



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη Καινοτόμου Μεθοδολογίας Για Την Ανίχνευση Παθογόνων
Βακτηρίων Στα Τρόφιμα**

ΣΠΥΡΙΑΩΝ – ΑΝΔΡΕΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΠΑΘΕΟΔΩΡΟΥ

ΑΙΓΑΛΕΩ

2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY
PROGRAM OF DOCTORAL STUDIES

PhD THESIS

**Development of an Innovative Methodology for the Detection of Foodborne
Pathogens**

SPYRIDON – ANDREAS KONSTANTINOS PAPANTHEODOROU

ATHENS – EGALEO

2024

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη Καινοτόμου Μεθοδολογίας Για Την Ανίχνευση Ρυπαντών Τροφίμων

Παπαθεοδώρου Σπυρίδων - Ανδρέας

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δήμητρα Χούχουλα. Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Δήμητρα Χούχουλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ

Γιαννακούρου Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

Κωνσταντίνα Τζιά, Ομότιμη Καθηγήτρια, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δήμητρα Χούχουλα, Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ

Μαρία Γιαννακούρου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

Κωνσταντίνα Τζιά, Ομότιμη Καθηγήτρια, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

Ευσταθία Τσάκαλη, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ

Ανθμία Μπατρίνου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ

Σπυρίδων Παπαδάκης, Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ

Θεοφανία Τσιρώνη, Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής Του Ανθρώπου, ΓΠΑ

Ημερομηνία εξέτασης 13/6/2024

PhD THESIS

Development of an Innovative Methodology for the Detection of Food Contaminants

Papatheodorou Spyridon - Andreas

SUPERVISOR: Dimitra Houhoula, Professor, Dpt of Food Science & Technology, UNIWA

THREE-MEMBER ADVISORY COMMITTEE:

Dimitra Houhoula, Associate Professor, Dpt of Food science & Technolgt, UNIWA.

Giannakourou Maria, Associate Professor, School of Chemical Engineering, NTUA

Konstantina Tzia, Professor Emeritus School of Chemical Engineering, NTUA

ΕΠΙΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Dimitra Houhoula, Professor,
Dpt of Food science & Technology, UNIWA

Giannakourou Maria, Associate Professor,
School of Chemical Engineering, NTUA

Konstantina Tzia, Professor Emeritus
School of Chemical Engineering, NTUA

Efstathia Tsakali, Assistant professor,
Dpt of Food science & Technology, UNIWA



Anthimia Mpatrinou, Assistant professor,
Dpt of Food science & Technology, UNIWA

Spyridon Papadakis, Professor,
Dpt of Food science & Technology, UNIWA

Theofania Tsironi, Assistant Professor,
Dpt of Food Science & Human Nutrition

Date of deffence 13/6/2024

Copyright © Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ και Παπαθεοδώρου Σπυρίδων
Ανδρέας, Φεβρουάριος, 2024**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή καλύπτεται από τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons «Αναφορά Δημιουργού Μη Εμπορική Χρήση Όχι Παράγωγα Έργα 4.0 Διεθνές» (CC BY-NC-ND 4.0). Συνεπώς, το έργο είναι ελεύθερο για διανομή (αναπαραγωγή, διανομή και παρουσίαση του έργου στο κοινό), υπό τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

- α. Αναφορά δημιουργού: Ο χρήστης θα πρέπει να κάνει αναφορά στο έργο με τον τρόπο που έχει οριστεί από το δημιουργό ή τον χορηγούντα την άδεια.
- β. Μη εμπορική χρήση: Ο χρήστης δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει το έργο αυτό για εμπορικούς σκοπούς.
- γ. Όχι Παράγωγα Έργα: Ο Χρήστης δεν μπορεί να αλλοιώσει, να τροποποιήσει ή να δημιουργήσει υλικό που να αξιοποιεί το συγκεκριμένο έργο (πάνω από το έργο αυτό).

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τους συγγραφείς.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον/την συγγραφέα του και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις θέσεις του επιβλέποντος, της επιτροπής εξέτασης ή τις επίσημες θέσεις του Τμήματος και του Ιδρύματος.

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Παπαθεοδώρου Σπυρίδων Ανδρέας του Κωνσταντίνου, υποψήφιος διδάκτορας του Τμήματος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας και δικαιούχος των πνευματικών δικαιωμάτων επί της διατριβής και δεν προσβάλω τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων. Για τη συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής δεν χρησιμοποίησα ολόκληρο ή μέρος έργου άλλου δημιουργού ή τις ιδέες και αντιλήψεις άλλου δημιουργού χωρίς να γίνεται αναφορά στην πηγή προέλευσης (βιβλίο, άρθρο από εφημερίδα ή περιοδικό, ιστοσελίδα κ.λπ.). 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». Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της διατριβής μου μέχρι **13/6/2025** και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη.



Ο Δηλών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή στοχεύει στην αξιολόγηση και σύγκριση διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης για ή τρία κοινά τροφιμογενή παθογόνα, τη *Listeria monocytogenes*, την *Escherichia coli* και τη *Salmonella Typhimurium*, σε διάφορες μήτρες τροφίμων. Σκοπός αυτής της έρευνας είναι η ενίσχυση της ασφάλειας των τροφίμων με τη βελτίωση της ανίχνευσης και ταυτοποίησης αυτών των παθογόνων σε δείγματα τροφίμων μέσα από τη δημιουργία μίας microfluidic συσκευής που βασίζεται σε μοριακές τεχνικές (loop mediated isothermal amplification - LAMP) και με την οποία θα είναι δυνατό να πραγματοποιούνται μικροβιολογικές αναλύσεις σε δείγματα τροφίμων.

Η μεθοδολογία περιελάμβανε τη διεξαγωγή μίας περιεκτικής βιβλιογραφικής ανασκόπησης για την απόκτηση γνώσεων σχετικά με τις υπάρχουσες μεθόδους ανίχνευσης παθογόνων βακτηρίων και τους περιορισμούς τους. Με βάση την ανασκόπηση, επιλέχθηκαν οι εξής τέσσερις συγκεκριμένες μέθοδοι ανίχνευσης για αξιολόγηση: η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), οι ανοσοαναλύσεις, οι βιοαισθητήρες και η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS).

Στην παρούσα μελέτη δοκιμάστηκαν πρώτα 11 διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης DNA μικροοργανισμών και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν με τις μοριακές τεχνικές που αναφέρονται (PCR- LAMP).

Στη συνέχεια επιλέχθηκε ο συνδυασμός της in-house μεθόδου που αναφέρεται σε συνδυασμό με τη LAMP (όντας πιο ευαίσθητη και ταχεία μοριακή τεχνική από την PCR) ως βέλτιστη από πλευράς χρόνου-κόστους-ευαισθησίας, και τέλος συνδυάστηκε με μία 3D συσκευή microfluidic.

Για την αξιολόγηση της απόδοσης αυτών των μεθόδων, χρησιμοποιήθηκαν τεχνητά μολυσμένα δείγματα τροφίμων, όπως μαρούλι, γάλα και κοτόπουλο ως μήτρες δοκιμής. Κάθε μέθοδος αξιολογήθηκε με βάση την ευαισθησία, την εξειδίκευσή της, την απαίτηση χρόνου, το κόστος και την ευκολία χρήσης της. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η δυνατότητα αυτών των μεθόδων για τον εντοπισμό συγκεκριμένων παραγόντων λοιμογόνου δράσης και γονιδίων αντιμικροβιακής αντοχής που σχετίζονται με τα παθογόνα στόχους.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν διαφορετικές επιδόσεις μεταξύ των μεθόδων ανίχνευσης. Η PCR και η Next Generation Sequencing (NGS) παρουσίασαν υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση, επιτρέποντας την ακριβή ανίχνευση και ταυτοποίηση των παθογόνων στόχων. Οι

ανοσοδοκιμασίες έδειξαν καλή εξειδίκευση αλλά περιορισμένη ευαισθησία, ενώ οι βιοαισθητήρες προσέφεραν ταχεία ανίχνευση αλλά απαιτούσαν περαιτέρω βελτιστοποίηση για ενισχυμένη ευαισθησία.

Συζητήθηκε επίσης η εφαρμογή αυτών των μεθόδων ανίχνευσης σε αναλυτικά εργαστήρια τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των απαιτήσεων εξοπλισμού, της διαθεσιμότητας αντιδραστηρίων και της σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας. Επιπλέον, δόθηκαν κατευθύνσεις για μελλοντική έρευνα, δίνοντας έμφαση στην ανάγκη για εκτεταμένη ποικιλία στελεχών και δειγμάτων, ολοκληρωμένη επικύρωση έναντι μεθόδων αναφοράς και διερεύνηση αυτοματισμού και ανάλυσης υψηλής απόδοσης.

Η παρούσα συγκριτική μελέτη παρέχει πολύτιμες γνώσεις σχετικά με τις μεθόδους ανίχνευσης της *Salmonella Typhimurium*, της *Listeria monocytogenes* και της *Escherichia coli* σε δείγματα τροφίμων. Τα ευρήματα συμβάλλουν στην ανάπτυξη βελτιωμένων στρατηγικών για την έγκαιρη και ακριβή ανίχνευση των τροφιμογενών παθογόνων, συνεισφέροντας τελικά στην ασφάλεια των τροφίμων και τη δημόσια υγεία. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την αντιμετώπιση των περιορισμών που έχουν εντοπιστεί και για τη διερεύνηση νέων οδών για ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο σε διάφορα τρόφιμα.

Επιστημονική Περιοχή: Μοριακή μικροβιολογία Τροφίμων

Λέξεις-κλειδιά: Μέθοδοι ανίχνευσης, τροφιμογενή παθογόνα, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, PCR, loop mediated isothermal amplification – LAMP, ανοσοαναλύσεις, βιοαισθητήρες, αλληλούχιση επόμενης γενιάς, ασφάλεια τροφίμων.

ABSTRACT

The present PhD thesis aims to evaluate and compare different detection methods for two common foodborne pathogens, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli*, in various food matrices. The purpose of this research is to enhance food safety by improving the detection and identification of pathogens in food samples through the creation of a microfluidic device based on molecular techniques (loop mediated isothermal amplification - LAMP) which will be able to perform microbiological analyzes of food samples.

The methodology involved conducting a comprehensive literature review to gain insights into existing detection methods and their limitations. Based on the review, four specific detection methods were selected for evaluation: polymerase chain reaction (PCR), immunoassays, biosensors, and next-generation sequencing (NGS).

In the present study, 11 different microorganism DNA isolation methods were first tested and then identified by the molecular techniques mentioned (PCR-LAMP).

Then the combination of the in-house method we mention in combination with LAMP (being a more sensitive and rapid molecular technique than PCR) was chosen as optimal in terms of time-cost-sensitivity and finally combined with a 3D microfluidic device.

To evaluate the performance of these methods, artificially contaminated food samples such as lettuce, milk and chicken were used as test matrices. Each method was evaluated based on its sensitivity, specificity, time requirement, cost, and ease of use. Additionally, the potential of these methods to identify specific virulence factors and antimicrobial resistance genes associated with target pathogens was explored.

The results of the study showed different performances between the detection methods. PCR and NGS demonstrated high sensitivity and specificity, allowing accurate detection and identification of pathogenic targets. Immunoassays showed good specificity but limited sensitivity, while biosensors offered detection speed but required further optimization for enhanced sensitivity.

Practical considerations for implementing these detection methods in food testing

laboratories are also discussed, including equipment requirements, available reagents and cost-effectiveness. In addition, recommendations for future research were given, emphasizing the need for extensive variety of strains and samples, comprehensive validation against reference methods, and investigation of automation and high-throughput analysis.

This comparative study provides valuable insights into methods for the detection of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* in food samples. The findings contribute to the development of improved strategies for early and accurate detection of foodborne pathogens, ultimately enhancing food safety and public health. Further research is needed to address the limitations identified and to explore new avenues for real-time detection of various food labels.

Scientific Area: Food Molecular Microbiology

Keywords: detection methods, foodborne pathogens, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, PCR, loop mediated isothermal amplification – LAMP, immunoassays, biosensors, next generation sequencing, food safety.

Στη μνήμη του Χρήστου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτη από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Δρ. Δήμητρα Χούχουλα, καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας και Χημείας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ. Χωρίς αυτή, η υλοποίηση της παρούσας διατριβής δεν θα ήταν δυνατή. Όλα τα χρόνια που γνωριζόμαστε, με έχει βοηθήσει επανειλημμένα και ανιδιοτελώς, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, ανεξαρτήτως καταστάσεων και συγκυριών.

Εν συνεχεία, ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής της διδακτορικής διατριβής. Συγκεκριμένα τη Δρ. Μαρία Γιαννακούρου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ και Δρ. Κωνσταντίνα Τζιά, Ομότιμη Καθηγήτρια, Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ για τη συμβολή τους στην επίβλεψη της παρούσας μελέτης.

Επιπλέον, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, Δρ. Σπύρο Παπαδάκη, ομότιμο καθηγητή Τμήματος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ, Δρ. Ευσταθία Τσάκαλη, επίκουρο καθηγητή Τμήματος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ, Δρ. Ανθιμία Μπατρίνου, επίκουρη καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ και Δρ. Θεοφανία Τσιρώνη, Επίκουρη καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, ΓΠΑ, για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη διεκπεραίωση της διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου Αλίκη Τσάκη και Διονύση Αντωνόπουλο, για την εξαιρετική και παραγωγική συνεργασία μας τα τελευταία χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
ABSTRACT	14
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	Error! Bookmark not defined.
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	21
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	25
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	33
Κεφάλαιο 1ο: Παθογόνα βακτήρια και η σημασία τους στην υγεία και την οικονομία στην Ευρώπη	39
1.1. Παθογόνα βακτήρια.....	39
1.2. Κατάταξη των επικίνδυνων κατηγοριών βακτηρίων	42
1.3. Τροφιμογενή βακτήρια και ασθένειες.....	44
1.3.1. Salmonella Typhimurium.....	44
1.3.2. Listeria monocytogenes.....	49
1.3.3. Escherichia coli	53
1.4. Επιβάρυνση στην ποιότητα ζωής	55
1.5. Επιδημιολογία και οικονομική επιβάρυνση.....	58
1.6. Ασφάλεια τροφίμων.....	59

Κεφάλαιο 2ο: Μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων	61
2.1. Μέθοδοι βασισμένες στην καλλιέργεια	62
2.2. Μέθοδοι με βάση τα νουκλεϊκά οξέα.....	64
2.2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	64
2.2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πολλαπλών εκκινήτων (mPCR)	66
2.2.3. PCR πραγματικού χρόνου ή ποσοτική PCR (qPCR)	68
2.2.4. Ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων (NASBA).....	72
2.2.5. Ισόθερμη ενίσχυση μέσω βρόχου (LAMP).....	74
2.2.6. Colorimetric LAMP	84
2.2.7. Μικροσυτοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων DNA	85
2.3. Μέθοδοι βιοαισθητήρων	87
2.3.1. Οπτικοί βιοαισθητήρες	88
2.3.2. Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες.....	89
2.3.3. Βιοαισθητήρες με βάση τη μάζα	89
2.4. Μέθοδοι που βασίζονται στην ανοσολογία	90
2.5. Μέθοδοι με βάση τις συσκευές μικρορευστομηχανικής (microfluidic chips).....	92
2.5.1. Microfluidic chips.....	94

2.5.2. Η χρήση των microfluidic chips στην ανάλυση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα.....	97
2.5.3. Συνδυασμός μικρορευστομηχανικής με άλλες τεχνολογίες	101
2.5.4. Μελλοντικές προοπτικές και χρήσεις	105
Κεφάλαιο 3ο: Μέθοδοι & Υλικά.....	109
3.1. Σχεδιασμός	109
3.2. Εξοπλισμός και υλικά	109
3.3. Επιμόλυνση δειγμάτων τροφίμων	113
3.4. Μέθοδοι εκχύλισης DNA.....	114
3.5. Ταυτοποίηση με μοριακές τεχνικές	120
3.5.1. PCR – Ηλεκτροφόρηση	121
3.5.2. Colorimetric LAMP	123
3.6. Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	124
3.7. Σχεδιασμός της συσκευής	125
3.8. Εκχύλιση DNA στα δείγματα τροφίμων	131
Κεφάλαιο 4ο: Αποτελέσματα.....	132
4.1. Ηλεκτροφόρηση	132
4.2. Colorimetric LAMP.....	142

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : Συμπεράσματα.....	187
5.1. Γενικά	187
5.2. Ανίχνευση και Απομόνωση <i>Listeria monocytogenes</i>	188
5.2.1. Μέθοδος NucleoSpin® Food.....	188
5.2.2. Αποτελέσματα Μέθόδου NucleoSpin® Food.....	190
5.2.3. Συμπεράσματα της μέθόδου NucleoSpin® Food - Υψηλή ευαισθησία και αξιοπιστία στην ανίχνευση του <i>L. monocytogenes</i> σε δείγματα τροφίμων.....	191
5.3. Ανίχνευση και απομόνωση <i>Escherichia coli</i>	192
5.3.1. Μέθοδος - LAMP	192
5.3.2. Αποτελέσματα - Θετική ανίχνευση <i>E. coli</i> σε δείγματα τροφίμων	193
5.3.3. Συμπεράσματα - Υψηλή ευαισθησία και αξιοπιστία στην ανίχνευση των παθογόνων σε δείγματα τροφίμων.	194
Κεφάλαιο 6^ο : Συζήτηση και Περιορισμοί.....	195
6.1. Συζήτηση	195
6.2. Περιορισμοί της παρούσας έρευνας και ο αντίκτυπός τους για τη Μελλοντική Έρευνα	197
Κεφάλαιο 7^ο : Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα.....	201
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	203

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Ανίχνευση τεσσάρων τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών με βάση πολλαπλή PCR μαγνητικού διαχωρισμού και τριχοειδή ηλεκτροφόρηση https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biot.202100335	67
Εικόνα 2 Σχηματική αναπαράσταση της ενίσχυσης με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων (NASBA) https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-nucleic-acid-sequence-based-amplification-NASBA_fig4_236316412	73
Εικόνα 3 Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση LAMP.....	75
Εικόνα 4 Ισοθερμική ενίσχυση με τη βοήθεια βρόχου (LAMP) https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666517422000177	76
Εικόνα 5 Διαγραμματική αναπαράσταση του μικρορευστικού chip https://www.researchgate.net/figure/A-Diagrammatic-representation-of-the-microfluidic-chip-B-type-of-microfluidic-chips-and_fig1_355657151	93
Εικόνα 6 Διαδικασία παρασκευής μικρορευστομηχανών από πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο https://www.researchgate.net/figure/Illustration-of-the-step-by-step-fabrication-process-of-a-PDMS-chip-by-replica-moulding_fig1_346217022	96
Εικόνα 7 Σχηματική αναπαράσταση της φυγοκεντρικής μικροσυσκευής LAMP https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7564122/	108
Εικόνα 8 Θερμοκυκλοποιητής - Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems)	110
Εικόνα 9 Λουτρό υπερήχων (ELMASONIC S10 - Ultrasonic Cleaning Device 800ml 37 kHz 30 W, Elma Ultrasonic Technology).....	110
Εικόνα 10 Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini Single Cell Electrophoresis Chamber .	111
Εικόνα 11 Συσκευή ανάγνωσης - ανάλυσης με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας UV – DNR Mini BISPRo	112
Εικόνα 12 Επιμόλυνση δειγμάτων γάλακτος.....	114
Εικόνα 13 Διαδικασία επιμόλυνσης στερεών τροφίμων.....	114
Εικόνα 14 Εκχύλιση DNA με την χρήση DNeasy Blood & Tissue Kit	117
Εικόνα 15 Γραφική απεικόνιση της μεθοδολογίας 11	118
Εικόνα 16 Απεικόνιση μεθόδου εκχύλισης βακτηριακού DNA σε δείγματα τροφίμων με τη χρήση εμπορικού kit MN NucleoSpin® Food.	120
Εικόνα 17 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	122

Εικόνα 18 Ηλεκτροφόρηση.....	123
Εικόνα 19 Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου (LAMP). BSt Πολυμεράση, 4-6 εκκινητές. Ελεύθερα ολιγονουκλεοτίδια (dNTPs), Χρωστικές - δείκτες pH ...	124
Εικόνα 20 Μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων τροφίμων σε εκλεκτικά μέσα.	125
Εικόνα 21 Σχεδιασμός συσκευών microfluidics: Εισαγωγή δείγματος.....	126
Εικόνα 22 Σχεδιασμός συσκευών microfluidics.....	126
Εικόνα 23 Σχεδιασμός συσκευών microfluidics.....	127
Εικόνα 24 Συσκευές που σχεδιάστηκαν.....	127
Εικόνα 25 Εισαγωγή δείγματος	128
Εικόνα 26 Απεικόνιση συσκευής microfluidic.....	128
Εικόνα 27 Προεπεξεργασία της τρισδιάστατης εκτύπωσης: Λογισμικό CHITUBOX	129
Εικόνα 28: 3D PRINTER: Phrozen Sonic Mini 4K.....	130
Εικόνα 29 Αρχή λειτουργίας του τρισδιάστατου εκτυπωτή	131
Εικόνα 30 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με <i>L. monocytogenes</i> που απομονώθηκαν με τη βοήθεια του kit απομόνωσης MN NucleoSpin® Food.....	132
Εικόνα 31 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με <i>L. monocytogenes</i> που απομονώθηκαν με την in-house μέθοδο 11.	133
Εικόνα 32 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με <i>E. coli</i> . Απομόνωση με NucleoSpin® Food.	134
Εικόνα 33 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με <i>E. coli</i> . Απομόνωση με την in-house τεχνική.....	135
Εικόνα 34 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με <i>S. Typhimurium</i> . Απομόνωση με NucleoSpin® Food.	136
Εικόνα 35 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με <i>S. Typhimurium</i> . και ύστερα απομονώθηκαν με τη μέθοδο 11.	137
Εικόνα 36 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων νερού που επιμολύνθηκαν με <i>L. monocytogenes</i> (*1.5 cfu/mL) και ύστερα απομονώθηκαν με τη μέθοδο 11.....	138
Εικόνα 37 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων νερού που επιμολύνθηκαν με <i>S. enterica serovar Typhimurium</i> (*1.5 cfu/mL) και ύστερα απομονώθηκαν με τη μέθοδο 11.	139
Εικόνα 38 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων τροφίμων που επιμολύνθηκαν με <i>L. monocytogenes</i> (*1.5 cfu/mL) και ύστερα απομονώθηκαν με τη μέθοδο 11. ..	140

Εικόνα 39 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων τροφίμων που επιμολύνθηκαν με <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium (*1.5 cfu/mL) και ύστερα απομονώθηκαν με τη μέθοδο 11.	141
Εικόνα 40 LAMP σε δείγματα μαρουλιού επιμολυσμένα με <i>S. Typhimurium</i> σε δυάδες. Τελευταίο σωληνάκι κοντρόλ.	142
Εικόνα 41 LAMP σε δείγματα μαρουλιού επιμολυσμένα με <i>L. monocytogenes</i> σε δυάδες. Τελευταίο σωληνάκι κοντρόλ.	143
Εικόνα 42 LAMP σε δείγματα μαρουλιού επιμολυσμένα με <i>E. Coli</i> σε δυάδες. Τελευταίο σωληνάκι κοντρόλ.	144
Εικόνα 43 LAMP σε δείγματα τροφίμων επιμολυσμένα με <i>S. Typhimurium</i> και <i>L. monocytogenes</i> (*1,5 cfu/mL) μετά από εκχύλιση βακτηριακού DNA με τη μέθοδο 4	145
Εικόνα 44 LAMP σε δείγματα τροφίμων επιμολυσμένα με <i>S. Typhimurium</i> και <i>L. monocytogenes</i> (*1,5 cfu/mL) μετά από εκχύλιση βακτηριακού DNA με τη μέθοδο 4	146
Εικόνα 45 Ανίχνευση της <i>E. coli</i> σε εμπλουτισμένα δείγματα τροφίμων με colorimetric LAMP.....	146
Εικόνα 46 Ανίχνευση της <i>L. monocytogenes</i> σε δείγματα γάλακτος και κοτόπουλου του εμπορίου.	147
Εικόνα 47 Αποτελέσματα της ανάλυσης των εμπορικών δειγμάτων διατροφής με τη χρήση της LAMP σε 3D συσκευή μικρορευστομηχανικής.	148

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

HCl	Hydrogen chloride
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Bcc	Burkholderia cepacia
AMR	Antimicrobial resistance
MDR	Multi-drug-resistant
POC	Point-of-care
HAI	Healthcare-Associated Infections
WHO	World Health Organization
HIV	Human Immunodeficiency Virus
LPS	Lipopolysaccharides
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate
HE	Hektoen enteric
KIA	Kligler's iron agar
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
NTS	Nontyphoidal <i>Salmonella</i>
PPs	Peyer's patches
SCVs	<i>Salmonella</i> -containing vacuoles
ATR	Acid tolerance response
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
HGF	Hepatocyte growth factor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
LLO	Listeriolysin O
DEC	Diarrheagenic <i>E. coli</i>
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamases
DALY	Disability-adjusted life year

YLD	Years of healthy life lost due to disability
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
EAAT	Εθνική Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Points
ΕΣΑΤ	Εθνικά Συστήματα Ασφάλειας Τροφίμων
VBNC	Viable but non-culturable
SMAC	Sorbitol MacConkey agar
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
CC	Conventional culture
CBDs	Cell wall binding domains
PCR	Polymerase chain reaction
mPCR	Multiplex polymerase chain reaction
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
CFU	Colony forming unit
AMV	Avian myeloblastosis virus
CMOS	Complementary-metal oxide-semiconductor
HNB	Hydroxynaphthol blue,
PMA	Propidium monoazide
CR	Cresol red
HNB	Hydroxynaphthol blue
SPR	Surface plasmon resonance
QCM	Quartz crystal microbalance
BAW	Bulk acoustic wave
SAW	Surface acoustic wave
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

TRH	TDH-related hemolysin
VIDAS	VITEK immunodiagnostic assay system
SPR	Solid phase receptacle
SERS	Surfaced-enhanced Raman scattering
LOC	Lab-on-a-chip
μPad	MicroPad

Κεφάλαιο 1ο: Παθογόνα βακτήρια και η σημασία τους στην υγεία και την οικονομία στην Ευρώπη

1.1. Παθογόνα βακτήρια

Παρόλο που η «παθογένεια» μπορεί να οριστεί από την πλευρά των ιδιοτήτων ενός μικροοργανισμού, είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι η έννοια της παθογένειας είναι σε μεγάλο βαθμό ανθρωπομορφική, καθώς υπονοεί ότι ένας μικροοργανισμός θα προκαλούσε ασθένεια «σκόπιμα». Μία πιο ρεαλιστική άποψη είναι ότι το ανθρώπινο σώμα είναι ένας βιότοπος για τους μικροοργανισμούς, στον οποίο προσαρμόζονται και τον χρησιμοποιούν ως ευνοϊκό περιβάλλον για την επιβίωση και την ανάπτυξή τους. Ορισμένα βακτήρια έχουν αναπτύξει έναν «τρόπο ζωής» που τους επιτρέπει να αποικίζουν αυτή τη θέση τόσο με συμβιωτικούς όσο και με παθογόνους τρόπους [1]. Κάθε επιφάνεια του σώματος - το δέρμα, ο επιπεφυκότας, οι βλεννογόνοι της ανώτερης και κατώτερης αναπνευστικής οδού, η εντερική οδός, η γεννητική οδός κ.ο.κ. - φιλοξενεί έναν χαρακτηριστικό κοινόβιο βακτηριακό πληθυσμό που διαφέρει ποιοτικά από τον πληθυσμό άλλων περιοχών του σώματος. Βακτήρια με παθογόνο συμπεριφορά μπορούν να εδραιωθούν σε αυτό το μικροβιακό οικοσύστημα. Μόλις εγκατασταθούν, άλλες παθογόνες ιδιότητες επιτρέπουν στο παθογόνο να διεισδύσει σε βαθύτερους ιστούς, να αποφύγει ή να εξουδετερώσει τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή και να πολλαπλασιαστεί. Καθώς ακολουθούν αυτή τη στρατηγική, τα παθογόνα βακτήρια προκαλούν βλάβες στον ξενιστή. Ως παράγοντες που σχετίζονται με την παθογένεια μπορούν να οριστούν όλοι οι παράγοντες που είναι απαραίτητοι για την έκφραση της παθογένειας.

Ωστόσο, το αν ένας ξενιστής θα αναπτύξει ασθένεια δεν καθορίζεται μόνο από το παθογόνο δυναμικό του βακτηρίου, αλλά και από παράγοντες του ξενιστή. Υπάρχει ένα τεράστιο φάσμα ειδικών και μη ειδικών παραγόντων του ξενιστή που επηρεάζουν την έκβαση μιας αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός ξενιστή και ενός παθογόνου βακτηρίου. Για παράδειγμα, ο φυσιολογικός συμβιωτικός πληθυσμός παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του ξενιστή από την εισβολή παθογόνων οργανισμών. Αυτό το επιτυγχάνουν με μηχανισμούς όπως: 1) ανταγωνισμός για τα ίδια θρεπτικά συστατικά- 2) ανταγωνισμός για τους ίδιους υποδοχείς στα κύτταρα του ξενιστή- 3) παραγωγή βακτηριοσινών ή άλλων αντιμικροβιακών παραγόντων (παρεμβολή)- και 4) διέγερση διασταυρούμενων προστατευτικών ανοσολογικών παραγόντων. Ο κοινός πληθυσμός του ξενιστή μπορεί να επηρεαστεί από διάφορες δραστηριότητες (π.χ. χρήση αντιβιοτικών). Πρόσθετοι

παράγοντες του ξενιστή που μπορούν να επηρεάσουν την παθογένεια περιλαμβάνουν την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (π.χ. λυσοζύμη στις βρογχικές εκκρίσεις- ή τα παγκρεατικά ένζυμα, τη χολή ή τις εντερικές εκκρίσεις- ή την έκκριση οξέος [HCl] για το χαμηλό pH του στομάχου). Επίσης, ο άνθρωπος διαθέτει ένα έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα που τον προστατεύει από την εισβολή. Όταν το σύστημα αυτό καταρρέει, π.χ. σε προχωρημένα στάδια του συνδρόμου επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS) [2], βακτήρια που κανονικά δεν είναι σε θέση να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο μπορεί να γίνουν ευκαιριακά παθογόνα τα οποία προκαλούν καταστάσεις που κλινικά μιμούνται τα πιο συχνά απαντώμενα «γνήσια» παθογόνα. Η δυνατότητα βακτηρίων που φυσιολογικά απαντούν στο περιβάλλον να προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις σε ξενιστές με εξασθενημένα αμυντικά συστήματα αναγνωρίζεται ως σημαντικός κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία. Η περίπτωση του συμπλέγματος *Burkholderia cepacia* (Bcc) αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα [3]. Τα βακτήρια του Bcc βρίσκονται σε όλο το περιβάλλον, ορισμένα από αυτά ως παθογόνα των φυτών.

Αν και φυσικό φαινόμενο, η μικροβιακή αντοχή (AMR) έχει επιταχυνθεί από την αλόγιστη χρήση αντιβακτηριακών παραγόντων. Καθώς ο αγωγός για νέους παράγοντες στερεύει (μόνο 2 αντιβακτηριακά με νέους στόχους, η δαπτομυκίνη και η λινεζολίδη, έχουν εισαχθεί στην πράξη αυτόν τον αιώνα) λόγω μειωμένων οικονομικών κινήτρων και αυξημένων ρυθμιστικών φραγμών [4], τα παγκόσμια συστήματα υγειονομικής περίθαλψης χρειάζονται μεθόδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο προγραμμάτων αντιβακτηριακής διαχείρισης για να βοηθήσουν στη διατήρηση της αποτελεσματικότητας των σημερινών αντιβακτηριακών. Σε νοσοκομειακό περιβάλλον, απαιτούνται μέθοδοι για την ανίχνευση πολυανθεκτικών οργανισμών (MDR) στο πλαίσιο μίας προσέγγισης για την πρόληψη και τον έλεγχο των λοιμώξεων. Μία αποτελεσματική στρατηγική διαχείρισης κινδύνου για την πρόληψη της διασταυρούμενης λοίμωξης μεταξύ ασθενών βασίζεται στην ταχεία και αξιόπιστη ανάλυση των δειγμάτων και την επακόλουθη εισαγωγή προφυλάξεων επαφής (π.χ. απομόνωση ασθενών) [5]. Στις ανεπτυγμένες χώρες, η συνταγογράφηση σε γενικό ιατρείο αντιπροσωπεύει περίπου το 90% του συνόλου της χρήσης αντιβιοτικών στον άνθρωπο [6], ενώ μία εξέταση point-of-care (POC) θα επέτρεπε τη βέλτιστη έκβαση της θεραπείας των ασθενών και θα μείωνε επίσης την πιθανότητα ανάπτυξης περαιτέρω αντοχής, ενημερώνοντας για την επιλογή του κατάλληλου αντιβακτηριακού παράγοντα για τον κατά περίπτωση ασθενή, χρησιμοποιώντας θεραπεία με κατεύθυνση το παθογόνο.

Είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η επίδραση που έχει η μικροβιακή αντοχή στην επιβάρυνση της νόσου λόγω των λοιμώξεων που αποκτώνται στην κοινότητα, αλλά τα δεδομένα για τις νοσοκομειακές λοιμώξεις (νοσοκομειακές λοιμώξεις) είναι ανησυχητικά και ενδεικτικά του μεγέθους του προβλήματος που αντιμετωπίζουν τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης. Στις ΗΠΑ, οι λοιμώξεις που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη (HAI) εκτιμάται ότι ευθύνονται για 99.000 θανάτους ετησίως- στην Ευρώπη ο μέσος επιπολασμός των HAI είναι 7,1 ανά 100 ασθενείς, ενώ σε χώρες με χαμηλό εισόδημα η επιβάρυνση αυτή έχει εκτιμηθεί ότι φτάνει το 15,5 ανά 100 ασθενείς [6]. Οι λοιμώξεις αυτές ευθύνονται για παρατεταμένη παραμονή στο νοσοκομείο, αυξανόμενα ποσοστά μικροβιακής αντοχής, τεράστια οικονομική επιβάρυνση των συστημάτων υγειονομικής περίθαλψης και της κοινωνίας, καθώς και νοσηρότητα και θνησιμότητα των ασθενών που μπορούν να αποφευχθούν. Για παράδειγμα, στην Ευρώπη εκτιμάται ότι οι λοιμώξεις που οφείλονται σε ανθεκτικούς οργανισμούς οδηγούν σε 25.000 θανάτους ετησίως, ενώ οι σχετικές δαπάνες υγειονομικής περίθαλψης και οι απώλειες παραγωγικότητας ανέρχονται σε 1,5 δισ. ευρώ. Στις ΗΠΑ, έχει υπολογιστεί ότι υπάρχουν τουλάχιστον 2 εκατομμύρια ασθένειες και 23.000 θάνατοι που σχετίζονται με την αντοχή στα αντιβιοτικά [5], και το συνδυασμένο κόστος των ιατρικών λογαριασμών και της παρατεταμένης νοσοκομειακής περίθαλψης έχει εκτιμηθεί σε 30 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως [6].

1.2. Κατάταξη των επικίνδυνων κατηγοριών βακτηρίων

Τα παθογόνα βακτήρια ταξινομούνται συνήθως σε ομάδες κινδύνου, ανάλογα με το βαθμό παθογένειάς τους. Η ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO), όπως περιέχεται στο Εγχειρίδιο Βιοασφάλειας Εργαστηρίων [7], είναι γενικά αποδεκτή. Πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι αυτές οι ομάδες κινδύνου αφορούν κυρίως εργαστηριακές εφαρμογές, όπου η έκθεση μπορεί να είναι υψηλή. Ισχύουν για άτομα που δεν είναι ανοσοκατασταλμένα. Σύμφωνα με την ταξινόμηση αυτή, η ομάδα κινδύνου 1 («κανένας ή χαμηλός ατομικός ή κίνδυνος για την κοινότητα») περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που είναι απίθανο να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο ή στα ζώα. Η ομάδα κινδύνου 2 («μέτριος ατομικός κίνδυνος, χαμηλός κοινοτικός κίνδυνος») περιλαμβάνει παθογόνους μικροοργανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο ή στα ζώα, αλλά είναι απίθανο να αποτελέσουν σοβαρό κίνδυνο για τους εργαζόμενους στο εργαστήριο, την κοινότητα, τα ζώα ή το περιβάλλον- η έκθεση στο εργαστήριο μπορεί να προκαλέσει σοβαρή λοίμωξη, αλλά υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία και προληπτικά μέτρα και ο κίνδυνος εξάπλωσης της λοίμωξης είναι περιορισμένος. Η ομάδα κινδύνου 3 («υψηλός ατομικός κίνδυνος, χαμηλός κίνδυνος για την κοινότητα») περιλαμβάνει παθογόνους παράγοντες που συνήθως προκαλούν σοβαρή ασθένεια στον άνθρωπο ή στα ζώα, αλλά συνήθως δεν μεταδίδονται από ένα μολυσμένο άτομο σε άλλο- υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία και προληπτικά μέτρα. Η ομάδα κινδύνου 4 («υψηλός ατομικός και κοινοτικός κίνδυνος») περιλαμβάνει παθογόνους μικροοργανισμούς που συνήθως προκαλούν σοβαρή ασθένεια στον άνθρωπο ή στα ζώα και μπορούν εύκολα να μεταδοθούν από το ένα άτομο στο άλλο, άμεσα ή έμμεσα.

Για πρακτικούς λόγους, και στην κανονιστική πρακτική, γίνεται διάκριση μεταξύ βακτηρίων που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και βακτηρίων που είναι παθογόνα για άλλα ζώα. Η προσαρμοστικότητα των βακτηρίων σε ξενιστές είναι αποτέλεσμα των διαφορών μεταξύ του περιβάλλοντος που συναντούν τα βακτήρια σε διαφορετικούς ξενιστές, δηλαδή στο ανθρώπινο σώμα και στα σώματα άλλων ζώων. Εάν υπάρχουν ομοιότητες στο περιβάλλον τους, ότι οι παθογόνοι οργανισμοί συχνά ξεπερνούν το φράγμα των ειδών. Πράγματι, υπάρχει ένας αριθμός βακτηρίων που είναι πρωτίστως παθογόνα για άλλα σπονδυλωτά και τα οποία είναι επίσης παθογόνα για τον άνθρωπο, π.χ. *Bacillus anthracis*, *Brucella abortus*, *Yersinia pestis*, *Leptospira* spp. και ορισμένα είδη *Salmonella*.

Οι ανθρώπινες ασθένειες που προκαλούνται από αυτά τα βακτήρια ονομάζονται ζωνοόσοι [8]. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι εντομομεταφορείς παίζουν συγκεκριμένο ρόλο στη μετάδοση των παθογόνων βακτηρίων από το ζώο στον ανθρώπινο ξενιστή. Οι ζωνοόσοι είναι «ζωογενείς»: τα ζώα ή τα ζωικά προϊόντα λειτουργούν ως πηγή της νόσου. Κατά συνέπεια, η έκθεση στην ασθένεια μπορεί να αλλάξει με την αλλαγή των κοινωνικών, συμπεριφορικών και καταναλωτικών πρακτικών. Η κατηγορία κινδύνου ενός ζωνοσογόνου βακτηριακού είδους μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον ξενιστή. Για τις αξιολογήσεις περιβαλλοντικού κινδύνου/ασφάλειας των δραστηριοτήτων με αυτά τα βακτηριακά είδη, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η υψηλότερη κατηγορία κινδύνου.

Όπως επισημάνθηκε προηγουμένως, είναι δύσκολο να δηλωθεί οριστικά ότι ένα βακτηριακό στέλεχος είναι μη παθογόνο. Τα στοιχεία που δίνονται για τη μη παθογένεια μπορούν να είναι μόνο προσωρινά. Ο προσδιορισμός του κατά πόσον ένα βακτηριακό στέλεχος μπορεί να θεωρηθεί μη παθογόνο γίνεται συνήθως με σταδιακό τρόπο. Το στέλεχος μπορεί να θεωρηθεί μη παθογόνο, εάν ανήκει σε είδος ή ταξινομική ομάδα για την οποία δεν είναι γνωστά παθογόνα στελέχη. Εάν έχει άμεσες συγγενικές σχέσεις με παθογόνους οργανισμούς ή εάν προέρχεται ως εξασθενημένο παθογόνο στέλεχος, θα πρέπει να αποδειχθεί ότι το στέλεχος στερείται ουσιαστικά των καθοριστικών παραγόντων ιογένεσης των παθογόνων συγγενών του. Εάν αυτό αποτύχει, η μη παθογένεια μπορεί να αποδειχθεί με κατάλληλες δοκιμές σε ζώα. Αυτό απαιτεί, ωστόσο, ένα επικυρωμένο ζωικό μοντέλο. Εάν κανένα από αυτά τα αποδεικτικά στοιχεία δεν είναι διαθέσιμο ή δεν μπορεί να αποκτηθεί, το στέλεχος μπορεί να θεωρηθεί μη παθογόνο επειδή έχει μακρά ιστορία ασφαλούς χρήσης υπό συνθήκες όπου δεν έχει εφαρμοστεί ειδικός φυσικός περιορισμός.

Ορισμένα βακτήρια ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους ανεξάρτητα από έναν ανθρώπινο ή ζωικό ξενιστή. Άλλα που δεν έχουν την ικανότητα να προκαλούν ασθένειες, μπορούν να αναγνωριστούν, να προσκολληθούν και να πολλαπλασιαστούν στον ξενιστή ή πάνω σε αυτόν, ως κοινότοποι. Τα ευκαιριακά παθογόνα έχουν κάποια περιορισμένη ικανότητα να προκαλούν ασθένεια, αλλά συνήθως διατηρούνται υπό έλεγχο από την ανοσολογική απόκριση και τα αμυντικά συστήματα του ξενιστή και τους ανταγωνιστικούς, αβλαβείς μικροοργανισμούς με τους οποίους ανταγωνίζονται στο περιβάλλον του ξενιστή. Ωστόσο, μπορεί να εδραιωθούν, με δυσμενείς συνέπειες για τον ξενιστή, γενικά υπό συνθήκες όπου οι αμυντικοί μηχανισμοί του ξενιστή είναι εξασθενημένοι (π.χ. αποδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος λόγω ηλικίας ή μόλυνσης από τον ιό HIV) ή έχουν καταστραφεί (π.χ. λόγω δερματικών βλαβών ή εγκαυμάτων). Ορισμένα ευκαιριακά

παθογόνα αποκτώνται από το περιβάλλον, ενώ άλλα μπορεί να αποτελούν μέρος του φυσιολογικού βακτηριακού πληθυσμού του ξενιστή. Ορισμένα είδη βακτηρίων που προκαλούν λοιμώξεις στα νοσοκομεία χρησιμοποιούνται σε διαδικασίες βιοεξυγίανσης ή/και βιοενίσχυσης που μπορεί να περιλαμβάνουν εμβολιασμό του εδάφους με μεγάλες ποσότητες βακτηρίων. Για παράδειγμα, η *Pseudomonas aeruginosa* και η *Stenotrophomonas maltophilia* είναι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται βιομηχανικά και προκαλούν νοσοκομειακές λοιμώξεις σε ασθενείς με κυστική ίνωση και εγκαύματα. Η *Serratia marcescens*, ένα κοινό βακτήριο του εδάφους, που προκαλεί πνευμονία, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και βακτηριαιμία σε εκτεθειμένους ανθρώπινους ξενιστές, και είναι θανατηφόρα για ορισμένα είδη εντόμων με εμπορική χρήση ως βιοπεζίτης, ενώ είναι κοινόβια στο ριζόστρωμα πολλών φυτικών ειδών. Άλλα βακτήρια, όπως ο *Lactobacillus acidophilus*, μπορούν να θεωρηθούν μη παθογόνα, επειδή σπάνια ή ποτέ δεν προκαλούν ανθρώπινη ασθένεια. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η κατηγοριοποίηση ως μη παθογόνων μπορεί να αλλάξει λόγω της εγγενούς μεταβλητότητας και προσαρμοστικότητας των βακτηρίων και της πιθανότητας επιζήμιων επιδράσεων στα αμυντικά συστήματα του ξενιστή που προκαλούνται, για παράδειγμα, από την ακτινοθεραπεία, τη χημειοθεραπεία και την ανοσοθεραπεία, τις γενετικές ανωμαλίες (κυστική ίνωση) ή την ανοσοκατασταλτική λοίμωξη.

