



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:  
**«Ανίχνευση και ταυτοποίηση παθογόνων βακτηρίων σε  
δείγματα τροφίμων με τη χρήση καινοτόμων μοριακών  
τεχνικών»**

Όνοματεπώνυμο Φοιτητή: ΜΑΓΟΥΛΑΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

Αριθμός Μητρώου: 17053

Επιβλέπων καθηγητής: ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ

Αθήνα 2022



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

SCHOOL OF FOOD SCIENCES

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

THESIS:

**«Detection and identification of bacterial pathogens in food samples with innovative molecular techniques»**

Student name: MAGOULAS SOTIRIOS

Registration number: 17053

Supervisor: HOUHOULA DIMITRA

Athens 2022

**«Ανίχνευση και ταυτοποίηση παθογόνων βακτηρίων σε  
δείγματα τροφίμων με τη χρήση καινοτόμων μοριακών  
τεχνικών»**

**Υπεύθυνος καθηγητής: ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ**

**Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής:**

**ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ ΑΝΘΙΜΙΑ**

**ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ**

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος ΜΑΓΟΥΛΑΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ του ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ, με αριθμό μητρώου 17053 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

Ο Δηλών: ΜΑΓΟΥΛΑΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ



## Περίληψη

Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις είναι ένα από τα σημαντικότερα θέματα που αφορούν, τη βιομηχανία των τροφίμων και την παγκόσμια υγεία. Ο υψηλός αριθμός ετήσιων λοιμώξεων καθιστά την έγκαιρη και έγκυρη ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα κρίσιμο σημείο ελέγχου κατά την παραγωγή και επεξεργασία των τροφίμων. Οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων είναι χρονοβόρες έχουν υψηλό κόστος και απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό. Συνεπώς υπάρχει ανάγκη για ανάπτυξη νέων, ταχέων και αξιόπιστων μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών οι οποίες θα μπορούν να αξιοποιηθούν άμεσα από την βιομηχανία των τροφίμων. Η παρούσα εργασία συγκρίνει την ευαισθησία της μεθόδου ισοθερμικής ενίσχυσης μέσω βρόγχου (Loop-mediated isothermal amplification–LAMP) με τη μέθοδο της PCR, καθώς και δύο μεθόδους απομόνωσης του βακτηριακού DNA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις τριών βακτηρίων μεγάλου ενδιαφέροντος, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli*. Ακόμη δοκιμάζει 3D εκτυπωμένες συσκευές – τσιπ (microfluidic devices) που εφαρμόζουν τις αρχές της μικρορευστομηχανικής. Η απομόνωση του DNA των παθογόνων βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους. Με το εμπορικό kit απομόνωσης DNA NucleoSpin® Food και με μία in-house τεχνική που περιλάμβανε την χρήση βρασμού, υπερήχων, διαλύματος χλωροφορμίου με ισοαμυλική αλκοόλη, αιθανόλη και κατάψυξη. Η μέθοδος απομόνωσης του βακτηριακού DNA φαίνεται να μην επηρεάζει σημαντικά τα όρια ανίχνευσης των μικροοργανισμών. Η μέθοδος LAMP έδωσε αποτελέσματα σε χρόνο που δεν υπερβαίνει τα 60 λεπτά, σε σταθερή θερμοκρασία 65 °C, ενώ αντίθετα η PCR χρειάστηκε περισσότερο χρόνο για να δώσει αποτελέσματα αφού όχι μόνο απαιτεί θερμικούς κύκλους που διαρκεί περίπου 3 ώρες, αλλά και ηλεκτροφόρηση για να αναγνωστούν τα αποτελέσματά της. Η LAMP είναι πιο εύχρηστη τεχνική αφού δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό υψηλού κόστους, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για χρήση σε εργαστήρια με χαμηλούς πόρους. Στα εκτυπωμένα τσιπ μικρορευστομηχανικής δοκιμάστηκαν δείγματα που ανιχνεύτηκαν με τη LAMP, δίνοντας αξιόπιστα και επαναλήψιμα αποτελέσματα.

## Abstract

Foodborne infections are one of the most important issues for the food industry and global health. The high number of annual infections makes the timely and valid detection of pathogenic bacteria in food a critical control point in the production and processing of food in the food industry. The procedures used to detect pathogenic bacteria are time consuming, costly and require specialized equipment. There is therefore a need to develop new, rapid and reliable methods for detecting pathogenic microorganisms that can be used directly by the food industry. The present study compares the sensitivity of the LAMP method with the PCR method, as well as two methods of extraction and bacterial DNA isolation at different concentrations of three bacteria of great interest. *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. It also evaluates 3D printed chip devices that apply the principles of microfluidics. DNA isolation of pathogenic bacteria was performed by two different methods. With the commercial DNA NucleoSpin® Food isolation kit and with an in-house technique that included the use of boiling, ultrasound, chloroform solution with isoamyl alcohol, ethanol and freezing. The bacterial DNA isolation technique does not seem to significantly affect the limits of detection of the microorganisms. LAMP gave results in a time not exceeding 60 minutes, at a constant temperature of 65 °C, while PCR took longer to give results as it not only requires a thermal cycle that lasts about 3 hours, but also electrophoresis technique to show results. LAMP is a more user-friendly technique as it does not require specialized or high-cost equipment, which makes it suitable for use in laboratories with low resources. Samples detected with LAMP were tested on the printed microfluidic chips, giving reliable and repeatable results.

## Ευχαριστίες

Ευχαριστώ την επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Χούχουλα Δήμητρα για την ανάθεση ενός εξαιρετικά ενδιαφέροντος θέματος, για την προθυμία και τη διάθεσή της να αφιερώσει χρόνο στην καθοδήγησή μου και στην επίλυση των αποριών μου, καθώς και για την πολύτιμη θεωρητική και πρακτική εμπειρία που αποκόμισα από την συνεργασία μας. Ακόμη την ευχαριστώ για τον προσωπικό της χρόνο τον οποίο αφιέρωσε με σκοπό την βέλτιστη πορεία της εργασίας αυτής, από την ανάληψη του θέματος, έως και την παράδοσή της εργασίας στην τελική της μορφή.

Ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα κύριο Παπαθεοδώρου Σπύρο για την πολύτιμη βοήθειά του και την απλόχερη μεταβίβαση των γνώσεών του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, αλλά και κατά την σύνταξη της εργασίας και για την όρεξη που είχε να αφιερώσει χρόνο στην καθοδήγηση των φοιτητών του τμήματος.

Ευχαριστώ όλους τους καθηγητές της σχολής που συνέλαβαν με τις γνώσεις τους και τη διδασκαλία τους να φτάσω στο στάδιο αυτό και με βοήθησαν να αποκτήσω έναν τρόπο σκέψης και κρίσης, όσον αφορά την επιστήμη των τροφίμων. Επίσης τους ευχαριστώ για τα βιβλία που έγραψαν, έργα τα οποία ήταν σημαντικά βοηθήματα στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ την οικογένειά μου που πάντοτε με στηρίζει και στάθηκε δίπλα μου και στα πέντε χρόνια των προπτυχιακών μου σπουδών.

Ευχαριστώ τα αξιότιμα μέλη της επιτροπής που πρόκειται να αξιολογήσουν την πτυχιακή μου εργασία.

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	I
Abstract .....	III
Ευχαριστίες .....	IV
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	1
Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και η ανίχνευσή τους.....	1
Σημασία ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών.....	1
Επιδημιολογικά στοιχεία .....	2
<i>Salmonella enterica</i> ορότυπος Typhimurium.....	3
Συνηθέστερες πηγές επιμόλυνσης από <i>Salmonella spp</i> .....	6
Φυσιολογία – Ανάπτυξη και Επιβίωση.....	7
Μολυσματική δόση .....	8
Προληπτικά μέτρα.....	8
Χαρακτηριστικά της ασθένειας και θεραπεία .....	9
<i>Listeria monocytogenes</i> .....	10
Πηγές <i>Listeria monocytogenes</i> .....	11
Ευαισθησία σε Φυσικούς και Χημικούς Παράγοντες .....	12
Μολυσματική δόση .....	14
Έλεγχος .....	14
Χαρακτηριστικά της ασθένειας.....	14
<i>Escherichia coli</i> .....	15
Πηγές <i>E. coli</i> .....	16
Ευαισθησία σε Φυσικούς και Χημικούς Παράγοντες .....	17
Μολυσματική δόση .....	17
Έλεγχος .....	17
Χαρακτηριστικά της ασθένειας.....	17
Κεφάλαιο 2: Βιβλιογραφική ανασκόπηση .....	19
Κλασσικές μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών στα τρόφιμα .....	19
Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών στα τρόφιμα .....	20
Απομόνωση DNA.....	21
Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	23
Ηλεκτροφόρηση .....	31



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

34

Η μικρορρευστομηχανική στην ανίχνευση παθογόνων (microfluidics).....	40
Άλλες μέθοδοι απομόνωσης και εκχύλισης του DNA .....	45
Πλεονεκτήματα μοριακών μεθόδων έναντι των κλασικών.....	47
Κεφάλαιο 3: Υλικά και μέθοδοι.....	49
Εξοπλισμός και υλικά.....	49
Πειραματική διαδικασία .....	50
Προετοιμασία δειγμάτων .....	50
Απομόνωση με την χρήση του εμπορικού kit (NucleoSpin® Food).....	50
Αναλυτικά βήματα της in-house τεχνικής απομόνωσης DNA.....	52
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	52
Ηλεκτροφόρηση .....	54
Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου - LAMP (loop-mediated isothermal amplification) .....	55
Συσκευή-τσιπ μικρορρευστομηχανικής (microfluidic analytical device).....	57
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα και συζήτηση .....	60
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα και προτάσεις για μελλοντική εξέλιξη.....	69
Βιβλιογραφία.....	71

## Κατάλογος πινάκων

<b>Πίνακας 1.1:</b> Σημαντικότεροι επικίνδυνοι μικροοργανισμοί.....	3
<b>Πίνακας 1.2:</b> Νομοθετικά όρια ανίχνευσης της σαλμονέλας σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθμ. 2073/2005 .....	4
<b>Πίνακας 1.3:</b> Φυσικοί και χημικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της <i>SalmonellaTyphimurium</i> .....	7
<b>Πίνακας 1.4:</b> Φυσιολογικά όρια για την ανάπτυξη της <i>SalmonellaTyphimurium</i> σε τρόφιμα και βακτηριολογικά μέσα.....	7
<b>Πίνακας 1.5:</b> Μολυσματική δόση <i>SalmonellaTyphimurium</i> για τους ανθρώπους.....	8
<b>Πίνακας 1.6:</b> Νομοθετικά όρια ανίχνευσης της <i>L. monocytogenes</i> .....	10
<b>Πίνακας 1.7:</b> Επίδραση φυσικών και χημικών παραγόντων στην ανάπτυξη της <i>Listeriamonocytogenes</i> .....	12
<b>Πίνακας 1.8:</b> Αποτελέσματα σε διάφορες αντιδράσεις (για τη <i>L. monocytogenes</i> ).....	13
<b>Πίνακας 1.9:</b> Επίδραση της θερμοκρασίας στο χρόνο διπλασιασμού της <i>Listeriamonocytogenes</i> .....	14
<b>Πίνακας 2.1:</b> Βασικά στάδια της PCR (Μπατρίνου 2011).....	25

## Κατάλογος εικόνων

<b>Εικόνα 2.1:</b> Σχεδιάγραμμα της πειραματικής πορείας απομόνωσης του DNA .....	23
<b>Εικόνα 2.2:</b> Η λειτουργία της PCR σχηματικά.....	31
<b>Εικόνα 2.3:</b> Εξοπλισμός για τη διεκπεραίωση μιας ηλεκτροφόρησης.....	33
<b>Εικόνα 2.4:</b> Πορεία και αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης .....	34
<b>Εικόνα 2.5:</b> Εφαρμοσμένες δοκιμές LAMP .....	39
<b>Εικόνα 2.6:</b> Η αρχή λειτουργίας της LAMP σχηματικά.....	40
<b>Εικόνα 2.7:</b> Παραδείγματα microfluidic chip.....	44
<b>Εικόνα 2.8:</b> Πρακτικές εφαρμογές της μικρορευστομηχανικής .....	45

# Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

## Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και η ανίχνευσή τους

Οι σύγχρονοι ρυθμοί ζωής και η αύξηση του πληθυσμού των πόλεων, χρήζουν εντατικοποίηση της παραγωγής επεξεργασμένων τροφίμων σε αρκετές μορφές. Παρόλο που η αλματώδης πρόοδος που έχει σημειωθεί στη βιομηχανία τροφίμων τα τελευταία χρόνια ολοένα και αυξάνεται, τα κρούσματα τροφιμογενών λοιμώξεων στον ευρωπαϊκό χώρο παραμένουν σταθερά σε υψηλά επίπεδα. Εδώ και πολλά χρόνια έχει αποδειχθεί ότι οι κλασικές μέθοδοι μικροβιολογίας δεν μπορούν να ανταποκριθούν στα υψηλά επίπεδα προσδοκιών που επιβάλλονται από την ασφάλεια των τροφίμων στη σύγχρονη εποχή. Με την ασφάλεια των καταναλωτών να βάλλεται από παντού, η βιομηχανία τροφίμων περνάει μία κρίση. Ωστόσο η πρόοδος των ερευνητικών επιστημών σε συνδυασμό με την συνεχή εξέλιξη της τεχνολογίας έχουν αναδείξει νέες καινοτόμες μεθόδους που στηρίζονται στην ανίχνευση σε μοριακό επίπεδο οι οποίες δύνανται να εξασφαλίσουν ένα μεγαλύτερο ποσοστό κάλυψης της ασφάλειας των καταναλωτών, όσον αφορά την πρόληψη των τροφιμογενών μολύνσεων (SAParatheodorou 2021).

Με την αμφισβήτηση της ασφάλειας των τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο, οι μοριακές μέθοδοι γεμίζουν ένα σημαντικό κενό στον τομέα ελέγχου των τροφίμων, καθώς αυτές είναι πιο γρήγορες, πιο εξειδικευμένες, πιο αποτελεσματικές και πιο οικονομικές από τις κλασικές. Η βιομηχανία τροφίμων χρειάζεται όλα αυτά τα χαρακτηριστικά και επιφυλάσσει μέλλον στην εξέλιξη των μοριακών τεχνικών. Η ταυτόχρονη ποιοτική καθώς και ποσοτική ανίχνευση όχι μόνο παθογόνων μικροοργανισμών αλλά και προϊόντων αυτών π.χ. τοξίνες ως μεταβολίτες, αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα που καθιστά τις μεθόδους αυτές μονόδρομο.

### Σημασία ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών

Οι τροφικές δηλητηριάσεις διακρίνονται σε τροφολοιμώξεις (που προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν μικροοργανισμούς, οι οποίοι προσβάλλουν το εντερικό σύστημα) και σε τροφοτοξινώσεις (που οφείλονται στην κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν τοξικές ουσίες). Οι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν για τη μελέτη του ορίου ανίχνευσης ήταν *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*

και *Escherichia coli*. Τα βακτήρια αυτά είναι υπεύθυνα για ένα πολύ σημαντικό ποσοστό των τροφοδηλητηριάσεων. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων (European Food Safety Authority – EFSA), μεταξύ όλων των τροφιμογενών ασθενειών που οφείλονται σε βακτήρια, η σαλμονέλωση και η λιστερίωση ήταν υπεύθυνες για τους περισσότερους καταγεγραμμένους θανάτους εντός Ε.Ε. το 2018. Ιδιαίτερη βαρύτητα έχει το γεγονός ότι η εκλεκτικότητα και η επαναληψιμότητα των μεθόδων αυτών καθιστά ευκολότερη την ανίχνευση και ταυτοποίηση των βακτηρίων-στόχων που αναμένεται να εντοπιστούν σε κάθε δείγμα τροφίμου.

Η ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (1998) έχει δώσει τους παρακάτω ορισμούς για τις διάφορες κατηγορίες κινδύνων:

1. Μικροβιολογικός κίνδυνος υψηλής σοβαρότητας και επικινδυνότητας (severe hazard): Είναι ο κίνδυνος που σχετίζεται με την παρουσία παθογόνου μικροοργανισμού ή τοξίνης στο τρόφιμο και είναι δυνατόν να προκαλέσει προβλήματα τροφικής δηλητηρίασης όταν αυτό καταναλωθεί.
2. Μικροβιολογικός κίνδυνος μέτριας σοβαρότητας και επικινδυνότητας (moderate hazard): Είναι ο κίνδυνος που προκαλεί παροδικές και χωρίς σοβαρά συμπτώματα ασθένειες σε υγιή άτομα. Οι κίνδυνοι αυτοί διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

Μικροβιολογικός κίνδυνος μέτριας επικινδυνότητας και σοβαρότητας με πιθανότητα εκτεταμένης εξάπλωσης (extensive spread): Ο κίνδυνος αυτός μπορεί να εξαπλωθεί με αλληλοεπιμόλυνση στους χώρους επεξεργασίας των τροφίμων. Η ασθένεια είναι δυνατόν να προκληθεί από μικρή ποσότητα των μικροοργανισμών αυτών.

Μικροβιολογικός κίνδυνος μέτριας επικινδυνότητας και σοβαρότητας με περιορισμένη εξάπλωση (limited spread): Τα κρούσματα από τον κίνδυνο αυτό περιορίζονται μόνο στο άτομο που καταναλώνει το μολυσμένο τρόφιμο, ενώ απαιτείται η παρουσία σημαντικού αριθμού μικροοργανισμών στο μολυσμένο τρόφιμο για να προκληθεί ασθένεια (Τσάκνης 2009).

### **Επιδημιολογικά στοιχεία**

Ο αριθμός των κρουσμάτων συνεχίζει να αυξάνεται (SayadA 2018). Έτσι, παθογόνα βακτήρια όπως *Salmonella* spp. και η *Listeria monocytogenes* αποτελούν σημαντικό κίνδυνο και η ανίχνευσή τους θα πρέπει να θεωρείται κρίσιμη (MarquisH 2016)

(RadoshevichL 2017), (SantosRL 2003), (ZhangS 2003). Τα εθνικά επιδημιολογικά στοιχεία εξακολουθούν να υπογραμμίζουν την *Salmonella* ως κύρια αιτία πρόκλησης ασθενειών που προκαλούνται σε ανθρώπους από τροφογενή βακτήρια. Τα περιστατικά τροφογενούς σαλμονέλλωσης τείνουν να επισκιάσουν τα περιστατικά που σχετίζονται με τα περισσότερα άλλα τροφογενή παθογόνα. Είναι αξιοσημείωτο ότι το πρόβλημα σαλμονέλλωσης στον άνθρωπο λόγω κατανάλωσης τροφίμων συνεχίζει να αυξάνεται παγκοσμίως καθώς είναι υπεύθυνη για το 80-90% των περιπτώσεων τροφικών δηλητηριάσεων.

Το 20-30% των ανθρώπων που παθαίνουν λιστερίωση πεθαίνουν, γεγονός που καθιστά το ποσοστό θνησιμότητας αρκετά υψηλό.

### Πίνακας 1.1: Σημαντικότεροι επικίνδυνοι μικροοργανισμοί

Υψηλής επικινδυνότητας και σοβαρότητας	Μέτριας επικινδυνότητας και σοβαρότητας (με πιθανότητα εκτεταμένης εξάπλωσης)	Μέτριας επικινδυνότητας και σοβαρότητας (με περιορισμένη εξάπλωση)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Clostridium botulinum</i></li> <li>• <i>Shigella dysenteriae</i></li> <li>• <i>Salmonella typhi</i>, <i>paratyphi A,B</i></li> <li>• <i>Vibrio cholerae 01\</i></li> <li>• <i>Vibrio vulnificus</i></li> <li>• <i>Hepatitis A, E</i></li> <li>• <i>Trichinella spiralis</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>L. monosytogenes</i></li> <li>• <i>Salmonella spp.</i></li> <li>• <i>Shigella spp.</i></li> <li>• <i>Escherichia coli (EEC)</i></li> <li>• <i>Rotavirus</i></li> <li>• <i>Streptococcus pyogenes</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus cereus</i></li> <li>• <i>Cambylobacter jejuni</i></li> <li>• <i>Clostridium perfringens</i></li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Vibrio cholerae non-01</i></li> <li>• <i>Yersinia enterocolitica</i></li> </ul>

### *Salmonella enterica* ορότυπος Typhimurium

Ενώ παλαιότερα οι ορότυποι των σαλμονέλλων θεωρούνταν είδη, σήμερα αναφέρονται ως *S. Typhimurium* και εννοούμε *S. Enterica* ορότυπος (serovar) Typhimurium (Κοτζεκίδου 2009). Η *Salmonella Typhimurium* είναι είδος του γένους *Salmonella* και ανήκει στα τυφοειδή στελέχη αυτής. Είναι προαιρετικά αναερόβιο, αρνητικό κατά gram, ραβδόμορφο βακτήριο, που ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. (SuLH 2007). Το βακτήριο αυτό μπορεί και κινείται με τη βοήθεια περίτριχωνμαστιγίων,

δηλαδή μαστιγίων που είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα πάνω στην κυτταρική επιφάνεια (GA 2008). Η *Salmonella Typhimurium* είναι ικανή να χρησιμοποιεί ένα μεγάλο εύρος οργανικών υποστρωμάτων (για αυτό το λόγο αποκαλείται και χημειοοργανοτρόφος), με την ικανότητα να μεταβολίζει τα θρεπτικά συστατικά μέσω του αναπνευστικού και του ζυμωτικού μονοπατιού. Αναπτύσσεται ιδανικά στους 37°C και καταβολίζει την D-γλυκόζη και άλλους υδατάνθρακες με την παραγωγή οξέος και αερίου. Είναι αρνητική στην οξειδάση και την καταλάση ενώ χρησιμοποιεί το κιτρικό οξύ ως πηγή άνθρακα (ClarkMA 1987), (AlvarezJ 2004). Παράγει υδρόθειο, αποκαρβοξυλιώνει τη λυσίνη και την ορνιθίνη και δεν υδρολύει την ουρία (Σπηλιώτης Β. 2010).

Ο πίνακας που ακολουθεί αποτυπώνει την αντιμετώπιση της νομοθεσίας για τη σαλμονέλα και ειδικότερα για τη *S. Typhimurium*, όσον αφορά τα όρια ανίχνευσης. Αναφέρονται ενδεικτικά κάποια παραδείγματα.

**Πίνακας1.2:** Νομοθετικά όρια ανίχνευσης της σαλμονέλας σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθμ. 2073/2005.

Κατηγορία τροφίμων	Όρια	Αναλυτική μέθοδος αναφοράς	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
Κιμάς και παρασκευάσματα κρέατος που προορίζονται να καταναλωθούν ωμά	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Κιμάς και παρασκευάσματα κρέατος από κρέας πουλερικών που προορίζονται να καταναλωθούν μαγειρευμένα	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Κιμάς και παρασκευάσματα κρέατος από κρέας ειδών εκτός από πουλερικά που προορίζονται να καταναλωθούν μαγειρευμένα	Απουσία σε 10 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Μηχανικώς διαχωρισμένο κρέας (ΜΔΚ)	Απουσία σε 10 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Ζελατίνη και κολλαγόνο	Απουσία σε	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη

	25 g		διάρκεια διατήρησής τους
Τυριά, βούτυρο και κρέμα από νοπό γάλα ή από γάλα που έχει υποστεί επεξεργασία σε θερμοκρασία χαμηλότερη από της παστερίωσης	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Γάλα σε σκόνη και ορός γάλακτος σε σκόνη	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση που περιέχουν ωμό αυγό, εξαιρουμένων των προϊόντων για τα οποία η διαδικασία παρασκευής ή η σύνθεση του προϊόντος θα εξαλείψει τον κίνδυνο σαλμονέλλας	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Ζώντα δίθυρα μαλάκια και ζώντα εχινόδεσμα, χιτωνόζωα και γαστερόποδα	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Σπόροι με φύτρο (έτοιμοι για κατανάλωση)	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Κομμένα φρούτα και λαχανικά (έτοιμα για κατανάλωση)	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Μη παστεριωμένοι χυμοί φρούτων και λαχανικών (έτοιμοι για κατανάλωση)	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Παρασκευάσματα για βρέφη σε σκόνη και τρόφιμα που προορίζονται για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς σε σκόνη για βρέφη ηλικίας κάτω των έξι μηνών	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Νοπό κρέας πουλερικών ( <i>Salmonella Typhimurium</i> και <i>Salmonella enteritidis</i> )	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579 (για την ανίχνευση) Σύστημα White-Kaufmann-Le Minor (για τον προσδιορισμό οροτύπου)	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους



### Συνηθέστερες πηγές επιμόλυνσης από *Salmonella spp.*

- Το πεπτικό σύστημα των θερμόαιμων και των ψυχρόαιμων ζώων
- Χοιρινό κρέας
- Νωπό μοσχαρίσιο κρέας
- Αυγά πουλερικών
- Νωπό γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα
- Σοκολάτα
- Γλυκά με γέμιση

Ακόμη από επιμολύνσεις όπως:

- Ζωοτροφές με υπολείμματα σφαγείων
- Μολυσμένο νερό (από κόπρανα)
- Τρωκτικά και μύγες
- άτομα/ζώα που πάσχουν από σαλμονέλλωση ή είναι φορείς σαλμονέλων

Ο κυριότερος φόβος στην περίπτωση αυτή είναι τα πουλερικά και επισκιάζει όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις. (Foley S.L. 2008), (Wales A. 2013), (VandeGiessen 1994), (Κοτζεκίδου 2009).

