόνη της χωρίς αντιβιοτική θεραπεία. Ωστόσο, τα αντιβιοτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία πιο σοβαρών ή περίπλοκων λοιμώξεων.

3.4 Είδη ιών και παρασίτων που οδηγούν σε τροφιμογενείς λοιμώξεις

Μια σειρά διαφορετικών ιών μπορεί να προκαλέσουν τροφιμογενή λοίμωξη η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ποικιλία συμπτωμάτων, από ήπια, οξεία ασθένεια έως χρόνια, εξουθενωτική ασθένεια, ακόμη και στο θάνατο. Λόγω των εγγενών διαφορών μεταξύ βακτηρίων και ιών, δηλαδή του γεγονότος ότι οι ιοί δεν αναπαράγονται στα τρόφιμα, ενώ τα βακτήρια αναπαράγονται, οι ιοί είναι συχνά δύσκολο να ανιχνευθούν. Αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι πολλοί από τους ιούς που σχετίζονται με την εντερική νόσο δεν αναπαράγονται στην κυτταρική καλλιέργεια. Αυτοί οι παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν σε καθυστέρηση μεταξύ αναφοράς, ανίχνευσης και ανάλυσης τροφιμογενών ιών έναντι βακτηριακών παραγόντων. Παρά αυτούς τους περιορισμούς, είναι πλέον προφανές ότι υπάρχουν τόσο καθιερωμένοι όσο και αναδυόμενοι ιοί που εμπλέκονται σε τροφιμογενείς λοιμώξεις και ο ρόλος της μοριακής ανίχνευσης και χαρακτηρισμού γίνεται όλο και πιο σημαντικός (Atreya, 2004).

Από τη πλευρά των ιών, οι κύριοι ιοί που απαντώνται στη πράξη είναι οι εξής:

Νοροϊός (norovirus). Οι νοροϊοί ανήκουν στο γένος *Caliciviridae* και είναι μικροί, μη τμηματοποιημένοι, θετικής αίσθησης, μονόκλωνοι ιοί χωρίς περίβλημα, με εικοσαεδρικό RNA. Ο νοροϊός είναι ένας πολύ μεταδοτικός ιός που προκαλεί εμετό και διάρροια. Άτομα κάθε ηλικίας μπορούν να μολυνθούν και να αρρωστήσουν με αυτόν, συνήθως με άμεση επαφή με μολυσμένο άτομο, με κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων (π.χ. φρούτα, νωπά λαχανικά) ή νερού ή να έρθει σε επαφή με μολυσμένες επιφάνειες (O'Shea et al., 2019).

Ο νοροϊός προκαλεί φλεγμονή του στομάχου ή των εντέρων. Αυτό ονομάζεται οξεία γαστρεντερίτιδα. Ένα άτομο συνήθως εμφανίζει συμπτώματα 12 έως 48 ώρες μετά την έκθεση στον νοροϊό. Τα περισσότερα άτομα με ασθένεια νοροϊού αναρρώνουν μέσα σε 1 έως 3 ημέρες.

Ορισμένα μέτρα πρόληψης για τον ιό αυτό περιλαμβάνουν την καλή υγιεινή των χεριών, το πλύσιμο φρούτων και λαχανικών και το μαγείρεμα θαλασσινών, ιδιαίτερα τα οστρακοειδή, άτομα που νοσούν να αποφεύγουν την επαφή με άλλους, για τουλάχιστον 48 ώρες μετά την υποχώρηση των συμπτωμάτων και απολύμανση με τη χρήση κατάλληλων απολυμαντικών (Lennon et al., 2014).

Ροταϊός (Rotavirus): Ο Ροταϊός ανήκει στην οικογένεια *Reoviridae* και είναι ιοί μεσαίου μεγέθους, τμηματοποιημένοι, δίκλωνοι χωρίς περίβλημα με εικοσαεδρικό RNA. Η νόσος αυτή εκδηλώνεται πιο συχνά σε βρέφη και μικρά παιδιά. Ωστόσο, τα μεγαλύτερα παιδιά και οι ενήλικες μπορούν επίσης να αρρωστήσουν από τον ροταϊό, ενώ οι ενήλικες τείνουν να έχουν πιο ήπια συμπτώματα (O'Shea et al., 2019).

Τα πιο κοινά συμπτώματα του ροταϊού είναι σοβαρή υδαρής διάρροια, έμετος, πυρετός και/ή κοιλιακοί πόνοι. Τα συμπτώματα συνήθως ξεκινούν περίπου δύο ημέρες μετά την έκθεση ενός ατόμου στον ροταϊό. Ο έμετος και η υδαρής διάρροια μπορεί να διαρκέσουν 3 έως 8 ημέρες. Πρόσθετα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν απώλεια όρεξης και αφυδάτωση (απώλεια σωματικών υγρών), που μπορεί να είναι ιδιαίτερα επικίνδυνα για τα βρέφη και μικρά παιδιά. Η μόλυνση μπορεί να προέρχεται από μολυσμένο φαγητό, άπλυτα χέρια και από επαφή με μολυσμένα αντικείμενα ή επιφάνειες (Matthijnssens et al., 2008).

Ο καλύτερος τρόπος προστασίας από την αφυδάτωση είναι η πόση μεγάλης ποσότητας υγρών. Η πιο έντονη αφυδάτωση μπορεί να απαιτεί νοσηλεία για θεραπεία με ενδοφλέβια υγρά που λαμβάνουν οι ασθενείς απευθείας μέσω των φλεβών τους. Η καλή υγιεινή όπως το πλύσιμο των χεριών και η καθαριότητα είναι μεν σημαντικά, αλλά δεν επαρκούν για τον έλεγχο της εξάπλωσης της νόσου. Ο εμβολιασμός κατά του ροταϊού είναι ο καλύτερος τρόπος για τη προστασία, ιδίως των παιδιών, από την εν λόγω νόσο (Matthijnssens et al., 2008; O'Shea et al., 2019).

Ηπατίτιδα Α (HAV): Ο ιός της ηπατίτιδας Α (HAV) ανήκει στην οικογένεια των *Picornaviridae* και είναι το είδος του γένους *Hepatovirus*. Είναι ένας εικοσαεδρικός ιός χωρίς περίβλημα με μονομερές, θετικό, μονόκλωνο γονιδίωμα RNA. Η Ηπατίτιδα είναι γενικώς η φλεγμονή του ήπατος (συκώτι). Όταν το συκώτι έχει φλεγμονή ή βλάβη, η λειτουργία του μπορεί να επηρεαστεί. Η έντονη χρήση αλκοόλ, οι τοξίνες, ορισμένα φάρμακα και ορισμένες ιατρικές καταστάσεις μπορεί να προκαλέσουν ηπατίτιδα, αλλά συχνά προκαλείται από έναν ιό (Lemon et al., 2014).

Ο HAV μεταδίδεται στα τρόφιμα και το νερό, αγγίζοντας μολυσμένες επιφάνειες/αντικείμενα ή με άμεση επαφή με μολυσμένο άτομο. Η μόλυνση των τροφίμων μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο παραγωγής, από το αγρόκτημα έως και τη κατανάλωση του. Ο ιός είναι συνήθως ήπιος χωρίς μόνιμες επιπτώσεις και χαρακτηρίζεται από πυρετό, κόπωση, απώλεια όρεξης, ναυτία, έμετο, κοιλιακούς πόνους, σκούρα ούρα, ίκτερο (κιτρίνισμα του δέρματος και των ματιών) κ.α..

Είναι πιο συχνή σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, ενώ στα παιδιά περίπου το 70% είναι ασυμπτωματικά και σε αυτά με κλινικές εκδηλώσεις τα συμπτώματα είναι γενικά ήπια. Τα μολυσμένα άτομα μπορεί να αποβάλουν τον μολυσματικό ιό για αρκετές εβδομάδες πριν εμφανίσουν συμπτώματα[9].

Ως προς τη θεραπεία, μια διπλή δόση εμβολίου μπορεί να προσφέρει μακροπρόθεσμη προστασία και οι στρατηγικές ανοσοποίησης μιας δόσης έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές τουλάχιστον βραχυπρόθεσμα και μεσοπρόθεσμα. Εκτός από την

[9] https://www.cdc.gov/hepatitis/hav/index.htm

ενεργό ανοσοποίηση, το εμβόλιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί προληπτικά τις πρώτες εβδομάδες της μόλυνσης.