1.3. Τροφιμογενή βακτήρια και ασθένειες

1.3.1. *Salmonella Typhimurium*

Η ανακάλυψη του γένους *Salmonella* χρονολογείται από το 1885, όταν ο Daniel Elmer Salmon, ένας Αμερικανός κτηνιατρικός παθολόγος, και ο Theobald Smith, ο βοηθός του, αναζητούσαν την αιτία της κοινής χολέρας των χοίρων. Ο Smith απομόνωσε ένα νέο είδος βακτηρίου, που προηγουμένως ονομαζόταν *S. cholerae-suis*, από άρρωστους χοίρους και το πρότεινε ως περιστασιακό παράγοντα. Παρ' όλα αυτά, παρά το γεγονός ότι ο Smith ήταν αυτός που έκανε την ανακάλυψη, ο Salmon διεκδίκησε τα εύσημα για την ανακάλυψη και ο οργανισμός στη συνέχεια πήρε το όνομά του. Ωστόσο, μεταγενέστερες έρευνες αποκάλυψαν ότι ο οργανισμός αυτός σπάνια προκαλεί εντερικά συμπτώματα στους χοίρους και επομένως δεν ήταν ο παράγοντας που αναζητούσαν (ο οποίος τελικά αποδείχθηκε ότι ήταν ένας ιός) [9]. Το γένος *Salmonella*, το οποίο συγγενεύει στενά με το γένος *Escherichia*, αποτελείται από αρνητικά κατά Gram, μη σπορογόνα, ραβδοειδή βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Η διάμετρος αυτών των

μικροοργανισμών κυμαίνεται από περίπου 0,7 έως 1,5 μm , με μήκος 2 έως 5 μm . Είναι προαιρετικά αναερόβια και παρουσιάζουν κυρίως περιτριχιακή κινητικότητα. Το γένος αυτό αναφέρεται σε πρωτογενή ενδοκυτταρικά παθογόνα που οδηγούν σε διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις κατά την ανάπτυξη λοίμωξης στον άνθρωπο [10].

Το Συνεργαζόμενο Κέντρο Αναφοράς και Έρευνας για τη *Salmonella* στο Ινστιτούτο Παστέρ, Παρίσι, Γαλλία, ορίζει και επικαιροποιεί την ταξινόμηση αυτού του γένους με βάση το σύστημα Kauffmann-White [11]. Κατά συνέπεια, το γένος *Salmonella* αποτελείται από δύο είδη, το *S. enterica* και το *S. bongori*. Με τη σειρά της, η *S. enterica* μπορεί να διαιρεθεί σε έξι υποείδη: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) και *S. enterica* subsp. *indica* (VI). Το *S. bongori* (V) θεωρήθηκε αρχικά ως ένα ακόμη υποείδος, αλλά τώρα έχει ταξινομηθεί χωριστά από τις υπόλοιπες σειρές *S. enterica* ως ξεχωριστό είδος. Το *S. bongori* καθώς και τα υποείδη II, IIIa, IIIb, IV και VI απομονώνονται σπάνια από κλινικά δείγματα, αλλά εντοπίζονται κυρίως σε ψυχρόαιμα σπονδυλωτά και στο περιβάλλον. Ως εκ τούτου, σχεδόν όλοι οι οργανισμοί *Salmonella* που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο και τα οικόσιτα ζώα ανήκουν στο υποείδος *S. enterica enterica* (I) [12]. Εναλλακτικά, τα στελέχη της *S. enterica* μπορούν επίσης να ταξινομηθούν με βάση το αντιγόνο επιφάνειας O (λιποπολυσακχαρίτης [LPS]) σε 67 οροομάδες και σε 2.557 ορότυπους ή serovars, όταν τα στελέχη διαφοροποιούνται τόσο από το αντιγόνο O όσο και από το αντιγόνο H (flagellar). Μεταξύ αυτών, 1.531 serovars αναγνωρίζεται ότι ανήκουν στο υποείδος I. Σήμερα, σύμφωνα με την τρέχουσα ταξινόμηση, τα γνωστά ονόματα που δίνονται στα serovars, όπως *S. enterica* serovar Typhimurium, *Enteritidis* ή *Choleraesuis*, διατηρούνται και δεν αντικαθίστανται από τους αντιγονικούς τους τύπους.

Η ταυτοποίηση σε κλινικό εργαστήριο πραγματοποιείται με την ανάπτυξη δειγμάτων κοπράνων σε ποικίλα στερεά μέσα. Οι πλάκες εξετάζονται μετά από 24 h ανάπτυξης στους 37°C με βάση τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά. Οι πλάκες άγαρ MacConkey χρησιμοποιούνται γενικά σε όλα τα εργαστήρια και αντιπροσωπεύουν ένα μέσο χαμηλής εκλεκτικότητας στο οποίο οι αποικίες *Salmonella* είναι άχρωμες λόγω της έλλειψης ζύμωσης της λακτόζης. Ωστόσο, άλλα στερεά εκλεκτικά μέσα, όπως το άγαρ *Salmonella-Shigella* (SS), το άγαρ ξυλόζης-λυσίνης-δεοξυχολικής (XLD) και οι πλάκες άγαρ Hektoen enteric (HE), χρησιμοποιούνται για πιο ειδική απομόνωση και ταυτοποίηση. Η παραγωγή υδρόθειου, ένα μεταβολικό χαρακτηριστικό γνώρισμα που χαρακτηρίζει αυτό το γένος,

φαίνεται από αποικίες με μαύρα κέντρα σε αυτούς τους τρεις τύπους επιλεκτικών μέσων.

Επιπλέον, αρκετές ειδικές βιοχημικές ιδιότητες επιβεβαιώνουν την ταυτοποίηση αυτού του εντερικού παθογόνου. Οι ιδιότητες αυτές περιλαμβάνουν την παραγωγή αερίου υδρόθειου σε άγαρ σιδήρου Kligler (Kligler's iron agar, KIA) και άγαρ σιδήρου με τριπλό σάκχαρο (triple sugar iron, TSI), καθώς και ζύμωση δεξτρώζης που οδηγεί σε κίτρινο χρωματισμό. Και τα δύο μέσα χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ικανότητας ζύμωσης της γλυκόζης ή/και της λακτόζης, αν και το μέσο TSI ανιχνεύει επίσης τη ζύμωση της σακχαρόζης. Η *Salmonella* μπορεί να προκαλέσει ζύμωση της γλυκόζης αλλά όχι της λακτόζης ή της σακχαρόζης. Η έλλειψη παραγωγής αποκαρβοξυλάσης της λυσίνης είναι επίσης χαρακτηριστική για το γένος *Salmonella*. Επιπλέον, η περαιτέρω ταυτοποίηση του οικείου ορότυπου επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών αντιορών. Στην αγορά διατίθενται 7 πολυδύναμα μίγματα αντιορού O, και μεταξύ αυτών, τα OMA και OMB χρησιμοποιούνται στο κλινικό περιβάλλον για την ανίχνευση περίπου του 98% των στελεχών *Salmonella* που απομονώνονται από ανθρώπους και θερμόαιμα ζώα (συμπεριλαμβανομένων των ορομάδων A, B, C, D, E, F, G, H και L).

Επί του παρόντος, ένας αυξανόμενος αριθμός κλινικών εργαστηρίων αντικαθιστά τον προηγούμενο βιοχημικό χαρακτηρισμό της *Salmonella* με την ανάλυση φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight), επειδή πρόκειται για μία απλή, γρήγορη και φθηνή μέθοδο ταυτοποίησης ρουτίνας. Δυστυχώς, η ταυτοποίηση των κλινικά απομονωμένων στελεχών *Salmonella* με την ανάλυση MALDI-TOF δεν μπορεί να φθάσει στο επίπεδο του οροβαρίου [13].

Δύο σημαντικά κλινικά σύνδρομα που προκαλούνται από τη λοίμωξη από *Salmonella* στον άνθρωπο είναι ο εντερικός ή τυφοειδής πυρετός και η κολίτιδα/διαρροϊκή νόσος. Ο εντερικός πυρετός είναι μία συστηματική διεισδυτική ασθένεια που προκαλείται αποκλειστικά από τα παθογόνα του ανθρώπου *S. enterica* serovar Typhi και *S. enterica* serovar Paratyphi A και B. Οι κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν πυρετό, πονοκέφαλο, κοιλιακό άλγος και παροδική διάρροια ή δυσκοιλιότητα, ενώ η λοίμωξη μπορεί να προκαλέσει θανατηφόρες αναπνευστικές, ηπατικές, σπληνικές ή/και νευρολογικές βλάβες. Χωρίς θεραπεία, η θνησιμότητα είναι 10 έως 20% και μειώνεται σε <1% μεταξύ των ασθενών που υποβάλλονται σε θεραπεία με τα κατάλληλα αντιβιοτικά [14].

Αντίθετα, υπάρχουν πολλά στελέχη μη τυφοειδούς σαλμονέλας (nontyphoidal *Salmonella*, NTS) που προκαλούν διαρροϊκή νόσο στον άνθρωπο και μπορούν, επιπλέον, να μολύνουν

ένα ευρύ φάσμα ζωικών ξενιστών [15]. Σύμφωνα με στοιχεία που προέρχονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το *S. Enteritidis* και το *S. Typhimurium* είναι τα δύο serovars που απομονώνονται συχνότερα σε κλινική πρακτική. Σε όλες τις περιοχές εκτός από τη Βόρεια Αμερική και την Ωκεανία, ο *S. Enteritidis* είναι πιο διαδεδομένος από τον *S. Typhimurium*. Παρ' όλα αυτά, τα δύο αυτά οροβακτήρια κατατάσσονται σε αντίθετη σειρά στις δύο αυτές περιοχές, αντιπροσωπεύοντας παγκοσμίως το 65% και το 12% όλων των απομονωθέντων, αντίστοιχα, το 2002. Σε αντίθεση με αυτά τα αποτελέσματα, ο *S. Typhimurium* ήταν ο πιο συχνά αναφερόμενος ορότυπος μεταξύ των μη ανθρώπινων απομονώσεων το 2002, αντιπροσωπεύοντας το 17% των απομονώσεων [16].

Σε έναν ανοσοκατασταλμένο ξενιστή, τα οροβακτήρια NTS προκαλούν αυτοπεριοριζόμενη διάρροια με ποσοστό θνησιμότητας χωρίς θεραπεία περίπου 0,1% στις ανεπτυγμένες χώρες. Στους παράγοντες κινδύνου για τη διαρροϊκή νόσο NTS περιλαμβάνονται η ηλικία, η αλλοίωση της ενδογενούς χλωρίδας του εντέρου (π.χ. ως αποτέλεσμα προηγούμενης αντιμικροβιακής θεραπείας ή χειρουργικής επέμβασης), η αχλωρυδρία, η ατροφική γαστρίτιδα ή προηγούμενη γαστρική χειρουργική επέμβαση και ο διαβήτης, ενώ ιδιαίτερη σημασία έχει η δραματικά πιο σοβαρή και επεμβατική παρουσίαση σε ανοσοκατεσταλμένους ενήλικες, ιδίως στο πλαίσιο του HIV [17].

Η εντερική λοίμωξη από *Salmonella* δεν μπορεί να διακριθεί κλινικά αξιόπιστα από εκείνη που προκαλείται από άλλα εντερικά βακτηριακά παθογόνα. Οι ασθενείς συνήθως παρουσιάζουν οξεία έναρξη πυρετού, κράμπες, κοιλιακό άλγος, διάρροια με ή χωρίς αίμα που σχετίζεται με φλεγμονή του παχέος εντέρου και πολύ συχνά ναυτία και έμετο- υπάρχει ευρύ φάσμα βαρύτητας της νόσου [10]. Η νόσος εμφανίζεται συνήθως μετά την κατάποση περισσότερων από 50.000 βακτηρίων σε μολυσμένα τρόφιμα ή νερό και μετά από μία περίοδο επώασης περίπου 6 έως 72 h, η οποία εξαρτάται από την ευαισθησία του ξενιστή και το εμβόλιο [18]. Περίπου το 5% των ατόμων με γαστρεντερική νόσο που προκαλείται από NTS αναπτύσσουν βακτηραιμία, ένα σοβαρό και δυνητικά θανατηφόρο πρόβλημα. Η βακτηραιμία είναι πιο πιθανό να εμφανιστεί σε μικρά παιδιά, ανοσολογικά εξασθενημένους ασθενείς και ασθενείς με συνυπάρχουσες ιατρικές καταστάσεις (π.χ. HIV, ελονοσία ή υποσιτισμός). Αυτοί οι ξενιστές είναι επίσης πιο πιθανό να αναπτύξουν εστιακή λοίμωξη, συμπεριλαμβανομένης της μηνιγγίτιδας, της σηπτικής αρθρίτιδας, της οστεομυελίτιδας, της χολαγγειίτιδας και της πνευμονίας. Μία επίφοβη επιπλοκή της βακτηραιμίας από *Salmonella* στους ενήλικες είναι η ανάπτυξη λοιμώδους ενδοαρτηρίτιδας, ιδίως αυτής που αφορά την κοιλιακή αορτή [19].

Μία άλλη ιδιαίτερη πτυχή των κλινικών επιπτώσεων των λοιμώξεων από *Salmonella* είναι η λεγόμενη κατάσταση φορέα. Η κατάσταση αυτή, η οποία ισχύει για τις λοιμώξεις NTS τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα και για τον τυφοειδή πυρετό, αντιστοιχεί σε επίμονο αποικισμό του εντέρου, ο οποίος εγκαθίσταται μόνιμα μετά την αρχική μόλυνση (πάνω από 10 εβδομάδες μετά τη μόλυνση). Η παραγωγή βιοφίλμ συγκαταλέγεται συχνά στα χαρακτηριστικά ιωτικότητας που υποστηρίζουν αυτή τη χρόνια παραμονή. Αυτοί οι φορείς χαρακτηρίζονται από κατάσταση χωρίς συμπτώματα και μπορούν να λειτουργήσουν ως δεξαμενές και, ως εκ τούτου, να συμβάλουν στη διάδοση της νόσου, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση των εργαζομένων στα τρόφιμα. Δυστυχώς, υπάρχει έλλειψη αποτελεσμάτων σχετικά με την ανοσολογική απόκριση και την αποτελεσματικότητα της αντιμικροβιακής θεραπείας σε αυτές τις σιωπηλές λοιμώξεις, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη κατάλληλων προληπτικών και θεραπευτικών μεθόδων [20].

Η λοίμωξη από *Salmonella Typhimurium* αρχίζει με την κατάποση οργανισμών σε μολυσμένα τρόφιμα ή νερό. Το πρώτο εμπόδιο που πρέπει να ξεπεραστεί στον ξενιστή είναι το όξινο pH του στομάχου. Για να προστατευθεί από το σοβαρό όξινο σοκ, το *S. Typhimurium* ενεργοποιεί την απόκριση ανοχής στα οξέα (acid tolerance response, ATR), η οποία παρέχει μία επαγωγίμη pH-οικοστατική λειτουργία για τη διατήρηση του ενδοκυτταρικού pH σε τιμές υψηλότερες από εκείνες του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος [21]. Μετά την είσοδό τους στο λεπτό έντερο, τα βακτήρια *Salmonella* πρέπει να φθάσουν και να διασχίσουν τη στιβάδα της εντερικής βλέννας, προτού συναντήσουν και προσκολληθούν στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Στα ποντίκια, τα βακτήρια *Salmonella* φαίνεται να προσκολλώνται και να εισέρχονται κατά προτίμηση στα κύτταρα M των κηλίδων Peyer (Peyer's patches, PPs) του εντερικού επιθηλίου, αν και μπορεί επίσης να συμβεί εισβολή σε φυσιολογικά μη φαγοκυτταρικά εντεροκύτταρα [22]. Λίγο μετά την προσκόλληση, η διαδικασία εισβολής εμφανίζεται ως συνέπεια εμπλεκόμενων σηματοδοτικών μονοπατιών των κυττάρων του ξενιστή που οδηγούν σε βαθιές αναδιατάξεις του κυτταροσκελετού [23]. Αυτές οι εσωτερικές τροποποιήσεις διαταράσσουν το φυσιολογικό επιθηλιακό όριο ιστών και προκαλούν τον επακόλουθο σχηματισμό μεμβρανικών βολβών που απορροφούν τα προσκολλημένα βακτήρια σε μεγάλα κυστίδια που ονομάζονται κενά που περιέχουν *Salmonella* (*Salmonella*-containing vacuoles, SCVs), το μοναδικό ενδοκυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο τα κύτταρα *Salmonella* επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται [24]. Ταυτόχρονα, η επαγωγή μίας

εκκριτικής απάντησης στο εντερικό επιθήλιο ξεκινά τη στρατολόγηση και τη μετανάστευση των φαγοκυττάρων από τον υποβλεννογόνο χώρο στον εντερικό αυλό. Η διαδικασία αυτή σχετίζεται με την παραγωγή διαφόρων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) και η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) [25].

1.3.2. Listeria monocytogenes

Η *Listeria monocytogenes* απομονώθηκε για πρώτη φορά στην Αγγλία από τους E. G. D. Murray et al 1926. Το όνομα *Bacterium monocytogenes* αποδόθηκε αρχικά σε αυτό το θετικό κατά Gram βακτήριο που ευθύνεται για μία θανατηφόρα ασθένεια σε κουνέλια η οποία χαρακτηρίζεται από σημαντική αύξηση του αριθμού των μονοκυττάρων που κυκλοφορούν στο αίμα [26]. Το 1927, ο Pirie απομόνωσε τον ίδιο οργανισμό από το ήπαρ τρωκτικών στη Νότια Αφρική. Ως εκ τούτου, το βακτήριο μετονομάστηκε σε *Listerella hepatolytica*, προς τιμήν του χειρουργού J. Lister. Το 1940 υιοθετήθηκε τελικά η ονομασία *Listeria monocytogenes*. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, η λιστερίωση θεωρούνταν ζωνόσος, μία ασθένεια που προσβάλλει κυρίως τα ζώα, αλλά η οποία θα μπορούσε να μεταδοθεί στον άνθρωπο. Η *L. monocytogenes* αναγνωρίστηκε επίσημα ως παθογόνο για τον άνθρωπο μετά τις πρώτες επιδημίες στα τέλη της δεκαετίας του 1970 [27] και ως τροφιμογενές παθογόνο τη δεκαετία του 1980 [28]. Ωστόσο, το *L. monocytogenes* είχε αρχίσει να χρησιμοποιείται ως ισχυρό μοντέλο για τη μελέτη της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας στις αρχές της δεκαετίας του 1960, μετά τις μελέτες του Mackaness που κατέδειξαν τον βασικό ρόλο της κυτταρικής ανοσίας στον έλεγχο αυτής της ενδοκυτταρικής λοίμωξης [29]. Το πρωτοποριακό του έργο ακολουθήθηκε από πολυάριθμες μελέτες που υπογράμμιζαν ότι τόσο η έμφυτη όσο και η προσαρμοστική ανοσία απαιτούνται για την αποτελεσματική αναγνώριση και απομάκρυνση της *L. monocytogenes*. Στη συνέχεια, καθιερώθηκε ένας αριθμός θεμελιωδών προτύπων σχετικά με το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της μόλυνσης ποντικών με *L. monocytogenes*. Ξεκινώντας από τα τέλη της δεκαετίας του 1980, η μοριακή βάση της μολυσματικότητας και της ενδοκυτταρικής ζωής του *L. monocytogenes* μελετήθηκε λεπτομερώς με ένα συνδυασμό προσεγγίσεων γενετικής και μοριακής κυτταρικής βιολογίας. Αυτό οδήγησε στην ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό βασικών παραγόντων ιογένεσης, αλλά και σε βασικές γνώσεις στην κυτταρική βιολογία, καθιερώνοντας το *L. monocytogenes* μεταξύ των πρότυπων συστημάτων που χρησιμοποιούνται για τη διαλεύκανση των μοριακών

μηχανισμών που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου.

Η *L. monocytogenes* είναι ένα διεισδυτικό βακτήριο, το οποίο μπορεί να εισέλθει σε μία ευρεία ποικιλία κυττάρων και στη συνέχεια να περάσει απευθείας από ένα πρωτίστως μολυσμένο κύτταρο σε ένα παρακείμενο κύτταρο. Σε μορφολογικό επίπεδο, η διαδικασία μόλυνσης έχει διερευνηθεί λεπτομερώς [30]. Μοριακές και κυτταροβιολογικές προσεγγίσεις αποκάλυψαν ότι η *L. monocytogenes* έχει αναπτύξει ένα περίπλοκο σύνολο παραγόντων ιογένεσης που μιμούνται λειτουργικά ή δομικά τις πρωτεΐνες του ξενιστή για να καταλάβουν την κυτταρική διαδικασία προς όφελός του. Κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων του ενδοκυτταρικού κύκλου ζωής της, η *L. monocytogenes* εκμεταλλεύεται διάφορους αλυσιδωτούς μηχανισμούς σηματοδότησης του κυττάρου του ξενιστή.

Η είσοδος σε μη φαγοκυτταρικά κύτταρα διαμεσολαβείται από τις δύο βακτηριακές επιφανειακές πρωτεΐνες InlA και InlB. Τόσο η InlA όσο και η InlB ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών που περιέχουν πλούσιες σε λευκίνες επαναλήψεις και ονομάζονται ιντερναλίνες [31]. Η InlA είναι μία επιφανειακή πρωτεΐνη με μοτίβο LPXTG που επιτρέπει την ομοιοπολική αγκύρωση στην πεπτιδογλυκάνη, ενώ η InlB αλληλεπιδρά μη ομοιοπολικά με τα λιποτεϊχοϊκά οξέα. Η InlA και η InlB προσδένονται η καθεμία σε επιφανειακές πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή- η InlA προσδέεται στην πρωτεΐνη E-καντερίνη της προσκολλητικής σύνδεσης, ενώ η InlB στοχεύει στην κινάση τυροσίνης Met του υποδοχέα [32]. Οι ενδογενείς συνδέτες της E-καντερίνης και της Met είναι αντίστοιχα η E-καντερίνη και ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (HGF). Η πρόσδεση των InlA και InlB στους υποδοχείς τους δεν λαμβάνει χώρα στις ίδιες θέσεις με τους ενδογενείς συνδέτες E-καντερίνης και HGF, αλλά οδηγεί στη στρατολόγηση ενός παρόμοιου συνόλου μεταγενέστερων σηματοδοτικών μορίων. Η πρόσδεση των InlA και InlB στους υποδοχείς τους έχει ως αποτέλεσμα (i) την ουβικουιτινίωση του υποδοχέα, (ii) τη στρατολόγηση της κλαθρίνης, (iii) την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού του φλοιού και (iv) τελικά την πρόσληψη παθογόνων [33]. Η πρόσδεση της InlA στην E-καντερίνη και η πρόσδεση της InlB στη Met επάγουν επίσης τη συναρμολόγηση πολυσύνθετων σηματοδοτικών επιπέδων, οδηγώντας σε ενεργοποίηση βασικών κυτταρικών μονοπατιών, όπως η φωσφατιδυλινοσιτόλη-3-κινάση (PI3K), οι PI4-κινάσες τύπου II και τα μονοπάτια της ενεργοποιούμενης με μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης (mitogen-activated protein kinase, MAPK) [34].

Μελέτες *in vitro* οδήγησαν στην ανακάλυψη ότι η λοίμωξη από το στόμα στον άνθρωπο εξελίσσεται πιο αποτελεσματικά από ότι στα ποντίκια, λόγω της διαφοράς ενός και μόνο αμινοξέος στη θέση 16 της E-καντερίνης των ποντικών, η οποία μειώνει την αλληλεπίδραση με την InlA σε εντερικό επίπεδο [35]. Ομοίως, η αναγνώριση της Met από την InlB είναι ειδική για κάθε είδος [36]. Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στη δημιουργία νέων επιτρεπτών ζωικών μοντέλων, δηλαδή ποντίκια που έχουν κατασκευαστεί για να εκφράζουν ανθρωποποιημένη E-καντερίνη ή στην εργαστηριακή χρήση φυσικά επιτρεπτικών ζώων όπως τα gerbils [37]. Αυτοί οι οργανισμοί-μοντέλα επέτρεψαν *in vivo* μελέτες που αφορούν τους μοριακούς μηχανισμούς που χρησιμοποιεί η *L. monocytogenes* για να διασχίσει τον εντερικό φραγμό, δείχνοντας ότι το βήμα αυτό απαιτεί κυρίως την InlA [38].

Πιο πρόσφατα, η ανάλυση της εμβρυοπλακουντιακής λιστερίωσης σε τρωκτικά και σε ποντίκια με εξανθρωπισμένη E-καντερίνη knock-in, επέτρεψε την ανακάλυψη ότι η InlA και η InlB παίζουν αλληλοεξαρτώμενους ρόλους στη στόχευση και την εισβολή στο πλακουντιακό επιθήλιο [39]. Λίγες μελέτες έχουν ασχοληθεί με τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται στη διάβαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού που οδηγεί σε μηνιγγιτιδοεγκεφαλίτιδα [40]. Το μόνο μόριο που πιθανώς εμπλέκεται, όπως υποδεικνύεται από μελέτες *in vitro*, είναι η InlB, αν και έχει προταθεί ότι παίζει ρόλο και η E-καντερίνη, με βάση την έκφρασή της από το μικροαγγειακό ενδοθήλιο και τα κύτταρα του χοριοειδούς πλέγματος που αποτελούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [41].

Η μεταγραφική ανάλυση σε όλο το γονιδίωμα έχει χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό της απόκρισης των κυττάρων του ξενιστή στη μόλυνση από τη *L. monocytogenes*. Οι αρχικές μελέτες στην κυτταρική σειρά μακροφάγων J774 του ποντικού έδειξαν αύξηση των γενικών αποκρίσεων στρες, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης διαφόρων πρωτεϊνών θερμικού σοκ [42]. Σε μία από τις πρώτες μελέτες ολόκληρου του γονιδιώματος, οι Cohen και συνεργάτες του [43] χρησιμοποίησαν ολιγοσυστοιχίες και μικροσυστοιχίες DNA για να ανιχνεύσουν γονίδια που ρυθμίζονται κατά τη μόλυνση από *L. monocytogenes* καλλιεργημένων ανθρώπινων προμυελοκυτταρικών κυττάρων THP1. Αρκετά γονίδια παρουσίασαν ρύθμιση προς τα πάνω, ιδίως προφλεγμονώδη, γονίδια μεταγωγής σήματος ή γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό. Οι Baldwin και οι συνεργάτες του [44] πραγματοποίησαν αναλύσεις μικροσυστοιχιών σε καλλιεργημένα ανθρώπινα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα CaCo2 και διαπίστωσαν ισχυρή ενεργοποίηση της σηματοδότησης NFjB κατά τη μόλυνση, η οποία επιβεβαιώθηκε περαιτέρω σε

μεταγενέστερες μελέτες [45]. Η απόκριση του NFjB αναλύθηκε λεπτομερώς σε πρωτογενή μακροφάγα προερχόμενα από τον μυελό των οστών και περιγράφηκε μία διφασική απόκριση στη μόλυνση από τη *L. monocytogenes* [46]. Η πρώτη φάση συνίστατο σε μία NFjB απόκριση που ήταν μάλλον μη ειδική, καθώς θα μπορούσε επίσης να προκληθεί από θερμικά θανατωμένη *L. monocytogenes*. Αντίθετα, η δεύτερη φάση περιελάμβανε την ανοδική ρύθμιση των γονιδίων που ανταποκρίνονται στην ιντερφερόνη και εξαρτιόταν από την παρουσία της λιστεριολυσίνης O (listeriolysin O, LLO) και τη διαμεσολαβούμενη από την LLO διαφυγή από τα κενά στο κυτταρόλυμα. Η σημασία της LLO επιβεβαιώθηκε στην προσέγγιση των Lecuit και των συνεργατών του [47], οι οποίοι συνέκριναν τις επιδράσεις της από του στόματος μόλυνσης από *L. monocytogenes* και του εντερικού συμβιωτή *Bacteroides thetaiotaomicron* σε διαγονιδιακά ποντίκια επιτρεπτά για μόλυνση από *L. monocytogenes*. Η χαρακτηριστική μεταγραφική υπογραφή που επάγεται από τη μόλυνση με *L. monocytogenes* περιελάμβανε την ανοσοφλεγμονώδη αντίδραση καθώς και πτυχές του μεταβολισμού των λιπιδίων, των αμινοξέων και της ενέργειας [47]. Παραδόξως, αυτές οι αποκρίσεις δεν εξαρτώνται από την InlA, αλλά μάλλον από την έκφραση της LLO.

Η διείσδυση της *L. monocytogenes* ξεκινά με τη σύνδεση με τους υποδοχείς των κυττάρων του ξενιστή, όπως η E-καντερίνη και η Met, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Η πρόσδεση αυτή εκκινεί μία σειρά από αλυσιδωτούς κύκλους σηματοδότησης που περιλαμβάνουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις διαφόρων πρωτεϊνών, ιδίως των ίδιων των υποδοχέων. Δύο κύριες τροποποιήσεις που παρατηρούνται σε αυτό το στάδιο της μόλυνσης είναι η φωσφορυλίωση και η ουβικουιτυλίωση πρωτεϊνών, οι οποίες είναι αμφότερες αναστρέψιμες τροποποιήσεις που τροποποιούν τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών-στόχων και που απαιτούνται για την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού ακτίνης και την πρόσληψη παθογόνων.

Στον άνθρωπο, η λιστερίωση προκαλείται από την κατάποση τροφίμων μολυσμένων με *L. monocytogenes*. Τα κλινικά συμπτώματα κυμαίνονται από γαστρεντερίτιδα έως πιο σοβαρές διάχυτες μορφές λοίμωξης, όπως σήψη ή μηνιγγιτιδοεγκεφαλίτιδα. Η συχνότητα εμφάνισης της λιστερίωσης στον άνθρωπο είναι σχετικά χαμηλή, εν μέρει λόγω του αυστηρού ελέγχου των τροφίμων, αλλά η νόσος έχει υψηλό ποσοστό θνησιμότητας σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, νεογνά και έμβρυα, με συνολική θανατηφόρα έκβαση σε ποσοστό έως και 30% των περιπτώσεων [48]. Η *L. monocytogenes* είναι ένα προαιρετικό ενδοκυτταρικό βακτήριο που μπορεί να επιβιώσει στο περιβάλλον. Μετά την κατάποση, η *L. monocytogenes* είναι σε θέση να διασχίσει το εντερικό επιθήλιο και να διαδοθεί μέσω

της λέμφου και της κυκλοφορίας του αίματος σε βαθύτερους ιστούς. Το ήπαρ και ο σπλήνας αποτελούν πρωταρχικά όργανα-στόχους για περαιτέρω βακτηριακό πολλαπλασιασμό, με αποτέλεσμα το σχηματισμό αποστήματος. Μία χαρακτηριστική πτυχή της φυσιοπαθολογίας της *L. monocytogenes* είναι η ικανότητά της να διασχίζει δύο ακόμη σημαντικούς επιθηλιακούς φραγμούς, τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και τον πλακουντιακό φραγμό. Αυτό μπορεί στη συνέχεια να προκαλέσει μηνιγγιτιδοεγκεφαλίτιδα ή να οδηγήσει σε μόλυνση του εμβρύου και τελικά σε αποβολή, θνησιγένεια ή νεογνική μηνιγγίτιδα.

1.3.3. *Escherichia coli*

Το γένος *Escherichia*, το οποίο πήρε το όνομά του από τον Γερμανό παιδίατρο Theodor Escherich, αποτελείται από προαιρετικά αναερόβιους αρνητικούς κατά Gram βακίλους που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* [49]. Το είδος του γένους *Escherichia coli* είναι ευρέως διαδεδομένο, όπου είναι το κυριότερο προαιρετικά αναερόβιο που κατοικεί στο παχύ έντερο του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων [50]. Αν και τα περισσότερα στελέχη *E. coli* ζουν χωρίς επιπτώσεις στο παχύ έντερο και σπάνια προκαλούν ασθένειες σε υγιή άτομα, ορισμένα παθογόνα στελέχη μπορούν να προκαλέσουν εντερικές και εξωεντερικές ασθένειες τόσο σε υγιή όσο και σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα [51]. Οι διαρροϊκές ασθένειες αποτελούν σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας και κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας σε βρέφη και μικρά παιδιά [52]. Οι χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος στην Αφρική, την Ασία και τη Λατινική Αμερική είναι οι περιοχές που πλήττονται περισσότερο, με τις διαρροϊκές ασθένειες να εμφανίζονται συχνότερα με θανατηφόρα αποτελέσματα κυρίως λόγω των κακών συνθηκών διαβίωσης (ανεπαρκής παροχή νερού, κακή περιβαλλοντική υγιεινή και αποχέτευση και ανεπαρκής εκπαίδευση) [51].

Τα στελέχη *E. coli* που εμπλέκονται στις διαρροϊκές νόσους είναι ένας από τους σημαντικότερους από τους διάφορους αιτιολογικούς παράγοντες της διάρροιας, όπου τα στελέχη έχουν εξελιχθεί με την απόκτηση, μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς, ενός συγκεκριμένου συνόλου χαρακτηριστικών που έχουν παραμείνει επιτυχώς στον ξενιστή [53]. Ανάλογα με την ομάδα των καθοριστικών παραγόντων ιογένεσης που αποκτήθηκαν, σχηματίστηκαν ειδικοί συνδυασμοί που καθορίζουν τους σήμερα γνωστούς παθότυπους *E. coli*, οι οποίοι είναι συλλογικά γνωστοί ως διαρροιογόνα *E. coli* (*diarrheagenic E. coli*,

DEC) [53]. Οι παθότυποι DEC διαφέρουν ως προς τις προτιμώμενες θέσεις αποικισμού τους στον ξενιστή, τους μηχανισμούς ιογένεσης και τα επακόλουθα κλινικά συμπτώματα και συνέπειες και ταξινομούνται ως εντεροπαθογόνο *E. coli* (enteropathogenic, EPEC), εντεροαιμορραγικό (που παράγει τοξίνη Shiga) *E. coli* (enterohemorrhagic, EHEC/Shiga toxin-producing, STEC), εντεροσυγκεντρωτικό *E. coli* (enteroaggregative, EAEC), εντεροτοξινογόνο *E. coli* (enterotoxigenic, ETEC) και εντεροδιδεισδυτικό *E. coli* (enteroinvasive, EIEC).

Η παραγωγή ESBL είναι ιδιαίτερα σημαντική για τις λοιμώξεις που προκαλούνται στην κοινότητα. Η μετάδοση βακτηρίων που παράγουν ESBL μπορεί να συμβεί από άνθρωπο σε άνθρωπο ή από ζωικές πηγές στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας [54]. Ο κλινικός αντίκτυπος των λοιμώξεων από στελέχη *E. coli* που παράγουν ESBL έχει μελετηθεί κυρίως σε νοσηλευόμενους ασθενείς. Οι λοιμώξεις αυτές παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας που σχετίζεται με την καθυστέρηση στην εφαρμογή της κατάλληλης αντιμικροβιακής θεραπείας, καθώς τα εμπειρικά συνταγογραφούμενα αντιβιοτικά ενδέχεται να μην είναι αποτελεσματικά σε αυτή την περίπτωση [54]. Σε μία μελέτη στην Ευρώπη, οι λοιμώξεις από *E. coli* που παράγουν ESBL εκτιμήθηκαν ότι είναι της τάξης των 300.000 και ότι έχουν προκαλέσει 9.000 θανάτους [55]. Εξάλλου, οι λοιμώξεις με βακτήρια που παράγουν ESBL έχουν συσχετιστεί με μεγαλύτερη παραμονή στο νοσοκομείο και με αυξημένη επιβάρυνση των υπηρεσιών υγείας [56].

Οι οργανισμοί που παράγουν ESBLs αναφέρονται όλο και συχνότερα παγκοσμίως μετά την πρώτη περιγραφή τους στην Ευρώπη στις αρχές της δεκαετίας του 1980 [57]. Μία πρόσφατη μελέτη ανέφερε έναν αθροιστικό παγκόσμιο συγκεντρωτικό επιπολασμό εντερικής μεταφοράς *E. coli* που παράγει ESBL, στην κοινότητα, της τάξης του 16,5% για την περίοδο 2013-2018, με οκταπλάσια αύξηση κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες, υποδεικνύοντας ότι η πρόληψη της διάδοσης τέτοιων στελεχών μπορεί να απαιτεί νέες θεραπευτικές στρατηγικές και στρατηγικές δημόσιας υγείας [58]. Η παρουσία των ESBLs και η συνδυασμένη αντοχή τους αποτελεί σοβαρή ανησυχία για τη δημόσια υγεία. Εκτός από την αντοχή που προσδίδουν τα ένζυμα ESBL, παρατηρείται συχνά συν-αντοχή σε άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών, περιορίζοντας δραστικά τις διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές και θέτοντας σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία [59]. Επιπλέον, το φαινόμενο αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη χρήση καρβαπενεμών, ευνοώντας την περαιτέρω διάδοση των *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάση [60].

1.4. Επιβάρυνση στην ποιότητα ζωής

Οι εκτιμήσεις της FERG για την παγκόσμια και περιφερειακή επιβάρυνση από τροφιμογενείς ασθένειες δείχνουν ότι, παρόλο που η Ευρώπη έχει τη χαμηλότερη εκτιμώμενη επιβάρυνση, περισσότεροι από 23 εκατομμύρια άνθρωποι αρρωσταίνουν ετησίως και 5.000 πεθαίνουν από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων [61]. Οι 10 συχνότερες αιτίες τροφιμογενών ασθενειών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Οι διααρροϊκές νόσοι αντιπροσώπευαν την πλειονότητα των περιπτώσεων και ο νοροϊός (Norovirus) ήταν υπεύθυνος για τις περισσότερες περιπτώσεις ετησίως, σχεδόν 15 εκατομμύρια περιπτώσεις, ακολουθούμενος από το *Campylobacter spp.* με σχεδόν 5 εκατομμύρια περιπτώσεις, τη μη τυφοειδή *Salmonella spp.* με σχεδόν 1,7 εκατομμύρια και την *T. gondii* με περισσότερες από 1 εκατομμύριο περιπτώσεις. Η *Giardia spp.*, το *Cryptosporidium spp.* και το *E. coli* που παράγει τοξίνη Shiga προκαλούσαν περισσότερες από 485.000, 187.000 και 165.000 ασθένειες ετησίως, αντίστοιχα.

Πίνακας 1 Κυριότερες αιτίες τροφιμογενών ασθενειών στην Ευρώπη ανά βακτήριο, 2010 [62]

Αίτιο τροφιμογενούς ασθένειας	Αριθμός περιπτώσεων
Norovirus	14.850.045
<i>Campylobacter spp.</i>	4.687.810
Non-typhoidal <i>S. enterica</i>	1.683.734
<i>Toxoplasma gondii</i>	1.068.724
<i>Giardia spp.</i>	485.752
<i>Cryptosporidium spp.</i>	187.416
Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>	165.250
Hepatitis A virus	97.472
<i>Ascaris spp.</i>	71.884
Enteropathogenic <i>E. coli</i>	71.395

Μόνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το 2014 αναφέρθηκαν περισσότερα από 340.000 κρούσματα ζωοανθρωπονόσων, τα οποία οδήγησαν σε θάνατο σε 315 περιπτώσεις [63]. Η καμπυλοβακτηρίωση είναι η πιο συχνά αναφερόμενη ζωνόσος στην Ευρωπαϊκή Ένωση από το 2005, ακολουθούμενη από τη σαλμονέλωση. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα του FERG, καθώς η λοίμωξη από νοροϊό και η τοξοπλάσμωση δεν παρακολουθούνται στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η κατάταξη του FERG των κινδύνων που

προκαλούν θανάτους στην Ευρώπη (Πίνακας 2) δείχνει ότι η μη τυφοειδής *Salmonella* spp. ήταν η κύρια αιτία, με σχεδόν 2000 εκτιμώμενους θανάτους ετησίως, ακολουθούμενη από το *Campylobacter* spp. (459 θάνατοι), το Norovirus (435 θάνατοι) και τη *L. monocytogenes* (399 θάνατοι).

Πίνακας 2 Κύριες αιτίες θανάτου λόγω τροφιμογενών ασθενειών στην Ευρώπη, 2010 [62]

Αίτιο τροφιμογενούς ασθένειας	Αριθμός θανάτων
Non-typhoidal <i>S. enterica</i>	1.854
<i>Campylobacter</i> spp.	459
Norovirus	435
<i>Listeria monocytogenes</i>	399
<i>Echinococcus multilocularis</i>	239
Hepatitis A virus	195
<i>Brucella</i> spp.	191
Aflatoxin	160
<i>Mycobacterium bovis</i>	150
<i>Echinococcus granulosus</i>	82

Σε παγκόσμιο επίπεδο, το 2010, εκτιμάται ότι 600 εκατομμύρια, ή σχεδόν ένας στους δέκα ανθρώπους στον κόσμο, αρρώστησαν μετά την κατανάλωση τροφίμων που είχαν μολυνθεί από οποιοδήποτε από τους 31 εξεταζόμενους τροφιμογενείς κινδύνους [61]. Από αυτούς, 420.000 άνθρωποι πέθαναν, συμπεριλαμβανομένων 125.000 παιδιών ηλικίας κάτω των 5 ετών. Η πλειονότητα των 600 εκατομμυρίων περιπτώσεων (550 εκατομμύρια) προκλήθηκε από παράγοντες διαρροϊκής νόσου, όπως ο νοροϊός (124 εκατομμύρια περιπτώσεις) και το *Campylobacter* spp. (96 εκατομμύρια περιπτώσεις). Συχνές αιτίες διεισδυτικής μολυσματικής νόσου ήταν ο ιός της ηπατίτιδας Α και τα παράσιτα *Ascaris* spp. και *T. gondii*, με 14, 12 και 10 εκατομμύρια περιπτώσεις, αντίστοιχα. Ο αριθμός των θανάτων που οφείλονται σε τροφιμογενείς διαρροϊκούς κινδύνους ήταν επίσης πολύ υψηλός (περίπου 230.000). Η παγκόσμια επιβάρυνση από τις τροφιμογενείς νόσους το 2010 που προκλήθηκαν από τους 31 κινδύνους που μελετήθηκαν ήταν 33 εκατομμύρια έτη ζωής προσαρμοσμένα στην αναπηρία (disability-adjusted life year, DALY), της ίδιας τάξης με εκείνη που οφείλεται στις μείζονες μολυσματικές ασθένειες HIV/AIDS (92 εκατομμύρια DALYs), ελονοσία (55 εκατομμύρια DALYs) και φυματίωση (44 εκατομμύρια DALYs). Η εκτίμηση είναι επίσης συγκρίσιμη με εκείνη για ορισμένους άλλους παράγοντες

κινδύνου, όπως οι διατροφικοί παράγοντες κινδύνου (254 εκατομμύρια DALYs), η κακή ποιότητα νερού και υγιεινής (211 εκατομμύρια DALYs) και η ατμοσφαιρική ρύπανση (76 εκατομμύρια DALYs).

Οι παράγοντες διαρροϊκών νόσων ευθύνονται για 18 εκατομμύρια DALY, ή το 54% της επιβάρυνσης από τροφιμογενείς νόσους, το 2010. Μόνο η μη τυφοειδής *Salmonella* spp. ήταν υπεύθυνη για 4 εκατομμύρια DALYs, και έξι άλλοι παράγοντες διάρροιας (Norovirus, *Campylobacter* spp., εντεροπαθογόνος *E. coli*, εντεροτοξινογόνος *E. coli*, *Vibrio cholerae* και *Shigella* spp.) προκάλεσαν επιβάρυνση 1-3 εκατομμυρίων DALYs ο καθένας. Οι μη διαρροϊκοί κίνδυνοι που συνέβαλαν σημαντικά στην παγκόσμια επιβάρυνση περιλαμβάνουν τη *Salmonella* Typhi (*S. enterica* serovar Typhi) 3,7 εκατομμύρια DALYs, το *T. solium* (2,8 εκατομμύρια DALYs), τον ιό της ηπατίτιδας A (1,4 εκατομμύρια DALYs) και το *Paragonimus* spp. (1 εκατομμύριο DALYs).

Συνολικά στην Ευρώπη, η συμβολή των ετών χαμένης ζωής (Years of life lost, YLL) στις συνολικές εκτιμήσεις επιβάρυνσης ήταν υψηλότερη για τη *Salmonella* spp., τη *Listeria*, τον ιό της ηπατίτιδας A και τον *M. bovis* από ότι για άλλους κινδύνους, ενώ η συμβολή των ετών υγιούς ζωής που χάνονται λόγω αναπηρίας (Years of healthy life lost due to disability, YLD) ήταν υψηλότερη για τις διοξίνες, την *T. gondii* και το *Campylobacter* spp. Τα εκτιμώμενα DALY ανά 100 000 πληθυσμό ανά έτος λόγω χημικών κινδύνων ήταν χαμηλότερα στην Ευρώπη από ότι στις άλλες περιοχές. Ωστόσο, στην υποπεριοχή Α (που περιλαμβάνει κυρίως χώρες της Δυτικής Ευρώπης), η σχετική συμβολή των αλλεργιογόνων των φυσιτικών στις εκτιμήσεις των DALY ήταν εκπληκτικά υψηλή. Η επιβάρυνση των τροφιμογενών ασθενειών διέφερε ευρέως μεταξύ και εντός των χωρών, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα συγκεντρωτικά δεδομένα σε εθνικό και περιφερειακό επίπεδο ενδέχεται να μην αποτυπώνουν την πολυπλοκότητα της δυναμικής των ασθενειών- κατά συνέπεια, πληθυσμοί ή περιοχές που διατρέχουν κίνδυνο ενδέχεται να αγνοούνται. Περαιτέρω ανάλυση τόσο των παγκόσμιων όσο και των περιφερειακών εκτιμήσεων δείχνει μία αξιοσημείωτα διαφορετική κατανομή της επιβάρυνσης από τροφιμογενείς νόσους [62].

