



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανίχνευση *Salmonella spp.* και *Escherichia coli* με
μοριακές τεχνικές σε οπωροκηπευτικά**

Όνοματεπώνυμο Φοιτητή: Ανυφαντή Αντιγόνη

Αριθμός Μητρώου: 19684006

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Χούχουλα Δήμητρα

Αθήνα 2023

ΘΕΜΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ

«Ανίχνευση *Salmonella* spp. και *Escherichia coli* με μοριακές τεχνικές σε οπωροκηπευτικά»

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

01	ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ	
02	ΤΣΑΚΑΛΗ ΕΥΣΤΑΘΙΑ	
03	ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη ΑΝΥΦΑΝΤΗ ΑΝΤΙΓΟΝΗ του ΓΕΩΡΓΙΟΥ, με αριθμό μητρώου 19684006 φοιτήτρια 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/Η Δηλών/ούσα



Ευχαριστίες

Για την επιτυχή ολοκλήρωση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της. Ειδικότερα, να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Χούχουλα Δήμητρα για την ανάθεση της εργασίας, την συνεργασία της και την πολύτιμη καθοδήγησή της. Κατόπιν να ευχαριστήσω και την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Δέσποινα Βουγιουκλάκη για την, επίσης, κομβική συμβολή της κατά την εκπόνηση του πειράματος.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί αύξηση των κρουσμάτων από τροφιμογενείς λοιμώξεις, λόγω κατανάλωσης τροφίμων που είχαν επιμολυνθεί από τα παθογόνα βακτήρια *Salmonella spp.* και *Escherichia coli*. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιορίσει την συχνότητα εμφάνισης των συγκεκριμένων μικροοργανισμών σε οπωροκηπευτικά προϊόντα του εμπορίου συσκευασμένα ή μη. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε εξειδικευμένο kit απομόνωσης DNA για τρόφιμα, και συγκεκριμένα το NucleoSpin® Food, MACHEREY-NAGEL, και στην συνέχεια με την βοήθεια θερμοκυκλοποιητή και κατάλληλων εκκινητών επιτεύχθηκε ανάλυση PCR για τον πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών, που υπάρχουν στα βακτήρια αυτά. Τέλος, για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, ώστε να παρατηρηθεί το πήκτωμα κάτω από λάμπα UV. Τα δείγματα του εμπορίου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν χωρισμένα σε έξι κατηγορίες: συσκευασμένες σαλάτες, συσκευασμένα φύλλα από σπανάκι, ντομάτες, καρότα, μαρούλια και φράουλες. Η επιλογή αυτών των τροφίμων δεν έγινε τυχαία, αλλά πρόκειται για τρόφιμα που καταναλώνει σε μεγάλο βαθμό συχνότητας ο μέσος Έλληνας. Η έρευνα έδειξε πως στο 5,56% των δειγμάτων παρατηρήθηκε παρουσία της *Salmonella spp.*, ενώ η *Escherichia coli* απουσίαζε σε όλα τα δείγματα. Συμπερασματικά, αυτό το αποτέλεσμα αιτιολογεί την αύξηση κρουσμάτων σαλμονέλλωση το 2021 και υπάρχει χώρος για περαιτέρω διερεύνηση στα συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα προϊόντα.

Abstract

The past couple of years there has been an increase in cases of foodborne infections due to the consumption of food that was contaminated with the pathogenic bacteria *Salmonella spp.* and *Escherichia coli*. The aim of this study was to determine the frequency of contamination in packaged or non-packaged fruit and vegetable products from these microorganisms. During this experimental procedure, a DNA isolation kit specifically for food, namely NucleoSpin® Food, MACHEREY-NAGEL, was used and then with the help of a thermal cycler and the right primers, PCR analysis was achieved for the amplification of selected sequences that are presented in these bacteria. Finally, to analyse the results, agarose gel electrophoresis was performed in order to observe the gel under a UV lamp. The samples were divided into six categories: packaged salads, packaged spinach leaves, tomatoes, carrots, lettuce and strawberries. These fruits and vegetables were chosen because they are highly consumed in Greece. The survey showed that *Salmonella spp* was found in 5.56% of the samples, while *Escherichia coli* was absent in all samples. In conclusion, this result justifies the increase in Salmonellosis cases in 2021 and there is space for further investigation in modified atmosphere packaged products.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	1
Περίληψη.....	2
Abstract.....	3
Ευρετήριο Εικόνων.....	6
Ευρετήριο Πινάκων.....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1. Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα.....	8
1.2. Σημασία παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα.....	8
1.3. Επιδημιολογικά στοιχεία.....	10
1.4. Αντίστοιχες έρευνες.....	11
2. Σκοπός.....	14
3. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση.....	15
3.1. <i>Salmonella spp</i>	15
3.1.1. Γενικά.....	15
3.1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της <i>Salmonella</i>	18
3.1.3. Πηγές <i>Salmonella spp</i>	19
3.1.4. Συμπτώματα Σαλμονέλλωσης.....	20
3.1.5. Μολυσματική δόση.....	21
3.1.6. Ασθένεια από <i>Salmonella</i>	21
3.1.7. Μέτρα Πρόληψης.....	21
3.2. <i>Escherichia coli</i>	22
3.2.1. Γενικά.....	22
3.2.2. Παθογόνα είδη <i>Escherichia coli</i>	23
3.2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του <i>Escherichia coli</i>	24
3.2.4. Πηγές <i>Escherichia coli</i>	25
3.2.5. Συμπτώματα τροφικής λοίμωξης από <i>Escherichia coli</i>	26
3.2.6. Μολυσματική δόση.....	26
3.2.7. Μέτρα για την πρόληψη της τροφική λοίμωξης από <i>Escherichia coli</i>	27

3.3.	Ανίχνευση μικροοργανισμών με μοριακές τεχνικές στα τρόφιμα.....	27
3.3.1.	Απομόνωση DNA.....	27
3.3.2.	Έλεγχος καθαρότητας DNA.....	32
3.3.3.	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	32
3.3.4.	Ηλεκτροφόρηση.....	39
4.	Υλικά και Μέθοδοι.....	44
4.1.	Συσκευές.....	44
4.2.	Υλικά.....	44
4.3.	Διαλύματα.....	45
4.4.	Περιγραφές Συσκευών.....	45
4.5.	Δειγματοληψία.....	50
4.6.	Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA.....	51
4.7.	Πρωτόκολλο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).....	53
4.8.	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης.....	57
	Αποτελέσματα.....	60
	Συζήτηση.....	62
	Συμπεράσματα.....	63
	Βιβλιογραφία.....	64

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 3.1: Βακτήρια <i>Salmonella spp.</i>	15
Εικόνα 3.2: Βακτήρια <i>Escherichia coli</i>	22
Εικόνα 3.3: Διαδικασία απομόνωσης DNA.....	30
Εικόνα 3.4: Kit απομόνωσης DNA, NucleoSpin® Food, MACHEREY-NAGEL.....	31
Εικόνα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση λειτουργίας PCR.....	37
Εικόνα 3.6: Μέρη συσκευής ηλεκτροφόρησης.....	42
Εικόνα 3.7: Παράδειγμα πορείας και αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης.....	42
Εικόνα 4.1: Αναλυτικός Ζυγός.....	45
Εικόνα 4.2: Θερμοκυκλοποιητής.....	46
Εικόνα 4.3: Συσκευή Ηλεκτροφόρησης.....	46
Εικόνα 4.4: Συσκευή Vortex.....	47
Εικόνα 4.5: Συσκευή Λάμπας UV.....	47
Εικόνα 4.6: Τροφοδοτικό Ηλεκτροφόρησης.....	48
Εικόνα 4.7: Φασματοφωτόμετρο.....	48
Εικόνα 4.8: Φυγόκεντρος.....	49
Εικόνα 4.9: Thermal Block.....	49
Εικόνα 4.10: Εκκινητές για ανίχνευση <i>Salmonella spp.</i>	55
Εικόνα 4.11: Εκκινητές για ανίχνευση γονιδίου <i>ecpA</i>	55
Εικόνα 4.12: Συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου για την ανίχνευση <i>Salmonella spp.</i>	56
Εικόνα 4.13: Συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου <i>ecpA</i>	57
Εικόνα 4.14: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.....	59
Εικόνα 4.15: 10x Loading Buffer.....	59
Εικόνα 4.16: Δείγματα DNA έπειτα από προσθήκη του 10x Loading Buffer.....	59
Εικόνα 5.1: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης για την ανίχνευση <i>Salmonella spp.</i> και παρατήρηση θετικού αποτελέσματος.....	61

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1.1: Σημαντικότεροι Επικίνδυνοι Μικροοργανισμοί.....	10
Πίνακας 3.1: Νομοθετικά όρια ανίχνευσης <i>Salmonella spp.</i> βάση κανονισμού (ΕΚ) 2073/2005.....	16
Πίνακας 3.2: Περιβαλλοντικές Πηγές <i>Salmonella spp.</i>	21
Πίνακας 3.3: Τρόφιμα που προκαλούν Σαλμωνέλλωση.....	22
Πίνακας 3.4: Περιβαλλοντικοί Παράγοντες Επιμόλυνσης από <i>Escherichia coli</i>	25
Πίνακας 3.5: Τρόφιμα που προκαλούν τροφικές λοιμώξεις από <i>Escherichia coli</i>	25
Πίνακας 4.1: Δείγματα Εμπορίου.....	50
Πίνακας 4.2: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο της PCR.....	54
Πίνακας 4.3: Αλληλουχίες και μοριακά βάρη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο της PCR.....	55

1. Εισαγωγή

1.1. Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα

Οι τροφιμογενείς ασθένειες εξακολουθούν να μαστίζουν την Ευρώπη τόσο για τη δημόσια υγεία όσο και για την οικονομία. Παρόλο που τα μέτρα προφύλαξης γίνονται όλο και πιο αυστηρά, ο αριθμός των κρουσμάτων συνεχίζει να αυξάνεται. Οι συμβατικές τεχνικές για την ανίχνευση βακτηριακών παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, αν και αξιόπιστες, απαιτούν αρκετές ημέρες για να δώσουν αποτελέσματα. Έτσι, καθώς η παγκόσμια παραγωγή τροφίμων αυξάνεται, οι συμβατικές τεχνικές δεν φαίνεται να μπορούν να συμβαδίσουν. Έτσι, οι επαναστατικές, χαμηλού κόστους και σύντομοι χρόνοι ολοκλήρωσης θεωρούνται απαραίτητες για την ταυτοποίηση των βακτηρίων και των γονιδίων ανθεκτικότητάς τους. Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που βασίζονται στο DNA προκειμένου να καλυφθούν τα υπάρχοντα κενά. Οι μοριακές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση διαφόρων τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών λόγω της ικανότητάς τους να αναλύουν πολλά δείγματα ταυτόχρονα, της ταχύτητας και της υψηλής ευαισθησίας τους. Από την άλλη πλευρά, παρουσιάζουν επίσης ορισμένα μειονεκτήματα. Οι περισσότερες μοριακές τεχνικές απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και εκπαιδευμένο προσωπικό. Επιπλέον, η απομόνωση και η εκχύλιση του DNA εξακολουθεί να είναι πολύ δαπανηρή, καθιστώντας τις μεθόδους που βασίζονται στο DNA ακατάλληλες για τομείς μαζικής παραγωγής. Επιπλέον, οι σύνθετες μήτρες, όπως τα τρόφιμα, μπορεί να επηρεάσουν το αποτέλεσμα των περισσότερων μοριακών τεχνικών.

1.2. Σημασία της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα

Η τροφιμογενείς δηλητηριάσεις αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα επιβάρυνσης της δημόσιας υγείας αλλά και της οικονομία, όχι μόνο της μονάδας παραγωγής, επεξεργασίας ή μεταποίησης των τροφίμων, αλλά ολόκληρης της χώρας. Η προσβολή από μία τροφική δηλητηρίαση γίνεται συνήθως λόγω επαρκές αριθμού παθογόνων μικροοργανισμών, κυρίως βακτηρίων, στο τρόφιμο που καταναλώθηκε ή λόγω παρουσίας τοξίνης, που παρήγαγε παθογόνος μικροοργανισμός σε κάποιο από τα στάδια παραγωγής, στο τρόφιμο.

Αυτές οι τροφιμογενείς ασθένειες μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες, στις τροφικές τοξινώσεις και στις τροφικές λοιμώξεις. Οι τροφικές τοξινώσεις προκαλούνται από κατανάλωση τροφίμου που περιέχει τοξίνες, ενώ οι τροφικές λοιμώξεις προκαλούνται από κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν παθογόνου μικροοργανισμούς. Τα προβλήματα που μπορούν να προκαλέσουν τροφικές ασθένειες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία και κυρίως στο πεπτικό σύστημα, όπως στομαχικές διαταραχές, ναυτίες, διάρροια, εμετό, τα οποία συνοδεύονται συνήθως από πονοκέφαλο και πυρετό. Όπως αναφέραμε προηγουμένως οι κύριοι μικροοργανισμοί που προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις είναι τα παθογόνα βακτήρια. Ανάμεσα στα παθογόνα βακτήρια που είναι πιο συχνά υπεύθυνα για τις τροφικές ασθένειες, είναι τα gram αρνητικά βακτήρια *Salmonella spp* και *Eschericia coli*, στα οποία εστίασε και το συγκεκριμένο πείραμα που θα αναλυθεί παρακάτω.

Η ICMSF (1988), ή αλλιώς International Commission on Microbiological Specifications for Food) παρέχει τους ορισμούς σχετικά με τις διάφορες κατηγορίες κινδύνων:

1. Μικροβιολογικός κίνδυνος υψηλής σοβαρότητας και επικινδυνότητας (Severe Hazard):
Πρόκειται για τον κίνδυνο που σχετίζεται με την παρουσία παθογόνου μικροοργανισμού ή τοξίνης στο τρόφιμο και μπορεί να προκαλέσει τροφική δηλητηρίαση μετά την κατανάλωση του τροφίμου.
2. Μικροβιολογικός κίνδυνος μέτριας σοβαρότητας και επικινδυνότητας (Moderate Hazard):
Αναφέρεται στον κίνδυνο που είναι υπεύθυνος για παροδικές και με ήπια συμπτώματα ασθένειες σε υγιή άτομα. Οι κίνδυνοι αυτοί μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες:
 - 2.a. Μικροβιολογικός κίνδυνος μέτριας επικινδυνότητας και σοβαρότητας με πιθανότητα εκτεταμένης εξάπλωσης (Extensive Spread):
Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο κίνδυνος μπορεί να εξαπλωθεί με αλληλοεπιμόλυνση στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων. Η λοίμωξη μπορεί να προκύψει και από μικρή ποσότητα των παθογόνων μικροοργανισμών.
 - 2.b. Μικροβιολογικός κίνδυνος μέτριας επικινδυνότητας και σοβαρότητας με περιορισμένη εξάπλωση (Limited Speed):
Κρούσματα του συγκεκριμένου κινδύνου περιορίζονται σε ένα άτομο, το οποίο κατανάλωσε μολυσμένο τρόφιμο, ενώ για να προκληθεί ασθένεια απαιτείται η παρουσία μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών πάνω στο τρόφιμο.

Πίνακας 1.1: Σημαντικότεροι Επικίνδυνοι Μικροοργανισμοί

Υψηλής Επικινδυνότητας και Σοβαρότητας	Μέτριας Επικινδυνότητας και Σοβαρότητας (extended spread)	Μέτριας Επικινδυνότητας και Σοβαρότητας (limited spread)
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Salmonella typhi, paratyphi A, B</i>	<i>Shigella spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Hepatitis A and E</i>	<i>Enterovirulent Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Vibrio cholerae 01</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Vibrio cholerae non-01</i>
<i>Vibrio vulnificus</i>		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Trichinella spiralis</i>		<i>Yersinia enterocolitica</i>

1.3. Επιδημιολογικά στοιχεία

Οι λοιμώξεις από *Salmonella* και *E. coli* αυξήθηκαν το 2021, σύμφωνα με νέα στοιχεία του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (ECDC). Τριάντα χώρες ανέφεραν 61.236 κρούσματα σαλμονέλλωσης, εκ των οποίων τα 60.494 ήταν εργαστηριακά επιβεβαιωμένα το 2021. Πρόκειται για αύξηση 14% από τα 53.163 κρούσματα το 2020. Τα υψηλότερα ποσοστά κοινοποιήσεων αναφέρθηκαν από την Τσεχία και τη Σλοβακία, ακολουθούμενες από τη Μάλτα, την Ουγγαρία και τη Γαλλία. Τα χαμηλότερα ποσοστά σημειώθηκαν στην Ελλάδα, τη Ρουμανία, τη Βουλγαρία, την Ιρλανδία και την Πορτογαλία. Η κατάσταση νοσηλείας αναφέρθηκε για 31.357 κρούσματα και το 38% χρειάστηκε νοσοκομειακή περίθαλψη. Η Κύπρος, η Ελλάδα και η Λιθουανία είχαν το μεγαλύτερο ποσοστό νοσηλευόμενων περιστατικών. Τουλάχιστον 73 άτομα έχασαν τη ζωή τους το 2021. Το κορυφαίο ποσοστό νόσησης ήταν μεταξύ των μικρών παιδιών ηλικίας 0 έως 4. Το ποσοστό σε αυτή την ομάδα ήταν τρεις φορές μεγαλύτερο από ό,τι στα μεγαλύτερα παιδιά και 11 φορές μεγαλύτερο από ό,τι στους ενήλικες ηλικίας 25 έως 64 ετών. Όπως και τα προηγούμενα έτη, οι τρεις κύριοι τύποι *Salmonella* ήταν η *Salmonella Enteritidis*, η *Typhimurium* και η μονοφασική *Salmonella Typhimurium*. Τα μικρά παιδιά και οι ηλικιωμένοι υποφέρουν γενικά από τις πιο σοβαρές ασθένειες. Η μεγαλύτερη επιδημία εκδηλώθηκε στη Φινλανδία τον Ιούνιο, όταν περισσότεροι από 700 ασθενείς από κέντρα ημερήσιας φροντίδας σε τρεις πόλεις νόσησαν από *Salmonella*

Typhimurium. Όλα τα κέντρα εξυπηρετούνταν από την ίδια κεντρική κουζίνα και το στέλεχος της επιδημίας εντοπίστηκε σε λαχανικά που σερβίρονταν στο γεύμα.