Ηπατίτιδα Ε (HEV): Ο ιός της ηπατίτιδας Ε (HEV) είναι ένας μικρός εικοσαεδρικός ιός χωρίς περίβλημα με μονόκλωνο γονιδίωμα θετικής αίσθησης RNA. Ο ιός ανήκει στην οικογένεια *Hepeviridae*, το γένος *Orthohepevirus*. Μεταδίδεται κυρίως μέσω της στοματικής οδού και της επακόλουθης μόλυνσης του πόσιμου νερού. Άλλοι τρόποι μετάδοσης είναι η κατανάλωση ωμών ή μη μαγειρεμένων τροφών από μολυσμένα ζώα ή οστρακοειδή, οι μεταγγίσεις αίματος ή η μετάδοση από έγκυες γυναίκες στο έμβρυο (Yugo & Meng, 2013).

Ο HEV χαρακτηρίζεται από πυρετό, μειωμένη όρεξη, ναυτία και έμετο, κοιλιακό άλγος και ελαφρώς διευρυμένο, ευαίσθητο ήπαρ (ηπατομεγαλία, αύξηση μεγέθους του συκωτιού εξαιτίας φλεγμονής). Είναι αυτοπεριοριζόμενος και οι περισσότερες περιπτώσεις του δεν απαιτούν θεραπεία. Για όσους έχουν οξεία συμπτώματα ή για άτομα υψηλού κινδύνου, απαιτείται νοσηλεία. Το αντιιικό φάρμακο ριμπαβιρίνη συνιστάται να χορηγηθεί, αν και σε έγκυες γυναίκες αυτό πρέπει να λαμβάνεται προσεκτικά υπόψη, λόγω της τερατογένεσης αυτής της αντιιικής ένωσης (Melgaço et al., 2018).

Αδενοϊός (Adenovirus): Οι αδενοϊοί είναι μεσαίου μεγέθους ιοί χωρίς περίβλημα με ένα εικοσαεδρικό νουκλεοκαψίδιο που περιέχει ένα γονιδίωμα DNA διπλής έλικας. Ανήκουν στην οικογένεια *Adenoviridae* η οποία εμπεριέχει 5 γένη ιών: Αταδενοϊούς, που μολύνουν πτηνά, σαύρες και θηλαστικά, Αβιαδενοϊούς, που μολύνουν τα πτηνά, Ιχταδενοϊούς, που μολύνουν τον οξύρρυγχο, Μασταδενοϊούς, που μολύνουν μόνο τα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων και Σιαδενοϊούς,, που μολύνουν κυρίως τα πτηνά και 1 είδος βατράχου (Lennon et al., 2007).

Οι αδενοϊοί που προκαλούν μια σειρά από ασθένειες όπως κρυολόγημα, πυρετό, πονόλαιμο, βρογχίτιδα, πνευμονία, διάρροια και επιπεφυκίτιδα. Η λοίμωξη από αδενοϊό μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα ή υπάρχουσα αναπνευστική/καρδιακή νόσο είναι πιο πιθανό να νοσήσουν από έναν αδενοϊό.

Η γαστρεντερίτιδα που σχετίζεται με τον αδενοϊό εμφανίζεται συχνά σε σχολεία, νοσοκομεία ή στρατόπεδα όπου υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση ατόμων. Οι αδενοϊοί μεταδίδονται με την ανθρώπινη επαφή, με βήχα και φτέρνισμα, αγγίζοντας μολυσμένες επιφάνειες ή μέσω της στοματικής οδού. Οι λοιμώξεις από αδενοϊούς δεν σχετίζονται με μολυσμένα τρόφιμα, αλλά η μετάδοση μπορεί να συμβεί στο νερό, μέσω δημόσιων συστημάτων ύδρευσης ή σε πισίνες. Οι λοιμώξεις από αδενοϊούς είναι συχνά ασυμπτωματικές ή ήπιες και αυτοπεριοριζόμενες. Ωστόσο, μπορεί να συσχετιστούν με σοβαρή νοσηρότητα ή θνησιμότητα, με τους ανοσοκατεσταλμένους και τους νέους να είναι πιο ευάλωτοι (Lynch & Kajon, 2016).

Επί του παρόντος, εμβόλια κατά του ανθρώπινου αδενοϊού 4 και 7 χρησιμοποιούνται από τον στρατό των ΗΠΑ, αλλά δεν υπάρχουν διαθέσιμα εμβόλια για γενική χρήση. Καθώς ο ιός συνήθως αυτοπεριορίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν απαιτείται θεραπεία. Σε σοβαρές περιπτώσεις, μπορεί να χρειαστεί νοσηλεία και επανυδάτωση. Η πρόληψη γίνεται με τυπικές μεθόδους υγιεινής κατά των ιών όπως αποφυγή κοινής χρήσης σκευών φαγητού και ποτού, πλύσιμο χεριών και αποφυγή επαφής με άρρωστα άτομα, ειδικά σε περιβάλλοντα κινδύνου όπως τα νοσοκομεία[10].

Ιός γρίπης H5N1: Οι ιοί της γρίπης είναι μέλη της οικογένειας των *Orthomyxoviridae* και ο γονότυπος H5N1 ανήκει στο γένος του ιού *Alphainfluenza*, στο είδος της γρίπης Α. Είναι ιοί αρνητικού κλώνου RNA που έχουν τμηματοποιημένο γονιδίωμα. Πρόσφορα μέρη για αυτούς τους ιούς είναι τα άγρια πτηνά, ιδιαίτερα τα υδρόβια πτηνά, στα οποία συνήθως παρατηρείται υποκλινική γαστρεντερική λοίμωξη. Έτσι, αυτός ο ιός ονομάζεται συχνά και γρίπη των πτηνών (ICTV, 2017).

Η μετάδοση του ιού H5N1 γίνεται μέσω εισπνοής μικρών σταγονιδίων αερολύματος, μόλυνσης από κόπρανα από πουλερικά και από μολυσμένο νερό. Στην Ασία, η μόλυνση του περιβάλλοντος από τα περιττώματα των υδρόβιων πτηνών οδηγεί σε μόλυνση οικόσιτων πουλερικών, συμπεριλαμβανομένων των κοτόπουλων, των πάπιων και των χηνών που συχνά διατηρούνται στο ίδιο περιβάλλον. Αυτό συνήθως προκαλεί σοβαρές ασθένειες από τα οικόσιτα πτηνά προάγοντας τη μόλυνση αυτών που εργάζονται ή έρχονται σε επαφή με αυτά ή στην τροφική αλυσίδα γενικότερα. Η εκτροφή μάλιστα πουλερικών και χοίρων μαζί αυξάνει τον κίνδυνο μετάδοσης στους

[10] https://www.cdc.gov/adenovirus/index.html

χοίρους (π.χ. H1N1) και μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο μόλυνσης από τον άνθρωπο. Στον άνθρωπο, τα συμπτώματα που προκαλεί είναι μια οξεία λοίμωξη του αναπνευστικού με πυρετό και πονόλαιμο, βήχα και αδιαθεσία. Εάν ο ιός γίνει συστηματικός μπορεί επίσης να υπάρχει έμετος και κοιλιακό άλγος (Tumpey et al., 2002).

Η μείωση της έκθεσης των οικόσιτων πουλερικών στα άγρια υδρόβια πτηνά μειώνει τον κίνδυνο μόλυνσης αυτών των πουλερικών και επομένως την έκθεση των ανθρώπων στον ιό. Η καραντίνα καθώς και το κλείσιμο των αγορών με ζωντανά πτηνά μειώνουν επίσης τον κίνδυνο εξάπλωσης της μόλυνσης. Υπάρχουν διάφορα αντιικά φάρμακα όπως ριμανταδίνη, οσελταμιβίρη, ζαναμιβίρη κ.α. τα οποία όμως δρουν μερικώς αποτελεσματικά καθώς υπάρχει σχετική ανθεκτικότητα του ιού σε αυτά. Το ίδιο συμβαίνει και με διάφορα εμβόλια που έχουν κυκλοφορήσει κατά της γρίπης Α και Β (Wright et al., 2013).