Η *Salmonella* spp. είναι μία από τις σημαντικότερες και ευρύτερα διαδεδομένες αιτίες τροφιμογενών ασθενειών στον άνθρωπο. Οι μη τυφοειδείς *S. enterica* προκαλούν συνήθως γαστρεντερίτιδα. Αυτή η ομάδα serovars της *Salmonella* περιλαμβάνει τα *S. Enteritidis* και *S. Typhimurium*, τα οποία είναι τα δύο πιο συχνά αναφερόμενα serovars της ανθρώπινης τροφιμογενούς *Salmonella* spp. στα περισσότερα μέρη του κόσμου. Η λιστερίωση είναι μία

σημαντική τροφιμογενής νόσος που προκαλείται από το πανταχού παρόν βακτήριο της *L. monocytogenes*. Σε αντίθεση με τα περισσότερα άλλα τροφιμογενή παθογόνα, η *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε τρόφιμα με αρκετά χαμηλή υγρασία, υψηλή συγκέντρωση αλατιού και σε θερμοκρασίες ψύξης. Η ικανότητα παραμονής και πολλαπλασιασμού στο περιβάλλον των τροφίμων καθιστά τον έλεγχο της *L. monocytogenes* ιδιαίτερα δύσκολο [62].

1.5. Επιδημιολογία και οικονομική επιβάρυνση

Στην ΕΕ, καταγράφονται ετησίως περισσότερα από 91.000 κρούσματα σαλμονέλλωσης σε ανθρώπους, γεγονός που αντιπροσωπεύει αναλογία 20 κρουσμάτων ανά 100.000 κατοίκους. Εκτιμάται ότι το παγκόσμιο κόστος της ανθρώπινης σαλμονέλλωσης θα μπορούσε να ανέλθει σε 3 δισεκατομμύρια ευρώ ετησίως [64]. Σύμφωνα με την Ετήσια έκθεση για τις πηγές και τις τάσεις των ζωνοσόων που δημοσιεύεται από την EFSA και το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (ECDC), τα κρούσματα σαλμονέλλωσης έχουν σταθεροποιηθεί τα τελευταία χρόνια στην ΕΕ, μετά από μία μακρά περίοδο πτωτικής τάσης. Η EFSA δημοσιεύει ετήσιες εκθέσεις σχετικά με την κατάσταση και τον επιπολασμό των ζωνοσόων στην ΕΕ. Τα τελευταία στοιχεία που δημοσιεύθηκαν ήταν από το 2019, αναφέροντας ότι τα 26 μέλη της ΕΕ που διαθέτουν προγράμματα ελέγχου της *Salmonella* για τα πουλερικά είχαν παρόμοια ποσοστά *Salmonella enteritidis* όπως και το 2017-2018. Το 2019, η *Salmonella* απομονώθηκε στο 2,34% των σμηνών που υποβλήθηκαν σε δειγματοληψία στην ΕΕ, ποσοστό υψηλότερο από τα προηγούμενα έτη (2,03% το 2018 και 1,89% το 2017). Ο επιπολασμός των σμηνών που ήταν θετικά για οποιονδήποτε από τους πέντε ορότυπους που στοχεύουν τα προγράμματα ελέγχου της *Salmonella* (*S. enteritidis*, *S. Typhimurium* (συμπεριλαμβανομένης της μονοφασικής παραλλαγής), *S. virchow*, *S. infantis* και *S. hadar*) ήταν 0,62% το 2019, κάπως υψηλότερος από ό,τι το 2018 (0,54%). Με άλλα λόγια, το 26,56% των θετικών αποτελεσμάτων για *Salmonella* που αναφέρθηκαν σε σμήνη ορνίθων αναπαραγωγής ήταν ορότυποι που αποτελούν στόχο των προγραμμάτων ελέγχου της *Salmonella*. Η Πολωνία είχε τον υψηλότερο επιπολασμό από τους πέντε ορότυπους-στόχους των προγραμμάτων ελέγχου της *Salmonella*, με 1,5%. Το 2019, ο *S. enteritidis* ήταν ο ορότυπος με τον υψηλότερο επιπολασμό σε φάρμες αναπαραγωγής στην ΕΕ.

1.6. Ασφάλεια τροφίμων

Η σταθερή παροχή ασφαλών και καλής ποιότητας τροφίμων είναι μία από τις πιο θεμελιώδεις βασικές ανθρώπινες ανάγκες. Πολλοί θεωρούν ότι είναι ευθύνη της κυβέρνησης να ικανοποιήσει την ανάγκη για ασφαλή τρόφιμα [65]. Τα στατιστικά στοιχεία για τις ασθένειες που προκαλούνται από τα τρόφιμα σε όλο τον κόσμο επισημαίνουν το γεγονός ότι τα κακής ποιότητας τρόφιμα έχουν σημαντικές οικονομικές και σε ορισμένες περιπτώσεις θανατηφόρες συνέπειες [66]. Η έλλειψη μίας αποτελεσματικής Εθνικής Αρχής Ασφάλειας Τροφίμων μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία, την ασφάλεια των τροφίμων, την εθνική οικονομία, την ποιότητα ζωής, το επίπεδο των υπηρεσιών ασφάλειας τροφίμων και τη συνολική οικονομική ανάπτυξη [67].

Οι κυβερνήσεις έχουν την ευθύνη της προστασίας της υγείας των καταναλωτών, καθώς και της προστασίας των καταναλωτών από δόλιες και παραπλανητικές πρακτικές στην αλυσίδα τροφίμων [68]. Οι κίνδυνοι για τη δημόσια υγεία που συνδέονται με την κατανάλωση τροφίμων μειώνονται ή ελέγχονται αποτελεσματικά μέσω μίας σειράς ελεγκτικών μηχανισμών και δραστηριοτήτων [69]. Οι παραπάνω μηχανισμοί περιλαμβάνουν την κατάλληλη νομοθεσία για τα τρόφιμα, τα καθιερωμένα κυβερνητικά πρότυπα, μέτρα ελέγχου ποιότητας όπως το HACCP, κώδικες πρακτικής που υιοθετούνται από τη βιομηχανία τροφίμων και ρυθμιστικούς ελέγχους που εφαρμόζονται από τις εθνικές και περιφερειακές κυβερνήσεις σε όλους τους τομείς της αλυσίδας τροφίμων «από το αγρόκτημα στο τραπέζι» [70]. Έχει αποδειχθεί ότι το επίπεδο κινδύνου έχει αντίστροφη σχέση με την αποτελεσματικότητα των παραπάνω μέτρων ελέγχου. Αυτοί οι έλεγχοι θα μπορούσαν να διευκολυνθούν καλύτερα στο πλαίσιο ενός καλά οργανωμένου και αποτελεσματικά λειτουργικού Εθνικού Συστήματος Ασφάλειας Τροφίμων.

Αν και οι Εθνικές Αρχές Ασφάλειας Τροφίμων έχουν συσταθεί σε διαφορετικό βαθμό μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, εντούτοις οι αλλαγές αυτές θεωρούνται επωφελείς για την καλύτερη οργάνωση του Εθνικού Συστήματος Ασφάλειας Τροφίμων, καθώς η πλειοψηφία των χωρών έχει χρησιμοποιήσει τεχνικές διαχείρισης κατά την ανάπτυξη και εφαρμογή των προγραμμάτων ελέγχου των τροφίμων [71]. Τα διάφορα στοιχεία μίας Εθνικής Αρχής Ασφάλειας Τροφίμων μπορεί επίσης να πάσχουν από ορισμένους περιορισμούς- ωστόσο, η αναθεωρημένη Εθνική Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων αρκετών χωρών της ΕΕ μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική, παρά ορισμένες ατυχίες, λόγω της προτεραιότητας που δίνεται στα προγράμματα ελέγχου τροφίμων που βασίζονται σε

ολοκληρωμένη ανάλυση κινδύνου [72]. Η βιβλιογραφία υποστηρίζει την υπόθεση ότι ο διαχωρισμός της εκτίμησης και της επικοινωνίας κινδύνου από τη διαχείριση κινδύνου συμβάλλει θετικά στη βελτίωση της λειτουργικότητας και της αποτελεσματικότητας του Εθνικού Συστήματος Ασφάλειας Τροφίμων. Ο κύριος λόγος είναι ότι οι προσπάθειες αυτές παρέχουν μία καίρια ασπίδα προστασίας έναντι των οικονομικών και πολιτικών επιρροών.

Τα Εθνικά Συστήματα Ασφάλειας Τροφίμων αποτελούν μία ομάδα παραγόντων οργανωμένων και διατεταγμένων με τέτοιο τρόπο, ώστε να μπορούν να δράσουν ως σύνολο για την προστασία της υγείας των καταναλωτών. Τα Εθνικά Συστήματα Ασφάλειας Τροφίμων είναι επίσης απαραίτητα για την προστασία των καταναλωτών από δόλιες πρακτικές, διαφυλάσσοντας έτσι τα οικονομικά τους δικαιώματα. Σε γενικές γραμμές, ένα αποτελεσματικό Εθνικό Σύστημα Ασφάλειας Τροφίμων βοηθά την οικονομική ανάπτυξη κάθε χώρας, διατηρώντας την εμπιστοσύνη των καταναλωτών στη βιομηχανία τροφίμων και στους εθνικούς ελέγχους τροφίμων και διασφαλίζοντας το δίκαιο εμπόριο τροφίμων σε εθνικό και διεθνές επίπεδο [67]. Συνεπώς, τα Εθνικά Συστήματα Ασφάλειας Τροφίμων είναι απαραίτητα σε κάθε χώρα, διότι είναι πιθανό να συμβάλουν στην αύξηση της ποιότητας των τροφίμων και στον έλεγχο της νοθείας, της μόλυνσης και του κινδύνου τροφιμογενών ασθενειών. Τα Εθνικά Συστήματα Ασφάλειας Τροφίμων περιλαμβάνουν τη συμμετοχή διαφόρων φορέων για την επίτευξη της προστασίας των καταναλωτών και του δίκαιου εμπορίου. Είναι δύσκολο να επισημανθεί ένα μόνο επιτυχημένο μοντέλο που θα μπορούσε να αναπαραχθεί από άλλες χώρες [73]. Ωστόσο, η δημιουργία ενός ενιαίου οργανισμού για την ασφάλεια των τροφίμων ή ενός παρόμοιου οργανισμού σε εθνικό επίπεδο από την πλειονότητα των κρατών μελών της ΕΕ, προκειμένου να διευκολυνθεί η αλληλεπίδραση, η συνεργασία και η εποπτεία μεταξύ των διαφόρων φορέων που εμπλέκονται στον έλεγχο των τροφίμων, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα χρήσιμο σύγχρονο μοντέλο [67]. Επιπλέον, οι κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με τα παραπάνω που έχουν εκδοθεί από τον WHO [73] μπορούν να προσαρμοστούν, ώστε να ανταποκρίνονται στις ιδιαίτερες ανάγκες των χωρών.

Κεφάλαιο 2ο: Μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων

Είναι απαραίτητο να εξετάζονται τα τρόφιμα ως προς την παρουσία τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών, προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφαλής προμήθεια τροφίμων και να ελαχιστοποιηθεί η εμφάνιση τροφιμογενών ασθενειών. Οι συμβατικές μέθοδοι για την ανίχνευση των τροφιμογενών βακτηριακών παθογόνων μικροοργανισμών που υπάρχουν στα τρόφιμα βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε πλάκες άγαρ, ακολουθούμενη από τυποποιημένες βιοχημικές ταυτοποιήσεις [74]. Οι συμβατικές μέθοδοι είναι συνήθως φθηνές και απλές, αλλά οι μέθοδοι αυτές μπορεί να είναι χρονοβόρες, καθώς εξαρτώνται από την ικανότητα των μικροοργανισμών να αναπτύσσονται σε διάφορα μέσα καλλιέργειας, όπως μέσα προεμπλουτισμού, εκλεκτικά μέσα εμπλουτισμού και εκλεκτικά μέσα επιμετάλλωσης. Συνήθως οι συμβατικές μέθοδοι απαιτούν 2 έως 3 ημέρες για την προκαταρκτική ταυτοποίηση και πάνω από μία εβδομάδα για την επιβεβαίωση του είδους των παθογόνων μικροοργανισμών [75]. Οι συμβατικές μέθοδοι είναι δαπανηρές, τόσο χρονικά όσο και οικονομικά, καθώς απαιτούν την προετοιμασία των μέσων καλλιέργειας, τον εμβολιασμό των πλακών και την καταμέτρηση των αποικιών [74]. Επιπλέον, οι συμβατικές μέθοδοι μπορεί να περιορίζονται από τη χαμηλή ευαισθησία τους [76]. Μπορεί να προκύψουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα λόγω βιώσιμων αλλά μη καλλιεργήσιμων (viable but non-culturable, VBNC) παθογόνων. Η αποτυχία ανίχνευσης τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών θα αυξήσει τον κίνδυνο μετάδοσης των παθογόνων μικροοργανισμών.

Πρόσφατα, έχουν αναπτυχθεί διάφορες ταχείες μέθοδοι με υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί των συμβατικών μεθόδων για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, οι ερευνητές εξακολουθούν να αναπτύσσουν νέες μεθόδους με βελτιώσεις όσον αφορά στην ταχύτητα, την ευαισθησία, την εξειδίκευση και την καταλληλότητα για ανάλυση *in situ* και διάκριση του βιώσιμου κυττάρου [75]. Οι μέθοδοι ταχείας ανίχνευσης είναι σημαντικές, ιδίως στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς είναι σε θέση να ανιχνεύσουν άμεσα την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών σε ωμά και επεξεργασμένα τρόφιμα. Οι ταχείες μέθοδοι είναι επίσης αρκετά ευαίσθητες για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών που υπάρχουν σε χαμηλούς αριθμούς στα τρόφιμα. Η ευαισθησία είναι σημαντική, επειδή ένα μόνο παθογόνο που υπάρχει στα τρόφιμα έχει κίνδυνο να προκαλέσει μόλυνση. Οι ταχείες μέθοδοι είναι πιο αποδοτικές ως προς τον χρόνο,

εξοικονομούν εργασία και είναι σε θέση να μειώσουν τα ανθρώπινα λάθη [74]. Ωστόσο, κάθε μία από τις ταχείες μεθόδους έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και περιορισμούς. Γενικά, οι μέθοδοι ταχείας ανίχνευσης κατηγοριοποιούνται σε μεθόδους που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα, σε μεθόδους που βασίζονται σε βιοαισθητήρες και σε ανοσολογικές μεθόδους [75].

2.1. Μέθοδοι βασισμένες στην καλλιέργεια

Οι μέθοδοι που βασίζονται στην καλλιέργεια είναι οι παλαιότερες μέθοδοι ανίχνευσης των μικροοργανισμών, ακόμη και των παθογόνων στελεχών. Η μέθοδος αυτή δίνει ένα επιβεβαιωμένο αποτέλεσμα όσον αφορά στην παρουσία ενός συγκεκριμένου παθογόνου. Το ποσοστό επιτυχίας διαπιστώνεται ότι είναι υψηλό και οι μέθοδοι αυτές είναι οικονομικά αποδοτικές. Ωστόσο, το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου που βασίζεται στην καλλιέργεια είναι η αργή ανάπτυξη, λόγω της οποίας απαιτείται υπερβολικός χρόνος για να ληφθεί το τελικό αποτέλεσμα, το οποίο μπορεί να αποβεί μοιραίο. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλα αυτά τα μέσα χρειάζονται έως και 18-24 h για να δώσουν το ακριβές αποτέλεσμα, γεγονός που υποδηλώνει τον αργό χρόνο διεκπεραίωσης. Ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα, το οποίο παρουσιάζει υψηλό ποσοστό επιτυχίας και δείχνει επίσης ότι η μέθοδος είναι ιδιαίτερα αποδοτική, είναι η καλλιέργεια *E. coli* O157:H7 σε Sorbitol MacConkey agar (SMAC), η οποία βασίζεται στην αρχή της ζύμωσης της σορβιτόλης. Ωστόσο, ο σημαντικότερος περιορισμός αυτής της μεθόδου είναι ο αργός χρόνος διεκπεραίωσης και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω των αναδυόμενων ορότυπων μη O157 και O157 STEC που ζυμώνουν τη σορβιτόλη [77].

Τα μειονεκτήματα του άγαρ SMAC μπορούν να ξεπεραστούν με τη χρήση χρωμογόνου μέσου για την απομόνωση STEC, το οποίο έχει αυξημένη εξειδίκευση και ευαισθησία. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα είναι η ευκολότερη διάκριση με βάση το χρώμα. Λόγω της χρήσης της χρωμογόνου ουσίας, το μέσο είναι περισσότερο γνωστό ως CHROMagar [78]. Αν και είναι συγκριτικά αποτελεσματικότερο από το SMAC, ένα αξιοσημείωτο μειονέκτημα είναι ότι το CHROMagar δεν είναι ευαίσθητο σε όλα τα στελέχη. Αυτό φάνηκε σε ένα από τα πειράματα όπου μόνο το ένα πέμπτο των διαρροιογόνων στελεχών ανιχνεύθηκε σε σύγκριση με το SMAC [77].

Το άγαρ κεφσουλοδίνης-ιργκαζάνης-νοβοβιοκίνης (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin, CIN), ένα εκλεκτικό μέσο γνωστό για την καλύτερη διάκριση μεταξύ των βακτηριακών ειδών,

χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση της *Yersinia enterocolitica* και της μη *Y. enterocolitica* [79]. Το χρωμογόνο μέσο *Y. enterocolitica* χρησιμοποιείται όπου το άγαρ περιέχει ζυμώσιμο σάκχαρο σελοβιόζη, χρωμογόνο υπόστρωμα και εκλεκτικό αναστολέα που καταστέλλει τα ανταγωνιστικά βακτήρια. Αυτό υποδεικνύει ότι οι μωβ/μπλε αποικίες που σχηματίζονται στο άγαρ CIN είναι από *Y. enterocolitica* και *Y. pseudotuberculosis* που είναι σημαντικά παθογόνα τροφίμων που προκαλούν υερσίνωση. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του μολυσμένου τόφου [80].

Πολλοί μικροοργανισμοί τείνουν να εισέρχονται σε κατάσταση λιμοκτονίας του μεταβολισμού υπό συνθήκες στρες. Ωστόσο, θα παραμείνουν βιώσιμοι αλλά μη καλλιεργήσιμοι, οι οποίοι δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε συμβατικά μέσα καλλιέργειας (conventional culture, CC), αλλά μπορούν να σηματοδοτήσουν ιογενή μονοπάτια [81]. Η ανίχνευση αυτών των παθογόνων μικροοργανισμών αποτελεί μείζονα πρόκληση για την ασφάλεια των τροφίμων [82]. Δεδομένου ότι δεν θα σχηματιστούν αποικίες, χρησιμοποιούνται άλλες μέθοδοι, όπως οι φθορίζουσες χρωστικές, για την ανίχνευση των βιώσιμων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηριών, όπου χρησιμοποιούνται διαφορετικές χρωστικές. Η δέσμευση του πορτοκαλί ακριδίνης στα παθογόνα που είναι βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα εξαρτάται από την αναλογία DNA προς πρωτεΐνη στα κύτταρα. Τα κύτταρα που αναπαράγονται ενεργά εμφανίζονται πράσινα, ενώ τα κύτταρα που αναπτύσσονται αργά ή δεν αναπαράγονται εμφανίζονται πορτοκαλί. Μία άλλη χρωστική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των βιώσιμων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηριών είναι η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη, η αρχή της οποίας είναι η ανίχνευση της ενζυμικής δραστηριότητας ζωντανών κυττάρων. Εάν υπάρχει παρουσία ζωντανών κυττάρων, εμφανίζεται ιώδες ή μπλε χρώμα. Το πόσιμο νερό, το παστεριωμένο γάλα και τα επεξεργασμένα τρόφιμα είναι ευάλωτα στα παθογόνα που είναι βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα. Ορισμένα από τα τροφιμογενή παθογόνα που εμπίπτουν στην κατηγορία βιώσιμων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηριών περιλαμβάνουν τα *C. jejuni*, *E. aerogenes*, *E. faecalis*, *E. coli* (συμπεριλαμβανομένου του EHEC), *Pseudomonas aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *S. dysenteriae*, *S. sonnei* και *V. cholerae*.

Τα μόρια δέσμευσης υψηλής συγγένειας που προέρχονται από βακτηριοφάγους (τομείς δέσμευσης κυτταρικού τοιχώματος, cell wall binding domains-CBDs) έχουν πρόσφατα εισαχθεί ως εργαλεία για την ανίχνευση και τη διαφοροποίηση της *Listeria* στα τρόφιμα, καθώς οι συμβατικές μέθοδοι καλλιέργειας παρεμποδίζονται από τα χρονοβόρα στάδια εμπλουτισμού και επώασης. Αυτό σε συνδυασμό με τον μαγνητικό διαχωρισμό αυξάνει την

ευαισθησία και την ταχύτητα στην ανίχνευση και θα είναι πιο δαπανηρές σε σύγκριση με τις συνήθεις διαγνωστικές μεθόδους [83].

2.2. Μέθοδοι με βάση τα νουκλεϊκά οξέα

Οι μέθοδοι που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα λειτουργούν με την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA ή RNA στο παθογόνο-στόχο. Αυτό γίνεται με υβριδισμό της αλληλουχίας νουκλεϊνικού οξέος-στόχου με ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο (ανιχνευτές ή εκκινητές) το οποίο είναι συμπληρωματικό προς την αλληλουχία-στόχο [75]. Υπάρχουν πολλά βακτηριακά παθογόνα, όπως *Clostridium botulinum*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli* O157, τα οποία παράγουν τοξίνες που προκαλούν τροφιμογενείς ασθένειες [84]. Τα γονίδια που σχετίζονται με τις τοξίνες σε αυτά τα παθογόνα μπορούν να ανιχνευθούν με μεθόδους που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα [75]. Επιπλέον, παθογόνα που παρουσιάζουν διφορούμενα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως τα αρνητικά σε ιππουρικό οξύ στελέχη *Campylobacter jejuni*, μπορούν να ταυτοποιηθούν και να επιβεβαιωθούν με μεθόδους που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα [85]. Οι μέθοδοι που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα ανιχνεύουν τα συγκεκριμένα γονίδια στα παθογόνα-στόχους, αποτρέποντας έτσι διφορούμενα ή λανθασμένα αποτελέσματα. Οι πρόσφατες μέθοδοι με βάση τα νουκλεϊκά οξέα που περιγράφονται είναι η απλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πολλαπλών εκκινητών (multiplex polymerase chain reaction, mPCR), η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο/ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative polymerase chain reaction, qPCR), η ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA), η ισοθερμική ενίσχυση με τη βοήθεια βρόχου (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) και η τεχνολογία μικροσυστοιχιών.

2.2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους μοριακής βάσης για την ανίχνευση βακτηριακών παθογόνων που μεταδίδονται με τρόφιμα είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η PCR εφευρέθηκε πριν από περίπου 30 χρόνια και επιτρέπει την ανίχνευση ενός μόνο βακτηριακού παθογόνου που υπάρχει στα τρόφιμα με την

ανίχνευση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA-στόχου [86]. Η PCR λειτουργεί με την ενίσχυση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA-στόχου σε μία κυκλική διαδικασία τριών βημάτων [74]. Πρώτον, το δίκλωνο DNA-στόχος μετουσιώνεται σε μονόκλωνο DNA σε υψηλή θερμοκρασία. Στη συνέχεια, δύο μονόκλιωνα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια ή ειδικοί εκκινητές που είναι ο εμπρόσθιος και ο ανάστροφος εκκινητής συνδέονται με τις αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί η διαδικασία πολυμερισμού κατά την οποία οι συμπληρωματικοί προς το μονόκλωνο DNA εκκινητές επεκτείνονται με την παρουσία δεοξυριβονουκλεοτιδίων και μίας θερμοσταθούς DNA πολυμεράσης. Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR απεικονίζονται σε πηκτή ηλεκτροφόρησης ως ζώνες με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο [75]. Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι απεικόνισης των προϊόντων PCR: (1) χρώση του ενισχυμένου προϊόντος DNA με μία χημική χρωστική όπως το βρωμιούχο αιθίδιο, η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο αλυσίδων του duplex ή (2) επισήμανση των εκκινητών PCR ή των νουκλεοτιδίων με φθορίζουσες χρωστικές (φθοριοφόρες) πριν από την ενίσχυση της PCR. Η τελευταία μέθοδος επιτρέπει την άμεση ενσωμάτωση των ετικετών στο προϊόν της PCR. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανάλυση του προϊόντος PCR είναι η χρήση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης, η οποία διαχωρίζει τα προϊόντα DNA με βάση το μέγεθος και το φορτίο. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης είναι η ευκολότερη μέθοδος απεικόνισης και ανάλυσης του προϊόντος PCR. Επιτρέπει τον προσδιορισμό της παρουσίας και του μεγέθους του προϊόντος PCR. Ένα προκαθορισμένο σύνολο προϊόντων DNA με γνωστά μεγέθη εκτελείται ταυτόχρονα στο πηκτή ως τυποποιημένοι μοριακοί δείκτες που βοηθούν στον προσδιορισμό του μεγέθους του προϊόντος [87]. Η PCR έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πολυάριθμων τροφιμογενών παθογόνων όπως *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. και *Shigella* spp. [88].

Υπάρχουν πολλαπλά πλεονεκτήματα της PCR. Πρώτον, είναι μία απλή τεχνική στην κατανόηση και τη χρήση και παράγει γρήγορα αποτελέσματα. Είναι μία εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική με δυνατότητα παραγωγής εκατομμυρίων έως δισεκατομμυρίων αντιγράφων ενός συγκεκριμένου προϊόντος για αλληλουχία, κλωνοποίηση και ανάλυση. Αυτό ισχύει και για την qRT-PCR, αλλά η qRT-PCR έχει το πλεονέκτημα της ποσοτικοποίησης του συνθετικού προϊόντος. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση μεταβολών των επιπέδων έκφρασης γονιδίων σε όγκους, μικρόβια ή άλλες καταστάσεις ασθενειών. Αν και η PCR είναι μια πολύτιμη τεχνική, έχει περιορισμούς.

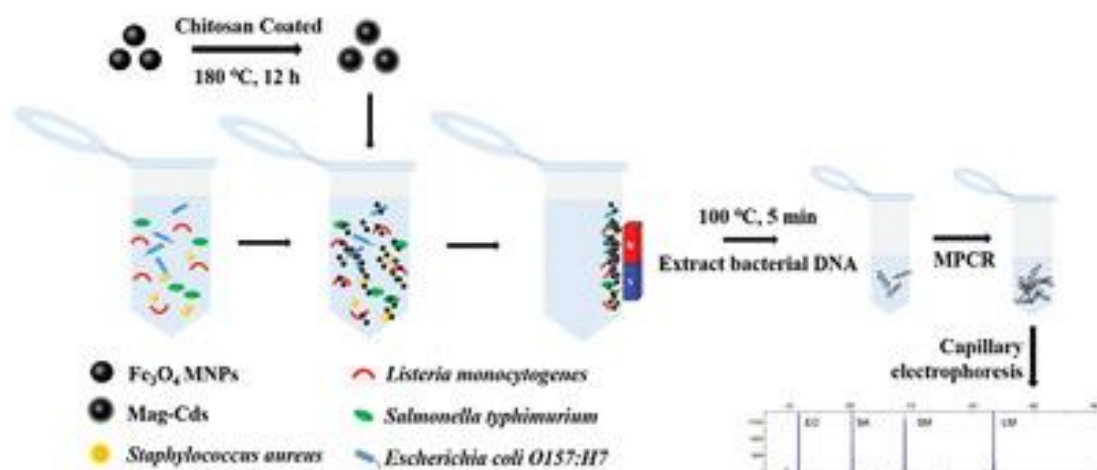
Επειδή η PCR είναι μία εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική, οποιαδήποτε μορφή μόλυνσης του δείγματος ακόμη και από ίχνη DNA μπορεί να οδηγήσει σε παραπλανητικά αποτελέσματα [89]. Επιπλέον, προκειμένου να σχεδιαστούν εκκινητές για την PCR, απαιτούνται κάποια προηγούμενα δεδομένα αλληλουχίας. Ως εκ τούτου, η PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για τον προσδιορισμό της παρουσίας ή της απουσίας ενός γνωστού παθογόνου ή γονιδίου. Ένας άλλος περιορισμός είναι ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την PCR μπορούν να συνδεθούν μη ειδικά σε αλληλουχίες που είναι παρόμοιες, αλλά όχι εντελώς ταυτόσημες με το DNA-στόχο. Επιπλέον, λανθασμένα νουκλεοτίδια μπορούν να ενσωματωθούν στην αλληλουχία PCR από την πολυμεράση DNA, αν και με πολύ χαμηλό ρυθμό.

2.2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πολλαπλών εκκινητών (mPCR)

Η mPCR προσφέρει ταχύτερη ανίχνευση σε σύγκριση με την απλή PCR μέσω της ταυτόχρονης ενίσχυσης πολλαπλών γονιδιακών στόχων. Η βασική αρχή της mPCR είναι παρόμοια με τη συμβατική PCR. Ωστόσο, στη ανάλυση mPCR χρησιμοποιούνται διάφορα σύνολα ειδικών εκκινητών, ενώ στη συμβατική δοκιμασία PCR χρησιμοποιείται μόνο ένα σύνολο ειδικών εκκινητών. Ο σχεδιασμός των εκκινητών είναι πολύ σημαντικός για την ανάπτυξη της mPCR, καθώς τα σύνολα εκκινητών πρέπει να έχουν παρόμοια θερμοκρασία ανόπτησης προκειμένου να παραχθεί μία επιτυχής ανάλυση mPCR [75]. Εκτός αυτού, η συγκέντρωση των εκκινητών είναι επίσης σημαντική στην mPCR. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να εμφανιστεί αλληλεπίδραση μεταξύ των πολλαπλών σετ εκκινητών στην mPCR, η οποία οδηγεί σε διμερή των εκκινητών, επομένως, η συγκέντρωση των εκκινητών μπορεί να χρειαστεί να προσαρμοστεί για να εξασφαλιστεί η παραγωγή αξιόπιστων προϊόντων PCR [75]. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες για μία επιτυχημένη δοκιμή mPCR περιλαμβάνουν τις συγκεντρώσεις των ρυθμιστικών διαλυμάτων PCR, την ισορροπία μεταξύ των συγκεντρώσεων χλωριούχου μαγνησίου και δεοξυνουκλεοτιδίων, τις ποσότητες του προτύπου DNA, τις θερμοκρασίες κύκλου και την Taq DNA πολυμεράση [90].

Προηγουμένως, η mPCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση περίπου δύο έως τριών παθογόνων μόνο. Τώρα, η mPCR είναι πιο προηγμένη και μπορεί να ανιχνεύσει έως και πέντε ή περισσότερα παθογόνα ταυτόχρονα. Οι Chen και οι συνεργάτες του είχαν πραγματοποιήσει mPCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση της *Salmonella Enteritidis*, του

Staphylococcus aureus, της *Shigella flexneri*, της *Listeria monocytogenes* και της *Escherichia coli O157:H7* χρησιμοποιώντας πέντε ζεύγη εκκινητών που στόχευαν την πρωτεΐνη εισβολής (invasion protein, *invA*), το 16S rDNA, το πλασμιδιακό αντιγόνο εισβολής H (invasion plasmid antigen H, *ipaH*), τη λιστεριολυσίνη O (listeriolysin O, *hlyA*) και το γονίδιο *intimin* (*eaeA*), αντίστοιχα [91]. Οι Ryu et al είχαν αναπτύξει μία νέα δοκιμή mPCR η οποία είναι σε θέση να ανιχνεύει και να διακρίνει έξι είδη *Listeria* ταυτόχρονα σε ένα σωληνάριο με υψηλή ακρίβεια [92]. Τα είδη *Listeria* που ταυτοποιήθηκαν με επιτυχία είναι τα εξής: *Listeria monocytogenes*, *Listeria grayi*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* και *Listeria seeligeri*. Το όριο ανίχνευσης της mPCR ήταν $7,58 \times 10^4$ αντίγραφα για το μικτό γονιδιωματικό DNA.



Εικόνα 1 Ανίχνευση τεσσάρων τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών με βάση πολλαπλή PCR μαγνητικού διαχωρισμού και τριχοειδή ηλεκτροφόρηση <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biot.202100335>

Περαιτέρω βελτιώσεις της mPCR περιλαμβάνουν την ανάπτυξη μίας νέας GeXP-PCR από τους Zhou και συνεργάτες για την ταυτόχρονη ανίχνευση έξι τροφιμογενών βακτηριακών παθογόνων: *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli O157:H7*, *Shigella spp.* και *Campylobacter jejuni* [88]. Το σύστημα γενετικής ανάλυσης GenomeLab Gene Expression Profiler (GeXP) επιτρέπει την υψηλή απόδοση και την ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων μικροοργανισμών σε μία μόνο αντίδραση. Η αναλυτική διαδικασία περιλαμβάνει σχεδιασμό εκκινητών, ενίσχυση PCR και τριχοειδή ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των προϊόντων PCR αντί για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο πολλαπλασιασμός PCR GeXP περιλαμβάνει τη

χρήση χιμαιρικών (chimeric) εκκινητών, καθολικών εκκινητών και τριχοειδούς ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού των προϊόντων PCR αντί ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης. Οι χιμαιρικοί εκκινητές περιέχουν μια ειδική για το γονίδιο αλληλουχία με μια καθολική ετικέτα στο 5' άκρο και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αμπλικονίων με καθολικές ετικέτες. Στη συνέχεια, οι καθολικοί εκκινητές που περιέχουν την ίδια αλληλουχία με τις καθολικές ετικέτες που χρησιμοποιούνται στους χιμαιρικούς εκκινητές θα οδηγήσουν τις υπόλοιπες αντιδράσεις PCR. Ο εμπρόσθιος καθολικός εκκινητής είναι ομοιοπολικά επισημασμένος με φθορίζουσα χρωστική στο 5' άκρο και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κατά την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση [88]. Αυτή η μέθοδος βρέθηκε ότι είναι πιο ευαίσθητη και κατάλληλη για ανάλυση υψηλής απόδοσης. Το όριο ανίχνευσης της GeXP-PCR για *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli O157:H7*, *Shigella spp.* και *Campylobacter jejuni* ήταν 420, 310, 270, 93, 85 και 66 CFU/mL αντίστοιχα.

2.2.3. PCR πραγματικού χρόνου ή ποσοτική PCR (qPCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου ή ποσοτική PCR διαφέρει από την απλή PCR, καθώς δεν απαιτεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης για την ανίχνευση των προϊόντων PCR. Η μέθοδος αυτή είναι σε θέση να παρακολουθεί συνεχώς τον σχηματισμό των προϊόντων PCR σε ολόκληρη την αντίδραση μετρώντας το φθορίζον σήμα που παράγεται από ειδικούς διπλά επισημασμένους ανιχνευτές ή χρωστικές παρεμβολής. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας των αμπλικονίων PCR [93].

Έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα φθορισμού για qPCR και τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συστήματα φθορισμού περιλαμβάνουν το SYBR green, τους ανιχνευτές TaqMan και τους μοριακούς φάρους. Το SYBR green είναι μία φθορίζουσα χρωστική που δεσμεύει δίκλωνο DNA (double-stranded, dsDNA). Αυτή η μη αλληλουχοειδής χρωστική παρεμβολής εκπέμπει λίγο φθορισμό και το σήμα φθορισμού ενισχύεται όταν δεσμεύεται στη δευτερεύουσα αύλακα της διπλής έλικας του DNA [94].

Οι ανιχνευτές TaqMan και οι μοριακοί φάροι είναι οι συνήθεις εναλλακτικές λύσεις του SYBR green. Οι ανιχνευτές TaqMan, γνωστοί και ως ανιχνευτές διπλής χρωστικής, είναι ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν ένα φθοριοφόρο ως χρωστική αναφοράς στο 5'-άκρο και τη χρωστική σβέσης στο 3'-άκρο. Η χρωστική αναφοράς και η χρωστική απόσβεσης βρίσκονται κοντά η μία στην άλλη και αυτό εμποδίζει τον εκπεμπόμενο φθορισμό της

χρωστικής αναφοράς [95]. Ο ανιχνευτής TaqMan είναι συμπληρωματικός προς μία συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία σε έναν από τους κλώνους του αμφικλίνου εσωτερικά και των δύο εκκινητών και το σύστημα εξαρτάται από τη δραστικότητα της 5'-3' εξωνουκλεάσης της Taq DNA πολυμεράσης που διασπά τον ανιχνευτή και διαχωρίζει τις δύο χρωστικές προκειμένου να παραχθεί το φθοριοφόρο σήμα [96].

Οι μοριακοί φάροι είναι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές με διαμόρφωση φουρκέτας/στελέχους και βρόχου, όπου η αλληλουχία που είναι συμπληρωματική προς μια αλληλουχία-στόχο υπάρχει στο τμήμα του βρόχου και το στέλεχος παράγεται από την ανόπτηση δύο συμπληρωματικών αλληλουχιών βραχιόνων. Στο ένα άκρο του ανιχνευτή συνδέεται μία χρωστική αναφοράς και στο άλλο άκρο συνδέεται μία χρωστική σβέσης. Και οι δύο χρωστικές βρίσκονται σε κοντινή απόσταση η οποία διατηρείται από το υβριδικό στέλεχος, επομένως δεν παράγεται φθορισμός [96]. Ο μοριακός φάρος παράγει σήμα φθορισμού κατά τον υβριδισμό του ανιχνευτή με τη συμπληρωματική του νουκλεοτιδική αλληλουχία στο αμπλικόνιο. Κατά τη διάρκεια του υβριδισμού, ο ανιχνευτής υφίσταται αυθόρμητη αλλαγή διαμόρφωσης που διαχωρίζει τις δύο χρωστικές και αυτό επιτρέπει την εμφάνιση φθορισμού [97].

Η ανίχνευση της *Salmonella* σε φρεσκοκομμένα φρούτα και λαχανικά με qPCR με μοριακό φάρο που στοχεύει στο γονίδιο που σχετίζεται με την εισβολή (invasion associated gene, iagA) αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Liming και Bhagwat 2004 [97]. Το όριο ανίχνευσης ήταν περίπου 4 CFU/25 g προϊόντος μετά από εμπλουτισμό. Οι Tyagi και συνεργάτες 2009 ανέπτυξαν μία ευαίσθητη και εξαιρετικά αναπαραγωγίμη ανάλυση qPCR SYBR green για την ανίχνευση του παθογόνου tdh-θετικού *Vibrio parahaemolyticus* σε τροπικά οστρακοειδή [98]. Το όριο ανίχνευσης ήταν 102 CFU/mL για ομογενοποιημένα ομοιογενή γαρίδας που εμπλουτίστηκαν με καθαρή καλλιέργεια. Άλλες πρόοδοι στην qPCR περιλαμβάνουν την ανάπτυξη του TaqMan και του SYBR Green qPCR για τον εντοπισμό και την ποσοτική ανίχνευση στελεχών *Staphylococcus aureus* που φέρουν το γονιδιακό σύμπλεγμα εντεροτοξινών (enterotoxin gene cluster, egc) στο νωπό γάλα. Περίπου 1×10^3 CFU/mL *Staphylococcus aureus* ανιχνεύθηκε με την SYBR green qPCR ενώ 1×10^4 CFU/mL *Staphylococcus aureus* ανιχνεύθηκε με το TaqMan qPCR στο νωπό γάλα [99].

Επιπλέον, έχει αναπτυχθεί ανάλυση πολλαπλών qPCR για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλαπλών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Οι

Fratamico και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν μελέτη για την ανίχνευση των οροομάδων O26, O45, O103, O111, O121 και O145 της *Escherichia coli* που παράγουν τοξίνη Shiga σε μοσχαρίσιο κιμά χρησιμοποιώντας πολλαπλή qPCR με εκκινητές που στοχεύουν στις τοξίνες Shiga (stx1 και stx2), στα γονίδια intimin (eae) και wzx [100]. Χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές Taqman με διαφορετικούς συνδυασμούς φθοριοφόρων για την ανίχνευση του προϊόντος της πολλαπλής qPCR με όριο ανίχνευσης περίπου 50 CFU ανά PCR. Επιπλέον, αναπτύχθηκε από τους Kim και τους συνεργάτες του μία ταυτόχρονη ανίχνευση των *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* και *Vibrio vulnificus* με πολλαπλή qPCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν τα γονίδια vnrA, zot και vnuA αντίστοιχα [101]. Τα προϊόντα της πολλαπλής qPCR ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση SYBR green. Οι Hu και συνεργάτες διεξήγαγαν μελέτη για την ανίχνευση οκτώ τροφιμογενών βακτηριακών παθογόνων που περιλαμβάνουν *Salmonella enterica subsp. enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Campylobacter jejuni*, *Enterobacter sakazakii* και *Shigella spp.* με τη χρήση πολλαπλών qPCR με μοριακό φάρο που στοχεύει τα γονίδια ssaR, hlyA, rfbE, toxR, vnh, gyrA, 16SrRNA και ipaH αντίστοιχα [102]. Τα όρια ανίχνευσης της ανάλυσης κυμάνθηκαν από $1,3 \times 10^3$ - $1,6 \times 10^4$ CFU/g δείγματος κοπράνων.

Μεταξύ των συστημάτων φθορισμού που συζητήθηκαν για qPCR, το SYBR green είναι απλό και λιγότερο δαπανηρό σε σύγκριση με τους ανιχνευτές TaqMan ή τους μοριακούς φάρους [103]. Εκτός αυτού, το πλεονέκτημα της χρήσης του SYBR green είναι ότι η καμπύλη τήξης του DNA μπορεί να δημιουργηθεί μετά την PCR μαζί με τον υπολογισμό της τιμής T_m των ενισχυμένων προϊόντων. Αυτό απαιτείται προκειμένου να διαφοροποιηθούν τα προϊόντα-στόχοι από τον σχηματισμό διμερών εκκινητών. Τα προϊόντα διμερών εκκινητών έχουν χαμηλότερες τιμές T_m σε σύγκριση με τα αμπλικόνια [95]. Το SYBR green δεν έχει εξειδίκευση και δεσμεύεται σε όλα τα δίκλιωνα DNA, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση οποιουδήποτε προϊόντος PCR [104]. Ωστόσο, η χρωστική SYBR green δεσμεύεται σε άλλα μη ειδικά προϊόντα της αντίδρασης, τα οποία περιλαμβάνουν διμερή εκκινητών [104]. Όσον αφορά τους ανιχνευτές TaqMan και τους μοριακούς φάρους, είναι ανιχνευτές ειδικοί για την αλληλουχία και δεσμεύονται μόνο στην αλληλουχία-στόχο τους, επομένως δεν θα ανιχνευθούν διμερή εκκινητών [95]. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η qPCR με βάση το TaqMan είναι πιο ευαίσθητη σε σύγκριση με την qPCR με βάση το SYBR green ή

τους μοριακούς φάρους [105]. Ωστόσο, η ευαισθησία της μεθόδου με βάση την PCR επηρεάζεται κυρίως από την εξειδίκευση του εκκινητή, την αλληλουχία του εκκινητή και τη θερμοκρασία ανόπτησης, παρά από την επιλογή του ανιχνευτή ανίχνευσης [105]. Συνολικά, η qPCR είναι πιο ευαίσθητη από τη συμβατική PCR και ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης [93].

Η συμβατική PCR και η πολλαπλή PCR που απαιτούν ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης για την ανίχνευση των προϊόντων PCR είναι δαπανηρές και χρονοβόρες, επομένως δεν είναι κατάλληλες για ανάλυση υψηλής απόδοσης και είναι δύσκολο να αυτοματοποιηθούν [88]. Όσον αφορά την qPCR, δεν απαιτείται επεξεργασία μετά την PCR. Αυτό επιτρέπει χαμηλό κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης, ανάλυση υψηλής απόδοσης και αυτοματοποίηση [106]. Τα πλεονεκτήματα της qPCR οδήγησαν στην ανάπτυξη διαφόρων εμπορικών kit qPCR για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων όπως η *Salmonella*, η *Listeria monocytogenes*, η *Escherichia coli* O157:H7 και το *Campylobacter* [107].