Είναι γνωστό πως η υπερεντατική εκτροφή ζώων συμβάλλει στην καλλιέργεια ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών και στην εξάπλωσή τους στον καταναλωτικό πληθυσμό.

Μόνο λίγα κύτταρα CFU/g (colony-forming units) μπορεί να αρκούν για την πρόκληση της σαλμονέλλωσης.

Η είσοδος των κυττάρων του μικροοργανισμού σε λιπώδη μικκύλια προστατεύει τα κύτταρα, τα οποία εν τέλει επιβιώνουν σε λιπαρά τρόφιμα (Σπηλιώτης B. 2010)

Στα αφυδατωμένα τρόφιμα οι σαλμονέλες μπορεί να επιβιώσουν μέχρι τρία χρόνια, αλλά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ο πληθυσμός τους μειώνεται.

Στη σοκολάτα το κακάο είναι η κύρια πηγή επιμόλυνσης και επειδή είναι τρόφιμο με υψηλή λιποπεριεκτικότητα και χαμηλή υγρασία είναι δυνατό να επιβιώσει η *S. Typhimurium* (Κοτζεκίδου 2009).

## Φυσιολογία – Ανάπτυξη και Επιβίωση

Είναι πολύ σημαντικό να επισημανθεί ότι η ανάπτυξη της *Salmonella Typhimurium* επηρεάζεται και διαφοροποιείται από τρόφιμο σε τρόφιμο και εξαρτάται και από το βακτηριολογικό μέσο που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Στον παρακάτω πίνακα, υποδεικνύεται πως φυσικοί ή χημικοί παράγοντες επηρεάζουν το χρόνο διπλασιασμού της *Salmonella Typhimurium* σε διάφορα τρόφιμα μολυσμένα με φυσικό ή τεχνητό τρόπο.

**Πίνακας 1.3:** Φυσικοί και χημικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της *Salmonella Typhimurium*

Φυσικοί και χημικοί παράγοντες	Ανάπτυξη της <i>Salmonella Typhimurium</i>
Θερμοκρασία (°C)	Από 0 °C έως 54 °C, ιδανική: 37 °C
pH	4,5 – 9,5, ιδανικό :6,5 – 7,5
Οσμωτική πίεση	Παρεμποδίζεται με 3 – 4% NaCl, Αυξάνεται με την άνοδο της θερμοκρασίας από 10 – 30 °C
Τροποποιημένη ατμόσφαιρα	Θετική ανάπτυξη σε συσκευασία MAP

(Σπηλιώτης Β. 2010).

**Πίνακας 1.4:** Φυσιολογικά όρια για την ανάπτυξη της *Salmonella Typhimurium* σε τρόφιμα και βακτηριολογικά μέσα

Παράμετρος	<u>Όρια (χρόνος διπλασιασμού)</u>		Προϊόν
	Ελάχιστο	Μέγιστο	
Θερμοκρασία	2°C (24h)		Κιμάς βοδινού <sup>α</sup>
	2°C (2 ημέρες)		Κιμάς κοτόπουλου <sup>β</sup>
		54,0°C <sup>γ</sup>	Θρεπτικό μέσο με άγαρ
pH		9,5	Νερό ξεπλύματος αυγών

<sup>α</sup>Μολυσμένο με φυσικό τρόπο

<sup>β</sup>Μολυσμένο με τεχνητό τρόπο

<sup>γ</sup>Μεταλλαγμένα στελέχη επιλεγμένα ώστε να αναπτύσσονται σε αυξημένη θερμοκρασία

(Σπηλιώτης Β. 2010).

### Μολυσματική δόση

Τα νεογέννητα, τα παιδιά, οι ηλικιωμένοι και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα είναι περισσότερο ευπαθή σε μολύνσεις από το βακτήριο σε σχέση με τους υγιείς ενήλικες. Η κατανάλωση έστω και λίγων κυττάρων *Salmonella Typhimurium* μπορεί να είναι μολυσματική. Οι καθοριστικοί παράγοντες για τη πρόκληση της ασθένειας δεν περιορίζονται μόνο στην ανοσολογική ετερογένεια μεταξύ των ανθρώπων και στη λοιμογόνο δράση των μολυσματικών στελεχών, αλλά μπορεί να συμπεριλαμβάνουν και τη χημική σύνθεση του μολυσμένου τροφίμου. Ένας κοινός παρανομαστής των τροφίμων που σχετίζονται με χαμηλές μολυσματικές δόσεις είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη (Σπηλιώτης Β. 2010).

#### Πίνακας 1.5: Μολυσματική δόση *Salmonella Typhimurium* για τους ανθρώπους.

Τρόφιμο	Μολυσματική δόση (CFU)
Απομίμηση παγωτού	$10^4$
Τυρί τσένταρ	$10^0 - 10^1$
Σοκολάτα	$\leq 10^1$

(D' Aoust 1994)

### Προληπτικά μέτρα

- Η πλήρης θερμική επεξεργασία των τροφίμων (στο αυγό αρκούν 3 λεπτούς 64°C στο γεωμετρικό του κέντρο).
- Το καθάρισμα και η εξυγίανση των επιφανειών επαφής με τρόφιμα.
- Το καλό πλύσιμο των χεριών των εργαζομένων σε εταιρείες και καταστήματα τροφίμων.
- Το καλό πλύσιμο των σκευών και η χρήση καθαρού νερού.
- Ζωοτροφές χωρίς ζωικά υπολείμματα σφαγείων.
- Λιγότερο εντατικές μορφές εκτροφής ζώων και ψαριών.
- Ορθή παστερίωση του γάλακτος

(Σπηλιώτης Β. 2010), (Κοτζεκίδου 2009).

## Χαρακτηριστικά της ασθένειας και θεραπεία

Οι δύο κυριότερες κατηγορίες σαλμονέλωσης είναι η τυφική και η μη τυφική. Η μόλυνση από την *Salmonella Typhimurium* προκαλεί τυφική σαλμονέλωση και απαντάται μόνο στους ανθρώπους (Σπηλιώτης Β. 2010). Η τυφική σαλμονέλωση η οποία είναι ευρύτερα γνωστή ως τυφοειδής ή εντερικός πυρετός μολύνει και αλλοιώνει διάφορα όργανα. Τα συμπτώματα του εντερικού πυρετού εμφανίζονται έπειτα από μια περίοδο επώασης που κυμαίνεται από 7 έως 28 ημέρες (Σπηλιώτης Β. 2010), (WainJ 2015). Αυτή η κατηγορία σαλμονέλωσης επηρεάζει ολόκληρο τον οργανισμό και όχι απλά τα έντερα, όπως συμβαίνει με την μη τυφοειδή σαλμονέλωση, κάνοντας την ασθένεια πολύ πιο επικίνδυνη για τον οργανισμό, έως και θανατηφόρα. Τα συμπτώματα της τυφικής είναι τα ίδια με της μη τυφικής μόνο που ο πυρετός είναι υψηλότερος και εξαφανίζεται μετά από τρεις εβδομάδες, ενώ μόνο στην τυφική συναντώνται και: ναυτία, διάρροια, κοιλιακές κράμπες, πονοκέφαλοι, εμετοί, εντερική διάτρηση, μηνιγγίτιδα, οστεομυελίτιδα, ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία, ελαττωμένη επιθυμία για φαγητό, εντερική αιμορραγία, στομαχόπονος, ενώ είκοσι με τριάντα ημέρες μετά την προσβολή του οργανισμού, ενδέχεται να υπάρξουν πόνοι στις αρθρώσεις (Σπηλιώτης Β. 2010), (CrumpJA 2010). Είναι επίσης πιθανό να προκληθούν χρόνιες καταστάσεις, όπως η ασηπτική αρθρίτιδα, το σύνδρομο Reiter και η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα. Η εκδήλωση τέτοιων χρόνιων ασθενειών προϋποθέτει ικανότητα του βακτηριακού στελέχους να μολύνει βλενώδεις επιφάνειες (βλεννογόνους), παρουσία των λιποσακχαριτών (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης και ικανότητα να επιβάλλει σε κύτταρα ξενιστές. (Σπηλιώτης Β. 2010)

Η διάγνωση της θεραπείας εξαρτάται από την απομόνωση του μολυσματικού παράγοντα από δείγματα αίματος και ούρων κατά τα στάδια της ασθένειας ή από κόπρανα ύστερα από την εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων (WainJ 2015). Η θεραπεία βασίζεται στην υποστηρικτική θεραπεία και στη χρήση χλωραμφενικόλης, αμπικιλίνης ή trimethoprim –sulfamethoxazole για την εξαφάνιση της συστηματικής μόλυνσης (Σπηλιώτης Β. 2010), (ParryCM 2009), (SoeGB 1987). Η αξιοσημείωτη παγκόσμια αύξηση της ανθεκτικότητας του βακτηρίου σε αυτά τα φάρμακα την τελευταία δεκαετία έχει περιορίσει την αποτελεσματικότητά τους στην θεραπεία του ανθρώπου. (Σπηλιώτης Β. 2010)

## *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο. Μπορεί να αναπτυχθεί και να αναπαραχθεί μέσα στα κύτταρα του ξενιστή και είναι ένας από τους πιο μολυσματικούς τροφιμογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς, με 20-30% των λοιμώξεων από λιστερίωση σε άτομα υψηλού κινδύνου να είναι θανατηφόρα (RamaswamyV 2007). Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά gram βακτήριο, μη σπορογόνο, προαιρετικά αναερόβιο, με κοκοειδές σχήμα ή σχήμα κοντής ράβδου βακτήριο. Κινητό στους 20-25°C, ακίνητο τους 37°C. Είναι ένα από τα έξι είδη του γένους *Listeria*. Στο γένος αυτό μόνο η *Listeria monocytogenes* και η *Listeria ivanovii* είναι παθογόνα. Η πλειονότητα των στελεχών *L. monocytogenes* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Είναι θετική στην αντίδραση της καταλάσης, αρνητική σε αυτήν της οξειδάση και εκφράζει μία βήτα αιμολυσίνη, η οποία καταστρέφει τα ερυθρά αιμοσφαίρια (Σπηλιώτης Β. 2010). Υπάρχουν 13 ορότυποι του μικροοργανισμού. Το 95% των μικροοργανισμών που απομονώνονται από τα θύματα της λιστερίωσης ανήκουν σε τρεις ορότυπους: 1/2a, 1/2b και 4b (WardTJ 2004). Τα κρούσματα λιστερίωσης σε ετήσια βάση αγγίζουν περίπου τις 2000 περιστατικά, δίνοντας στη *Listeria monocytogenes* την πρώτη θέση σε ποσοστά θνησιμότητας στην Ευρωπαϊκή Ένωση σε σύγκριση με άλλα παθογόνα βακτήρια. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η λιστερίωση ακολουθεί ανοδική τάση που ξεκίνησε το 2008, προκαλώντας 2.161 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις και 210 θανάτους το 2014, 16% περισσότερο από ότι το 2013 (The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014 2015).

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία επιβάλλει τα παρακάτω όρια για το μικροοργανισμό, σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθμ. 2073/2005.

**Πίνακας 1.6:** Νομοθετικά όρια ανίχνευσης της *L. monocytogenes*

Κατηγορία τροφίμων	Όριο	Αναλυτική μέθοδος αναφοράς	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 11290-1	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	100 cfu/g	EN/ISO 11290-2	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 11290-1	Πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης τροφίμων που το παρήγαγε
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	100 cfu/g	EN/ISO 11290-2	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

### Η *Listeria monocytogenes*

- Κατανέμεται ευρέως
- Είναι ανθεκτικός σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες
- Είναι μικροαερόβιος
- Είναι ψυχρότροφος
- Αναπτύσσεται μέσα σε ανθρώπινα φαγοκύτταρα

(Σπηλιώτης Β. 2010).

### Πηγές *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* βρίσκεται παντού στο περιβάλλον και μολύνει τους ανθρώπους με πολλούς τρόπους. Αναπτύσσεται και επιβιώνει όχι μόνο στο έδαφος, αλλά και το νερό. Λιμνάζοντα νερά αποτελούν σημαντικότερη πηγή προέλευσης του συγκεκριμένου βακτηρίου. Είδη της *Listeria* έχουν απομονωθεί και από φυτά τα οποία καλλιεργήθηκαν σε έδαφος όπου απορρίπτονταν λύματα υπονόμων. Η *Listeria monocytogenes* έχει ανιχνευθεί σε γρασίδι βοσκοτόπων και σε ζωοτροφές. Η

αποσύνθεση του φυτικού ιστού και των περιττωμάτων των ζώων ενδεχομένως να συμβάλλει στην παρουσία της στο έδαφος. Έχει παρατηρηθεί απομόνωση της *Listeria monocytogenes* ακόμη και από περιττώματα υγιών ζώων, καθώς η λοίμωξη από το βακτήριο αυτό δεν περιορίζεται μόνο στον άνθρωπο, με ποικιλία ζωικών ειδών να δύνανται να πάθουν λιστερίωση και οργανισμοί που έχουν νοσήσει από το βακτήριο, αλλά και άλλοι που είναι απλά φορείς του μικροοργανισμού χωρίς συμπτώματα νόσησης, να τον αποβάλλουν μέσω των κοπράνων τους (Σπηλιώτης Β. 2010).

Παραδείγματα τροφίμων τα οποία συνδέονται με την πρόκληση της λιστερίωσης είναι γαλακτοκομικά προϊόντα (ακατέργαστο γάλα, τυρί), προϊόντα κρέατος και πουλερικά (σπιτικό λουκάνικο, χοιρινό λουκάνικο, λουκάνικα γαλοπούλας, φέτες αλλαντικών, κοτομπουκιές, προμαγειρεμένο κοτόπουλο υπό ψύξη), ψάρι, καπνιστό ψάρι, αυγοτάραχο, hotdog, αλατισμένα μανιτάρια, έτοιμες σαλάτες, παγωτό, τριφύλλι.

Προσβολή από *Listeria monocytogenes* μπορεί να προκληθεί και από επιμόλυνση η οποία οφείλεται σε:

- κακή υγιεινή του προσωπικού
- δάπεδα
- τοίχους
- αποχετεύσεις
- επιμόλυνση στο στάδιο μετά τη θερμική επεξεργασία
- κακή υγιεινή των χώρων συμύκνωσης υδρατμών στα ψυγεία

Για το λόγω αυτό άλλωστε το σωστό πλύσιμο των χεριών από το προσωπικό των βιομηχανιών των τροφίμων αποτελεί και ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου στα συστήματα διασφάλισης ποιότητας των τροφίμων (Τσάκνης 2009).

## **Ευαισθησία σε Φυσικούς και Χημικούς Παράγοντες**

**Πίνακας 1.7:** Επίδραση φυσικών και χημικών παραγόντων στην ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*.

Φυσικοί και χημικοί παράγοντες	Ανάπτυξη της <i>Listeria monocytogenes</i>
Θερμοκρασία (°C)	Από 1 έως 44 °C Θανάτωση >50 °C
pH	4,0 – 9,6
Οργανικά οξέα (κιτρικό, οξικό, γαλακτικό)	Παρεμπόδιση της ανάπτυξης κατά 0,1% Άριστη σε $a_w \geq 0,97$
Ενεργότητα νερού ( $a_w$ )	Για τα περισσότερα στελέχη $a_w \geq 0,93$ Για ορισμένα στελέχη $a_w \geq 0,90$ Άριστη σε μέτριες συγκεντρώσεις 6,5%
Άλατα	Καλή υπό την παρουσία 10-12% NaCl Μέτρια σε υψηλότερες συγκεντρώσεις για μεγάλα χρονικά διαστήματα

**Πίνακας 1.8:** Αποτελέσματα σε διάφορες αντιδράσεις (για τη *L. monocytogenes*)

Αντίδραση	Αποτέλεσμα
καταλάσης	Θετικό
Αναγωγής νιτρικών	Αρνητικό
Παραγωγής υδροθείου	Αρνητικό
Διάσπασης της ουρίας	Αρνητικό
MR	Θετικό
Voges-Proskauer	Θετικό
Αποικοδόμησης δεξτρόζης	Θετικό
Αποικοδόμησης εσκουλίνης	Θετικό
Αποικοδόμησης μαλτόζης	Θετικό
Αποικοδόμησης μανιτόλης	Αρνητικό
Αποικοδόμησης ραμνόζης	Θετικό
Αποικοδόμησης ξυλόζης	Αρνητικό

(Δ. Τυμπής 2016)



**Πίνακας 1.9:**Επίδραση της θερμοκρασίας στο χρόνο διπλασιασμού της *Listeria monocytogenes*

Θερμοκρασία (°C)	ta(h)
4	43
10	6,6
37	1,1

### Μολυσματική δόση

Η μολυσματική δόση της *Listeria monocytogenes* εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, η μολυσματικότητα το μικροβίου και το είδος του τροφίμου. Για άτομα με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα ακόμα και 100 κύτταρα είναι αρκετά. Για τους υγιείς ανθρώπους ο αριθμός αυτός αυξάνεται σε 10.000.000 κύτταρα (Τσάκνης 2009).

### Έλεγχος

- Δυνατότητα ανάπτυξης σε συνθήκες ψύξης και σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι.
- Κατάλληλη θερμική επεξεργασία για τη θανάτωση του μικροοργανισμού.
- Το όξινο περιβάλλον παρόλο που επιτρέπει την επιβίωση, μειώνει τον ρυθμό ανάπτυξης.
- Εφαρμογή πρακτικών που επιτρέπουν την επιμόλυνση.
- Χαμηλή ενεργότητα ύδατος.

### Χαρακτηριστικά της ασθένειας

Η *Listeria monocytogenes* προκαλεί ασθένεια σε καλά προσδιορισμένες ομάδες υψηλού κινδύνου. Αυτές αποτελούν οι εγκυμονούσες, τα νεογνά, οι ανοσοκατεσταλμένοι ενήλικες και οι ηλικιωμένοι. Οι έγκυες γυναίκες και συγκεκριμένα στον τρίτο μήνα της κύησης, μπορεί απλά να παρουσιάσουν ελαφριά συμπτώματα γρίπης ως αποτέλεσμα της προσβολής από τον μικροοργανισμό. Παρόλα αυτά, η λοίμωξη έχει καταστροφικές συνέπειες για το έμβρυο, που οδηγούν σε αποβολή ή γέννηση νεκρού εμβρύου. Σε ενήλικες γυναίκες που δεν εγκυμονούν η *Listeria monocytogenes* προκαλεί σηψαιμία, μηνιγγίτιδα και μηνιγγοεγκεφαλίτιδα. Το ποσοστό θνησιμότητας είναι σχετικά υψηλό,

στο 20-25%. Έχουν παρατηρηθεί περιστασιακά περιπτώσεις λιστερίωσης και σε υγιείς ανθρώπους. Η *Listeria monocytogenes* μπορεί επίσης να προκαλέσει μία δεύτερη, διαφορετική ασθένεια, την εμπύρετη γαστρεντερίτιδα. Τα κρούσματα γαστρεντερίτιδας διαφέρουν από τα επιθετικά κρούσματα που περιγράφηκαν παραπάνω. Πλήττουν ανθρώπους που δεν έχουν παράγοντες προδιάθεσης στον κίνδυνο. Η μολυσματική δόση είναι υψηλότερη ( $1,9 \times 10^5$  μέχρι  $1 \times 10^9$  κύτταρα ανά ml τροφίμου) σε σχέση με εκείνης της επιθετικής λιστερίωσης. Τελικά, τα συμπτώματα εμφανίζονται μέσα σε μερικές ώρες (18 – 27 h) από τη έκθεση, σε αντίθεση με τις εβδομάδες που παρατηρούνται για την επιθετική λιστερίωση.

Αν και η έκθεση στην *Listeria monocytogenes* είναι συνηθισμένη, η λιστερίωση είναι σπάνια. Δεν είναι σαφές αν αυτό οφείλεται στην ανθρώπινη ανθεκτικότητα ή στο γεγονός ότι τα περισσότερα στελέχη είναι αδύναμα παθογόνα. Κάποια υγιή άτομα είναι περιττωματικοί φορείς του μικροοργανισμού χωρίς να έχουν συμπτώματα.

### *Escherichia coli*

Η *Escherichia coli* είναι εντεροβακτήριο, ανήκει δηλαδή στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Παρουσιάζει μέτρια ανάπτυξη απουσία οξυγόνου και καλή ανάπτυξη παρουσία του. Είναι αρνητικό κατά Gram και δεν παράγει σπόρια. Ταξινομείται στην άτυπη ομάδα των κολοβακτηριοειδών (ζυμώνει τη λακτόζη και παράγει οξύ και αέριο) και διακρίνεται περαιτέρω στην υποομάδα των κολοβακτηριοειδών εντερικής προέλευσης (fecal coliforms). Ενδημεί, δηλαδή, αποκλειστικά στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων. Καταστρέφεται με ήπια θερμική επεξεργασία, αφυδάτωση ή κατάψυξη και η παρουσία της στα τρόφιμα οφείλεται αποκλειστικά σε επιμόλυνση. Για τους παραπάνω λόγους, η *E. coli* είναι ο κύριος αντιπρόσωπος του «δείκτη επιμόλυνσης» στα τρόφιμα. Είναι ο πρώτος σε σειρά μικροοργανισμός που ανιχνεύεται στα κόπρανα. Ταυτοποιείται με μια σειρά δοκιμών: ινδόλης, ερυθρού του μεθυλενίου, Vogues Proskauer και νιτρικών (IMViC). Το αποτέλεσμα πρέπει να είναι είτε ++-- (*E. coli* τύπος I), είτε +--+ (*E. coli* τύπος II) (Δ. Τυμπής 2016). Τα στελέχη της *E. coli* διαφοροποιούνται ορολογικά βάση των αντιγόνων:

- Ο (σωματικά)

- Η (μαστιγίων)
- Κ (κάψας)

Τα διαρροϊκά στελέχη διαφοροποιούνται βάση των Ο αντιγόνων τους ως προς την ορολογική ομάδα και των Η αντιγόνων τους ως προς τον ορολογικό τύπο και κατηγοριοποιούνται σε:

- Εντεροπαθογόνα στελέχη (EPEC)
- Εντεροτοξιγόνα στελέχη (ETEC)
- Εντεροδιεισδυτικά στελέχη (EIEC)
- Εντεροπροσκολλητικά στελέχη (DAEC)
- Εντεροσυσσωρευτικά στελέχη (EAEC)
- Εντεροαιμοραγικά στελέχη (EHEC)

Τα εντεροαιμοραγικά στελέχη έγιναν γνωστά ως παθογόνα του ανθρώπου το 1982, όταν διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος *E. coli* O157:H7 προκάλεσε κρούσματα αιμορραγικής κολίτιδας. (Κοτζεκίδου 2009). Για την περίοδο 2005 έως 2010, ο μέσος ετήσιος αριθμός περιπτώσεων λοίμωξης από STEC που δεν ήταν O157 ήταν 117.712 (εύρος 50.624 – 239.716) με εκτιμώμενο κόστος 449\$ (εύρος 231 – 1.007\$) ανά ασθένεια (W.GuntherIV 2014).

### **Πηγές *E. coli***

Όπως αναφέρθηκε, η *E. Coli* προέρχεται από τον εντερικό σωλήνα και είναι δείκτης κοπρανώδους επιμόλυνσης στα τρόφιμα. Η παρουσία της είναι ανεπιθύμητη στα προϊόντα τα οποία καταναλώνονται νωπά ή δεν επιδέχονται επιπλέον θερμική επεξεργασία πριν από την κατανάλωσή τους. Ανίχνευση του μικροοργανισμού στα τρόφιμα σημαίνει μη τήρηση των συνθηκών και μέτρων υγιεινής και παρουσιάζεται σε πληθώρα προϊόντων-υποστρωμάτων, όπως για παράδειγμα σε:

- Νερό
- Αλιεύματα
- Κατεψυγμένα τρόφιμα
- Τυριά και γαλακτοκομικά
- Νωπά κρέατα και κρεατοσκευάσματα
- Τρόφιμα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία
- Ακόμη μετάδοση από επαφή με μολυσμένο άτομο

Ποσοστό 14% των τροφικών δηλητηριάσεων οφείλεται σε μετάδοση από άτομο σε άτομο και 9% σε το πόσιμο νερό.

Λόγω επιμόλυνσης των νωπών λαχανικών μπορεί να προκληθούν προβλήματα στις έτοιμες σαλάτες ακόμα και όταν αυτές συσκευαστούν σε ατμόσφαιρα 3% O<sub>2</sub> και 97% N<sub>2</sub> (Κοτζεκίδου 2009).

### **Ευαισθησία σε Φυσικούς και Χημικούς Παράγοντες**

Μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 7 έως 50°C, με βέλτιστη θερμοκρασία 37°C. Παρουσιάζει ανάπτυξη σε όξινα τρόφιμα με ελάχιστο pH 4,4 και σε τρόφιμα με ελάχιστη ενεργότητα νερού 0,95 [WHO]. Πιο συγκεκριμένα, 72°C για 0,27 λεπτά αρκούν για να καταστραφεί πληθυσμός 10<sup>4</sup> κυττάρων E. coli O157:H7 ανά ml γάλακτος ή 68,3°C για μερικά δευτερόλεπτα στη θερμική επεξεργασία που εφαρμόζεται στα αλλαντικά. Ακόμη δόση ακτινοβολίας 1,5 kGy καταστρέφει τον μικροοργανισμό στο νωπό κιμά. Στις ΗΠΑ επιτρέπεται η εφαρμογή ακτινοβολίας ιονισμού 4,5 kGy στο νωπό κιμά που διατηρείται σε θερμοκρασίες ψύξης και 7,5 kGy στον κατεψυγμένο κιμά.