SARS CoV: Ο ιός αυτός ανήκει στην οικογένεια *Coronaviridae* που με τη σειρά της ανήκει στην τάξη *Nidovirales* των μονόκλωνων, θετικών ιών RNA. Είναι μεταδοτικός κυρίως μέσω κοπράνων ή της στοματικής οδού, καθώς και από εκκρίσεις αερολύματος. Ο SARS-CoV ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 2003, μετά από μια πανδημία σοβαρής αναπνευστικής νόσου που προήλθε από την επαρχία Γκουανγκντόνγκ της Κίνας. Επηρέασε παγκοσμίως 8098 άτομα και από αυτά τα 774 πέθαναν (Guan et al., 2003). Στα τέλη του 2019, ένα νέο στέλεχος του ιού (SARS-CoV-2) προκάλεσε την υφιστάμενη πανδημία του νέου κορωνοϊού (COVID-19) που ξεκίνησε από την πόλη Ουχάν της Κίνας (Burki, 2020). Οι ιοί αυτοί μεταδίδονται συνήθως από νυχτερίδες, πιθανώς μέσω της μόλυνσης των πηγών τροφής, απευθείας τον άνθρωπο ή με ενδιάμεσους ξενιστές, κυρίως με φοίνικες και σκύλους ρακούν, και στη συνέχεια μεταδίδουν τον ιό στον άνθρωπο. Μόλις ο SARS-CoV εισέρχεται στον άνθρωπο, εξαπλώνεται με αναπνευστικά σταγονίδια ή μόλυνση των επιφανειών από σταγονίδια που στη συνέχεια μεταφέρονται στο στόμα, τη μύτη ή τα μάτια με το άγγιγμα (Guan et al., 2003; Burki, 2000).

Η περίοδος επώασης είναι 2-7 ημέρες αλλά μπορεί να είναι έως και 10 ημέρες. Η μόλυνση έχει ως αποτέλεσμα συμπτώματα υψηλού πυρετού, ρίγη και πονοκέφαλο. Μερικοί άνθρωποι έχουν ήπια αναπνευστικά συμπτώματα από την αρχή που έπειτα

μπορεί να εξελιχθούν σε προσβολή του κατώτερου αναπνευστικού με μη παραγωγικό βήχα, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε υποξαιμία και πνευμονία.

Δεν υπάρχει συγκεκριμένη θεραπεία για αυτόν τον ιό, άλλωστε αυτό είναι και γνωστό από την υφιστάμενη πανδημία του COVID-19. Γίνονται ωστόσο προσπάθειες μέσω διαφόρων εμβολίων σε πειραματικό στάδιο και με τη χορήγηση κάποιων φαρμάκων που ακόμη δεν έχουν γίνει γνωστά (Masters & Perlman, 2013).

Από την άλλη πλευρά, τα παράσιτα, γενικώς είναι οργανισμοί που αντλούν τροφή και προστασία από άλλους ζωντανούς οργανισμούς γνωστούς ως ξενιστές. Μπορούν να μεταδοθούν από τα ζώα στον άνθρωπο, από άνθρωπο σε άνθρωπο ή από τον άνθρωπο στα ζώα. Πολλά παράσιτα έχουν αναδειχθεί ως σημαντικές αιτίες τροφιμογενών και υδατογενών ασθενειών. Αυτοί οι οργανισμοί ζουν και αναπαράγονται στους ιστούς και τα όργανα ανθρώπων και ζώων ξενιστών και συχνά απεκκρίνονται με τα κόπρανα. Διάφορα είδη παρασίτων δημιουργούν τροφιμογενείς λοιμώξεις, τα χαρακτηριστικότερα από τα οποία είναι τα εξής[11]:

Giardia duodenalis* ή *intestinalis: είναι ένα μονοκύτταρο, μικροσκοπικό παράσιτο που μπορεί να ζει στα έντερα των ζώων και των ανθρώπων. Εντοπίζεται σε κάθε περιοχή σε όλο τον κόσμο και έχει αναγνωριστεί ως μία από τις πιο κοινές αιτίες υδατογενών (και περιστασιακά τροφιμογενών) λοιμώξεων. Συνδέεται συχνά με την κατανάλωση μολυσμένου νερού, αλλά μερικοί άνθρωποι μπορεί να μολυνθούν καταναλώνοντας άψητο κρέας που έχει επίσης μολυνθεί με G. duodenalis. Η διάρροια, το κοιλιακό άλγος, τα αέρια και η ναυτία είναι τα πιο κοινά συμπτώματα. Η χρόνια μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε αφυδάτωση και σοβαρή απώλεια βάρους. Ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι ασυμπτωματικές. Επηρεάζει κυρίως ομάδες όπως παρόχους φροντίδας, ιδίως σε παιδικούς σταθμούς, ταξιδιώτες από το εξωτερικό, έγκυες γυναίκες, πεζοπόρους, κατασκηνωτές, άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα και άλλα άτομα που μπορεί να πίνουν από μη επεξεργασμένο ή μολυσμένο νερό, ακόμη και όταν κολυμπούν σε λίμνες ή ποτάμια.

[11] https://www.fsis.usda.gov/food-safety/foodborne-illness-and-disease/pathogens/parasites-and-foodborne-illness

Η πρόληψη των ασθενειών του εν λόγω παράσιτου περιλαμβάνει το σωστό μαγείρεμα του φαγητού στη κατάλληλη θερμοκρασία, τη πόση παστεριωμένου γάλακτος, πλύσιμο/ξεφλούδισμα φρούτων και λαχανικών πριν την κατανάλωση τους, καθώς και καλή υγιεινή/πλύσιμο των χεριών, αποφυγή επαφής με μολυσμένο άτομο, αποφυγή κατανάλωσης μολυσμένου νερού κ.λπ..

***Cryptosporidium parvum*:** είναι ένα μονοκύτταρο, μικροσκοπικό παράσιτο με κέλυφος. Εντοπίζεται στα έντερα πολλών ζώων αγέλης, συμπεριλαμβανομένων των αγελάδων, των προβάτων, των κατσικιών, των ελαφιών και των άλκων. Η ασθένεια μπορεί να είναι εντερική, τραχεία ή πνευμονική. Αυτό το παράσιτο μπορεί να βρεθεί στο έδαφος, στα τρόφιμα, στο νερό ή σε επιφάνειες που έχουν μολυνθεί με περιττώματα μολυσμένων ανθρώπων ή ζώων.

Τα συμπτώματα, οι ευάλωτες ομάδες και η πρόληψη είναι παρόμοια με αυτά του *G. duodenalis.*

***Cyclospora cayetanensis*:** είναι ένα μονοκύτταρο, μικροσκοπικό παράσιτο. Επί του παρόντος λίγα είναι γνωστά για αυτόν τον οργανισμό, αν και αναφέρονται περιπτώσεις κυκλοσπορίασης από διάφορες χώρες με αυξανόμενη συχνότητα.

Τα συμπτώματα, οι ευάλωτες ομάδες και η πρόληψη είναι παρόμοια με των προαναφερθέντων παρασίτων.

Toxoplasma gondii: είναι ένα μονοκύτταρο, μικροσκοπικό παράσιτο που απαντάται σε όλο τον κόσμο. Αυτοί οι οργανισμοί μπορούν να πραγματοποιήσουν τον αναπαραγωγικό τους κύκλο μόνο στα μέλη της οικογένειας των γατών. Σε αυτή τη σχέση παρασίτου-ξενιστή, η γάτα είναι ο μόνος ξενιστής.

Η τοξοπλάσμωση είναι σχετικά αβλαβής για τους περισσότερους ανθρώπους, αν και μερικοί μπορεί να εμφανίσουν συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη, όπως πρησμένους λεμφαδένες και/ή μυϊκούς πόνους. Σε υγιή άτομα, η ασθένεια είναι συνήθως ήπια και υποχωρεί χωρίς ιατρική θεραπεία. Ωστόσο, τα αδρανοποιημένα μη μολυσματικά παράσιτα μπορούν να παραμείνουν στο μολυσμένο άτομο για μια ζωή.

Οι ευάλωτες ομάδες και η πρόληψη είναι σχεδόν παρόμοια με αυτά των προαναφερθέντων παρασίτων.

***Trichinella spiralis*:** είναι ένας εντερικός στρογγυλός σκώληκας του οποίου οι προνύμφες μπορεί να μεταναστεύσουν από την πεπτική οδό και να σχηματίσουν κύστες σε διάφορους μύες του σώματος. Οι λοιμώξεις συμβαίνουν σε παγκόσμια κλίμακα αλλά είναι πιο διαδεδομένες σε περιοχές όπου το χοιρινό ή τα άγρια θηράματα καταναλώνονται ωμά ή άψητα.

Τα πρώτα συμπτώματα είναι ναυτία, διάρροια, έμετος, πυρετός, κόπωση και κοιλιακό άλγος, ακολουθούμενα από πονοκεφάλους, πρήξιμο στα μάτια, πόνο στις αρθρώσεις και τους μύες, αδυναμία και φαγούρα στο δέρμα. Σε σοβαρές λοιμώξεις, τα άτομα μπορεί να παρουσιάσουν δυσκολία στον συντονισμό και να έχουν καρδιακά και αναπνευστικά προβλήματα.