Τα παραδείγματα των εμπορικών kit qPCR για την ανίχνευση της *Salmonella* περιλαμβάνουν το *Salmonella* BAX™ PCR (DuPont Qualicon), το AnDiaTec® *Salmonella* real time PCR Kit (AnDia Tec), το Probelia™ *Salmonella* sp. (Sanofi Diagnostics Pasteur) και το TaqMan™ *Salmonella* detection kit (PE Applied Biosystems) [108]. Οι Kimura και συνεργάτες αξιολόγησαν το kit ανίχνευσης TaqMan™ *Salmonella* για την ανίχνευση σαλμονέλας σε γαρίδες και κρέας [109]. Το όριο ανίχνευσης ήταν 120 CFU/mL σε καθαρή καλλιέργεια. Οι Wan και οι συνεργάτες του αξιολόγησαν τα kit ενίσχυσης και ανίχνευσης PCR Probelia™ *Salmonella* sp. για την ανίχνευση της *Salmonella agona* σε τεχνητά μολυσμένο γάλα σε σκόνη και τυρί ρικότα [110]. Το όριο ανίχνευσης ήταν περίπου 8-79 CFU/mL. Εκτός αυτού, οι Margot και οι συνεργάτες του αξιολόγησαν επτά εμπορικά kit qPCR για την ανίχνευση της *Salmonella*, τα οποία περιλαμβάνουν το BAX® system Q7 real-time PCR (DuPont Qualicon) και άλλα εμπορικά kit qPCR, όπως το ADIAFOOD® *Salmonella* (AES chemunex), το BIOTECON foodproof *Salmonella* Detection Kit (Bioteccon Diagnostics), το BioControl Assurance GDS® TM *Salmonella* (BioControl), το Genedisc® Shiga Toxic E. coli και *Salmonella* spp. (Pall GeneDisc® Technologies), BioRad iQ-Check *Salmonella* 2 (Biorad) και MicroSeq® *Salmonella* spp. Detection Kit (Applied Biosystems) [111].

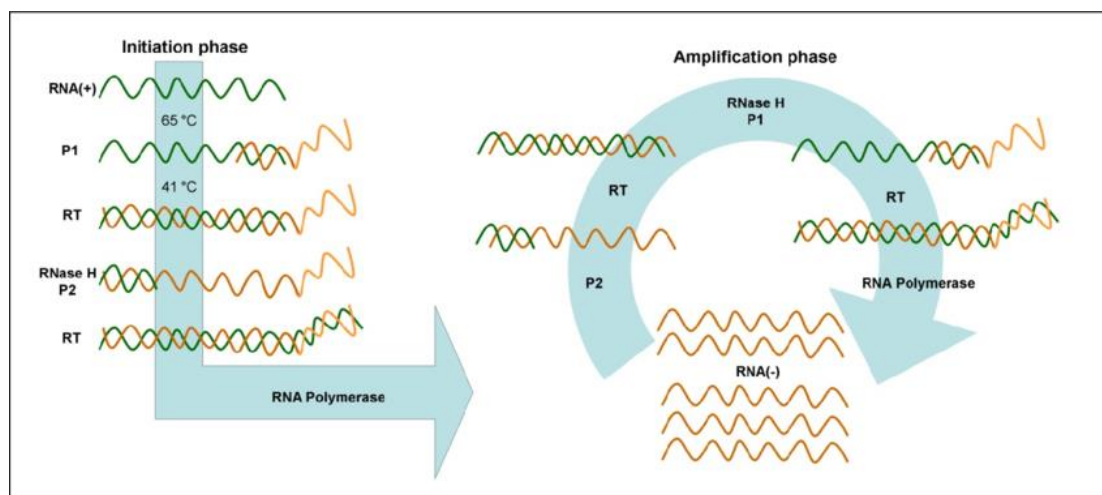
Τα εμπορικά kit qPCR που διατίθενται για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes*

είναι τα BAX® *Listeria monocytogenes* Detection System (DuPont Qualicon), TaqMan® *Listeria monocytogenes* Detection Kit (Applied Biosystems), ADIAFOOD rapid pathogen detection system for *Listeria monocytogenes* (AES Chemunex), Probelia® *Listeria monocytogenes* PCR system (Biorad), LightCycler® *Listeria monocytogenes* Detection Kit (Roche/Biotecon) και GeneVision® Rapid Pathogen Detection System for *Listeria monocytogenes* [112]. Το BAX® *Listeria monocytogenes* Detection System έχει εγκριθεί από το USDA (2012) ως δοκιμή διαλογής για την *L. monocytogenes*. Εκτός αυτού, οι Wan και οι συνεργάτες του διεξήγαγαν μία μελέτη για τη σύγκριση του συστήματος PCR Probelia® *Listeria monocytogenes* και της μεθόδου 11290-1 του Διεθνούς Οργανισμού Τυποποίησης (ISO) για την ανίχνευση της *L. monocytogenes* σε δείγματα σολομού [113]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σύστημα PCR Probelia® *Listeria monocytogenes* είναι εξίσου καλό με τη μέθοδο ISO και το όριο ανίχνευσης ήταν περίπου 20 CFU/mL καλλιέργειας ζωμού για καθαρή καλλιέργεια *L. monocytogenes*.

Υπάρχουν πολλά περισσότερα εμπορικά kit qPCR που διατίθενται για την ανίχνευση άλλων τροφιμογενών βακτηριακών παθογόνων, όπως η *Escherichia coli* και το *Campylobacter*. Για παράδειγμα, *Escherichia coli* O157 BAX® PCR (DuPont Qualicon), ADIAFOOD rapid pathogen detection system for *E. coli* O157 και *E. coli* O157:H7 (AES Chemunex) και ADIAFOOD *Campylobacter* JCL qPCR commercial kit (AES Chemunex) για την ανίχνευση των *C. jejuni*, *C. coli* και *C. lari* [114].

2.2.4. Ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων (NASBA)

Η NASBA αναπτύχθηκε από τον Compton στις αρχές της δεκαετίας του '90 και λειτουργεί ενισχύοντας νουκλεϊκά οξέα υπό ισοθερμικές συνθήκες, σε αντίθεση με την PCR που απαιτεί σύστημα θερμοκυκλώσεων [115]. Η NASBA χρησιμοποιείται συνήθως για την ενίσχυση του RNA, όπου το μονόκλωνο πρότυπο RNA μετατρέπεται σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) από την αντίστροφη μεταγραφάση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η αντίδραση NASBA λαμβάνει χώρα στους 41°C περίπου και περιλαμβάνει δύο ειδικούς εκκινητές και τρία ένζυμα: την αντίστροφη μεταγραφάση του ιού της μυελοβλάστης των πτηνών (avian myeloblastosis virus, AMV), την T7 RNA πολυμεράση και την ριβονουκλεάση H. Τα αμπλικόνια NASBA μπορούν να ανιχνευθούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης [116].



Εικόνα 2 Σχηματική αναπαράσταση της ενίσχυσης με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων (NASBA) https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-nucleic-acid-sequence-based-amplification-NASBA_fig4_236316412

Οι μέθοδοι ανίχνευσης προϊόντων μετά την NASBA, όπως η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή η ανάλυση σε πηκτή με ένζυμο, θεωρούνται ενεργοβόρες και μη οικονομικά αποδοτικές. Αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη μίας νέας NASBA πραγματικού χρόνου, η οποία χρησιμοποιεί φθορίζοντες ανιχνευτές που είναι μοριακοί φάροι για την ανίχνευση των μονόκλωνων αμπλικονίων RNA, παράγοντας έτσι μία ομοιογενή ανάλυση NASBA [116]. Η NASBA πραγματικού χρόνου έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση διαφόρων τροφιμογενών παθογόνων όπως η *Salmonella enterica*, η *Vibrio cholerae*, ο *Staphylococcus aureus*, το *Campylobacter jejuni* και το *Campylobacter coli* [117]. Επιπλέον, η NASBA πραγματικού χρόνου είναι σε θέση να ανιχνεύσει βιώσιμους μικροοργανισμούς που υπάρχουν σε δείγματα τροφίμων μέσω της ενίσχυσης mRNA και η ανίχνευση στόχων RNA θα υποδεικνύει την παρουσία βιώσιμων κυττάρων [118]. Η NASBA πραγματικού χρόνου έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των βιώσιμων από τα μη βιώσιμα βακτηριακά κύτταρα και συνήθως απαιτείται επεξεργασία με RNάση για την αποικοδόμηση του mRNA-στόχου από τα νεκρά κύτταρα πριν από την εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος ή απαιτείται επεξεργασία των δειγμάτων με DNάση χωρίς RNάση πριν από την εκτέλεση της ανάλυσης NASBA [119].

Η NASBA προσφέρει ανάλυση υψηλής απόδοσης και έχει διατεθεί στο εμπόριο ως kit. Υπάρχουν διάφορα εμπορικά kit NASBA που κατασκευάζονται από τις Life Sciences, KIT Biomedical Research, Gen-Probe και bioMérieux [120]. Ωστόσο, το εμπορικό kit NASBA που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση βακτηριακών παθογόνων μικροοργανισμών που

μεταδίδονται μέσω τροφίμων είναι κυρίως το Nuclisens EasyQ® Basic Kit (bioMérieux). Το Nuclisens EasyQ® Basic Kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση της *Listeria monocytogenes*, της *Salmonella enterica* και του *Vibrio cholerae* [121].

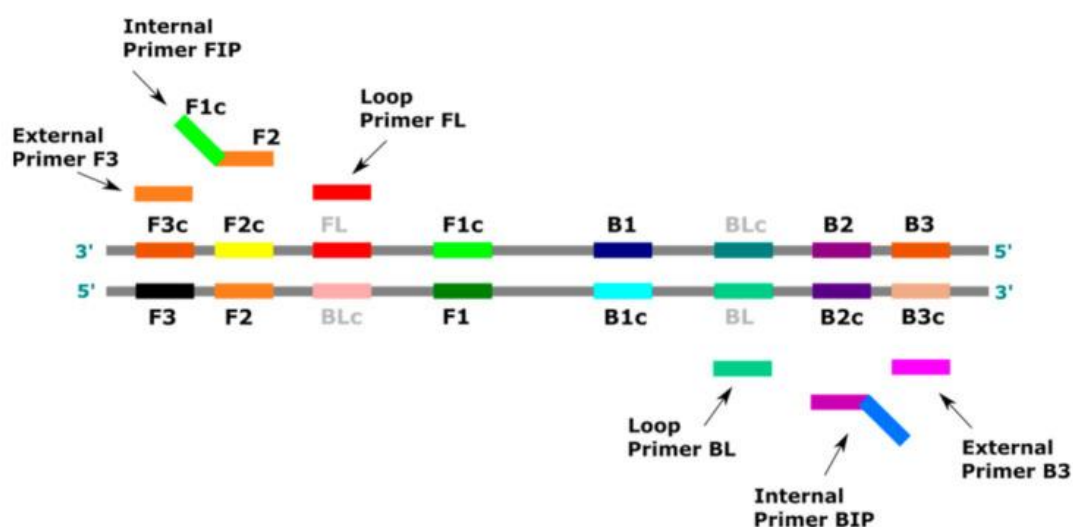
2.2.5. Ισόθερμη ενίσχυση μέσω βρόχου (LAMP)

Η LAMP είναι μία νέα μέθοδος ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων που αναπτύχθηκε από τους Notomi και τους συνεργάτες του, η οποία παρέχει ταχεία, ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών [122]. Η τεχνική είναι εξαιρετικά ειδική και αυξάνει την ποσότητα του ενισχυμένου DNA ακόμη και σε ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα σε λιγότερο από μία ώρα, σε σύγκριση με ένα εκατομμύριο αντίγραφα που αποδίδει η PCR. Η ισοθερμική ενίσχυση μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς προηγμένο εργαστηριακό εξοπλισμό, όπως σε ξηρό θερμαντήρα μπλοκ ή σε υδατόλουτρο. Μία άλλη καινοτόμος πτυχή της LAMP είναι η υψηλή εξειδίκευσή της λόγω της χρήσης πολλών εκκινητών (από τέσσερις έως έξι), οι οποίοι μπορούν να διακρίνουν έως και οκτώ συγκεκριμένες θέσεις στο πρότυπο DNA, σε σύγκριση με δύο μόνο στην τυπική PCR. Ένα αποφασιστικό στοιχείο που είναι υπεύθυνο για τη σωστή εξέλιξη της αντίδρασης LAMP είναι το στάδιο του σχεδιασμού των εκκινητών. Αρκετά ζεύγη εκκινητών πρέπει να βελτιστοποιηθούν όσον αφορά μια σειρά παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης, της θέσης των ζευγών νουκλεοτιδίων και της απόστασης μεταξύ των περιοχών DNA [123].

Οι εκκινητές πρέπει να έχουν δομή μονής αλυσίδας στους 60-65 °C και δεν πρέπει να δημιουργούν σταθερή δομή διπλής αλυσίδας. Η χρήση μεγαλύτερου αριθμού εκκινητών για την ενίσχυση, της ίδιας αλληλουχίας μπορεί να αυξήσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Ο σχεδιασμός των εκκινητών LAMP μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση διαδικτυακού λογισμικού, όπως το PrimerExplorer (<https://primerexplorer.jp/e/>), το LAMP Designer Optigene (www.optigene.co.uk/lamp-designer/) ή το Premier Biosoft (<http://www.premierbiosoft.com/isothermal/lamp.html>). Επιπλέον, η επιλογή των εκκινητών απαιτεί προηγούμενη ανάλυση της παραλλακτικότητας πολλών γονιδιωματικών αλληλουχιών στο στοχευόμενο είδος, ανάλογα με τον στόχο της LAMP. Εάν οι πληροφορίες αυτές δεν είναι διαθέσιμες, πρέπει να εφαρμοστεί αλληλούχιση για τον προσδιορισμό της παραλλακτικότητας ενός συγκεκριμένου γονιδίου στο είδος, γεγονός που

επεκτείνει σημαντικά τον χρόνο και την προσπάθεια που απαιτούνται για μία συνήθη εφαρμογή LAMP [123].

Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην LAMP είναι τα εξής: οι εσωτερικοί εκκινητές, εσωτερικός εκκινητής προς τα εμπρός (FIP) και εσωτερικός εκκινητής προς τα πίσω (BIP)- οι εξωτερικοί εκκινητές, εκκινητής προς τα εμπρός (F3) και εκκινητής προς τα πίσω (B3)- και οι προαιρετικοί εκκινητές βρόχου, εκκινητής βρόχου προς τα εμπρός (FL) και εκκινητής βρόχου προς τα πίσω (BL). Οι εσωτερικοί εκκινητές είναι συμπληρωματικοί σε δύο απομακρυσμένες θέσεις του προτύπου (στην αλυσίδα με νόημα και στην αντινόημα αλυσίδα). Οι εξωτερικοί εκκινητές είναι μικρότεροι (21-24 bp) και εφαρμόζονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο μείγμα αντίδρασης για να συνδέονται με το πρότυπο πιο αργά από ό,τι οι εσωτερικοί εκκινητές. Οι εσωτερικοί και οι εξωτερικοί εκκινητές, τόσο προς τα εμπρός όσο και προς τα πίσω, σε συνδυασμό με την πολυμεράση Bst DNA, η οποία παρουσιάζει υψηλή δραστικότητα μετατόπισης κλώνων στους 60-65 °C, δημιουργούν μία δομή DNA που μοιάζει με αλτήρα [124].

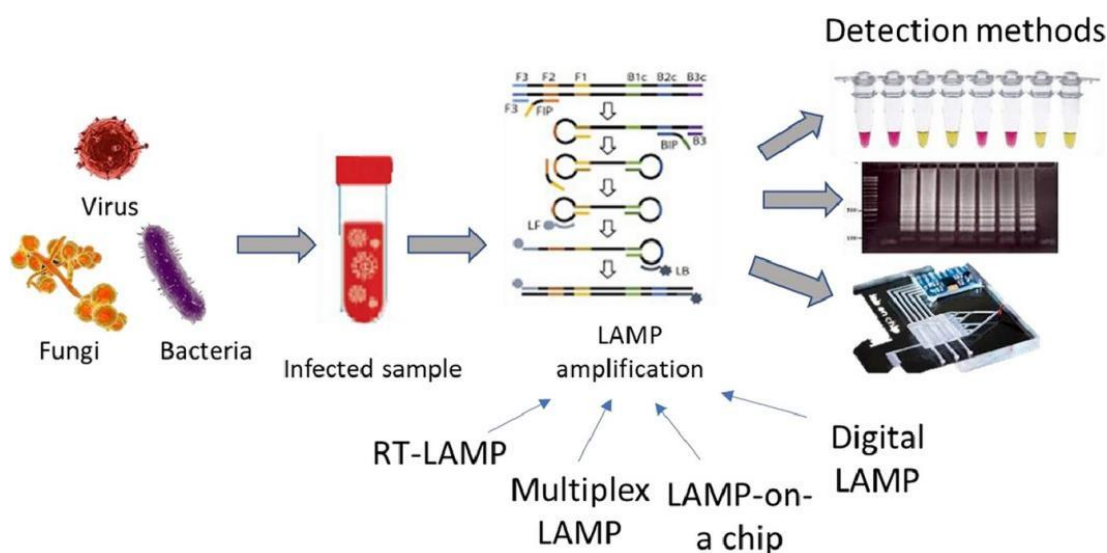


Εικόνα 3 Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση LAMP

Αυτή η δομή χρησιμεύει ως πρότυπο για περαιτέρω ενίσχυση. Η προσθήκη εκκινητών βρόχου, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί προς το DNA που μοιάζει με αλτήρα, αυξάνει τον αριθμό των "σημείων εκκίνησης" κατά τη διάρκεια της αντίδρασης LAMP μέχρι συνολικά οκτώ ενισχυμένες αλληλουχίες DNA [124]. Έτσι, οι εκκινητές βρόχου βελτιώνουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα και την ευαισθησία της αντίδρασης και μειώνουν τον χρόνο που απαιτείται κατά 50%. Επιπλέον, οι εκκινητές βρόχου ενεργοποιούνται μόνο μία

φορά όταν έχει δημιουργηθεί το τεχνητό πρότυπο, γεγονός που αυξάνει σημαντικά την επιλεκτικότητα της αντίδρασης [125].

Η LAMP βασίζεται στην αυτοκυκλική σύνθεση του DNA με μετατόπιση της αλυσίδας που πραγματοποιείται από την πολυμεράση Bst DNA large fragment υπό ισόθερμες συνθήκες μεταξύ 59°C και 65°C για 60 min. Στην LAMP, χρησιμοποιούνται τέσσερις εκκινητές που περιλαμβάνουν δύο εσωτερικούς εκκινητές και δύο εξωτερικούς εκκινητές για τη στόχευση έξι συγκεκριμένων περιοχών του DNA-στόχου. Δομές DNA που μοιάζουν με κουνουπίδι και φέρουν πολλαπλούς βρόχους, καθώς και DNA στελέχους με βρόχους διαφόρων μεγεθών είναι τα τελικά προϊόντα της LAMP. Με την LAMP μπορεί να παραχθεί μεγάλη ποσότητα αμπλικονίων εντός 60 min, η οποία είναι συνήθως 10³ φορές ή μεγαλύτερη σε σύγκριση με την απλή PCR. Τα αμπλικόνια LAMP μπορούν να ανιχνευθούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή με τη χρωστική SYBR Green I [126].



Εικόνα 4 Ισοθερμική ενίσχυση με τη βοήθεια βρόχου (LAMP)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666517422000177>

Στον τομέα της ανίχνευσης τροφιμογενών παθογόνων, η LAMP χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για την ανίχνευση του γονιδίου *stx*A2 στην *Escherichia coli* O157:H7 [127]. Έκτοτε, η LAMP χρησιμοποιείται για την ανίχνευση διαφόρων τροφιμογενών παθογόνων λόγω της ταχύτητας και της ευαισθησίας της. Η LAMP έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο εξειδικευμένη και ευαίσθητη σε σύγκριση με τις δοκιμασίες PCR για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών [128]. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η LAMP χρησιμοποιεί τέσσερις εκκινητές που στοχεύουν σε έξι συγκεκριμένες περιοχές και παρέχει ταχεία ενίσχυση, μεγαλύτερη απόδοση προϊόντων ενίσχυσης και χαμηλότερα όρια

ανίχνευσης από τις αναλύσεις PCR [129]. Μέχρι σήμερα διατίθενται εμπορικά kit LAMP για την ανίχνευση της *Listeria*, της *Salmonella*, του *Campylobacter*, της *Legionella* και της *Escherichia coli* που παράγει βεροτοξίνη [130]. Για παράδειγμα, το kit ανίχνευσης Loompamp (Eiken Chemical) είναι διαθέσιμο στο εμπόριο για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων όπως η *Salmonella enterica* [131], η *Shigella* [132], η εντεροδεισδυτική *Escherichia coli* [132], η βεροτοξινογόνος *Escherichia coli* O157 και O26 [133] και το *Campylobacter* [134].

Με την πάροδο του χρόνου, εισήχθησαν διάφορες παραλλαγές της LAMP, συμπεριλαμβανομένης της ισοθερμικής ενίσχυσης με τη βοήθεια βρόχου αντίστροφης μεταγραφής (RT-LAMP), της ισοθερμικής ενίσχυσης με τη βοήθεια βρόχου πολλαπλών διεργασιών (M-LAMP) και της παρατήρησης του προϊόντος σε πραγματικό χρόνο με τροποποίηση του αρχικού πρωτοκόλλου, η οποία επέτρεψε την ανάλυση RNA και την πολλαπλή ανίχνευση [135]. Όπως και στην παραλλαγή RT-PCR, η RT-LAMP χρησιμοποιεί αντίστροφη μεταγραφάση σε συνδυασμό με DNA πολυμεράση για την ανίχνευση αλληλουχιών RNA ή πολυμεράση με δραστηριότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, π.χ. Bst 3.0 ή OmniAmp [136]. Η διαδικασία αποδείχθηκε εξαιρετικά χρήσιμη για τη διάγνωση πολλών ιών RNA [137]. Με τη σειρά της, η M-LAMP μπορεί να ανιχνεύσει πολλούς παθογόνους μικροοργανισμούς σε μία μόνο αντίδραση ή δοκιμαστικό σωλήνα εάν χρησιμοποιηθούν περισσότεροι εκκινητές ή εκκινητές με μοναδικά σήματα φθορισμού [138].

Εκτός αυτού, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι δοκιμασιών LAMP για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, η πολλαπλή LAMP, η LAMP αντίστροφης μεταγραφής, η LAMP πραγματικού χρόνου και η *in situ* LAMP [139]. Η διαθεσιμότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο των προϊόντων ενίσχυσης LAMP με την παρουσία θολερότητας ή φθορισμού εξαλείφει την ανάγκη χρώσης με βρωμιούχο αιθίδιο και ηλεκτροφόρησης πηκτής. Ως εκ τούτου, αυτό επιτρέπει την ανάλυση υψηλής απόδοσης μαζί με την υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευσή της.

Για να βελτιωθεί η ακρίβεια της LAMP, με μείωση του φθορισμού υποβάθρου και αύξηση του φθορισμού σήματος, έχουν προταθεί διάφορες προσεγγίσεις, όπως ο σχεδιασμός ανιχνευτών μετατόπισης της αλυσίδας [140], καρβοξαμιδίου και N-ακυλοκαρβοξαμιδίου [141], πουλουλάνης [142], γλωριούχου γουανιδίνης [143], θερμοκρασίας επαφής με πρόσθετα όπως διμεθυλοσουλφοξείδιο [144] και ένα σύστημα ανιχνευτών Janus [145].

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια χρυσού [146] για την άσκηση επίδρασης θερμής εκκίνησης στο LAMP και πρωτεΐνη δέσμευσης μονόκλωνου DNA (SSB) [147] για την καταστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ των προτύπων DNA. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μια μέθοδος LAMP με βάση το οξείδιο του γραφενίου (graphene oxide, GO) για την ενίσχυση της ακρίβειας της LAMP, με ευρύτερο δυναμικό εύρος για τη διάκριση των αληθών από τα ψευδή αμπλικόνια [148]. Το GO ως δισδιάστατο (2D) νανοϋλικό με υψηλή επιφάνεια [149] χρησιμοποιήθηκε για τη μείωση του μη ειδικού υβριδισμού των DNA-πρωτογενών, επειδή το GO τείνει να προσροφά μόνο μονόκλωνο νουκλεϊκό οξύ (ssDNA και RNA) και όχι δίκλωνο DNA [150]. Ωστόσο, η χρήση του GO σε αντιδράσεις ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, όπως η PCR και η LAMP, αποτελεί συχνά πρόκληση λόγω των δυσμενών χαρακτηριστικών του GO, συμπεριλαμβανομένης της χαμηλής διασποράς παρουσία δισθενούς κατιόντος (π.χ. Mg²⁺) [151] και της προσρόφησης πρωτεϊνών στην επιφάνεια του GO, η οποία προκαλεί συσσωμάτωση πρωτεϊνών με απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας [152]. Το GO χρησιμοποιήθηκε για την προσρόφηση εκκινητών ssDNA για την ενίσχυση της εξειδίκευσης σε PCR, μειώνοντας το σήμα υπόβαθρου που προκαλείται από μη ειδική ενίσχυση του DNA [153]. Το GO μειώνει τη μη ειδική ανόπτηση του ssDNA, όπως ο διμερισμός των εκκινητών και η ψευδής προετοιμασία, προσροφώντας την περίσσεια εκκινητών κατά τη διάρκεια μιας PCR. Ωστόσο, η DNA πολυμεράση, η οποία είναι απαραίτητη στην ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων, τείνει να προσροφάται στην επιφάνεια GO μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών, εμφανίζοντας μειωμένη λειτουργία με χαμηλή αποτελεσματικότητα στην ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων.

Η LAMP προσφέρει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την PCR, όπως (i) ταχεία λειτουργία, (ii) υψηλή ευαισθησία, (iii) μέγιστη εξειδίκευση και (iv) οικονομική αποδοτικότητα για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, η LAMP έχει αναδειχθεί ως αναλυτική τεχνική hotspot για την ανάλυση σε πραγματικό χρόνο των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών λόγω των ευεργετικών παραγόντων της, όπως (i) ο φθορισμός, (ii) η θολερότητα και (iii) οι δυνατότητες ηλεκτροχημικής ανίχνευσης. Παρά την υψηλή εξειδίκευση και την ταχύτητά της σε σύγκριση με την PCR, η LAMP δεν είναι κατάλληλη για την POC διάγνωση. Για την επίλυση αυτών των ζητημάτων, πολλοί ερευνητές επικεντρώνονται στην ενσωμάτωση της τεχνολογίας ημιαγωγών οξειδίου συμπληρωματικού μετάλλου (complementary-metal oxide-semiconductor, CMOS) με την LAMP. Με τον τρόπο αυτό, έχει επιτευχθεί με επιτυχία η παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Ο Wang και οι συνεργάτες του

ανέπτυξαν ένα σύστημα LAMP με βάση το CMOS, το οποίο επιτρέπει την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο των μεταβολών των φωτονίων ανάλογα με τη διαδικασία ενίσχυσης [154]. Για την πρόταση αυτή, χρησιμοποιήθηκε το μπλε της υδροξυναφθόλης (Hydroxynaphthol blue, HNB) ως δείκτης μετάλλων, ο οποίος μπορεί να αλλάξει χρώμα από ιώδες σε μπλε χρώμα. Αργότερα, η κόκκινη λυχνία LED χρησιμοποιήθηκε ως πηγή φωτός, η οποία αντιπροσωπεύει μείωση του αριθμού των φωτονίων.

Σε μία άλλη μελέτη, ο Li και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν τη μεθοδολογία LAMP με βάση τη βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση χρησιμοποιώντας χρωστικές που παρεμβάλλονται στο DNA, όπως το μονοαζίδιο του αιθιδίου (ethidium monoazide, EMA) και το μονοαζίδιο του προπιδίου (propidium monoazide, PMA) [155]. Όπως αναπτύχθηκε, η τεχνολογία PMA/EMA-LAMP με βάση την PMA/EMA χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για την ποσοτικοποίηση της κατάστασης VBNC των βακτηρίων. Κατέδειξε μία θαυμάσια επίδραση στην κατανόηση των επιδημιών, όπου οι άνθρωποι υποφέρουν σοβαρά από μία ευρεία ποικιλία τροφιμογενών λοιμώξεων. Έδειξε (i) υψηλή ευαισθησία, (ii) μέγιστη εξειδίκευση και (iii) ταχύτητα σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους που βασίζονται στην PCR [155]. Η πολλαπλή αποτελεσματικότητα και ο έλεγχος υψηλής απόδοσης για την ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων βακτηρίων με τη χρήση μίας μόνο συσκευής σε τροφιμογενείς λοιμώξεις είναι πάντα ιδιαίτερα συνιστώμενες. Για την εκπλήρωση αυτών των πλεονεκτημάτων, αναπτύχθηκε η φυγοκεντρική μικροσυσκευή LAMP για την ταυτοποίηση τροφιμογενών βακτηρίων όπως η *E. coli* O157:H7, η *Salmonella enterica* και το *Vibrio parahaemolyticus*. Στο παρόν, οι συγγραφείς σχεδίασαν εξεζητημένα τη φυγοκεντρική μικροσυσκευή και τον έλεγχο RPM. Με τον τρόπο αυτό επιτρέπει την ταυτόχρονη εκτέλεση 24 αντιδράσεων LAMP με τρόπο υψηλής απόδοσης. Οι αντιδράσεις αυτές μπορούν εύκολα να διακριθούν με γυμνό μάτι μέσω της εξέτασης της μεσολαβούμενης από το Eriochrome Black T (EBT) χρωματομετρικής αλλαγής του χρώματος από μωβ σε γαλάζιο του ουρανού. Χρησιμοποίησαν τη στρατηγική ρατιομετρικής επεξεργασίας εικόνας με βάση το RGB, η οποία διευκολύνει την επίτευξη υψηλότερων τιμών LOD σε σύγκριση με άλλες μεθόδους ανίχνευσης με βάση την ηλεκτροχημεία και τον φθορισμό. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική πλατφόρμα POC για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση τροφιμογενών βακτηρίων στο μέλλον [156].

Οι ιοί είναι τα ευπροσάρμοστα μικροβιακά παθογόνα που οδήγησαν στην επιδημία του σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου (SARS), της γρίπης των πτηνών και της

πανδημίας της γρίπης των χοίρων το 2003, το 2005 και το 2009, αντίστοιχα. Μπορούν να δημιουργήσουν τις χειρότερες καταστάσεις στην ανθρώπινη υγεία μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα [157]. Στον σημερινό κόσμο, οι ιοί είναι τα ευάλωτα τροφιμογενή παθογόνα που προκαλούν τεράστιες βλάβες στην ανθρώπινη υγεία. Στο πλαίσιο αυτό, ο NoV, προκαλεί σε τεράστιο βαθμό οξεία γαστρεντερίτιδα, η οποία αντιπροσωπεύει 1 στις 5 περιπτώσεις μεταξύ των ανεπτυγμένων χωρών. Τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) πραγματοποίησαν μία ολοκληρωμένη αξιολόγηση των κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας στις ΗΠΑ μεταξύ των ετών 2009 και 2012. Έδειξε σαφώς ότι αναφέρθηκε περίπου το 48% των κρουσμάτων τροφιμογενών ασθενειών, τα οποία προκαλούνται από τον NoV [158]. Γενικά, χρησιμοποιούνται συχνά δοκιμασίες μοριακής βάσης για την ανίχνευση ιικών νουκλεϊκών οξέων. Ωστόσο, αυτές είναι περιορισμένες στην ανίχνευση ιών λόγω των ακόλουθων πτυχών: i) έλλειψη άφθονων ιδιαίτερα μολυσματικών ιών, οι οποίοι απαιτούν κρίσιμη δειγματοληψία και αξιολόγηση τεράστιων όγκων τροφίμων, ii) απαίτηση εκχύλισης και συγκέντρωσης των δειγμάτων ιών πριν από την ανίχνευση και iii) ανάγκη για την εκχύλιση ιών, οι οποίες δεν περιέχουν ουσίες που παρεμβαίνουν στις δοκιμασίες ή τις μεθόδους ανίχνευσης ιών. Από την άλλη πλευρά, η άμεση ανίχνευση και η ορθή ταυτοποίηση των ιών στα τρόφιμα είναι επίσης ένα δύσκολο έργο λόγω της μεγάλης ποικιλίας και πολυπλοκότητας των τροφίμων και της άλλης ετερογενούς κατανομής των ιών στις μολυσμένες ουσίες τροφίμων. Ως εκ τούτου, οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης δεν διακρίνουν σαφώς την παρουσία μολυσματικών ιών, εκτός από τα θραύσματα του ιικού γονιδιώματος. Οι περισσότεροι ιοί που σχετίζονται με τροφιμογενείς λοιμώξεις περιλαμβάνουν τον ιό NoV και τον ιό της ηπατίτιδας Α (HAV). Ωστόσο, άλλοι ιοί, όπως ο ιός της ηπατίτιδας Ε (HEV), ο αστροϊός, ο ανθρώπινος ροταϊός (HRV), ο ιός Aichi, ο εντεροϊός, ο σαπωνοϊός, ο παρβοϊός, οι κοροναϊοί και ο αδενοϊός μπορούν να μεταδοθούν μέσω ουσιών τροφίμων. Ανάλογα με τα συμπτώματα της λοίμωξης, οι ιοί μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις ομάδες, δηλαδή (i) εκείνους που προκαλούν γαστρεντερίτιδα (NoV, Αστροϊοί, ιός Aichi, HRV, Σαποϊοί και Αδενοϊοί), (ii) την εντερικά μεταδιδόμενη ηπατίτιδα (που προκαλείται από τους HEV και HAV, οι οποίοι μεταδίδονται στο ήπαρ και εκδηλώνουν νόσο) και (iii) εκείνους που πολλαπλασιάζονται κυρίως στο ανθρώπινο έντερο αλλά προκαλούν νόσο μετά τη μετανάστευση σε όργανα, δηλαδή στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Εντεροϊοί) [159].

Οι περισσότερες από τις 10 οικογένειες ιών προκαλούν τροφιμογενείς λοιμώξεις. Οι ασθένειες κυμαίνονται από απλές διαρροϊκές λοιμώξεις έως σοβαρές φλεγμονές στον

εγκέφαλο, δηλαδή εγκεφαλίτιδα. Η παγκόσμια επιβάρυνση από τροφιμογενείς λοιμώξεις εξελίσσεται σε μεγάλο βαθμό λόγω της μετάδοσης ιών στον άνθρωπο μέσω πολύ κακών πρακτικών υγιεινής [160]. Μεταξύ των ιών, οι ιοί της ηπατίτιδας είναι ένας από τους σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνους για τις τροφιμογενείς λοιμώξεις, οι οποίοι περιλαμβάνουν τους ιούς της ηπατίτιδας Α και Ε. Το κόστος της επιβάρυνσης για την τροφιμογενή ηπατίτιδα Α εκτιμάται ότι υπερβαίνει τα 36.000 δολάρια ΗΠΑ ανά άτομο στις Ηνωμένες Πολιτείες. Η ηπατίτιδα Α μπορεί να μεταδοθεί μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού και της κατάποσης εξαιρετικά μολυσμένου νερού και τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων φρούτων, οστρακοειδών και ωμών ή μη επεξεργασμένων λαχανικών. Το πιο σημαντικό είναι ότι τα κρούσματα τροφιμογενών και υδατογενών λοιμώξεων που σχετίζονται με τον ιό της ηπατίτιδας Α ευθύνονται για το 2%-7% των συνολικών ασθενειών [161]. Ο ιός της ηπατίτιδας Ε είναι επίσης ένας από τους σημαντικότερους τύπους του ιού της ηπατίτιδας που προκαλεί τροφιμογενείς λοιμώξεις. Τέσσερις γονότυποι του ιού και οι γονότυποι 3 και 4 είναι ζωνοσογόνοι ιοί που μολύνουν τον άνθρωπο, τους χοίρους και άλλα συγγενικά ζώα. Οξείες επιδημίες του ιού της ηπατίτιδας Ε συνέβησαν αρκετές φορές στον κόσμο. Τα ποσοστά θνησιμότητας παρατηρούνται σε ποσοστό 25% σε έγκυες γυναίκες κατά το τρίτο τρίμηνο. Ο ιός αυτός μεταδίδεται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων και νερού. Η μόλυνση αυτή αποδίδεται κυρίως στην κατανάλωση ωμού ή ατελώς μαγειρεμένου κρέατος που προέρχεται από αγριογούρουνα και ελάφια, λουκάνικα και συκωτιού του εμπορίου. Πρόσφατα αναπτύχθηκαν μέθοδοι LAMP αντίστροφης μεταγραφής (RT-LAMP) που ενσωματώνουν νανοσωματίδια χρυσού για την ανίχνευση των ιών της ηπατίτιδας Ε. Αυτή η RT-LAMP ενός βήματος σε συνδυασμό με τη στρατηγική χρωματομετρικής σήμανσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανίχνευση των ιών της ηπατίτιδας Ε σε σύγκριση με τις υπάρχουσες παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης. Η μέθοδος αυτή συνιστάται ανεπιφύλακτα λόγω της απλότητας, της ταχύτητας και της υψηλής ευαισθησίας της μαζί με ένα όριο ανίχνευσης σχεδόν 101 αντιγράφων RNA [162]. Οι NoVs είναι ένας από τους σημαντικούς τύπους ιών που προκαλούν πολύ συχνά τροφιμογενείς λοιμώξεις. Για τον σκοπό αυτό αναπτύχθηκε η δοκιμασία RT-LAMP, η οποία επέδειξε εξαιρετική εξειδίκευση και υψηλή εκλεκτικότητα λόγω των έξι εκκινητών, όπου δύο εκκινητές βρόχου ταυτοποίησαν οκτώ περιοχές στην αλληλουχία-στόχο του ιού. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η δοκιμασία αυτή μείωσε τον χρόνο ενίσχυσης της δοκιμασίας εντός 60 ή 90 min [163].

Τα τροφικά αλλεργιογόνα αποτελούν σοβαρή απειλή για τα άτομα προκαλώντας

ανοσολογικές αντιδράσεις και άλλες επιπλοκές. Ο κύριος λόγος για το ζήτημα αυτό είναι η ανάπτυξη ευαισθητοποίησης στα άτομα που καταναλώνουν αλλεργιογόνα τρόφιμα. Για τον μετριασμό αυτών των προβλημάτων, η κυβέρνηση των Ηνωμένων Πολιτειών εισήγαγε ένα νόμο, δηλαδή τον νόμο για την επισήμανση των αλλεργιογόνων τροφίμων και την προστασία των καταναλωτών το 2004. Σύμφωνα με αυτόν, όλοι οι κατασκευαστές τροφίμων πρέπει να επισημαίνουν στα προϊόντα τους, αν περιέχουν οκτώ σημαντικά αλλεργιογόνα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των αυγών, των ψαριών, του γάλακτος, των ξηρών καρπών, των φιστικιών, της σόγιας ή του σιταριού και των οστρακοειδών οστρακοειδών. Αυτά τα "οκτώ μεγάλα" είναι εξαιρετικά κρίσιμα για σχεδόν το 90% όλων των τροφικών αλλεργιών. Στη Βόρεια Αμερική, τα υπολογιζόμενα ποσοστά αλλεργίας στα φιστίκια, στα ψάρια και στο γάλα για τους ενήλικες είναι 0,6%, 0,4% και 0,3%, αντίστοιχα. Στην περίπτωση των μικρών παιδιών, τα αλλεργιογόνα περιλαμβάνουν αγελαδινό γάλα (2,5%), φιστίκια (1%), ξηρούς καρπούς (0,5%), σόγια (0,4%), σιτάρι (0,4%), ψάρι (0,1%), οστρακοειδή (0,1%), σουσάμι (0,1%) και αυγό (1,5%). Ενώ, οι αλλεργικές αντιδράσεις σε φρούτα και λαχανικά δεν είναι επίσης ασυνήθιστες (5%) [164]. Κατά συνέπεια, έχουν αναπτυχθεί διάφορες βάσεις δεδομένων για την αντιμετώπιση των αιτιολογικών και προληπτικών μέτρων που απαιτούνται για τις αλλεργίες αυτές. Μεταξύ αυτών είναι (i) η WHO/IUIS Subcommittee on Allergen Nomenclature (<http://www.allergen.org/>), (ii) η βάση δεδομένων Allergome (<http://www.allergome.org/>) και (iii) η βάση δεδομένων AllFam (<http://www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/>). Ωστόσο, η ανίχνευση των τροφικών αλλεργιογόνων δεν είναι εύκολη υπόθεση για τους εξής λόγους: i) παρουσία τροφικών αλλεργιογόνων σε ίχνη σε ορισμένα τρόφιμα και ii) παρεμβολή της μήτρας. Επί του παρόντος, διατίθενται πολυάριθμες αναλυτικές μέθοδοι, όπως βιοαισθητήρες που βασίζονται σε ηλεκτροχημικές αρχές, φθορισμό και άλλες αρχές σύνθετης αντίστασης. Όλες αυτές οι μέθοδοι έχουν τα δικά τους μειονεκτήματα, όπως (i) έλλειψη POC διαγνωστικής, (ii) έλλειψη έγκαιρης διάγνωσης των τροφικών αλλεργιογόνων, (iii) δαπανηρότητα, (iv) ακατάλληλος έλεγχος των αλλεργιογόνων, (v) καλά εκπαιδευμένο προσωπικό και (vi) έλλειψη εξελιγμένου εξοπλισμού [165].

Ως εκ τούτου, για την επίλυση αυτών των ζητημάτων, η έτοιμη προς χρήση τεχνολογία όπως η LAMP είναι αξιόπιστη και παρέχει ευκαιριακή πρόοδο της στρατηγικής ανίχνευσης των αλλεργιογόνων τροφίμων. Ο Sheu και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια ανάλυση LAMP για την ανίχνευση αλλεργιογόνων φιστικιών με τη χρήση σετ εκκινητών. Τα δύο σετ εκκινητών LAMP στόχευαν στην εσωτερική μεταγραφική αλληλουχία 1 (ITS1) του

πυρηνικού ριβοσωμικού DNA και στην αλληλουχία του γονιδίου *arah1* στα φιστίκια. Οι συγγραφείς επιβεβαιώνουν ότι η ταυτοποίηση του φιστικιού μέσω των φρεσκοσχεδιασμένων εκκινητών για την αλληλουχία ITS 1 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε σύγκριση με τους εκκινητές για την αλληλουχία του γονιδίου *arah1* μέσω της ανάλυσης LAMP. Αυτή η δοκιμασία LAMP επέδειξε υψηλή εξειδίκευση στην ταυτοποίηση του φιστικιού και, κατά τρόπο ενδιαφέροντα, δεν παρατηρήθηκε διασταυρούμενη αντίδραση με άλλα είδη ξηρών καρπών, όπως τα αμύγδαλα, το κάσιους, το φουντούκι και το καρύδι [166]. Σε μία άλλη μελέτη, αναπτύχθηκε με επιτυχία το χρωματομετρικό μικρορρευτικό chip LAMP ή η εξαιρετικά επιλεκτική ανίχνευση τριών αλλεργιογόνων, συμπεριλαμβανομένων του φιστικιού, της σόγιας και του σησαμιού, με εξαιρετική ευαισθησία και εξειδίκευση εντός 60 min. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της παρουσίας ή της απουσίας αλλεργιογόνων τροφίμων που αγοράζονται στην αγορά. Είναι ενδιαφέρον ότι η ακρίβειά της είναι αρκετά καλή σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο Taq Man PCR πραγματικού χρόνου [167].

Είναι πολύ πιθανό ότι οι επιστημονικές και εμπορικές εξελίξεις στην τεχνολογία LAMP, γενικά, θα προωθήσουν και θα διαμορφώσουν τις μελλοντικές εξελίξεις στον τομέα αυτό. Αυτό περιλαμβάνει την ανάπτυξη νέων αντιδραστηρίων LAMP και νέων πλατφορμών για την περαιτέρω αξιοποίηση των δύο πιο χαρακτηριστικών χαρακτηριστικών της LAMP, δηλαδή της ταχύτητας και της απλότητας [168]. Ήδη, έχουν σημειωθεί πολλές πρόσφατες εξελίξεις σε νέα αντιδραστήρια LAMP, ιδίως ένζυμα και κύρια μίγματα, για παράδειγμα, οι πολυμεράσες Bst 2.0 και Bst 2.0 WarmStart DNA (New England Biolabs, Ipswich, MA), οι πολυμεράσες GspSSD και Tin DNA και τα ισοθερμικά κύρια μίγματα (OptiGene Ltd, West Sussex, Ηνωμένο Βασίλειο), καθώς και την OmniAmp DNA πολυμεράση και τα κύρια μίγματα LavaLAMP (Lucigen Corporation, Middleton, WI), τα οποία προσφέρουν καλύτερη θερμοσταθερότητα, υψηλότερη απόδοση ενίσχυσης και, ως εκ τούτου, είναι πιο προσιτά σε συνθήκες περιορισμένων πόρων και πεδίου. Θετικά αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν εντός 5 min με τη χρήση ορισμένων από αυτά τα αντιδραστήρια. Τα λυοφιλοποιημένα αντιδραστήρια LAMP έχουν διατεθεί στο εμπόριο για ορισμένα κλινικά διαγνωστικά kit [168], μία μορφή αντιδραστηρίου που μπορεί να υιοθετηθεί από τα kit ανίχνευσης *Salmonella* LAMP για τρόφιμα και ζωοτροφές στο μέλλον.