Συνολικά καταγράφηκαν 6.534 επιβεβαιωμένα κρούσματα λοιμώξεων από *E. coli* που παράγουν τοξίνη Shiga (STEC) σε σύγκριση με 4.824 το 2020. Η Γερμανία κατέγραψε τους περισσότερους ασθενείς με 1.635, ακολουθώντας η Δανία με 927 και η Ιρλανδία με 878. Τα υψηλότερα ποσοστά αναφορών ανά χώρα σημειώθηκαν στην Ιρλανδία, τη Δανία, τη Μάλτα και τη Νορβηγία. Συνολικά, το 41% των 2.575 κρουσμάτων με γνωστές πληροφορίες νοσηλεύτηκαν σε νοσοκομείο και 18 πέθαναν. Το μεγαλύτερο ποσοστό κοινοποίησης ήταν στην ηλικιακή ομάδα 0 έως 4 ετών. Τα δεδομένα από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) δείχνουν 275 ασθενείς σε 36 περιπτώσεις έξαρσης ανάμεσα σε 11 χώρες. Σε ένα από τα κρούσματα η παρουσία του STEC O26 σε νωπό αγελαδινό γάλα και προ-κομμένα λαχανικά προκάλεσε μια εστία STEC O103, και σε δύο κρούσματα O157 μεταφέρθηκε μέσω κιμά και καρπάτσιο.

1.4. Αντίστοιχες έρευνες ανίχνευσης *Salmonella spp.* και *Escherichia coli* σε οπωροκηπευτικά προϊόντα

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλαπλές αντίστοιχες έρευνες πάνω στην ανίχνευση *Salmonella spp.* και *Escherichia coli* σε διάφορα φρούτα και λαχανικά. Ένα σημαντικό περιστατικό που συνέβη τον Οκτώβρη του 2003 είναι εκείνο όπου παρατηρήθηκε *Salmonella spp.* σε ωμά λαχανικά στο Selangor της Μαλαισίας. Αναλυτικότερα, στην ερευνά αυτή απομονώθηκαν συνολικά 43 δείγματα selom (*Oenanthe stolonifera*), 26 δείγματα pegaga (*Centella asiatica*), 25 δείγματα kangkong (*Ipomoea aquatica*) και 18 δείγματα kesum (*Polygonum minus*) εξετάστηκαν για την παρουσία *Salmonella spp.* ανιχνεύθηκαν σε 40 (35%) από τα εξετασθέντα δείγματα λαχανικών. Οι συχνότεροι ορότυποι που απομονώθηκαν ήταν ο *S. Weltevreden* (23,5%), *S. agona* (16,2%), *S. senftenberg* (10,1%) και *S. albania* (6,7%). Οι υπόλοιποι 27 ορότυποι *Salmonella* απομονώθηκαν με συχνότητες από 0,6% έως 3,4%. Αρκετοί από τους ορότυπους *Salmonella* που απομονώθηκαν σε αυτή τη μελέτη έχουν εμπλακεί σε ανθρώπινες λοιμώξεις σε άλλες χώρες. Αν και τα είδη *Salmonella* ανιχνεύονται συχνά σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, η ανίχνευση 31 ορότυπων *Salmonella* σε τέσσερα τοπικά λαχανικά σαλάτας σε αυτή τη μελέτη δεν είναι πολύ ενθαρρυντική και υποστήριξε την άποψη ότι αυτά τα λαχανικά μπορεί να είναι δυνητικά υγειονομικά

κινδύνους.

Τον Ιανουάριο του 2011 εκδόθηκε έρευνα που έγινε συγκεκριμένα για την μεταβλητότητα της εσωτερίκευση της *Salmonella Typhimurium* σε φυλλώδη λαχανικά και φρέσκα βότανα. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίπτωση της *Salmonella Typhimurium* στην επιφάνεια και κάτω από την επιδερμίδα σε αποκολλημένα φύλλα επτά λαχανικών και φρέσκων βουτάνων. Η συχνότητα εμφάνισης της εσωτερικευμένης *Salmonella* διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφόρων φυτών. Η υψηλότερη παρουσία παρατηρήθηκε στο μαρούλι iceberg ($81\pm 16\%$) και στα φύλλα ρόκας ($88\pm 16\%$), ενώ το ρόδινο μαρούλι ($16\pm 16\%$) και το κόκκινο μαρούλι ($20\pm 15\%$), παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά ($P < 0,05$). Η εσωτερίκευση που παρατηρήθηκε στον φρέσκο βασιλικό ήταν $46\pm 12\%$, ενώ τα φύλλα μαϊντανού και τομάτας παρουσίασαν μόνο οριακή εσωτερίκευση ($1,9\pm 3,3\%$ και $0,56\pm 1,36\%$, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η εσωτερίκευση της σαλμονέλας συμβαίνει σε διάφορα φυλλώδη λαχανικά και φρέσκα βότανα, εκτός από το μαρούλι iceberg, ωστόσο το επίπεδο εσωτερίκευσης ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των φυτών και εντός της ίδιας καλλιέργειας.

Μία άλλη έρευνα που διεξήλθε τον Αύγουστο του 2007 σχετικά με την συμπεριφορά του *Escherichia coli* O157:H7 σε φυλλώδη λαχανικά, συμπεριλαμβανομένων του μαρουλιού και του σπανακιού, αποδεικνύει ότι η θερμοκρασία αποθήκευσης για το συσκευασμένο φρεσκοκομμένο μαρούλι είναι ο σημαντικότερος περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη του *E. coli* O157:H7. Συμπερασματικά καταλήγει στο ότι το *E. coli* O157:H7 μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί κατά την αποθήκευση στους 8°C σε όλα τα συσκευασμένα φυλλώδη λαχανικά που διατίθενται σήμερα στην αγορά.

Τον Οκτώβρη του 2001 πραγματοποιήθηκε πειραματική έρευνα πάνω στην επιβίωση της *Salmonella spp.* και της *Escherichia coli* O157:H7 σε φρέσκες και κατεψυγμένες φράουλες. Αναφέρεται αρχικά πως για να επιτευχθεί η μέγιστη διάρκεια ζωής, οι φρέσκες φράουλες συλλέγονται απευθείας χωρίς πλύσιμο σε δοχεία λιανικής πώλησης. Αντιθέτως, οι κατεψυγμένες φράουλες συνήθως αποφλοιώνονται κατά την ψύξη και πλένονται πριν από την κατάψυξη, μερικές φορές με την προσθήκη σακχαρόζης. Για να προσδιοριστεί η επιβίωση των πιθανόν βακτηριακών επιμολύνσεων, οι κομμένες ή άθικτες επιφάνειες των φρέσκων φραουλών εμβολιάστηκαν επιτόπου με κοκτέιλ πέντε ή

έξι στελεχών *Salmonella* ή *Escherichia coli* O157:H7 (log 7,0 CFU/δείγμα). Οι εμβολιασμένες φράουλες αποξηράνθηκαν για 1 ώρα στους 24°C και αποθηκεύτηκαν σε κλειστά δοχεία στους 5 ή 24°C. Οι κομμένες σε φέτες φράουλες με ή χωρίς προσθήκη 20% σακχαρόζης εμβολιάστηκαν με ένα από τα δύο στελέχη του *E. coli* O157:H7 και καταψύχθηκαν στους -20C. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι το *E. coli* O157:H7 και η *Salmonella* είναι ικανά να επιβιώσουν αλλά όχι να αναπτυχθούν στις επιφάνεια των φρέσκων φραουλών καθ' όλη την αναμενόμενη διάρκεια ζωής των φρούτων και μπορούν να επιβιώσουν σε κατεψυγμένες φράουλες για περιόδους μεγάλης διάρκειας.

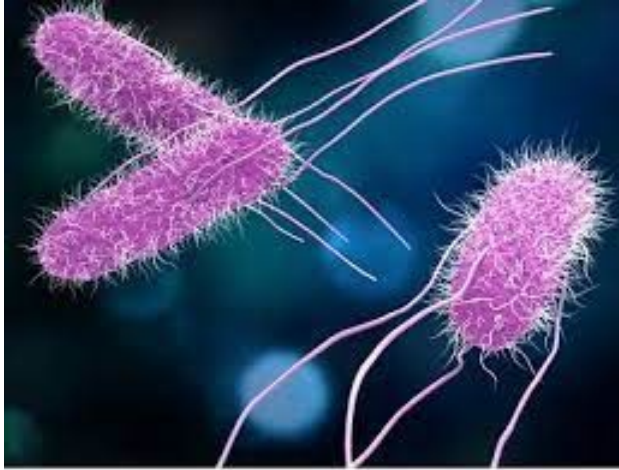
Έχουν διεξαχθεί επίσης έρευνες πάνω σε τομάτες συσχετίζοντας την επιμολυνσή τους από *Salmonella spp.* και *Escherichia coli* μέσω του εδάφους και των μολυσμένων υπόγειων υδάτων. Πιο συγκεκριμένα, σε έρευνα του 2001 αναφέρεται πως βάση παρατηρήσεων σχετικά με τη διήθηση της σαλμονέλας στους ιστούς της τομάτας υποστηρίζεται ο ισχυρισμός ότι η επαφή των προϊόντων πριν από τη συγκομιδή με μολυσμένο νερό ή έδαφος επιδεινώνει τα προβλήματα που συνδέονται με την απομάκρυνση των παθογόνων μετά τη συγκομιδή ή την προσβασιμότητά τους στην επεξεργασία με απολυμαντικά. Ταυτόχρονα, σε νεότερη έρευνα του 2012 η συνολική εικόνα δείχνει πως υπήρχε ασθενής συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων *E. coli* που βρέθηκαν στο νερό που χρησιμοποιείται για άρδευση και εκείνων των *E. coli* που βρέθηκαν στο αρδευόμενο έδαφος, αλλά καμία συσχέτιση με *E. coli* στις τομάτες. Αυτό συμπεράναν καθώς μόνο 2/84 δείγματα τομάτας περιείχαν *E. coli* και η κατανάλωση αυτών των τοματών δεν φαίνεται να συνδέεται με σημαντικούς κινδύνους για την υγεία.

2. Σκοπός

Πρωταρχικός στόχος της συγκεκριμένης έρευνας είναι η παρατήρηση της παρουσίας ή μη των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella spp.* και *Escherichia coli* σε φρούτα και λαχανικά συσκευασμένα ή μη. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν λήφθηκαν από τοπικές αγορές του ελληνικού εμπορίου που έχουν πρόσβαση όλοι οι καταναλωτές. Μετά την διεξαγωγή του πειράματος γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τις αντίστοιχες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εξωτερικό και τα αποτελέσματά τους.

3. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

3.3. *Salmonella* spp



Εικόνα 3.1: Βακτήρια *Salmonella* spp.

3.3.1. Γενικά

Το γένος *Salmonella* ανήκει στην μεγάλη οικογένεια των Εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae*), η οποία γενικότερα αποτελείται μόνο από gram αρνητικά βακτήρια. Σήμερα θεωρείται ότι το γένος *Salmonella* αποτελείται από δύο είδη, *Salmonella enterica* και *Salmonella bongori*, και το πιο παθογόνο είδος είναι η *Salmonella Enterica*, η οποία διαιρείται κατ' επέκταση σε ορότυπους, με πιο σημαντικούς την *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (γνωστή και ως *Salmonella Typhimurium*), την *Salmonella Enteritidis* και την *Salmonella Typhi*, οι οποίοι μπορούν να υποστούν περαιτέρω ταξινόμηση με την βοήθεια τύπων φάγων. Ορισμένοι από τους ορότυπους έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα παθογόνοι για τον άνθρωπο. Επιπλέον, τα βακτήρια του γένους *Salmonella* μπορεί να είναι αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια έχοντας σχήμα ράβδου και παρουσιάζοντας κινητικότητα με την βοήθεια μαστιγίων, και συγκεκριμένα με περίτριχα μαστίγια, δηλαδή τα μαστίγια είναι κατανομημένα ομοιόμορφα επάνω στην κυτταρική επιφάνεια. Τέλος, οι σαλμονέλες πρωτεολυτικά βακτήρια, δηλαδή οι σαλμονέλες δεν μπορούν να διασπάσουν πρωτεΐνες, δεν έχουν την δυνατότητα σχηματισμού σπορίων, όμως το ίδιο το βακτήριο παρουσιάζει μικρή θερμοανθεκτικότητα. Τα βακτήρια του γένους *Salmonella* υπάρχουν φυσιολογικά στην μικροχλωρίδα του

εντερικού σωλήνα των ζώων αλλά και του ανθρώπου. Αίτιο της ασθένειας είναι η διείσδυση και μεταφορά της *Salmonella* από την κοιλότητα του εντέρου στον επιθήλιο του λεπτού εντέρου όπου παρουσιάζεται φλεγμονή.

Παρακάτω παρατίθεται πίνακας στον οποίο απεικονίζονται όρια ανίχνευσης όσον αφορά την *Salmonella* σε διάφορες περιπτώσεις τροφίμων που έχουν τεθεί από την νομοθεσία σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005.

Πίνακας 3.1: Νομοθετικά όρια ανίχνευσης *Salmonella spp.* βάση κανονισμού (ΕΚ) 2073/2005

Κατηγορία τροφίμων	Όριο	Αναλυτική Μέθοδος Αναφοράς	Στάδιο όπου εφαρμόζεται το κριτήριο
Κιμάς και παρασκευάσματα κρέατος που προορίζονται να καταναλωθούν ωμά	Απουσία σε 25g	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 25g	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 10g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Μηχανικώς διαχωρισμένο κρέας (ΜΔΚ)	Απουσία σε 10g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Προϊόντα κρέατος που προορίζονται να καταναλωθούν ωμά, εξαιρουμένων των προϊόντων για τα οποία η διαδικασία παρασκευής ή η σύνθεση του προϊόντος θα εξαλείψει τον κίνδυνο σαλμονέλλας	Απουσία σε 25g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Προϊόντα κρέατος από κρέας πουλερικών που προορίζονται	Απουσία σε 25g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην

να καταναλωθούν μαγειρευμένα			αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Ζελατίνη και κολλαγόνο	Απουσία σε 25g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Τυριά, βούτυρο και κρέμα από νωπό γάλα ή από γάλα που έχει υποστεί επεξεργασία σε θερμοκρασία χαμηλότερη από της παστερίωσης	Απουσία σε 25g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Γάλα σε σκόνη και ορός γάλακτος σε σκόνη	Απουσία σε 25g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Παγωτό, εξαιρουμένων των προϊόντων για τα οποία η διαδικασία παρασκευής ή η σύνθεση του προϊόντος θα εξαλείψει τον κίνδυνο σαλμονέλλας	Απουσία σε 25g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Προϊόντα αυγών, εξαιρουμένων των προϊόντων για τα οποία η διαδικασία παρασκευής ή η σύνθεση του προϊόντος θα εξαλείψει τον κίνδυνο σαλμονέλλας	Απουσία σε 25g	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 25g ή ml	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Βρασμένα μαλακόστρακα και μαλάκια	Απουσία σε 25g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Ζώντα δίθυρα μαλάκια και	Απουσία σε 25g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που

ζώντα εχινόδεσμα, χιτωνόζωα και γαστερόποδα			διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Σπόροι με φυτό (έτοιμοι για κατανάλωση)	Απουσία σε 25g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Κομμένα φρούτα και λαχανικά (έτοιμα για κατανάλωση)	Απουσία σε 25g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Μη παστεριωμένοι χυμοί φρούτων και λαχανικών (έτοιμοι για κατανάλωση)	Απουσία σε 25g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

3.3.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των σαλμονελλών

1) Θερμοκρασία

Ελάχιστη Θερμοκρασία Ανάπτυξης: 2-4°C

Μέγιστη Θερμοκρασία Ανάπτυξης: 45-47°C

(με εξαίρεση ορισμένα στελέχη *S.Typhimurium* που έχουν μέγιστο τους 54°C)

Βέλτιστη Θερμοκρασία Ανάπτυξης: 35-37°C

Η *Salmonella* παρουσιάζει ευαισθησία στην θερμότητα, δηλαδή σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 70°C, ενώ είναι αρκετά ανθεκτική κατά την ψύξη και κατάψυξη.

Να σημειωθεί ότι κατά την κατάψυξη καταστρέφονται ορισμένα κύτταρα όμως παραμένει επαρκής αριθμός κυττάρων ώστε να μπορέσει να μολύνει το τρόφιμο μετά το ξεπάγωμα.

2) pH

Ελάχιστη τιμή pH ανάπτυξης: 4,2

Μέγιστη τιμή pH ανάπτυξης: 9,5

Βέλτιστη τιμή pH ανάπτυξης: 6,5-7,5

Όσον αφορά την ελάχιστη τιμή pH που αναπτύσσεται το βακτήριο διαφοροποιείται

ανάλογα από το μέσο όξυνσης που χρησιμοποιείται για την πτώση του pH.

3) Ανθεκτικότητα σε NaCl

Γενικότερα τα είδη της *Salmonella* δεν επιβιώνουν σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl. Αναλυτικότερα, οι σαλμονέλες αναστέλλουν την ανάπτυξή τους σε συγκεντρώσεις 3-4% NaCl. Όταν αυξάνεται η θερμοκρασία από 10°C στους 30°C έχει ως απότοκο και την αύξηση την ανθεκτικότητας των σαλμονελών στο NaCl. Επιπλέον, σε συνθήκες υπό κενό ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας συσκευασίας προκαλείται αύξηση της ανθεκτικότητας του βακτηρίου αυτού στο NaCl.

4) Ενεργότητα Νερού aw

Ελάχιστη τιμή aw ανάπτυξης: 0,94

Βέλτιστη τιμή aw ανάπτυξης: 0,995

Γενικότερα όταν η aw έχει τιμή χαμηλότερη του 0,99 υπάρχει σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, ενώ σε τιμές aw μικρότερες του 0,93 σε ουδέτερο pH αναστέλλεται πλήρως η ανάπτυξη του βακτηρίου. Να σημειωθεί πως σε μικρότερες τιμές pH απαιτούνται υψηλότερες aw για να καταφέρει να αναπτυχθεί το βακτήριο.