Οι ευάλωτες ομάδες είναι κυρίως άτομα που καταναλώνουν ωμό ή μισομαγειρεμένο χοιρινό κρέας, καθώς και άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Η πρόληψη περιλαμβάνει καλό πλύσιμο των χεριών, σωστό μαγείρεμα του χοιρινού κρέατος στην κατάλληλη θερμοκρασία και καθαρισμό των μηχανημάτων κοπής κρεάτων.

4 CRISPR-CAS ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

4.1 Καλλιέργειες/Κτηνοτροφία

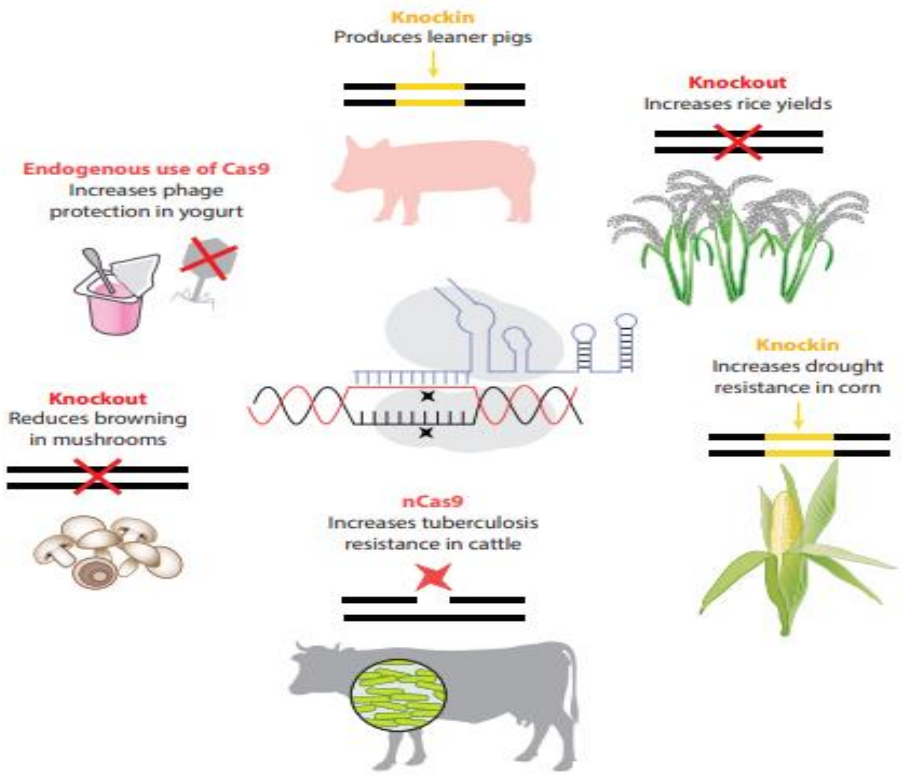
Τα τρόφιμα καθώς και η επιστήμη τροφίμων γενικότερα, έχουν επηρεαστεί από την χρήση ανασυδνυασμένων γενετικών τεχνολογιών, ακολουθούν η γεωργία, οικολογία, κτηνοτροφία και η ιατρική. Έχουν επιτευχθεί σημαντικές βελτιώσεις όπως η βιομηχανική βιοσύνθεση βιταμινών, ενζύμων καθώς και φαρμακευτικών προϊόντων. Η ανακάλυψη και μετέπειτα η διερεύνηση των συστημάτων Crispr-Cas, οδγήγησε στην ανάπτυξη εφαρμογών όπως ο χειρισμός μικροβιακών κοινοπραξιών (Gomaa και άλλοι 2014) η σχεδίαση εμβολιασμού μικροοργανισμών κατά διεισδυτικών γενετικών στοιχείων (Barrangou και άλλοι, 2013) και τυποποίησης βακτηριακών στελεχών (Barrangou & Horvath, 2012). Για την βελτίωση των διαδικασιών οι συγκεκριμένη τεχνολογία βοήθησε για τον χαρακτηρισμό των βακτηρίων της βιομηχανικής καλλιέργειας εκκίνησης η οποία χρησιμοποιείται κατά την διαδικασία ζύμωσης του γάλακτος.

Σε αρχικό στάδιο οι επιστήμονες των φυτών εργάζονται για την βελτίωση των καλλιεργειών, ειδικότερα προσπαθούν να δημιουργήσουν καλλιέργειες με αυξημένη απόδοση, αντοχή στις ασθένειες, τα παράσιτα και ανοχή στο στρες. Υπάρχουν τρεις τεχνολογίες που δουλεύουν πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο τα τελευταία χρόνια, ZFNS, TALENS, CRISPR-Cas. Η τεχνολογία CRISPR-Cas είναι εκείνη που επικρατεί των άλλων δύο, λόγω της εύκολης χρήσης της, αποτελεσματικότητάς της και την ικανότητα να χρησιμοποιεί πολλαπλά sgRNA, τα οποία επιτρέπουν την ταχύτερη ανάπτυξη επιθυμητών χαρακτηριστικών.

Το 2013, οι Jiang et al. (2013), απέδειξαν την χρήση σε ορισμένα τρόφιμα όπως είναι ο καπνός, το σοργό και το ρύζι. Έχουν ακολουθήσει και σε άλλα τρόφιμα την τεχνολογία CRISP-Cas, όπως το σιτάρι (Shan et al. 2013, Upadhyay et al 2013). Σχετικά με την ανοχή στο στρες, έχει ήδη αντιμετωπιστεί από την DuPont Pioneer με την κατασκευή αραβόσιτου ανθεκτικό στην ξηρασία (Shi et al. 2017). Η ενίσχυση προϊόντων με την μέθοδο CRISPR-Cas, βοήθησε με την παθηνοκαρπία, η οποία σχετίζεται με προϊόντα όπως οι τομάτες κατά τις συνθήκες θερμικής καταπόνησης (Karkute et al. 2017). Αναφορικά με τα φρούτα είναι ακόμη στα πρώτα στάδια και έχει

εφαρμοστεί μέχρι τώρα σε φράουλες και μήλα (Gomez et al. 2018, Nishitani et al. 2016).

Η τεχνολογία της CRISPR-Cas, έχει επεκταθεί και στο τομέα της κτηνοτροφίας και πιο συγκεκριμένα η εφαρμογή του έχει γίνει στα εξής είδη ζώων: βοοειδή, χοίρους και κοτόπουλα. Συγκεκριμένα η εφαρμογή της CRISPR-Cas, εφαρμόστηκε σε βοοειδή για την ανάπτυξη αρσενικών απογόνων, καθώς τα αρσενικά μεγαλώνουν γρηγορότερα και είναι μεγαλύτερα από τα θηλυκά κατι το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην κτηνοτροφία (Rosenblum, 2018). Η εφαρμογή στους χοίρους έγινε για την γέννηση νέων πιο αδύνατων χοίρων καθώς το χαμηλό τους βάρος βοηθάει στην μείωση της θνησιμότητάς τους λόγω του συνεχούς ελέγχου για την ρύθμιση θερμοκρασίας και λίπους. Σχετικά με τα κοτόπουλα, η εφαρμογή αφορούσε κυρίως τα αυγά κατά τα οποία αφαιρέθηκε μια πρωτεΐνη από τα ασπράδια η οποία ήταν η αφορμή για αλλεργικές αντιδράσεις (Oishi et al. 2016).



Εικόνα 4.

ΠΗΓΗ : https://www.annualreviews.org

Η τεχνολογία CRISPR-Cas, έχει χρησιμοποιηθεί με πολλούς τρόπους για την επεξεργασία πολλαπλών οργανισμών-στόχων. Όπως παρατηρούμε στην παραπάνω εικόνα, με τον όρο Knockin, έχουμε ορίσει όσους οργανισμούς έγινε αλλαγή της γενετικής αλληλουχίας. Στους χοίρους για την παραγωγή πιο αδύνατων γουρουνιών, στο καλαμπόκι για την αύξηση της αντοχής στο καλαμπόκι. Με τον όρο Knockout έχουμε ορίσει το γονίδιο-στόχος το οποίο θέλουμε να αδρανοποιήσουμε, στο ρύζι για την αύξηση απόδοσης του ρυζιού και στα μανιτάρια για την μείωση του μαυρίσματος. Τέλος, την πρωτεΐνη Cas9 για την αύξηση της αντοχής των βοοειδών ενάντια στη φυματίωση και την ενδογενής χρήση της Cas9 για την αύξηση της προστασίας των φάγων στο γιαούρτι.