Οι πολλαπλές αναλύσεις LAMP ακόμα διερευνώνται [169], χρησιμοποιώντας την απελευθέρωση της τεχνολογίας απόσβεσης [170], τον φθοριογόνο υβριδισμό [171], τον περιορισμό με ενδονουκλεάση [144], τους αφομοιωτικούς ανιχνευτές [172] και τη

διαφοροποίηση της θερμοκρασίας ανόπτησης [173] για την ανίχνευση πολλαπλών στόχων σε ένα μόνο σωληνάριο αντίδρασης. Οι δύο τελευταίες τεχνικές έχουν εφαρμοστεί στη *Salmonella* [173]. Αυτές διαφέρουν κατ' αρχήν από την παράλληλη ανίχνευση που περιγράφεται για πολλές μικρορευστομηχανές POC, όπου οι αντιδράσεις LAMP για πολλαπλούς στόχους πραγματοποιούνται ταυτόχρονα σε ξεχωριστούς θαλάμους ή φρεάτια. Οι μελλοντικές εξελίξεις στις χημικές μεθόδους/στρατηγικές για τις δοκιμασίες πολλαπλών LAMP θα προωθήσουν σημαντικά την πολλαπλή ανίχνευση LAMP της *Salmonella* (πολλαπλά γονίδια ή παθογόνα).

2.2.6. Colorimetric LAMP

Η LAMP είναι μία από τις δυνητικές τεχνολογίες για την ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων σε σταθερή θερμοκρασία *in vitro* αποτελεσματικά, γρήγορα και οικονομικά αποδοτικά [174]. Επεξεργάζεται με μια DNA πολυμεράση με δραστικότητα απομάκρυνσης κλώνων και 4-6 ορθολογικά σχεδιασμένους εκκινητές. Εκτός από το εγγενές ισοθερμικό της πλεονέκτημα, η LAMP έχει πολύ υψηλότερη αποτελεσματικότητα ενίσχυσης παράγοντας δύο τάξεις μεγέθους περισσότερο αμπλικόνια και έτσι μπορεί να ανιχνευθεί άμεσα με γυμνό μάτι μέσω διαφόρων μεθόδων, όπως η θολερότητα [175] ή τα υποπροϊόντα με βάση τη χρωματομετρική ανίχνευση (colorimetric detection) [176]. Αυτές οι γρήγορες, εύκολες και απλές μέθοδοι ανίχνευσης έχουν αξιοποιήσει καλύτερα την προσβασιμότητα αυτής της τεχνικής ενίσχυσης σε περιοχές με περιορισμένους πόρους. Δεδομένου ότι η LAMP έχει επίσης υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία, έχει επεκταθεί σε διάφορες μορφές [177] και χρησιμοποιείται ευρέως σε τομείς που κυμαίνονται από την ασφάλεια των τροφίμων έως την ιατρική διάγνωση [178].

Παρόλο που έχουν καταβληθεί πολλές προσπάθειες για την οπτική ανίχνευση των αμπλικονίων LAMP [179], εξακολουθούν να υπάρχουν ανάγκες που δεν μπορούν να ικανοποιηθούν σε πρακτικές εφαρμογές. Η μέθοδος της θολερότητας είναι άμεση και απλή, αλλά τα αποτελέσματα είναι δύσκολο να διακριθούν με γυμνό μάτι, ειδικά όταν υπάρχουν περιορισμένοι στόχοι. Έτσι, εξακολουθούν να απαιτούνται ορισμένα όργανα (όπως θολερόμετρα) ή τεχνική εμπειρογνωμοσύνη. Όσον αφορά τις μεθόδους που βασίζονται στη χηλίωση φθορίζουσών χρωστικών που δεσμεύουν το DNA, το αποτέλεσμα μπορεί εύκολα να διακριθεί από μη εκπαιδευμένο προσωπικό, ωστόσο οι περισσότερες χρωστικές (όπως η SYBR Green I) πρέπει να προστίθενται στο διάλυμα μετά την ενίσχυση με την ανάγκη

ανοίγματος των καπακιών [180], αυξάνοντας σημαντικά τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης. Για τον σκοπό αυτό, οι οπτικές χρωστικές χρωστικές είναι ελκυστικές, εάν μπορούν να προστεθούν εκ των προτέρων στα μείγματα αντιδράσεων LAMP, χωρίς να αναστέλλουν τις αντιδράσεις ενίσχυσης [181].

Η κόκκινη κρεσόλη (Cresol red, CR) είναι μία από αυτές τις χρωστικές και ευαίσθητη στην αλλαγή του pH. Όταν το pH είναι χαμηλότερο από 7,2, θα είναι κίτρινο- όταν το pH υπερβαίνει το 8,8, γίνεται μοβ. Κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης των νουκλεϊκών οξέων, καθώς τα νουκλεϊκίδια ενσωματώνονται στις αναπτυσσόμενες βάσεις, απελευθερώνονται πρωτόνια, παρουσιάζοντας μείωση του pH με αλλαγή χρώματος από πορφυρό κόκκινο σε κίτρινο [182]. Το μπλε της υδροξυναφθόλης (Hydroxynaphthol blue, HNB) είναι ένας δείκτης μετάλλων, ο οποίος έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη χρωματομετρική ανίχνευση LAMP [183]. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης LAMP, η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} στο διάλυμα μειώνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα το δοκίμιο που είναι φορτωμένο με HNB να μεταβάλλεται από μοβ σε μπλε [183]. Με βάση τους διαφορετικούς τρόπους δράσης αυτών των χρωστικών ουσιών και την αρχή της εξέλιξης του χρώματος, τα CR και HNB θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα σε αντιδράσεις LAMP και να έχουν βελτιωμένα χρωματομετρικά αποτελέσματα. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι, αν συνδυαστούν οι δύο διαδικασίες της χρωματομετρίας, αναμένεται ένα πολύ ευρύτερο οπτικό παράθυρο χρωματικής διακύμανσης, ώστε τα αποτελέσματα να είναι ευκολότερα αναγνωρίσιμα, κάτι που σπάνια αναφέρεται στην χρωματομετρική ανίχνευση. Επιπλέον, η αντίδραση διεξάγεται σε ένα σωληνάριο και δεν απαιτείται το άνοιγμα του καπακιού που μειώνει τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης, καθιστώντας αυτή τη μέθοδο εύκολη στη λειτουργία.

2.2.7. Μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων DNA

Η πρόσφατη πρόοδος στην τεχνολογία ανίχνευσης πολλαπλών γονιδίων περιλαμβάνει την τεχνολογία μικροσυστοιχιών [184]. Οι μικροσυστοιχίες χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, αλλά οι μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδικού DNA χρησιμοποιήθηκαν ευρέως στον τομέα της ανίχνευσης τροφιμογενών παθογόνων. Οι μικροσυστοιχίες αποτελούνται από γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες ή chip επικαλυμμένα με έως και εκατοντάδες ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές και οι ανιχνευτές αυτοί είναι χημικά συντιθέμενες σύντομες αλληλουχίες που κυμαίνονται από 25

έως 80 bp [185]. Κάθε ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής είναι σε θέση να στοχεύσει ένα συγκεκριμένο τμήμα μίας γονιδιακής αλληλουχίας. Σε αυτή τη μέθοδο, τα θραύσματα νουκλεϊκών οξέων του δείγματος (DNA, mRNA ή cDNA) επισημαίνονται με φθορίζουσα χρωστική και στη συνέχεια μετουσιώνονται για να δημιουργηθούν μονόκλωνα θραύσματα. Αυτά τα θραύσματα θα υβριδοποιηθούν στη συστοιχία μέσω σύνδεσης με τους αντίστοιχους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές τους. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται μέσω της απεικόνισης του σήματος φθορισμού που παράγεται από το σύμπλοκο ανιχνευτή-δείγματος. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης κάθε επισημασμένου θραύσματος νουκλεϊκού οξέος [186].

Ο Li et al του είχαν παρουσιάσει την πρώτη αναφορά για την ανίχνευση παθογόνων ορότυπων *Shigella* και *Escherichia coli* με μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδικού DNA [187]. Η ανίχνευση ενός συγκεκριμένου ορότυπου μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας ειδικά για την *Escherichia coli*, καθώς αυτό το παθογόνο έχει διαφορετικούς ορότυπους με διαφορετικό επίπεδο παθογένειας που κυμαίνεται από το ακίνδυνο στέλεχος *Escherichia coli* K-12 έως το θανατηφόρο στέλεχος *Escherichia coli* O157:H7 [186]. Επιπλέον, ο Wang και οι συνεργάτες του (2007) ανέπτυξαν μία ανάλυση μικροσυστοιχίας η οποία επιτρέπει την ανίχνευση και την ταυτοποίηση 22 τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών [188]. Ορισμένα παραδείγματα αυτών των παθογόνων είναι οι *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Shigella* spp. *Salmonella* spp. και *Bacillus cereus*.

Οι μικροσυστοιχίες DNA είναι διαθέσιμες στο εμπόριο, αλλά οι περισσότερες από αυτές έχουν σχεδιαστεί για μελέτες ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης [189]. Οι εμπορικές in situ συντιθέμενες συστοιχίες είναι μικροσυστοιχίες υψηλής πυκνότητας όπου οι σύντομοι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές που κυμαίνονται από 20 έως 25 bp συντίθενται απευθείας στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας. Επιπλέον, περιλαμβάνονται πολλαπλοί ανιχνευτές ανά στόχο για μεγαλύτερη ευαισθησία, εξειδίκευση και ακρίβεια. Αυτές οι μικροσυστοιχίες υψηλής πυκνότητας απαιτούν ειδική κατασκευή και έχουν σχετικά υψηλό κόστος [189]. Υπάρχουν διάφορες εμπορικά διαθέσιμες μικροσυστοιχίες DNA που κατασκευάζονται από τις Affymetrix, Roche NimbleGen και Agilent Technologies [185].

Οι περισσότερες από τις εμπορικές μικροσυστοιχίες δεν είναι επιθυμητές για εξειδικευμένες εφαρμογές, όπως η μικροβιακή ανάλυση τροφίμων ή το διαγνωστικό εργαστήριο, επειδή οι μικροσυστοιχίες χαμηλής ή μεσαίας πυκνότητας θα χρησιμεύσουν ως η ιδανική πλατφόρμα

μικροσυστοιχιών που μπορεί να παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα χωρίς να απαιτείται η χρήση περίπλοκων εξοπλισμών και η διαχείριση δεδομένων [185]. Στην περίπτωση αυτή, οι προσαρμοσμένες μικροσυστοιχίες είναι διαθέσιμες από το Τμήμα Βιολογικών Πόρων του Seibersdorf και άλλους οργανισμούς. Οι προσαρμοσμένες μικροσυστοιχίες είναι ευαίσθητες, εξειδικευμένες και λιγότερο δαπανηρές από τις εμπορικές μικροσυστοιχίες [190]. Παρ' όλα αυτά, οι μικροσυστοιχίες χαμηλής πυκνότητας είναι διαθέσιμες στο εμπόριο. Για παράδειγμα, οι StaphyChips® που αναπτύχθηκαν από την Affymetrix και σε συνεργασία με την Advanced Array Technology (ATT, Eppendorf Array Technologies). Το StaphyChips® είναι σε θέση να ανιχνεύσει συνολικά 15 είδη *Staphylococcus*, συμπεριλαμβανομένου του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA) [190].

Γενικά, η μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων DNA επιτρέπει την ταυτόχρονη ταυτοποίηση πολλαπλών τροφιμογενών βακτηριακών παθογόνων. Ως εκ τούτου, είναι ικανή για ανάλυση υψηλής απόδοσης και έχει επίσης τη δυνατότητα να αυτοματοποιηθεί [88].

2.3. Μέθοδοι βιοαισθητήρων

Ο βιοαισθητήρας είναι μία αναλυτική συσκευή που αποτελείται από δύο κύρια στοιχεία: έναν βιοϋποδοχέα και έναν μετατροπέα. Ο βιοϋποδοχέας που είναι υπεύθυνος για την αναγνώριση του αναλύτη-στόχου μπορεί να είναι είτε:

- A. Βιολογικό υλικό: ένζυμα, αντισώματα, νουκλεϊκά οξέα και κυτταρικοί υποδοχείς, ή
- B. Βιολογικά παραγόμενο υλικό: απταμερή και ανασυνδυασμένα αντισώματα, ή
- Γ. Βιομιμητικό: αποτυπωμένα πολυμερή και συνθετικοί καταλύτες.

Ο μετατροπέας που μετατρέπει τις βιολογικές αλληλεπιδράσεις σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα μπορεί να είναι οπτικός, ηλεκτροχημικός, μαζικός, θερμομετρικός, μικρομηχανικός ή μαγνητικός [86]. Οι βιοαισθητήρες είναι εύχρηστοι και δεν απαιτούν προ-εμπλουτισμό του δείγματος, σε αντίθεση με τις μεθόδους που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα και τις ανοσολογικές μεθόδους, οι οποίες απαιτούν προ-εμπλουτισμό του δείγματος για τη συγκέντρωση των παθογόνων πριν από την ανίχνευση [191]. Οι πρόσφατοι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων

μικροοργανισμών είναι οπτικοί, ηλεκτροχημικοί και βιοαισθητήρες με βάση τη μάζα [192].

2.3.1. Οπτικοί βιοαισθητήρες

Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος οπτικός βιοαισθητήρας για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων είναι ο βιοαισθητήρας συντονισμού επιφανειακού πλάσμονιου (surface plasmon resonance, SPR) λόγω της ευαισθησίας του. Ο SPR χρησιμοποιεί φασματοσκοπία ανάκλασης για την ανίχνευση παθογόνων [86]. Στο SPR, οι βιοϋποδοχείς ακινητοποιούνται στην επιφάνεια ενός λεπτού μετάλλου. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος αλληλεπιδρά με το νέφος ηλεκτρονίων του λεπτού μετάλλου και παράγει ισχυρό συντονισμό. Όταν ο παθογόνος οργανισμός δεσμεύεται στην επιφάνεια του μετάλλου, η αλληλεπίδραση αυτή μεταβάλλει τον δείκτη διάθλασής του, με αποτέλεσμα την αλλαγή του μήκους κύματος που απαιτείται για τον ηλεκτρονικό συντονισμό [192].

Οι εμπορικοί οπτικοί βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν τεχνικές SPR, όπως ο βιοαισθητήρας SPREETA και ο βιοαισθητήρας BIACORE 3000, είναι σήμερα διαθέσιμοι για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Ο Waswa και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν τον βιοαισθητήρα SPREETA για την ανίχνευση της *E. coli* O157:H7 σε γάλα, χυμό μήλου και μοσχαρίσιο κιμά [193]. Το όριο ανίχνευσης ήταν περίπου 10^2 - 10^3 CFU/mL. Επιπλέον, η *Salmonella Enteritidis* και η *Salmonella Typhimurium* ανιχνεύθηκαν επιτυχώς με τον βιοαισθητήρα SPREETA [194]. Εκτός αυτού, η *Listeria monocytogenes* ανιχνεύθηκε επιτυχώς από τον βιοαισθητήρα BIACORE 3000 με όριο ανίχνευσης 1×10^5 κύτταρα/mL [195]. Η *Salmonella* των ομάδων B, D και E, η *Escherichia coli* O157:H7 και η *Salmonella Enteritidis* ανιχνεύθηκαν επίσης με επιτυχία με τον βιοαισθητήρα BIACORE [196].

Οι εμπορικά διαθέσιμοι βιοαισθητήρες για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών είναι ως επί το πλείστον οπτικοί βιοαισθητήρες. Οι εμπορικοί βιοαισθητήρες προσφέρουν διάφορους βαθμούς αυτοματοποίησης [197]. Η εμπορευματοποίηση των βιοαισθητήρων είναι πιο αργή από άλλες ταχείες μεθόδους λόγω διαφόρων παραγόντων, όπως η εξέταση του κόστους, η διασφάλιση της ποιότητας, τα ζητήματα σταθερότητας, τα ζητήματα ευαισθησίας και ο σχεδιασμός των οργάνων. Υπάρχουν δυσκολίες στις μεθόδους παραγωγής φθηνών και αξιόπιστων αισθητήρων, στην αποθήκευση των βιοαισθητήρων, στη σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων, στις μεθόδους βαθμονόμησης των αισθητήρων και στη συνολική ολοκλήρωση του συστήματος

αισθητήρων [198].

2.3.2. Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες ταξινομούνται περαιτέρω σε διάφορους τύπους, όπως οι αμπερομετρικοί, οι εμπεδησιομετρικοί, οι ποτενσιομετρικοί και οι αγωγιμομετρικοί, ανάλογα με τη μέτρηση των μεταβολών του ρεύματος, της εμπέδησης, της τάσης και της αγωγιμότητας αντίστοιχα, οι οποίες προκαλούνται από τις αλληλεπιδράσεις αντιγόνου-βιοϋποδοχέα [192].

Πολλοί ερευνητές είχαν αναφέρει την επιτυχή ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών με ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες. Για παράδειγμα, ο Pal και συνεργάτες του ανίχνευσαν με επιτυχία τον *Bacillus cereus* που υπάρχει σε φύτρα μηδικής, φράουλες, μαρούλι, ντομάτες, τηγανητό ρύζι και μαγειρεμένο καλαμπόκι με αγωγιμομετρικό βιοαισθητήρα άμεσης μεταφοράς φορτίου [199]. Το όριο ανίχνευσης αυτής της μεθόδου ήταν περίπου 35-88 CFU/mL. Για την ανίχνευση του *Staphylococcus aureus* χρησιμοποιήθηκε αμπερομετρικός μαγνητοανοσοαισθητήρας (magnetoimmunosensor), το όριο ανίχνευσης αυτής της μεθόδου ήταν 1 CFU/mL και ο χρόνος ανάλυσης ήταν 2 h [200]. Οι Munoz-Berbel και συνεργάτες είχαν περιγράψει τη χρήση της εμπεδησιομετρικής φασματοσκοπίας για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της *Escherichia coli*, το όριο ανίχνευσης βρέθηκε να είναι 10^1 - 10^7 CFU/mL [201]. Οι Ercole και συνεργάτες είχαν αναφέρει την επιτυχή ανίχνευση της *Escherichia coli* σε φυτικά τρόφιμα με τη χρήση ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα με βάση αντισώματα με όριο ανίχνευσης 10 κύτταρα/ml [202].

2.3.3. Βιοαισθητήρες με βάση τη μάζα

Οι βιοαισθητήρες με βάση τη μάζα ή οι ευαίσθητοι στη μάζα βιοαισθητήρες λειτουργούν με βάση την ανίχνευση μικρών μεταβολών στη μάζα. Οι βιοαισθητήρες με βάση τη μάζα περιλαμβάνουν τη χρήση πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου, ο οποίος δονείται σε ορισμένη συχνότητα όταν προκαλείται από ηλεκτρικό σήμα ορισμένης συχνότητας. Οι βιοϋποδοχείς (π.χ. αντισώματα) για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ. αντιγόνων) ακινητοποιούνται σε αυτόν τον κρύσταλλο. Μόλις τα αντιγόνα-στόχοι συνδεθούν με τα αντισώματα που είναι ακινητοποιημένα στον κρύσταλλο, αυτό θα προκαλέσει μια

μετρήσιμη αλλαγή στη συχνότητα δόνησης του κρυστάλλου, η οποία συσχετίζεται με την προστιθέμενη μάζα στην επιφάνεια του κρυστάλλου. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι βιοαισθητήρων με βάση τη μάζα, οι οποίοι είναι οι αντηχεία ακουστικών κυμάτων όγκου (bulk acoustic wave, BAW) ή μικροβαρόμετρο κρυστάλλου χαλαζία (quartz crystal microbalance, QCM) και οι αντηχεία ακουστικών κυμάτων επιφάνειας (surface acoustic wave, SAW) [86].

Ωστόσο, η εφαρμογή των βιοαισθητήρων μάζας στον τομέα της ανίχνευσης τροφιμογενών παθογόνων είναι γενικά μικρότερη από τους ηλεκτροχημικούς και οπτικούς βιοαισθητήρες [86]. Η χρήση πιεζοηλεκτρικού ανοσοαισθητήρα για την ανίχνευση της *Salmonella Enteritidis* με όριο ανίχνευσης 1×10^5 κύτταρα/mL [203] και την ανίχνευση της *Escherichia coli* με όριο ανίχνευσης 10^6 - 10^9 CFU/mL [204]. Η ανίχνευση του τοξινογόνου *Escherichia coli* O157:H7 με τη χρήση βιοαισθητήρα SAW αναφέρθηκε από τους Berkenpas και συνεργάτες [205]. Ο ανοσοαισθητήρας QCM χρησιμοποιήθηκε από τους Vaughan και συνεργάτες για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* και το όριο ανίχνευσης ήταν 1×10^7 κύτταρα/mL [206]. Επιπλέον, ο Liu και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν τον ανοσοαισθητήρα QCM για την ανίχνευση του *Escherichia coli* O157:H7 και το όριο ανίχνευσης ήταν 102 CFU/mL με χρόνο ανίχνευσης μικρότερο από 1,5 h [207].

2.4. Μέθοδοι που βασίζονται στην ανοσολογία

Η ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών με ανοσολογικές μεθόδους βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις αντισώματος-αντιγόνου, σύμφωνα με τις οποίες ένα συγκεκριμένο αντίσωμα συνδέεται με το συγκεκριμένο αντιγόνο. Η ισχύς πρόσδεσης ενός συγκεκριμένου αντισώματος στο αντιγόνο του καθορίζει την ευαισθησία και την εξειδίκευση των μεθόδων που βασίζονται στην ανοσολογία. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανοσολογία περιλαμβάνουν τη χρήση πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων [75]. Η ενζυμο-συνδεδεμένη ανοσορροφητική δοκιμασία (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) και η ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής είναι μεταξύ των μεθόδων που βασίζονται στην ανοσολογία και οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών.

Η ELISA είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ανοσολογικές μεθόδους για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Η ELISA τύπου Sandwich είναι η

πιο αποτελεσματική μορφή ELISA, κατά την οποία συμμετέχουν δύο αντισώματα [75]. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι συνήθως ακινητοποιημένο στα τοιχώματα των πηγαδιών της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Το αντιγόνο-στόχος, όπως τα βακτηριακά κύτταρα ή οι βακτηριακές τοξίνες από το δείγμα τροφίμων, δεσμεύεται στο ακινητοποιημένο πρωτογενές αντίσωμα και τα υπόλοιπα μη δεσμευμένα αντιγόνα απομακρύνονται. Στη συνέχεια, προστίθεται ένα δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο, το οποίο δεσμεύεται στο αντιγόνο και τα υπόλοιπα μη συνδεδεμένα αντισώματα απομακρύνονται. Σχηματίζεται το σύμπλοκο που αποτελείται από το αντιγόνο που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο αντισώματα και μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός άχρωμου υποστρώματος το οποίο θα μετατραπεί σε έγχρωμη μορφή παρουσία του ενζύμου [192]. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ενζύμων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ELISA, μερικά από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ένζυμα περιλαμβάνουν την υπεροξειδάση του χρένου (horseradish peroxidase, HRP), την αλκαλική φωσφατάση και τη β-γαλακτοσιδάση [208].

Πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί με τη χρήση της ELISA τύπου sandwich για την ταχεία ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, ο Kumar οι και συνεργάτες του πραγματοποίησαν την ανίχνευση του παθογόνου *Vibrio parahaemolyticus* σε θαλασσινά με ELISA τύπου sandwich, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της αιμολυσίνης που σχετίζεται με την TDH (TDH-related hemolysin, TRH) του παθογόνου *Vibrio parahaemolyticus*. Το όριο ανίχνευσης αυτής της ανάλυσης ήταν 103 κύτταρα παθογόνου *Vibrio parahaemolyticus* [209]. Για την ανίχνευση της *Salmonella* σε τρόφιμα διατίθεται επίσης εμπορικό kit δοκιμών ELISA, όπως το BIOLINE *Salmonella* ELISA Test. Το όριο ανίχνευσης αυτού του kit δοκιμών ήταν 1 CFU/25 g δείγματος με ελάχιστο αριθμό τεσσάρων από τις 20 μήτρες τροφίμων που εξετάστηκαν [210]. Η ELISA χρησιμοποιείται επίσης συνήθως για την ανίχνευση τοξινών που υπάρχουν στα τρόφιμα, όπως η τοξίνη α, β και ε του *Clostridium perfringens*, οι εντεροξίνες A, B, C και E του σταφυλόκοκκου, οι τοξίνες της αλλαντίασης και οι εντεροτοξίνες της *Escherichia coli* [211].

Για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών διατίθενται συστήματα ELISA υψηλής απόδοσης και αυτοματοποιημένα συστήματα ELISA, όπως το VIDAS (BioMerieux) και το Assurance EIA (BioControl) [212]. Το σύστημα ανοσοδιαγνωστικής ανάλυσης VITEK (VITEK immunodiagnostic assay system, VIDAS) είναι σύστημα που εκτελεί αυτόματα ολόκληρη τη διαδικασία ELISA. Χρησιμοποιεί συνδεδεμένη με ένζυμο ανοσοανάλυση φθορισμού (enzyme-linked fluorescent immunoassay, ELFA), η οποία είναι

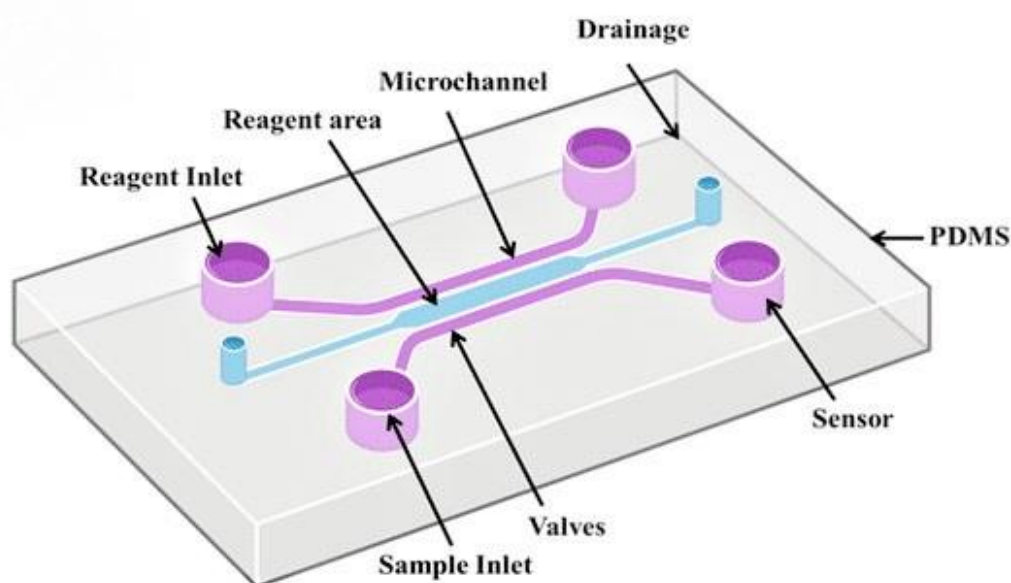
παρόμοια με την ELISA, αλλά είναι μια πιο ευαίσθητη ανοσοανάλυση φθορισμού για την αναφορά των αποτελεσμάτων. Γενικά, αυτό το σύστημα μπορεί να ολοκληρώσει μία ανάλυση σε 45 min έως 2 h, γεγονός που εξαρτάται επίσης από το kit εξέτασης. Το σύστημα VIDAS περιλαμβάνει τη χρήση ταινίας αντιδραστηρίου και ενός πλαστικού σωλήνα γνωστού ως δοχείο στερεάς φάσης (solid phase receptacle, SPR). Ένα υγρό δείγμα ενός εμπλουτισμένου δείγματος τοποθετείται στη λωρίδα αντιδραστηρίων που περιέχει όλα τα απαιτούμενα αντιδραστήρια σε μορφή έτοιμη προς χρήση. Το SPR χρησιμεύει ως πιπέτα και ως στερεά φάση για την ανάλυση. Το όργανο θα εκτελέσει ELFA μεταφέροντας αυτόματα το δείγμα στο SPR το οποίο είναι επικαλυμμένο με αντισώματα στο εσωτερικό τοίχωμά του προκειμένου να συλλάβει το παθογόνο ή την τοξίνη-στόχο. Στη συνέχεια, το SPR μεταφέρεται αυτόματα σε μία σειρά φρεατίων που περιέχουν συνδεδεμένα με ένζυμα δευτερογενή αντισώματα και ένζυμα με διαδοχικό τρόπο. Μόλις ολοκληρωθεί η δοκιμή, το αποτέλεσμα αναλύεται αυτόματα από το όργανο και ερμηνεύεται ως θετικό ή αρνητικό [213].

Αρκετές μελέτες εφάρμοσαν το VIDAS για την ανίχνευση της *Salmonella* σε δείγματα χοιρινού κρέατος, φρούτων και λαχανικών [214], της *Listeria monocytogenes* σε δείγματα ψαριών, μοσχαριού, χοιρινού κρέατος, φρούτων και λαχανικών [215], της *Escherichia coli* O157:H7 σε τυρί Minas Frescal, φρούτα και λαχανικά [216], του *Campylobacter spp.* σε φρούτα και λαχανικά [215] και σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη σε τυρί από νωπό γάλα [217].

2.5. Μέθοδοι με βάση τις συσκευές μικρορευστομηχανικής (microfluidic chips)

Τα microfluidic chips ή microfluidic devices κατασκευάζονται συνήθως από πυρίτιο, γυαλί, χαλαζία ή θερμοπλαστικά υλικά. Στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται τεχνικές μικροεπεξεργασίας για την ενσωμάτωση μικροβαλβίδων, μικροαντλιών, μικροαναμικτήρων, μικροηλεκτροδίων σε ένα chip μικρο/νανοκλίμακας, ώστε να δημιουργηθεί ένα σύστημα που μοιάζει με δίκτυο και μπορεί να επιτύχει την προεπεξεργασία, την ανάμιξη, την αντίδραση, το διαχωρισμό ή την ανίχνευση του δείγματος, κάτι που δεν είναι δυνατό στα παραδοσιακά εργαστήρια [218]. Η μικρορευστομηχανική διαθέτει αρκετούς διαφορετικούς τύπους βασικών δομών ανάμιξης. Για παράδειγμα, αναπτύχθηκε ένα σύστημα μικρορευστομηχανικής ποσοτικής PCR

φθορισμού με πνευματική βαλβίδα και δομή δέντρου με τη χρήση τεχνολογίας τρισδιάστατης εκτύπωσης. Λόγω της καλής ομοιομορφίας της θερμοκρασίας και της θερμικής αγωγιμότητας των microfluidic chips με βάση την PCR, η ταχεία ανίχνευση του νουκλεϊκού οξέος του ιού της ηπατίτιδας Β σε δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε σε 50 min [219]. Επί του παρόντος, η σμίκρυνση, η ενσωμάτωση και η αυτοματοποίηση αυτών των συσκευών σε συνδυασμό με τις πολλαπλές διεργασίες έχουν καταστήσει τα microfluidic chips δημοφιλείς επιλογές για χρήση σε ένα ευρύ φάσμα τομέων.



Εικόνα 5 Διαγραμματική αναπαράσταση του microfluidic chip https://www.researchgate.net/figure/A-Diagrammatic-representation-of-the-microfluidic-chip-B-type-of-microfluidic-chips-and-fig1_355657151

Γενικά, οι παραδοσιακές τεχνικές καλλιέργειας μικροβίων απαιτούν τη χρήση σωλήνων, τρυβλίων καλλιέργειας, πλακών πολλαπλών τοιχωμάτων και φιαλών, γεγονός που καθιστά την ανίχνευση βακτηρίων πιο περίπλοκη. Ωστόσο, ο Wang και οι συνεργάτες του συνδύασαν μόνο μία μικρορευστομηχανική πλατφόρμα εμπλουτισμού με βάση το νανοδιηλεκτροφορητικό σύστημα με επιφανειακή σκέδαση Raman (surfaced-enhanced Raman scattering, SERS) για την επιτυχή και αυτόματη παρακολούθηση της *Escherichia coli* O157:H7 στο πόσιμο νερό (η ανίχνευση περιορίστηκε σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου) [220]. Ο Wan και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν επίσης ένα ψηφιακό μικρορευστικό σύστημα βασισμένο στην LAMP για την ανίχνευση παθογόνων νουκλεϊκών οξέων [221]. Σε αυτό το πείραμα, απαιτήθηκε μόνο 1 μL δείγματος αντίδρασης LAMP που ανήκε σε καθαρισμένο DNA του *Trypanosoma cruzi*, το οποίο μείωσε κατά 10 φορές την κατανάλωση αντιδραστήριου σε σύγκριση με τη συμβατική LAMP. Εάν το δείγμα της

LAMP είναι άγνωστο, μπορεί επίσης να ολοκληρωθεί σε 40 min με όριο ανίχνευσης τα 10 αντίγραφα/αντίστροφο. Επιπλέον, το σύστημα μπορεί να ρυθμιστεί θερμικά σε πραγματικό χρόνο, γεγονός που είναι δυνατό για τη μικροσκοπική, φορητή και επιτόπια εφαρμογή στην ανίχνευση βακτηρίων στο μέλλον [221]. Ωστόσο, προκειμένου να μειωθεί το κόστος και να βελτιωθεί η φορητότητα της ανίχνευσης, έχουν εφαρμοστεί υλικά υψηλής απόδοσης, όπως τα microfluidic chips με βάση το χαρτί. Ο Jokerst και οι συνεργάτες του σχεδίασαν μία συσκευή ανάλυσης με βάση το χαρτί για την ανίχνευση των *E. coli O157:H7*, *Salmonella Typhimurium* και *Listeria monocytogenes* [222]. Το χαρτί που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του μικρορευστοποιημένου συστήματος ήταν η εκτύπωση κεριού σε διηθητικό χαρτί, η οποία επιτεύχθηκε με τη μέτρηση της χρωματικής αλλαγής της απόκρισης του ενζύμου που σχετίζεται με το παθογόνο που μας ενδιαφέρει στο χρωμογόνο υπόστρωμα. Όταν συνδυάστηκε με μία διαδικασία εμπλουτισμού, η μέθοδος επέτρεψε χρόνο εμπλουτισμού 12 h ή λιγότερο και ήταν σε θέση να ανιχνεύσει τα βακτήρια στο κρέας σε όριο ανίχνευσης 10 μονάδων που σχηματίζουν αποικίες/cm² [222].

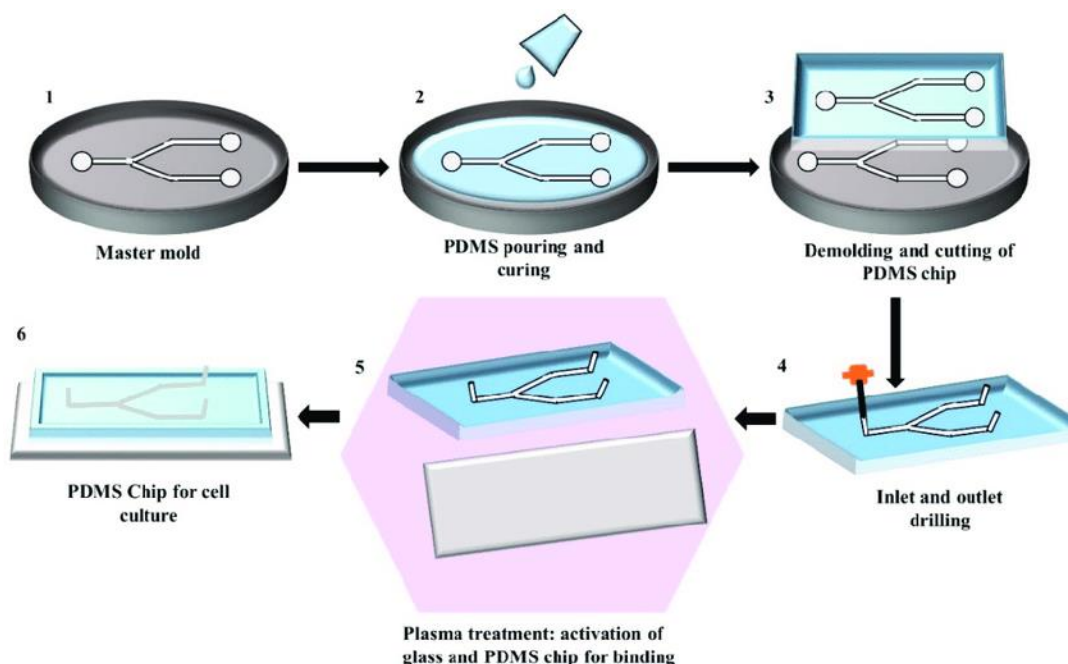
2.5.1. Microfluidic chips

Τα microfluidic chips (devices) αναφέρονται στην επιστήμη και την τεχνολογία των συστημάτων που επεξεργάζονται ή χρησιμοποιούν πολύ μικρούς όγκους υγρών σε κανάλια με διαστάσεις δεκάδων έως εκατοντάδων μικρομέτρων [223]. Η μικρορευστομηχανική περιγράφεται επίσης ως lab-on-a-chip (LOC) ή μικροσκοπικά συστήματα ολικής ανάλυσης (miniaturized total analysis systems, μ -TAS), τα οποία ενσωματώνουν την προετοιμασία του δείγματος, την αντίδραση, τον διαχωρισμό, την ανίχνευση και άλλες βασικές λειτουργικές μονάδες σε ένα chip κλίμακας εκατοστού με δίκτυο μικροκαναλιών [224]. Η μικρορευστομηχανική είναι ένα διεπιστημονικό πεδίο, που περιλαμβάνει πτυχές της φυσικής, της χημείας, της μηχανικής και της βιοτεχνολογίας [225]. Λόγω των χαρακτηριστικών της ηλεκτρο-υδροδυναμικής με μικρές παραμέτρους μεγέθους και μικρούς χρόνους ανίχνευσης, της ηλεκτροδυναμικής και των θερμικών τριχοειδών φαινομένων, έχουν αναπτυχθεί μικρορευστομηχανές για την αντιμετώπιση συγκεκριμένων επιστημονικών προβλημάτων που δεν μπορούν να επιλυθούν εύκολα με παραδοσιακές τεχνικές [226].

Ο Manz και οι συνεργάτες του πρότειναν πρώτοι την έννοια του συστήματος συνολικής μικροανάλυσης (μ -TAS) [227]. Το 1992, η τεχνολογία μικρο-ηλεκτρομηχανικής

κατεργασίας χρησιμοποιήθηκε για τη χάραξη μικρο-σωλήνων σε επίπεδο γυαλί για την παρασκευή μίας συσκευής τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης chip, και η συσκευή πραγματοποίησε το διαχωρισμό αμινοξέων σημασμένων με φθορισμό και ήταν πρωτοπόρος στην τεχνολογία μικρορευστομηχανικών chip [228]. Το 1995, ο Woolley και ο Mathies πραγματοποίησαν με επιτυχία αλληλούχιση DNA χρησιμοποιώντας το δικό τους σύστημα chip ηλεκτροφόρησης, διαβάζοντας 150 βάσεις σε 540s με ποσοστό ακρίβειας 97% [229]. Στη συνέχεια, ο Woolley και οι συνεργάτες του ενσωμάτωσαν την PCR και την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση σε ένα μικρορευστικό chip, διευκολύνοντας τη γενετική ανάλυση [230]. Το 1998, οι Brahmasandra και συνεργάτες χρησιμοποίησαν την τεχνολογία φωτολιθογραφίας για να κατασκευάσουν ένα microfluidic chip που περιλάμβανε έναν δειγματολήπτη υγρών, έναν αναμίκτη, ένα σύστημα τοποθέτησης, έναν θάλαμο αντίδρασης ελεγχόμενης θερμοκρασίας, ένα σύστημα διαχωρισμού ηλεκτροφόρησης και ένα σύστημα ανιχνευτή φθορισμού για ανάλυση DNA [231]. Το 2000, ο Anderson και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν ένα εξαιρετικά ολοκληρωμένο chip που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία μίας σειράς πολύπλοκων διαδικασιών για πολλαπλά δείγματα και η συσκευή αυτή εφαρμόστηκε για την εξαγωγή συμπτκνωμένων νουκλεϊκών οξέων από ένα υγρό δείγμα για μικροκρυσταλλική χημική ενίσχυση, ενζυμική αντίδραση, υβριδισμό, ανάμιξη και μέτρηση, επιτρέποντας περισσότερες από 60 διαδοχικές λειτουργίες μίας δωδεκάδας αντιδραστηρίων [232].

Οι συσκευές μικρορευστομηχανικής λειτουργούν κυρίως με το χειρισμό ρευστών σε μικροκατασκευασμένες δομές καναλιών και θαλάμων. Επιπλέον, η μικρορευστομηχανική μπορεί να συνδυαστεί με διάφορες τεχνικές ανίχνευσης, όπως η PCR, η LAMP, η φασματοσκοπία μάζας ή η φασματοσκοπία φθορισμού, για την ανίχνευση αναλυτών εντός ή μετά το chip [233]. Τα microfluidic chips ή microfluidic devices κατασκευάζονται από πυρίτιο, γυαλί, χαλαζία, οργανικά πολυμερή και σύνθετα υλικά με τεχνολογία μικροκατασκευής. Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται η διαδικασία παρασκευής μικρορευστομηχανών από πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (polydimethylsiloxane, PDMS). Έχουν αναπτυχθεί στη βιομηχανία τροφίμων chip μικρορευστομηχανικής με βάση το χαρτί με χαμηλό κόστος, φορητότητα και εύκολη λειτουργία [234]. Η επιλογή ενός συγκεκριμένου υλικού για μία συσκευή είναι σημαντική για τις λειτουργίες της.



Εικόνα 6 Διαδικασία παρασκευής συσκευών μικρορευστομηχανικής από πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο https://www.researchgate.net/figure/Illustration-of-the-step-by-step-fabrication-process-of-a-PDMS-chip-by-replica-moulding_fig1_346217022

Σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους, όπως η PCR, η ενζυμική ανοσοπροσρόφηση ή οι ανιχνευτές DNA, οι συσκευές μικρορευστομηχανικής επιτρέπουν τον ευέλικτο συνδυασμό πολλαπλών λειτουργικών μονάδων και τη συνολική δυνατότητα ελέγχου, έτσι ώστε ορισμένα στάδια, όπως η προεπεξεργασία του δείγματος, η ανάμιξη ή η αντίδραση, να μπορούν να ενσωματωθούν σε ένα μόνο chip. Επιπλέον, επειδή η δομή των καναλιών στο chip είναι κλίμακας μικρομέτρων ή ακόμη και νανοκλίμακας, έχει υψηλή ειδική επιφάνεια, υψηλό συντελεστή διάχυσης και γρήγορη μεταφορά θερμότητας, επιταχύνοντας αποτελεσματικά την αντίδραση στα κανάλια και μειώνοντας σημαντικά τον συνολικό χρόνο ανάλυσης [235]. Για παράδειγμα, ο Zhang και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν ένα νέο μικρορευστικό chip καθαρισμού νουκλεϊκών οξέων υγρής φάσης που μπορεί να διαχωρίσει επιλεκτικά DNA ή RNA από 5000 μL σε μονοκύτταρα βακτηριακά κύτταρα [192]. Ο όγκος του δείγματος είναι μόνο 1 μL ή 125 nL, το οποίο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί άμεσα από ένα chip σε περίπου 30 λεπτά. Έτσι, αυτές οι μικρές συσκευές απαιτούν επίσης πολύ μικρότερες ποσότητες αντιδραστηρίων και δειγμάτων, γεγονός που μειώνει σημαντικά το κόστος ανίχνευσης και επιτρέπει τη γρήγορη και χαμηλού κόστους ανίχνευση. Παρόλα αυτά, η μικρορευστομηχανική τεχνολογία έχει τα δικά της μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, δεν υπάρχει επιδέξια και ώριμη τεχνική για την προετοιμασία ενός καλού μικρορευστομηχανικού συστήματος και υπάρχει έλλειψη καλών και τέλειων υλικών

προετοιμασίας. Συνολικά, τα πλεονεκτήματα της τεχνολογίας των microfluidics προσδίδουν πολλά υποσχόμενες δυνατότητες για διαλογή υψηλής απόδοσης, περιβαλλοντική παρακολούθηση, κλινική παρακολούθηση, επιτόπια ανάλυση και εφαρμογές αλληλούχισης DNA.