3.1.3. Πηγές *Salmonella spp.*

Η πηγή από την οποία προέρχονται οι σαλμονέλλες είναι η φυσική μικροχλωρίδα που υπάρχει στο πεπτικό σύστημα των ψυχρόαιμων και θερμόαιμων ζώων, άρα και του ανθρώπου. Μέσω των κοπράνων μεταφέρονται οι σαλμονέλες στα τρόφιμα και στο νερό. Ταυτόχρονα, όταν άτομα ή ζώα, που είτε είναι φορείς σαλμονελλών είτε πάσχουν από σαλμονέλλωση, έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα μπορούν να μεταφέρουν σαλμονέλλες σε αυτά. Τέλος, ακόμα και οι μύγες και τα τρωκτικά έχουν σημαντικό ρόλο στην μετάδοση σαλμονελλών σε τρόφιμα.

Πίνακας 3.2: Περιβαλλοντικές Πηγές *Salmonella spp.*

Νερό
Χώμα
Έντομα
Επιφάνειες κουζινών και μονάδων επεξεργασίας
Ζωικά περιττώματα
Ακατέργαστα κρέατα
Πουλερικά
Θαλασσινά

Πίνακας 3.3: Τρόφιμα που προκαλούν Σαλμονέλλωση

Ωμά Κρέατα	Καρύδες
Πουλερικά	Σάλτσες
Αυγά	Dressing Σαλάτας
Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα	Μίγματα κέικ
Ψάρια	Επιδόρπια με κρέμα
Γαρίδες	Ξηρή ζελατίνη
Βατραχοπόδαρα	Φυστικοβούτυρο
Ζυμαρικά	Κακάο και σοκολάτα
Μπαχαρικά	Άπλυτα λαχανικά

3.1.4. Συμπτώματα Σαλμονέλλωσης

Η σαλμονέλλωση προκαλείται έπειτα από κατανάλωση τροφίμου που φέρει 10^4 - 10^7 βακτηριακά κύτταρα σαλμονέλλας ανά γραμμάριο. Βέβαια έχουν υπάρξει και περιπτώσεις όπου η τροφική δηλητηρίαση προκλήθηκε έπειτα από κατανάλωση μόνο λίγων βακτηριακών κυττάρων. Παράδειγμα αποτελεί η φορά που παρατηρήθηκε ασθενής με σαλμονέλλωση που είχε καταναλώσει σοκολάτα με 1 κύτταρο *Salmonella* ανά γραμμάριο.

Η εμφάνιση των συμπτωμάτων της τροφικής αυτής λοίμωξης εμφανίζονται 12 με 14 ώρες αφού καταναλωθεί η μολυσμένη τροφή και τα χαρακτηριστικά συμπτώματα εκτός της γενικής εξάντλησης του οργανισμού είναι η ναυτία, ο εμετός, οι κοιλιακοί πόνοι και η διάρροια. Το ποσοστό θνησιμότητας της ασθένειας αυτής είναι 4,1%, με εξαίρεση ειδικές κατηγορίες ατόμων, όπως σε άτομα άνω των 50 είναι 21% και σε νεογέννητα είναι 5,8%. Ανάμεσα από όλα τα είδη *Salmonella*, η *S. Choleraesuis* εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας, το οποίο φτάνει το 21%. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως το 5% των ασθενών μπορούν να γίνουν φορείς της *Salmonella*.

3.1.5. Μολυσματική Δόση

Βρέφη, παιδιά, ηλικιωμένοι και ανοσοκατεσταλμένα άτομα ανήκουν στις ευπαθείς ομάδες και είναι πιο ευαίσθητα σε τροφικές λοιμώξεις σε σχέση με υγιείς ενήλικες. Συγκεκριμένα η κατανάλωση έστω και ελάχιστων βακτηριακών κυττάρων *Salmonella* μπορεί να αποτελέσει μολυσματική δόση για αυτά τα άτομα. Ανάμεσα στους κύριους παράγοντες που προκαλούν την νόσηση πέρα από την ανοσοολογική ετερογένεια μεταξύ διαφόρων ατόμων και τη λοιμογόνο δράση του μολυσματικού στελέχους, συμπεριλαμβάνεται και η χημική σύσταση του τροφίμου που αποτελεί φορέας του μικροοργανισμού. Βέβαια έχει παρατηρηθεί πως τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη έχουν συσχετιστεί με χαμηλές μολυσματικές δόσεις. Ένας γενικός κανόνας για την μολυσματική δόση είναι ότι κυμαίνεται στα 15-20 κύτταρα, δηλαδή είναι χαμηλή. Τέλος, να σημειωθεί πως κατά τον μικροβιολογικό έλεγχο στα τρόφιμα υπάρχει μηδενική ανοχή της *Salmonella* στα 25g.

3.1.6. Ασθένεια από *Salmonella*

Έπειτα από την πρόσδεση και εισβολή των βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου πραγματοποιείται έκκριση διαρροϊκών εντεροτιζινών και μπορεί να έχει τα δύο εξής απότοκα:

A) Τυφοειδής πυρετός:

- διάρροια με συνεχή πυρετό, κοιλιακούς πόνους, πονοκέφαλο
- χρόνος επώασης 7-28 μέρες
- αντιμετώπιση με αντιβίωση

B) Εντεροκολίτιδα

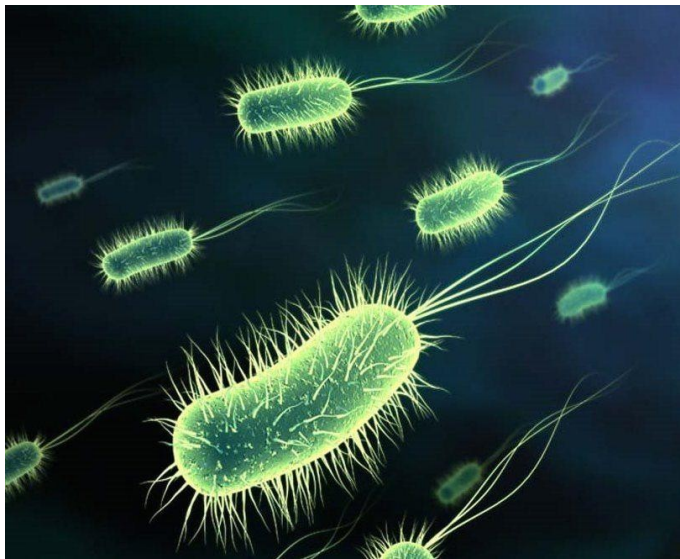
- χρόνος επώασης 8-72 ώρες
- ορισμένες φορές μπορεί να προκαλέσει χρόνιες παθήσεις, όπως αρθρίτιδα

3.1.7. Μέτρα πρόληψης για τον έλεγχο της *Salmonella*:

- Διατήρηση των τροφίμων εκτός της θερμοκρασιακής επικίνδυνης ζώνης (4-60°C)
- Η ψύξη των τροφίμων να γίνεται σε θερμοκρασίες μικρότερες ή ίσες με 4°C, ενώ όσον αφορά την κατάψυξή τους να εφαρμόζονται θερμοκρασίες κάτω των -18°C.

- Επαρκές μαγείρεμα σε πουλερικά και τα προϊόντα τους, αυγά, ο κιμάς και τα προϊόντα του αλλά και τα ψάρια, καθώς οι σαλμονέλλες καταστρέφονται με το μαγείρεμα.
- Η γέμιση πρέπει να μαγειρεύεται ξεχωριστά από τα πουλερικά έτσι ώστε να επιτυγχάνονται οι επιθυμητές θερμοκρασίες.
- Τροφές που περιέχουν ωμά ή ελαφρώς μαγειρεμένα αυγά καλό είναι να αποφεύγονται.
- Πολύ καλό πλύσιμο των λαχανικών ακόμα και αν πρόκειται να μαγειρευτούν.

3.2. *Escherichia coli*



Εικόνα 3.3: Βακτήρια *Escherichia coli*

3.2.1. Γενικά

Τα στελέχη της *Escherichia coli* είναι gram αρνητικά βακτήρια που ανήκουν, όπως και το γένος *Salmonella*, στην μεγάλη οικογένεια των Εντεροβακτηριοειδών (*Enterobacteriaceae*) και ταξινομείται στην άτυπη ομάδα των κολοβακτηριοειδών. Αναλυτικότερα, μπορεί να διακριθεί περαιτέρω στην υποομάδα των κολοβακτηριοειδών εντερικής προέλευσης, τα οποία παρουσία αλάτων χολικού οξέος αναπτύσσονται και ζυμώνουν την λακτόζη προς αέριο και οξύ μέσα σε 48 ώρες στους 44-45,5°C. Γίνεται κατανοητό λοιπόν πως λόγω της επικράτησης του βακτηρίου αυτού στον εντερικό σωλήνα ζώων και ανθρώπων όταν βρεθεί σε επεξεργασμένα τρόφιμα θεωρείται ένδειξη άμεσης ή έμμεσης περιττωματικής προέλευσης. Πρέπει να αναφερθεί επίσης πως η γενικότερη

συμπεριφορά της *E. coli* στα τρόφιμα είναι αντίστοιχη με αυτή των *Enterobacteriaceae*. Γενικότερα χαρακτηρίζονται ως ραβδόμορφα βακτήρια που δεν έχουν την ικανότητα σχηματισμού σπορίων, ενώ η ανάπτυξή τους σε σχέση με το οξυγόνο ορίζεται ως αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια. Τα περισσότερα είδη του βακτηρίου *E. coli* είναι αβλαβή ή ακόμα και επωφελή για τον άνθρωπο, όμως υπάρχουν και ορισμένα παθογόνα στελέχη που μπορούν να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα υγείας.

3.2.2. Παθογόνα είδη *Escherichia coli*

Η διαφοροποίηση των στελεχών *E. coli* επιτυγχάνεται ορολογικά βάση των αντιγόνων:

- Ο (σωματικά αντιγόνα)
- Η (αντιγόνα μαστιγίων)
- Κ (αντιγόνα κάψας)

Τα διαρροϊκά στελέχη διαφοροποιούνται βάση των σωματικών αντιγόνων Ο ως προς την ορολογική ομάδα και των αντιγόνων μαστιγίων Η ως προς τον ορολογικό τύπο με αποτέλεσμα την κατηγοριοποίηση των παθογόνων στελεχών στις εξής έξι κατηγορίες:

- Εντεροπαθογόνα στελέχη (*Enteropathogenic E. Coli – EPEC*):
Προκαλούν γαστρεντερίτιδα και έχουν κατηγοριοποιηθεί για πολλαπλά κρούσματα παιδικής διάρροιας σε χώρες όπου επικρατούν πολύ κακές συνθήκες υγιεινής. Συχνά αναφέρεται και ως “διαρροϊκή *E. coli*”.
- Εντεροτοξινογόνα στελέχη (*Enterotoxigenic E. coli – ETEC*):
Είναι υπεύθυνα για την λεγόμενη διάρροια των ταξιδιωτών (*traveler’s diarrhea*). Όπως γίνεται αντιληπτό και από το όνομά της το παθογόνο αίτιο της διάρροιας είναι η τοξίνη ή και τοξίνες.
- Εντεροδιδεισδυτικά στελέχη (*Enteroinvasive E. coli – EIEC*):
Είναι αίτιο πρόκληση δυσεντερίας (*dysentery*) παρόμοιας με αυτή της σιγκέλωσης. Από το όνομα των στελεχών αυτών γίνεται κατανοητό πως έχουν την ικανότητα εισβολής στα ευκαρυωτικά κύτταρα του επιθηλιακού ιστού.
- Εντεροπροσκολλητικά στελέχη (*Diffuse-adhering E. coli – DAEC*):
Ονομάζονται και εντεροδιαχεόμενα στελέχη και αφορά κυρίως νεαρά άτομα ηλικίας από 1-5 έτη προκαλώντας τους διάρροια. Ο λόγος που τα άτομα της συγκεκριμένης ηλικίας είναι ευπαθή προς το συγκεκριμένο στέλεχος είναι

άγνωστος.

- Εντεροσυσσωρευτικά στελέχη (*Enteroaggregative E. coli* – EAEC):
Αφορά κυρίως νεογέννητα και παιδιά προκαλώντας έμμομη διάρροια.
- Εντεροαιμορραγικά στελέχη (*Enterohemorrhagic E. coli* – EHEC):
Πρωταγωνιστής της συγκεκριμένης κατηγορίας είναι ο ορότυπος O157:H7, ο οποίος προκαλεί γαστρεντερίτιδα παράγοντας τοξίνες που ονομάζονται βεροτοξίνες (verotoxin-VTI) ή τοξίνες τύπου “Shiga” (Stx), οι οποίες μοιάζουν με τις τοξίνες που παράγει το βακτήριο *Shigella dysenteriae*. Ο ορότυπος αυτός έχει ενοχοποιηθεί και για νοσηρές καταστάσεις, όπως κρούσματα αιμορραγικής κολίτιδας, ακόμα και σε πολύ μικρούς αριθμούς 1-15 cfu/ g.

3.2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του *Escherichia coli*

1. Θερμοκρασία

Θερμοκρασιακό εύρος: 7-46°C.

Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης: 30-42°C

Καταστρέφονται με ευκολία με την εφαρμογή θερμοκρασιών παστερίωσης.

2. pH

Ελάχιστη τιμή pH ανάπτυξης: 4,0-4,5

Βέλτιστη τιμή pH ανάπτυξης: 7,0-7,2

Το συγκεκριμένο βακτήριο όταν εκτεθεί σε όξινο περιβάλλον (pH<4,3) ξεκινάει διαδικασίες ανάπτυξης μηχανισμών αντοχής στο όξινο στρες και κατ' επέκταση ο μικροοργανισμός καταφέρνει να επιβιώσει σε όξινο περιβάλλον όταν βρεθεί σε συνθήκες ψύξης.

Να σημειωθεί πως με την ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής του μικροοργανισμού σε όξινο περιβάλλον ταυτόχρονα γίνεται ανθεκτικός και στη θερμότητα, στα χημικά συντηρητικά και στην ακτινοβολία.

3. Ενεργότητα νερού aw

Δεν αναπτύσσονται σε τιμές aw<0,95

4. Ανθεκτικότητα σε NaCl

Είναι ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος 7-10%

5. Ανθεκτικότητα σε ακτινοβολήση

Παρουσιάζει ευαισθησία στην ακτινοβολία και στις ΗΠΑ έχει εγκριθεί για την επεξεργασία νωπού κρέατος.

3.2.4. Πηγές *Escherichia coli*

Τα παθογόνα στελέχη της *Escherichia coli* υπάρχουν φυσιολογικά στο μικροβίωμα του εντερικού σωλήνα των ζώων αλλά και των ανθρώπων. Η *E. coli* αποτελεί τον κύριο αντιπρόσωπο του “δείκτη επιμόλυνσης” για τα τρόφιμα, καθώς πρόκειται και για τον μικροοργανισμό που ανιχνεύεται πρώτος κατά την ανάλυση κοπράνων. Η παρουσία του έχει συνδεθεί με μολυσμένα ύδατα με περιττώματα ζώων ή ανθρώπων, τα οποία αποτελούν πηγές επιμόλυνσης.

Πίνακας 3.4: Περιβαλλοντικοί παράγοντες επιμόλυνσης από *E. coli*

Πηγές νερού
Χειρισμός κοπριάς στο αγρόκτημα
Πηγές τροφής ζώων
Μολυσμένα άτομα

Πίνακας 3.5: Τρόφιμα που προκαλούν τροφικές λοιμώξεις από *Escherichia coli*

Ανεπαρκώς μαγειρεμένο ή ακατέργαστο κρέας και κρεατοσκευάσματα
Φρέσκα λαχανικά
Έτοιμες σαλάτες
Αpasteρίωτος χυμόςφρούτων
Αποξηραμένο σαλάμι
Μαρούλι
Κυνήγι
Τυρόπηγμα
Ωμό γάλα

3.2.5. Συμπτώματα τροφικής λοίμωξης από *Escherichia coli*

Κατά την τροφική δηλητηρίαση από *E. coli* τα κύρια συμπτώματα που παρατηρούνται η διάρροια, η αιμορραγική κολίτιδα και το αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο (Hemolytic Uremic Syndrome). Το συγκεκριμένο σύνδρομο χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση χαμηλού αριθμού αιμοπεταλίων, αιμολυτική αναιμία, οιδήματος, μείωση του όγκου των ούρων και νεφρικής ανεπάρκειας. Στους ενήλικες το αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο εμφανίζεται σε ποσοστό 6% του πληθυσμού και από αυτό το ποσοστό το 50% του εμφανίζει νεφρική ανεπάρκεια, το 15% παρουσιάζει χρόνια ηπατική ανεπάρκεια, ενώ παρατηρείται επίσης 1% ποσοστό θνησιμότητας. Σε μεγαλύτερο ποσοστό, περίπου 15%, εμφανίζεται το συγκεκριμένο σύνδρομο σε νεαρές ηλικίες 2-10 ετών. Η πιο ευαίσθητες ομάδες που μπορεί να αντιμετωπίσουν τροφικές λοιμώξεις από *Escherichia coli* είναι τα άτομα τρίτης ηλικίας και τα παιδιά. Το χρονικό διάστημα εμφάνισης συμπτωμάτων μπορεί να ποικίλει από λίγες ώρες έως και 10 ημέρες έπειτα από την κατανάλωση επιμολυσμένου τροφίμου. Τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας ξεκινάνε από υδαρή διάρροια που συνοδεύεται από κοιλιακούς πόνους με κράμπες και εξελίσσονται σε αιμορραγική διάρροια.