4.2 Εφαρμογές στη βιομηχανία

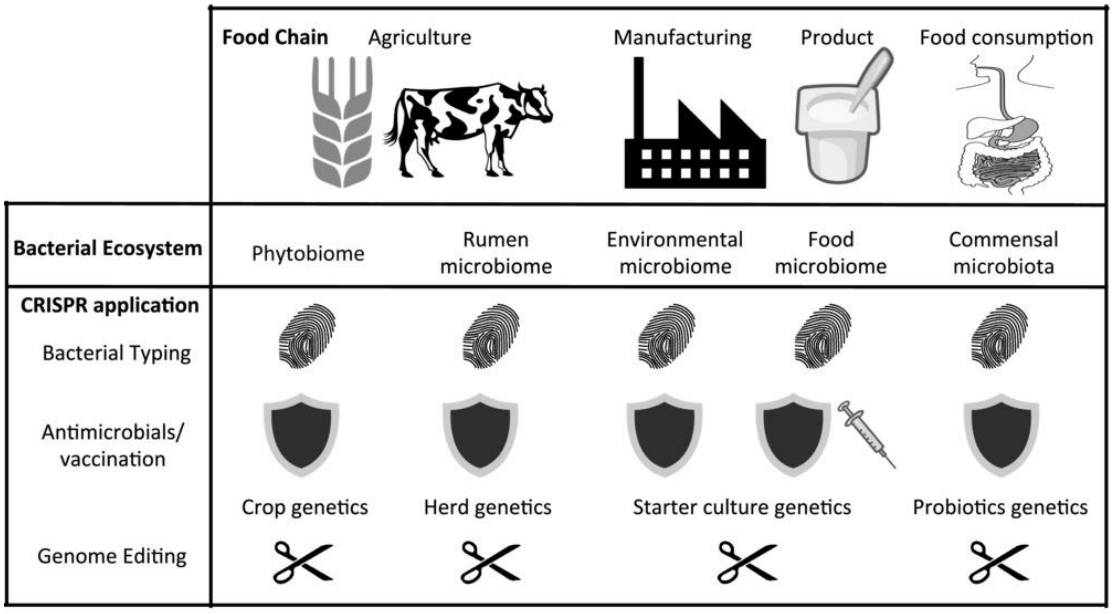
Η βιομηχανίες έχουν ήδη εφαρμόσει την CRISPR-Cas σε ορισμένους μικροοργανισμούς. Συγκεκριμένα οι ερευνητές έχουν ασχοληθεί με βακτηριακούς μικροοργανισμούς όπως είναι οι γαλακτοβάκιλλοι, στρεπτόκοκκοι καθώς επίσης και τροφιμογενή βακτήρια όπως η *Salmonella* και η *E.coli* (Barrangou and Horvath, 2012). Η ικανότητα της αλληλουχίας που χρησιμοποιεί η τεχνολογία της CRISPR-Cas για την διάκριση ορισμένων στελεχών, επέτρεψε στις εταιρείες να παρακολουθούν συγκεκριμένα στελέχη. Η τεχνολογία CRISPR-Cas έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης στο προβιοτικό, *Lacrobacillous reuteri,* (Oh & van Pijkeren 2014).

Ζυμομύκητες και μύκητες : Σε μια μελέτη χρησιμοποίησαν ζυμομύκητες του κρασιού και ο στόχος ήταν η παραγωγή ουρίας ώστε να περιορίσει την παραγωγή καρκινογόνους ουσίας κατά την ζύμωση (Vigentini et al. 2017).

Lactobacillus spp : Έχει αποδειχθεί πως οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί πολλαπλασιάζονται κατά τις διαδικασίες μια ζύμωσης ή όταν χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί οργανισμοί. Άρα, είτε ως ζυμωτικό μέσο ή ως συστατικά του ανθρώπινου μικροβιώματος η έκθεσή τους σε βακτήρια είναι πιθανή. Έρευνες που έχουν γίνει in silico (Horvath και άλλοι 2009) έχουν αποδείξει ότι μικροβιώματα του ανθρώπινου οργανισμού καθώς και τροφίμων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για με την μέθοδο της CRISPR-Cas για χρήση σε συστήματα ποιότητας τροφίμων. Η εφαρμογή των

διαδικασιών της CRISPR-Cas απευθύνεται σε όλο το φάσμα των βακτηρίων στα τρόφιμα, παθογόνα, των οργανισμών που προκαλούν τις ζυμώσεις, των προβιοτικών και των αλλοιώτικών οργανισμών.

Οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής, γονότυπο βακτηρίων, χειρισμό μικροβιακών κοινοπραξιών, εμβολιασμό κατά φάγων και επεξεργασία γονιδιώματος.



Εικόνα 5. Η Crispr-Cas ως εργαλείο δακτυλογράφησης μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε στάδιο παραγωγής των τροφίμων, ενώ η επεξεργασία γονιδιώματος μπορεί να εφαρμοστεί σε καλλιέργειες τροφίμων, κοπάδια ζώων και βιομηχανικά μικρόβια. Ο εμβολιασμός κατά φάγων χρησιμοποιείται για την προστασία του πληθυσμού και της γενετικής σταθερότητας των καλλιεργειών.

R: Concise Reviews in Food Science **CRISPR-Based Technologies and the Future of Food Science** - Kurt Selle,Rodolphe Barrangou/ 07 October 2015

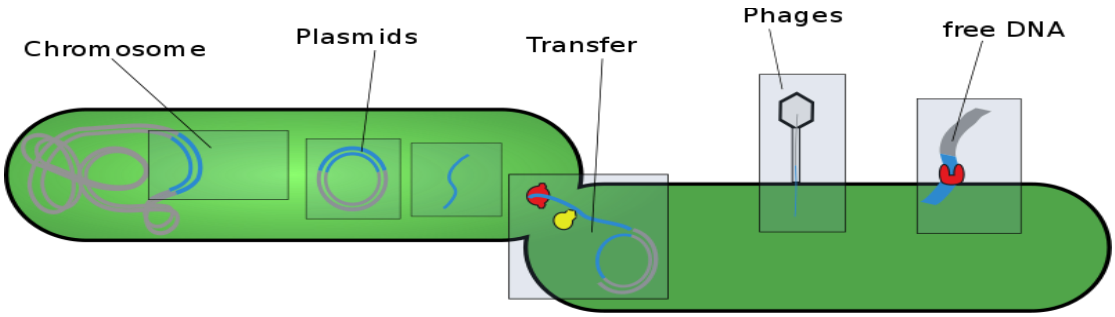
4.3 Γονοτυποίηση με CRISPR-Cas

Ο γονότυπος της σειράς CRISPR-Cas, προσφέρει ένα υψηλής ποιότητας και γρήγορο μέσο τυποποίησης βακτηριακών στελεχών (Barrangou & Horvath,2012). Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ως εργαλείο αναγνώρισης και πληκτρολόγησης, ο ίδιος τόπος συστοιχίας CRISPR πρέπει να εμπλουτίζεται ή να είναι παρών εντός καθορισμένων ταξινομικών ομάδων (γένος ή είδος) και το περιεχόμενο διαχωρισμού της συστοιχίας πρέπει να ποικίλλει σε όλα τα στελέχη σε ένα δεδομένο υποσύνολο. Η παρουσία ή η απουσία μιας συστοιχίας CRISPR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση των στελεχών, αλλά είναι αξιόπιστη μόνο όταν συσχετίζεται με τη φυλογένεση του οργανισμού. Προκειμένου να συμβεί επαρκής σύγκριση διαχωριστών,

εντός μιας δεδομένης θέσης CRISPR, οι πιο αρχαίοι διαχωριστές πρέπει να έχουν κοινή προέλευση, η οποία στη συνέχεια αποκλίνει κατά τη διάρκεια της συστοιχίας. . Έτσι, η διαδικασία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ύπαρξη ενεργού μηχανισμού απόκτησης διαχωριστή σε κάποιο σημείο της εξελικτικής ιστορίας, αν και ο εκφυλισμός των συστοιχιών CRISPR μπορεί επίσης να προσθέσει πολυμορφισμούς στο περιεχόμενο διαχωριστή. Φυσικά, η τυποποίηση με βάση το CRISPR εξαρτάται επίσης από την παρουσία συστημάτων CRISPR-Cas στα γονιδιώματα των γενών και των ειδών ενδιαφέροντος, και αυτοί οι τόποι έχουν εντοπιστεί στα περισσότερα αρχαία και πολλά βακτήρια, αλλά έχει τεκμηριωθεί ότι εμφανίζονται μόνο στο 46% περίπου των βακτηριακά γονιδιώματα. Μέχρι σήμερα, τα σχήματα τυποποίησης που βασίζονται στο CRISPR έχουν εφαρμοστεί αποτελεσματικά σε τροφιμογενή παθογόνα όπως *Salmonella* (Shariat και άλλοι, 2013), *Escherichia coli* (Toro και άλλοι 2013 , Yin και άλλοι 2013), καλλιέργειες εκκίνησης βιομηχανικής ζύμωσης όπως *S. thermophilus* (Horvath και άλλοι 2008), προβιοτικά όπως *Lactobacillus casei* (Broadbent) και άλλα και αλλοιώνουν τους οργανισμούς όπως ο *Lactobacillus buchneri* (Briner and Barrangou 2014), που απεικονίζουν τις ευρείες δυνατότητες του γονότυπου βάσει CRISPR σε όλο το βακτηριακό φάσμα.