### **Μολυσματική δόση**

Κατά τη μετάδοση του βακτηρίου από άνθρωπο σε άνθρωπο η λοιμογόνος δόση είναι <100 κύτταρα. Στα ευαίσθητα άτομα 10 μόνο κύτταρα είναι ικανά να προκαλέσουν λοίμωξη.

### **Έλεγχος**

Τα κυριότερα μέτρα για την πρόληψη της τροφικής δηλητηρίασης από E. coli είναι:

- Επαρκής θερμική επεξεργασία
- Ψύξη των τροφίμων αμέσως μετά τη θερμική επεξεργασία
- Χλωρίωση του νερού
- Εφαρμογή των κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής σε όλη την παραγωγική διαδικασία των τροφίμων

### **Χαρακτηριστικά της ασθένειας**

Τα κύρια συμπτώματα είναι διάρροια, αιμοραγική κολίτιδα και το αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο (Hemolytic Uremic Syndrome), το οποίο εμφανίζεται ως αιμολυτική αναιμία, χαμηλός αριθμός αιμοπεταλίων, μείωση του όγκου των ούρων, οίδημα και νεφρική

ανεπάρκεια. 6% των ενηλίκων παρουσιάζει HUS και από αυτούς οι μισοί εμφανίζουν νεφρική ανεπάρκεια, 15% χρόνια ηπατική ανεπάρκεια και το ποσοστό θνησιμότητας είναι 1%. Παιδιά ηλικίας 2-10 ετών εμφανίζουν συνηθέστερα HUS (σε ποσοστό 15%). Έχουν παρατηρηθεί επίσης και περιπτώσεις πυρετού και εμετού. Η τροφική δηλητηρίαση από *E. coli* O157H7 προσβάλλει κυρίως τα παιδιά και τους ηλικιωμένους. Τα συμπτώματα εμφανίζονται μετά από τρεις με τέσσερις ημέρες και γίνονται αισθητά προκαλώντας κοιλιακό άλγος με κράμπες. Η διάρροια γίνεται αιματηρή σε περίπου 90% των περιπτώσεων. Οι περισσότεροι ασθενείς αναρρώνουν μέσα σε δέκα ημέρες, αλλά σε ένα μικρό ποσοστό (ιδιαίτερα σε μικρά παιδιά και ηλικιωμένους), η λοίμωξη μπορεί να τους προκαλέσει το αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο. Το HUS είναι η πιο κοινή αιτία οξείας νεφρικής ανεπάρκειας σε μικρά παιδιά. Μπορεί να προκληθούν νευρολογικές επιπλοκές (όπως επιληπτικές κρίσεις, εγκεφαλικό επεισόδιο και κώμα) στο 25% των ασθενών με HUS και χρόνια νεφρικά επακόλουθα, συνήθως ήπια, σε περίπου 50% των επιζώντων (Κοτζεκίδου 2009), (W.GuntherIV 2014).

## Κεφάλαιο 2: Βιβλιογραφική ανασκόπηση

### Κλασσικές μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών στα τρόφιμα

Με τον όρο κλασσικές μέθοδοι, αναφερόμαστε στις μεθόδους καλλιέργειας των μικροοργανισμών σε διάφορα υποστρώματα με σκοπό την ανίχνευση και την ταυτοποίηση τους. Τέτοιες μέθοδοι ξεκίνησαν να εφαρμόζονται πολλά χρόνια πριν και εξακολουθούν να εφαρμόζονται ακόμη και σήμερα. Στην Ευρώπη η χρήση των κλασσικών μεθόδων ξεπερνά το ποσοστό του 60% του συνόλου των ελέγχων για τους παθογόνους μικροοργανισμούς (Rohde 2017).

Αυτές οι μέθοδοι:

- Είναι απλές
- Έχουν χαμηλό κόστος
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αρίθμηση των βακτηρίων του δείγματος
- Δίνουν την δυνατότητα διάκρισης μεταξύ ζωντανών και νεκρών μικροοργανισμών

Όμως έχουν και μειονεκτήματα ύψιστης σημασίας:

- Μη επαρκή καταστολή της ανταγωνιστικής χλωρίδας
- Μεγάλο χρόνο διάρκειας των διαδικασιών της επώασης και του εμπλουτισμού
- Δυσκολία στη διάκριση της μορφολογίας και της εμφάνισης των αποικιών του βακτηρίου στόχου από τις αποικίες των υπόλοιπων βακτηρίων
- Μεγάλο φόρτο εργασίας

Οι μέθοδοι καλλιέργειας για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών περιλαμβάνουν εμπλουτισμό, απομόνωση, βιοχημική ταυτοποίηση, επιβεβαίωση του ορότυπου και έλεγχο για τοξίνες, και μπορεί να διαρκέσουν από 3 έως 10 ημέρες (KimJH 2020). Η έλλειψη αυτοματοποίησης των τεχνικών αυτών αποτελεί ένα σημαντικότατο μειονέκτημα και έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ημιαυτόματων μεθόδων, με σκοπό την αύξηση των δειγμάτων που αναλύονται ταυτόχρονα και την ευκολότερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Rohde 2017).

Η ύπαρξη ανταγωνισμού μεταξύ των ειδών των μικροοργανισμών σε ένα δείγμα δύναται να επηρεάσει την εξέλιξη της καλλιέργειας του μικροοργανισμού-στόχου, ή και

να διαστρεβλώσει τα τελικά αποτελέσματα της διαδικασίας. Ακόμη η συγγενική σχέση που μπορεί να έχουν κάποιες ομάδες μικροοργανισμών, ενδεχομένως να παρουσιάσει λανθασμένα θετικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα σε τρόφιμα με υψηλό μικροβιακό φορτίο, χαμηλά επίπεδα *Salmonella* είναι πολύ πιθανό να μην καταφέρουν να αναπτυχθούν λόγω αυτού του μεγάλου ανταγωνισμού. Αναπτυσσόμενοι μέθοδοι συνδυάζουν ένα βήμα εμπλουτισμού σε ειδικό υπόστρωμα σε συνδυασμό με υψηλή θερμοκρασία το οποίο ακολουθείται από απομόνωση σε ένα χρωμογόνο Άγαρ. Η εκλεκτικότητα των υποστρωμάτων αυτών καταστέλλει την ανάπτυξη ανταγωνιστικών μικροοργανισμών, ενώ μπορεί ταυτόχρονα να χρωματίσει τις αποικίες του μικροοργανισμού-στόχου. Χρωμογόνα Άγαρ όπως είναι τα RAPIDagars (Bio-Rad) και το ChromID (bioMerieux) χρωματίζουν τις αποικίες και τις κάνουν να διακρίνονται ευκολότερα. Το χρωμογόνο άγαρ είναι εξαιρετικά χρήσιμο σε είδη μικροοργανισμών όπως η *Escherichia coli* η οποία έχει πολλούς ορότυπους με υψηλή παθογένεια αλλά και ορότυπους που δεν προκαλούν ασθένεια (Rohde 2017).

### **Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών στα τρόφιμα**

Οι μοριακές μέθοδοι στηρίζονται στην ανίχνευση συγκεκριμένου τμήματος του DNA των μικροοργανισμών, το οποίο είναι μοναδικό και έτσι η ανίχνευσή του συνεπάγεται την ύπαρξη του μικροοργανισμού στο δείγμα που αναλύθηκε. Η ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) συνέβαλλε στην ταχεία εξέλιξη και ανάπτυξη των τεχνικών αυτού του είδους. Οι μοριακές μέθοδοι στην Βόρεια Αμερική και αποτελούν το 30% από τις συνολικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Το αντίστοιχο ποσοστό στην Ευρώπη είναι κάτω από 10% (Rohde 2017). Οι μοριακές τεχνικές μπορούν να διακριθούν σε τεχνικές μη ισόθερμης ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος, για παράδειγμα

- PCR
- Multiplex PCR
- Nested PCR

Και τεχνικές ισόθερμης ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος, για παράδειγμα

- LAMP (loop-mediated isothermal amplification)
- SDA (Strand displacement amplification)
- MDA (multiple displacement amplification)
- RCA (rolling circle amplification)
- HDA (helicase displacement amplification)

Προτού εφαρμοστεί η PCR, είναι απαραίτητο το DNA να διαχωριστεί από τα υπόλοιπα μακρομόρια (πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες) και να απομονωθεί (εκχύλιση DNA) (Μπατρίνου 2011).

### **Απομόνωση DNA**

Στις περισσότερες μεθόδους απομόνωσης, είναι απαραίτητο να γίνει διαχωρισμός του DNA από τα υπόλοιπα συστατικά του κυττάρου. Αρχικά τα κύτταρα λύνονται με τη χρήση διαλυτών, ανάλογα με τη φύση του κυττάρου. Έπειτα προκειμένου να γίνει αποδιάταξη των πρωτεϊνών που υπάρχουν στο μίγμα, προστίθενται χημικά όπως η φαινόλη. Για τη διαλυτοποίηση των λιπιδίων, χρησιμοποιείται χλωροφόρμιο. Αφού το μίγμα υποστεί φυγοκέντριση, σχηματίζονται τρεις διακριτές φάσεις. Μία φαινολική, μία υδατική και μία χλωροφορμική. Η υδατική φάση, στην οποία περιέχεται το DNA, συλλέγεται και προστίθεται ψυχρή αιθανόλη, με σκοπό να καθιζάνει το DNA και το RNA. Το μίγμα ξαναφυγοκεντρείται και συλλέγεται το ίζημα. Το ίζημα αραιώνεται σε νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα και μπορεί επιπλέον να επεξεργαστεί με ειδικά ένζυμα, τις RNAσες, οι οποίες αποικοδομούν το DNA (Μπατρίνου 2011). Αναλυτικότερα τα στάδια της απομόνωσης παρουσιάζονται παρακάτω:

#### **Πρώτο στάδιο απομόνωσης**

Λύονται οι κυτταρικές και πυρηνικές μεμβράνες με τη χρήση διαλυμάτων που περιέχουν απορρυπαντικά όπως το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), ώστε να απελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα. Το απορρυπαντικό αυτό διασπά τα φωσφολιπίδια και δημιουργεί σύμπλοκα με μεμβρανικές πρωτεΐνες κάνοντάς τις υδατοδιαλυτές. Επίσης δεσμεύει τις μη μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες χάνουν τη τριτοταγή δομή τους και συνεπώς τη λειτουργικότητά τους.

#### **Δεύτερο στάδιο απομόνωσης**



Οι κυτταρικές πρωτεΐνες αποικοδομούνται με τη χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων, με συχνότερο την πρωτεΐνάση K. Η πρωτεΐνάση K απενεργοποιεί τις ενδογενείς νουκλεάσες του κυττάρου που μπορεί να κατακερματίσουν το DNA κατά το στάδιο της εκχύλισης. Το ένζυμο αυτό έχει το πλεονέκτημα να παραμένει δραστικό ακόμα και με τη παρουσία του SDS και χηλικών παραγόντων.

### **Τρίτο στάδιο απομόνωσης**

Γίνεται διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες με άλατα υψηλής ιοντικής ισχύος και απόλυτης αιθανόλης (100%). Οι υψηλές συγκεντρώσεις των αλάτων διασπών τους δεσμούς του DNA με τα μόρια του νερού. Η απόλυτη αιθανόλη αλλάζει τη δομή του DNA, το οποίο κατακρημνίζεται και μετά από φυγοκέντριση βρίσκεται ως ίζημα στον πυθμένα.

### **Τέταρτο στάδιο απομόνωσης**

Γίνεται καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων με διάλυμα παγωμένης αιθανόλης 70%.

### **Πέμπτο στάδιο απομόνωσης**

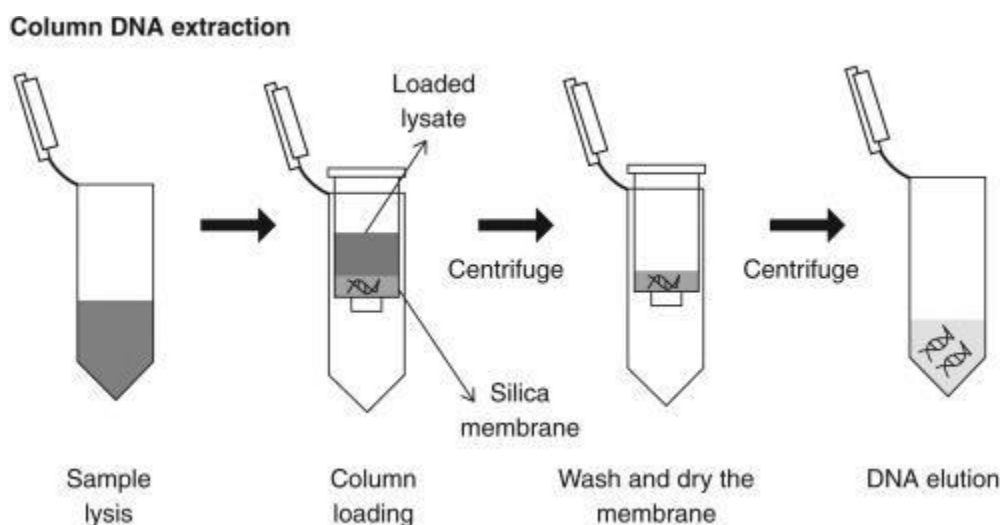
Το διάλυμα Tris- EDTA είναι ένα ρυθμιστικό αλκαλικό διάλυμα που περιέχει EDTA. Το EDTA προστατεύει το DNA, δεσμεύοντας δισθενή ιόντα που είναι χρήσιμα για τη δράση νουκλεασών (που διασπών το DNA) και πρωτεασών.

### **Απομόνωση DNA με εμπορικά διαθέσιμα συστήματα αντιδραστηρίων (kit)**

Τα kit αυτά έχουν απλοποιήσει την απομόνωση γενετικού υλικού και η χρήση τους γίνεται ολοένα και πιο συχνή. Υπάρχουν διαφορετικά kit ανάλογα με τη πηγή από την οποία απομονώνεται το DNA (βιολογικά υγρά, επίχρισμα μυελού των οστών, κύτταρα από καλλιέργειες, τρίχες, φυτά, βακτήρια). Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των συστημάτων αυτών για απομόνωση DNA είναι:

- Αναλυτικές οδηγίες εκτέλεσης του πειράματος κι επομένως ευκολία χειρισμού
- Ταυτόχρονος χειρισμός δειγμάτων και συνεπώς αυξημένη ταχύτητα
- Αποφυγή χρήσης επικίνδυνων χημικών
- Υψηλή ποιότητα απομονωμένου DNA

- Επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων



**Εικόνα 2.1:** Σχεδιάγραμμα της πειραματικής πορείας απομόνωσης του DNA.

## Polymerase Chain Reaction (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) επινοήθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1980 από τον Kary Mullis και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως ως ένα εύχρηστο και αξιόπιστο εργαλείο το 1988. Έφερε επανάσταση στο χώρο της μοριακής γενετικής και χάρισε στον Mullis το βραβείο νόμπελ χημείας το 1993 (Μπατρίνου 2011), (James D. Watson 2007). Είναι μια γρήγορη, ακριβής, ευαίσθητη και αποτελεσματική τεχνική επαναλαμβανόμενης αντιγραφής μιας επιλεγμένης περιοχής ενός μορίου DNA, και παρομοιάζεται με την κλωνοποίηση του DNA, με τη διαφορά ότι η PCR λαμβάνει χώρα στο δοκιμαστικό σωλήνα (*in vitro*) και όχι σε ζωντανά κύτταρα. Η αντιγραφή δεν εκτελείται από κυτταρικά ένζυμα, αλλά από την ανθεκτική DNA πολυμεράση του βακτηρίου *Thermus aquaticus*, το οποίο ζει στο νερό σε θερμοκρασία 75 °C. Η Taq πολυμεράση είναι ανθεκτική ακόμη και στους 94 °C και έτσι παραμένει ενεργή σε όλη τη διάρκεια των κύκλων του πολλαπλασιασμού. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι η PCR έχει εφαρμοστεί ακόμη και σε DNA απομονωμένο από δείγματα βιοψίας εγκλεισμένα σε παραφίνη για πάνω από 40 χρόνια αλλά και σε DNA απομονωμένο από το δόντι ενός παιδιού Νεάντερταλ ηλικίας 10 με 11 ετών που έζησε πριν από 100.000 χρόνια (James D. Watson 2007), (Brown 2010). Η PCR είναι ικανή να αναπαράγει σε μεγάλες ποσότητες και γρήγορα μία συγκεκριμένη αλληλουχία DNA που βρίσκεται

μέσα σε ένα πολύπλοκο μίγμα. Ο όγκος του δείγματος μπορεί να είναι πολύ μικρός, καθώς χάρη στην ευαισθησία της μεθόδου, ένα και μόνο μόριο DNA αρκεί.

**Για την αντίδραση της PCR είναι απαραίτητα:**

- Το DNA στόχος: Προέρχεται από ποικιλία δειγμάτων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε μη καθαρό δείγμα, αρκεί η αλληλουχία στόχος να είναι ακέραια, για να γίνει η αντιγραφή στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης.
- Εκκινητές: Ολιγονουκλεοτίδια 18-30 βάσεων. Επιλέγεται το τμήμα DNA που έχει μεγεθυνθεί.
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια: Ως υποστρώματα της αντίδρασης. Πρέπει να βρίσκονται σε ίσες ποσότητες στο μείγμα, για να μην υπάρχουν σφάλματα κατά την αντιγραφή.
- Taq πολυμεράση: Απαραίτητη για τη σύνθεση νέου κλώνου DNA.
- $MgCl_2$  και ρυθμιστικό διάλυμα συγκεκριμένου pH για τη δράση του ενζύμου. Σε υψηλές συγκεντρώσεις προϊόντων μαγνησίου προκύπτουν προϊόντα μη ειδικά, επειδή τα ιόντα σταθεροποιούν το δίκλωνο DNA με αποτέλεσμα οι εκκινητές να προσκολλώνται τυχαία σε άλλα τμήματα DNA. Αντίθετα, η χαμηλή συγκέντρωση μειώνει την απόδοση της PCR, διότι τα ιόντα ως συνένζυμα της πολυμεράσης είναι απαραίτητα για τη λειτουργία της.

Μετά από  $n$  κύκλους το μείγμα της αντίδρασης περιέχει θεωρητικά έως  $2^n$  δίκλιωνα μόρια DNA, τα οποία φέρουν αντίγραφα της αλληλουχίας που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές. Επομένως 30 κύκλοι πολλαπλασιάζουν μία αλληλουχία πάνω από 1 δισεκατομμύριο φορές (James D. Watson 2007), (Μπατρίνου 2011). Πρακτικά η απόδοση της αντίδρασης ανέρχεται στο 10-30% της θεωρητικά μέγιστης. Η απόδοση εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η DNA πολυμεράση συχνά δυσκολεύεται να αντιγράψει αλληλουχίες μεγάλου μήκους ή υψηλής περιεκτικότητας σε GC (James D. Watson 2007).

Η αντίδραση ξεκινά με θέρμανση του μείγματος στους 94 °C. Διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τα δύο πολυνουκλεοτίδια της διπλής έλικας – αποδιάταξη του DNA στόχου σε μονόκλιωνα μόρια. Μετά η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60 °C, με αποτέλεσμα τη μερική επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων του DNA στόχου,

καθώς επίσης και πρόσδεση των εκκινητών στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες. Αύξηση της θερμοκρασίας στους 72 °C (βέλτιστη θερμοκρασία για την Taq πολυμεράση) – σύνθεση του DNA. Το σύνολο των μακριών προϊόντων είναι πολυνουκλεοτίδια που έχουν ταυτόσημα 5' άκρα, αλλά τυχαία 3' άκρα, αφού η σύνθεση του DNA τερματίζει κατά τύχη. Όταν επαναληφθεί ο κύκλος της αποδιάταξης-αναδιάταξης-σύνθεσης, τα μακριά προϊόντα δρουν ως εκμαγεία για τη σύνθεση νέου DNA, αποδίδοντας βραχέα προϊόντα, των οποίων τα 5' και 3' άκρα ορίζονται από τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών. Στους επόμενους κύκλους, ο αριθμός των βραχέων προϊόντων αυξάνει με εκθετικό τρόπο έως ότου εξαντληθεί κάποιο από τα συστατικά της αντίδρασης. Αυτό σημαίνει ότι μετά από 30 κύκλους, από κάθε εναρκτήριο μόριο θα έχουν παραχθεί πάνω από 250 εκατομμύρια βραχέα προϊόντα. Αυτό ισοδυναμεί με αρκετά μικρογραμμάρια προϊόντος PCR από μερικά νανογραμμάρια ή ακόμη μικρότερη ποσότητα DNA στόχου (Brown 2010). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε ένα μηχάνημα που ονομάζεται θερμοκυκλοποιητής (thermocycler). Τα βασικά στάδια της PCR παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2.10: Βασικά στάδια της PCR (Μπατρίνου 2011)**

<b>1</b>	Γονιδιακό DNA τεμαχίζεται σε τμήματα με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων
<b>2</b>	Τα τμήματα DNA υποβάλλονται σε υψηλή θερμοκρασία (92 °C) για να επιτευχθεί αποδιάταξη (denaturation) των δίκλωνων μορίων σε μονόκλινα λόγω της λύσης των υδρογονικών δεσμών μεταξύ των κλώνων. Έτσι, η δίκλινη αλληλουχία η οποία έχει επιλεγεί για πολλαπλασιασμό διαχωρίζεται στους δύο κλώνους της. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι η αλληλουχία αυτή πρέπει να είναι γνωστής νουκλεοτιδικής σύνθεσης στο σύνολό της ή τουλάχιστον να είναι γνωστά τα τελευταία περίπου 20 νουκλεοτίδια του κάθε 3' άκρου της.
<b>3</b>	Κατασκευάζονται δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (από περίπου 20 νουκλεοτίδια το καθένα) που είναι συμπληρωματικά των 3' άκρων των δύο κλώνων της υπογήφιας για πολλαπλασιασμό αλληλουχίας DNA που θα χρησιμεύσουν ως εκκινητές (primers) για την έναρξη μίας φυσιολογικής DNA αντιγραφής με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση. Το ένα ολιγονουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό του 3' άκρου του ενός κλώνου και το άλλο ολιγονουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό του 3' άκρου του άλλου κλώνου DNA που έχουν προέλθει από την αποδιάταξη της δίκλωνης αλληλουχίας.
<b>4</b>	Η αρχική θερμοκρασία χαμηλώνει στους 50-60 °C και τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια προστίθενται στο μείγμα σε πολύ μεγάλες ποσότητες για να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες που βρίσκονται στο μείγμα, δηλαδή με τα 3' άκρα των δύο κλώνων που έχουν προέλθει από την αποδιάταξη της επιλεγμένης δίκλωνης αλληλουχίας που υπήρχε στο αρχικό μείγμα.
<b>5</b>	Αφού υβριδοποιηθούν τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια με τα 3' άκρα κάθε

	συμπληρωματικής μονόκλωνης αλληλουχίας, δημιουργούνται δύο μόρια που το καθένα έχει ένα δίκλωνο άκρο από 20 περίπου ζεύγη νουκλεοτιδίων και μία μονόκλωνη «ουρά» μήκους ανάλογου με το μέγεθος της αρχικής αλληλουχίας
6	Στο μείγμα προστίθενται δεοξυνουκλεοτίδια και μία ειδική θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που ονομάζεται Taq πολυμεράση (προέρχεται από το βακτήριο <i>Thermus aquaticus</i> που ζει σε θερμές πηγές). Η Taq πολυμεράση λειτουργεί στις υψηλές θερμοκρασίες που διεξάγεται η PCR
7	Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται πλέον σαν εκκινητές (primers) δηλαδή σημεία έναρξης για τη σύνθεση συμπληρωματικής DNA αλυσίδας και για τις υπόλοιπες αλληλουχίες της ουράς, προκειμένου να δημιουργηθεί ξανά μία δίκλωνη αλληλουχία για ολόκληρο το μόριο της αλληλουχίας που είναι πλέον πιστό αντίγραφο της αρχικής πριν αυτή αποδιαταχτεί.

### Αποτελέσματα, έλεγχος και μειονεκτήματα της PCR

Η ποιότητα του αποτελέσματος της PCR είναι ανάλογη της αρχικής συγκέντρωσης του DNA και αντιστρόφως ανάλογη του ποσοστού κατακερματισμού του (fragmentation). Πρόβλημα κατακερματισμένου DNA παρουσιάζουν τρόφιμα που έχουν υποστεί υψηλή επεξεργασία. Το προϊόν που προκύπτει ονομάζεται amplicon από το amplification που σημαίνει πολλαπλασιασμός. Ελέγχεται για το αν περιέχει σε μεγάλες ποσότητες τα τμήματα DNA με το αναμενόμενο μήκος. Αυτό γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5-2% με βρωμιούχοαιθίδιο. Το βρωμιούχοαιθίδιο είναι μια χρωστική που δεσμεύεται στο DNA και εμφανίζεται κάτω από υπεριώδες φως (Μπατρίνου 2011).