3.2.6. Μολυσματική Δόση

Από το συγκεκριμένο βακτήριο απαιτείται μία μικρή μόνο δόση για να προκαλέσει τροφική δηλητηρίαση. Πιο συγκεκριμένα, ακόμα και μικρότερη ποσότητα από 100 βακτηριακά κύτταρα, και κάποιες φορές μπορεί να χρειαστούν μόλις 10 μικροοργανισμοί. Με αυτόν τον τρόπο παρατηρείται πως η μολυσματική δόση είναι εξαιρετικά χαμηλή, το οποίο αποτελεί έναν κύριο παράγοντα για την εύκολη μετάδοση της ασθένειας από άνθρωπο σε άνθρωπο. Γενικότερα, οι παράγοντες που καθορίζουν το αν θα ασθενήσει ένα άτομο ή όχι είναι η ηλικία, η ανοσολογική κατάσταση και τυχόν εξασθένηση του οργανισμού. Η μη επιμελής προσωπική υγιεινή, κυρίως έπειτα από χρήση της τουαλέτας, μπορεί να γίνει μεταφορά του παθογόνου μικροοργανισμού μέσω μολυσμένων χεριών επιτυγχάνοντας έτσι δευτερογενή μεταφορά ή αλλιώς επιμόλυνση.

3.2.7. Μέτρα για την πρόληψη της τροφικής λοίμωξης από *Escherichia coli*

Τα πιο σημαντικά μέτρα που μπορούν ληφθούν για την αποφυγή δηλητηρίασης από το βακτήριο αυτό είναι:

- Το τρόφιμο να υποβάλλεται σε επαρκή θερμική επεξεργασία
- Άμεση ψύξη μετά την ολοκλήρωση της θερμικής επεξεργασίας
- Χλωρίωση του νερού
- Να εφαρμόζονται καταλλήλως οι κανόνες υγιεινής κατά τη διάρκεια όλης της αλυσίδας παραγωγής των τροφίμων

3.3. Ανίχνευση μικροοργανισμών με μοριακές τεχνικές στα τρόφιμα

3.3.1. Απομόνωση DNA

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ, ή αλλιώς DNA, μπορεί να απομονωθεί από έμβιους ή συντηρημένους ιστούς, κύτταρα ή ιούς είτε για αναλυτικούς λόγους είτε για παρασκευαστικούς λόγους. Η απομόνωση του DNA είναι σημαντική για τις περισσότερες μοριακές αναλύσεις, καθώς χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη, και απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί το να παραλαμβάνεται “καθαρό”. Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει το DNA στα πείραματα μοριακής βιολογίας είναι η εύκολη απομόνωσή του από ποικίλες πηγές, η καθαρότητα με την οποία μπορεί να απομονωθεί και η διατηρησιμότητά του για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Το DNA μπορεί να απομονωθεί με διαφορετικές τεχνικές και η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής εξαρτάται από το αρχικό δείγμα (όπως κύτταρα, ιστό, αίμα), το είδος του DNA (χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό, ιικό κ.λπ.), αλλά και την ποιότητα DNA που επιθυμούμε να απομονώσουμε.

Για τις περισσότερες τεχνικές απομόνωσης, είναι αναγκαία η απομάκρυνση του DNA από τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά. Καταρχάς, επιτυγχάνεται λύση των κυττάρων χρησιμοποιώντας διαλύτες, ανάλογα με την φύση του κυττάρου. Στη συνέχεια, προστίθενται χημικά, όπως η φαινόλη, με σκοπό να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται στο μίγμα. Η χρήση χλωροφορμίου επιβάλλεται, ώστε να γίνει διαλυτοποίηση των λιπιδίων. Έπειτα από φυγοκέντρηση του μίγματος, παρατηρούνται τρεις διάκριτες φάσεις, εκ των οποίων η μία είναι φαινολική, η άλλη υδατική και η τελευταία είναι χλωροφορμική. Συλλέγεται η υδατική φάση, καθώς σε αυτήν περιέχεται το

DNA, και προστίθεται ψυχρή αλκοόλη, ώστε το DNA και το RNA να καθιζάνουν. Αφού επαναληφθεί φυγοκέντρηση του μίγματος συλλέγεται το ίζημα και αραιώνεται σε νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα με αποτέλεσμα να μπορεί να γίνει περαιτέρω επεξεργασία με ειδικά ένζυμα τις RNAασες αποικοδομώντας έτσι το RNA.

Πιο αναλυτικά, η απομόνωση του DNA, ανεξαρτήτως της τεχνικής που χρησιμοποιείται, ακολουθεί μια απλή ροή διεργασίας.

1ο Στάδιο: Λύση κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών με σκοπό την απελευθέρωση του DNA και των υπόλοιπων συστατικών στο διάλυμα

Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιούνται διαλύματα που περιέχουν απορρυπαντικά, συνήθως δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate – SDS), για την λύση των κυτταρικών μεμβρανών. Πιο συγκεκριμένα, για το SDS ισχύει πως αποτελείται από μία υδρόφοβη ουρά και μία υδρόφιλη κεφαλή οριζοντάς το ως ένα αμφιφατικό μόριο, το οποίο δρα σαν αποδιατακτικός παράγοντας και διαταράσσει τους δεσμούς των πρωτεϊνών. Σημαντικό είναι, επίσης, να αναφερθεί πως το SDS απομακρύνει και τις ιστόνες από τα μόρια του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος. Η δομή της κυτταρικής μεμβράνης συγκροτείται από ένα διπλό στρώμα φωσφολιπιδίων και πρωτεΐνες. Στη διπλοστιβάδα οι πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων είναι στραμμένες προς την εξωτερική υδατική φάση, ενώ οι υδρόφοβες λιπαρές αλυσίδες στρέφονται προς το εσωτερικό του διπλού στρώματος. Η δράση του SDS ξεκινά με την διάσπαση της συνοχής των φωσφολιπιδίων και δημιουργεί σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες των μεμβρανών μετατρέποντάς τες σε υδατοδιαλυτές. Ταυτόχρονα, το SDS με την δέσμευση των μη μεμβρανικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα να χάνεται η τριτοταγής δομή αυτών των πρωτεϊνών, άρα και η λειτουργικότητά τους.

2ο Στάδιο: Χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων για την αποικοδόμηση των κυτταρικών πρωτεϊνών

Η πρωτεϊνάση K είναι το ένζυμο που χρησιμοποιείται συνηθέστερα για τον σκοπό αυτό. Αυτό συμβαίνει γιατί η δράση της πρωτεϊνάσης K πραγματοποιείται έναντι ευρέος φάσματος ενδογενών πρωτεϊνών και πιο συγκεκριμένα το όνομα της προέρχεται από την ικανότητά της να διασπά την κερατίνη. Αναλυτικότερα πρόκειται για μία πρωτεάση σερίνης, που έχει την ιδιότητα να εντοπίζει και να διασπά τον πεπτιδικό δεσμό που

βρίσκεται δίπλα στην καρβοξυλομάδα των αλειφατικών και αρωματικών αμινοξέων. Σχετικά ,με την ιδανική θερμοκρασία δράσης της πρωτεΐνάσης K ισχύει πως κυμαίνεται από 50°C μέχρι 70°C. Αφού προστεθεί η πρωτεΐνάση K στο διάλυμα αμέσως καταστέλλει την λειτουργία των ενδογενών νουκλεάσεων (DNAσες) του κυττάρου, που υπάρχει περίπτωση να κατακρεμνήσουν το DNA κατά την διάρκεια της απομόνωσης. Ένα σημαντικό θετικό χαρακτηριστικό του ενζύμου αυτού είναι πως παραμένει δραστικό ακόμα και όταν υπάρχουν στο διάλυμα SDS και χηλικοί παράγοντες όπως το Ethylenediaminetetraacetic (EDTA).

3ο Στάδιο: Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες

Το συγκεκριμένο στάδιο εξαρτάται από το πρωτόκολλο που έχει επιλεγεί να ακολουθηθεί και ο διαχωρισμός μπορεί να επιτευχθεί με τους εξής διαφορετικούς τρόπους:

- προσθήκη διαλυμάτων αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και απόλυτης (100%) αιθανόλης
- οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης χλωροφορμίου
- πρόσδεση σε μεμβράνη ιοντοαλλαγής ή σε μαγνητικά σφαιρίδια

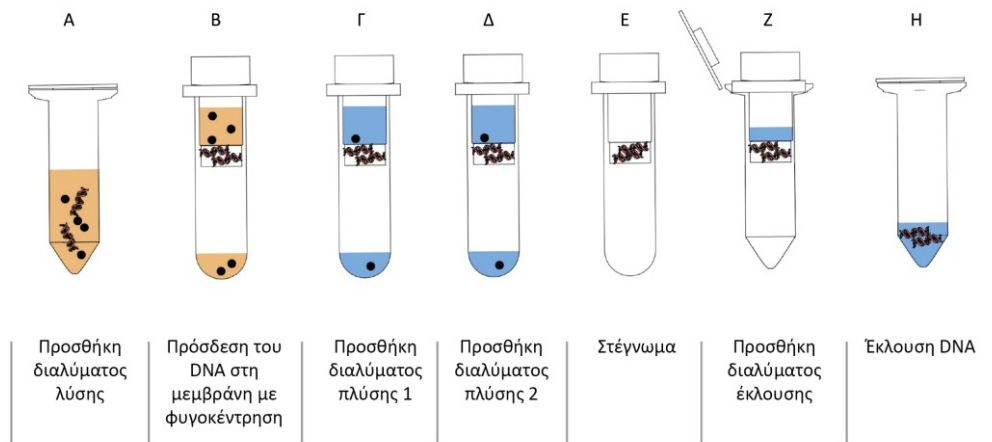
Σε αυτή την περίπτωση, όπως θα αναφερθεί και παρακάτω, χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο όπου έχει επιλεγεί ο πρώτος τρόπος διαχωρισμού του DNA. Όσον αφορά τις υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων ισχύει πως προκαλούν διάσπαση των δεσμών μεταξύ DNA και μορίων νερού, με αποτέλεσμα να το κάνουν λιγότερο υδρόφιλο, δηλαδή υδατοδιαλυτό. Ταυτόχρονα, με την προσθήκη αιθανόλης παρουσία αυτών των αλάτων προκαλούνται αλλαγές στην δομή του DNA κατακρημνίζοντας το και με την αύξηση της ποσότητάς του γίνεται διακριτό σαν μία λευκή κλωστή. Έπειτα φυγοκεντρείται ώστε το DNA να βρεθεί ως ίζημα και το υπερκείμενο να απομακρυνθεί.

4ο Στάδιο: Καθαρισμός του DNA από υπολλείματα αλάτων χρησιμοποιώντας διάλυμα παγωμένης αλκοόλης 70%

5ο Στάδιο: Έκλουση του DNA

Για να γίνει τελικά η συλλογή του DNA πρέπει να γίνει έκλουσή του με την βοήθεια ενός διαλύματος στο οποίο να είναι διαλυτό το DNA, δηλαδή σε διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος, όπως το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA (TE). Το διάλυμα αυτό περιέχει EDTA,

το οποίο προστατεύει το DNA με την δέσμευση δισθενών ιόντων (Mg^{2+} ή Ca^{2+}), τα οποία είναι απαραίτητα για την δράση των ενζύμων που διασπούν το DNA (νουκλεάσες) αλλά και για τις πρωτεάσες.



Εικόνα 3.3: Διαδικασία απομόνωσης DNA

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες μεθόδων απομόνωσης DNA:

1. Απομόνωση DNA με εμπορικά διαθέσιμα συστήματα αντιδραστηρίων (kits)
2. Αυτοματοποιημένα συστήματα απομόνωσης DNA

Απομόνωση DNA με εμπορικά διαθέσιμα συστήματα αντιδραστηρίων (kits)

Αυτά τα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα αντιδραστηρίων ή αλλιώς kits έχουν κάνει πιο απλή και ταχεία την απομόνωση του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος και για αυτό τον λόγο χρησιμοποιούνται όλο και πιο συχνά. Η συγκεκριμένη μέθοδος απομόνωσης DNA βασίζεται στην εκλεκτική και προσωρινή πρόσδεση του DNA σε μεμβράνη γέλης πυριτίου που βρίσκεται μέσα σε κατάλληλη αποστειρωμένη στήλη. Με την χρήση διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, που αναφέρθηκαν και προηγουμένως, τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA δεσμεύονται με τα θετικά φορτισμένα μόρια πυριτίου της μεμβράνης. Η αναστροφή αυτού του φαινομένου επιτυγχάνεται με την χρήση ελαφρά αλκαλικού διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος εκλούοντας με αυτόν τον τρόπο το DNA από την μεμβράνη.

Ανάλογα με την πηγή από την οποία επιθυμείται να γίνει η απομόνωση του γενετικού υλικού και ανάλογα με την ποσότητα DNA που χρειάζεται (mini, midi, max) υπάρχουν

διαφορετικά kits.

Τα κύρια πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν τα kits στην χρήση τους για την απομόνωση του DNA είναι:

- ο εύκολος χειρισμός του και οι λεπτομερές οδηγίες για την εκτέλεση της διαδικασίας
- η δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων με αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας
- η αποφυγή χρήσης επικίνδυνων χημικών ουσιών, όπως φαινόλη και χλωροφόρμιο
- η απομόνωση υψηλής ποιότητας γενετικού υλικού
- η δυνατότητα επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων



Εικόνα 3.4: Kit Απομόνωσης DNA, NucleoSpin® Food, MACHEREY-NAGEL

Αυτοματοποιημένα συστήματα απομόνωσης DNA

Τα αυτοματοποιημένα αυτά συστήματα είναι μία μέθοδος που έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια και βασίζεται στην τεχνολογία των μαγνητικών σφαιριδίων. Πιο συγκεκριμένα, σε αυτό σύστημα όλα τα απαραίτητα βήματα εκτελούνται αυτόματα, από την προετοιμασία του δείγματος έως την έκλυση του καθαρού DNA.

Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζονται σε αυτά τα ρομποτικά συστήματα είναι:

- η εκμηδένιση των πιθανοτήτων για κίνδυνο επιμόλυνσης από δείγμα σε δείγμα
- το μικρό χρονικό διάστημα απομόνωσης
- η ελάχιστη ενασχόληση του χειριστή

Βέβαια η συγκεκριμένη μέθοδος έχει και τα εξής μειονεκτήματα:

- δεν είναι δυνατή η απομόνωση DNA από πιο “δύσκολες πηγές” (όπως δόντια, τρίχες κ.α.)
- το αρκετά μεγάλο κόστος των αντιδραστηρίων και του μηχανισμού

3.3.2. Έλεγχος καθαρότητας DNA

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της απομόνωσης του DNA, είναι σημαντικό πριν γίνουν περαιτέρω αναλύσεις, πρέπει να ελεγχθεί η ποιότητα και η καθαρότητα του γενετικού υλικού που έχει απομονωθεί, ώστε να χρησιμοποιηθεί σε σωστές συγκεντρώσεις κατά την διεξαγωγή πειραμάτων.

Η μέτρηση του γενετικού υλικού επιτυγχάνεται με την χρήση της μεθόδου της φασματοφωτομετρίας μετρώντας την απορρόφηση του υπεριώδους φωτός από τις βάσεις των πυρινηκών οξέων. Πιο συγκεκριμένα, ο υπολογισμός της ποσότητας του γενετικού υλικού που έχει απομονωθεί εξαρτάται από την ένδειξη στα 260nm. Αναλυτικότερα, όταν η απορρόφηση στα 260nm $A_{260nm}=1$ αυτό αναλογεί σε 50μg/ml δίκλωνου DNA ή σε 37g/ml μονόκλωνου DNA. Ταυτόχρονα, μία ακόμα ένδειξη που λαμβάνεται και είναι σημαντική είναι στα 280nm. Μέσω αυτών των δύο τιμών προκύπτει ο λόγος A_{260nm}/A_{280nm} , ο οποίος δίνει την δυνατότητα ελέγχου της καθαρότητας του DNA. Αν ο λόγος αυτός είναι:

- από 1,8 μέχρι και 2,0 τότε το υλικό που έχει απομονωθεί θεωρείται καθαρό
- μικρότερο του 1,8 τότε υπάρχουν προσμίξεις είτε από πρωτεΐνες είτε από φαινόλη που χρησιμοποιήθηκε κατά την διάρκεια της απομόνωσης
- μεγαλύτερο από 2,0 τότε πρόκειται για προσμίξεις με RNA και δεν προκαλούν κάποιο πρόβλημα

3.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ή αλλιώς PCR (Polymerase Chain Reaction) ανακαλύφθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Karry Mullis και αποτελεί μία επαναστατική τεχνική πολλαπλασιασμού DNA, η οποία διευκολύνει σε πολύ μεγάλο βαθμό την μελέτη και τις εφαρμογές της Μοριακής Γενετικής. Γενικότερα, η PCR είναι

μία ταχεία και αποτελεσματική μέθοδος, η οποία βασίζεται στην διαδικασία της αντιγραφής του DNA επιτρέποντας την δημιουργία απεριόριστων αντιγράφων επιλεγμένης περιοχής του γενετικού υλικού από ένα μόνο κύτταρο. Στην ουσία είναι μία απλή μέθοδος κατά την οποία πραγματοποιείται *in vitro* σύνθεση συγκεκριμένης αλληλουχίας βάσεων DNA, σε επαρκής ποσότητα ώστε να ανιχνεύεται και να ταυτοποιείται με ευκολία. Κατά την αντιγραφή αντί για τα κυτταρικά ένζυμα, που φυσιολογικά την εκτελούν, χρησιμοποιούνται οι ανθεκτικές DNA πολυμεράσες του βακτηρίου *Thermus aquaticus*, το οποίο ζει στο νερό στους 75°C. Έτσι, η Taq πολυμεράση αντέχει ακόμα και στους 94°C παραμένοντας ενεργή καθ' όλη την διάρκεια της PCR. Λόγω της ακρίβειας και της ευαισθησίας αυτής της τεχνικής το τελικό προϊόν που προκύπτει είναι ένα πιστό αντίγραφο του στόχου-DNA. Χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, ή αλλιώς primers, κατά την διάρκεια της PCR κατευθύνεται ο θερμικός πολλαπλασιασμός της επιλεγμένης αλληλουχίας, μέσω επαναλαμβανόμενων γύρων αποδιάταξης, υβριδισμού με εκκινητές και επιμήκυνσης.