4.4 Επεξεργασία/αναδιαμόρφωση γονιδιώματος σε βακτήρια

Η ικανότητα επεξεργασίας και επαναπρογραματισμού των συστημάτων CRISPR-Cas στο γονιδίωμα χρησιμοποιείται για τον καθορισμό βακτηριακών γονιδιωμάτων, τον προσδιορισμό γονιδίων και τον προσδιορισμό γενετικά ετερογενών βακτηρίων (Jiang και άλλοι 2013 , Selle and Barrangou 2015). Η Crispr-cas χρησιμοποιήθηκε για να δείξει ότι τα κινητικά γενετικά στοιχεία MGEs συμβάλλουν στη γονιδιωματική πλαστικότητα του Streptococcus Thermophilus (Selle και άλλοι, 2015).



Εικόνα 6. **MGEs** Τα MGE μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις σε περιοχές κωδικοποίησης πρωτεΐνης, οι οποίες αλλάζουν τις πρωτεϊνικές λειτουργίες. Μπορούν επίσης να αναδιατάξουν τα γονίδια στο γονιδίωμα του ξενιστή. Κινητά γενετικά στοιχεία στο κύτταρο από την αριστερή πλευρά και τρόποι απόκτησης τους από την δεξιά πλευρά.

(https://wikipredia.net/el/File:Bacterial_mobile_elements.svg)

Ο στόχος στο γονιδίωμα είχε ως αποτέλεσμα την επιλογή και ανάκτηση μεταλλαγμάτων χωρίς γονίδια απαραίτητα για την οξίνιση και διατήρηση του γάλακτος. Αυτό θα μπορούσε επίσης να εφαρμοστεί για την αφαίρεση γονιδιωματικά κωδικοποιημένων MGE αυξάνοντας έτσι την σταθερότητα τους. Η αφαίρεση κομματιών που εμφνίζουν παθογονικότητα ή και των παραγόντων λοιμογόνου δράσης με βάση το CRISPR είναι μια μέθοδος για την εξουδετέρωση παθογόνων βακτηρίων. Έτσι, τα συστήματα CRISPR-Cas διευκολύνουν τον χαρακτηρισμό των MGE και την αποσαφήνιση της πλαστικότητας του βακτηριακού γονιδιώματος. Ομοίως, αυτή η τεχνολογία μπορεί επίσης να αξιοποιηθεί σε συνδυασμό με ανασυνδυασμό μονόκλωνου DNA για να οδηγήσει την επεξεργασία του γονιδιώματος σε προβιοτικά στελέχη όπως το *Lactobacillus reuteri* (Oh and van Pijkeren 2014 · van Pijkeren and Britton 2014).

4.5 Εμβολιασμός βιομηχανικών μικροβίων

Στην επιστήμη τροφίμων και ειδικότερα στην βιομηχανία τροφίμων ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα που έχουν να αντιμετωπίσουν είναι οι βακτηριοφάγοι, οι οποίοι αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για την συντήρηση των τροφίμων. Το υψηλό ποσοστό μετάλλαξης στους φάγους, έχει ως αποτέλεσμα την χρήση πολλών μηχανισμών αντίστασης και ελέγχων. Η μέθοδος Crispr, με την διαδικασία προσθήκης διαχωριστών που αντιστοιχούν σε φάγους, καταφέρνει με τον μηχανισμό αντίστασης ο οποίος λειτουργεί ειδικά αν οι διατηρημένες λειτουργικές αλληλουχίες στοχεύουν σε γονιδιώματα φάγων. Ένας διαχωριστής μπορεί να προκαλέσει αντίσταση σε φάγους αν εκείνοι περιέχουν την ίδια αλληλουχία με τον διαχωριστή.

Ένα ανησυχητικό πρόβλημα στην Ιατρική, είναι η αντίσταση των παθογόνων στα αντιβιοτικά. Η παρουσία γονιδίων αντίστασης στα αντιβιοτικά είναι απαγορευτική, με την Crispr-cas μπορούμε να κωδικοποιήσουμε τα γονίδια αντίστασης, γονιδιωματικά ή από πλασμίδια. Έτσι οι μεταλλάξεις που προκαλούν αντίσταση στα αντιβιοτικά να διορθωθούν χρησιμοποιώντας την επεξεργασία γονιδιώματος με την μεσολάβηση

προτύπου. Έτσι, είναι ένα φυσικό μέσο για τον εμβολιασμό βακτηρίων ποιότητας τροφίμων κατά των μεταδιδόμενων γονιδίων αντίστασης στα αντιβιοτικά, το οποίο μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ενσωμάτωσης μιας αλληλουχίας διαχωρισμού που αντιστοιχεί σε εκείνη της κωδικεύουσας αλληλουχίας για αντοχή στα αντιβιοτικά. Αντίθετα, είναι επίσης δυνατό να εισαχθεί ετερόλογα ένα ενεργό σύστημα CRISPR-Cas σε οργανισμούς που δεν διαθέτουν ενδογενές σύστημα και να εμβολιαστεί ο λήπτης κατά της πρόσληψης ανεπιθύμητου γενετικού περιεχομένου (Sapranauskas και άλλοι 2011).

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ύστερα από την βιβλιογραφική ανασκόπηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας σχετικά με την εξελισσόμενη τεχνολογία CRISPR-Cas, μπορούμε να συμπεράνουμε η έννοια της γονιδιωματικής επεξεργασίας υφίσταται από την αρχή και σε διάφορους τομείς όπως η Ιατρική, Βιολογία και στη συνέχεια πέρασε και στην Επιστήμη των Τροφίμων. Η επιστήμη της CRISPR-Cas έχει ήδη εφαρμοστεί σε οργανισμούς όπως είναι η μαγιά, το καλαμπόκι, το ρύζι και η τομάτα. Στόχος της είναι η βελτιστοποίηση ανάπτυξης προϊόντων υπό συνθήκες, ξηρασίας, εντομοκτόνων-παρασιτοκτόνων, συνθήκες λιπασμάτων και την βελτίωση των καλλιεργειών τροφίμων.

Το σημαντικότερο, είναι ο τρόπος δράσης της εν λόγω διαδικασίας. Το σύστημα CRISPR-Cas δρα με έναν ειδικό τρόπο, αναγνωρίζοντας και διασπώντας το ξένο DNA ή RNA.

Ο μηχανισμός άμυνας του συστήματος μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια

α) προσαρμογή ή ενσωμάτωση των διαχωριστικών αλληλουχιών CRISPR-Cas,

β) έκφραση και ωρίμανση του συστήματος - βιογένεση crRNA

γ) παρεμβολή του συστήματος (Gupta et al. 2019; Barman et al., 2020).

Η εξέλιξη της στον τομέα των τροφίμων χρήζει περαιτέρω διερεύνησης για την βοήθεια της βελτιστοποίησης και σε περισσότερα τρόφιμα ή ακόμα και στις καλλιέργειες έτσι ώστε να εφαρμοστεί η φράση από το χωράφι στο πιρούνι με την ανάπτυξη ασφαλών προϊόντων. Η CRISPR επηρεάζει όλο το φάσμα της αλυσίδας των τροφίμων, από καλλιέργειες εκκίνησης, μέχρι τις καλλιέργειες και την κτηνοτροφία. Λόγω της προόδου στην επεξεργασία γονιδιώματος σε βακτήρια και ζύμες τα οποία χρησιμοποιούνται για τις ζυμώσεις προϊόντων έχουμε φτάσει στην δημιουργία καλύτερων ποιοτικά προϊόντων χωρίς προβλήματα στις βιομηχανίες.