Ρύθμιση παραμέτρων για τη βελτιστοποίηση της PCR:

- Θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο
- Συγκεντρώσεις των αλάτων
- Χρονική διάρκεια κάθε επιμέρους βήματος.
- Επιλογή κατάλληλων εκκινητών

Εκκινητές μήκους 18-24 νουκλεοτιδίων παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση, εφόσον η υβριδοποίηση πραγματοποιείται κοντά στη θερμοκρασία τήξης τους, θερμοκρασία στην οποία τα μισά μόρια του εκκινητή υβριδοποιούνται με την αλληλουχία στόχο και τα άλλα μισά παραμένουν ελεύθερα ( $T_m$ ). Σε υψηλότερες θερμοκρασίες το ποσοστό αυτό μειώνεται, ενώ σε χαμηλότερες ο εκκινητής υβριδοποιείται σε τυχαίες θέσεις και προκύπτουν παραπροϊόντα. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι αν αυξηθεί το μήκος των εκκινητών, αυξάνεται και η  $T_m$  τους (James D. Watson 2007).

Η αυξημένη ευαισθησία της PCR μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα, σε περίπτωση ακόμη και παραμικρής επιμόλυνσης. Μία βασική διαδικασία ελέγχου είναι η εκτέλεση μιας PCR χωρίς DNA μήτρα, για να διαπιστωθεί η τυχόν μόλυνση των αντιδραστηρίων («αρνητικό κοντρόλ»). Λανθασμένα αποτελέσματα δεν προκύπτουν μόνο από επιμόλυνση. Η αντιγραφή του DNA δεν είναι τέλεια. Η συχνότητα σφάλματος της DNA πολυμεράσης στο κύτταρο είναι 1 κάθε  $10^9$  νουκλεοτίδια. Αντίθετα *in vitro*, όπου η Taq πολυμεράση δεν έχει την ικανότητα διορθωτικού ελέγχου, αυτή εισάγει ένα λάθος νουκλεοτίδιο κάθε περίπου  $2 \times 10^4$  (James D. Watson 2007). Ακόμη έλεγχος με «θετικά κοντρόλ» για:

- Επαρκή ποσότητα DNA
- Σωστές παράμετροι PCR
- Ύπαρξη κατασταλτικού παράγοντα

Τέλος είναι πιθανό να μην πολλαπλασιαστεί επαρκώς το DNA αν αυτό έχει καταστραφεί αρκετά. Τότε στο αποτέλεσμα της πρώτης PCR εφαρμόζεται μία δεύτερη PCR με άλλους συμπληρωματικούς εκκινητές, ειδικούς για την αλληλουχία DNA που είναι υπό πολλαπλασιασμό (Μπατρίνου 2011).

### **Παραλλαγές της PCR**

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Realtime PCR) μετρά με ακρίβεια την ποσότητα μιας Αλληλουχίας DNA στόχου με τη χρήση μιας ένωσης (π.χ. χρωστική SYBR-green) που φθορίζει μόνο όταν δεσμευθεί από δίκλωνο DNA. Κατά την εξέλιξη της διαδικασίας αυξάνεται η ποσότητα του μορίου στόχο συνεπώς και ο φθορισμός. Αυτή η παραλλαγή της μεθόδου δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της PCR σε πραγματικό χρόνο, απ' όπου πήρε και το όνομά της. Σχεδιάζεται μία πρότυπη καμπύλη της ποσότητας του φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους της PCR με δείγματα γνωστής αρχικής συγκέντρωσης DNA και ορίζεται ένα όριο φωσφορισμού. Ο αριθμός των κύκλων που χρειάζεται ένα δείγμα για να περάσει το όριο φθορισμού ορίζεται ως κατώφλι (Ct). Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αλληλουχίας DNA στόχου στο δείγμα, τόσο μικρότερο είναι το Ct. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε 20 λεπτά με 2 ώρες (Μπατρίνου 2011). Η παραλλαγή αυτή παρουσιάζει:

- Υψηλή ταχύτητα εκτέλεσης της PCR.

- Παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο.
- Άμεσος χαρακτηρισμός προϊόντων με την ανάλυση του σημείου τήξης τους.
- Ταχεία και ακριβής ποσοτικοποίηση.
- Ελαχιστοποίηση κινδύνων επιμόλυνσης

Η multiplex PCR (mPCR) έχει την δυνατότητα να στοχεύει περισσότερες από μία ακολουθίες, καθώς χρησιμοποιεί επιπλέον ζευγάρια εκκινητών στην αντίδραση. Η mPCR έχει μειωμένο κόστος και προσφέρει ταχεία και αποτελεσματική ανίχνευση πολλαπλών στόχων. Έχει ευρεία χρήση και βρίσκει εφαρμογή στην ανίχνευση μικροοργανισμών, στην έκφραση γονιδίων, στην αλληλουχία γονιδιώματος, στην εγκληματολογία καθώς και την διάγνωση ασθενειών. Ωστόσο θα πρέπει να προσαρμόζεται συνεχώς η αναλογία των εκκινητών για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της άνισης ενίσχυσης των στόχων (Xu 2016). Εκτός από την εξοικονόμηση χρόνου η συγκεκριμένη παραλλαγή μειώνει το κόστος της ανάλυσης έως και 60% σε σύγκριση με την κλασσική PCR (Aziz 2021).

Ένας τύπος ολιγονουκλεοτιδίου που φέρει μία φθορίζουσα ομάδα στο ένα άκρο και μία ομάδα απορρόφησης φθορισμού στο άλλο (ιχνηθέτης) ονομάζεται μοριακός φάρος (molecular beacon) είναι σχεδιασμένος να υβριδοποιείται σε εσωτερική αλληλουχία του μορίου στόχου. Σχηματίζει μία δομή στελέχους-βρόχου (stem-loop structure) κι φέρνει κοντά τις δύο ομάδες. Κάτω από UV η εκπομπή φθορισμού από τη μία ομάδα απορροφάται από την άλλη με μία διαδικασία που ονομάζεται FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer – μεταφορά ενέργειας μέσω αντανάκλασης φθορισμού) και δεν εκπέμπεται φως. Όταν όμως ο ιχνηθέτης θερμανθεί και υβριδοποιηθεί με την πολλαπλασιαζόμενη αλληλουχία DNA, η διαμόρφωσή του αλλάζει και η φθορίζουσα ομάδα απομακρύνεται από την ομάδα απορρόφησης, οπότε εκπέμπει φως όταν ακτινοβολείται. Η τεχνολογία αυτή σε συνδυασμό με τη Multiplex PCR, μπορεί να ανιχνεύσει δέκα μόλις μόρια ιού παρουσία 100.000 μορίων ενός άλλου ιού (James D. Watson 2007).

Η εμφωλιάζουσα (nested - nPCR) αποτελείται από δύο διαδοχικές PCR με την δεύτερη να χρησιμοποιεί τα προϊόντα της πρώτης σαν εκμαγείο για την αντίδραση. Με αυτό τον τρόπο η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης του DNA βελτιώνεται πολύ. Ενώ σύγχρονα εργαστήρια χρησιμοποιούν την Real-time PCR για την ανίχνευση βακτηρίων λόγω της

ευαισθησίας της μεθόδου, άλλα εργαστήρια ιδιαιτέρως αυτά με περιορισμένους πόρους χρησιμοποιούν την nested-PCR. Κατά την μέθοδο η πρώτη PCR χρησιμοποιεί ένα ζευγάρι εξωτερικών εκκινητών, ενώ στη συνέχεια η δεύτερη PCR χρησιμοποιεί ένα ζευγάρι εσωτερικών εκκινητών. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιείται ένα ζευγάρι εκκινητών όπως στη συμβατική PCR, ενώ στη δεύτερη χρησιμοποιούνται εκκινητές που ενώνονται σε τμήμα της αλληλουχίας της πρώτης PCR. Η nPCR μπορεί να είναι 1000 φορές πιο ευαίσθητη από την απλή PCR λόγω της αποτελεσματικότερης αποδιάταξης των μικρών τμημάτων DNA που προστίθενται στη δεύτερη PCR ως προϊόν της πρώτης. Συνήθως η πρώτη PCR εφαρμόζεται για να ενισχύσει την πολύ μικρή ποσότητα DNA που διατίθεται. Όσον αφορά την ακρίβεια της μεθόδου η nPCR μειώνει πολύ την πιθανότητα να παραχθούν και να ενισχυθούν μη επιθυμητά προϊόντα. Αυτό συμβαίνει επειδή τα προϊόντα που παράγονται κατά την αρχική PCR δεν πολλαπλασιάζονται στην δεύτερη, διότι δεν περιέχουν την ακολουθία στην οποία θα συνδεθούν οι εσωτερικοί εκκινητές (D. Shatleh-Rantisi 2020).

Η PCR αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, RT-PCR) εφαρμόζεται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του mRNA. Αρχικά απομονώνεται το RNA από το δείγμα. Έπειτα το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση αντιγράφει το mRNA του δείγματος σε συμπληρωματικό DNA το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε δίκλωνο με τη χρήση της πολυμεράσης. Τέλος, πραγματοποιείται έλεγχος και ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση συμβατικής ή Real-Time PCR.

### **Εφαρμογές της PCR**

Για την εφαρμογή της PCR θα πρέπει η αλληλουχία του DNA στην οποία στοχεύουμε να είναι γνωστή, προκειμένου να επιλέξουμε τους συμπληρωματικούς εκκινητές. Περιοχές DNA με μήκος μέχρι 5kb πολλαπλασιάζονται με ευκολία. Για κλάσματα DNA έως 40 kb θα πρέπει να εφαρμοστεί η τεχνική με ορισμένες τροποποιήσεις (Brown 2010). Η PCR εφαρμόζεται στον τομέα των τροφίμων για την ανίχνευση:

- παθογόνων μικροοργανισμών
- γενετικά τροποποιημένων οργανισμών
- «ωφέλιμων» μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε μικροβιακές ζυμώσεις
- Νοθείας σε μοριακό επίπεδο

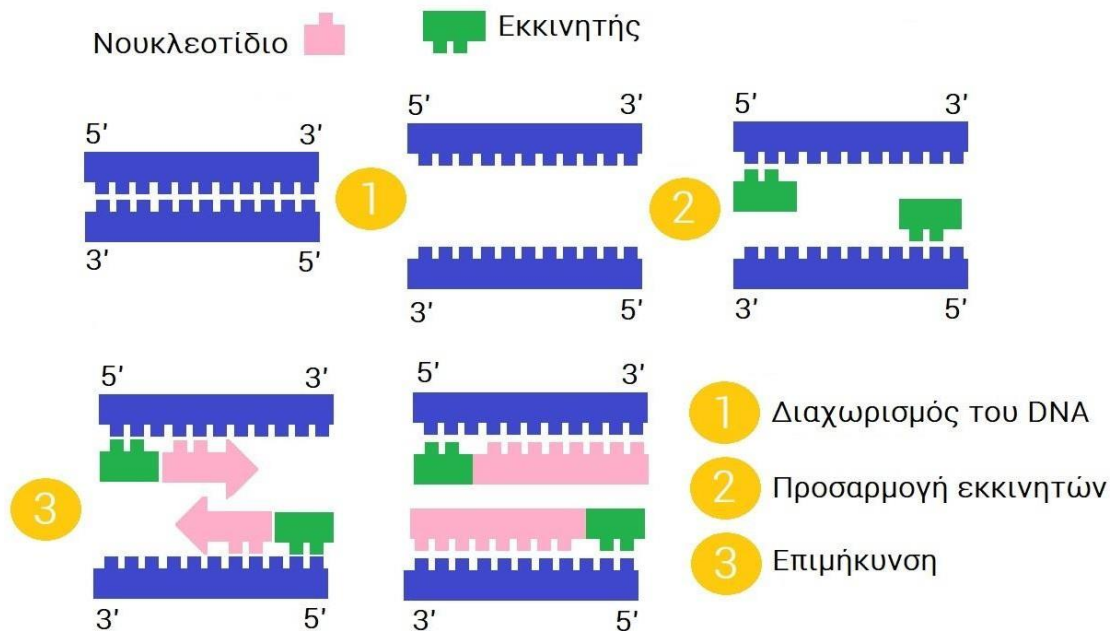


Τα τεστ DNA βασίζονται στην αρχή ότι κάθε οργανισμός διαθέτει μοναδικές αλληλουχίες DNA οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για το είδος του, ακόμα και για το στέλεχος, όταν γίνεται λόγος για μικροοργανισμούς (Μπατρίνου 2011).

Η PCR ακόμη χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με γενετικά νοσήματα, όπως η θαλασσαιμία και η κυστική ίνωση. Εφαρμόζεται στους τομείς της ιατροδικαστικής – εγκληματολογίας και αρχαιολογίας. Στην κλινική διαγνωστική ανιχνεύει την παρουσία ιικού DNA αρκετά πριν ο ιός εκδηλώσει νοσήματα. Αυτό είναι πολύ σημαντικό για την έγκαιρη διάγνωση των κακοήθων όγκων που επάγονται από ιούς, μιας που προσφέρει τη δυνατότητα έγκαιρης θεραπευτικής παρέμβασης πριν από την κλινική εκδήλωση του καρκίνου (Brown 2010).

Μερικά ακόμα παραδείγματα των προαναφερθέντων (Μπατρίνου 2011), (JamesD. Watson 2007):

- Ανίχνευση σαλμονέλας σε 12 ώρες αντί για 3-4 ημέρες (κλασσική μικροβιολογία)
- Και ποσοτικές μετρήσεις μικροοργανισμού
- Ανίχνευση ζυμών και βακτηρίων του γαλακτικού οξέος
- Μελέτη μικροβιακής βιοποικιλότητας ζυμών και εκκινητήρων καλλιιεργειών που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανικές ζυμώσεις
- Παρουσία φουντουκέλαιου σε δείγματα ελαιόλαδου
- Παρουσία DNA χοίρου σε τρόφιμα με επισήμανση περιεκτικότητας αποκλειστικά μοσχαρίσιου κρέατος
- Ανίχνευση αλλεργιογόνων
- Ανάλυση σύνδεσης με τη χρήση DNA από σπερματοζώαρια



**Εικόνα 2.2:** Η λειτουργία της PCR σχηματικά.

## Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος η οποία διαχωρίζει μόρια ή σωματίδια και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της καθαρότητας ενός δείγματος, ποιοτικό, και ποσοτικό έλεγχο, προσδιορισμό μοριακού βάρους, ενώ δείγματα μπορεί να είναι οτιδήποτε έχει φορτίο, όπως νουκλεϊκά οξέα, αμινοξέα, οργανικά οξέα και βάσεις κ.α. Αρχή της μεθόδου είναι η κίνηση των σωματιδίων με κατεύθυνση προς το αντίθετα φορτισμένο πεδίο, σε συνάρτηση με το μέγεθος και τη δομή τους. Η κινητικότητα εξαρτάται από την σταθερά  $pK$  και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου ενώ άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι η οξύτητα και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση. Για την ηλεκτροφόρηση προετοιμάζεται πηκτή αгарόζης (gel) η οποία παρασκευάζεται με ανάμιξη ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο προσφέρει ιόντα για ηλεκτρική αγωγιμότητα και σκόνη αгарόζης. Η αгарόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που έχει απομονωθεί από τα φύκια. Στη συνέχεια γίνεται θέρμανση μέχρι διαλυτοποίησης της αгарόζης. Η διάμετρος των πόρων που θα σχηματιστούν κυμαίνεται από 100 nm έως 300 nm και εξαρτάται από την περιεκτικότητα της πηκτής σε αгарόζη (Brown 2010).

Η κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα της αгарόζης εξαρτάται από τους εξής παραμέτρους:

- Το μέγεθος και τη στερεοδιάταξη του DNA. Η στερεοδιάταξη των μορίων DNA (υπερελικωμένα, ανοιχτά κυκλικά ή ευθύγραμμα) επηρεάζει την αντίσταση που δέχονται τα μόρια DNA όσο μετακινούνται μέσα από τους πόρους του πηκτώματος της αгарόζης. Τα υπερελικωμένα μόρια (πλασμαδιακό DNA) κινούνται ταχύτερα και ακολουθούν τα ανοιχτά κυκλικά και τα ευθύγραμμα μόρια DNA.
- Τη συγκέντρωση της αгарόζης.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα. Διατήρηση σταθερού pH και ύπαρξη των απαραίτητων ιόντων για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Απουσία ιόντων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA προχωρά πολύ λίγο μέσα στο πήκτωμα.
- Την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, που μετράται σε V/cm. Συνήθως εφαρμόζεται τάση 5 V/cm με βάση την απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Σε χαμηλή τάση ευνοείται ο διαχωρισμός των μεγάλων μορίων (σε τέτοιες περιπτώσεις επιλέγεται τάση 1 V/cm), ενώ σε υψηλότερη τάση διαχωρίζονται μόνο τα μικρά μόρια DNA, καθώς αυτά είναι πιο «ευκίνητα» μέσα στο πήκτωμα.

Συνήθη διαλύματα ηλεκτροφόρησης είναι τα:

- TBE (Tris Borate EDTA) Αλληλεπίδραση με το RNA – παρουσιάζει προβλήματα, καλός διαχωρισμός σε DNA 0,1-3 kb και όταν εφαρμόζουμε τάση >150V
- TAE (Tris Acetate EDTA) Μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα, χαμηλότερη τάση και περισσότερος χρόνος, καλύτερα αποτελέσματα, καλός διαχωρισμός σε DNA >4kb και σε υπερελικωμένο DNA

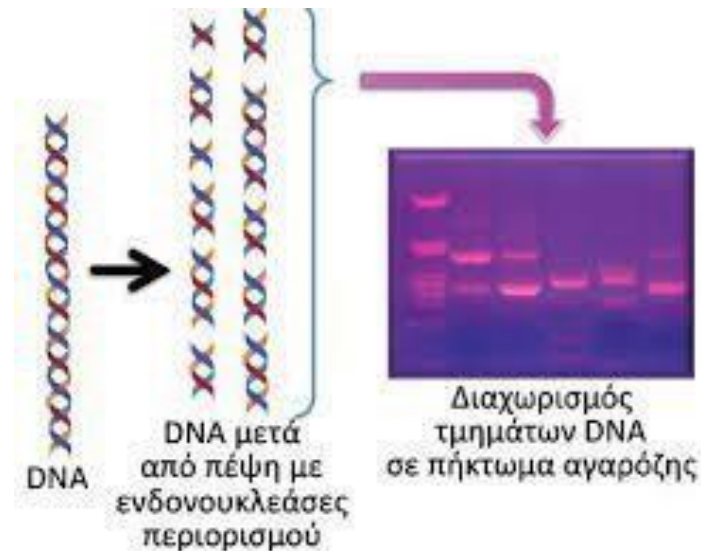
Για παράδειγμα μια πηκτή αгарόζης 0,3% μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μόρια μεταξύ 5kb και 50 kb, ενώ μια πηκτή αгарόζης 5% για μόρια μήκους 100-500 bp (Brown 2010). Σε περίπτωση διαχωρισμού τμημάτων δεκάδων έως εκατοντάδων bp, που διαφέρουν ακόμη και κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο (π.χ. κατά την αλληλούχιση του

DNA), είναι απαραίτητη η χρήση πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης (James D. Watson 2007). Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης έχουν μικρότερους πόρους και επιτρέπουν το διαχωρισμό μορίων από 10 έως 1500 bp. Χρησιμοποιούνται επίσης για διαχωρισμό DNA λεπτής κλίμακας, π.χ. στην εξέταση των προϊόντων της PCR για μικροδορυφορικές αλληλουχίες, όπου τα προϊόντα διαφορετικών αλληλόμορφων μπορεί να διαφέρουν κατά δύο ή τρία bp. Αυτές οι πηκτές μπορεί να προετοιμαστούν ως επίπεδα μεταξύ δύο γυάλινων παράλληλων πλακών ή ως μακριές λεπτές στήλες κατάλληλες για τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (Brown 2010). Οι συσκευές τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης είναι πιο αυτοματοποιημένες. Αντί για τη μεταφορά των προϊόντων με πιπέτα, οι συσκευές αυτές αναρροφούν έναν πολύ μικρό όγκο δείγματος και το ίδιο τριχοειδές μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολλές διαδοχικές φορές. Τα δείγματα φορτώνονται αυτόματα από ρομπότ και το μηχάνημα είναι σε θέση να εκτελέσει μεγάλο αριθμό αναλύσεων χωρίς επίβλεψη. Το γεγονός ότι αυτές οι συσκευές έχουν σημαντικά αυξημένη απόδοση είναι μία σημαντική βοήθεια για τα μεγάλα εργαστήρια αλληλούχισης (James D. Watson 2007).

Η ηλεκτροφόρηση βρίσκει εφαρμογή στη μοριακή βιολογία, στη βιοχημεία, στην πρωτεϊνική χημεία, στη φαρμακολογία, στην εγκληματολογία και σε πολλούς ακόμη τομείς.



**Εικόνα 2.3:** Εξοπλισμός για τη διεκπεραίωση μιας ηλεκτροφόρησης.



**Εικόνα 2.4:** Πορεία και αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης.

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

Μεταξύ όλων των ισόθερων μεθόδων ενίσχυσης του νουκλεϊκού οξέος η LAMP είναι η πιο εκτενώς μελετημένη. Σε βάθος χρόνου έχει αναλυθεί σε μεγάλο βαθμό και θεωρείται μία τεχνική που προσφέρει αξιόπιστα αποτελέσματα. Η LAMP προτάθηκε για πρώτη φορά το 2000 ως μία γρήγορη και με υψηλή αποδοτικότητα μέθοδο ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος (Deng H. 2015).

Έχει δημοσιευθεί σημαντικός αριθμός (83) εργασιών σχετικά με το θέμα των βακτηρίων και παραγωγών μυκοτοξινών σχετικά με τα τρόφιμα από το 2007. Επίσης ο αριθμός των δημοσιεύσεων που ασχολούνται με τη LAMP γενικά έχει αυξηθεί κατά 385% κατά τη διάρκεια αυτής της χρονικής περιόδου. Λόγω της ευκολίας χρήσης, της φθηνότητας και ταχύτητας σε συνδυασμό με σχεδόν απaráμιλλη ευαισθησία, η LAMP γίνεται πλέον μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος στην ανάλυση τροφίμων. Είναι διαθέσιμη για πολλά βακτηριακά παθογόνα, βακτηριακές και μυκητιακές τοξικές ουσίες και αλλοιωγόνους οργανισμούς. Πολλά εργαστήρια τροφίμων στον τομέα της δημόσιας υγείας αλλά και εργαστήρια βιομηχανικής ποιότητας χρησιμοποιούν τη LAMP ή σχεδιάζεται να τη χρησιμοποιήσουν στο εγγύς μέλλον, κυρίως παράλληλα με τα επίσημα πρωτόκολλα (Niessen L. 2013).

Συγκρινόμενη με την PCR και την real-time PCR τα σημεία που φαίνεται να υπερτερεί η LAMP είναι η δυνατότητα να ολοκληρώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα και στο

ότι απαιτεί σχετικά λίγους πόρους. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα μεγάλο θραύσμα της Bst DNA πολυμεράσης από το *Geobacillus stearothermophilus* (NiessenL. 2013) και ένα μείγμα από 4 έως 6 εκκινητές, οι οποίοι μπορούν να στοχεύουν την νουκλεοτιδική αλυσίδα σε 6 ή 8 διαφορετικά σημεία, ενώ επιπλέον απαιτεί σταθερή θερμοκρασία 60 με 65°C. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι έχει ανεκτικότητα απέναντι στους αναστολείς που συνήθως επιδρούν πάνω στην PCR. Επιπροσθέτως τα προϊόντα που παράγονται από την αντίδραση της LAMP μπορούν εύκολα να διακριθούν με το γυμνό μάτι με την προσθήκη μιας ποικιλίας χρωστικών οι οποίες παρεμβάλουν το DNA (Lee 2019).

Η LAMP λειτουργεί σε σταθερή θερμοκρασία σε οποιοδήποτε απλό θερμοπλόκ ή υδατόλουτρο, αποφεύγοντας τη χρήση εξοπλισμού που απαιτείται για την εκτέλεση μεθόδων κυκλοθερμικής ενίσχυσης όπως η PCR ή η real-time PCR. Επιπλέον, η LAMP μπορεί να λειτουργήσει σε σχετικά ακάθαρτα δείγματα αποφεύγοντας τη χρονοβόρα προετοιμασία του δείγματος πριν από την ανάλυση. Η LAMP είναι μια σχετικά νέα μέθοδος, η οποία ενισχύει τα νουκλεϊκά οξέα υπό ισοθερμικές συνθήκες (Notomi 2000).

Σε ορισμένες περιπτώσεις το όριο ανίχνευσης φτάνει τα 5 αντίγραφα με αποτέλεσμα η ευαισθησία της ανάλυσης να μπορεί να συγκριθεί ή και να ξεπεράσει ανοσολογικές αναλύσεις καθώς και αναλύσεις PCR. Το γεγονός ότι η τεχνική της LAMP γίνεται ισόθερμα σε χαμηλότερη θερμοκρασία από την τεχνική της PCR έχει ως αποτέλεσμα την δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε κλινικά δείγματα όπως ορούς καθώς και δείγματα ολικού αίματος με ελάχιστη ή και μηδαμινή προετοιμασία δείγματος. Με την βοήθεια 4 με 6 εκκινητών, η LAMP έχει την δυνατότητα να παράγει έως και  $10^9$  αντίγραφα της ακολουθίας του DNA στόχου εντός μίας ώρας. όμως η πολυπλοκότητα στον σχεδιασμό των εκκινητών παρεμποδίζει την ευρεία εφαρμογή της μεθόδου. Για τον σχεδιασμό των εκκινητών σημαντική είναι η συμβολή της βιοπληροφορικής (DengH. 2015).