Κατά την πραγματοποίηση της PCR είναι απαραίτητη η χρήση συγκεκριμένων αντιδραστηρίων ανεξαρτήτως του πρωτοκόλλου που έχει επιλεγεί για ορισμένο πείραμα. Τα αντιδραστήρια αυτά είναι τα εξής:

1. **Target DNA/DNA στόχος:** πρόκειται για την συγκεκριμένη αλληλουχία γενετικού υλικού που έχει επιλεγεί να ανιχνευτεί και να πολλαπλασιαστεί. Αυτό μπορεί να προέρχεται από διαφορετικά δείγματα και μάλιστα είναι ένα πλεονέκτημα της PCR να αναλύσει μη καθαρό δείγμα ή δείγμα που περιέχει μικρή ποσότητα DNA ή ακόμα και σε διασπασμένο DNA. Μοναδική προϋπόθεση για την PCR είναι το τμήμα DNA που επιθυμείται να πολλαπλασιαστεί να είναι ακέραιο.
2. **Primers/Εκκινητές Ολιγονουκλεοτιδίων:** ονομάζονται αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων, οι οποίες είναι συμπληρωματικές ως προς τα άκρα 5' και 3' των μονόκλωνων αλυσιδών του DNA στόχου. Χρησιμοποιούνται ζεύγη εκκινητών που να υβριδοποιούνται στην περιοχή του γενετικού υλικού που έχει επιλεγεί να πολλαπλασιαστεί. Σημαντική προϋπόθεση είναι οι εκκινητές να μην είναι συμπληρωματικοί με άλλες ακολουθίες του DNA που δεν είναι στόχοι. Ταυτόχρονα πρέπει να υπάρχει ακριβής ταύτιση μεταξύ εκκινητή και DNA στόχου. Όσον αφορά τους ίδιους τους εκκινητές συνήθως πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια

15 έως 30 βάσεων. Η επιλογή και ο σχεδιασμός εκκινητών επιτυγχάνεται με την βοήθεια πολλών προγραμμάτων. Αυτά τα προγράμματα συμβάλλουν στην αποφυγή λάθος προσκόλλησης σε αλληλουχίες διαφορετικών του στόχου και παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Επιπλέον βοηθούν στην επιλογή εκκινητών με παρόμοια περιεκτικότητα σε G+C με σκοπό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία αποδοτική θερμοκρασία υβριδισμού. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι σημαντικό καθώς η θερμοκρασία τήξης T_m ενός εκκινητή εξαρτάται από το ποσοστό σε ζεύγη βάσεων, σε μεγαλύτερο βαθμό των GC, και οι τιμές T_m των δύο εκκινητών πρέπει να είναι παραπλήσιες.

3. **Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια/dNTPs:** αναφέρονται στα τέσσερα 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια αδερίνη(dATP), θυμίνη(dTTP), κυτοσίνη(dCTP) και γουανίνη(dGTP), τα οποία είναι τα δομικά συστατικά για την σύνθεση των νέων αλυσίδων DNA και πρέπει να είναι σε ίσες ποσότητες στο μίγμα. Σε περίπτωση πλεονάσματος ενός από αυτά η μέθοδος καταλήγει να παρουσιάζει σημαντικό αριθμό σφαλμάτων κατά την αντιγραφή.
4. **DNA polymerase/DNA πολυμεράση:** είναι το ένζυμο που εκτελεί την σύνθεση του νέου αντιγράφου. Για να μπορεί να δράσει όμως πρέπει να υπάρχει στο μίγμα το μονόκλωνο DNA-προτύπου, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί σαν καλούπι, ένας εκκινητής για να δηλώσει το σημείο έναρξης της αντιγραφής και τα 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, από τα οποία θα σχηματιστεί η νέα συμπληρωματική αλυσίδα. Η κατεύθυνση που ακολουθεί το ένζυμο είναι πάντα από ακρό 5' προς το άκρο 3'.
5. **Buffer Solution/ Ρυθμιστικό Διάλυμα:** περιέχει συστατικά, όπως χλωριούχο νάτριο ή χλωριούχο κάλιο, τα οποία βοηθούν κάνοντας πιο εύκολη την σύνδεση των εκκινητών στο DNA-στόχος ενισχύοντας ταυτόχρονα την δραστικότητα και σταθερότητα της DNA πολυμεράσης. Σε περίπτωση συγκέντρωσης των αλάτων μεγαλύτερης από 50mM προκαλεί αναστολή της δράσης της Taq πολυμεράσης. Άλλο ένα συστατικό που υπάρχει στο διάλυμα είναι το Tris-HCl και βρίσκεται σε συγκεντώσεις 10mM με 50mM με pH=8,3 στους 20°C, ενώ κατά την διάρκεια της PCR επικρατούν συνθήκες θερμοκρασιών έως και 94°C τότε το pH κυμαίνεται σε τιμές 6,8 με 7,8. Η DNA πολυμεράση παρουσιάζει μεγαλύτερη ενζυμική δραστηριότητα σε pH λίγο πιο πάνω από 8. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως στο

διάλυμα υπάρχουν επίσης ιόντα μαγνησίου, μη ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες, ζελατίνη ή ορολευκωματίνη. Τα παραπάνω συστατικά είναι απαραίτητα για την δράση της Taq πολυμεράσης και την ενίσχυση της ειδικότητας και της μέγιστης δυνατής παραγωγής του τελικού προϊόντος.

Βασικά Στάδια της PCR:

Το όργανο που χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR in vitro ονομάζεται θερμοκυκλοποιητής. Η αντίδραση μπορεί να παρουσιαστεί σε τρία βασικά στάδια κατά τα οποία λαμβάνουν χώρα συνεχώς επαναλαμβανόμενοι κύκλοι διαδοχικής αύξησης και μείωσης της θερμοκρασίας.

Στάδιο 1ο: Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (Denaturation)

Σε αυτό το στάδιο το δείγμα του DNA-στόχου επωάζει περίπου στους 94-96°C με σκοπό να επιτευχθεί σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA και τελικά η αποδιάταξη της διπλής έλικας. Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνονται τα δύο μονόκλινα εκμαγεία γενετικού υλικού που θα χρησιμοποιηθούν σαν καλούπια για την σύνθεση του τελικού προϊόντος.

Στάδιο 2ο: Υβριδισμός των εκκινητών (Primer annealing)

Σε αυτό το σημείο της αντίδρασης πραγματοποιείται προσαρμογή των εκκινητών στο DNA-στόχο. Αυτό επιτυγχάνεται με μείωση της θερμοκρασίας προκαλώντας των υβριδισμό των εκκινητών της αντίδρασης με την συμπληρωματική αλληλουχία στο μονόκλινο εκμαγείο DNA. Πιο συγκεκριμένα, η θερμοκρασία που επιλέγεται σε αυτό το στάδιο κυμαίνεται μεταξύ 40 με 60°C, δηλαδή περίπου στην θερμοκρασία τήξης εκκινητή ολιγονουκλεοτιδίων. Τέλος, να τονιστεί πως η άριστη θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται από το μήκος που έχουν οι εκκινητές, την συγκέντρωση των εκκινητών στο μίγμα και τέλος από την θερμοκρασία τήξης του, ώστε να επιλέγεται να βρίσκεται 5°C με 10°C κάτω από την T_m των εκκινητών.

Στάδιο 3ο: Επιμήκυνση των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (Primer extension)

Στο τελικό αυτό στάδιο η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται κυμαίνεται στους 72-74°C και

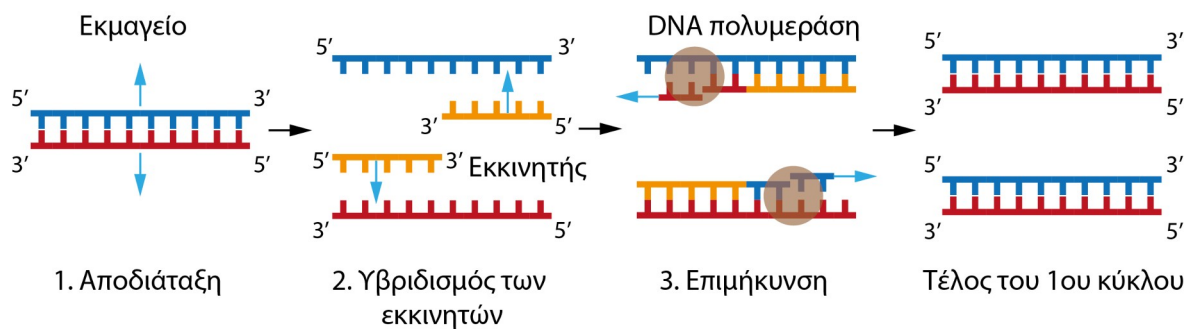
η αλληλουχία των εκκινητών επεκτείνεται χρησιμοποιώντας συμπληρωματικές βάσεις με την αλληλουχία του DNA-στόχου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της DNA πολυμεράσης, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοφίλο βακτήριο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, *Thermus aquaticus*, από όπου παίρνει και το όνομα Taq πολυμεράση, εμφανίζοντας βέλτιστη θερμοκρασία δραστηριότητας στους 72°C. Με αυτόν τον τρόπο η Taq πολυμεράση δεν μετουσιώνεται κατά το στάδιο της αποδιάταξης έχοντας έτσι την δυνατότητα επανάληψης της αντίδρασης χωρίς να είναι υποχρεωτική η προσθήκη πολυμεράσης σε κάθε νέο κύκλο. Στο τέλος αυτού του σταδίου σε κάθε κύκλο θα έχουν σχηματιστεί δύο καινούργιες αλυσίδες DNA, δηλαδή ο διπλασιασμός των δύο αρχικών.

Η PCR στην πράξη:

1. Το DNA-στόχος με την χρήση περιοριστικών ενζύμων τεμαχίζεται σε μικρότερα τμήματα
2. Η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 94-96°C με σκοπό την αποδιάταξη των δίκλωνων τμημάτων DNA, που δημιουργήθηκαν προηγουμένως, σε μονόκλιωνα μόρια μέσω της λύσης των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν την διπλή έλικα. Είναι σημαντικό σε αυτό το σημείο να είναι γνωστή η σύνθεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας προς ανάλυση ή τουλάχιστον τα τελευταία 20 δεοξυριβονουκλεοτίδια για κάθε 3' άκρο.
3. Σε αυτό το σημείο κατασκευάζεται το ζεύγος εκκινητών που θα χρησιμοποιηθεί. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για δύο ολιγονουκλεοτίδια, που αποτελούνται περίπου από 20 νουκλεοτίδια το καθένα, συμπληρωματικά στο 3' άκρο της κάθε αλυσίδας εκμαγείου και υποδεικνύουν το σημείο έναρξης της αντιγραφής που θα ξεκινήσει να συνθέτει η Taq πολυμεράση.
4. Μειώνοντας την αρχική θερμοκρασία στους 40-60°C προσθέτονται μεγάλες ποσότητες των εκκινητών με σκοπό τον υβριδισμό τους με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες .
5. Έπειτα από την πραγματοποίηση της υβριδοποίησης έχουν δημιουργηθεί δύο μόρια με δίκλιωνα άκρα 20 νουκλεοτιδίων περίπου και μία μονόκλινη “ουρά”, της οποίας το μήκος είναι ανάλογο του μεγέθους της αρχικής αλληλουχίας.
6. Προστίθεται η θερμοανθεκτική Taq πολυμεράση, η οποία παρουσιάζει δραστηριότητα στις υψηλές θερμοκρασίες της PCR, μαζί με το τριφωσφορικά

δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα οποία θα χρησιμοποιήσει η DNA πολυμεράση για την σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων, καταλήγοντας να παραχθούν δύο πιστά αντίγραφα του DNA-στόχου.

7. Με αυτόν τον τρόπο ολοκληρώνεται ένας κύκλος. Μετά το τέλος του πρώτου κύκλου η διαδικασία επαναλαμβάνεται αυξάνοντας την θερμοκρασία ξανά στους 95°C περίπου και ξεκινώντας τον δεύτερο κύκλο. Για την ολοκλήρωση της αντίδρασης εκτελούνται συνήθως 30-40 κύκλοι συνολικά και για κάθε κύκλο χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία τόσο οι αρχικές αλληλουχίες του δείγματος όσο και τα αντίγραφα που έχουν δημιουργηθεί. Το τελικό προϊόν της αντίδρασης PCR ονομάζεται amplicon από το amplification που σημαίνει πολλαπλασιασμός.



Εικόνα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας της PCR

Προβλήματα κατά την αντίδραση PCR και έλεγχος της:

Η τεχνική PCR μπορεί να παρουσιάζει προβλήματα, όμως για ορισμένα από αυτά να υπάρχει τρόπος ελέγχου για την αποφυγή τους. Αρχικά, στο σύστημα της συγκεκριμένης τεχνικής μπορεί να παρατηρηθεί επιμόλυνση από διαφορετικά DNA, τα οποία να καταφέρουν επίσης να διπλασιαστούν ταυτόχρονα με το δείγμα. Αυτό μπορεί να συμβεί όταν ξένο γενετικό υλικό έχει παραμείνει από προηγούμενα αμπλικόνια ή να έχει εισαχθεί από άγνωστες πηγές. Η αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος επιτυγχάνεται με την επιμελή τήρηση των εργαστηριακών πρωτοκόλλων, όπως αυστηρός ποιοτικός έλεγχος των ενζυμικών αντιδραστηρίων και η χρησιμοποίηση καθαρού μικροεξοπλισμού.

Ένας ακόμη σημαντικός έλεγχος για την αποφυγή προβλημάτων είναι το "θετικό κόντρόλ". Πρόκειται για δοκιμασίες όπου ελέγχεται αν έχουν εφαρμοστεί οι κατάλληλες χημικές παράμετροι, όπως η σωστή επιλογή εκκινήτων, θερμοκρασίας, χρόνου, κτλ., για

την επίτευξη επαρκούς πολλαπλασιασμού του δείγματος. Με αυτόν τον τρόπο αν δεν δοθεί το αναμενόμενο θετικό αποτέλεσμα της PCR διαπιστώνονται τα εξής:

- μη επαρκής ποσότητα DNA στο δείγμα
- εφαρμογή λανθασμένων παραμέτρων της PCR
- παρουσία κατασταλτικού παράγοντα για την διαδικασία

Πρέπει να σημειωθεί επίσης και το “αρνητικό κοντρόλ”, το οποίο επιτυγχάνει τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης από διαφορετικό DNA από αυτό που θέλουμε να πολλαπλασιαστεί. Συγκεκριμένα αυτή η δοκιμασία αφορά δείγματα στα οποία δεν περιέχεται καθόλου DNA και θα πρέπει να δίνουν αρνητικό αποτέλεσμα. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος τότε τα αντιδραστήρια ή τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται έχουν υποστεί κάποια επιμόλυνση.

Ταυτόχρονα, σε περίπτωση που το DNA-στόχος δεν καταφέρει να πολλαπλασιαστεί επαρκώς εάν είναι πολύ κατεστραμένο, τότε μετά την ολοκλήρωση της πρώτης PCR μπορεί να διεξαχθεί μία δεύτερη PCR στο αμπλικόνιο της πρώτης χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συμπληρωματικούς εκκινητές, ειδικούς για την περιοχή DNA που επιθυμείται να πολλαπλασιαστεί.

Κάποια επιπλέον μειονεκτήματα της PCR είναι:

- η απαίτηση εξειδικευμένων μηχανημάτων και προσωπικού
- ότι δεν παρουσιάζει σημαντική ευαισθησία σε επεξεργασμένα τρόφιμα
- αρκετά πιο ακριβή από την μέθοδο ELISA

Είδη Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης:

1. Multiplex PCR / Πολυπλεκτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
2. Nested PCR / Επάλληλη ή εμφωλιάζουσα PCR
3. LMP (Ligation Mediated PCR) / Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μέσω σύνδεσης
4. RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) / PCR Αντίστροφης Πολυμεράσης
5. Ασύμμετρη PCR
6. LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) / Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου

Εφαρμογές της PCR στη βιομηχανία τροφίμων

- A) Ανίχνευση μικροοργανισμών
- B) Ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών
- C) Ανίχνευση νοθείας σε μοριακό επίπεδο

3.3.4. Ηλεκτροφόρηση

Ως ηλεκτροφόρηση πρακτικά ορίζεται η διαδικασία μετακίνησης φορτισμένων σωματιδίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Αυτό το φαινόμενο είναι η βάση για την επίτευξη της πολύ χρήσιμης μεθόδου που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση βιολογικών μορίων διαφόρων μεγεθών. Η εφαρμογή της ηλεκτροφόρησης μπορεί να επιτευχθεί στα συγκεκριμένα μόρια με την προϋπόθεση πως φέρουν χημικές ομάδες που ιονίζονται και εν συνέχεια όταν βρεθούν σε επιλεγμένες συνθήκες pH καθαρού θετικού ή αρνητικού φορτίου στο οποίο μπορεί να προκαλέσει κίνηση των μορίων αυτών κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου προς τον αντίθετο πόλο.

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται ευρέως για την πραγματοποίηση του διαχωρισμού αλλά και του προσδιορισμού μίγματος ουσιών με αυξημένο μοριακό βάρος, όπως είναι οι πρωτεΐνες, οι λιποπρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, τα ένζυμα και τα ισοένζυμα, ή μικρότερου μοριακού βάρους μόρια, όπως για παράδειγμα πεπτιδία και αμινοξέα.