2.5.2. Η χρήση των *microfluidic chips* στην ανάλυση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό ορισμένων πειραματικών δειγμάτων είναι σχετικά απλές μόνο για ένα συστατικό. Ωστόσο, για πρακτική χρήση, τα πολύπλοκα δείγματα και η μεταβλητότητα των περιβαλλοντικών συνθηκών μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένη ευαισθησία και εξειδίκευση της μικρορευστομηχανικής τεχνολογίας, οπότε θα πρέπει να σχεδιαστεί μία συσκευή για την ανάλυση πιο πολύπλοκων δειγμάτων, όπως το έδαφος, τα λύματα ή τα δείγματα τροφίμων [236]. Λόγω του ότι οι φυσικές και χημικές ιδιότητες κάθε συστατικού προς εξέταση στο δείγμα μπορεί να μην διαφέρουν πολύ από εκείνες των μεμονωμένων συστατικών (όπως η ανίχνευση διαφορετικών βακτηρίων), μπορεί να είναι δύσκολο να επιτευχθεί ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών συστατικών. Επιπλέον, η ποικιλία και η περιεκτικότητα άλλων ουσιών σε πολύπλοκα υποστρώματα τροφίμων μπορεί να παρεμποδίσει την ανίχνευση και να μειώσει την ακρίβεια της ανάλυσης. Για παράδειγμα, εάν ο στόχος είναι η ανίχνευση *E. coli* σε δείγματα τροφίμων, υπάρχουν σίγουρα περισσότερα από ένα είδη βακτηρίων σε αυτό το συμπυκνωμένο δείγμα. Έτσι, προκειμένου να εξαλειφθούν αυτές οι παρεμβολές, μπορούν να ενσωματωθούν στο σύστημα ανίχνευσης ορισμένα ειδικά μόρια βιοαναγνώρισης. Με την αύξηση της συγκέντρωσης και της εξειδίκευσης του δείγματος διευκολύνεται η ανίχνευση των συστατικών από πολύπλοκα μείγματα.

Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι μικρορευστομηχανικών συστημάτων για την ανίχνευση βακτηριακών παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο, τα περισσότερα συστήματα μικρορευστομηχανικής χρειάζονται πολύπλοκα στάδια συγκέντρωσης. Ο Jokerst και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μία τεχνική chip μικρορευστομηχανικής με βάση το χαρτί για την ανίχνευση των *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* και *Salmonella* σε έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα κρέατος, με βάση την αλλαγή της έντασης του χρώματος του συστήματος μετά την αντίδραση ειδικών ενζύμων που εκκρίνονται από τα βακτήρια με υποστρώματα, με το LOD των *E. coli*, *L. monocytogenes* και *Salmonella* να είναι 106, 108 και 104 CFU/mL, αντίστοιχα [222]. Το παρασκευασμένο microfluidic chip με βάση το

χαρτί μπορεί να ανιχνεύσει τα παθογόνα βακτήρια με συγκέντρωση τόσο χαμηλή όσο 101 CFU/mL σε έτοιμο προς κατανάλωση κρέας σε 12 h ή λιγότερο, και η περίοδος ανίχνευσης ήταν σημαντικά μικρότερη από εκείνη της μεθόδου με χρυσή σήμανση, η οποία έφθασε το εύρος ανίχνευσης της τυπικής μεθόδου και συντομεύει σημαντικά τον χρόνο ανίχνευσης σε σύγκριση με την παραδοσιακή ιατρική μέθοδο. Ένας τρισδιάστατος μικρορευστικός μαγνητικός προσυγκεντρωτής (3DμFMP), ο οποίος δεν χρειάζεται εξαρτήματα, έχει αναπτυχθεί για την ανίχνευση του *E. coli* O157: H7. Η συσκευή θα μπορούσε να ανιχνεύσει το *E. coli* O157: H7 σε μεγάλο όγκο διαλύματος δείγματος με το φωτόμετρο ATP, σε ποσοστό μόλις 10 CFU *E. coli* O157: H7 (μονάδα σχηματισμού αποικιών)/mL. Θα μπορούσε να συσσωρεύσει επιλεκτικά EHEC O157: H7 σε συγκέντρωση 700 φορές σε μία ώρα. Τα αποτελέσματα αυτά απέδειξαν τη σκοπιμότητα του 3DμFMP ως προσυγκεντρωτή για τη βελτίωση του ορίου ανίχνευσης του υπάρχοντος συστήματος ανίχνευσης βακτηρίων. Οι Li Tianchan και οι συνεργάτες του συνδύασαν την ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση βρόχου (LAMP) που βασίζεται σε microfluidic chip με έναν πολυστρωματικό βιοαισθητήρα νανοσωλήνων άνθρακα (CNT) για την ανίχνευση του *E. coli* O157: H7 [235]. Μετά την καλλιέργεια του *E. coli*, τα συλληφθέντα βακτήρια θα μπορούσαν να απελευθερωθούν ανάλογα με τις ανάγκες με τη διακοπή της αλληλεπίδρασης μεταξύ του αντισώματος anti-*E. coli* O157: H7 και των βακτηρίων. Τα πολυστρωματικά στρώματα νανοσωλήνων άνθρακα με λειτουργικό αντίσωμα θα μπορούσαν να συλλάβουν, να καλλιεργήσουν και να απελευθερώσουν βακτήρια επιλεκτικά και στη συνέχεια αναλύθηκαν τη συγκέντρωση DNA των βακτηρίων που απελευθερώθηκαν με το microfluidic chip LAMP. Η προτεινόμενη πλατφόρμα ανίχνευσης ήταν ικανή να ανιχνεύει συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 1 CFU/mL, η οποία είναι πολύ πιο ευαίσθητη από την προηγουμένως αναφερθείσα μέθοδο. Η πλατφόρμα ανίχνευσης έχει τα πλεονεκτήματα του χαμηλού κόστους και της εύκολης λειτουργίας και αποτελεί μία πιθανή πλατφόρμα για την ανίχνευση του *E. coli* O157: H7 στην ασφάλεια των τροφίμων.

Η κύρια αιτία της χαμηλής αναπαραγωγιμότητας ή της αδυναμίας των συσκευών μικρορευστομηχανικής να ανιχνεύσουν σε πολύπλοκα υποστρώματα τροφίμων οφείλεται στη συγκέντρωση των αναλυτών κάτω από το όριο ανίχνευσης. Συνεπώς, απαιτείται ο διαχωρισμός και ο εμπλουτισμός των στόχων από μία μήτρα τροφίμων για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των αναλυτών. Η συγκέντρωση του δείγματος μπορεί να βελτιωθεί με διάφορες τεχνικές, όπως μαγνητικά σφαιρίδια ή μεμβράνες φίλτρου. Μεταξύ αυτών, τα μαγνητικά σφαιρίδια έχουν γενικά ανώτερο παραμαγνητισμό, όπως το

Fe₃O₄, το οποίο είναι σε θέση να διαχωριστεί από το προς εξέταση δείγμα με τη βοήθεια ενός μαγνητικού πεδίου και μίας πλούσιας επιφανειοδραστικής ομάδας. Οι μεμβράνες διήθησης κατασκευάζονται συνήθως από διάφορα πολυμερή υπερυψηλής απόδοσης, τα οποία έχουν αντοχή σε οξέα και αλκάλια ή αντοχή στην οξείδωση για να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός και ο καθαρισμός των δειγμάτων. Επιπλέον, δεδομένου ότι η αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα μικρορευστοειδές σύστημα, οι διάφορες μέθοδοι έγχυσης μπορούν να βελτιώσουν τη συγκέντρωση του στόχου [237].

Ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (Immunomagnetic separation, IMS) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη συγκέντρωση βακτηριακών κυττάρων που υπάρχουν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, αλλά είναι κατάλληλος μόνο για δείγματα μικρού όγκου (π.χ. 1 mL), που είναι πολύ μικρότερος από τον μεγάλο όγκο της καλλιέργειας εμπλουτισμού (π.χ. 250 mL). Για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος, οι Ganesh και συνεργάτες ενσωμάτωσαν τον IMS βακτηριακών κυττάρων σε μικρορευστομηχανές για τον προσυγκέντρωση δειγμάτων όγκου 50 mL [238]. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε PCR για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση της *E. coli* O157:H7 σε λιγότερο από 2 h. Αυτή η πλατφόρμα μείωσε τόσο τον απαιτούμενο όγκο δείγματος όσο και τον συνολικό χρόνο της αντίδρασης. Ο Oh και οι συνεργάτες του συνδύασαν την LAMP με μία συσκευή φυγοκεντρικής μικρορευστομηχανής σε σχήμα δίσκου για την επιτυχή ανίχνευση τεσσάρων τροφιμογενών παθογόνων (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio parahaemolyticus* και *Listeria monocytogenes*) σε μολυσμένα δείγματα γάλακτος με βακτήρια [239]. Η χρήση του Eriochrome Black T (EBT) στο σύστημα επέτρεψε τη χρωματομετρική ανίχνευση της αντίδρασης LAMP και η διαδικασία αυτή επέτρεψε την πλήρως αυτοματοποιημένη ανίχνευση βακτηρίων με όριο ανίχνευσης 10 βακτηριακών κυττάρων σε 65 min. Ωστόσο, η χρωματομετρική μέτρηση αυτής της πλατφόρμας αναγνωρίζεται με γυμνό μάτι, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει ορισμένα σφάλματα στην ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων. Για το λόγο αυτό, οι Sayad και συνεργάτες χρησιμοποίησαν την καλσεΐνη ως δείκτη και τη συνδύασαν με LAMP για μία γονοτυπική ανάλυση οκτώ στελεχών των τροφιμογενών παθογόνων *E. coli* O157:H7, *Salmonella* και *Vibrio cholerae*, για ένα σύνολο 24 παθογόνων βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν [240]. Το αποτέλεσμα της χρωματομετρικής μεθόδου αναλύθηκε και διαβιβάστηκε σε smartphone με τη χρήση ενός αναπτυγμένου ηλεκτρονικού συστήματος που διασυνδέθηκε με την ασύρματη τεχνολογία bluetooth σε 60 min. Το σύστημα αυτό αποφεύγει τα τεχνητά υποκειμενικά σφάλματα και επιτυγχάνει μία πλήρως αυτοματοποιημένη, γρήγορη και

επιτόπια εξέταση.

Στα παραπάνω πειράματα χρησιμοποιούνται ειδικά υλικά για την ανίχνευση βακτηρίων, αλλά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν μεμβράνες φίλτρου νανοδιήθησης για την αύξηση της συγκέντρωσης του στόχου. Οι Li και συνεργάτες χρησιμοποίησαν μία μονάδα μεμβρανών κοίλης ίνας από πολυσουλφόνη για τον διαχωρισμό και τη συγκέντρωση βακτηριακών κυττάρων από ομογενοποιημένα προϊόντα κοτόπουλου σε μικροδιήθηση διασταυρούμενης ροής [241]. Αυτό το ειδικό σύστημα μικρορευστοποίησης μπορεί να ανακτήσει αποτελεσματικά το 70% των αναλυτών στο μείγμα σε 30-45 min, βελτιώνοντας σημαντικά τη συγκέντρωση των αναλυτών και μειώνοντας τον πειραματικό χρόνο (περίπου 6 ώρες στη βιομηχανία) [241]. Ωστόσο, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και ειδικά κανάλια έγχυσης. Για παράδειγμα, οι Shu και συνεργάτες ενσωμάτωσαν πολλαπλά στάδια PCR σε συσκευές μικρορευστομηχανικής προετοιμάζοντας ειδικά κανάλια συνεχούς ροής. Με αυτή την ειδική συσκευή, τα γονίδια των *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 και *S. aureus* μπορούσαν να ενισχυθούν και να ανιχνευθούν ταυτόχρονα από δείγματα μπανάνας, γάλακτος και αλλαντικών. Το όλο πείραμα απαιτούσε μόνο 19 min, με όριο ανίχνευσης μόλις 102 αντίγραφα/μL [242].

Ακόμα και αν η συγκέντρωση των αναλυτών μπορεί να αυξηθεί, η ανίχνευση του στόχου παρουσία κάποιων παρόμοιων συστατικών αποτελεί πρόκληση. Ως εκ τούτου, απαιτούνται κάποιοι βιοδείκτες ικανοί να αναγνωρίζουν ειδικά τον αναλύτη για να επιτευχθεί η ταχεία και ακριβής ανίχνευση του στόχου. Τα αντισώματα είναι ένα από τα πιο κοινά μόρια βιοαναγνώρισης. Οι Savas και συνεργάτες χρησιμοποίησαν έναν βιοαισθητήρα-συζευγμένο αντίσωμα σε νανοσωματίδια χρυσού για την επιτυχή ανίχνευση της *Salmonella* από δείγματα ανθρώπινων κοπράνων [243]. Ο πλήρως αυτοματοποιημένος μικρορευστομηχανικός ηλεκτροχημικός αισθητήρας επέτρεψε την ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση της *Salmonella*, σε μικτά δείγματα, σε ποσοστό μόλις 1 CFU/mL, μέσω μίας ειδικής αντίδρασης μεταξύ του ειδικού αντισώματος και του αντιγόνου στην επιφάνεια των βακτηρίων [243]. Ως εναλλακτική λύση στα αντισώματα, οι απταμερείς είναι μονόκλωνα μόρια νουκλεϊνικών οξέων που είναι σταθερά, εύκολα στη σύνθεση και φθηνότερα από τα αντισώματα. Τα απταμερή μπορούν επίσης να δεσμεύουν ειδικά μόρια-στόχους και μπορούν να τροποποιηθούν με διάφορες φθορίζουσες χρωστικές ή άλλες ετικέτες. Οι Wu και συνεργάτες διαχώρισαν και συμπύκνωσαν για πρώτη φορά αναλυτές από ένα μικτό διάλυμα χρησιμοποιώντας την ιδιότητα των μαγνητικών νανοσωματιδίων Fe₃O₄ [244]. Στη συνέχεια, σύμφωνα με την εξειδίκευση του απταμερούς διαφορετικών βακτηρίων,

χρησιμοποιήθηκαν χρωματικά μεταβαλλόμενα ανοδικά νανοσωματίδια συζευγμένα με διαφορετικά απταμερή ως ανιχνευτής σήματος για την ανίχνευση τριών αντίστοιχων παθογόνων βακτηρίων. Η χρωματική αλλαγή του σύνθετου σύνθετου νανοσωματιδίου που μετατρέπει το χρώμα σε πολλαπλά χρώματα έδειχνε εάν τα βακτήρια υπήρχαν στο μείγμα, ώστε να επιτευχθεί ταυτόχρονη, ευαίσθητη και επιλεκτική ανίχνευση [244].

Οι λεκτίνες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως μόρια βιοαναγνώρισης. Οι Kang και συνεργάτες μελέτησαν διαφορετικά μεγέθη μαγνητικών νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με λεκτίνες για τη σύλληψη παθογόνων βακτηρίων από μικτά διαλύματα [245]. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι τα μαγνητικά νανοσωματίδια με ακτίνα 250 nm ήταν η πιο αποτελεσματική μέθοδος για το διαχωρισμό και την ανίχνευση του *S. aureus* σε ένα μικτό διάλυμα (102 CFU/mL) [245]. Σε μία άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κονκαναβαλίνη A (concanavalin A, ConA), μία λεκτίνη που δεσμεύει μαννόζη/γλυκόζη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση λιποπολυσακχαριτών που εκτίθενται σε βακτηριακές επιφάνειες. Οι Dao και συνεργάτες συνδύασαν chip μικρορευστομηχανικής με λειτουργικότητα ConA με LAMP για τη σύλληψη και τον εμπλουτισμό *Salmonella Typhimurium* σε δείγματα ούρων (10 mL). Μέσω αυτού του ολοκληρωμένου συστήματος, η ανίχνευση *Salmonella Typhimurium* χωρίς ετικέτες, γρήγορα και σε πραγματικό χρόνο με συγκέντρωση μόλις 5 CFU/mL ολοκληρώθηκε σε 100 min [246].

2.5.3. Συνδυασμός μικρορευστομηχανικής με άλλες τεχνολογίες

Για τρόφιμα ή άλλα πολύπλοκα περιβαλλοντικά δείγματα, η απόκτηση των αναλυτών μπορεί να είναι δύσκολη ή μπορεί να είναι δύσκολο να ενσωματωθούν πλήρως οι διαδικασίες διαχωρισμού και ανίχνευσης σε ένα μόνο μικρορευστικό chip [247]. Ειδικότερα, εάν οι φυσικές και χημικές ιδιότητες κάθε συστατικού που πρόκειται να εξεταστεί στο δείγμα είναι παρόμοιες, ενδέχεται να είναι δύσκολη η ταυτόχρονη διάκριση και ανίχνευση διαφόρων ουσιών. Οι μελλοντικές εργασίες θα πρέπει να στοχεύουν στη μείωση της προεπεξεργασίας ή στο συνδυασμό των βημάτων προεπεξεργασίας με την ανίχνευση για την ανάλυση των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Η επιτυχής εφαρμογή εξαρτάται κυρίως από την υψηλή αποδοτικότητα, την υψηλή ταχύτητα και την αυτοματοποίηση της τεχνολογίας μικρορευστοποίησης, σε συνδυασμό με διάφορες τεχνολογίες, όπως ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες, οπτικούς βιοαισθητήρες, ανοσολογικές αναλύσεις και μεθόδους που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα [248].

Ένας πολλά υποσχόμενος τύπος κατασκευής microfluidics, ο οποίος μπορεί να είναι κατάλληλος για τον τομέα της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων, είναι οι μικρορευστομηχανές ανάλυσης με βάση το χαρτί (μPADs). Οι μPADs παρουσιάστηκαν για πρώτη φορά το 2007 και έχουν αναφερθεί ως μία οικονομικά αποδοτική, αποτελεσματική, ευαίσθητη, σε πραγματικό χρόνο και χωρική μέθοδος ανίχνευσης σε σύγκριση με άλλες συμβατικές μεθόδους παρακολούθησης μικροβίων. Λόγω του πορώδους του, το χαρτί παρέχει πλεονεκτήματα έναντι άλλων μη πορωδών υλικών στην ανάπτυξη των μPADs. Δεδομένου ότι το ρευστό μεταφέρεται μέσω του χαρτιού με τριχοειδείς δυνάμεις, τα μPADs δεν απαιτούν άντληση για να λειτουργήσουν και, επομένως, δεν χρειάζονται εξωτερική πηγή ενέργειας [249].

Η μέθοδος εκτύπωσης με κερί αποτελείται από δύο ξεχωριστά στάδια, το σχεδιασμό της εκτύπωσης σε επιφάνεια χαρτιού κυτταρίνης με τη χρήση εκτυπωτή κεριού ή εκτυπωτή λέιζερ και την τήξη του εκτυπωμένου κεριού με τη χρήση είτε μίας θερμαντικής πλάκας είτε ενός συμβατικού φούρνου, η οποία παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα επιτρέποντας τη διάχυση του κεριού στο χαρτί και δημιουργώντας ένα φράγμα κεριού [250]. Το φράγμα αυτό είναι υδρόφοβο, κατευθύνοντας έτσι το διάλυμα που πρέπει να εντοπιστεί στην επιθυμητή περιοχή. Η εφαρμογή κεροτυπωμένων μPADs είναι βολική, απλή και γρήγορη διαδικασία, φιλική προς το περιβάλλον και καταλληλότερη για την παραγωγή μαζικών ποσοτήτων συσκευών με το χαμηλότερο δυνατό κόστος. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή παρουσιάζει χαμηλή ανάλυση και απαιτείται ένα πρόσθετο στάδιο (θέρμανση του χαρτιού κυτταρίνης) μετά την εναπόθεση κεριού. Επιπλέον, ο ακριβής όγκος και η ταχύτητα ροής του υγρού δεν μπορούν να ελεγχθούν εύκολα [251].

Η μέθοδος κοπής χαρτιού μπορεί να χρησιμοποιηθεί (α) με τροποποίηση της δομής του χαρτιού με χρήση κοπτικού μηχανήματος CO₂ laser ελεγχόμενου από υπολογιστή [252], (β) με κοπή του χαρτιού πάνω σε μεμβράνη από υαλοβάμβακα με κοινό κοπτικό μηχανήμα, χρησιμοποιώντας μεμβράνες από υαλοβάμβακα και φύλλο PVC (πολυβινυλοχλωρίδιο), ή (γ) με αναδίπλωση και ξεδίπλωση του χαρτιού με το χέρι προκειμένου να δημιουργηθεί μία τρισδιάστατη συσκευή σε ένα μόνο φύλλο χαρτιού [253]. Αυτή η μέθοδος κοπής χαρτιού είναι ακριβής και δεν απαιτεί επιπλέον αναλώσιμα. Ωστόσο, η εφαρμογή της μεθόδου απαιτεί ακριβά όργανα και παράγει μεγάλες ποσότητες αποβλήτων, επομένως είναι απαραίτητη μία ταινία κάλυψης για την αποφυγή της ρύπανσης και την αύξηση της στιβαρότητας της συσκευής.

Η φωτολιθογραφία αναφέρεται στην εκτύπωση μίας ακριβούς φωτομάσκας με τη βοήθεια ενός τρισδιάστατου εκτυπωτή. Σκοπός της συγκεκριμένης φωτομάσκας είναι να δημιουργηθούν τόσο υδρόφιλα κανάλια όσο και υδρόφοβα εμπόδια στο χαρτί [254]. Για να επιτευχθεί αυτό, το υδρόφοβο σιλάνιο του διαλύματος οκταδεκυλοτριγλωροσιλανίου πρέπει να συνδεθεί με τις ίνες του χαρτιού και στη συνέχεια να εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία μέσω της φωτομάσκας. Τα μPADs που βασίζονται στη φωτολιθογραφία είναι φθηνές, ελαφριές και απλές συσκευές με μικρορευστικά κανάλια υψηλής ανάλυσης, αλλά απαιτούν ακριβά όργανα και συχνά τοξικά αντιδραστήρια [255].

Η εκτύπωση με inkjet μπορεί να υλοποιηθεί με τη χρήση ενός ανακατασκευασμένου εκτυπωτή inkjet, προκειμένου να εκτυπωθεί το διάλυμα αλκενυλοκετενικού διμερούς-επτανίου πάνω σε μη επεξεργασμένο διηθητικό χαρτί, έτσι ώστε η εκτυπωμένη περιοχή να γίνει υδρόφοβη και κατά συνέπεια να μετατραπεί σε υδρόφοβο φράγμα, κατευθύνοντας το νερό στην επιθυμητή περιοχή. Προτάθηκε η εκτύπωση διπλής όψης μίας υδρόφοβης ακρυλικής σύνθεσης που ωριμάζει με υπεριώδη ακτινοβολία, στην οποία το μελάνι είναι απαλλαγμένο από πτητικές οργανικές ενώσεις (volatile organic compound, VOC) και εύκολα εύφλεκτες ουσίες, σύμφωνα με τις διαδικασίες πράσινης τεχνολογίας από την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ [256]. Τα κύρια πλεονεκτήματα αυτής της διαδικασίας κατασκευής είναι ότι είναι οικονομικά και χρονικά αποδοτική, απλή, εύχρηστη, με υψηλή ανάλυση, και επίσης ικανή να διαμορφώνει τόσο το χάρτινο υπόστρωμα όσο και την εναπόθεση των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για τη (βιο)χημική ανίχνευση, καθιστώντας την διαθέσιμη για την κατασκευή ολόκληρων μPADs σε μία μόνο συσκευή. Η συσκευή αυτή μπορεί να κατασκευαστεί μόνο με τροποποιημένους εκτυπωτές inkjet με διαφορετικούς τύπους μελανιών για κάθε εκτύπωση και όπως και στην περίπτωση της μεθόδου κατασκευής με εκτύπωση κεριού, απαιτεί ένα επιπλέον βήμα (θέρμανση του χαρτιού κυτταρίνης) μετά την εναπόθεση μελανιού [257].

Η εκτύπωση πολυ-δι-μεθυλο-σιλοξάνης (PDMS) είναι μία τεχνική χύτευσης, όπου ένα διάλυμα PDMS χρησιμοποιείται ως μάσκα χαρτιού λόγω της υδροφοβικότητάς του. Αυτό το διάλυμα λειτουργεί ως παράγοντας φραγμού που υποστηρίζει καλά ορισμένους διαλύτες, επιτρέποντας στη συσκευή να λειτουργεί σε πολλές εφαρμογές. Η κύρια διαδικασία περιλαμβάνει την τοποθέτηση της εκτυπωμένης μάσκας πάνω στο χαρτί, την προσθήκη του διαλύματος PDMS πάνω από τη μάσκα και τη θέρμανση στους 120°C για 30 min, ώστε να μπορέσει να διεισδύσει μέσα από το διηθητικό χαρτί [258]. Η εκτύπωση PDMS παρέχει οικονομικά αποδοτικές, απλές, μη τοξικές, φορητές και ευαίσθητες συσκευές χωρίς ρεύμα,

οι οποίες παρουσιάζουν υψηλότερη ανάλυση από άλλες μεθόδους κατασκευής και παρουσιάζουν χειρισμούς πολλαπλής ανίχνευσης. Ωστόσο, οι διαδικασίες που απαιτούνται για την κατασκευή των εκτυπωμένων με PDMS συσκευών περιλαμβάνουν πολλαπλά στάδια και, ως εκ τούτου, είναι ακατάλληλες για μαζική παραγωγή.

Η κατασκευή συσκευής με βάση το πλαστικοποιημένο χαρτί (Laminated paper-based device, LPAD) αποτελείται από τρεις ξεχωριστές ενέργειες. Πρώτον, σχεδιασμός του κατάλληλου χαρτιού (χρωματογραφίας) που θα χρησιμοποιηθεί και στη συνέχεια συνδυασμός του με δύο πρόσθετες μεμβράνες θερμικής συγκόλλησης από πολυεστέρα, οι οποίες καλύπτουν τόσο την επάνω όσο και την κάτω πλευρά του. Στη συνέχεια, και τα τρία ξεχωριστά μέρη περνούν από θερμαντικό ρολό πλαστικοποίησης για να συγκολληθούν μεταξύ τους. Η μέθοδος αυτή είναι φθηνή, απλή, απλή και οικονομικά αποδοτική, όπως και οι περισσότερες μέθοδοι κατασκευής συσκευών μικρορευστομηχανικής με βάση το χαρτί. Επιπλέον, η τεχνική πλαστικοποίησης χαρτιού ενισχύει τη μηχανική αντοχή και τη συνολική ανθεκτικότητα και ευελιξία των συσκευών [259]. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλου όγκου αποβλήτων και απαιτεί ειδικά όργανα, όπως πλάκες θέρμανσης.

Ένα μPAD που χρησιμοποιεί διηθητικό χαρτί και εκτυπωτή λέιζερ έχει αναπτυχθεί για την ανίχνευση της *Salmonella enterica* serovars Typhimurium (ψυχόμενη μετά από πλήρη καλλιέργεια σε συγκεντρώσεις 10^8 CFU/mL και σειριακή αραίωση), με όριο ανίχνευσης σε επίπεδο ενός κυττάρου [260]. Ένα άλλο μPAD εισήχθη με τη μέθοδο εκτύπωσης με λέιζερ [261]. Η συσκευή μπόρεσε να ανιχνεύσει ταυτόχρονα τόσο την *Escherichia coli* O157:H7 όσο και τη *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, με όρια ανίχνευσης 105 και 106, αντίστοιχα. Το 2018 κατασκευάστηκε επίσης ένα καινοτόμο μPAD χρησιμοποιώντας ένα μαξιλάρι PVC με διηθητικό χαρτί για την ανίχνευση του *Chronobacter* spp. [262]. Το όριο ανίχνευσης της συσκευής ήταν 10^{-1} cfu/cm² και ο χρόνος ανίχνευσης διαρκούσε 8-12h, με συνολικό κόστος μικρότερο από 0,15\$/συσκευή.

Ακόμη, κατασκευάστηκε μία συσκευή μικρορευστομηχανικής για την ανίχνευση των *E.coli* O157:H7, *L. monocytogenes* και *Salmonella enterica* serovar Typhimurium που εμβολιάζονται σε δείγματα κρέατος, με όριο ανίχνευσης 10 cfu/cm² [222]. Ο χρόνος ανίχνευσης για την ανάλυση των *Salmonella enterica* Typhimurium, *E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes* ήταν 8, 10 και 12 h, αντίστοιχα, πολύ κάτω από τους εκτιμώμενους χρόνους για τις καλλιεργημένες τεχνικές που κυμαίνονται μεταξύ 5-7 ημερών.

Αναπτύχθηκε μία συσκευή εκτύπωσης με κεριά για την ανίχνευση των *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* και *E. coli* σε γεωργικό νερό, με όριο ανίχνευσης 0,1cfu/mL και διάρκεια ανάλυσης 24 h [263]. Με βάση αυτό το σύστημα, τα βακτήρια ανιχνεύονται οπτικά με έγχρωμη ένδειξη. Κατασκευάστηκε ένα μPAD με τη μέθοδο εκτύπωσης κεριού για την ανίχνευση του *E. coli* σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού [264]. Η συσκευή ανέφερε την ανίχνευση παθογόνων με τη χρήση τροποποιημένης δοκιμής καταλάσης που παρείχε έγχρωμη ένδειξη ανάλογα με τη συγκέντρωση του *E. coli*. Ένα άλλο μPAD αναπτύχθηκε με τη μέθοδο της φωτολιθογραφίας ακολουθώντας τις ίδιες αρχές του χρωμογόνου υποστρώματος για την ανίχνευση παθογόνων. Η συσκευή δοκιμάστηκε σε διάφορα δείγματα τροφίμων (κορίανδρος, κέικ, γάλα, σπανάκι) και ήταν σε θέση να παρέχει αποτελέσματα σε 3-4 h με όριο ανίχνευσης 10^4 cfu/mL. Προτάθηκε ένα πλαστικοποιημένο μPAD για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* σε έτοιμα προς κατανάλωση θαλασσινά. Η διαδικασία ανάλυσης διαρκεί 4,5 h και έχει όριο ανίχνευσης 100 αντίγραφα DNA ανά 50 g δείγματος με εκτιμώμενο κόστος λιγότερο από 5 δολάρια ΗΠΑ ανά δείγμα [249].

2.5.4. Μελλοντικές προοπτικές και χρήσεις

Τα μPAD αναπτύσσονται από μικρορευστικά chip με βάση το χαρτί. Χρησιμοποιούν ειδικά υλικά για να σχεδιάσουν τα γραφικά των λειτουργικών μονάδων και των καναλιών στο χάρτινο υπόστρωμα, για να πραγματοποιήσουν την κατευθυνόμενη ροή του υγρού στα υδρόφιλα κανάλια με τη βοήθεια της τριχοειδούς δράσης ενός σκελετού κυτταρίνης. Το χαρτί δεν είναι μόνο φθινό και εύκολο στο χειρισμό, αλλά έχει επίσης καλύτερη βιοσυμβατότητα και παρέχει καλή αντίθεση φόντου για τις χρωματομετρικές αντιδράσεις. Το πρωτότυπο των χάρτινων μικρορευστοποιητικών chip ανάγεται στη δεκαετία του 1940, όταν η ερευνητική ομάδα του Muller χρησιμοποίησε παραφίνη για να σχηματίσει κανάλια σε διηθητικό χαρτί και παρατήρησε τη διάχυση και το διαχωρισμό ενός διαλύματος χρωστικής ουσίας στο χαρτί. Επιπλέον, η ανοσοχρωματογραφία, η οποία εμφανίστηκε τη δεκαετία του 1980, μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως μία από τις πρώτες τεχνολογίες μικρορευστοποίησης με βάση το χαρτί. Στις περισσότερες υπάρχουσες ανασκοπήσεις, η ερευνητική ομάδα του Whiteside στο Πανεπιστήμιο του Χάρβαρντ [265] αναγνωρίζεται ως η πρώτη ομάδα που ανέφερε chip μικρορευστομηχανική βασισμένα σε χαρτί. Μετά την αναφορά τους, έχουν εμφανιστεί συσκευές μικρορευστομηχανικής και συσκευές με διαφορετικές λειτουργίες και μεθόδους επεξεργασίας που βασίζονται στο χαρτί. Η

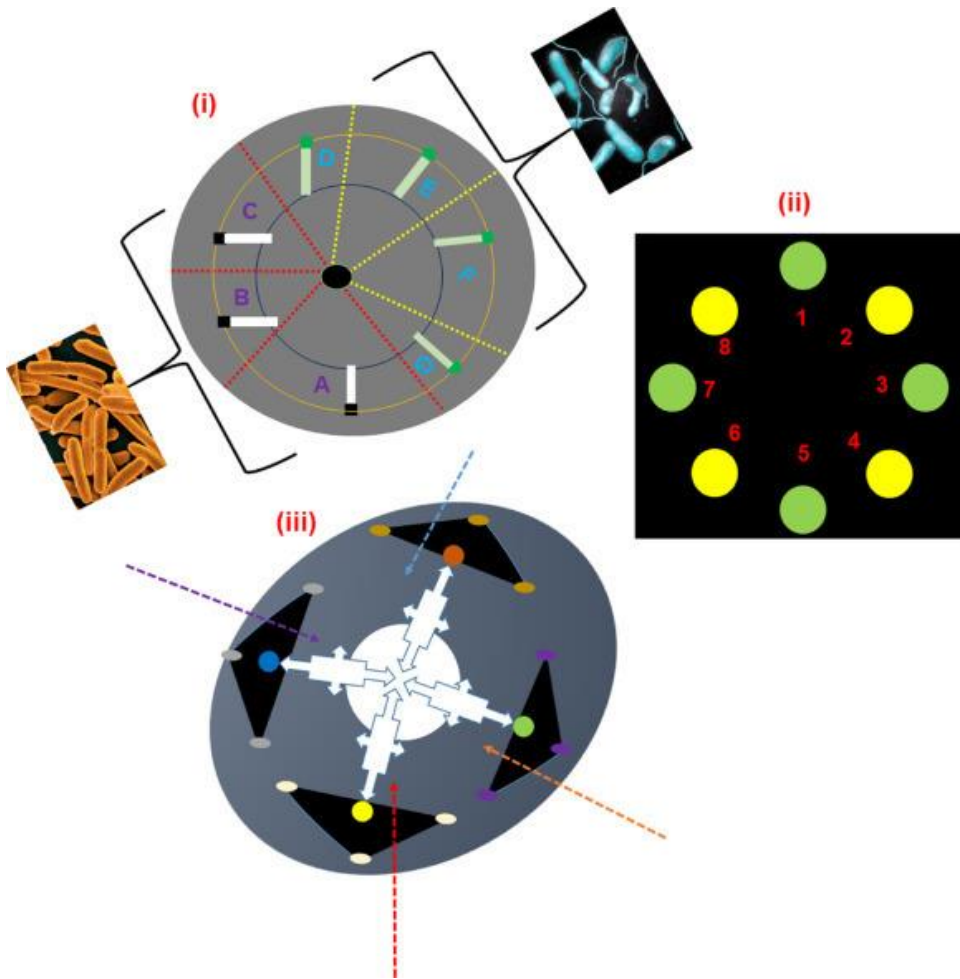
ερευνητική ομάδα του Whitesides συνδύασε χάρτινα chip με συσκευές σάρωσης για να δημιουργήσει ένα μPAD για ποσοτική ανάλυση [266] και κατασκεύασε για πρώτη φορά ένα τρισδιάστατο (3D) χάρτινο chip, στοιβάζοντας πολλαπλά στρώματα χάρτινων chip με ταινία διπλής όψης [266]. Το 2009, η ερευνητική ομάδα του Whitesides [267] πρότεινε τη χρήση της μεθόδου εκτύπωσης κεριού για την κατασκευή chip μικρορευστομηχανικής με βάση το χαρτί. Η μέθοδός τους χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της απλότητας και του χαμηλού κόστους της. Την ίδια χρονιά, οι Dungchai και συνεργάτες κατασκεύασαν ένα χάρτινο chip βασισμένο στην ανίχνευση ηλεκτροχημικού σήματος, εκτυπώνοντας πρώτα ηλεκτρόδια σε χαρτί φίλτρου [268]. Η μέθοδος αυτή βελτιώνει σημαντικά την ευαισθησία ανίχνευσης των χάρτινων μικρορευστολογικών chip που βασίζονται σε χαρτί. Το 2011, οι Liu και συνεργάτες πραγματοποίησαν την κατασκευή τρισδιάστατων χάρτινων chip χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αναδίπλωσης, η οποία είναι πιο βολική και αποτελεσματική από τη μέθοδο κατασκευής που παρείχε η ερευνητική ομάδα του Whitesides [253].

Αναμφισβήτητα, στα πρώτα τους στάδια, τα όρια ανίχνευσης (detection limits, LOD) των μικρορευστολογικών chip που βασίζονται σε χαρτί δεν ήταν αρκετά χαμηλά, ευαίσθητα στη μόλυνση και μηχανικά αδύναμα. Για την επίλυση αυτών των προβλημάτων, οι ερευνητές χρησιμοποιούν νέα νανοϋλικά, συσκευές στεγανοποίησης και προηγμένους αισθητήρες στα μPADs [269]. Μεταξύ αυτών, η προσθήκη αισθητήρων αποτελεί ένα ερευνητικό hotspot. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν διερευνήσει την κατασκευή αισθητήρων φθορισμού [270], ηλεκτροχημικών αισθητήρων [271] και χρωματομετρικών αισθητήρων [272] στην πλατφόρμα χάρτινων chip. Στη συνέχεια μελέτησαν και σχεδίασαν μία σειρά από χαμηλού κόστους, βολικά και γρήγορα μPADs [273], τα οποία προώθησαν την εφαρμογή και την ανάπτυξη της τεχνολογίας μικρορευστοποίησης με βάση το χαρτί στη βιολογική και περιβαλλοντική ανάλυση.

Ως σημείο αιχμής στον τομέα της ανίχνευσης αναλυτικής χημείας, η τεχνολογία chip μικρορευστομηχανικής χαρτιού έχει ερευνηθεί και εφαρμοστεί σε διάφορους τομείς, από την αρχική ανάλυση χαρτιού δοκιμής έως το δισδιάστατο σύστημα μικροροής και στη συνέχεια το τρισδιάστατο σύστημα ροής. Η δοκιμή και η ανάλυση σε λίγα μόνο τετραγωνικά εκατοστά υλικών με βάση το χαρτί μπορεί να εξοικονομήσει σε μεγάλο βαθμό το χρόνο δοκιμής και να μειώσει την κατανάλωση αντιδραστηρίων και δειγμάτων και ταυτόχρονα να προστατεύσει το περιβάλλον, ενώ σχετικά ακριβή χημικά μέσα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ουσιών. Καθώς ένας αυξανόμενος αριθμός ερευνητών μελετά τα χάρτινα chip, η διαδικασία παραγωγής και η τεχνολογία ανίχνευσης των

χάρτινων chip γίνονται απλούστερες και ακριβέστερες και οι εφαρμογές τους γίνονται πιο ποικίλες.

Πρόσφατα, τα χάρτινα microfluidic chips έχουν αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανίχνευση και τον έλεγχο πολλαπλών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Οι Pang και συν. σχεδίασαν ένα νέο υβριδικό μικρορευστικό chip πολυδιμεθοξυσιλοξάνης (polydimethoxysiloxane, PDMS)/χαρτιού, το οποίο ονομάστηκε εν συντομία chip SPH, ενσωματωμένο με την τεχνολογία LAMP με βάση τη μεικτή χρωστική για την ανίχνευση πολλαπλών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Το εν λόγω chip έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα, όπως (i) οικονομικά αποδοτική ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών πολλαπλών αναλύσεων με βάση το chip, (ii) απλή λειτουργία μέσω του chip SPH και (iii) ακριβής μεθοδολογία LAMP με βάση τη μεικτή χρωστική. Οι τιμές LOD για τον *Staphylococcus aureus* και το *Vibrio parahemolyticus* βρέθηκαν να είναι 21,5 και 20,9 αντίγραφα μL^{-1} , αντίστοιχα. Επιπλέον, η πρακτικότητα αξιολογήθηκε με τη χρήση μολυσματικών ουσιών τροφίμων και 1000 CFU mL^{-1} βακτηρίων μπορούν να ανιχνευθούν με υψηλή εξειδίκευση [274]. Στην Εικόνα 7 απεικονίζεται η σχηματική αναπαράσταση των σημερινών τεχνολογιών που βασίζονται σε LAMP για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Σε μία άλλη μελέτη, η συσκευή lab-on-a-disc κατασκευάστηκε με τη χρήση αντιδραστηρίων LAMP και κατασκευάστηκε σε έναν ενιαίο μικρορευστικό συμπαγή δίσκο (CD) με τη διαδικασία αυτοματοποίησης. Αυτή η συσκευή έχει αρκετούς ευεργετικούς παράγοντες σε σύγκριση με τις υπάρχουσες συμβατικές μεθόδους. Αυτοί περιλαμβάνουν (i) διαδικασία εξοικονόμησης χρόνου, δηλαδή εντός 70 min, (ii) η ευελιξία αντιπροσωπεύει τη χρήση της μικρορευστομηχανικής λειτουργίας και του πιστολιού θερμού αέρα, (iii) καμία ανάγκη εξωτερικών αντλιών για τον χειρισμό της ανάλυσης LAMP και (iv) εξάλειψη της χρήσης εργαστηριακών οργάνων όπως το ερμάριο PCR, το vortex, τα σωληνάρια PCR, η πιπέτα, ο εξοπλισμός ανάμιξης κ.λπ. με την αυτοματοποιημένη μικρορευστομηχανική ανάμιξη των συνολικών αντιδραστηρίων LAMP. Η φορητή συσκευή που αναπτύχθηκε χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση σαλμονέλας (που είχε προστεθεί στις ντομάτες) και πέτυχε την τιμή LOD 5×10^{-3} ng/ μL συγκέντρωσης DNA [275]. Αυτό το μικρορευστικό εργαστήριο επί δίσκου ενσωματωμένο με LAMP είναι εξαιρετικά βολικό στην POC διαγνωστική των τροφιμογενών παθογόνων [276].



Εικόνα 7 Σχηματική αναπαράσταση της φυγοκεντρικής μικροσυσκευής LAMP
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7564122/>

Κεφάλαιο 3ο: Μέθοδοι & Υλικά

3.1. Σχεδιασμός

Η πειραματική πορεία της διατριβής χωρίστηκε σε 3 στάδια:

1. Αρχικά εντοπίστηκε η αποτελεσματικότερη μέθοδος εκχύλισης βακτηριακού DNA από δείγματα τροφίμων. Σε αυτό το στάδιο:

Επιμολύνθηκαν δείγματα τροφίμων και νερού με γνωστές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών, με σκοπό να απομονωθούν στη συνέχεια και να ταυτοποιηθούν.

Συγκρίθηκαν οι μοριακές τεχνικές PCR & colorimetric LAMP στην ταυτοποίηση των μικροοργανισμών. Οι μοριακές αναλύσεις που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα, με βάση την τεχνική LAMP για την ανίχνευση παθογόνων, είναι 100 έως 1000 φορές πιο ευαίσθητες από τις συμβατικές αναλύσεις PCR αντίστοιχης εξειδίκευσης [277]. Η μέθοδος LAMP έχει επίσης το πλεονέκτημα ότι ανέχεται ενώσεις που αναστέλλουν την τυπική μέθοδο PCR [278]. Παρόμοια αποτελέσματα εντοπίζονται και στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, επομένως η μέθοδος LAMP είναι καλύτερη στην ταυτοποίηση των βακτηρίων.

2. Σχεδιάστηκε μία συσκευή μικρορευστομηχανικής (microfluidic chip) με το σχεδιαστικό πακέτο 3D Autodesk, Fusion 360, μέσα στην οποία θα πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις της LAMP. Σκοπός ήταν να δημιουργηθεί η συσκευή αυτή, ούτως ώστε να αποτελεί πλήρες αναλυτικό εργαλείο για μοριακή ανίχνευση παθογόνων σε τρόφιμα.

3. Εφαρμογή της συσκευής για ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών (βακτηρίων) σε δείγματα τροφίμων του εμπορίου.