Η χρήση της Bst DNA πολυμεράσης είναι αυτή που επιτρέπει την πραγματοποίηση της τεχνικής σε σταθερή θερμοκρασία εξαλείφοντας την ανάγκη για θερμικό κύκλο. Η αντίδραση δίνει  $10^6$ - $10^9$  αντίγραφα του DNA-στόχου μέσα σε 30 με 60 λεπτά κάτω από σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 60-65°C.

Το γεγονός ότι οι αντιδράσεις LAMP δίνουν αποτελέσματα υψηλής εξειδίκευσης λόγω της χρήσης έξι θέσεων δέσμευσης εκκινητών καθώς και του γεγονότος ότι η αντίδραση εκτελείται σε σταθερή θερμοκρασία 65 °C χωρίς θερμικό κύκλο, δίνουν στα

διαγνωστικά που βασίζονται σε LAMP το πλεονέκτημα ότι είναι ταχύτερα, πιο συγκεκριμένα και φθηνότερα σε σύγκριση με πολλές από τις αναλύσεις PCR που χρησιμοποιούνται τώρα στις αναλύσεις της ασφάλειας των τροφίμων (NiessenL. 2013).

### **Εφαρμογές και μελλοντική εξέλιξη της LAMP**

Όταν ασχολούμαστε με την ανίχνευση και την αναγνώριση των βακτηριακών παθογόνων και αλλοιογόνων πρέπει να γίνεται διάκριση μεταξύ των περιπτώσεων στις οποίες η παθογένεια βασίζεται σε ζωντανές οντότητες ενός οργανισμού που εισβάλλουν στον ξενιστή του και σε περιπτώσεις στις οποίες η παθογένεια βασίζεται σε τοξίνες ή άλλα κυτταρικά συστατικά. Στην τελευταία περίπτωση, τα διαγνωστικά που βασίζονται σε LAMP μπορεί να είναι πολύ χρήσιμα επειδή ανιχνεύουν την παρουσία του DNA-στόχου αντί για το ζωντανό κύτταρο ή κάποιο πρωτεϊνικό αντιγόνο. Συνήθως το DNA είναι αρκετά σταθερό για να ανιχνευθεί ανεξάρτητα από τη φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου που το φέρει. Επίσης το μόριο είναι αρκετά σταθερό ώστε να επιβιώνει στις περισσότερες από τις συνθήκες που συναντώνται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και επεξεργασίας των τροφίμων.

Σε όλες τις περιπτώσεις που η παρουσία συγκεκριμένου παθογόνου, ζωντανού ή νεκρού, παρέχει επαρκείς πληροφορίες για να εκτιμηθεί εάν ένα δείγμα τροφής θα ήταν δυνατό να θέσει σε κίνδυνο την υγεία των ανθρώπων ή των ζώων, οι αναλύσεις που βασίζονται σε LAMP μπορεί να είναι χρήσιμες ως ένα ευαίσθητο αναλυτικό εργαλείο. Λόγω της σταθερότητας του DNA, η LAMP και άλλες μέθοδοι που βασίζονται στη μοριακή ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων, δεν μπορούν εύκολα να διακρίνουν τους ζωντανούς από τους νεκρούς οργανισμούς-στόχους και έχουν επομένως περιορισμένη αξία σε περιπτώσεις όπου η ασφάλεια των τροφίμων διακυβεύεται μόνο από ζωντανά κύτταρα ενός παθογόνου και τα νεκρά κύτταρα μπορούν να αγνοηθούν (Niessen L. 2013).

### **LAMP και Gram αρνητικά βακτήρια**

Τα περισσότερα εντερικά βακτήρια ανήκουν στην ομάδα των Gram αρνητικών βακτηρίων. Μέλη αυτής της ομάδας παράγουν μια μεγάλη ποικιλία ενδοτοξινών και το στρώμα λιποπολυσακχαρίτη των κυττάρων τους μπορεί να οδηγήσει σε ανοσολογικές αντιδράσεις που προκαλούν πυρετό σε άτομα υψηλού κινδύνου. Μερικά Gram αρνητικά βακτήρια όπως *Salmonella spp.*, *Vibrio spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* ή το *Enterobacter sakazakii* βρίσκονται συχνά σε τρόφιμα και πηγές σχετικές με τα τρόφιμα.

Οι πρώτες μελέτες που χρησιμοποίησαν τη LAMP για την ανίχνευση της σαλμονέλας δημοσιεύθηκαν το 2005. Οι περισσότερες χρησιμοποίησαν αλληλουχίες εντός του γονιδίου *invA* ως στόχο για τη δέσμευση του εκκινητή. Το συμπέρασμα ήταν ότι η LAMP ήταν 10 φορές πιο ευαίσθητη σε σύγκριση με την PCR στην ανίχνευση του ίδιου γονιδίου. Επομένως η LAMP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση *Salmonella* spp. με υψηλή ευαισθησία στα προϊόντα, όπως υγρό αυγό, γάλα και λαχανικά.

*E. coli* που παράγει Shiga-τοξίνη (STEC) αναλύθηκε με LAMP σε κιμά, μοσχαρίσιο κρέας, μαρούλι και σπανάκι.

### **LAMP και Gram θετικά βακτήρια**

Τον Σεπτέμβριο του 2011 μολυσμένα πεπόνια προκάλεσαν το χειρότερο ατύχημα τροφικής δηλητηρίασης των τελευταίων χρόνων στις ΗΠΑ. Το 2009 αναπτύχθηκε LAMP χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται με την αλληλουχία του γονιδίου *invA* στη *L. monocytogenes*. Το 2010 παρουσιάστηκε ένα σύνολο έξι εκκινητών LAMP, που συνδέονται στην αλληλουχία του γονιδίου *iap* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη IAP της *L. monocytogenes* και βρήκε εφαρμογή στην ανάλυση δειγμάτων νοπού γάλακτος. Το γονίδιο *hlyA*, της *L. monocytogenes* που κωδικοποιεί μια αιμολυσίνη που απαιτείται για τη λύση των φαγοσωμάτων του ξενιστή κατά τη διάρκεια παθογένεσης, χρησιμοποιήθηκε επίσης ως γονίδιο-στόχος για τη LAMP. Το 2011 δημοσιεύθηκε ένα σετ εκκινητών LAMP που σχεδιάστηκαν για να συνδέονται με το γονίδιο *hlyA* για ανάλυση 182 τροφικών στελεχών *L. monocytogenes*. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν υψηλά επίπεδα συμφωνίας μεταξύ της LAMP και της συμβατικής PCR. Το 2011 προτάθηκε ένα σύνολο εκκινητών LAMP που βασίζονταν επίσης στο ίδιο γονίδιο αλλά χρησιμοποιούσαν διαφορετικές θέσεις δέσμευσης στη *L. monocytogenes* σε δείγματα κοτόπουλου. Το 2012 αναπτύχθηκε μια LAMP πραγματικού χρόνου με βάση το γονίδιο *hlyA* για την ανίχνευση της *L. monocytogenes* σε δείγματα τροφίμων λιανικής χρησιμοποιώντας ένα θολόμετρο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση (Niessen L. 2013).

Συστήματα κιτ-έτοιμων προς χρήση έχουν κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας και πιθανώς θα είναι διαθέσιμα στο μέλλον. Μερικά είναι ήδη διαθέσιμα στην αγορά όπως τα κιτ ενίσχυσης DNA Loopamp που έχουν αναπτυχθεί και διατίθενται στο εμπόριο με την άδεια της Eiken Chemical Co. Ltd. (Τόκιο, Ιαπωνία). Όσον αφορά την ταχύτητα ανάλυσης, το 2012 η New England Biolabs απελευθέρωσε τη νέα Bst 2.0 DNA



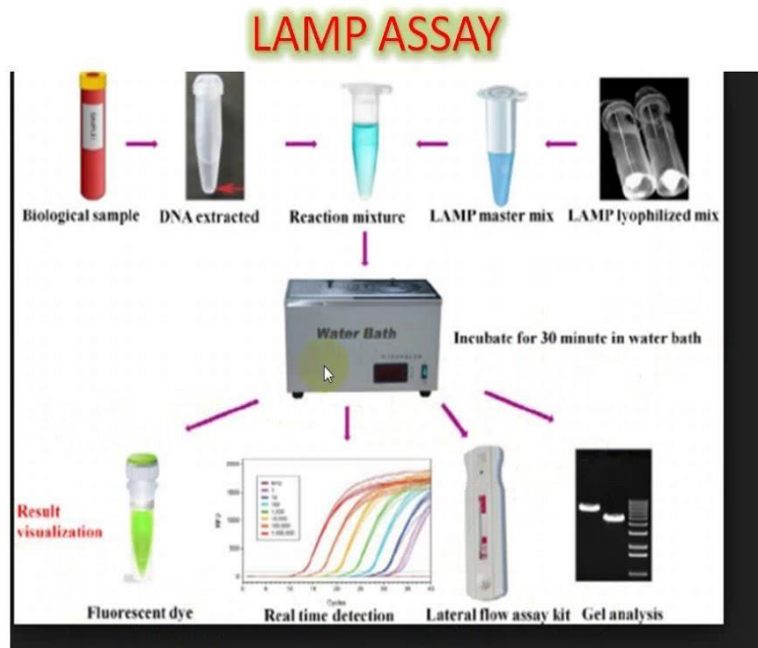
πολυμεράση, ένα ένζυμο με εξαιρετικά βελτιωμένη επεξεργασιμότητα. Το ένζυμο μειώνει τους χρόνους αντίδρασης κατά περίπου 50%.

Μια άλλη μελλοντική τάση στην εφαρμογή της LAMP για επιτόπια ανίχνευση βακτηρίων και μυκήτων θα είναι η μικρορευστομηχανική.

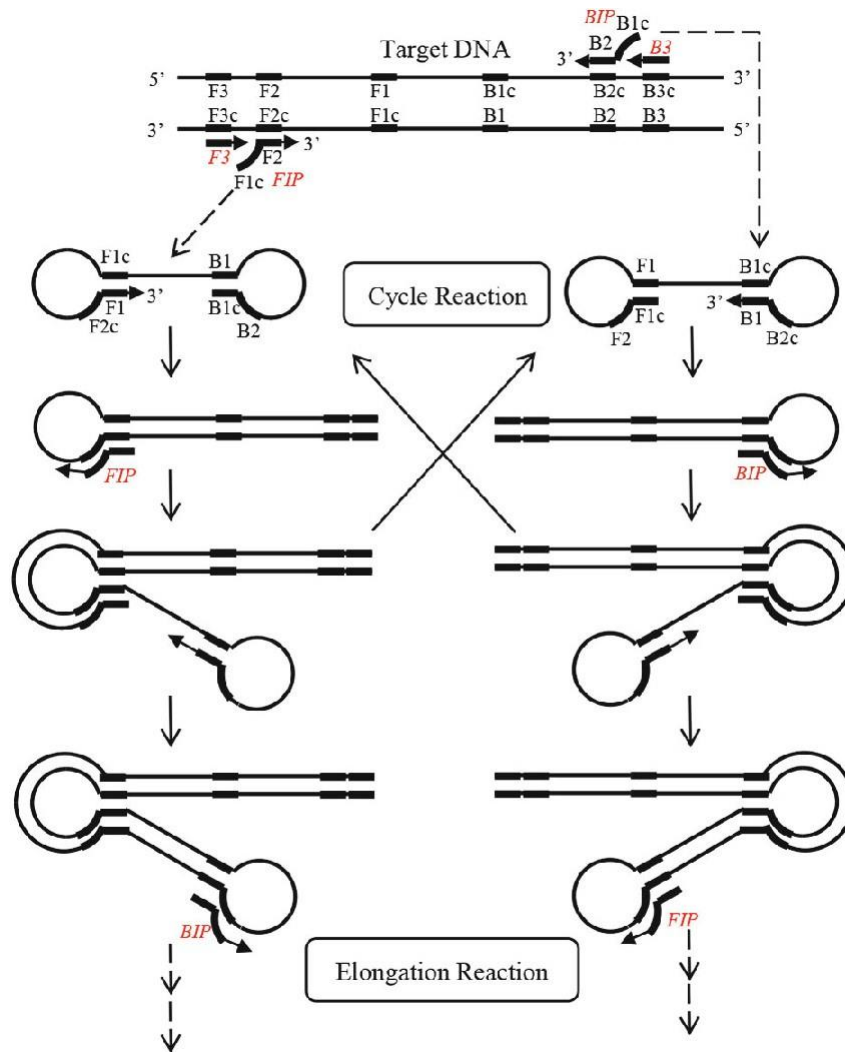
Ωστόσο, μέχρι τώρα, οι δοκιμασίες που βασίζονται στη LAMP δεν πληρούν τις προδιαγραφές που ορίζει ο ΠΟΥ για τις διαγνωστικές μεθόδους. Αυτές πρέπει να είναι οικονομικές, ευαίσθητες, εξειδικευμένες, εύκολες προς τη χρήση, γρήγορες και στιβαρές, χωρίς εξοπλισμό και να έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιηθούν από τους τελικούς χρήστες (Niessen L. 2013).

**Πίνακας 2.2:** Όρια ανίχνευσης μικροοργανισμών με τη LAMP (Niessen L. 2013)

Μικροοργανισμός-στόχος		Γονίδιο	Δοκιμή	Τρόφιμο	Όριο ανίχνευσης
<i>Salmonella</i>	<i>spp.</i>	invA	LAMP	γάλα	10 <sup>2</sup> cfu/ml
	<i>spp.</i>		LAMP kit	Πουλερικά, ωμό κρέας, γαλακτοκομικά	10 <sup>2</sup> cfu/ml
	<i>enterica</i>		LAMP	Αυγά (υγρά)	2.2 cfu/test tube
	Typhimurium		Real-time reverse transcriptionLAMP	Περιβάλλον επεξεργασίας χοιρινού κρέατος	10 cfu/ml
	Typhimurium	hisJ	LAMP	Χοιρινό, κοτόπουλο, λαχανικά	16 cfu/reaction
<i>Escherichia coli</i>	Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC)	aggR	LAMP	φύτρα ραπανάκι, φύτρα μπρόκολου, έτοιμες σαλάτες, χοιρινό και μοσχαρίσιο κιμά	6.3 cfu/reaction
	serogroup O157	rfbE	LAMP	Ωμό γάλα	410 cfu/ml
	serotype O157:H7	rfbE	LAMP	Χοιρινό κρέας	10 cfu/ ml
	Shiga toxin-producing <i>E. coli</i> (STEC)	wzx, wzy	LAMP	Μοσχαρίσιος κιμάς, μαρούλι, σπανάκι	10-20 cfu/25g
<i>Listeria monocytogenes</i>		hlyA	LAMP	κοτόπουλο	2 cfu/reaction
		iap	LAMP	Ωμό γάλα	186 cfu/ml



**Εικόνα 2.5:** Εφαρμοσμένες δοκιμές LAMP



Εικόνα 2.6: Η αρχή λειτουργίας της LAMP σχηματικά.

## Η μικρορευστομηχανική στην ανίχνευση παθογόνων (microfluidics)

Τα τσιπ που βασίζονται στις αρχές της μικρορευστομηχανικής παρουσιάζουν πλεονεκτήματα όπως:

- μικρότερη κατανάλωση δείγματος
- γρήγορη ανίχνευση
- απλή λειτουργία
- ταυτόχρονη ενσωμάτωση πολλών δειγμάτων
- μικρό μέγεθος
- πολλαπλή ανίχνευση και

- είναι φορητά

Το 2003, το περιοδικό Forbes χαρακτήρισε αυτή την τεχνολογία ως «μία από τις 15 σημαντικότερες εφευρέσεις για το μέλλον της ανθρωπότητας».

Ωστόσο, το υψηλό κόστος των παραδοσιακών τσιπ μικρορευστομηχανικής περιορίζει την εφαρμογή τους σε μεγάλη κλίμακα.

Το 2006 προτάθηκε για πρώτη φορά η έννοια της «συσκευής ανάλυσης μικρορευστομηχανικής από χαρτί», όπου το τσιπ με βάση το χαρτί έχει τα πλεονεκτήματα:

- χαμηλού κόστους
- απλής προετοιμασίας
- καλής ευαισθησίας
- άνετης χρήσης και μεταφοράς
- μικρού όγκου του απαιτούμενου δείγματος
- γρήγορης ταχύτητας ανάλυσης
- ταυτόχρονης ανίχνευσης ποικιλίας ουσιών

και έχει δείξει ισχυρή αναπτυξιακή ζωτικότητα και καλές προοπτικές εφαρμογής στον τομέα της ασφάλειας των τροφίμων. Αναμένεται να γίνει το πιο οικονομικό μέσο ανίχνευσης και ανάλυσης.

Η τεχνολογία των τσιπ αυτών στην ασφάλεια των τροφίμων βρίσκει εφαρμογή σε δοκιμές (Hongwei Gao 2020):

- συστατικών τροφίμων
- υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων
- παθογόνων βακτηρίων
- βαρέων μετάλλων
- πρόσθετων των τροφίμων

## **Υλικά που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των συσκευών μικρορευστομηχανικής (microfluidic devices).**

Τα υλικά από πυρίτιο και γυαλί είναι ακριβά και δύσκολα στην επεξεργασία και για αυτό έχουν αντικατασταθεί από μια ποικιλία υλικών χαμηλού κόστους. Πολυμερή υλικά, όπως ελαστομερή, θερμοπλαστικά πολυμερή, θερμοσκληρυνόμενα πολυμερή, χάρτινα υλικά, βιοϋλικά και άλλα.

### **Ελαστομερή**

Το PDMS (polydimethylsiloxane) είναι σήμερα το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ελαστομερές υλικό στον τομέα των τσιπ μικρορευστομηχανικής. Η εφαρμογή του προτάθηκε για πρώτη φορά το 1998. Το PDMS έχει τα πλεονεκτήματα της χαμηλής τιμής, της οπτικής διαφάνειας, της καλής βιοσυμβατότητας και ορισμένο βαθμό διαπερατότητας και είναι ιδανικό υλικό για τσιπ χαμηλού κόστους. Η χρήση του PDMS στην επεξεργασία των τσιπ γίνεται συχνά μέσω της μεθόδου χύτευσης στην επιφάνεια του σχηματισμού της μικροδομής και η ακρίβεια της μεθόδου μπορεί να φτάσει ακόμη και επίπεδα νανόμετρου. Ωστόσο, το PDMS έχει τα μειονεκτήματα της εύκολης κατάρρευσης των καναλιών και της απορρόφησης ενός μέρους των υγρών.

### **Θερμοπλαστικά**

Τα θερμοπλαστικά είναι τα πιο κοινά και ευρέως χρησιμοποιούμενα υλικά στην καθημερινότητά μας και η τιμή τους είναι πολύ χαμηλή. Μπορούν να μαλακώσουν και να διαμορφωθούν σε συγκεκριμένη θερμοκρασία. Θερμοπλαστικά υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι ο μεθακρυλικός πολυμεθυλεστέρας (PMMA), το πολυστυρένιο (PS), COC, polycarbonate (PC), το πολυτερεφθαλικό οξύ (PET), το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) και άλλα. Στα θερμοπλαστικά, το PMMA έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορες επιστήμες αλλά και στην ιατρική έρευνα, λόγω του χαμηλού κόστους, της καλής θερμικής επεξεργασίας και των οπτικών ιδιοτήτων του. Το PS έχει εξαιρετική βιοσυμβατότητα και έχει σημαντικά πλεονεκτήματα στον τομέα της κυτταρικής καλλιέργειας.

### **Υλικά από χαρτί**

Τα τσιπ με βάση το χαρτί σχηματίζονται με διείδυση υδρόφοβων υλικών στις υδρόφιλες ίνες του χαρτιού. Κοινός inkjet εκτυπωτής, τρισδιάστατοι εκτυπωτές,

εκτυπωτές κεριού ακόμη και κραγιόνια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επεξεργασία τσιπ χαμηλού κόστους με βάση το χαρτί. Για την επιλογή του χαρτιού, κυρίως χρησιμοποιείται το διηθητικό χαρτί της σειράς Whatman ή χρωματογραφικό χαρτί. Σε αντίθεση με τα τσιπ από πολυμερή, στα οποία πρέπει να κλείσει το κανάλι, στα τσιπ με βάση το χαρτί συχνά δεν χρειάζεται να γίνει αυτό. Τα κανάλια είναι ανοιχτά γιατί το υγρό κινείται μέσα στις ίνες του χαρτιού.

Τα τσιπ με βάση το χαρτί έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορες έρευνες και εφαρμογές ανίχνευσης ιατρικής και άλλων βιοεπισημών, λόγω του χαμηλού κόστους υλικών και επεξεργασίας, όπως ανίχνευση ακεταλδεΐδης σάλιου, ανίχνευση βαρέων μετάλλων, ανίχνευση σακχάρου στο αίμα, ανίχνευση γαλακτικού οξέος κ.λπ (Hongwei Gao 2020).

### **Ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων**

Έχει αναπτυχθεί ένα τσιπ από χαρτί για την ανίχνευση *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* και *Salmonella* σε έτοιμο προς κατανάλωση προϊόντα κρέατος, με βάση την αλλαγή της χρωματικής έντασης του συστήματος μετά από την έκκριση συγκεκριμένων ενζύμων από τα βακτήρια, τα οποία αντιδρούν με τα υποστρώματα. Το όριο ανίχνευσης των *E. coli*, *L. monocytogenes* και *Salmonella* είναι 10<sup>6</sup>, 10<sup>8</sup> και 10<sup>4</sup> CFU/mL, αντίστοιχα. Το τσιπ με βάση το χαρτί μπορεί να ανιχνεύσει τα παθογόνα βακτήρια σε έτοιμο προς κατανάλωση κρέας σε 12 ώρες ή λιγότερο.

Ακόμη ένα τρισδιάστατο τσιπ το οποίο δεν χρειάζεται καμία προσθήκη εξαρτήματος, έχει αναπτυχθεί για την ανίχνευση του *E. coli* O157: H7. Η συσκευή μπορεί να ανιχνεύσει την *E. coli* O157: H7 σε μεγάλο όγκο δείγματος με φωτόμετρο ATP, σε επίπεδα της τάξης των 10 CFU.

Η τεχνολογία των τσιπ μικρορευστομηχανικής συνδυασμένη με τη LAMP, ανέπτυξε ένα τσιπ με πολυστρωματικό βιοαισθητήρα νανοσωλήνων άνθρακα (CNT) για την ανίχνευση *E. coli* O157: H7. Μετά την καλλιέργεια του *E. coli*, τα βακτήρια μπορούν να απελευθερωθούν ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος, μειώνοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ αντι-*E. coli* O157: H7 αντισωμάτων και βακτηρίων. Τα πολλαπλά στρώματα νανοσωλήνων άνθρακα, που λειτουργούν με αντισώματα, μπορούν να συλλάβουν, να καλλιεργήσουν και να απελευθερώσουν βακτήρια επιλεκτικά, και στη συνέχεια να αναλυθεί η συγκέντρωση DNA των απελευθερωμένων βακτηρίων με το τσιπ μικρορευστομηχανικής-LAMP. Η πλατφόρμα ανίχνευσης είναι σε θέση να ανιχνεύσει συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 1 CFU/mL.

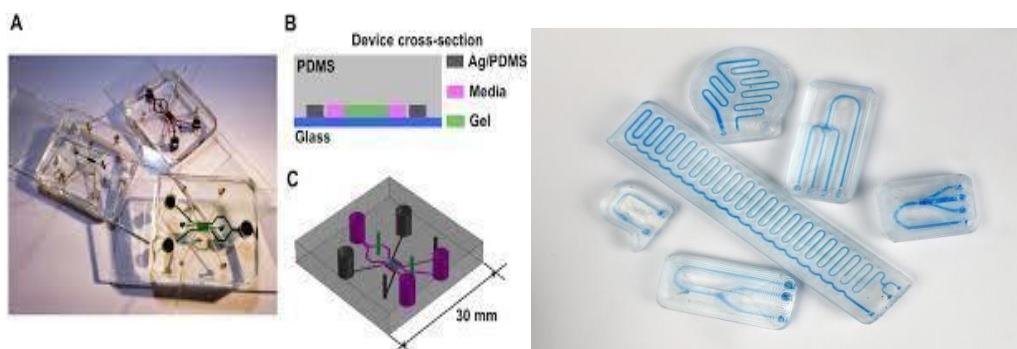
Προκειμένου να καλυφθούν οι ανάγκες της ταχείας επιτόπιας ανίχνευσης παθογόνων, ένα σύστημα εργαστηρίου σε τσιπ οκτώ θαλάμων με ενσωματωμένο μαγνητικό σφαιρίδιο για την προετοιμασία δείγματος, σε συνδυασμό με τη LAMP για την ταχεία ποσοτική ανίχνευση της σαλμονέλας, ολοκληρώνει την ανίχνευση σε 40 λεπτά και έχει όριο ανίχνευσης 50 κυττάρων.