Συγκεκριμένα, η εφαρμογή της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης σε DNA χρησιμεύει για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA ποικίλων μεγεθών που περιέχονται σε ένα μίγμα και τον προσδιορισμό του μήκους τους. Όσον αφορά μεγαλύτερα μόρια DNA πρέπει αρχικά να επεξεργαστούν με ειδικά ένζυμα που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες, τα οποία τεμαχίζουν τα μεγάλα μόρια γενετικού υλικού σε μικρότερα τμήματα. Στο όργανο της ηλεκτροφόρησης, τοποθετείται πηκτή, είτε αγαρόζης είτε πολυακρυλαμιδίου, η οποία εμβαπτίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα. Η πηκτή έχει μικρές εσοχές ή αλλιώς “πηγάδια”, όπου με την βοήθεια μικροπιπέτας εμβολιάζονται τα δείγματα και ένας μάρτυρας DNA γνωστού μήκους, με αποτέλεσμα να είναι εφικτός ο προσδιορισμός του μήκους των άγνωστων δειγμάτων σε σύγκριση με αυτό του μάρτυρα. Όταν στο παραπάνω σύστημα εφαρμοστεί ηλεκτρικό ρεύμα τότε τα μόρια με αρνητικό φορτίο, το οποίο προκύπτει κυρίως λόγω των φωσφορικών ομάδων τους, μετακινούνται

προς τον θετικό πόλο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα των διαχωρισμό των μορίων με διαφορετικό καθαρό φορτίο, καθώς παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα. Σχετικά με τα μόρια ίδιου καθαρού φορτίου άλλα διαφορετικού μήκους παρατηρείται επίσης διαφορετική ταχύτητα, εξαιτίας των διαφορετικών δυνάμεων τριβής που τους ασκούνται, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται. Αναλυτικότερα, τα μικρά τμήματα μετακινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα, σε αντίθεση με μεγαλύτερα τμήματα που κινούνται με πιο αργούς ρυθμούς, καθώς παρεμποδίζονται από την δομή της πηκτής. Εδώ να σημειωθεί πως ρυθμίζοντας το μέγεθος των πόρων της πηκτής που χρησιμοποιείται μπορεί να καθοριστεί η κινητικότητα των μορίων που επιθυμούμε να διαχωριστούν ή επιλέγοντας το εύρος του μεγέθους των μορίων, τα οποία σε πηκτή συγκεκριμένης σύστασης διαχωρίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό. Με αυτόν τον τρόπο τα διαφορετικά τμήματα καταλαμβάνουν τις συγκεκριμένες θέσεις που τους αντιστοιχούν σχηματίζονται εμφανής ζώνες. Οι ζώνες αυτές γίνονται ορατές σε υπεριώδη ακτινοβολία προσθέτοντας προηγουμένως ειδική χρωστική που ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο και έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στο DNA φθορίζοντας με την έκθεσή της στο υπεριώδες. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως το μήκος του DNA μετριέται σε ζεύγη βάσεων.

Παράγοντες που επηρεάζουν την κινητικότητα των μορίων στην πηκτή:

1. Η στερεοδιάταξη και το μέγεθος του DNA. Όσον αφορά την στερεοδιάταξη για τα μόρια του DNA μπορεί να είναι υπερελικωμένα, όπως αυτά του πλασμιδιακού DNA, ανοιχτά κυκλικά ή ευθύγραμμα επηρεάζοντας την αντίσταση που δέχεται το DNA από τους πόρους της πηκτής. Μεγαλύτερη ταχύτητα παρουσιάζουν τα υπερελικωμένα DNA σε σχέση με τα ανοιχτά κυκλικά και ευθύγραμμα μόρια.
2. Η συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου ή αγαρόζης
3. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται πρέπει να διατηρεί το pH του σταθερό και να περιέχει τα αναγκαία ιόντα, ώστε να αυξηθεί η ηλεκτρική αγωγιμότητα. Όταν απουσιάζουν τα ιόντα ελαχιστοποιείται η ηλεκτρική αγωγιμότητα και το DNA μετακινείται ελάχιστα στο πήκτωμα.
4. Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου έχει ως μονάδα μέτρησης V/cm. Η τάση που επιλέγεται πιο συχνά είναι στα 5V/cm και εξαρτάται από την απόσταση που υπάρχει μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων του οργάνου. Μειωμένη τάση ευνοεί τον διαχωρισμό μορίων μεγαλύτερου μεγέθους και αντίθετα σε αυξημένη τάση

επιτυγχάνεται μόνο διαχωρισμός μικρών τμημάτων DNA, καθώς παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευκινησία μέσα στην πηκτή.

Ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται συνήθως:

- TAE-Tris Acetate EDTA: Παρουσιάζει μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα, απαιτεί χαμηλή τάση και αυξημένο χρόνο. Βέβαια, δίνει καλύτερα αποτελέσματα και καλό διαχωρισμό σε DNA >4kb και πλασμιδιακό DNA.
- TBE-Tris Botane EDTA: Εμφανίζει πρόβλημα αλληλεπίδραση με το RNA. Όμως έχει καλό διαχωρισμό σε DNA 0,1-3kb και εφαρμόζοντας τάση >150V.

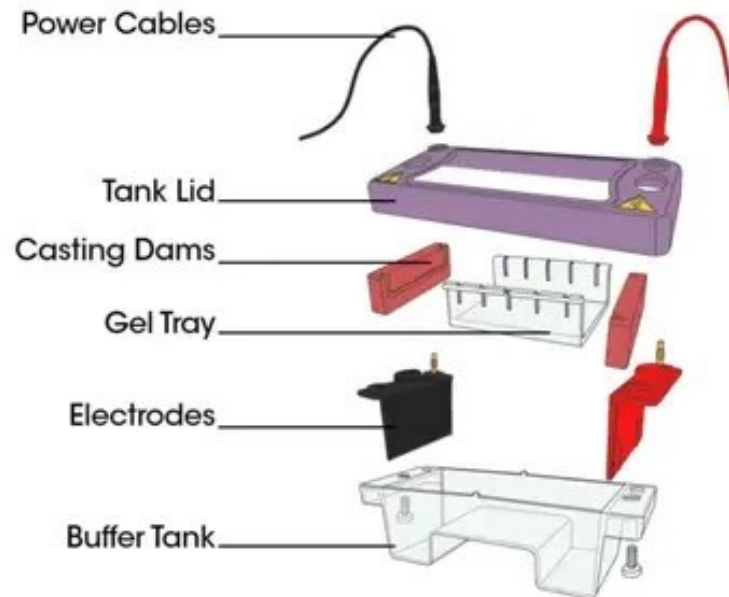
Είδη Ηλεκτροφόρησης:

Για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης απαιτείται και εξειδικευμένος εξοπλισμός, ο οποίος αποτελείται από δύο βασικά μέρη, τη μονάδα ηλεκτροφόρησης και τη μονάδα τάσης. Σχετικά με την μονάδα ηλεκτροφόρησης μπορεί να βρίσκεται είτε σε οριζόντια θέση (ηλεκτροφορήσεις γενετικού υλικού) είτε σε κάθετη θέση (όταν επιλέγεται πήκτωμα πολυακρυλαμίδης). Για να επιλεγεί κατάλληλη μέθοδος διαχωρισμού νουκλεϊκών οξέων λαμβάνεται υπόψιν το μέγεθος των μορίων και η επιθυμητός βαθμός ανάλυσης. Οι πιο σύνηθες μέθοδοι ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούν είτε πηκτή αγαρόζης είτε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

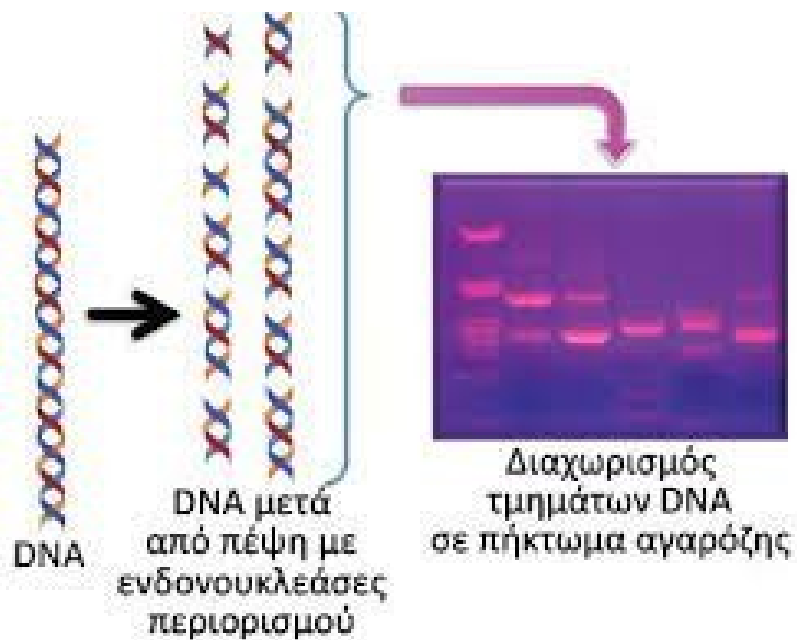
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Το κύριο χαρακτηριστικό ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης είναι πως έχει την δυνατότητα διαχωρισμού τμημάτων DNA ποικίλων μεγεθών. Όσον αφορά την αγαρόζη πρόκειται για πολυσακχαρίτη που απομονώνεται από κόκκινα φύκη. Η δημιουργία της πηκτής από αγαρόζη απαιτεί την προσθήκη του πολυσακχαρίτη σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και θερμαίνοντας το μίγμα διαλυτοποιείται. Το μόριο της αγαρόζης αποτελείται από πολλές ομάδες υδροξυλίου, οι οποίες μπορούν και αναπτύσσουν δεσμούς υδρογόνου σταθεροποιώντας έτσι το δίκτυο μεγάλων πόρων στη μήτρα της πηκτής. Για το συγκεκριμένο πήκτωμα για να καταφέρει να γίνει ορατό το DNA χρησιμοποιούνται ειδικές χρωστικές, όπως το EtBr (βρωμιούχο αιθίδιο), το οποίο μπορεί και συμπλέκεται με το DNA προσφέροντας την δυνατότητα εύκολου εντοπισμού. Αφού τρέξει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης μπορούν να παρατηρηθούν τα τμήματα DNA κάτω από μία λάμπα

υπεριώδους φωτός, όπου γίνονται διακριτές οι ζώνες DNA αφού φθορίζει το βρωμιούχο αιθίδιο.



Εικόνα 3.6: Μέρη συσκευής ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 3.7: Παράδειγμα πορείας και αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης περιορίζεται στον διαχωρισμό τμημάτων γενετικού υλικού που δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές μεγέθους. Βέβαια παρέχει και την δυνατότητα διαχωρισμού και πρωτεϊνών. Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι η αυξημένη διαχωριστική ικανότητα κυρίως όταν τοποθετείται κατακόρυφα. Εξαιτίας αυτού μπορεί και διαχωρίζει ακόμα και μόρια που διαφέρουν μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο, το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τον εντοπισμό μεταλλάξεων. Η συγκεκριμένη πηκτή σχηματίζει ένα ουδέτερο τρισδιάστατο πλέγμα υδρογονανθράκων που συνδέονται με με μεθυλομάδες. Το πλέγμα προκύπτει έπειτα από πολυμερισμό του N,N1-μεθυλενο-bis-ακρυλαμιδίου (ή σκέτο bis), που παίζει σημαντικό ρόλο στην συνεκτικότητα του πηκτώματος, και των μονομερών ακρυλαμιδίου (MBA). Η ολική συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης και το MBA καθορίζουν το μέγεθος των πόρων της πηκτής, δηλαδή σε υψηλές συγκεντρώσεις πολυακρυλαμίδης παρατηρούνται μικροί πόροι στην πηκτή, και αντιστρόφως. Όταν επιλέγεται να γίνει διαχωρισμός τμημάτων DNA, χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας στην πηκτή εφαρμόζοντας ταυτόχρονα υψηλή τάση με αποτέλεσμα να θερμαίνεται η πηκτή και με την βοήθεια της ουρίας να επιτυγχάνεται μετουσίωση του γενετικού υλικού. Για να γίνει δυνατή η εμφάνιση των διαχωρισμένων τμημάτων DNA χρησιμοποιούνται σημασμένα νουκλεϊκά οξέα. Παλαιότερα επιλέγονταν ραδιενεργά ισότοπα ανιχνεύοντας τα μέσω αυτοραδιογραφίας, ενώ πλέον προτιμάται η ενσωμάτωση φθορίζουσων χρωστικών, οι οποίες διεγείρονται εκλεκτικά με την βοήθεια ακτίνων λέιζερ και στη συνέχεια ανιχνεύονται με φωτοδιόδους. Τέλος, η εμφάνιση των αποτελεσμάτων μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση του αποτυπώματος κατά Southern μεταφέροντας τα τμήματα DNA από το πήκτωμα σε νάιλον ή μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια, η ανίχνευση γίνεται μέσω υβριδοποίησης με την βοήθεια ειδικών ανιχνευτών γονιδίων εφαρμόζοντας ανοσολογικές, αυτοραδιογραφικές ή φθορισμομετρικές μεθόδους.

4. Υλικά και Μέθοδοι

4.1. Συσκευές

- Αναλυτικός Ζυγός
- Αυτοματοποιημένες ρυθμιζόμενες πιπέτες-PIPETMAN GILSON Classic (20μL,200μL)
- Θερμοκυκλοποιητής
- Συσκευή Ηλεκτροφόρησης
- Συσκευή με Λάμπα UV
- Συσκευή Vortex
- Τροφοδοτικό Ηλεκτροφόρησης
- Φασματοφωτόμετρο
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Φυγόκεντρος
- Thermal Block

4.2. Υλικά

- Αγαρόζη
- Γάντια
- Δείγματα DNA
- Κωνική Φιάλη των 250mL
- Μάρτυρας Μοριακών Μεγεθών (Ladder DNA 100bp)
- Ογκομετρικοί Κύλινδροι των 100mL
- Πλαστικά Eppendorf των 1,5mL
- Πλαστικά tips
- PCR plates
- PCR tips

4.3. Διαλύματα

- Διάλυμα βρωμιούχου Αιθιδίου (EtBr) 10 mg/mL
- Ρυθμιστικό Διάλυμα TBE 10x
- Υγρό Ηλεκτροφόρησης (για την παρασκευή 300mL διαλύματος προσθέτουμε 30mL TBE και 270mL απεσταγμένου νερού)

4.4. Περιγραφές Συσκευών

1. Αναλυτικός Ζυγός

Μοντέλο	Precisa-202A
Εταιρία	Precisa
Χώρα Προέλευσης	Germany



Εικόνα 4.1: Αναλυτικός Ζυγός

2. Θερμοκυκλοποιητής

Μοντέλο	Veriti Dx Thermal Cycler
Εταιρία	Thermo Fisher Scientific
Χώρα Προέλευσης	Austria



Εικόνα 4.2: Θερμοκυκλοποιητής

3. Συσκευή Ηλεκτροφόρησης

Μοντέλο	MultiSUB Midi-96
Εταιρία	Clever Scientific
Χώρα Προέλευσης	United Kingdom



Σχήμα 4.3: Συσκευή Ηλεκτροφόρησης

4. Συσκευή Λάμπας UV

Μοντέλο	MiniBis Pro
Εταιρία	Bio Imaging Systems
Χώρα Προέλευσης	Israel



Εικόνα 4.4: Συσκευή Λάμπας UV

5. Συσκευή Vortex

Μοντέλο	Vortex V-1 plus
Εταιρία	Biosan
Χώρα Προέλευσης	Latvia



Εικόνα 4.5: Συσκευή Vortex

6. Τροφοδοτικό Ηλεκτροφόρησης

Μοντέλο	Lively 300V Power Supply, MP-310
Εταιρία	Major Science
Χώρα Προέλευσης	U.S.A.



Εικόνα 4.6: Τροφοδοτικό Ηλεκτροφόρησης

7. Φασματοφωτόμετρο

Μοντέλο	Epoch™ Microplate Spectrophotometer
Εταιρία	Biotek
Χώρα Προέλευσης	U.S.A



Εικόνα 4.7: Φασματοφωτόμετρο

8. Φυγόκεντρος

Μοντέλο	SL 16 Certifuge
Εταιρία	Thermo Scientific™
Χώρα Προέλευσης	Israel



Εικόνα 4.8: Φυγόκεντρος

9. Thermal Block

Μοντέλο	M503-HBD
Εταιρία	Artiglass
Χώρα Προέλευσης	Italy



Εικόνα 4.9: Thermal Block

4.5. Δειγματοληψία

Για την διεξαγωγή του πειράματος με σκοπό τον εντοπισμό *Salmonella spp.* και *Escherichia coli* σε διάφορα δείγματα οπωροκηπευτικών χρησιμοποιήθηκαν τα εξής φρούτα και λαχανικά του εμπορίου:

Πίνακας 4.1: Δείγματα Εμπορίου	
Συσκευασμένο Σπανάκι σε Φύλλα	1. Συσκευασμένο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 2. Κατεψυγμένο 3. Κατεψυγμένο Βιολογικής Καλλιέργειας
Συσκευασμένες Σαλάτες σε Τροποποιημένη Ατμόσφαιρα	4. Σαλάτα Μαρούλι-Κλασσική 5. Μαρούλι Μίχ (μαρούλι ρωμάνα, μαρούλι σαλάτας, αντίδι σγουρό) 6. Σαλάτα Ιταλική (άισμπεργκ, μαρούλι, ραντίτσιο)
Καρότα	7. Καρότα Χύμα Ελληνικά 8. Καρότα Χύμα Ελληνικής προέλευσης 9. Καρότα Αχαΐας Βιολογικά
Ντομάτες	10. Ντομάτες Τσαμπί Πετρούσα Δράμας 11. Ντομάτες Χύμα Ελληνικής Προέλευσης 12. Ντομάτες Βιολογικής Προέλευσης Λασιθίου
Φράουλες	13. Βιολογικές Φράουλες Κορίνθου 14. Φράουλες Ηλείας 15. Φράουλες Μανωλάδα

Μαρούλι

16. Μαρούλι Ελληνικό Χύμα

17. Μαρούλι Αργολήδος

18. Μαρούλι Μέγαρο



4.6. Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA







Για την απομόνωση του DNA των παραπάνω δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit που ονομάζεται NucleoSpin® Food, MACHEREY-NAGEL, το οποίο είναι εξειδικευμένο kit απομόνωσης DNA από δείγματα τροφίμων.

Προετοιμασία για την χρησιμοποίηση του kit:

1. Στο wash buffer C5 πρέπει να προστεθεί αιθανόλη (96-100%) ανάλογα με την ποσότητα των δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν.
2. Πρέπει να διασπαστεί η λυοφιλιμένη πρωτεΐνάση K με την προσθήκη του Proteinase Buffer PB σε σωστή αναλογία.
3. Προθέρμανση του Lysis Buffer CF στους 65°C και του Elution Buffer CE στους 70°C.