3.2. Εξοπλισμός και υλικά

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε:

1. Θερμοκυκλοποιητής (Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler)



Εικόνα 8 Θερμοκυκλοποιητής - Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems)

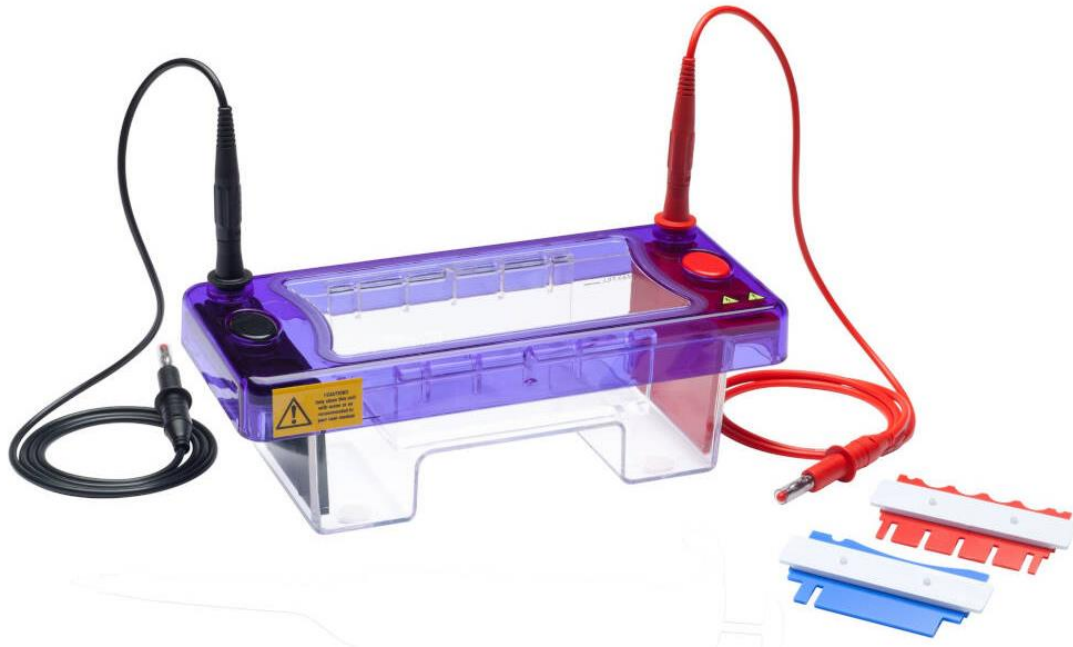
2. Λουτρό υπερήχων (ELMASONIC S10 - Ultrasonic Cleaning Device 800ml 37 kHz 30 W, Elma Ultrasonic Technology)



Εικόνα 9 Λουτρό υπερήχων (ELMASONIC S10 - Ultrasonic Cleaning Device 800ml 37 kHz 30 W, Elma Ultrasonic Technology)

3. Φυγόκεντρος (MSE Sanyo Micro Centaur Centrifuge)

4. Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini Single Cell Electrophoresis Chamber)



Εικόνα 10 Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini Single Cell Electrophoresis Chamber

5. Thermal Block (THERMOBLOCK TD 200-1)

6. Θερμαντική εστία

7. Συσκευή ανάγνωσης - ανάλυσης με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας UV – DNR Mini BISPRo



Εικόνα 11 Συσκευή ανάγνωσης - ανάλυσης με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας UV – DNR Mini BISPRo

8. Υδατόλουτρο

9. 3D εκτυπωτής Phrozen sonic mini 4k

10. Διαφανής υγρή ρητίνη PRIMA Value UV Resin STANDARD CLEAR πυκνότητας 1.1 g/mL

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

Εκλεκτικά υποστρώματα καλλιέργειας *Salmonella* CHROMagar™ SALMONELLA PLUS (Bioprepare Microbiology, Athens, Greece).

Εκλεκτικά υποστρώματα καλλιέργειας *Listeria monocytogenes* CHROMagar™ LISTERIA (Bioprepare Microbiology, Athens, Greece).

Εκλεκτικά υποστρώματα καλλιέργειας *Escherichia coli* and CHROMagar™ ECC (Bioprepare Microbiology, Athens, Greece).

Χλωροφόρμιο

Αιθανόλη

Ισοαμυλική Αλκοόλη

Οξικό Νάτριο 3M

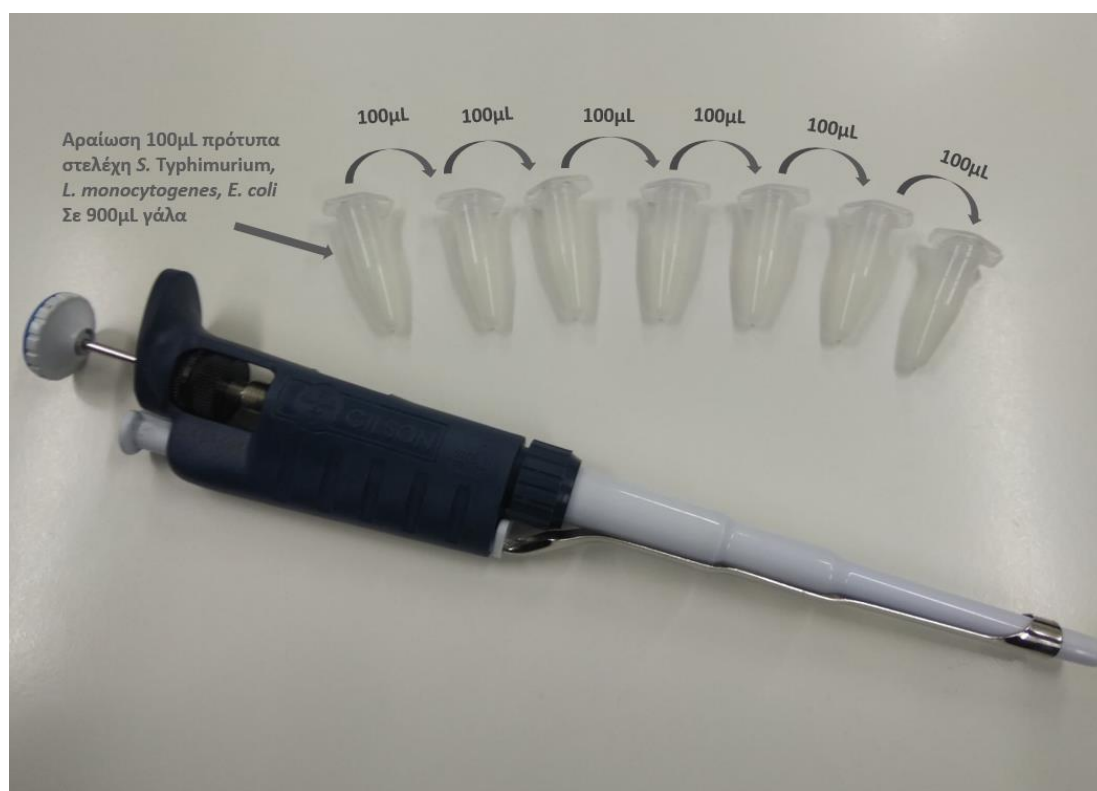
Elution Buffer

Βρωμιούχο αιθίδιο

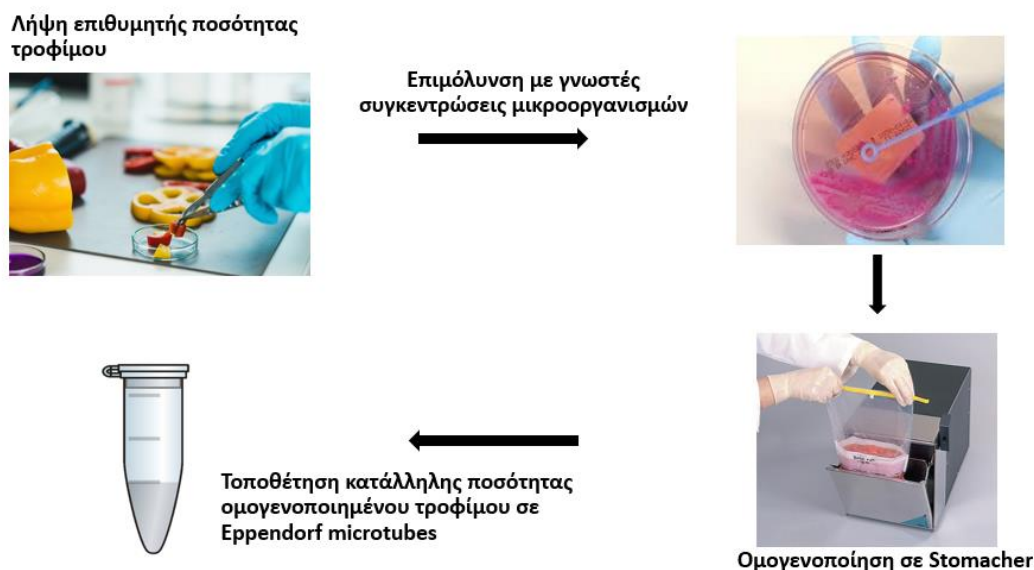
Tris Borate EDTA Buffer (TBE)

3.3. Επιμόλυνση δειγμάτων τροφίμων

Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, δείγματα νερού και τροφίμων (γάλα και κοτόπουλο) επιμολύνθηκαν με *S. Typhimurium* (NCTC 12023), *L. monocytogenes* (NCTC 10357) και *E. coli* (NCTC 10418). Τα εναιωρήματα των βακτηρίων παρασκευάστηκαν σε ζωμό τρυπτόνης σόγιας (Tryptone Soy Broth, TSB) σε ισοδύναμο θολερότητας 0,5 McFarland (περίπου $1,5 \times 10^8$ cfu/mL) και παρασκευάστηκαν δεκαπλάσιες σειριακές αραιώσεις σε τελικό όγκο 10 mL, σε τελική συγκέντρωση $1,5 \times 10^1$ cfu/mL στις παραπάνω μήτρες. Κάθε σειριακή αραιώση αναλύθηκε αργότερα, προκειμένου να αξιολογηθεί η αναλυτική ευαισθησία.



Εικόνα 12 Επιμόλυνση δειγμάτων γάλακτος



Εικόνα 13 Διαδικασία επιμόλυνσης στερεών τροφίμων

3.4. Μέθοδοι εκχύλισης DNA

Για την απομόνωση του DNA αξιοποιήθηκαν συνολικά δώδεκα διαφορετικές μέθοδοι:

1. Εκχύλιση με τη χρήση εμπορικού KIT Thermo Scientific Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit

Το Genomic DNA Purification Kit είναι ένα απλό και γρήγορο σύστημα για τον υψηλής ποιότητας καθαρισμό γονιδιωματικού DNA από διάφορες ουσίες, όπως: ολικό αίμα, ορός, κυτταρικές σειρές, βακτηριακά κύτταρα, φυτικοί ιστοί και ιστοί θηλαστικών. Το kit βασίζεται στην επιλεκτική καταβύθιση του DNA από ακατέργαστο λυτικό διάλυμα με τη βοήθεια απορρυπαντικού. Η όλη διαδικασία είναι ταχεία - μόλις 20-25 min - με τυπική απόδοση 2-10 μg γονιδιωματικού DNA από 0,2 mL αίματος. Το υψηλού μοριακού βάρους γονιδιωματικό DNA που καθαρίζεται με το kit είναι κατάλληλο για άμεση χρήση σε όλες τις συνήθεις εφαρμογές μοριακής βιολογίας: PCR, Thermo Scientific FastDigest και συμβατική πέψη περιορισμού, κλωνοποίηση, αλληλούχιση DNA και ανάλυση Southern blot.

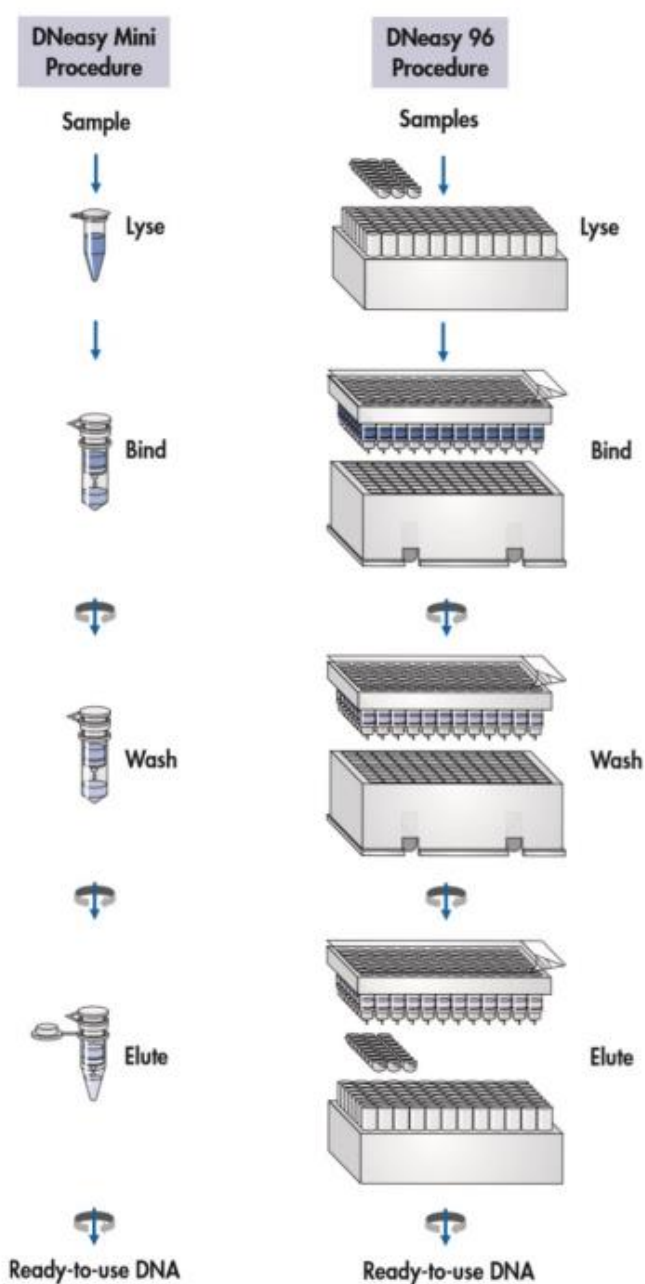
2. Εκχύλιση με τη χρήση εμπορικού KIT QIAGEN DNease Blood & Tissue kit

Τα DNeasy Blood & Tissue Kits έχουν σχεδιαστεί για τον γρήγορο καθαρισμό ολικού DNA

(π.χ. γονιδιωματικού, μιτοχονδριακού και παθογόνου) από μία ποικιλία πηγών δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων νωπών ή κατεψυγμένων ζωικών ιστών και κυττάρων, αίματος ή βακτηρίων. Το καθαρισμένο DNA DNeasy είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις και ενζυμικούς αναστολείς και είναι ιδιαίτερα κατάλληλο για εφαρμογές PCR, Southern blotting, RAPD, AFLP και RFLP. Ο καθαρισμός δεν απαιτεί εκχύλιση με φαινόλη ή χλωροφόρμιο ή καθίζηση με αλκοόλη και περιλαμβάνει ελάχιστο χειρισμό. Αυτό καθιστά τα DNeasy Blood & Tissue Kits ιδιαίτερα κατάλληλα για την ταυτόχρονη επεξεργασία πολλαπλών δειγμάτων. Για εφαρμογές υψηλότερης απόδοσης, το kit DNeasy 96 Blood & Tissue Kit επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία 96 ή 192 δειγμάτων. Το ρυθμιστικό σύστημα είναι βελτιστοποιημένο, ώστε να επιτρέπει την άμεση λύση των κυττάρων που ακολουθείται από την επιλεκτική πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη DNeasy. Μετά τη λύση, η διαδικασία της στήλης περιστροφής DNeasy Blood & Tissue μπορεί να ολοκληρωθεί σε μόλις 20 min. Χρησιμοποιώντας το kit DNeasy 96 Blood & Tissue Kit, 96 ή 192 δείγματα μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία σε μόλις 1 h μετά τη λύση. Η απλή επεξεργασία με φυγοκέντρηση απομακρύνει πλήρως τους μολυσματικούς παράγοντες και τους ενζυμικούς αναστολείς, όπως οι πρωτεΐνες και τα δισθενή κατιόντα, και επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία πολλαπλών δειγμάτων παράλληλα. Επιπλέον, οι διαδικασίες DNeasy Blood & Tissue είναι κατάλληλες για ένα ευρύ φάσμα μεγεθών δειγμάτων. Το καθαρισμένο DNA εκλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλών αλάτων ή σε νερό, έτοιμο για χρήση σε εφαρμογές που ακολουθούν. Το καθαρισμένο DNA DNeasy έχει συνήθως λόγο A260/A280 μεταξύ 1,7 και 1,9 και έχει μέγεθος έως 50 kb, με θραύσματα των 30 kb να κυριαρχούν. Η διαδικασία DNeasy ανακτά επίσης αποτελεσματικά θραύσματα DNA τόσο μικρά όσο 100 bp.

Οι διαδικασίες DNeasy Blood & Tissue είναι απλές. Τα δείγματα λύνονται πρώτα με τη χρήση πρωτεΐνάσης K. Οι ρυθμιστικές συνθήκες ρυθμίζονται, ώστε να παρέχουν βέλτιστες συνθήκες δέσμευσης του DNA και το λυτικό διάλυμα φορτώνεται στη στήλη περιστροφής DNeasy Mini ή στην πλάκα DNeasy 96. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης, το DNA δεσμεύεται επιλεκτικά στη μεμβράνη DNeasy, καθώς οι προσμίξεις περνούν. Οι εναπομείνουσες προσμίξεις και οι ενζυμικοί αναστολείς απομακρύνονται σε δύο αποτελεσματικά βήματα πλύσης και το DNA εκλύεται στη συνέχεια σε νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα, έτοιμο για χρήση. Το καθαρισμένο με DNeasy DNA έχει αναλογίες A260/A280 1,7-1,9 και οι σαρώσεις απορρόφησης δείχνουν μία συμμετρική κορυφή στα 260 nm που επιβεβαιώνει την υψηλή καθαρότητα. Η μεμβράνη DNeasy συνδυάζει τις ιδιότητες

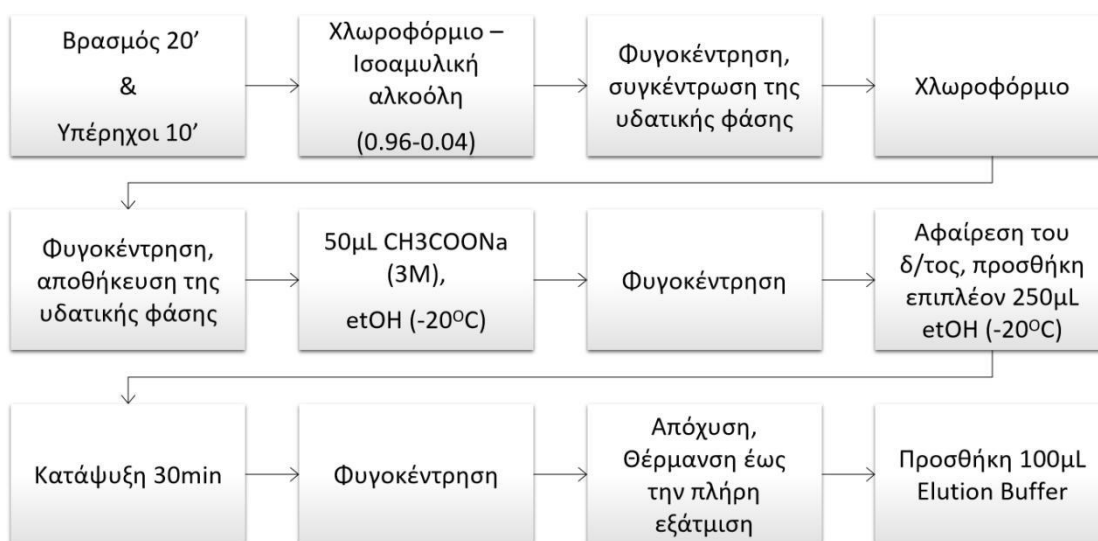
πρόσδεσης μίας μεμβράνης με βάση το διοξείδιο του πυριτίου με την απλή τεχνολογία microspin ή με το σύστημα φυγοκέντρησης 96-Well-Plate της QIAGEN. Το DNA προσροφάται στη μεμβράνη DNeasy παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων χαοτροπικών αλάτων, τα οποία απομακρύνουν το νερό από τα ενυδατωμένα μόρια στο διάλυμα. Οι συνθήκες ρυθμιστικού διαλύματος στις διαδικασίες DNeasy Blood & Tissue έχουν σχεδιαστεί έτσι, ώστε να επιτρέπουν τη συγκεκριμένη προσρόφηση του DNA στη μεμβράνη πυριτίου και τη βέλτιστη απομάκρυνση των προσμίξεων και των ενζυμικών αναστολέων.



Εικόνα 14 Εκχύλιση DNA με τη χρήση DNeasy Blood & Tissue Kit

3. Διαχωρισμός των φάσεων του δείγματος με χλωροφόρμιο (για απομάκρυνση των αναστολέων λιπαρούς φύσης)
4. Βρασμός δειγμάτων για 20 min και στη συνέχεια αποθήκευση
5. Λουτρό υπερήχων 10 min και στη συνέχεια αποθήκευση.
6. Βρασμός 10 min + υπέρηχοι 10 min και στη συνέχεια αποθήκευση.
7. Βρασμός 20 min + διαχωρισμός φάσεων με χλωροφόρμιο και στη συνέχεια αποθήκευση της υδατικής φάσης.
8. Υπέρηχοι (λουτρό υπερήχων) για 10 min + διαχωρισμός φάσεων με χλωροφόρμιο και στη συνέχεια αποθήκευση της υδατικής φάσης.
9. Βρασμός 10 min + υπέρηχοι 10 min + διαχωρισμός φάσεων με χλωροφόρμιο και στη συνέχεια αποθήκευση της υδατικής φάσης.
10. Βρασμός των δειγμάτων για 10 min σε υδατόλουτρο, και κατάψυξη στους -20°C για 30 min και τέλος επανάληψη της διαδικασίας βρασμού στο υδατόλουτρο για ακόμη 15 min και με βρασμό του δείγματος για 10 min και στη συνέχεια υποβολή του σε λουτρό υπερήχων για ακόμη 10 min. Στη συνέχεια αποθήκευση.
11. Η μέθοδος 11 αποτελεί μία in-house μέθοδος εκχύλισης βασισμένη στο τυπικό πρωτόκολλο με φαινόλη - χλωροφόρμιο - ισοαμυλική αλκοόλη, με ορισμένες τροποποιήσεις. Εν συντομία, 1 mL από κάθε νερό και το εναιώρημα των τροφίμων βράστηκαν σε υδατόλουτρο για 10 min και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για επιπλέον 10 min, προκειμένου να προκληθεί λύση της κυτταρικής μεμβράνης χωρίς τη χρήση χημικού παράγοντα (π.χ. φαινόλη). Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε (SL 16R, Thermo Scientific) στις 11.000 rpm για 1 min και συλλέχθηκε η υδατική φάση. Προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (0,96:0,04) και φυγοκεντρήθηκε στις 11.000 rpm για 1 min. Η υδατική (άνω) φάση συλλέχθηκε και προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφορμίου και τέθηκε σε νέα φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές ανά min για 1 min. Μετά τη συλλογή της υδατικής φάσης, προστέθηκαν επίσης στο διάλυμα 50 μL οξικού νατρίου 3 M ($\text{pH} = 5,2$). Στο μείγμα προστέθηκε ίσος όγκος απόλυτης αιθανόλης (σε θερμοκρασία δωματίου) προκειμένου να κατακρημνιστεί το DNA.

Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 11.000 rpm για 1 min και η υγρή φάση απομακρύνθηκε. Προστέθηκαν επιπλέον 250 μL απόλυτης αιθανόλης και αφέθηκαν υπό συνθήκες ψύξης ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) για 30 min. Στη συνέχεια, το μείγμα τέθηκε για φυγοκέντρωση στις 11.000 rpm για 2 min. Η αιθανόλη απομακρύνθηκε επίσης και τα δείγματα θερμάνθηκαν στους $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε θερμαντικό μπλοκ (HB-M501, Ιταλία) προκειμένου να εξατμιστεί η εναπομείνασα αιθανόλη. Τέλος, το σφαιρίδιο του DNA επαναιωρήθηκε σε 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (10 mM Tris-HCl, pH = 8,0, 1 mM EDTA) και συλλέχθηκε σε μικροσωλήνες Eppendorf 1,5 μL .



Εικόνα 15 Γραφική απεικόνιση της μεθοδολογίας 11

12. Απομόνωση με τη χρήση του εμπορικού kit (NucleoSpin® Food)

Περιεχόμενα του εμπορικού kit:

Lysis buffer CF

Buffer C4

Wash buffer CQW

Wash buffer C5 (concentrate)

Elution buffer CE

NucleoSpin® Food columns (plus collection tubes)

Proteinase K (lyophilized)

Proteinase buffer PB

Collection tubes (2mL)

User manual

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν:

Ομογενοποίηση του δείγματος

Λύση των κυττάρων. Προσθήκη 550 μ LCF προθερμασμένο στους 65 °C (ανάμιξη για 15 s) και 10 μ L proteinase K (ανάμιξη για 2-3s)

Προσαρμογή των συνθηκών για την πρόσδεση του DNA. Μεταφορά του δείγματος σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα. Προσθήκη ίσης ποσότητας C4 και ίσης ποσότητας αιθανόλης (συνολικά 3 φορές ο αρχικός όγκος). Έπειτα φυγοκέντρωση για 30 s.

Πρόσδεση DNA. Εισαγωγή 700 μ L δείγματος σε NucleoSpin® Food column μέσα σε collection tube. Φυγοκέντρωση για 1 min στις 11.000 στροφές και απόρριψη του υγρού στο σωληνάκι. Επανάληψη της διαδικασίας για την υπόλοιπη ποσότητα του δείγματος.











Έκπληση και στέγνωμα της μεμβράνης silica.

1η έκπληση: Προσθήκη 400 μ LCQW και φυγοκέντρωση για 1 min στις 11.000 στροφές. Απόρριψη του υγρού στο σωληνάκι.

2η έκπληση: Προσθήκη 700 μ LC5 και φυγοκέντρωση για 1 min στις 11.000 στροφές. Απόρριψη του υγρού στο σωληνάκι.

3η έκπληση: Προσθήκη 200 μ LC5 και φυγοκέντρωση για 2 min στις 11.000 στροφές, για την πλήρη απομάκρυνση του C5.

Έκλουση DNA. Τοποθέτηση της NucleoSpin® Food column σε καθαρό σωληνάκι των 1,5 mL. Προσθήκη 100 μ LCE (προθερμασμένο στους 70 °C) στη μεμβράνη. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντρωση για 1 min στις 11.000 στροφές για την έκλουση του DNA.

NucleoSpin® Food		
1 Homogenize sample		Homogenize 200 mg material
2 Lyse cells	 	550 µL CF (65 °C) 10 µL Proteinase K 65 °C, 30 min > 10,000 x g, 10 min Take clear supernatant (1 vol) and continue with step 3
3 Adjust DNA binding conditions		1 vol C4 1 vol ethanol
4 Bind DNA	 	Load sample stepwise (maximum loading capacity 700 µL) 11,000 x g, 1 min
5 Wash and dry silica membrane	 	1 st wash 400 µL CQW 11,000 x g, 1 min 2 nd wash 700 µL C5 11,000 x g, 1 min 3 rd wash 200 µL C5 11,000 x g, 2 min
6 Elute DNA	 	100 µL CE (70 °C) RT, 5 min 11,000 x g, 1 min

Εικόνα 16 Απεικόνιση μεθόδου εκχύλισης βακτηριακού DNA σε δείγματα τροφίμων με τη χρήση εμπορικού kit MN NucleoSpin® Food.

3.5. Ταυτοποίηση με μοριακές τεχνικές

Αφού πραγματοποιήθηκαν οι μέθοδοι εκχύλισης DNA, στη συνέχεια έγινε ανίχνευση - ταυτοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών με:

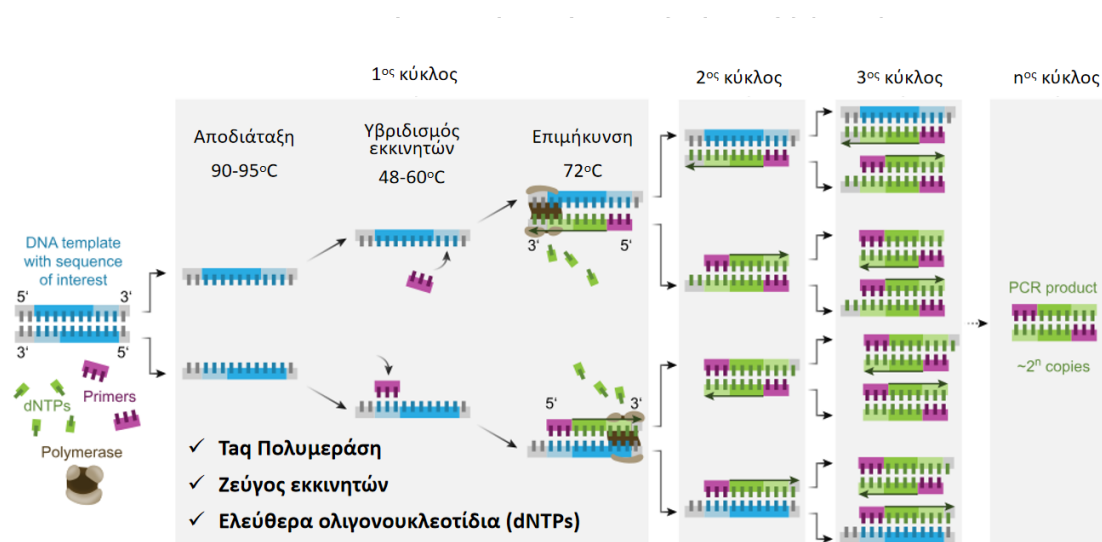
3.5.1. PCR – Ηλεκτροφόρηση

Η PCR πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα τελικού όγκου 50μL για κάθε δείγμα που αποτελούνταν από 25 μL OneTaq® Hot Start Quick-Load 2X Master Mix με Standard Buffer (NEB), 0,4 μM εκκινητές (για *S. Typhimurium*/*L. monocytogenes*) όπως περιγράφεται από τους Anju και συν. (2014) και Khalil (2016) αντίστοιχα, 5 μL του βακτηριακού DNA-στόχου και UltraPure™ DNase/RNase-Free Water (Invitrogen) μέχρι τελικού όγκου 50 μL. Η διαδικασία διεξήχθη σε ένα Veriti® 96 Well Therman Cycler (Applied Biosystems®). Οι συνθήκες ενίσχυσης ρυθμίστηκαν ως εξής: Αρχικά, ένα βήμα μετουσίωσης στους 95 °C για 10 min, ακολουθούμενο από 40 κύκλους των εξής: 1: °C για 60 s και ανόπτηση για 60 s στους 58 °C για το *S. Typhimurium* ή 52 °C για τη *L. monocytogenes*, επιμήκυνση στους 72 °C για 60 s και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για άλλα 7 min. Τα προϊόντα PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, χρωματίστηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 μg/mL) και τεκμηριώθηκαν υπό υπεριώδη φωτισμό με τη χρήση της συσκευής MiniBIS Pro.

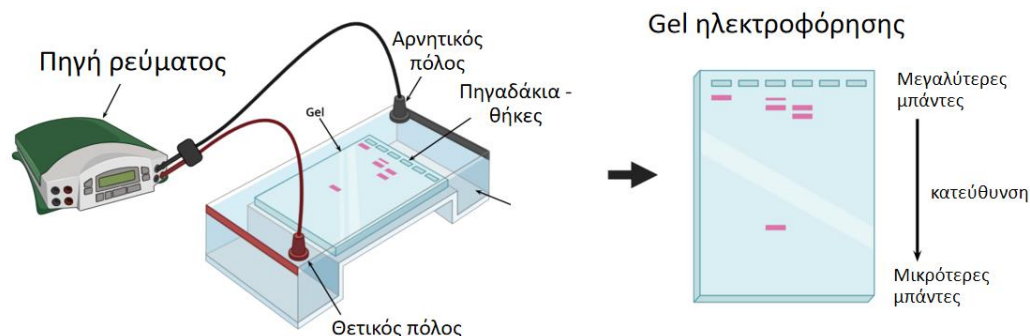
Πίνακας 3 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Anju et al., 2014; Khalil, 2017; Papatheodorou et al., 2021)

Βακτήριο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος ενίσχυσης
<i>S. Typhimurium</i>	stm F	5' GGTGGCAAGGGAATGAA 3'	915 bp
	stm R	3' CGCAGCGTAAAGCAACT 5'	915 bp
<i>L. monocytogenes</i>	Iap F	5' CTGGCACAAAATTA CTTACAACGA 3'	454 bp
	Iap R	3' AACTACTGGAGCTGCTTGT TTTTC 5'	454 bp
<i>E. coli</i>	stx F	5' GAATCCTCAGT TTTTCAACGTTTC 3'	208 bp
	stx R	3' TAGCCGTAACAACCAATACAAATG 5'	208 bp
Εκκινητής	Αλληλουχία		
<i>S. Typhimurium</i>			
F3	5' ACCAGATTCAGGGAGTGAGT 3'		
B3	5' CGCGCACGAAATTCGTAAC 3'		
FIP	5' ACCGGGTGGTAAGCGAATTGCGAGGTTAACCGTCTGGAGC 3'		
BIP	5' TCGGCCTCTTTGGCCATCACTGGCGAAATACTTTGCCGAG 3'		
LF	5' TGGTAAAGCCCCGCGCATCTG 3'		

LB	5' GCGCCAGTTCATGCGACTCG 3'
<i>L. monocytogenes</i>	
F3	5' TTGCGCAACAAACTGAAGC 3'
B3	5' GCTTTTACGAGAGCACCTGG 3'
FIP	5' CGTGTTCCTTTTCGATTGGCGTCTTTTTTTCATCCATGGCACC ACC 3'
BIP	5' CCACGGAGATGCAGTGACAAATGTTTTGGATTCTTCTTTTT CTCCACAAC 3'
LF	5' TAGGACTTGCAG GCGGAGATG 3'
LB	5' GCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGG 3'
<i>E. coli</i>	
F3	5' GCCATCTCCTGATGACGC 3'
B3	5' ATTTACCGCAGCCAGACG 3'
BIP	5' CATTTTGCAGCTGTACGCTCGCAGCCCATCATGAATGTTGCT 3'
FIP	5' CTGGGGCGAGGTCGTGGTATTCCGACAAACACCACGAATT 3'
Loop F	5' CTTTGTAACAACCTGTCATCGACA 3'
Loop B	5' ATCAATCTCGATATCCATGAAGGTG 3'



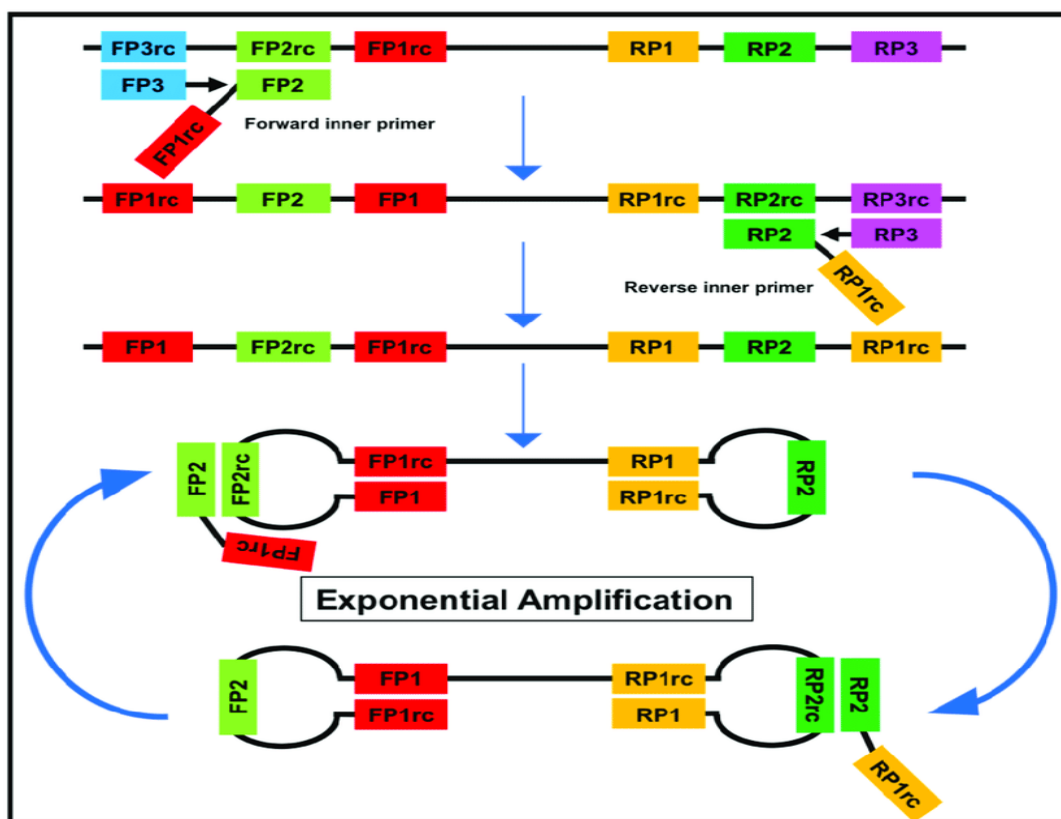
Εικόνα 17 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)



Εικόνα 18 Ηλεκτροφόρηση

3.5.2. Colorimetric LAMP

Για τη σύγκριση της ευαισθησίας κάθε μοριακής μεθόδου πραγματοποιήθηκε ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόχου, όπως περιγράφεται από τους Tanner και τους συνεργάτες του [279]. Η LAMP πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα τελικού όγκου 25 μL για κάθε δείγμα, αποτελούμενο από 12,5 μL WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (NEB), 0,8 M εκάστου εκκινητή FIP και BIP, 0,1 μM εκάστου εκκινητή F3 και B3 και 0,4 μM εκάστου των εκκινητών LF και LB για το *S. Typhimurium* και τη *L. monocytogenes* [280], 5 μL βακτηριακού DNA-στόχου και UltraPure™ DNase/RNase-Free Water (Invitrogen) μέχρι 25 μL . Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε συμβατικό φούρνο ρυθμισμένο στους 65 $^{\circ}\text{C}$ για 45 min για τα δείγματα που μολύνθηκαν με *S. Typhimurium* και 60 min για τα δείγματα που μολύνθηκαν με *L. monocytogenes* αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με βάση την αλλαγή του χρώματος χωρίς τη χρήση πρόσθετων οργάνων.



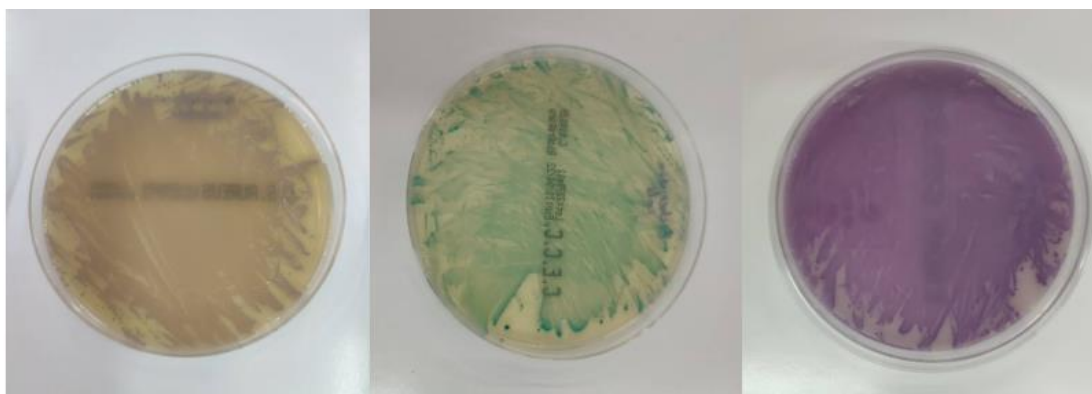
Εικόνα 19 Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου (LAMP). BSt Πολυμεράση, 4-6 εκκινήτες. Ελεύθερα ολιγονουκλεοτίδια (dNTPs), Χρωστικές - δείκτες pH

Αφού βρέθηκε η καλύτερη μέθοδος (colorimetric LAMP) σχεδιάστηκε μία 3D microfluidic analytical device που θα βοηθήσει στη διεκπεραίωση των αναλύσεων.

3.6. Μικροβιολογικές αναλύσεις

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ακρίβεια και η αξιοπιστία της μεθόδου που βασίζεται στη μικρορευστολογία σε πραγματικές μήτρες τροφίμων, τα δείγματα τροφίμων υποβλήθηκαν σε κλασικές μικροβιολογικές δοκιμές με τη χρήση τρυβλίων Petri και επιλεκτικών μέσων. Αρχικά, 25g από κάθε δείγμα τροφίμου αραιώθηκαν με 225mL ρυθμιστικού νερού με πεπτόνη (BPW) σε αποστειρωμένες σακούλες και ομογενοποιήθηκαν σε εργαστηριακό αναδευτήρα Stomacher 400, Seward Medical, για 45 s. Στη συνέχεια, 0,1mL από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν για ανίχνευση σε κάθε εκλεκτικό μέσο για *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* (μετά από προ-εμπλουτισμό σε BPW για 24 h) και *Escherichia coli*. Τα εκλεκτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: CHROMagar™ SALMONELLA PLUS (Bioprepare Microbiology, Αθήνα, Ελλάδα) για την ανίχνευση της

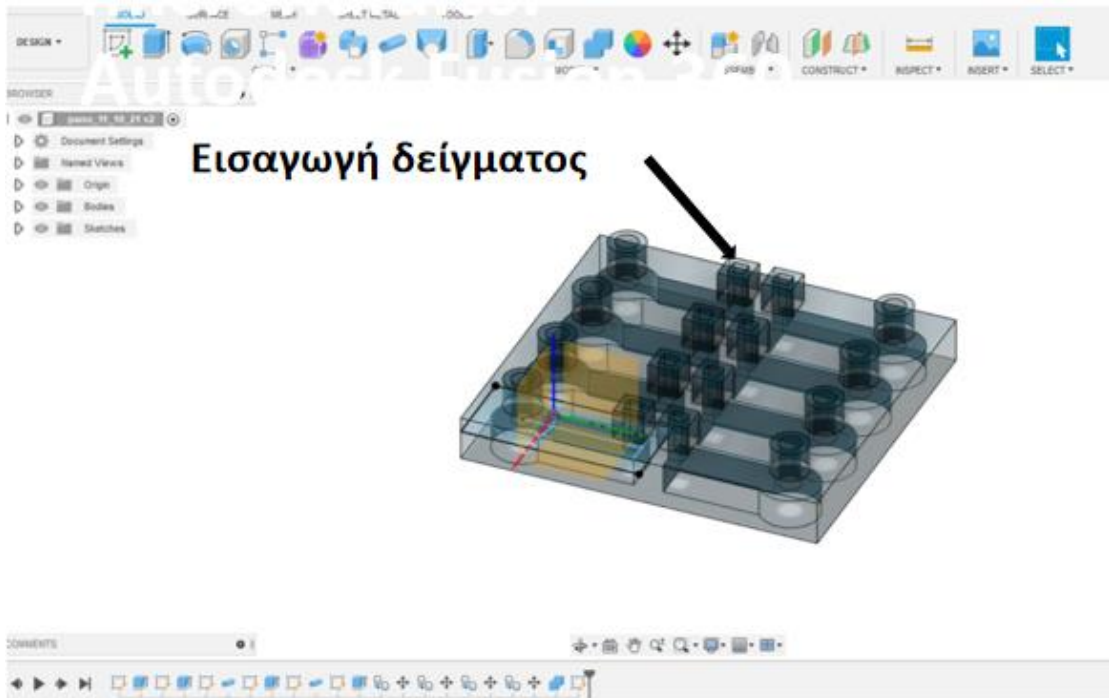
Salmonella Typhimurium, CHROMagar™ LISTERIA (Bioprep Microbiology, Αθήνα, Ελλάδα) για την ανίχνευση της *L. monocytogenes* και CHROMagar™ ECC (Bioprep Microbiology, Αθήνα, Ελλάδα) για την ανίχνευση *E. coli*. Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων ήταν σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα των αναλύσεων με βάση τα μικρορευστολογικά συστήματα, αποδεικνύοντας έτσι την ακρίβεια και την αξιοπιστία της μεθόδου.