### Συμπεράσματα και μελλοντική χρήση της τεχνολογίας

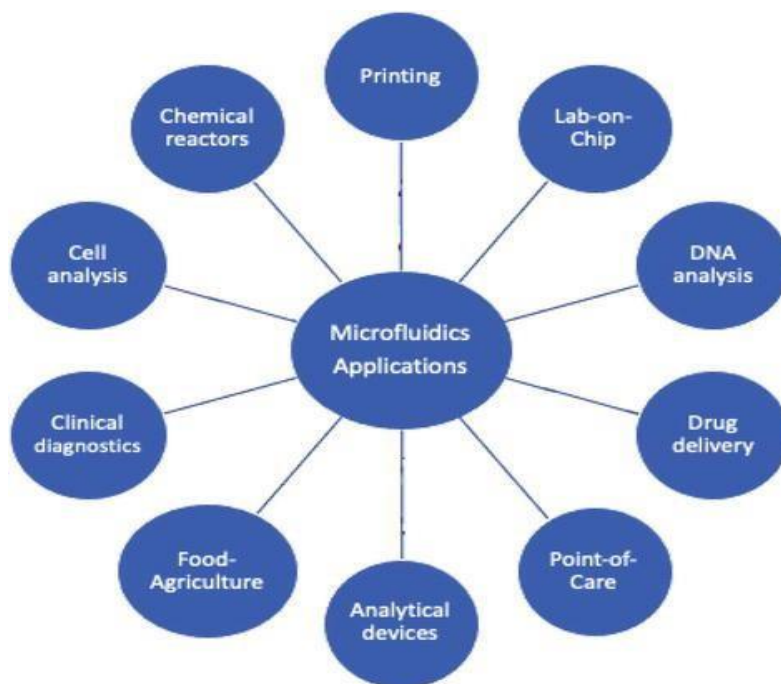
Ως νέα τεχνολογία, τα τσιπ μικρορευστομηχανικής μπορούν να συγκεντρώνουν πολλαπλά στάδια ανίχνευσης δείγματος σε ένα μικρό τσιπ, να ενσωματώνουν αυτές τις λειτουργίες μέσω του μεγέθους και της καμπυλότητας του καναλιού ροής, των μικροβαλβίδων και του σχεδιασμού των κοιλοτήτων, και τελικά να κάνουν ολόκληρη την ενσωμάτωση και την ανίχνευση σε μικρή κλίμακα και αυτοματοποιημένα.

Επειδή τα τσιπ μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να έχουν πολλά κανάλια, τα προς ανίχνευση δείγματα μπορούν να μεταφερθούν σεπολλαπλές μονάδες αντίδρασης ταυτόχρονα μέσω του δικτύου. Έχουν χαρακτηριστικά υψηλής απόδοσης σε σύγκριση με τη συμβατική ανίχνευση κάθε αντίδρασης ξεχωριστά. Επιπλέον, η τεχνολογία αυτή έχει επίσης τα πλεονεκτήματα της χαμηλής κατανάλωσης αντιδραστηρίων ανίχνευσης και δείγματος.

Η εφαρμογή της μικρορευστομηχανικής σε βιομηχανική κλίμακα θα γίνει τάση στο μέλλον. Τα επόμενα χρόνια, τα τσιπ μικρορευστομηχανικής θα μελετηθούν ευρύτερα και θα επεκταθεί το πεδίο εφαρμογής τους (HongweiGao 2020).



**Εικόνα 2.7:** Παραδείγματα microfluidic chip



**Εικόνα 2.8:** Πρακτικές εφαρμογές της μικροευστομηχανικής

### **Άλλες μέθοδοι απομόνωσης και εκχύλισης του DNA**

Η διαδικασία εξαγωγής DNA, συλλογής δειγμάτων, λύσης ιστού και καθαρισμού ή απομόνωσης του DNA στόχου είναι το πιο χρονοβόρο και εντατικό βήμα εργασίας από τις περισσότερες δοκιμές DNA και συνήθως απαιτεί εκπαιδευμένο εργαστηριακό προσωπικό σε ένα πλήρως εξοπλισμένο εργαστήριο για την παροχή του DNA στόχου με επαρκή καθαρότητα για αξιόπιστη ανάλυση (Fredricks 2005), (Wu 2014).

Οι παρούσες διαδικασίες καθαρισμού DNA, ειδικά οι εμπορικές, είναι δαπανηρές, επίπονες και χρειάζονται μεγάλο αριθμό αντιδραστηρίων και εξοπλισμού. Εκτός από τις χημικές μεθόδους, αρκετοί ερευνητές έχουν εξαγάγει με επιτυχία βακτηριακό DNA χρησιμοποιώντας φυσική δύναμη. Για παράδειγμα ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών επιτεύχθηκε με στροβιλισμό του αιωρήματος κυττάρων ή χτυπώντας το με σφαιρίδια ή κύματα υπερήχων (Ali A Dashti 2009).

### **Βρασμός**

Έχει παρατηρηθεί ότι χρήση μεθόδων που στηρίζονται στην εφαρμογή ακραίων θερμοκρασιών για τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων ελαχιστοποιεί τον χρόνο και την ανάγκη για αντιδραστήρια, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει την ποιότητα



του εξαγόμενου DNA και την παραγωγικότητα των επακόλουθων μοριακών τεχνικών. Όσο αναφορικά με χαμηλές θερμοκρασίες, η κατάψυξη προκαλεί κρυστάλλωση του νερού μέσα στα κύτταρα που οδηγεί σε καταστροφή των κυτταροπλασματικών δομών.

Η θέρμανση στους 94 °C για δύο λεπτά είναι αρκετή για τη μετουσίωση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Ali A Dashti 2009).

Στα Gram-αρνητικά βακτήρια μπορεί να προκληθεί βλάβη στις εξωτερικές μεμβράνες ακόμα και με ήπιο θερμικό σοκ. Μορφολογικές και δομικές μεταβολές καθώς και απώλεια λιποπολυσακχαριτών (LPS) των εξωτερικών μεμβρανών συνεπάγονται απώλεια της ελεγχόμενης διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών των βακτηρίων. Ακόμη οι μορφολογικές και δομικές πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν μετουσίωση, γεγονός που προκαλεί τη θερμική απενεργοποίηση του κυττάρου (A.D. 2003).

## **Υπέρηχοι**

Οι υπέρηχοι επιδρούν αρνητικά στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων, σχηματίζοντας μικροσκοπικές φυσαλίδες οι οποίες μπορούν να εισχωρήσουν στο εσωτερικό του κυττάρου, να διογκωθούν και με την ενέργεια των ηχητικών κυμάτων να πλήξουν το βακτηριακό κύτταρο. Οι ακραίες συνθήκες επιδρούν μηχανικά στο κύτταρο με αποτέλεσμα την δημιουργία κρουστικών κυμάτων και υψηλών διατμητικών δυνάμεων. Η ενέργεια που θα απελευθερωθεί από τη ρήξη της φυσαλίδας εντός του κυτταρικού χώρου, θα προκαλέσει φυσικές και χημικές μεταβολές στο κύτταρο. Τα παραπάνω φαινόμενα βλάπτουν την φυσική δομή των βακτηρίων με αποτέλεσμα να αποδυναμώνουν ή ακόμα και να καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα αυτών.

Το φαινόμενο του σχηματισμού, της διόγκωσης και της ενδόρρηξης μικροσκοπικών φυσαλίδων στο υγρό του σωλήνα και συνεπώς στο εσωτερικό των περιεχόμενων κυττάρων εξαιτίας της ενέργειας που απορροφούν μόρια του υγρού από τους υπερήχους, ονομάζεται σπηλαιώση.

Έχει αναπτυχθεί μια τεχνική εξαγωγής υπερήχων με μη θερμική εστίαση (Focused ultrasound extraction - FUSE), η οποία δημιουργεί ένα πυκνό σύννεφο φυσαλίδων ακουστικής σπηλαιώσης υψηλής πίεσης για να αποσυνθέτει ιστούς στόχους σε ακυτταρικά υπολείμματα, με αποτέλεσμα την ταχεία απελευθέρωση του παγιδευμένου DNA.

Υψηλής ποιότητας ενισχυτική αλληλούχιση ανιχνεύει και ταυτοποιεί οριστικά τα είδη. Αυτή η μέθοδος παρέχει επίσης προϊόντα λύσης από ένα μη ενζυματικό ρυθμιστικό διάλυμα που είχεται ίδια ποσοστά επιτυχίας ενίσχυσης με τις παραδοσιακές εξαγωγές Qiagen.

Τα αποτελέσματα από αυτή τη μελέτη καταδεικνύουν ότι το

Το πρωτόκολλο FUSE μπορεί να παρέχει προσβάσιμο DNA για ενίσχυση και αλληλούχιση με χρόνο εκχύλισης κάτω από 7 λεπτά σε σύγκριση με το χρόνο λύσης 45 λεπτών που απαιτήθηκε για να ληφθεί το ίδιο αποτέλεσμα χρησιμοποιώντας παραδοσιακά πρωτόκολλα θερμικής και ενζυμικής λύσης.

Η καθαρότητα των προϊόντων λύσης που παρήχθησαν χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο FUSE ήταν παρόμοια με αυτή των τυπικών εξαγωγών ελέγχου.

(HalR. Holmes 2020).

## **Πλεονεκτήματα μοριακών μεθόδων έναντι των κλασικών**

Στο σύνολό τους οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών υπερτερούν έναντι των κλασικών σε πολλούς τομείς και για τους λόγους που παρουσιάζονται παρακάτω έχουν τα χαρακτηριστικά εκείνα που ζητούνται από τα εργαστήρια τα οποία πραγματοποιούν ελέγχους στα τρόφιμα. Αναμένεται να είναι μια μελλοντική τάση στον τομέα των τροφίμων, η οποία θα χρησιμοποιείται κατά κόρον. Η έρευνα των μεθόδων αυτών έχει να δώσει ακόμη αρκετά και εξαιρετικά ενδιαφέροντα αποτελέσματα και κατέχει μία από τις πρώτες θέσεις στις προτεραιότητες των επιστημών τροφίμων και όχι μόνο, καθώς βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς τομείς.

Οι μοριακές μέθοδοι:

- Ανιχνεύουν το γενετικό υλικό των βακτηρίων
- Απαιτούν πολύ μικρότερη ποσότητα δείγματος

Έτσι καθίστανται πιο ευαίσθητες σε όρους ποσότητας και πολύ πιο εξειδικευμένες, ακόμη και σε επίπεδο στελέχους, αφού επιλέγεται συγκεκριμένη αλληλουχία DNA, που χαρακτηρίζει το βακτήριο-στόχο. Είναι δηλαδή εκλεκτικές. Επίσης εξοικονομούν πολύτιμα αντιδραστήρια.

- Χρειάζονται σημαντικά μειωμένο χρόνο για την πραγματοποίησή τους
- Επιτρέπουν τον ταυτόχρονο χειρισμό δειγμάτων

Η οικονομία χρόνου και η ανάγκη για ταυτόχρονη ανάλυση πολλών δειγμάτων είναι από τις κύριες απαιτήσεις των σύγχρονων εργαστηρίων.

- Δίνουν υψηλή ποιότητα απομονωμένου DNA
- Δίνουν επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων
- Δίνουν μεγάλη ακρίβεια των αποτελεσμάτων

Οι μοριακές μέθοδοι είναι άξιες εμπιστοσύνης, δίνουν ποιοτικά και ακριβή αποτελέσματα, τα οποία μπορούν να επαληθευτούν ανά πάσα στιγμή.

- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μεγάλη ποικιλία αναλύσεων
- Βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους

Εν κατακλείδι, οι μοριακές μέθοδοι αποτελούν ένα αξιόπιστο εργαλείο, απαραίτητο σε κάθε εργαστήριο, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα και χωρίς κόπο και κόστος.

## Κεφάλαιο 3: Υλικά και μέθοδοι

### Εξοπλισμός και υλικά

#### Εξοπλισμός:

- Θερμοκυκλοποιητής (Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler)
- Συσκευή υπερήχων (ELMASONIC S10 - Ultrasonic Cleaning Device 800ml 37 kHz 30 W, Elma Ultrasonic Technology)
- Φυγόκεντρος (MSE Sanyo Micro Centaur Centrifuge)
- Vortex (V-1 plus)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini Single Cell Electrophoresis Chamber)
- Thermal Block (THERMOBLOCK TD 200-1)
- Θερμική εστία
- Υάλινα σκεύη (ποτήρι ζέσεως, κωνική φιάλη)
- Πιπέτες
- Συσκευή ανάγνωσης - ανάλυσης με υπεριώδη ακτινοβολία UV – Mini BISPRO
- Υδατόλουτρο
- Ζυγός
- 3D εκτυπωτής Phrozen sonic mini 4k
- Διαφανής υγρή ρητίνη PRIMA Value UV Resin STANDARD CLEAR πυκνότητας 1.1 g/mL

#### Υλικά:

- Καλλιέργεια *Salmonella Typhimurium* σε ζωμό
- Καλλιέργεια *Listeria monocytogenes* σε ζωμό
- Καλλιέργεια *Escherichia coli* σε ζωμό
- Απιονισμένο νερό
- Χλωροφόρμιο
- Αιθανόλη
- Ισοαμυλική Αλκοόλη
- Οξικό Νάτριο 3M

- Elution Buffer
- Απιονισμένο Νερό
- Βρωμιούχοαιθίδιο
- Tris Borate EDTA Buffer (TBE)

## Πειραματική διαδικασία

### Προετοιμασία δειγμάτων

Ζυγίστηκαν 10g δείγματος μαρουλιού του εμπορίου, αφού το δείγμα είχε προηγουμένως απολυμανθεί, για την αποφυγή επιμόλυνσης από την υπάρχουσα μικροβιακή χλωρίδα. Έγινε αραίωση με αραιωτικό Peptoned Buffered Water (PBW) (προσθήκη 90g) και το μείγμα ομογενοποιήθηκε σε stomacher. Ακολούθησε λήψη 900μL και προσθήκη 100μL (αραίωση) της καλλιέργειας βακτηρίων, με αποτέλεσμα να προκύψει 1mL επιμολυσμένου διαλύματος με γνωστή συγκέντρωση βακτηρίου  $10^8$  cfu/mL. Η συγκέντρωση των βακτηρίων στο τελικό διάλυμα ήταν  $10^7$  cfu/mL ύστερα από την αραίωση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις από το αρχικό δείγμα, ώστε να προκύψουν συνολικά 7 δείγματα με συγκεντρώσεις από  $10^7$  έως  $10^1$  cfu/mL αντίστοιχα στο κάθε ένα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε τρεις φορές για τα τρία διαφορετικά βακτήρια. Συνολικά παρήχθησαν 21 δείγματα. Η απομόνωση του DNA έγινε με δύο διαφορετικές μεθόδους:

- a) Το εμπορικό extraction kit και
- b) Την in-house τεχνική που αναφέρεται κατωτέρω (Ενότητα 3.2.3).

Συνολικά προέκυψαν 42 απομονώσεις. Η κάθε ταυτοποίηση έγινε με 2 διαφορετικές μοριακές μεθόδους, PCR και LAMP, που συνολικά δίνουν 84 ταυτοποιήσεις. Τέλος τα δείγματα που αναλυθήκαν με τη LAMP ταυτοποιήθηκαν επίσης με τη χρήση των microfluidic analytical devices.

### Απομόνωση με την χρήση του εμπορικού kit (NucleoSpin® Food)

Περιεχόμενα του εμπορικού kit:

- Lysis buffer CF
- Buffer C4
- Wash buffer CQW
- Wash buffer C5 (concentrate)
- Elution buffer CE
- NucleoSpin® Food columns (plus collection tubes)
- Proteinase K (lyophilized)
- Proteinase buffer PB
- Collection tubes (2mL)
- User manual

Composition of elution buffer CE: 5mM Tris/HCl, pH 8.5

Αναλυτική παρουσίαση των βημάτων που ακολουθήθηκαν, όπως παρουσιάζονται στο φυλλάδιο οδηγιών του κιτ:

- 1) Ομογενοποίηση του δείγματος**
- 2) Λύση των κυττάρων.** Προσθήκη 550 µLCF προθερμασμένο στους 65 °C (ανάμιξη για 15 sec) και 10 µL proteinase K (ανάμιξη για 2-3sec)
- 3) Προσαρμογή των συνθηκών για την πρόσδεση του DNA.** Μεταφορά του δείγματος σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα. Προσθήκη ίσης ποσότητας C4 και ίσης ποσότητας αιθανόλης (συνολικά 3 φορές ο αρχικός όγκος). Έπειτα φυγοκέντριση για 30 sec.
- 4) Πρόσδεση DNA.** Εισαγωγή 700µL δείγματος σε NucleoSpin® Food column μέσα σε collection tube. Φυγοκέντριση για 1 min στις 11.000 στροφές και απόρριψη του υγρού στο σωληνάκι. Επανάληψη της διαδικασίας για την υπόλοιπη ποσότητα του δείγματος.
- 5) Έκπληση και στέγνωμα της μεμβράνης silica.**
  - 1<sup>η</sup> έκπληση:** Προσθήκη 400 µLCQW και φυγοκέντριση για 1 min στις 11.000 στροφές. Απόρριψη του υγρού στο σωληνάκι.
  - 2<sup>η</sup> έκπληση:** Προσθήκη 700 µLC5 και φυγοκέντριση για 1 min στις 11.000 στροφές. Απόρριψη του υγρού στο σωληνάκι.
  - 3<sup>η</sup> έκπληση:** Προσθήκη 200 µLC5 και φυγοκέντριση για 2 min στις 11.000 στροφές, για την πλήρη απομάκρυνση του C5.

- 6) **Έκλυση DNA.** Τοποθέτηση της NucleoSpin® Food column σε καθαρό σωληνάκι των 1,5 mL. Προσθήκη 100 µLCE (προθερμασμένο στους 70 °C) στη μεμβράνη. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντριση για 1 min στις 11.000 στροφές για την έκλυση του DNA.

### **Αναλυτικά βήματα της in-house τεχνικής απομόνωσης DNA**

- 1) Φυγοκέντρηση – απόρριψη του υπερκείμενου
- 2) Βρασμός για 20 min και υπέρηχοι για 20 min
- 3) Φυγοκέντρηση – διατήρηση της υδατικής φάσης
- 4) Προσθήκη ίσης ποσότητας χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (0,96-0,04)
- 5) Φυγοκέντρηση - διατήρηση της υδατικής φάσης
- 6) Προσθήκη ίσης ποσότητας χλωροφορμίου
- 7) Φυγοκέντρηση - διατήρηση της υδατικής φάσης
- 8) Προσθήκη 50 µL οξικού νατρίου 3M και ίσης ποσότητας κρύας απόλυτης αιθανόλης
- 9) Φυγοκέντρηση, απόρριψη της αιθανόλης και προσθήκη 250 µL κρύας απόλυτης αιθανόλης
- 10) Κατάψυξη για 30 min
- 11) Φυγοκέντρηση και απόρριψη της αιθανόλης
- 12) Τοποθέτηση του δοκιμαστικού σωλήνα με το διάλυμα στο θερμομπλόκ για να εξατμιστούν τα υπολείμματα της αιθανόλης
- 13) Προσθήκη 100µL Elution Buffer
- 14) Αποθήκευση στους -20 °C

### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιήθηκε σε όγκο 50µL για κάθε δείγμα. Αυτά αποτελούνταν από 25 µL Taq πολυμεράσης, από 1 µL από τον κάθε εκκινητή (2 συνολικά) και από 3 µL UltraPure™ DNase/RNase-Free Water. Τα υπόλοιπα 20µL είναι το DNA στόχος. Οι εκκινητές ήταν οι κατάλληλοι για τον κάθε παθογόνο μικροοργανισμό στόχο. Οι εκκινητές προστέθηκαν στο μείγμα σε κατάλληλες αραιώσεις προς αποφυγή του μεταξύ τους υβριδισμού, ο οποίος θα

επηρεάζει τα αποτελέσματα της διαδικασίας. Οι θερμοκρασίες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η διαδικασία ήταν:

- Για τη *L. monocytogenes* 52 °C
- Για την *E. coli* 53-54 °C
- Για τη *S. Typhimurium* 58 °C

**Πίνακας 3.1:** Εκκινητές των βακτηρίων για την PCR.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR
<i>S. typhimurium-1</i>	5'-GGTGGCAAGGAATGAA-3'	915 bp
<i>S. typhimurium-2</i>	3'-CGCAGCGTAAAGCAACT-5'	
<i>L. monocytogenes-1</i>	5'-CTGGACAAAATTACTTACAACGA-3'	454 bp
<i>L. monocytogenes-2</i>	3'-AACTACTGGAGTGCTTGTTTTTC-5'	
<i>E. coli - 1</i>	5'-GATAGACTTTTTCGACCCAACAAAG-3'	208 bp
<i>E. coli - 2</i>	3'-TTGCTCAATAATCAGACGAAGATG-5'	





**Εικόνα 3.1:** Το μηχάνημα της PCR- Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems)

## Ηλεκτροφόρηση

Ζυγίστηκαν σε έναν αναλυτικό ζυγό 15g αгарόζη και προστέθηκαν σε κωνική φιάλη. Έπειτα με την χρήση του φούρνου μικροκυμάτων διαλύθηκε η αгарόζη και προστέθηκε στο ζεστό διάλυμα 10μl βρωμιούχο αιθίδιο. Το τελικό διάλυμα μεταφέρθηκε στο ειδικό δίσκο του μηχανήματος ηλεκτροφόρησης. Στον ειδικό δίσκο πριν την μεταφορά του διαλύματος σε αυτό κολλήθηκε περιφερειακά χάρτινη ή πλαστική ταινία ενώ επιπλέον προστέθηκε σε αυτό το κατάλληλο χτενάκι και αφέθηκε στο ψυγείο για 30 λεπτά μέχρι να στερεοποιηθεί το gel. Το χτενάκι προστέθηκε έτσι ώστε μετά την στερεοποίηση του διαλύματος να έχουν δημιουργηθεί τα κατάλληλα κενά για την προσθήκη του DNA. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε η ταινία και το χτενάκι και στα κενά που δημιουργήθηκαν προστέθηκαν 5μl από τα δείγματα καθώς και 15μl ladder. Το ladder που προστέθηκε εξαρτάται από τον μικροοργανισμό στόχο. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε UV ακτινοβολία για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων.



**Εικόνα 3.2:** Η συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini Single Cell Electrophoresis Chamber

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

Για την τεχνική ανίχνευσης της LAMP αρχικά προετοιμάστηκε το μείγμα των εκκινητών. Οι συγκεντρώσεις του κάθε εκκινητή στο σωλήνα είναι 100  $\mu\text{M}$ . Για τη LAMP όμως χρειάζονται μικρότερες συγκεντρώσεις. Για τη *Salmonella* αραιώθηκαν οι εκκινητές στο 1/4, ώστε να προκύψει συγκέντρωση 25  $\mu\text{M}$ . Το μείγμα αποτελούταν από τους αραιωμένους εκκινητές στις παρακάτω αναλογίες: F3= 0,1  $\mu\text{M}$ , B3= 0,1  $\mu\text{M}$ , LF= 0,4  $\mu\text{M}$  και LB= 0,4  $\mu\text{M}$ , FIP= 0,8  $\mu\text{M}$ , BIP= 0,8  $\mu\text{M}$ . Για τη *Listeria* και την *Escherichia* οι εκκινητές αραιώθηκαν στο 1/2 της αρχικής τους συγκέντρωσης. Έπειτα προετοιμάστηκε το μείγμα της LAMP το οποίο αποτελείται από: 12,5  $\mu\text{L}$  Warm Start Colorimetric LAMP 2X Master Mix (NEB), 5  $\mu\text{L}$  Ultra Pure DNase/RNase-Free Water, 5  $\mu\text{L}$  βακτηριακό DNA και 2,5  $\mu\text{L}$  από το μείγμα των εκκινητών. Ο συνολικός όγκος του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα ήταν 25  $\mu\text{L}$ . Το μείγμα τοποθετήθηκε στο θερμομπλόκ στους 65° C για 45 λεπτά. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται οπτικά με την αλλαγή του χρώματος του μείγματος, από έντονο ροζ σε αποχρώσεις του κίτρινου.