Αναλυτική διαδικασία απομόνωσης DNA με την χρήση του NucleoSpin® Food:

1	Αφήνονται τα κατεψυγμένα δείγματα να αποψυχθούν πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου.	
2	Ακολουθεί ομογενοποίηση των δειγμάτων με την χρήση γουδιού.	 Homogenize samples
3	Μεταφορά περίπου 200mg των δειγμάτων σε Eppendorf microtubes των 2mL. Έπειτα, προσθέτονται σε κάθε δείγμα 550μL του Lysis Buffer (CF), με σκοπό την λύση των κυττάρων που υπάρχουν στο δείγμα, και πραγματοποιείται ανάδευση στο Vortex για 15sec. Επίσης, προστίθεται 10μL Proteinase K για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και επαναλαμβάνεται ανάδευση για 2-3sec.	 + 550 μL CF (65 °C) + 10 μL Proteinase K

4	<p>Τα δείγματα αφήνονται να επωásουν στο θερμομπλόκ στους 65°C για 30min, ενώ ανά τακτά διαστήματα αναδεύονται τα δείγματα στο Vortex. Στη συνέχεια, τοποθετούνται τα δείγματα στην φυγόκεντρο για 10min (10.000 x g), ώστε να απομακρυνθεί το ίζημα και κυτταρικά υπολείμματα.</p>	 <p>65°C, 30 min</p> <p>> 10,000 x g, 10 min</p>
5	<p>Μεταφέρεται το καθαρό υπερκείμενο υγρό του κάθε δείγματος σε νέα καθαρά Eppendorf microtubes των 2mL το οποίο είναι ικανό να συγκρατήσει τρεις φορές τον όγκο του δείγματος. Ανάλογα με τον του καθαρού υπερκείμενου υγρού που προέκυψε προστίθεται 1vol του όγκου αυτού Buffer C4 και 1vol αιθανόλη και επιτυγχάνεται ανάδευση στο Vortex για 30sec. (π.χ. για 300μL υπερκείμενου υγρού προσθέτονται 300μL C4 και 300μL αιθανόλη)</p>	 <p>1 vol C4 1 vol ethanol</p>
6	<p>Για την δέσμευση του DNA χρησιμοποιούνται οι στήλες που παρέχει το kit και για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται μία στήλη. Κάθε στήλη μπορεί να χωρέσει μέχρι 700μL και για αυτό σε περίπτωση μεγαλύτερης ποσότητας δείγματος το συγκεκριμένο δείγμα επαναλαμβάνεται μέχρι εξαντλήσεως του δείγματος. Με την χρήση πιπέτας προσθέτονται 700μL του μίγματος στην στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1min (11.000 x g). Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό.</p>	 <p>Load sample</p>  <p>11,000 x g, 1 min</p>
7	<p>Στο σημείο αυτό ξεκινάει η διαδικασία των εκπλύσεων προσθέτοντας με πιπέτα 400μL Wash Buffer CQW σε κάθε στήλη και επιτυγχάνεται φυγοκέντρηση για 1min (11.000 x g). Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό.</p>	<p>+ 400 μL CQW</p> <p>11,000 x g, 1 min</p>
8	<p>Έπειτα, προσθέτονται 700μL Wash Buffer C5 σε κάθε στήλη και επιτυγχάνεται φυγοκέντρηση για 1min (11.000 x g). Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό.</p>	<p>+ 700 μL C5</p> <p>11,000 x g, 1 min</p>
9	<p>Προσθήκη 200μL Wash Buffer C5 σε κάθε στήλη και φυγοκεντρούνται για 2min (11.000 x g). Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό. Για να είναι βέβαιο ότι έχει απομακρυνθεί οποιοδήποτε υπόλειμμα των wash buffer χωρίς να προσθέσουμε φυγοκεντρούνται τα δείγματα μία τελευταία φορά για 1min (11.000 x g) και απομακρύνεται τυχόν υπερκείμενο υγρό.</p>	<p>+ 200 μL C5</p> <p>11,000 x g, 2 min</p>
10	<p>Για την έναρξη της διαδικασίας της έκλουσης του DNA αντικαθίσταται το σωληνάριο συλλογής της στήλης αντικαθίσταται με καινούργιο, ώστε να συλλεχθεί το καθαρό DNA. Κατόπιν με πιπέτα προστίθεται ακριβώς πάνω στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης 100μL Elution Buffer CE και στη συνέχεια αφήνονται τα δείγματα να επωásουν για</p>	 <p>Load sample</p> <p>RT, 5 min</p>  <p>11,000 x g, 1 min</p>

	5min στους 15-25°C. Επιτυγχάνεται φυγοκέντριση για 1min (11.000 x g) κρατώντας μετά την ολοκλήρωσή της του περκείμενο υγρό, το οποίο είναι και το DNA που απομονώθηκε.
11	Το DNA που εκχειρίστηκε και συλλέχθηκε προσδιορίζεται ως προς την συγκέντρωσή του και την καθαρότητά του με φωτομέτρηση.

4.7. Πρωτόκολλο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR)

Η εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (ή αλλιώς PCR) έχει σκοπό την ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων του DNA μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων. Ανάλογα με την αλληλουχία που επιθυμείτε να ανιχνευθεί χρησιμοποιούνται ανάλογες θερμοκρασίες, χρόνοι και αριθμός κύκλων. Στο συγκεκριμένο πείραμα, για τον επαρκή πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας ανίχνευσης της *Salmonella spp.* απαιτούνται 35 κύκλοι, ενώ για την ανίχνευση στελεχών *Escherichia coli* γίνεται προσπάθεια πολλαπλασιασμού του γονιδίου *EcpA* και απαιτεί 40 κύκλους στον θερμοκυκλοποιητή. Το γονίδιο *EcpA* κωδικοποιεί *E. coli common pilus (ECP)*, το οποίο είναι μία κολλητική ίνα που παράγεται από όλα τα είδη *Escherichia coli*.

Διαδικασία προετοιμασίας του μίγματος PCR για το κάθε δείγμα:

- Πριν την έναρξη της προετοιμασίας πρέπει οποιοδήποτε συστατικό βρισκόταν σε συνθήκες κατάψυξης να παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 λεπτά, καθώς είναι απαραίτητο να έχει γίνει καλή απόψυξη του περιεχομένου.
- Ο συνολικός όγκος του μίγματος για κάθε δείγμα της αντίδρασης PCR είναι 45μL, από τα οποία τα 5μL είναι το δείγμα DNA. Στη σύσταση του μίγματος των δειγμάτων για την αντίδραση PCR συμπεριλαμβάνονται το δείγμα DNA, οι εκκινητές, απιονισμένο νερό και το διάλυμα master mix της PCR.
- Το DNA που απομονώθηκε αποτελεί την πρώτη ύλη για την PCR καθώς αυτό περιέχει και την αλληλουχία-στόχο που θέλουμε να πολλαπλασιαστεί. Στην συγκεκριμένη περίπτωση τα δείγματα έχουν πολλή μεγάλη συγκέντρωση DNA και για αυτό θα χρησιμοποιηθεί σχετικά μικρή ποσότητα του δείγματος.
- Το ζεύγος των εκκινητών είχε αποθηκευτεί στην κατάψυξη στους -20°C και σε

συγκέντρωση 100pmol/μL. Για να χρησιμοποιηθούν στην PCR πρέπει να υποστούν αραίωση 1:10, δηλαδή να έχουν τελική συγκέντρωση 10pmol/μL. Οπότε σε ένα σωληνάριο Eppendorf (1,5mL) προστέθηκαν 5μL του ενός εκκινητή και 45μL απιονισμένου νερού, ενώ η ίδια διαδικασία επιτεύχθηκε και για τον άλλον εκκινητή. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται 1μL από τον κάθε αραιωμένο εκκινητή.

- Το διάλυμα master mix της PCR περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για να πραγματοποιηθεί η ενίσχυση της αλληλουχίας DNA-στόχου, δηλαδή Taq-polymerase, δεοξυριβονουκλεοτίδια, MgCl₂, reaction buffer και νερό χωρίς νουκλεάση. Από αυτό το mix θα χρησιμοποιηθούν 25μL σε κάθε ένα από τα δείγματα.
- Στη συνέχεια προστίθεται απιονισμένο νερό έως ότου συμπληρωθούν τα 40μL του μίγματος, ώστε τα υπόλοιπα 5μL να αντιστοιχούν στο δείγμα DNA. Αυτό σημαίνει πως σε κάθε μίγμα θα έχουν προστεθεί 13μL απιονισμένου νερού.
- Πάντα το τελευταίο συστατικό που προστίθεται στο μίγμα είναι το DNA του κάθε δείγματος με ταυτόχρονη ανάδευση του μίγματος με την βοήθεια πιπέτας. Εκτός από τα άγνωστα δείγματα παρασκευάζεται ένα μίγμα στο οποίο την θέση του DNA έχει πάρει το απιονισμένο νερό σε ποσότητα 7μL.
- Με την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας τα δείγματα είναι έτοιμα να τοποθετηθούν στο θερμοκυκλοποιητή για να ξεκινήσει η διαδικασία της PCR.

Πίνακας 4.2: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Master Mix PCR	25μL
Primer Fw	1μL
Primer Rw	1μL
ddH ₂ O	13μL
DNA	5μL

Πίνακας 4.3: Αλληλουχίες και μοριακά βάρη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' προς 3')	Αναμενόμεν ο μέγεθος του προϊόντος της PCR
<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	Forward	GAA-TCC-TCA-GTT-TTT-CAA-CGT-TTC	678
	Reverse	TAG-CCG-TAA-CAA-CCA-ATA-CAA-ATG	
<i>EcpA</i>	Forward	AAT-GGT-TCA-CCG-GGA-CAT-CAT-GTC-C	759
	Reverse	AAG-GAT-GAA-ATA-TCG-CCGACA-TCC	



Εικόνα 4.10: Εκκινητές για ανίχνευση *Salmonella spp.*



Εικόνα 4.11: Εκκινητές για ανίχνευση γονιδίου *EcpA*

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου για την ανίχνευση *Salmonella spp.* είναι:

Στάδιο 1^ο : Αρχική αποδιάταξη DNA → 95°C για 10min

x1

Στάδιο 2^ο : Αποδιάταξη → 95°C για 1min
Υβριδοποίηση → 55°C για 1min
Επιμήκυνση → 72°C για 1min

x35

Στάδιο 3^ο : Τελική ενίσχυση → 72°C για 7min

x1



Εικόνα 4.12: Συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου για την ανίχνευση *Salmonella spp.*

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου *EscrA* είναι:

Στάδιο 1^ο : Αρχική αποδιάταξη DNA → 95°C για 5min x1

Στάδιο 2^ο : Αποδιάταξη → 95°C για 35sec
 Υβριδοποίηση → 58°C για 1min
 Επιμήκυνση → 72°C για 1min x40

Στάδιο 3^ο : Τελική ενίσχυση → 72°C για 10min x1



Εικόνα 4.13: Συνθήκες για την ενίσχυση του τμήματος του γονίδιου *EcpA*

4.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

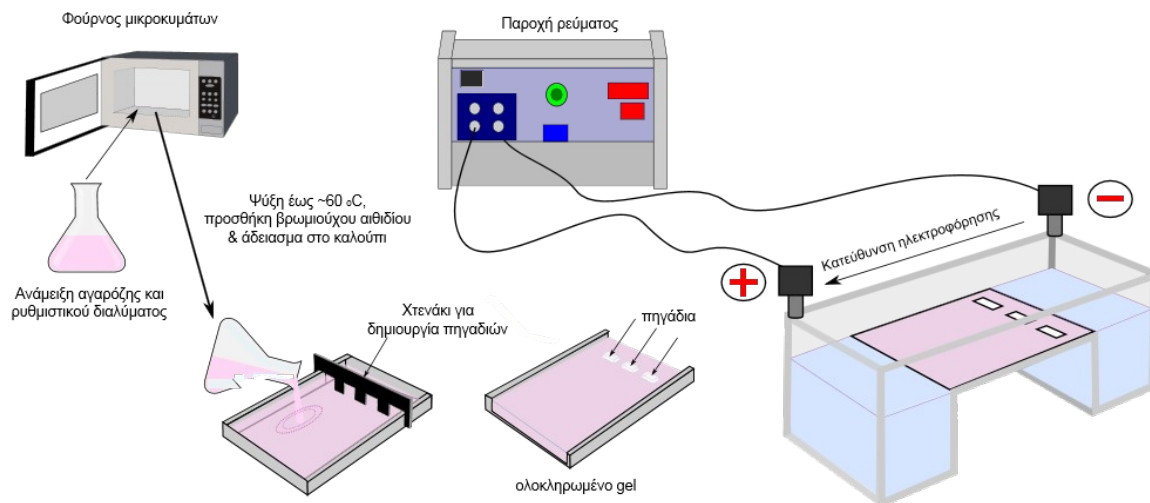
Παρασκευή Πηκτής Αγαρόζης Περιεκτικότητας 2,0%

1. Ζυγίζονται στον αναλυτικό ζυγό 2,6g αγαρόζης για την παρασκευή ενός μονού δίσκου και στη συνέχεια μεταφέρεται η ποσότητα αυτή σε κωνική φιάλη των 500mL.
2. Χρησιμοποιώντας ογκομετρικό σωλήνα των 100mL μετράμε 130mL (100mL + 30mL) αραιωμένου διαλύματος Tris Acetate Acid/EDTA (TAE) και τοποθετούνται και αυτά στη κωνική φιάλη μαζί με την αγαρόζη.
3. Έπειτα, η κωνική φιάλη μεταφέρεται σε φούρνο μικροκυμάτων για να θερμανθεί και να λιώσει η αγαρόζη, ώστε τελικά να παρατηρηθεί ένα διαυγές διάλυμα.
4. Μόλις γίνει διαυγές το διάλυμα απομακρύνεται από τον φούρνο μικροκυμάτων και αφήνεται να κρυώσει μέχρι να φτάσει τους 60°C, όπου στο συγκεκριμένο σημείο προσθέτονται 12μL βρωμιούχου αιθιδίου με την βοήθεια πιπέτας. Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο πως όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα με βρωμιούχο αιθίδιο είναι απαραίτητη η χρήση γαντιών και αποφυγή εισπνοής ατμών, καθώς πρόκειται για μία μέτριας τοξικότητας και ισχυρής μεταλλαξιογόνου ουσίας.

5. Αφού προστεθεί και αναμιχθεί το βρωμιούχο αιθίδιο στο διάλυμα πρέπει να έχει ήδη συναρμολογηθεί το καλούπι με το χτενάκι του, ώστε να προστεθεί άμεσα και προσεκτικά το διάλυμα αγαρόζης σε αυτό πριν προλάβει να πήξει και χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες.
6. Τέλος, τοποθετείται το διάλυμα στο ψυγείο με προσοχή σε ένα επίπεδο ράφι και αφήνεται να πήξει για περίπου 20 λεπτά.

Διαδικασία Ηλεκτροφόρησης:

1. Όταν η πηκτή αγαρόζης έχει πήξει αφαιρούνται τα δύο αποσπώμενα τοιχώματα του καλουπιού και το χτενάκι, χάρη στο οποίο σχηματίζονται τα πηγαδάκια, όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα DNA. Ο δίσκος είναι πλέον έτοιμος να τοποθετηθεί στην συσκευή ηλεκτροφόρηση.
2. Μετά την μεταφορά του gel στο σκεύος της ηλεκτροφόρησης προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή της πηκτής, δηλαδή Tris Acetate Acid, μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα.
3. Πριν ξεκινήσει η διαδικασία τοποθέτησης των δειγμάτων προστίθεται 1μL 10x Loading Buffer σε κάθε δείγμα και τότε τα δείγματα είναι έτοιμα για φόρτωση στην πηκτή. Προσθέτονται 14μL του κάθε δείγματος στις εγκοπές και 5μL του Ladder.
4. Κλείνοντας την συσκευή, συνδέοντας κατάλληλα τα καλώδια στους πόλους και επιλέγοντας την φορά του πεδίου, ώστε το DNA να μετακινείται προς τον θετικό πόλο, η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης είναι έτοιμη να τεθεί σε λειτουργία. Επιλέχθηκε να γίνει σε συνθήκες υπό σταθερή τάση στα 120V για 20min.
5. Με το πέρας των 20min κλείνεται το ρεύμα, αφαιρείται η πηκτή με την χρήση γαντιών και μεταφέρεται στην λάμπα UV για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων. Σημειώνονται τα αποτελέσματα και τραβάμε φωτογραφίες. Η λήξη των φωτογραφιών των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με ψηφιακή κάμερα, η οποία συνδέεται με υπολογιστεί δίνοντας την δυνατότητα επεξεργασίας τους με την βοήθεια ειδικού λογισμικού προγράμματος.