Στις μέρες μας, όλο και περισσότερες εταιρείες έχουν αρχίσει και ενσωματώνουν την τεχνολογία CRISPR-Cas για την βελτίωση των μικροβιακών προϊόντων τους λόγω του ορόσημου μέχρι το 2050 για τις καλλιέργειες σχετικά με την παγκόσμια ζήτηση των τροφίμων. Χρησιμοποιούν διάφορες τεχνικές της μηχανικής του γονιδιώματος ως

εναλλακτική λύση στα αντιβιοτικά. Εδώ και μια δεκαετία η εταιρεία DuPont χρησιμοποιεί την CRISPR για τυποποίηση και προστασία κατά των φάγων σε στελέχη γαλακτοκομικών προϊόντων (Barrangou et al. 2017), άλλες εταιρείες είναι οι Locus Biosciences, AgBiome. Αυτές είναι μερικές από τις εταιρείες που χρησιμοποιούν την CRISPR για την βελτίωση στον μικροβιολογικό χώρο.

Ένας κλάδος ο οποίος χρειάζεται να λάβουμε υπόψιν μας είναι αυτός της βιοηθικής, εξαιτίας της ταχείας ανάπτυξης στους τομείς της βιολογίας, ιατρικής σχετικά με την χαρτογράφηση του DNA, έφερε στην επιφάνεια προβληματισμούς οι οποίοι προκύπτουν από την εξέλιξη των παραπάνω επιστημών. Συγκεκριμένα, η τεχνολογία CRISPR/Cas έχει εφαρμοστεί στον άνθρωπο για διάφορες παθήσεις όπως είναι, η επιδιόρθωση μετάλλαξης του γονιδίου CFTR το οποία προκαλεί κυστική ίνωση σε έμβρυα καθώς και για την επιδιόρθωση μετάλλαξης στο γονίδιο β-σφαιρίνης που προκαλεί β-θαλασσαιμία (Μολλάκη & Βιδάλης, ΕΘΝΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΒΙΟΗΘΗΚΗΣ, 2018 http://e-child.gr/wp-content/uploads/2018/04/Report.pdf). Γι' αυτό χρειάζεται να τεθούν σαφή όρια σχετικά με τις μεθόδους επεξεργασίας γονιδιώματος όπως είναι και η CRISPR/Cas, ότι δεν θα καταπατηθεί η ανθρώπινη ελευθερία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη

Atreya, C. (2004). Major foodborne illness causing viruses and current status of vaccines against the diseases. *Foodborne Pathogens and Disease, 1*(2), σσ. 89-96.

Baker-Austin, C., Oliver, J., Alam, M., Ali, A., Waldor, M., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J. (2018). Vibrio spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers, 4*, σσ. 1–19.

Barman, A., Deb, B., & Chakraborty, S. (2020). A glance at genome editing with CRISPR–Cas9 technology. *Current Genetics, 66*(3), σσ. 447-462.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., . . . Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science, 315*, σσ. 1709-1712.

Beyret, E., Liao, H., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, R., Fu, Y., Erikson, G., . . . Belmonte, J. (2019). Single-dose CRISPR–Cas9 therapy extends lifespan of mice with Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature Medicine, 25*, σσ. 419–422.

Bhat, S., Malik, A., Ahmad, S., Shah, R., Ganai, N., Shafi, S., & Shabir, N. (2017). Advances in genome editing for improved animal breeding: A review. *Veterinary World, 10*(11), σσ. 1361-1366.

Brocke, D., Tark-Dame, M., & Dame, R. (2018). dCas9: A Versatile Tool for Epigenome Editing. *Current Issues in Molecular Biology, 26*, σσ. 15-32.

Burki, T. (2020). Testing for COVID-19. *Lancet Respiratory Medicine, 8*(7), σσ. e63-e64.

Chen, M., Mao, A., Xu, M., Weng, Q., Mao, J., & Ji, J. (2019). CRISPR-Cas9 for cancer therapy: opportunities and challenges. *Cancer Letters, 447*, σσ. 48–55.

Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., & Koyanagi, Y. (2013). Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Scientific Reports, 3*, σ. 2510.

Ebrahimi, V., & Hashemi, A. (2020). Challenges of in vitro genome editing with CRISPR/Cas9 and possible solutions: A review. *Gene, 753*(2660), σ. 144813.

El-Mounadi, K., Morales-Floriano, M., & Garcia-Ruiz, H. (2020). Principles, Applications, and Biosafety of Plant Genome Editing Using CRISPR-Cas9. *Frontiers in Plant Science*, σ. 11:56.

Foss, D., Hochstrasser, M., & Wilson, R. (2019). Clinical applications of CRISPR-based genome editing and diagnostics. *Transfusion, 59*(4), σσ. 1389–1399.

Gaj, T., Gersbach, C., & Barbas III, C. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology, 31*(7), σσ. 397-405.

Guan, Y., Zheng, B., & He, Y. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science, 302*, σσ. 276–278.

Guk, K., Keem, J., Hwang, S., Kim, H., Kang, T., Lim, E.-K., & Jung, J. (2017). A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex. *Biosensors and Bioelectronics, 95*(15), σσ. 67-71.

Gunasegar, S., & Neela, V. (2021). Evaluation of diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) compared with polymerase chain reaction (PCR) for Leptospira spp. in clinical samples: a systematic review and meta-analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 100*(3), σ. 115369.

Gupta, D., Bhattacharjee, O., Mandal, D., Sen, M., Dey, D., Dasgupta, A., . . . Ghosh, D. (2019). CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences, 232*, σ. 116636.

Hajian, R., Balderston, S., Tran, T., & al., e. (2019). Detection of unamplified target genes via CRISPR–Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nature Biomedical Engineering, 3*, σσ. 427–437.

Higgins, D., Young, M., Tremaine, M., Sardi, M., Fletcher, J., Agnew, M., . . . Sato, T. (2018). Natural Variation in the Multidrug Efflux Pump SGE1 Underlies Ionic Liquid Tolerance in Yeast. *Genetics, 210*(1), σσ. 219-234.

Hille, F., & Charpentier, E. (2016). CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, 371*(1707), σ. 20150496.

Huang, M., Zhou, X., Wang, H., & Xing, D. (2018). Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 Triggered Isothermal Amplification for Site-Specific Nucleic Acid Detection. *Analytical Chemistry, 90*(3), σσ. 2193-2200.

ICTV. (2017). *Virus Taxonomy: 2017 Release.* ICTV.

Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of Bacteriology, 200*(7), σσ. e00580-17.

Javed, M., Noman, M., Shahid, M., Ahmed, T., Khurshid, M., Rashid, M., . . . Khan, F. (2019). Current situation of biofuel production and its enhancement by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of microbial cells. *Microbiological Research, 219*, σσ. 1-11.

Jiang, F., & Doudna, J. (2017). CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics, 46*, σσ. 505–531.

Jolany vangah, S., Katalani, C., Boone, H., Hajizade, A., Sijercic, A., & Ahmadian, G. (2021). CRISPR-Based Diagnosis of Infectious and Noninfectious Diseases. *Nature Biomedical Engineering, 5*, σσ. 643–656.

Joung, J., Ladha, A., Saito, M., Segel, M., Bruneau, R., Huang, M., . . . Zhang, F. (2020). Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *medRxiv*, σ. 2020.05.04.20091231.

Kennedy, E., Bassit, L., Mueller, H., Kornepati, A., Bogerd, H., Nie, T., . . . Cullen, B. (2015). Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology, 476*, σσ. 196-205.

Kennedy, E., Kornepati, A., Goldstein, M., Bogerd, H., Poling, B., Whisnant, A., . . . Cullen, B. (2014). Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *Journal of Virology, 88*, σσ. 11965–11972.

Khanzadi, M., & Khan, A. (2020). CRISPR/Cas9: Nature's gift to prokaryotes and an auspicious tool in genome editing. *Journal of Basic Microbiology, 60*(2), σσ. 91-102.

Kotagama, O., Jayasinghe, C., & Abeysinghe, T. (2019). Era of Genomic Medicine: A Narrative Review on CRISPR Technology as a Potential Therapeutic Tool for Human Diseases. *Biomed Research International, 2019*, σσ. 1-15.

Lea, R., & Niakan, K. (2019). Human germline genome editing. *Nature Cell Biology, 21*, σσ. 1479–1489.

Lemon, S., Ott, J., Van Damme, P., & Shouval, D. (2014). Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *Journal of Hepatology, 159*(7), σσ. 1697-1705.