**Πίνακας 3.2:** Εκκινητές των βακτηρίων για την LAMP.

Assay	Primer	Sequence	Length
<i>S. Typhimurium</i>	F3	5' ACCAGATTCAGGGAGTGAGT 3'	20
	B3	5' CGCGCACGAAATTCGTAAC 3'	19
	FIP	5'ACCGGGTGGTAAGCGAATTGCGAGGTTAACCGTCTG GAGC 3'	40
	BIP	5'TCGGCCTCTTTGGCCATCACTGGCGAAATACTTTGCC GAG 3'	40
	LF	5' TGGTAAAGCCCGCGCATCTG 3'	20
	LB	5' GCGCCAGTTCATGCGACTCG 3'	20

Assay	Primer	Sequence	Length
<i>L. monocytogenes</i>	F3	5' TTGCGCAACAACTGAAGC 3'	19
	B3	5' GCTTTTACGAGAGCACCTGG 3'	20
	FIP	5'GTGTTTCTTTTCGATTGGCGTCTTTTTTTCATCCATGG CACCACC 3'	46
	BIP	5'CCACGGAGATGCAGTGACAAATGTTTTGGATTCTTC TTTTCTCCACAAC 3'	51
	LF	5' TAGGACTTGCAG GCGGAGATG 3'	21
	LB	5' GCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGG 3'	24

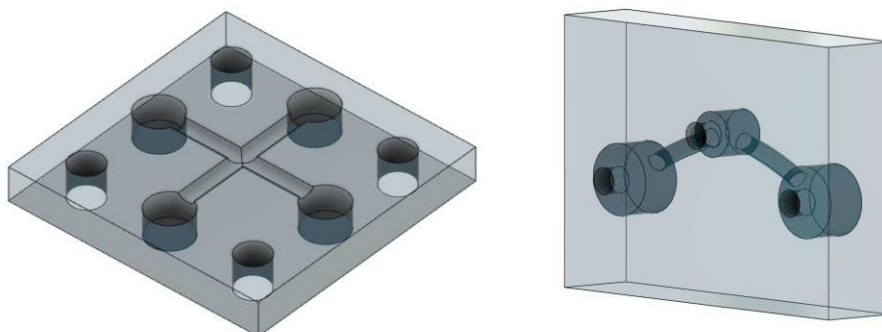
Assay	Primer	Sequence
<i>E. coli</i>	F3	5'-GCCATCTCCTGATGACGC-3'
	B3	5'-ATTTACCGCAGCCAGACG-3'
	FIP	5'-CTGGGGCGAGGTCGTGGTAT-TCCGACAAACACCACGAATT-3'
	BIP	5'-CATTTTGCAGCTGTACGCTCGC-AGCCCATCATGAATGTTGCT-3'

## Συσκευή-τσιπ μικρορευστομηχανικής (microfluidic analytical device)

Όλες οι συσκευές μικρορευστομηχανικής που δοκιμάστηκαν σχεδιάστηκαν με το σχεδιαστικό πακέτο Autodesk Fusion 360.



**Εικόνα 3.3:** Ο 3D εκτυπωτής Phrozen sonic mini 4κπου χρησιμοποιήθηκε



**Εικόνα 3.4:** Μερικά από τα σχέδια που δοκιμάστηκαν

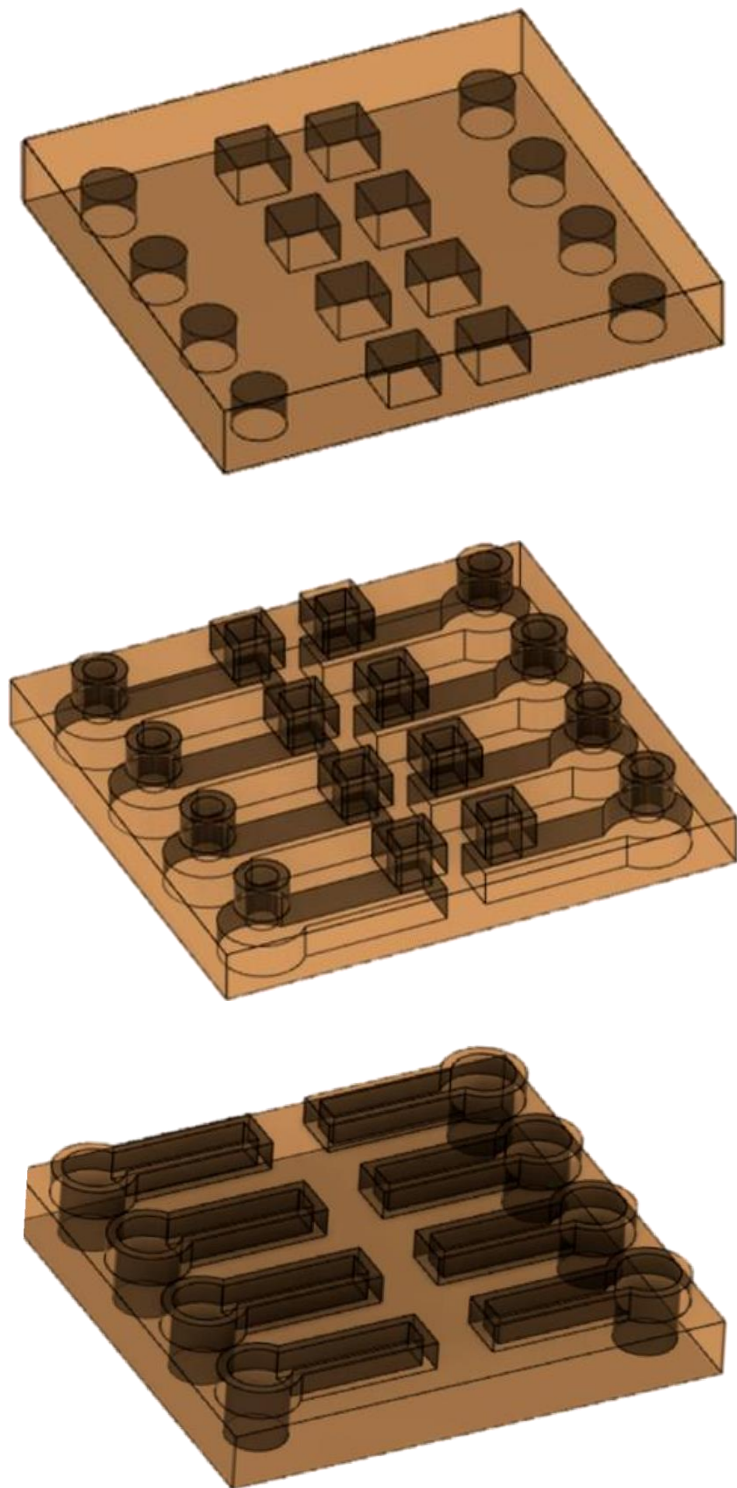
Το σχέδιο που επικράτησε είχε τα χαρακτηριστικά: διαστάσεις 24×22×9mm και κανάλια διαμέτρου 1.5mm για την καλύτερη και ευκολότερη ροή των αντιδραστηρίων. Έπειτα το σχέδιο επεξεργάστηκε σε λογισμικό chitubox, με τις εξής βέλτιστες ρυθμίσεις: Exposure time: 2 sec, Lift Distance: 6 mm, Lift speed 65 mm/min, Bottom exposure time: 12 sec, Layer height: 0.040 mm, Retract Speed: 120 mm/min. Ο εκτυπωτής ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την εκτύπωση ήταν ένας 3D εκτυπωτής Phrozen sonic mini 4k, με διάφανη υγρή ρητίνη PRIMA Value UV Resin STANDARD CLEAR πυκνότητας 1.1 g/mL ως υλικό εκτύπωσης.



**Εικόνα 3.5:** εκτυπωμένες συσκευές μικρορευστομηχανικής



Οι συσκευές μικρορευστομηχανικής που εκτυπώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αποτελούνταν από τρία μέρη: το καπάκι, το ενδιάμεσο τμήμα και τη βάση.



**Εικόνα 3.5:** Με τη σειρά τα τρία μέρη της τελικής συσκευής με οκτώ κανάλια

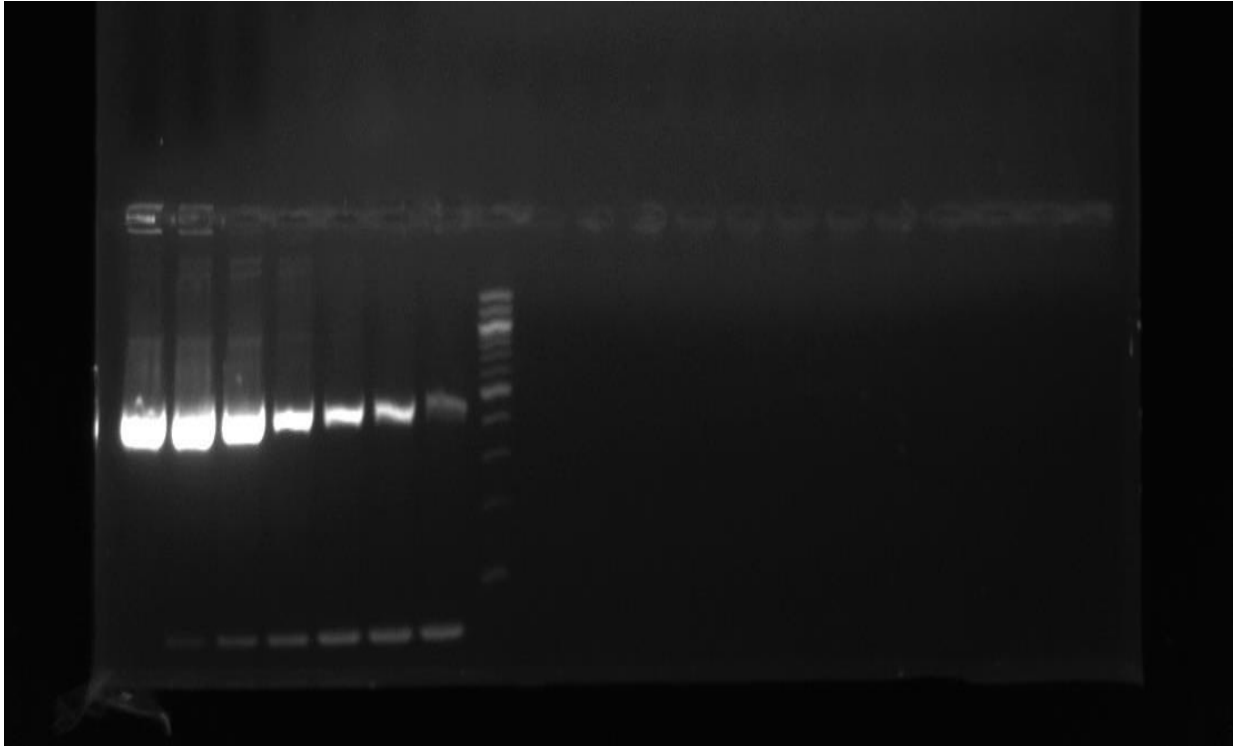
## Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα και συζήτηση

**Πίνακας 4.1:** Σύγκριση ορίων ανίχνευσης των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν

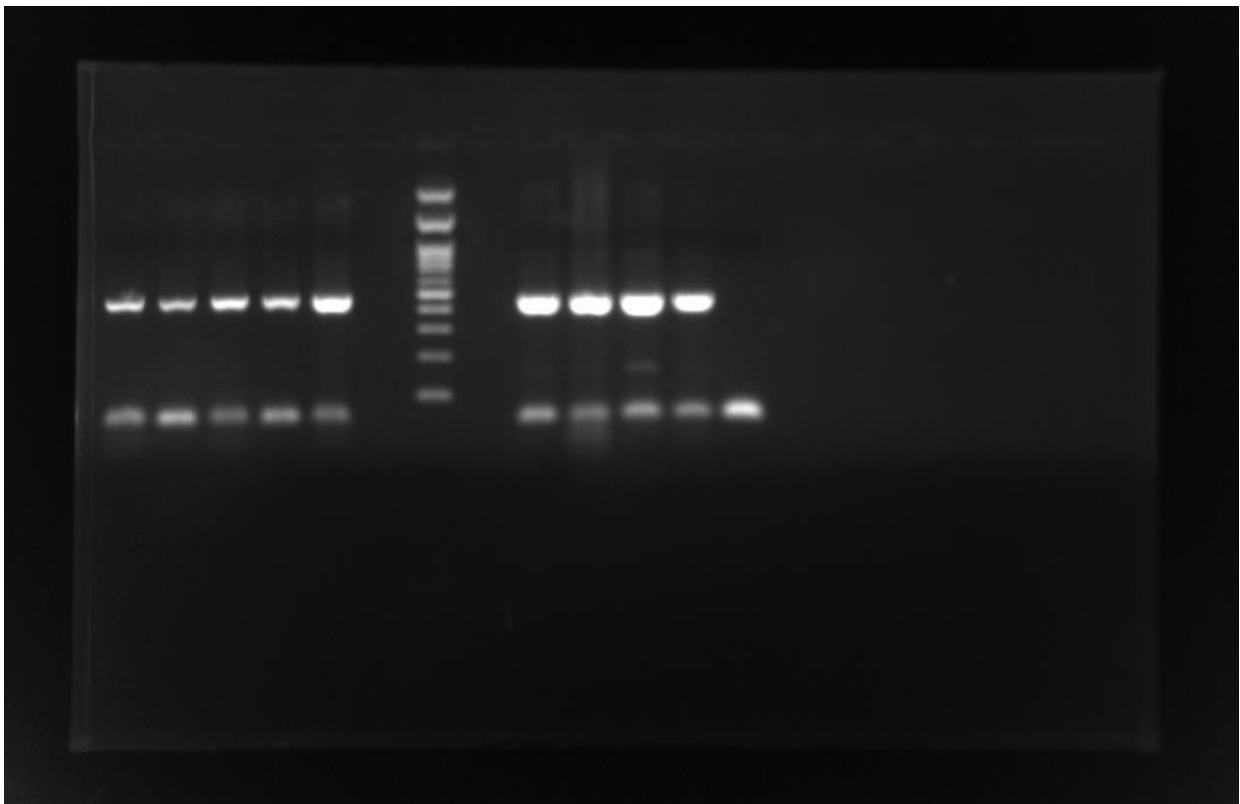
Δείγμα	Μικροοργανισμός	Μέθοδος εκχύλισης του DNA	PCR	LAMP
Κοτόπουλο	<i>L. monocytogenes</i>	1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
		2	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
		2	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
Γάλα	<i>L. monocytogenes</i>	1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
		2	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
		2	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
Νερό	<i>L. monocytogenes</i>	1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
		2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
		2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
Μαρούλι	<i>L. monocytogenes</i>	1	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>
		2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	1	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>
		2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
	<i>E. coli</i>	1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
		2	10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>

- 1) NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel, Duren, Germany)
- 2) In-house extraction method

Παρακάτω παρουσιάζονται εικόνες για την ηλεκτροφόρηση καθώς και για τη διαδικασία της LAMP και τη δοκιμή σε τσιπ μικρορευστομηχανικής των δειγμάτων που αναλύθηκαν στην πορεία των πειραμάτων αναλυτικά.

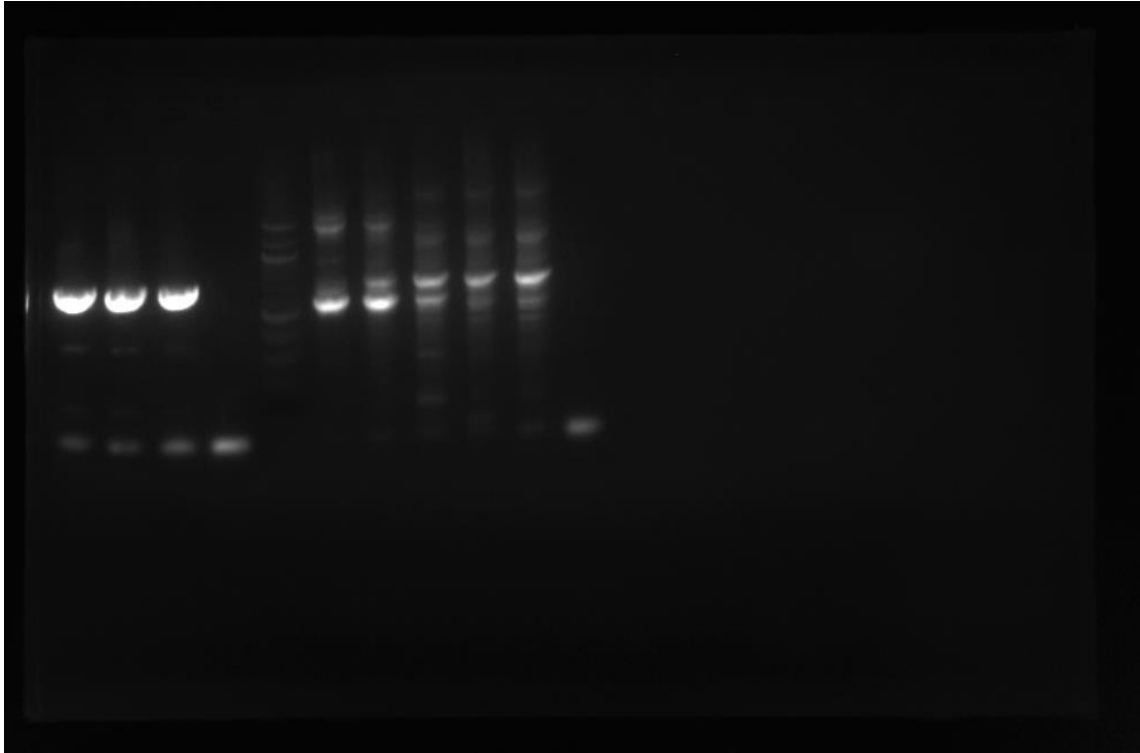


**Εικόνα 4.1:** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με *L. monocytogenes*. Απομόνωση με NucleoSpin® Food.

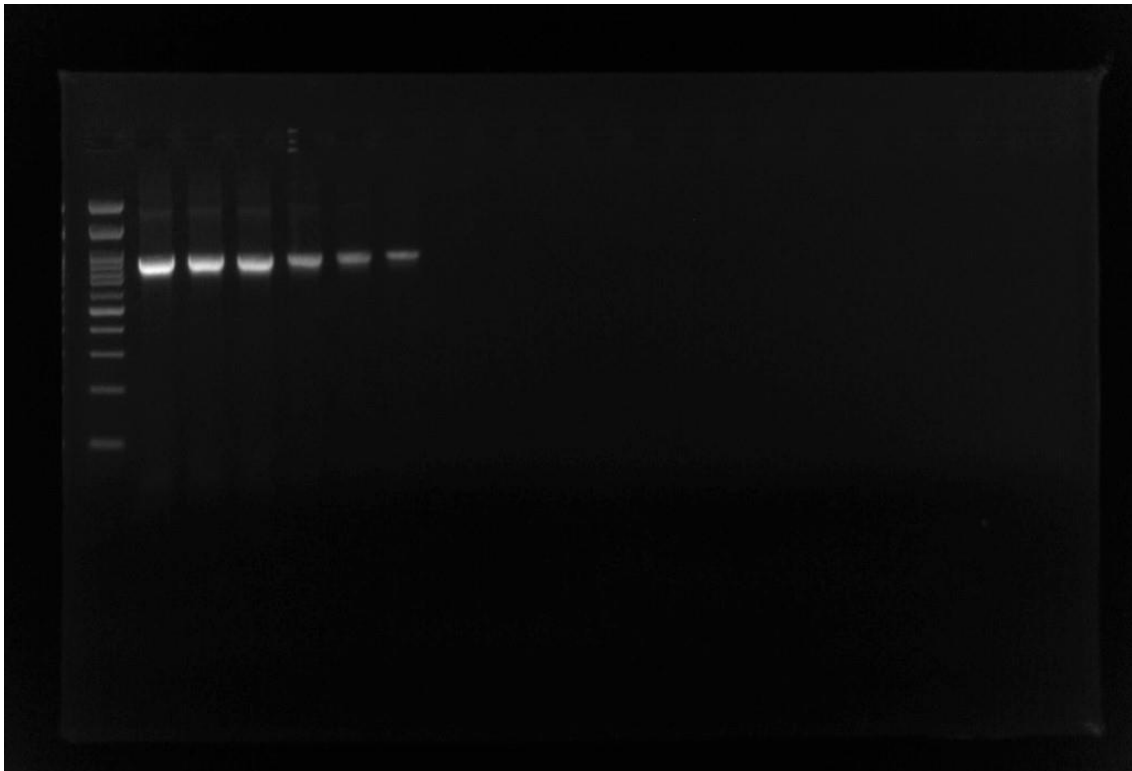


**Εικόνα 4.2:** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με *L. monocytogenes*. Απομόνωση με την in-house τεχνική.

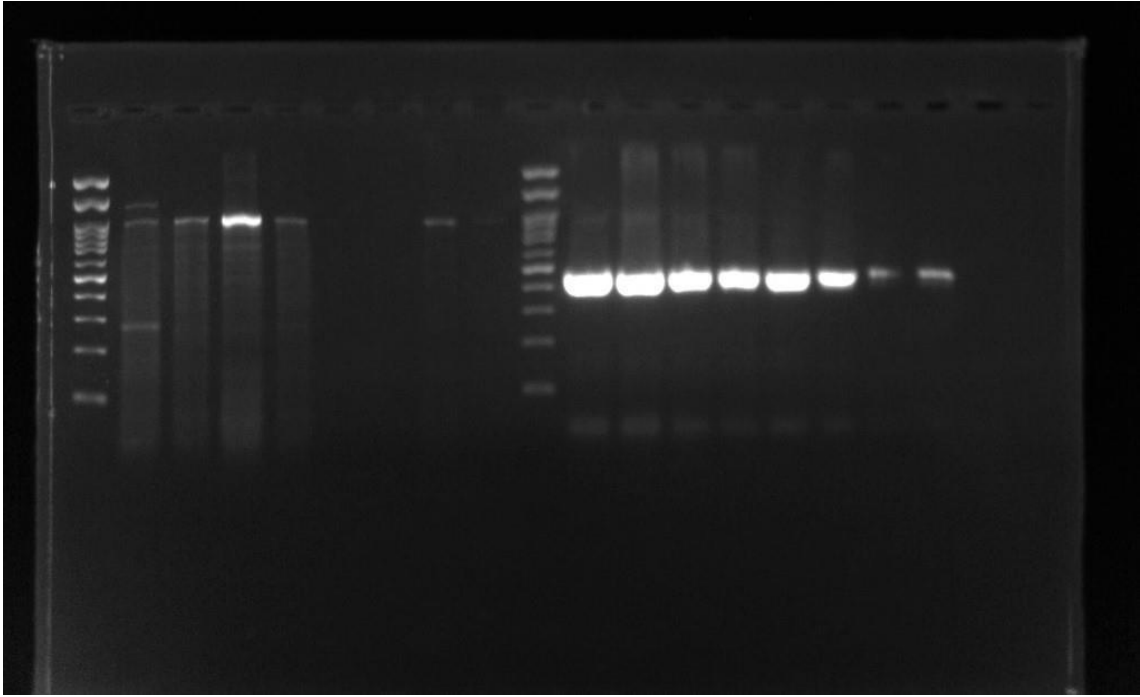




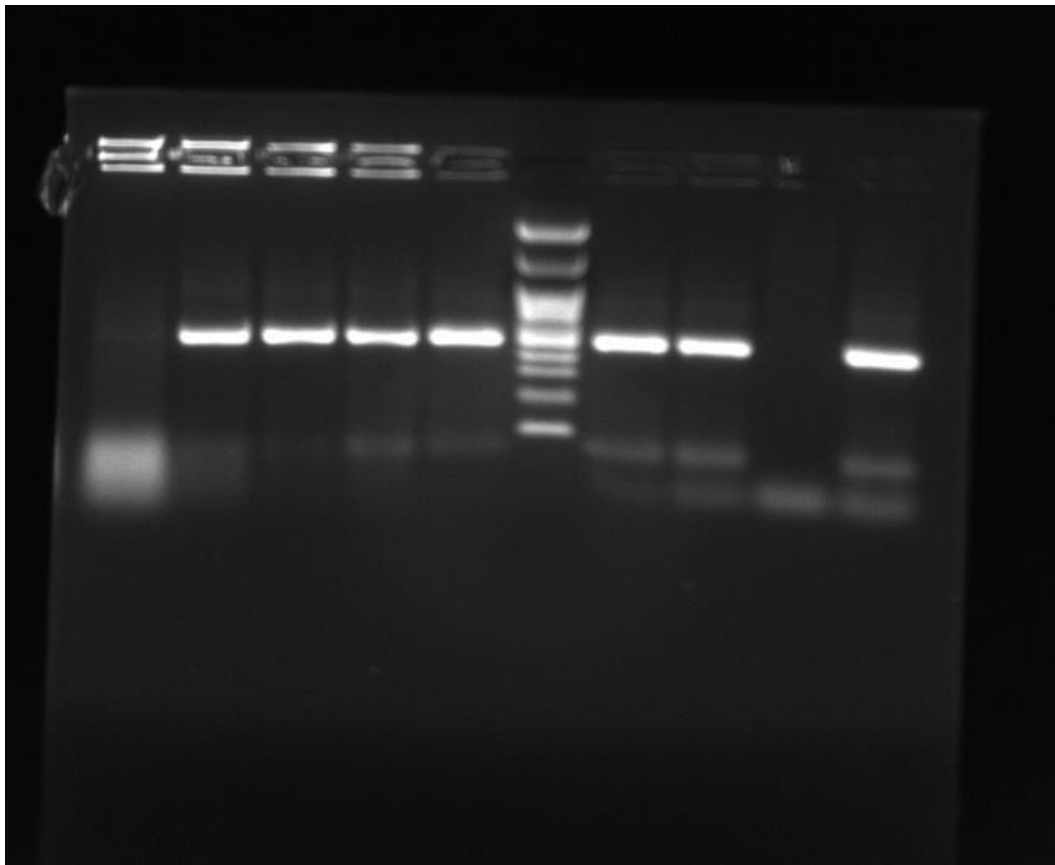
**Εικόνα 4.3:** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με *E. coli*.  
Απομόνωση με NucleoSpin® Food.