Εικόνα 4.14: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης



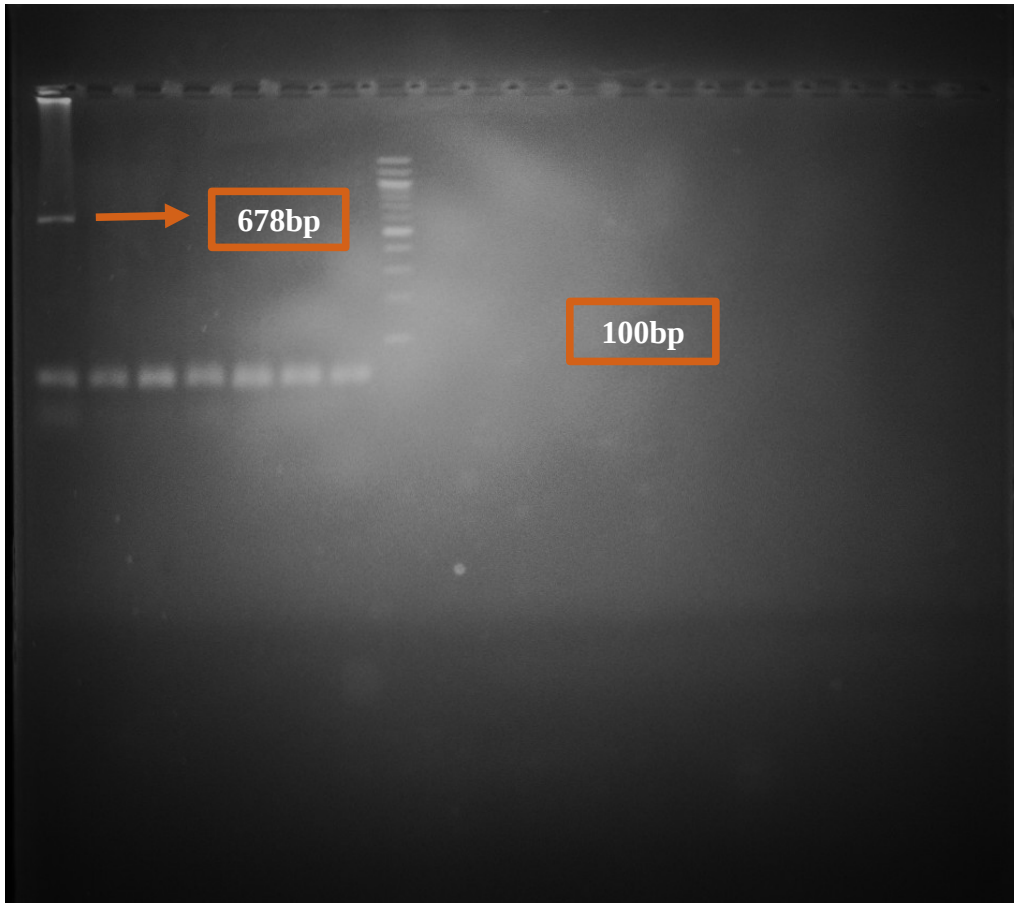
Εικόνα 4.15: 10x Loading Buffer



Εικόνα 4.16: Δείγματα DNA έπειτα από προσθήκη του 10x Loading Buffer

Αποτελέσματα

Κατά την εκτέλεση του πειράματος απομονώθηκε DNA από 18 οπωροκηπευτικά προϊόντα συσκευασμένα και μη, τα οποία ελέγχθηκαν για παρουσία *Salmonella spp.* και *Escherichia coli*. Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης του DNA τα δείγματα υποβλήθηκαν σε έλεγχο ως προς την συγκέντρωσή τους σε DNA και την καθαρότητά τους. Παρατηρήθηκε πως σε όλα τα δείγματα υπήρχαν μεγάλες συγκεντρώσεις DNA, με μέσο όρο περίπου 200ng/μL, και τις τιμές καθαρότητας να κυμαίνονται κοντά στο 2 καθιστώντας τα καθαρά και κατάλληλα για να προβούμε σε ανάλυση PCR. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αναλύσεις PCR μία για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου ανίχνευσης της *Salmonella spp.* και μία *Escherichia coli* και συγκεκριμένα για το γονίδιο *EcpA*, που υπάρχει σε όλα τα είδη *E.coli*. Αυτό συνέβη καθώς οι εκκινητές του κάθε γονιδίου απαιτούσαν διαφορετικές συνθήκες για τον υβριδισμό τους. Για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 2,0%. Αναλυτικότερα πέραν των προϊόντων της PCR προστέθηκε και ένας μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος του αγνώστου τμήματος. Ανάμεσα σε όλα τα δείγματα μόνο σε ένα παρατηρήθηκε παρουσία *Salmonella spp.* και έδωσε μπάντα στα 678bp. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για το δείγμα από σπανάκι σε φύλλα που ήταν συσκευασμένο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Άρα, η *Salmonello spp.* βρέθηκε σε ποσοστό 5,56% στα δείγματα οπωροκηπευτικών του εμπορίου που αναλύσαμε, ενώ η *Escherichia coli* δεν παρατηρήθηκε σε κανένα δείγμα. Παρακάτω παρατίθεται η φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης όπου εμφανίστηκε δείγμα θετικό σε *Salmonella spp.*



Εικόνα 5.1: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης για την ανίχνευση *Salmonella* spp. και παρατήρηση θετικού αποτελέσματος

Συζήτηση

Η *Salmonella spp.* και η *Escherichia coli* είναι δύο παθογόνα βακτήρια για τα οποία υγειονομικά ισχύει πως είναι “μηδενικής ανοχής”, δηλαδή ακόμα και ελάχιστη ποσότητα τους σε τρόφιμα μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα υγείας. Και για τα δύο μικρόβια ισχύουν τα εξής μέτρα πρόληψης:

- Επαρκή θερμική επεξεργασία
- Καλό πλύσιμο φρούτων και λαχανικών ακόμα και αν πρόκειται να υποβληθούν σε θερμική επεξεργασία
- Τήρηση των κανόνων υγιεινής

Για αυτό τον λόγο επιλέχθηκαν δείγματα οπωροκηπευτικών συσκευασμένων και μη καθώς πολλές φορές ο καταναλωτής δεν τηρεί όλα τα απαραίτητα μέτρα πρόληψης στα συγκεκριμένα τρόφιμα και κάνει ακόμα πιο σημαντική την απουσία αυτών των παθογόνων βακτηρίων. Ένα σύνηθες παράδειγμα είναι η περίπτωση των έτοιμων συσκευασμένων σαλατών, όπου ο καταναλωτής θεωρεί δεδομένο ότι έχουν προβεί σε εκτενές πλύσιμο ασχέτως αν αναγράφεται ή όχι στην συσκευασία κάποια σχετική πληροφορία. Επίσης συχνή είναι η περίπτωση κατά την οποία ο καταναλωτής δεν πλένει τα φρούτα και τα λαχανικά πριν την αποθήκευση τους προκαλώντας επιμολύνσεις και σε άλλα τρόφιμα. Γίνεται αντιληπτό λοιπόν το πόσο σημαντική είναι η απουσία της *Salmonella* και της *Escherichia coli* από τα φρούτα και τα λαχανικά.

Βάση των αποτελεσμάτων μας λοιπόν η *Salmonella spp.* βρέθηκε σε ποσοστό 5,56%, το οποίο είναι αρκετά υψηλό πόσο μάλλον αν αναλογιστούμε ότι πρόκειται για έναν μικροοργανισμό μηδενικής ανοχής στα τρόφιμα. Ωστόσο το ποσοστό αυτό αιτιολογεί και την αύξηση των κρουσμάτων από σαλμονέλλωση το 2021, καθώς πλέον υπάρχει επίσης αυξημένη προτίμηση των καταναλωτών σε λαχανικά και φρούτα, αφού αποτελούν βασικό πυλώνα του βιγκανισμού, ο οποίος επιλέγεται όλο και πιο συχνά σαν τρόπος διατροφής τα τελευταία χρόνια. Όσον αφορά την *Escherichia coli* δεν βρέθηκε σε κανένα δείγμα το οποίο είναι πολύ ικανοποιητικό αποτέλεσμα.

Συμπεράσματα

Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις από παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα είναι ένα σύνθετο πρόβλημα που επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες με σχεδόν αδύνατη την πλήρη εξάλειψή του και για αυτό είναι απαραίτητη η μεγαλύτερη κινητοποίηση και ευαισθητοποίηση πολλαπλών φορέων προς το θέμα αυτό. Κατ' επέκταση οι μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, δηλαδή η *Salmonella spp* και η *Escherichia coli*, θεωρούνται μηδενικής ανοχής υποδεικνύοντας την επικινδυνότητα και την σημαντικότητά τους.

Παρατηρώντας σε ένα χαμηλό ποσοστό την παρουσία *Salmonella spp.* και την απουσία της *Escherichia coli* δεν μπορεί να εξηγηθεί σε πιο σημείο της αλυσίδας παραγωγής έγινε επιμόλυνση. Ωστόσο, επειδή για τα συγκεκριμένα βακτήρια με βάση την νομοθεσία υποδηλώνεται μηδενική ανοχή, δηλαδή δεν πρέπει να ανιχνεύονται σε ένα τρόφιμο, όσον αφορά το βακτήριο *Escherichia coli* υπήρξε πλήρης απουσία γεγονός που επιβεβαιώνει την σωστή τήρηση των μέτρων πρόληψης επιμόλυνσης για το συγκεκριμένο βακτήριο. Στα νωπά φρούτα και λαχανικά πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή καθώς τις περισσότερες φορές καταναλώνονται νωπά και δεν υπόκεινται σε θέρμανση, ενώ ταυτόχρονα ειδικά σε συσκευασμένα προϊόντα δεν εφαρμόζεται σωστό πλύσιμο πριν την αποθήκευσή τους.

Ένα ακόμη συμπέρασμα, βάση των δεδομένων που συγκεντρώθηκαν μέσω του πειράματος και των στατιστικών αύξησης κρουσμάτων Σαλμονέλλωσης το 2021, που προκύπτει είναι η ανάγκη για ισχυροποίηση των μέτρων πρόληψης για την *Salmonella spp.* και συγκεκριμένα η εντατικοποίηση του ελέγχου παρουσίας *Salmonella spp.* σε όλες της φάσης της αλυσίδας παραγωγής και συσκευασίας των οπωροκηπευτικών προϊόντων με σκοπό την αποφυγή επιμολύνσεων. Για το βακτήριο αυτό ίσως δίνεται περισσότερη προσοχή στα ζωικά προϊόντα παραμελώντας έτσι την επικινδυνότητα ασθένειας από φρούτα και λαχανικά, τα οποία όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα του πειράματος είναι εξίσου σημαντική παράγοντες τροφιμογενών λοιμώξεων από *Salmonella spp.*.

Επιπλέον, επειδή η επιμόλυνση εμφανίστηκε σε τρόφιμο συσκευασμένο σε τροποποιημένη θα μπορούσε να προταθεί εκτενέστερη έρευνα σε αντίστοιχα προϊόντα. Κατ' επέκταση θα μπορούσαμε να συμπεράνουν πως τα στελέχη του βακτηρίου *Salmonella spp.* εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από ότι η

Escherichia coli και γι' αυτό παρατηρείται η πλήρης απουσία του *Escherichia coli*. Βέβαια, το ίδιο πρόβλημα θα μπορούσε να παρατηρηθεί μεταγενέστερα και με το *Escherichia coli* καθώς τα βακτήρια αυτά ανάμεσα στα κοινά τους χαρακτηριστικά έχουν και τις συνθήκες ανάπτυξης σχετικά με τον ατμοσφαιρικό αέρα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζουν συμφωνία με άλλες παρόμοιες έρευνες, όπου αναφέρονται σε πολλές περιπτώσεις υψηλότερα ποσοστά επιμολύνσεων. Βέβαια, η συγκεκριμένη έρευνα είναι καινοτόμος καθώς δεν έχει διεξαχθεί αντίστοιχη στον Ελλαδικό χώρο πάνω στα οπωροκηπευτικά προϊόντα και ειδικότερα στα συσκευασμένα, ενώ ακόμα και σε έρευνες του εξωτερικού εστίαζαν σε κάποιο συγκεκριμένο λαχανικό ή φρούτο.

Βιβλιογραφία

- Aaij, C. and Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 269, 192-200.
- Abdul-Raouf, U M, et al. “Survival and Growth of Escherichia Coli O157:H7 on Salad Vegetables.” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, no. 7, 1993, pp. 1999–2006. Accessed 11 Feb. 2020.
- Afonina, I., Zivarts, M., Kutyavin, I., Lukhtanov. E., Gamper, H., and Meyer, R.B. (1997). Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 25, 2657-2660.
- Awang Salleh, Noorzaleha, et al. “Incidence of Salmonella Spp. In Raw Vegetables in Selangor, Malaysia.” *Food Control*, vol. 14, no. 7, Oct. 2003, pp. 475–479. Accessed 27 Apr. 2021.
- Banwart, G.J. 1981. «Basic Food Microbiology», AVI Publishing Company, Inc. Westport, CT.
- Barlett J. Stirling D., PCR protocols, *Methods in molecular biology* 226, 1-6, 2003.
- Brown, T. A. Γονιδιώματα.Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣΕΠΕ, 2010
- Bustin S.A. (2010). *The PCR Revolution. Basic Technology and Applications*. Cambridge University Press, UK.
- Campbell, N. and Reece, J.(2010) ΒΙΟΛΟΓΙΑ (τόμος Ι). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης
- Carle, G.F., Frank, M. and Olson, M.V. (1986). Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science*, 232, 65-8.

- Cha, R.S., and Tilly, W.G. (1993). Specificity, efficiency and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl.* 3, 518-529.
- Corlett, Jr. D.A. 1989. Refrigerated foods and use of Hazard Analysis and Critical Control Point Principles. *Food Technology*, 43(2): 91-94.
- DELAQUIS, PASCAL, et al. “Behavior of Escherichia Coli O157:H7 in Leafy Vegetables.” *Journal of Food Protection*, vol. 70, no. 8, 1 Aug. 2007, pp. 1966–1974. Accessed 17 May 2020.
- Desk, News. “Recent Data Shows Salmonella and E. Coli Infections Rose in Europe in 2021.” *Food Safety News*, 4 Jan. 2023. Accessed 23 Aug. 2023.
- Doyle, M.P. and Beuchat, L.R. 2007. “Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers”, 3rd ed. ASM Press, Washington DC.
- Eisenstein BI (1990) “The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis,” *The New English Journal of medicine*, 323(16), pp. 1120–1123.
- Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. 1978. «Food Microbiology» 3rd ed. McGraw-Hill Book Company. New York.
- Forslund, Anita, et al. “Escherichia Coli Contamination and Health Aspects of Soil and Tomatoes (Solanum Lycopersicum L.) Subsurface Drip Irrigated with On-Site Treated Domestic Wastewater.” *Water Research*, vol. 46, no. 18, 15 Nov. 2012, pp. 5917–5934. Accessed 24 Apr. 2023.
- Giannakouris, N., Nikolioudakis, N., & Kokkorogiannis, T. (2015). *Οδηγός εργαστηριακών και φροντιστηριακών ασκήσεων βιολογίας* [Laboratory Guide].
- Golberg, Dana, et al. “Salmonella Typhimurium Internalization Is Variable in Leafy

Vegetables and Fresh Herbs.” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 145, no. 1, 31 Jan. 2011, pp. 250–257. Accessed 13 Mar. 2020.

GUO, XUAN, et al. “Survival of Salmonella on Tomatoes Stored at High Relative Humidity, in Soil, and on Tomatoes in Contact with Soil.” *Journal of Food Protection*, vol. 65, no. 2, 1 Feb. 2002, pp. 274–279. Accessed 13 June 2022.

Higushi, R. (1989). Simple and rapid preparation of samples for PCR, p. 31-38. In H.A. Erlich (ed.), *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. Stockton Press, New York.

Higushi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. Griffith, R., Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology (NY)* 10, 413- 417, 1992.

ICMSF. 1980. «Microbial Ecology of Foods: Factors Affecting Life and Death of Microorganisms» Vol. 1. International Commission on Microbiological Specifications for Foods, Academic Press, Inc., Orlando Fla.

Islam, Mahbub, et al. “Fate of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium on Carrots and Radishes Grown in Fields Treated with Contaminated Manure Composts or Irrigation Water.” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 4, Apr. 2004, pp. 2497–2502.

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.

Jay, J.M., Loessner, M.J. and D.A. Golden 2005. “Modern Food Microbiology”, 7th ed.. Springer, New York.

KNUDSEN, DAWN M., et al. “Survival of Salmonella Spp. And Escherichia Coli O157:H7 on Fresh and Frozen Strawberries.” *Journal of Food Protection*, vol. 64,

no. 10, 1 Oct. 2001, pp. 1483–1488. Accessed 30 June 2020.

Mafra, Isabel, et al. “Food Authentication by PCR-Based Methods.” *European Food Research and Technology*, vol. 227, no. 3, 30 Oct. 2007, pp. 649–665.

Maurer J. (2006). PCR Methods in Foods, Springer, USA.

McPherson M. & Moller S. (2006). PCR, Second Edition, Taylor and Francis.

Palumbo, S.A. 1986. Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? *Journal of Food Protection* 49:1003-1009

Papanikolaou, G., Palaiologou, D., Katsareli, E., Katsila, T., Tsarouha, H., Tzetis, M., Lilakos, K., & Doukissas, L. (2015). *Laboratory Exercises in Human Genetics* [Laboratory Guide].

Persing, D H. “Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches.” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 29, no. 7, July 1991, pp. 1281–1285. Accessed 21 Nov. 2021.

Phillips, C.A. 1996. Review: Modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology* 31: 463-479.

Rendon, M. A., et al. “Commensal and Pathogenic Escherichia Coli Use a Common Pilus Adherence Factor for Epithelial Cell Colonization.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 25, 11 June 2007, pp. 10637–10642. Accessed 11 June 2021.

Robinson, R.K. (Ed.). 1985. «Microbiology of Frozen Foods», Elsevier Applied Science Publishers, London.

Ruiz-Cruz, Saúl, et al. “Efficacy of Sanitizers in Reducing Escherichia Coli O157:H7,

Salmonella Spp. And Listeria Monocytogenes Populations on Fresh-Cut Carrots.”
Food Control, vol. 18, no. 11, Nov. 2007, pp. 1383–1390.

Santos RL, Tsolis RM, Adams LG, et al. «Pathogenesis of Salmonella-induced enteritis.»
Braz J Med Biol Res, 2003.

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.

Schochetman, G., C. Y. Ou, and W.K. Jones, (1988). Polymerase chain reaction. *Journal
Infection Diseases*, 158, 1154-57.

Su LH, Chiu CH. «Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature.» *Chang
Gung Medical Journal*, 2007.

Towson University & TIGR. (2012). Meischer’s Discovery, A DNA Extraction
Laboratory, Towson University.

Δ. Τυμπής, Ελ. Πετράκης, Σπ. Κοντελής. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ: Μεθοδολογία
και τεχνικές αναλύσεων. Δίσιγμα, 2016.

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

Κουτσουνμάνης, Κωνσταντίνος. *ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ,
ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ , ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ Συμπληρωματικές Σημειώσεις Γενικής Μικροβιολογίας.* 2011.

Μπατρίνου, Ανθιμία 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.

Χαρβάλου, Αικατερίνη και Δήμητρα Χούχουλα. *Εισαγωγή στις αρχές της μοριακής βιολογίας & διαγνωστική πρακτική*. Αθήνα: Εκδόσεις ΤΣΟΤΡΑΣ, 2020.

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