Lennon, G., Cashman, O., Lane, K., Cryan, B., & O'Shea, H. (2007). Prevalence and characterization of enteric adenoviruses in the South of Ireland. *Journal of Medical Virology, 79*, σσ. 1518–1526.

Lennon, G., Reidy, N., Collins, P., Gunn, L., Coyle, P., Cryan, B., . . . O'Shea, H. (2014). A comparison of the efficiency of ELISA and selected primer sets to detect Norovirus isolates in southern Ireland over a four-year period (2002-2006): variation in detection rates and evidence for continuing predominance of NoV GII.4 genotype. *Archives of Virology, 159*(7), σσ. 1697-1705.

Lynch, J., & Kajon, A. (2016). Adenovirus: Epidemiology, global spread of novel serotypes, and advances in treatment and prevention. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 37*, σσ. 586–602.

Ma, E., Harrington, L., O'Connell, M., Zhou, K., & Doudna, J. (2015). Single-stranded DNA cleavage by divergent CRISPR-Cas9 enzymes. *Molecular cell, 60*(3), σσ. 398–407.

Mahony, J., Blackhouse, B., Babwah, J., Smieja, M., Buracond, S., Chong, S., . . . Goeree, R. (2009). Cost Analysis of Multiplex PCR Testing for Diagnosing Respiratory Virus Infections. *Journal of Clinical Microbiology, 47*(9), σσ. 2812-2817.

Makarova, K., & Koonin, E. (2015). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in Molecular Biology, 1311*, σσ. 47-75.

Makarova, K., Aravind, L., Grishin, N., Rogozin, I., & Koonin, E. (2002). A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Research, 30*(2), σσ. 482-496.

Mammoth Biosciences. (2020). *A protocol for rapid detection of the 2019 novel coronavirusSARS-CoV-2 using CRISPR diagnostics: SARS-CoV-2 DETECTR.* Ανάκτηση Μάρτιος 7, 2022, από https://mammoth.bio/wp-content/uploads/2020/02/A-protocol-for-rapid-detection-of-the-2019-novel-coronavirus-SARS-CoV-2-using-CRISPR-diagnostics-SARS-CoV-2-DETECTR.pdf

Manghwar, H., Lindsey, K., Zhang, X., & Jin, S. (2019). CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends in Plant Science, 24*, σσ. 1102–1125.

Masters, P., & Perlman, S. (2013). Coronaviridae. Στο D. Knipe, & P. Howley, *Fields Virology* (σσ. 1151–1185). Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.

Matthews, K. (2021). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Δίσιγμα.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., & Heiman, E. (2008). Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-Like and bovine rotavirus strains. *Journal of Virology, 82,* σσ. 3204–3219.

Melgaço, J., Gardinali, N., & Mello, V. (2018). Hepatitis E: Update on prevention and control. *BioMed Research International,* σ. 5769201.

Mojica, F., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution, 60,* σσ. 174–182.

Montville, T., & Matthews, K. (2010). *Μικροβιολογία τροφίμων.* Εκδοτικός Όμιλος Ίων.

Nadakuduti, S., & Enciso-Rodríguez, F. (2020). Advances in Genome Editing With CRISPR Systems and Transformation Technologies for Plant DNA Manipulation. *Frontiers in Plant Science, 11,* σ. 637159.

Nagaraju, S., Davies, N., Walker, D., Köpke, M., & Simpson, S. (2016). Genome editing of Clostridium autoethanogenum using CRISPR/Cas9. *Biotechnology for Biofuels, 9,* σ. 219.

Nature Research. (2019). *CRISPR expands CAR T cell possibilities.* Ανάκτηση Μάρτιος 6, 2022, από https://media.nature.com/original/magazine-assets/d42473-019-00443-7/d42473-019-00443-7.pdf

Neal, R., Tharmanathan, P., & France, B. e. (2015). Is increased time to diagnosis and treatment in symptomatic cancer associated with poorer outcomes? Systematic review. *British Journal of Cancer, 112,* σσ. S92–S107.

O'Shea, H., Blacklaws, B., Collins, P., McKillen, J., & Fitzgerald, R. (2019). Viruses Associated With Foodborne Infections. *Reference Module in Life Sciences,* σσ. B978-0-12-809633-8.90273-5.

Pardee, K., Green, A., Takahashi, M., O'Connor, D., Gehrke, L., & Collins, J. (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell, 165*, σσ. 1255–1266.

Pickar-oliver, A., & Gersbach, C. (2019). The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 20*(8), σσ. 490-507.

Quan, J., Langelier, C., & Kuchta, A. e. (2019). FLASH: a next-generation CRISPR diagnostic for multiplexed detection of antimicrobial resistance sequences. *Nucleic Acids Research, 47*(14), σ. e83.

Sharma, P., Saharia, M., Srivstava, R., Kumar, S., & Sahoo, L. (2018). Tailoring Microalgae for Efficient Biofuel Production. *Frontiers in Marine Science, 5*, σ. 382.

Shrock, E., & Güell, M. (2017). CRISPR in Animals and Animal Models. *Progress in Molecular Biology and Translational Science, 152*, σσ. 95-114.

Sun, L., Lutz, B., & Tao, Y.-.. (2016). The CRISPR/Cas9 system for gene editing and its potential application in pain research. *Translational Perioperative and Pain Medicine, 1*(3), σσ. 22-33.

Tumpey, T., Suarez, D., & Perkins, L. (2002). haracterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza a virus isolated from duck meat. *Journal of Virology, 76*, σσ. 6344–6355.

Wang, T., Liu, Y., Sun, H., Yin, B., & Ye, B. (2019). An RNA-Guided Cas9 Nickase-Based Method for Universal Isothermal DNA Amplification. *Angewandte Chemie International Edition, 58*(16), σσ. 5382-5386.

Weissleder, R., Lee, H., Ko, J., & Pittet, M. (2020). COVID-19 diagnostics in context. *Science Translational Medicine, 12*(546), σ. eabc1931.

WHO. (2015). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015.* Ανάκτηση Μάρτιος

12, 2022, από https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1

Wright, P., Neumannm, G., & Kawaokam, Y. (2013). Orthomyxoviruses. Στο D. Knipe, & P. Howley, *Fields Virology*. (σσ. 1186–1243). Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.

Yang, G., & Huang, X. (2019). Methods and applications of CRISPR/Cas system for genome editing in stem cells. *Cell Regeneration, 8*, σσ. 33-41.

Yang, S., & Rothman, R. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infectious Diseases, 4*, σσ. 337-348.

Yugo, D., & Meng, X. (2013). Hepatitis E virus: Foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 10*, σσ. 4507–4533.

Zhang, H.-X., Zhang, Y., & Yin, H. (2019). Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Molecular Therapy, 27*(4), σσ. 735-746.

Zhou, W., Hu, L., Ying, L., Zhao, Z., Chu, P., & Yu, X.-F. (2018). A CRISPR–Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection. *Nature Communications, 9*, σ. 5012.

Zhu, H., Li, C., & Gao, C. (2020). Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 21*, σσ. 661–677.

Βανταράκης, Α. (2015). *Υγιεινή - Βιολογικοί παράγοντες και τρόφιμα.* Ανάκτηση Μάρτιος 4, 2022, από https://www.medicalmate.gr/wp-content/uploads/2020/05/4_23_%CE%92%CE%B9%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CE%AF-%CF%80%CE%B1%CF%81%CE%AC%CE%B3%CE%BF%CE%BD%CF

%84%CE%B5%CF%82-%CF%83%CF%84%CE%B1-
%CF%84%CF%81%CF%8C%CF%86%CE%B9%CE%BC%CE%B1.pdf

Πηγές από το Διαδίκτυο

www.annualreviews.org CRISPR Across the Food Supply Chain

https://www.synthego.com/blog/sickle-cell-ctx001

https://www.science.org/content/article/crispr-injected-blood-treats-genetic-disease-first-time

https://interestingengineering.com/designer-babies-gene-editing-and-the-controversial-use-of-crispr

https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety

https://www.cdc.gov/campylobacter/index.html

https://www.cdc.gov/listeria/index.html

https://www.cdc.gov/yersinia/index.html

https://www.cdc.gov/hepatitis/hav/index.htm

https://www.cdc.gov/adenovirus/index.html

https://www.fsis.usda.gov/food-safety/foodborne-illness-and-disease/pathogens/parasites-and-foodborne-illness

https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2021.6971

ΕΘΝΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΒΙΟΗΘΙΚΗΣ/ http://e-child.gr/wp-content/uploads/2018/04/Report.pdf