**Εικόνα 4.4:** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με *E. coli*.  
Απομόνωση με την in-house τεχνική.



**Εικόνα 4.5:** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με *S. Typhimurium*. Απομόνωση με NucleoSpin® Food.

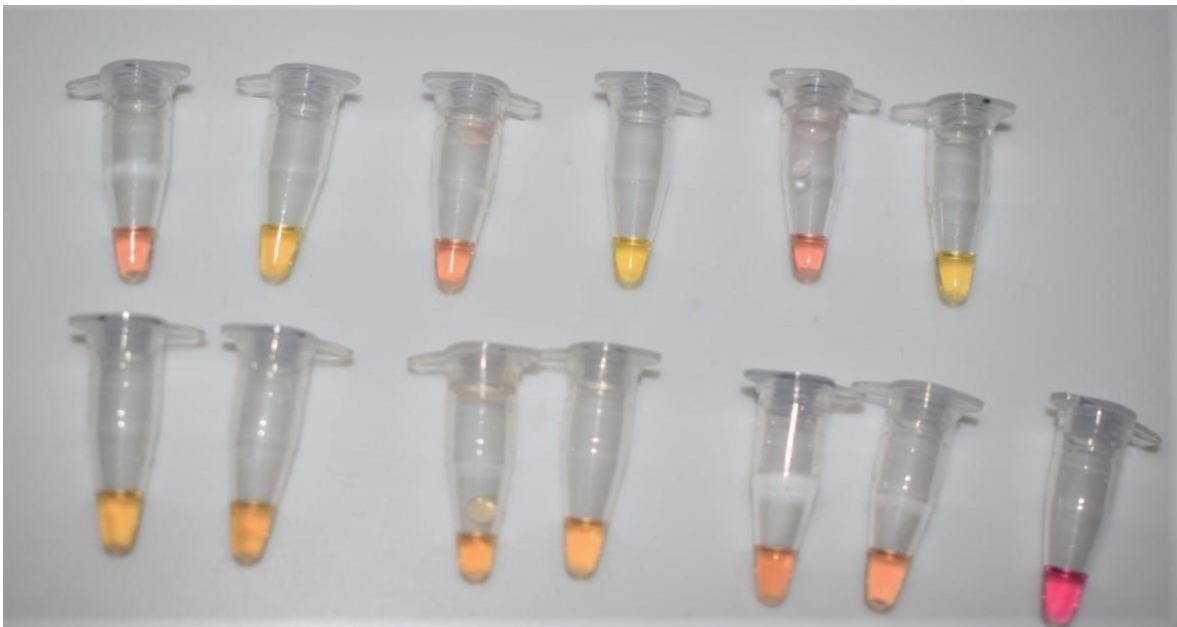


**Εικόνα 4.6:** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με *S. Typhimurium*. Απομόνωση με την in-house τεχνική.



**Εικόνα 4.7:** LAMP σε δείγματα μαρουλιού επιμολυσμένα με *S. Typhimurium* σε δυάδες. Τελευταίο σωληνάκι κοντρόλ.

Τα σωληνάκια είναι παρατεταγμένα από την συγκέντρωση βακτηρίων  $10^6$  προς τη  $10^1$ . Απομόνωση με NucleoSpin® Food αριστερά στη δυάδα και απομόνωση με την in-house τεχνική στα δεξιά.



**Εικόνα 4.8:** LAMP σε δείγματα μαρουλιού επιμολυσμένα με *L. monocytogenes* σε δυάδες. Τελευταίο σωληνάκι κοντρόλ.

Τα σωληνάκια είναι παρατεταγμένα από την συγκέντρωση βακτηρίων  $10^6$  προς τη  $10^1$ . Απομόνωση με NucleoSpin® Food αριστερά στη δυάδα και απομόνωση με την in-house τεχνική στα δεξιά.



**Εικόνα 4.9:** LAMP σε δείγματα μαρουλιού επιμολυσμένα με *E. Coli* σε δυάδες. Τελευταίο σωληνάκι κοντρόλ.

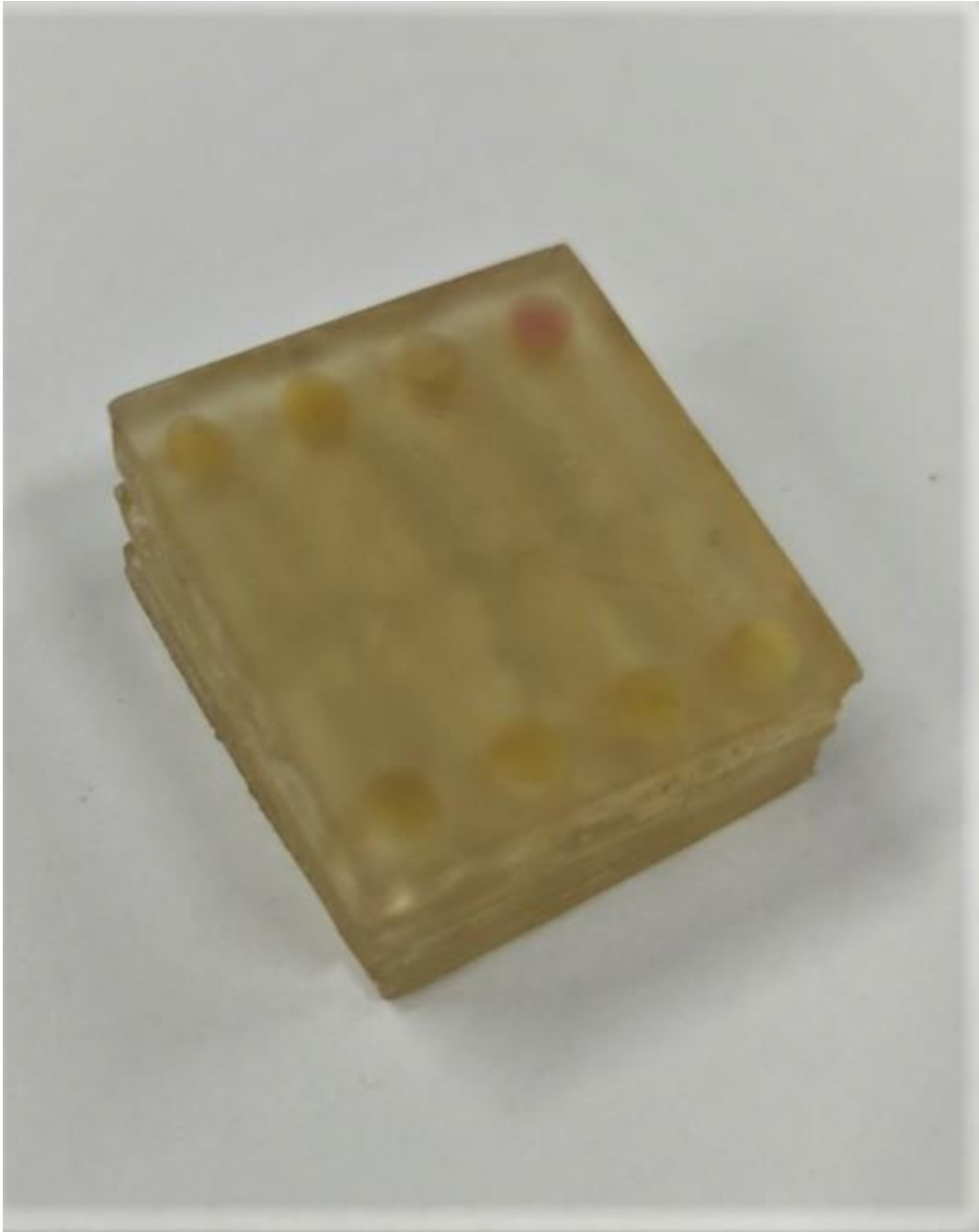
Τα σωληνάκια είναι παρατεταγμένα από την συγκέντρωση βακτηρίων  $10^6$  προς τη  $10^1$ . Απομόνωση με NucleoSpin® Food αριστερά στη δυάδα και απομόνωση με την in-house τεχνική στα δεξιά.



**Εικόνα 4.10:** Απεικόνιση της χρωματικής αλλαγής στις διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις στο πέρας της διαδικασίας της LAMP.



**Εικόνα 4.11:** LAMP σε δείγματα μαρουλιού επιμολυσμένα με τα βακτήρια στις διαδοχικές δεκαδικές τους αραιώσεις. Απομόνωση με την in-house τεχνική. Τα σωληνάκια είναι παρατεταγμένα από την υψηλότερη συγκέντρωση βακτηρίων ( $10^8$ ) προς τη μικρότερη ( $10^1$ ). Τελευταίο σωληνάκι κοντρόλ.



**Εικόνα 4.12:** Δοκιμή ανίχνευσης σε εκτυπωμένη συσκευή μικρορευστομηχανικής

Όσον αφορά τη δοκιμή της LAMP, τα αποτελέσματα των πειραμάτων επιβεβαιώνουν τη βιβλιογραφία σχετικά με την αποτελεσματικότητά της και συνεπώς για τη μετέπειτα χρήση αλλά και εξέλιξη της μεθόδου. Όπως παρουσιάστηκε ανωτέρω, με εξαίρεση ένα πειραματικό αποτέλεσμα (δείγμα μαρουλιού επιμολυσμένο με *L. monocytogenes* και απομόνωση με NucleoSpin® Food), η μέθοδος της LAMP κατάφερε να ανιχνεύσει αριθμό βακτηριακών κυττάρων τουλάχιστον ίσο με αυτό της εφαρμοσμένης διαδικασίας της PCR – ηλεκτροφόρησης, αν όχι μικρότερο, με χαρακτηριστικό παράδειγμα για τη δεύτερη περίπτωση τα πειραματικά αποτελέσματα των επιμολύνσεων σε πόσιμο νερό. Το γεγονός αυτό φανερώνει την μεγάλη ακρίβεια της μεθόδου, την αξιοπιστία της και τη δυνατότητά της για μελλοντική εξέλιξη, ευρεία χρήση και βιομηχανική εφαρμογή στον τομέα ελέγχου των τροφίμων και όχι μόνο.

Η in-house τεχνική απομόνωσης DNA παρουσίασε επίσης θεαματικά αποτελέσματα, μιας που τα όρια ανίχνευσης βρέθηκαν πολύ κοντά με αυτά του εμπορικού kit για κάθε βακτήριο, με διαφορά μόλις μία λογαριθμική μονάδα. Ταυτόχρονα διατήρησε τα πλεονεκτήματα της ταχύτερης πορείας της διαδικασίας, της ευκολίας και της επαναληψιμότητας της μεθόδου και κατά κύριο λόγο του σημαντικά μικρότερου κόστους, σε σχέση με το εμπορικό kit απομόνωσης. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, η in-house τεχνική απομόνωσης DNA φάνηκε να λειτουργεί άψογα σε συνδυασμό με τη μέθοδο της LAMP, χωρίς να παρουσιάζει τυχόν σημαντικά προβλήματα, όπως ακριβώς και τα αντιδραστήρια ενός εμπορικού kit απομόνωσης βακτηριακού DNA.

Τα δείγματα που δοκιμάστηκαν σε εκτυπωμένη συσκευή μικρορευστομηχανικής, αφού επιτυχώς αναλύθηκαν και έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα στα microtubes της LAMP, δεν παρουσίασαν κανένα πρόβλημα σχετικά με τις ρεολογικές ιδιότητες, την απαίτηση μικρών όγκων δειγμάτων και αντιδραστηρίων, ή την ποιότητα της εκτύπωσης. Έδωσαν έγκυρα αποτελέσματα, εύκολα στη διάγνωση και σε εξαιρετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Συνολικά αποδείχθηκε ότι τα τσιπ μικρορευστομηχανικής είναι ένας έξυπνος και αξιόπιστος τρόπος ταχείας ανάλυσης δειγμάτων επιμολυσμένων τροφίμων, με αποτελέσματα ακόμη και σε πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης και μικρό κόστος σε αντιδραστήρια, κόπο και χρήμα.

Η χρήση των τσιπ αυτών σε συνδυασμό με τη μέθοδο της LAMP αποτελεί μία πολύ δυνατή λύση για όλα τα εργαστήρια και η μελλοντική εφαρμογή της σε μεγαλύτερες κλίμακες είναι πολλά υποσχόμενη.



## Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα και προτάσεις για μελλοντική εξέλιξη

Η in-house τεχνική απομόνωσης φάνηκε να είναι το ίδιο αποτελεσματική με το εμπορικό kit ανίχνευσης δίνοντας αξιόπιστα αποτελέσματα σε μικρό χρονικό διάστημα και ταυτόχρονα με πολύ χαμηλότερο κόστος. Σε συνδυασμό τόσο με τη μέθοδο της PCR – ηλεκτροφόρησης, όσο και με τη LAMP, τα όρια ανίχνευσης ήταν τα αναμενόμενα και είχαν πολύ μικρές αποκλίσεις μεταξύ τους. Συμπερασματικά η in-house τεχνική απομόνωσης θα μπορούσε κάλλιστα να χρησιμοποιηθεί εντατικά από ένα εργαστήριο για πληθώρα δειγμάτων, αλλά και να εξελιχθεί με σκοπό την ευρεία βιομηχανική της εφαρμογή. Δεδομένου ότι το οικονομικό κόστος είναι ένας από τους κύριους παράγοντες επιλογής μιας μεθόδου έναντι άλλων, η τεχνική αυτή θα μπορούσε να καθιερωθεί ως η βασική τεχνική ανάλυσης δειγμάτων σε εργαστήρια με μεγάλο όγκο ημερησίων αναλύσεων.

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της LAMP επιβεβαίωσαν τη φήμη που τη διακρίνει ως μία εξαιρετικά αξιόπιστη μέθοδο με μεγάλη επαναληψιμότητα. Τα όρια ανίχνευσης φάνηκαν να είναι αρκετά μικρά, γεγονός που καθιστά τη LAMP μία μέθοδο με υψηλή ευαισθησία. Συγκρίνοντάς την με την PCR, η LAMP είναι πιο γρήγορη, αφού δεν απαιτεί περεταίρω διεργασίες όπως η ηλεκτροφόρηση, έχει πολύ μικρότερα περιθώρια σφάλματος, χρησιμοποιώντας περισσότερα από ένα ζευγάρια εκκινητών και η ανάγνωση των αποτελεσμάτων της είναι απλούστερη, αφού αρκεί μόνο η αλλαγή του χρώματος του περιεχόμενου υγρού στο σωλήνα για να χαρακτηριστεί η αντίδραση ως θετική ή αρνητική. Η αποβολή πρωτονίων από την αλυσίδα του DNA αλλάζει το pH του διαλύματος και συνεπώς το χρώμα από ροζ μεταβάλλεται σε αποχρώσεις του κίτρινου χάρη στους ειδικούς δείκτες pH που περιέχει στο έτοιμο master mix της. Ταυτόχρονα, καθώς διεκπεραιώνεται σε σταθερή θερμοκρασία, η μέθοδος της LAMP δεν απαιτεί θερμοκυκλοποιητή, συνεπώς είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και από λιγότερο εξοπλισμένα εργαστήρια. Η ορθότητα της μεθόδου και η συνέπειά της στα αποτελέσματα δεν σταμάτησε στους δοκιμαστικούς σωλήνες, αλλά εφαρμόστηκε επιτυχώς και στις 3D συσκευές – τσιπ μικρορευστομηχανικής.

Οι εκτυπωμένες συσκευές ανάλυσης (microfluidic analytical devices) αποδείχθηκαν εύκολες και γρήγορες στην παραγωγή, καθώς έχοντας καταλήξει στο σχέδιο με τις



βέλτιστες προδιαγραφές, ήταν δυνατόν να παραχθεί μεγάλος αριθμός αντιγράφων απλά προσθέτοντας επιπλέον ρητίνη. Το σχέδιο που επικράτησε των υπολοίπων είχε τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης μέχρι και οκτώ δειγμάτων, αριθμός κατάλληλος για τις ανάγκες των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Με έναν απλό 3D εκτυπωτή και τις κατάλληλες ρυθμίσεις στο σχεδιαστικό πρόγραμμα FUSION 360, οι εκτυπωμένες συσκευές δούλεψαν άψογα, δίνοντας αποτελέσματα με την αξιοπιστία της LAMP σε μικρό χρονικό διάστημα, με ελάχιστο εξοπλισμό και πλήρη δυνατότητα επανάληψης των αποτελεσμάτων σε επόμενο πείραμα.

Σε ένα μικρό τσιπ μικρορευστομηχανικής είναι δυνατόν να συγκεντρωθούν πολλαπλά στάδια ανίχνευσης δείγματος, μεγάλος αριθμός δειγμάτων, ανάλογα με τις ανάγκες του εργαστηρίου και όλα αυτά με μικρό κόστος, απαίτηση εξειδικευμένου εξοπλισμού και απασχόληση ανθρώπινου δυναμικού. Έχοντας ποικιλία στον αριθμό των καναλιών, τα προς ανίχνευση δείγματα μπορούν να μεταφερθούν σε πολλαπλές μονάδες αντίδρασης ταυτόχρονα μέσω του δικτύου. Έχουν χαρακτηριστικά υψηλής απόδοσης σε σύγκριση με τη συμβατική ανίχνευση κάθε αντίδρασης ξεχωριστά. Ακόμη, η κατανάλωση αντιδραστηρίων και δείγματος είναι ελάχιστη.

Μελλοντικά τα τσιπ μικρορευστομηχανικής ενδέχεται να μελετηθούν ευρύτερα και να επεκταθεί το πεδίο εφαρμογής τους σε βιομηχανική κλίμακα. Σε εξέλιξη της τεχνολογίας αυτής, τσιπ μικρορευστομηχανικής μπορεί να σχεδιαστούν ώστε τελικά να κάνουν ολόκληρη την ενσωμάτωση και την ανίχνευση σε μικροκλίμακα και αυτοματοποιημένα.

Ο συνδυασμός της μεθόδου της LAMP με την τεχνολογία των τσιπ μικρορευστομηχανικής, καθώς και με την in-house τεχνική απομόνωσης DNA, είναι πολλά υποσχόμενος και όντας μία πολύ αξιόπιστη αλλά και οικονομική μέθοδος ανίχνευσης ίσως εξαπλωθεί σε πολλούς τομείς ενδιαφερόντων στο κοντινό μέλλον. Μπορεί επίσης να αποτελέσει μία από τις πλέον χρησιμοποιούμενες και εφαρμόσιμες μεθόδους με κύρια θέση στην καθημερινότητα των προηγμένων εργαστηρίων ανάλυσης.

## Βιβλιογραφία

- A.D., Russell. «Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure.» *Science Progress*, 2003: 115-137.
- Ali A Dashti, Mehrez M Jadaon, Abdulsamad M Abdulsamad, Hussein M Dashti. «Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques.» *Kuwait Medical Journal*, 2009: 117-122.
- Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, Garaizar J. «Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of salmonella in human clinical samples.» *Journal of Clinical Microbiology*, April 2004.
- Aziz, A., Abbas, M. A., Siddique, N., Shah, A., Rahim, A., Rafique, S., Khan, A., Midrarullah, Khan, S., Rashid, F., Hui, Y., & Suleman, M. «Development of multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of E. coli (APEC), Salmonella, Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae.» *Gene Reports*, February 2021.
- Brown, T. A. *Γονιδιώματα*. Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣΕΠΕ, 2010.
- Clark MA, Barret EL. «The phs gene and hydrogen sulfide production by Salmonella typhimurium.» *Journal of Bacteriology*, June 1987.
- Crump JA, Mintz ED. «Global trends in typhoid and paratyphoid Fever.» *Clinical Infectious Diseases*, January 2010: 241-246.
- D' Aoust, Jean Yves. «Salmonella and the international food trade.» *International Journal of Food Microbiology*, December 1994: 11-31.
- D. Shatleh-Rantisi, A. Tamimi, Y. Ashhab. «Improving sensitivity of single tube nested PCR to detect fastidious microorganisms.» *Heliyon*, January 2020.
- Deng H., Gao Z. «Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques.» *Analytica Chimica Acta*, 2015: 30-45.
- EFSA Journal*. «The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014.» 2015.
- Foley S.L., Lynne A.M., Nayak R. «Salmonella challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates.» *Journal of Animal Science*, 2008.
- Fredricks, D. N., Smith, C., & Meier, A. «Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR.» *Journal of Clinical Microbiology*, 2005: 5122-5128.
- GA, Tortora. *Microbiology: An Introduction (9th ed.)*. Pearson, 2008.

Hal R. Holmes, Morgan Haywood, Ruby Hutchison, Qian Zhang, Connor Edsall, Timothy L. Hall, David Baisch, Jason Holliday, Eli Vlaisavljevich. «Focused ultrasound extraction (FUSE) for the rapid extraction of DNA from tissue matrices.» *Methods in Ecology and Evolution*, 9 October 2020: 1599-1608.

Hongwei Gao, Chunlei Yan, Wei Wu and Juan Li. «Application of Microfluidic Chip Technology in Food Safety Sensing.» *Sensors*, 15 March 2020.

James D. Watson, Amy A. Caudy, Richard M. Myers, Jan A. Witkowski.  
*ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ DNA, Γονίδια και γονιδιώματα - Μια συνοπτική παρουσίαση*. Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., 2007.

Kim JH, Jung S, Oh SW. «Combination of bacteria concentration and DNA concentration for rapid detection of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, and *S. Typhimurium* without microbial enrichment.» *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 2020.

Lee, S., Khoo, V. S. L., Medriano, C. A. D., Lee, T., Park, S. Y., & Bae, S. «Rapid and in-situ detection of fecal indicator bacteria in water using simple DNA extraction and portable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) PCR methods.» *Water Research*, 1 September 2019: 371-379.

Marquis H, Drevets DA, Bronze M S, et al. «Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in Humans.» Στο *Human Emerging and Re-emerging Infections: Viral and Parasitic Infections*, του/της S.K. Singh, 749–772. USA : Willey-Blackwell, 2016.

Niessen L., Luo J., Denschlag C., Vogel R. F. «The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for.» *Food Microbiology*, 2013.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, . «Loop-mediated isothermal amplification of DNA.» *Nucleic Acids Research*, 2000.

Parry CM, Beeching NJ. «Treatment of enteric fever.» *BMJ*, June 2009.

Radoshevich L, Cossart P. «*Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis.» *Nature Reviews Microbiology*, 2017.

Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM. «*Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis.» *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, February 2007: 4-13.

Rohde, A., Hammerl, J. A., Boone, I., Jansen, W., Fohler, S., Klein, G., Dieckmann, R., & Al Dahouk, S. «Overview of validated alternative methods for the detection of food bacterial pathogens.» *Trends in Food Science and Technology*, 2017: 113-118.

- S A Papatheodorou, P Halvatsiotis, D Houhoula. «A comparison of different DNA extraction methods and molecular techniques for the detection and identification of foodborne pathogens.» *AIMS Microbiology*, 9 September 2021.
- Santos RL, Tsohis RM, Adams LG, et al. «Pathogenesis of Salmonella-induced enteritis.» *Braz J Med Biol Res*, 2003.
- Sayad A, Ibrahim F, Uddin MS, et al. «A microdevice for rapid, monoplex and colorimetric detection of foodborne pathogens using a centrifugal microfluidic platform.» *Biosensors and Bioelectronics*, 2018.
- Soe GB, Overturf GD. «Treatment of typhoid fever and other systemic salmonellosis with cefotaxime, ceftriaxone, cefoperazone, and other newer cephalosporins.» *Oxford Journals*, 1987: 719-736.
- Su LH, Chiu CH. «Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature.» *Chang Gung Medical Journal*, 2007.
- Van de Giessen, A.W. «Intervention strategies for Salmonella enteritidis in poultry flocks: a basic approach.» *International Journal of Food Microbiology*, 1994: 145-154.
- W.GuntherIV, James L.SmithPina M.FratamicoNereus. «Shiga Toxin-Producing Escherichia coli.» *Advances in Applied Microbiology*, 2014.
- Wain J, Hendriksen RS, Mikoleit ML, Keddy KH, Ochiai RL. «Typhoid fever .» *Lancet*, March 2015: 1136-1145.
- Wales A., Davies R. H., Barrow P. A., Methner U. «Environmental aspects of Salmonella » Στο *Salmonella in Domestic Animals* , του/της Barrow P. A., Methner U., 399-425. Wallingford, UK: CABI, 2013.
- Ward TJ, Gorski L, Borucki MK, Mandrell RE, Hutchins J, Pupedis K. «Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the prfA virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*.» *Journal of Bacteriology*, August 2004: 4994-5002.
- Wu, J., Kodzius, R., Cao, W., & Wen, W. «Extraction, amplification and detection of DNA in microfluidic chip-based assays.» *Microchimica Acta*, 2014: 1611-1631.
- Xu, Y. G., Liu, Z. M., Zhang, B. Q., Qu, M., Mo, C. S., Luo, J., & Li, S. L. «Development of a novel target-enriched multiplex PCR (Tem-PCR) assay for simultaneous detection of five foodborne pathogens.» *Food Control*, 2016: 54-59.
- Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, et al. «Molecular pathogenesis of Salmonella enterica serotype typhimurium-induced diarrhea.» *Infection and Immunity*, 2003.
- Δ. Τυμπής, Ελ. Πετράκης, Σπ. Κοντελής. *ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ: Μεθοδολογία και τεχνικές αναλύσεων*. Δίσιγμα, 2016.

Κοτζεκίδου. *Μικροβιολογία τροφίμων & μικροβιολογική ανάλυση τροφίμων*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Γιαχούδη, 2009.

Μπατρίνου, Ανθμία Μ. *Σύγχρονη Βιοτεχνολογία Τροφίμων- γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα*. Π.Χ. Πασχαλίδης, 2011.

Σπηλιώτης Β., Γιαβάσης Ι.(επιμ.). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Αθήνα : Ίων , 2010.

Τσάκνης, Γιάννης. *Διασφάλιση Ποιότητας Τροφίμων*. Αθήνα: Παπασωτηρίου, 2009.