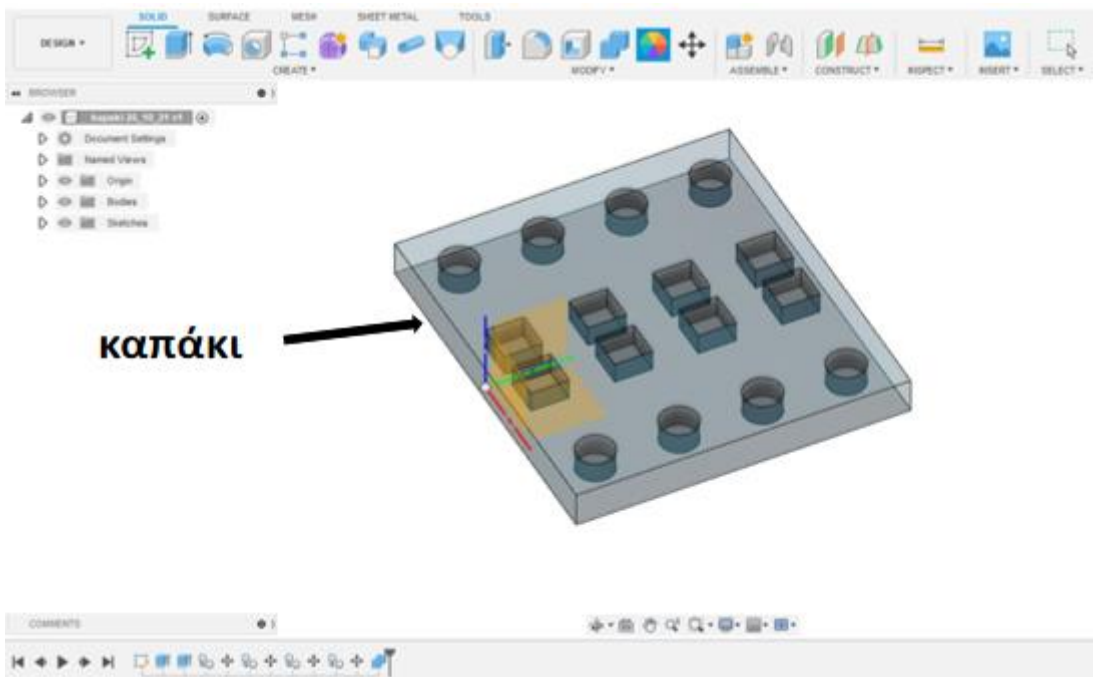
Εικόνα 20 Μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων τροφίμων σε εκλεκτικά μέσα.

3.7. Σχεδιασμός της συσκευής

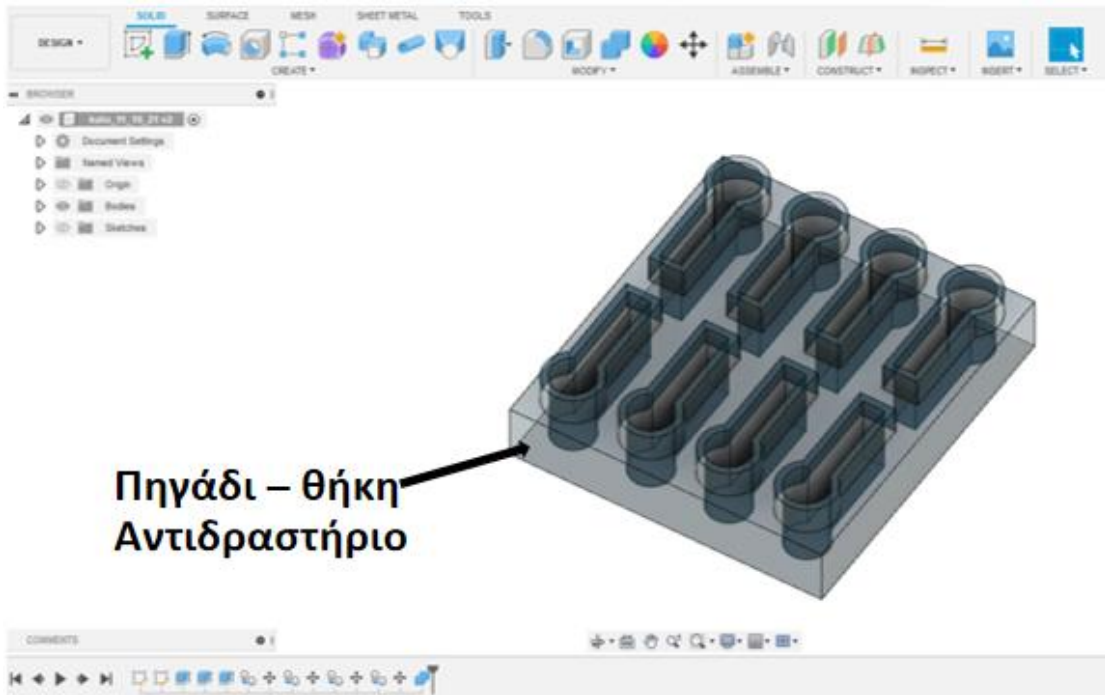
Η συσκευή μικρορευστομηχανικής (microfluidic device) σχεδιάστηκε με το σχεδιαστικό πακέτο Autodesk Fusion 360. Η εκτύπωση πραγματοποιείται σε εκτυπωτή Phrozen sonic mini 4k, με διαφανή υγρή ρητίνη PRIMA Value UV Resin STANDARD CLEAR ως υλικό εκτύπωσης. Επειδή κατά τη διάρκεια της εκτύπωσης ενδέχεται να παραμείνει ρητίνη σε υγρή μορφή στο εσωτερικό των μικροκαναλιών, η συσκευή σχεδιάστηκε έτσι, ώστε να αποτελείται από τρία (3) διαφορετικά κομμάτια (Μέρος Α: καπάκι, Μέρος Β: Ενδιάμεσο τμήμα, Μέρος Γ: Βάση), το ένα συμπληρωματικό του άλλου) τα οποία ενώνονται μετά την εκτύπωση όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες. Η συσκευή επιλέχθηκε να χωριστεί σε 3 διαφορετικά μέρη: καπάκι, ενδιάμεσο τμήμα, βάση, το ένα από τα οποία θα είναι συμπληρωματικό του άλλου, με σκοπό να συνδυαστούν μετά την εκτύπωση. Ο λόγος που αποφασίστηκε αυτό και δεν σχεδιάστηκε ως ενιαίο κομμάτι ήταν για να αποφευχθούν άλλα προβλήματα που προέκυπταν μετά την εκτύπωση. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια της σκλήρυνσης με υπεριώδη ακτινοβολία, μία μικρή ποσότητα υγρής ρητίνης παρέμεινε μέσα στα κανάλια, η οποία στη συνέχεια στερεοποιήθηκε με αποτέλεσμα να φράξουν και το υγρό να μην μπορεί να περάσει μέσα από αυτά. Κάθε συσκευή περιέχει 8 διαφορετικά κανάλια, ώστε να μπορεί να αναλύει 8 δείγματα ταυτόχρονα.



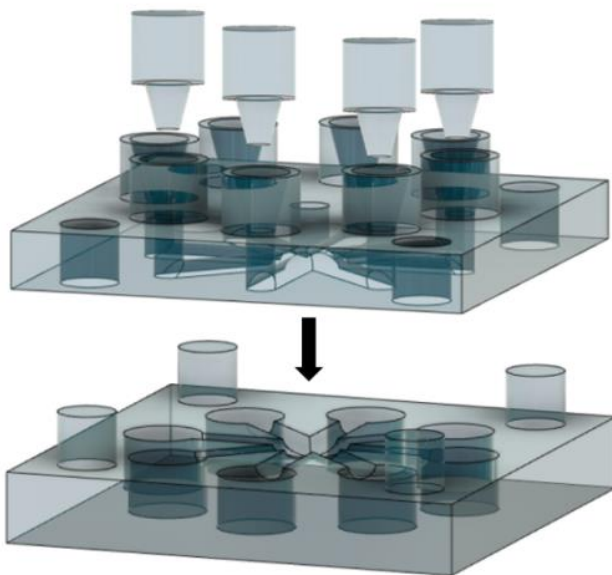
Εικόνα 21 Σχεδιασμός συσκευών microfluidics: Εισαγωγή δείγματος



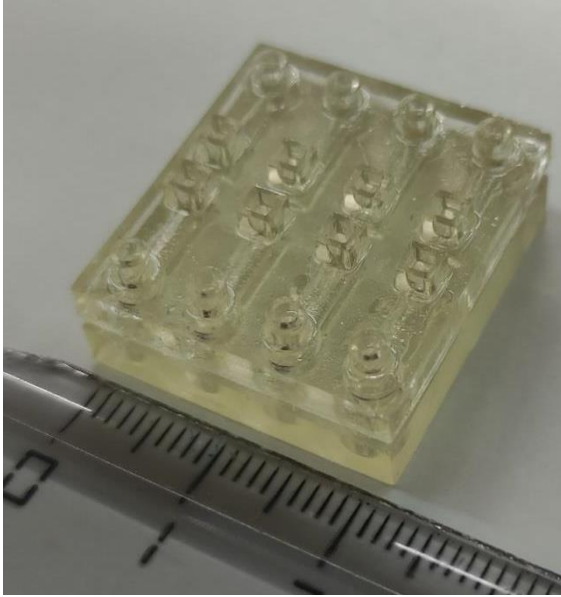
Εικόνα 22 Σχεδιασμός συσκευών microfluidics



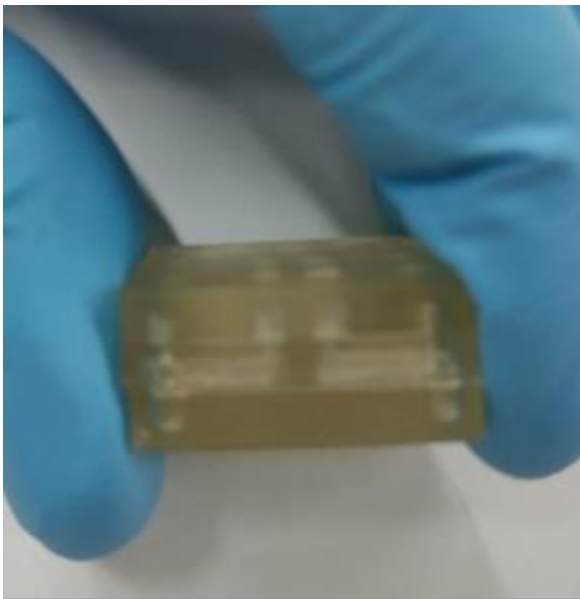
Εικόνα 23 Σχεδιασμός συσκευών microfluidics



Εικόνα 24 Συσκευές που σχεδιάστηκαν



Εικόνα 25 Εισαγωγή δείγματος



Εικόνα 26 Απεικόνιση συσκευής microfluidic

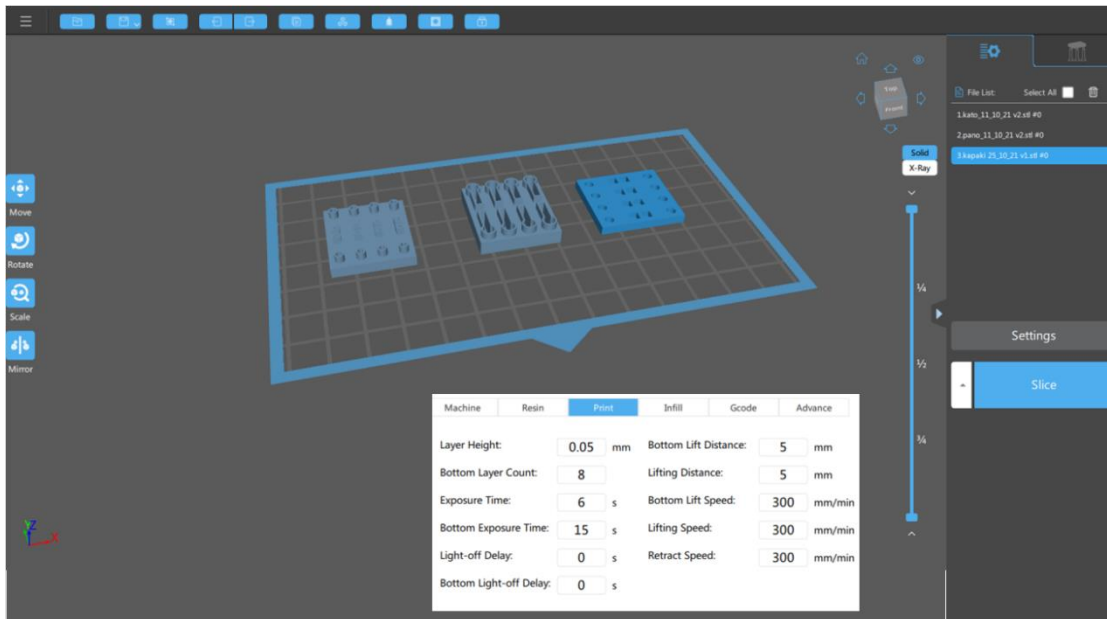
Διαστάσεις ολοκληρωμένης συσκευής: 24*22*9cm

Διαστάσεις μέρους Α (καπάκι): 24*22*2.5 cm (σχέδιο 1)

Διαστάσεις μέρους Β (ενδιάμεσο τμήμα): 24*22*6 cm

Διαστάσεις μέρους Γ (βάση): 24*22*5 cm

Ακολούθως μετά το σχεδιασμό της συσκευής, απαιτείται επεξεργασία σε ειδικό λογισμικό προετοιμασίας Chitubox.



Εικόνα 27 Προεπεξεργασία της τρισδιάστατης εκτύπωσης: Λογισμικό CHITUBOX

Για την αποφυγή της διόγκωσης των καναλιών λόγω εκτεταμένης έκθεσης της ρητίνης στη UV ακτινοβολία, ή την ελλιπή σκλήρυνση των καναλιών πρέπει να γίνει σωστή ρύθμιση της έκθεσης στην ακτινοβολία, τις ταχύτητες και τις αποστάσεις κίνησης της πλατφόρμας του εκτυπωτή κ.α.

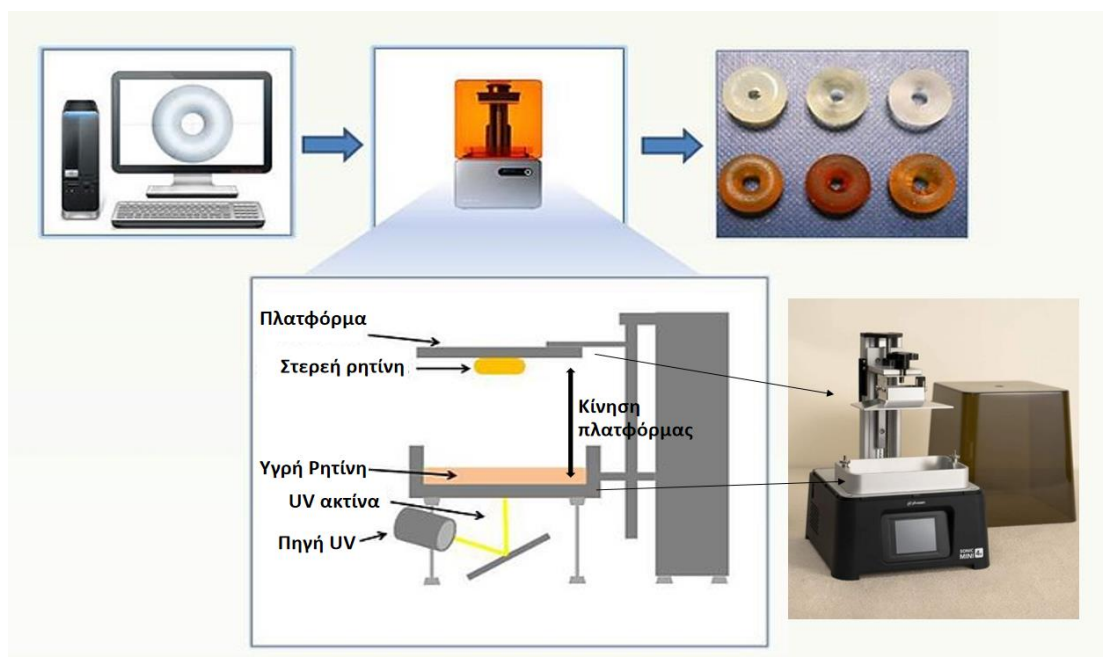


Εικόνα 28: 3D PRINTER: Phrozen Sonic Mini 4K

Ως βέλτιστες ρυθμίσεις χρησιμοποιήθηκαν:

- Exposure time: 2S
- Lift Distance: 6mm
- Lift speed 65 mm/min
- Bottom exposure time: 12S
- Layer height: 0.040mm
- Retract Speed: 120 mm/min

και ως Είδος ρητίνης επιλέχθηκε Clear Resin, με πυκνότητα: 1.1g/m



Εικόνα 29 Αρχή λειτουργίας του τρισδιάστατου εκτυπωτή

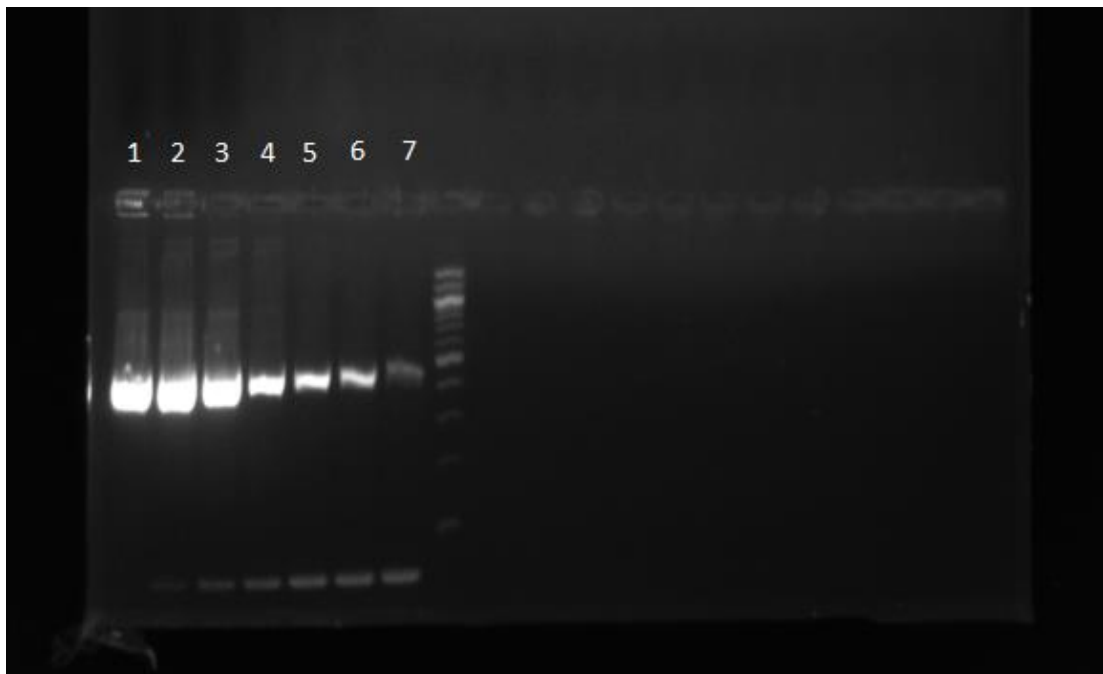
Ύστερα από την εκτύπωση, η επιφάνεια της συσκευής καθαρίζεται με 2-προπανόλη για την απομάκρυνση της υγρής ρητίνης που έχει απομείνει. Αφού αφεθεί να στεγνώσει σε σκοτεινό περιβάλλον, προστίθενται μέσα τα κατάλληλα αντιδραστήρια για την ανίχνευση-ταυτοποίηση οποιουδήποτε επιθυμητού μικροοργανισμού στόχου (*Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* ή *Listeria monocytogenes*).

3.8. Εκχύλιση DNA στα δείγματα τροφίμων

Αρχικά, 25 g των δειγμάτων τροφίμων τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους σάκους με την προσθήκη 225 g αραιωτικού διαλύματος (αραίωση 10%) και ομογενοποιήθηκαν σε συσκευή stomacher. Από το ομογενοποιημένο διάλυμα ελήφθησαν 1500 μ L δείγματος και φυγοκεντρήθηκαν για 3 min στις 12000 rpm. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε στη συνέχεια για να συλλεχθεί η κατώτερη φάση του, η οποία αποτελείτο από ένα συμπύκνωμα των κυττάρων του δείγματος. Αφού έγινε η συλλογή, το DNA των κυττάρων αυτών απομονώθηκε σύμφωνα με μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας [249], η οποία βασίζεται στην κλασική μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου με ορισμένες τροποποιήσεις για τη βελτίωση της απόδοσής της.

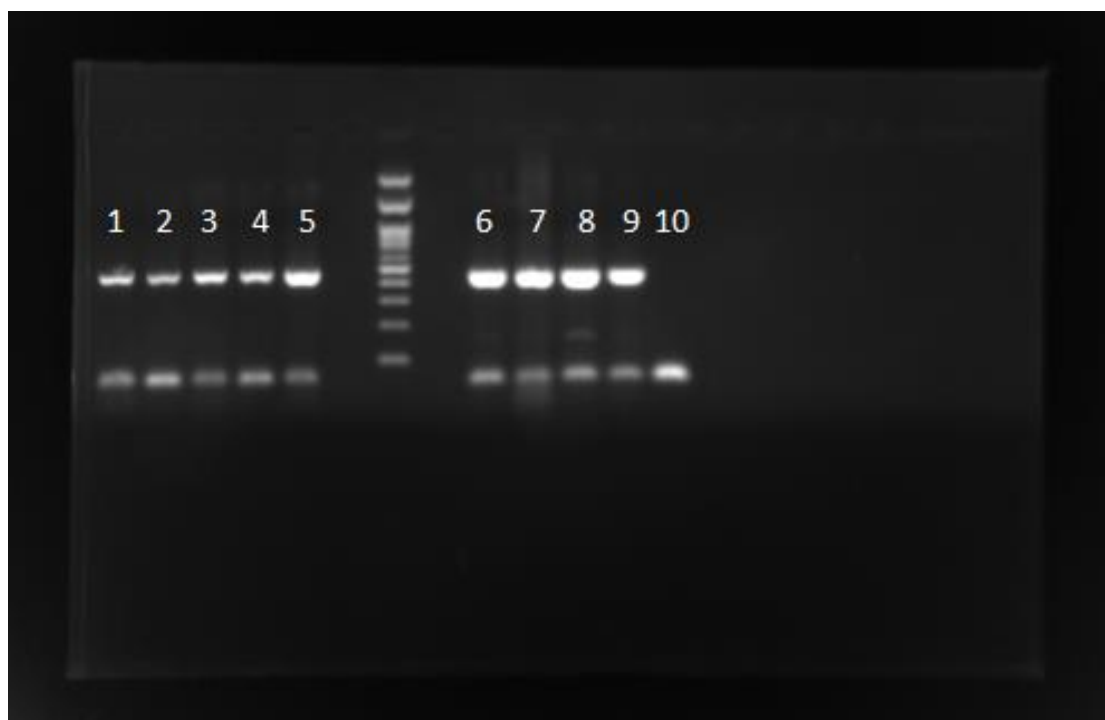
Κεφάλαιο 4ο: Αποτελέσματα

4.1. Ηλεκτροφόρηση



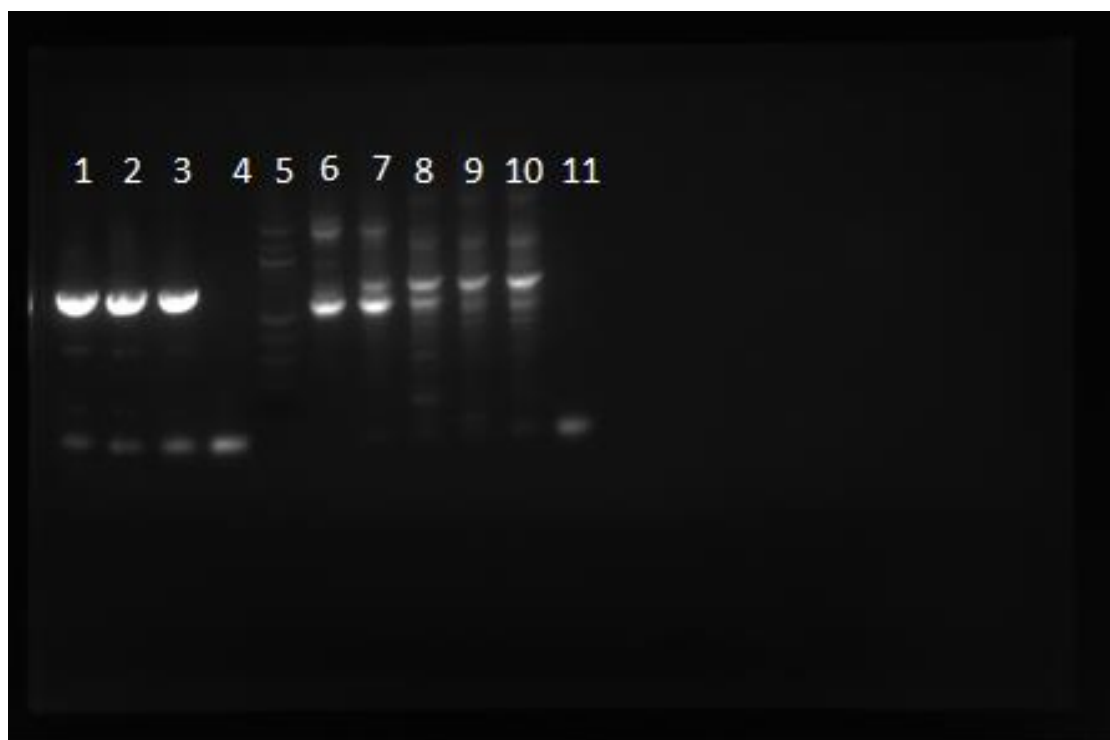
Εικόνα 30. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν με τη βοήθεια του kit απομόνωσης MN NucleoSpin® Food.

Η εικόνα 30 δείχνει την ανίχνευση της *L. monocytogenes* που έχει προστεθεί σε ολόκληρα δείγματα μαρουλιού του εμπορίου, ξεκινώντας από αρχική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^8$ cfu/mL και ακολουθούμενη από διαδοχικές δεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι την τελική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL. Τα δείγματα που εμφανίζονται είναι τα εξής: 1: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 2: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 3: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 4: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL) 5: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 6: Αρνητικό δείγμα. 7: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 8: Σκάλα DNA 100 bp (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). 9: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 10: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 11: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL). Ενώ τα υπόλοιπα ανιχνεύθηκαν επιτυχώς στα 915 bp, το δείγμα στο πέμπτο τρυβλίο ($1,5 \cdot 10^8$ cfu/mL) βρέθηκε αρνητικό. Αυτό συνέβη πιθανώς λόγω αναστολέων που θα μπορούσαν ενδεχομένως να υπάρχουν σε δείγματα με μεγάλες ποσότητες DNA.



Εικόνα 31 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν με την in-house μέθοδο 11.

Η εικόνα 31 δείχνει την ανίχνευση της *L. monocytogenes* που έχει προστεθεί σε ολόκληρα δείγματα μαρουλιού του εμπορίου, ξεκινώντας από αρχική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^8$ cfu/mL και ακολουθούμενη από τμηματικές δεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι την τελική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL. Τα δείγματα που εμφανίζονται είναι τα εξής: 1: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 2: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 3: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 4: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL) 5: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 6: Αρνητικό δείγμα. 7: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 8: θετικό control δείγμα. 9: θετικό control δείγμα. 10: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 11: *L. monocytogenes* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL).



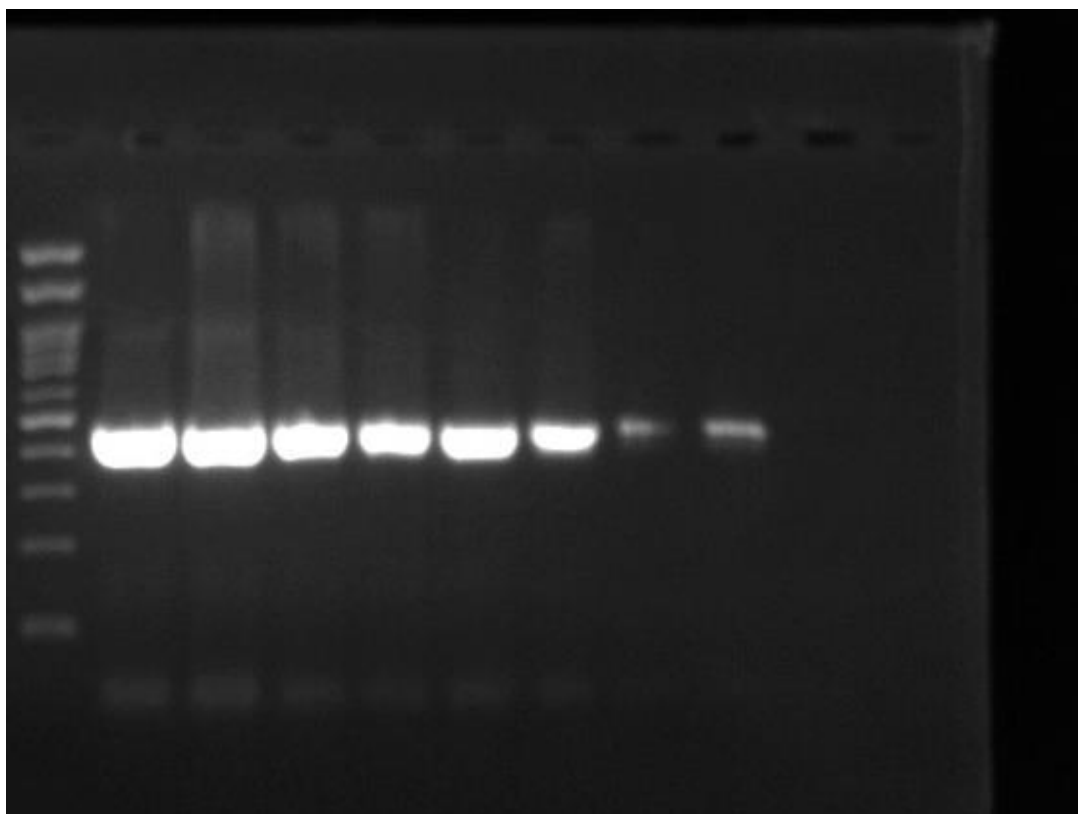
Εικόνα 32 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με *E. coli*. Απομόνωση με NucleoSpin® Food.

Η εικόνα 32 δείχνει την ανίχνευση της *E. coli* που έχει προστεθεί σε ολόκληρα δείγματα μαρουλιού του εμπορίου, ξεκινώντας από αρχική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^8$ cfu/mL και ακολουθούμενη από διαδοχικές δεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι την τελική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL. Τα δείγματα που εμφανίζονται είναι τα εξής: 1: θετικό control. 2: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^8$ cfu/mL). 3: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^7$ cfu/mL). 4: Αρνητικό δείγμα. 5: Αρνητικό δείγμα. 6: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL) 7: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 8: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL) 9: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL) 10: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 11: Αρνητικό δείγμα.



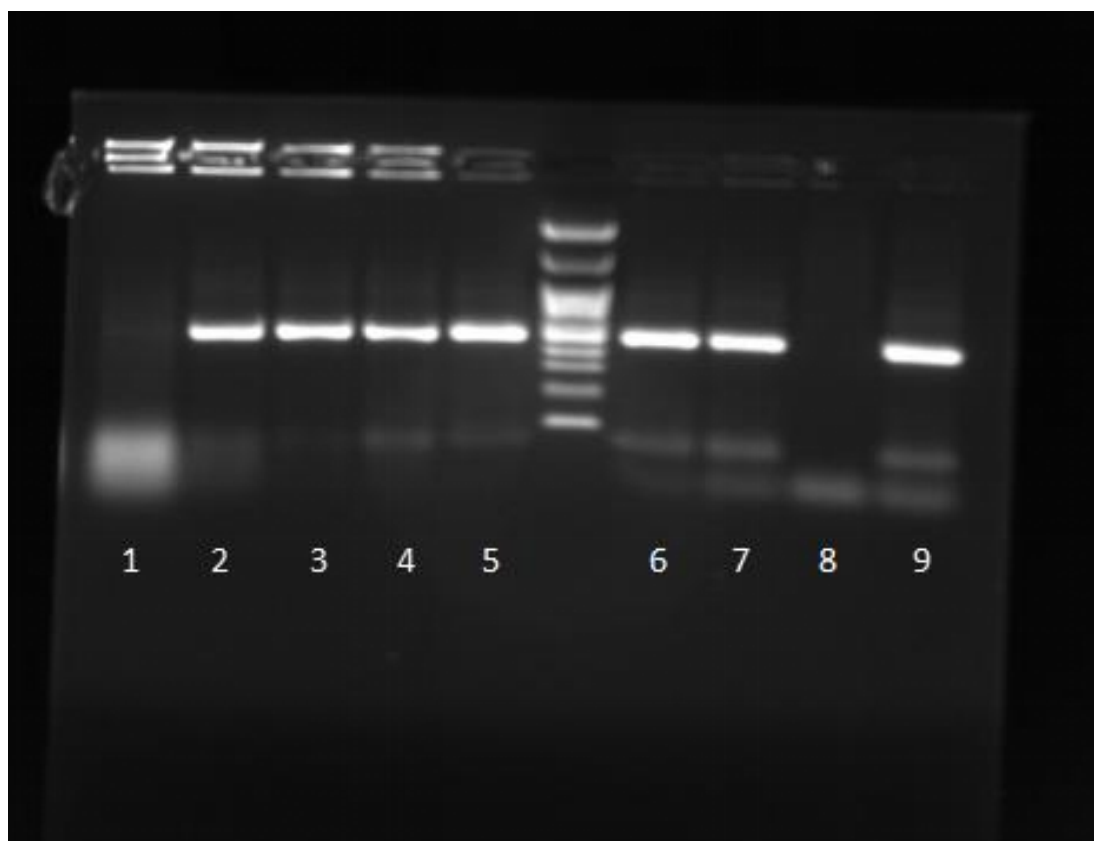
Εικόνα 33 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με *E. coli*. Απομόνωση με την in-house τεχνική.

Η εικόνα 33 δείχνει την ανίχνευση *E. coli* που έχει προστεθεί σε ολόκληρα δείγματα μαρουλιού του εμπορίου, ξεκινώντας από αρχική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^7$ cfu/mL και ακολουθούμενη από τμηματικές δεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι την τελική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL. Τα δείγματα που εμφανίζονται είναι τα εξής: 1: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^7$ cfu/mL) 2: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 3: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 4: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL) 5: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL) 6: *E. coli* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL) 7: Αρνητικό δείγμα.



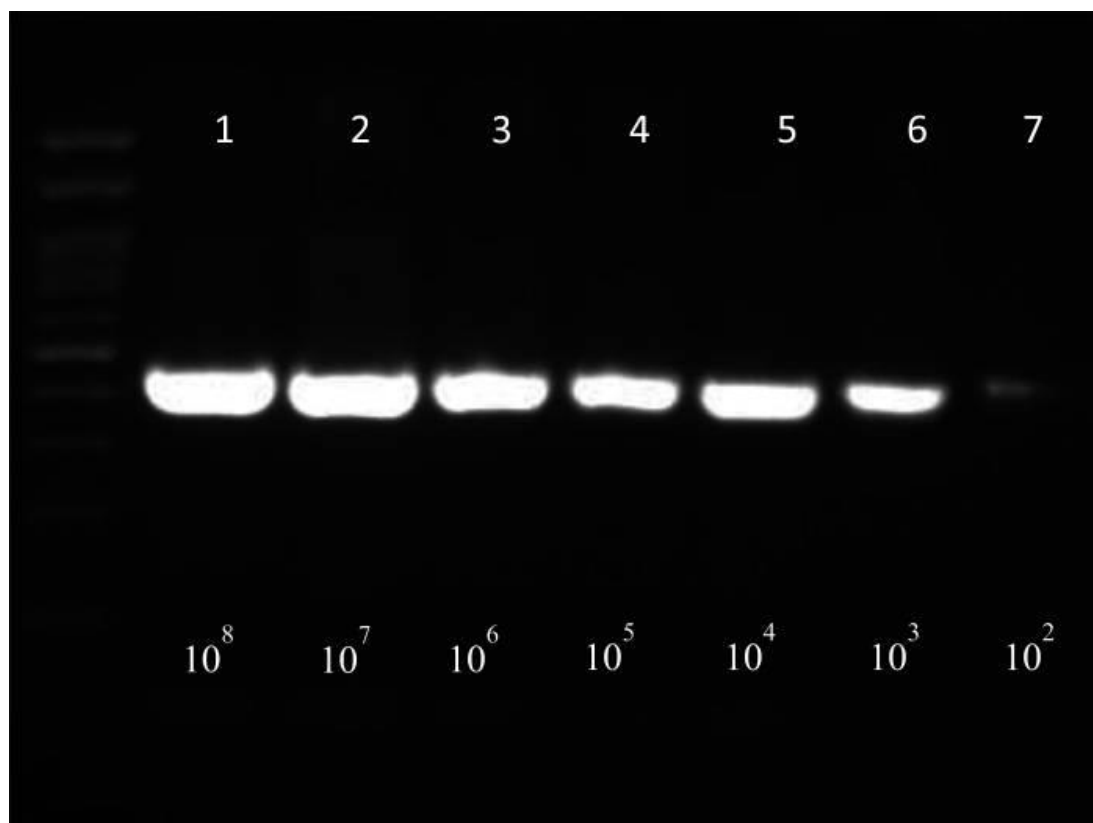
Εικόνα 34 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με *S. Typhimurium*. Απομόνωση με NucleoSpin® Food.

Η εικόνα 34 δείχνει την ανίχνευση του *S. Typhimurium* που έχει προστεθεί σε ολόκληρα δείγματα μαρουλιού του εμπορίου, ξεκινώντας από αρχική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^8$ cfu/mL και ακολουθούμενη από τμηματικές δεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι την τελική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL. Τα δείγματα που εμφανίζονται είναι τα εξής: 1: θετικό control. 2: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^8$ cfu/mL). 3: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^7$ cfu/mL). 4: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL) 5: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 6: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 7: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL). 8: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 9: Αρνητικό δείγμα. 10: Αρνητικό δείγμα.



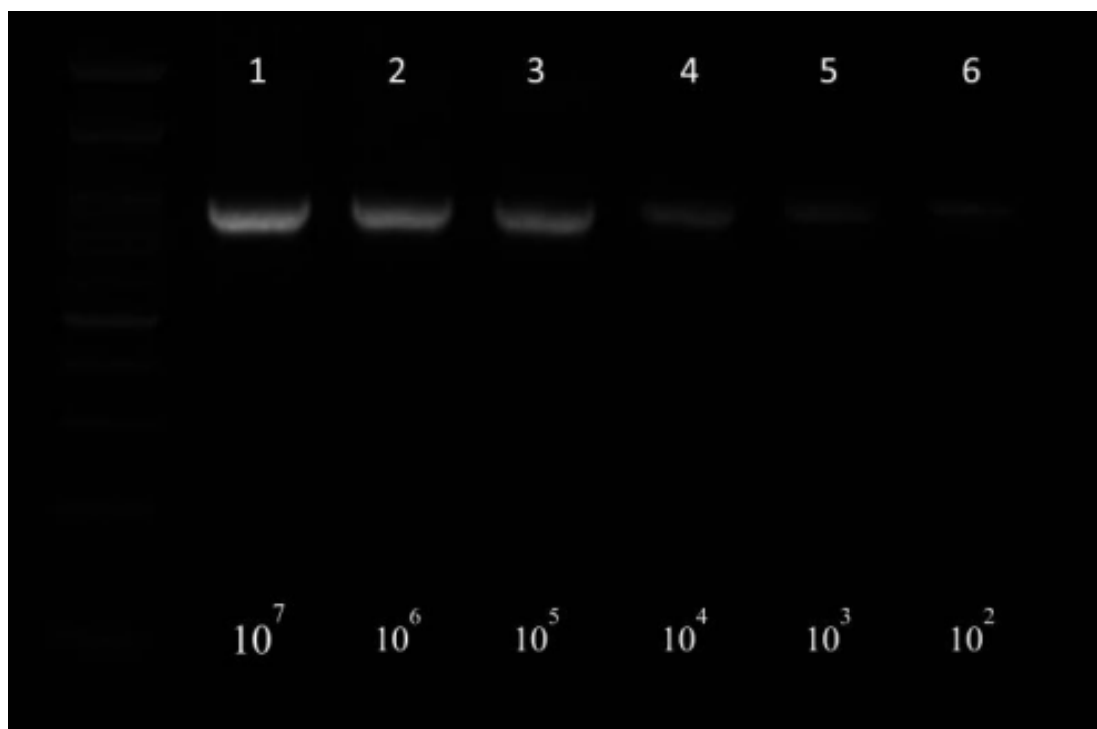
Εικόνα 35 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μαρουλιού επιμολυσμένα με *S. Typhimurium*, και ύστερα απομονώθηκαν με τη μέθοδο 11.

Η εικόνα 35 δείχνει την ανίχνευση του *S. Typhimurium* που έχει προστεθεί σε ολόκληρα δείγματα μαρουλιού του εμπορίου, ξεκινώντας από αρχική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^7$ cfu/mL και ακολουθούμενη από τμηματικές δεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι την τελική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL. Τα δείγματα που εμφανίζονται είναι τα εξής: 1: Αρνητικό δείγμα 2: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^7$ cfu/mL). 3: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 4: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL) 5: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 6: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL). 7: *S. Typhimurium* σε μαρούλι ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 8: Αρνητικό δείγμα. 9: Πρότυπο θετικό δείγμα.



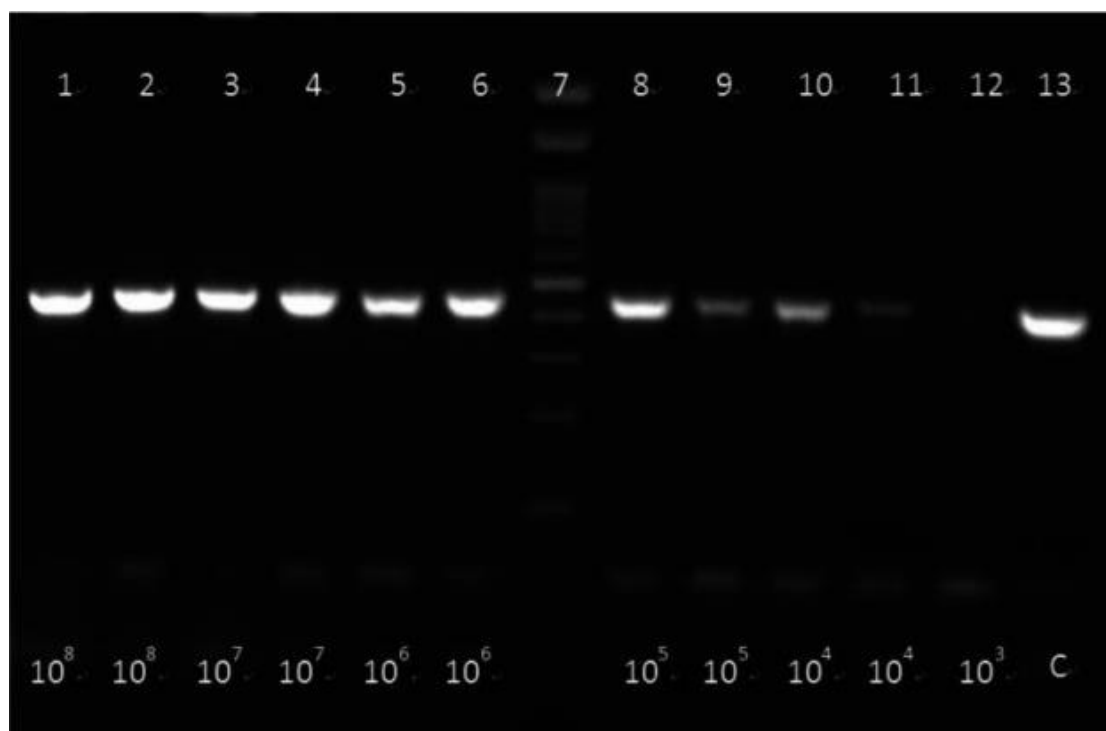
Εικόνα 36 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων νερού που επιμολύνθηκαν με *L. monocytogenes* (1.5 cfu/mL) και ύστερα απομονώθηκαν με τη μέθοδο 11.

Η εικόνα 36 δείχνει την ανίχνευση *L. monocytogenes* σε δείγματα νερού ξεκινώντας από μία αρχική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^8 \text{ cfu/mL}$, ακολουθούμενη από τμηματικές δεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι μία τελική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^2 \text{ cfu/mL}$. Όλα τα δείγματα βρέθηκαν θετικά στα 454 bp. Τα δείγματα που εμφανίζονται είναι τα εξής: 1: *L. monocytogenes* σε νερό ($1,5 \cdot 10^8 \text{ cfu/mL}$). 2: *L. monocytogenes* σε νερό ($1,5 \cdot 10^7 \text{ cfu/mL}$). 3: *L. monocytogenes* σε νερό ($1,5 \cdot 10^6 \text{ cfu/mL}$). 4: *L. monocytogenes* σε νερό ($1,5 \cdot 10^5 \text{ cfu/mL}$). 5: *S. Typhimurium* σε νερό ($1,5 \cdot 10^4 \text{ cfu/mL}$). 6: *L. monocytogenes* σε νερό ($1,5 \cdot 10^3 \text{ cfu/mL}$). 7: *L. monocytogenes* σε νερό ($1,5 \cdot 10^2 \text{ cfu/mL}$).



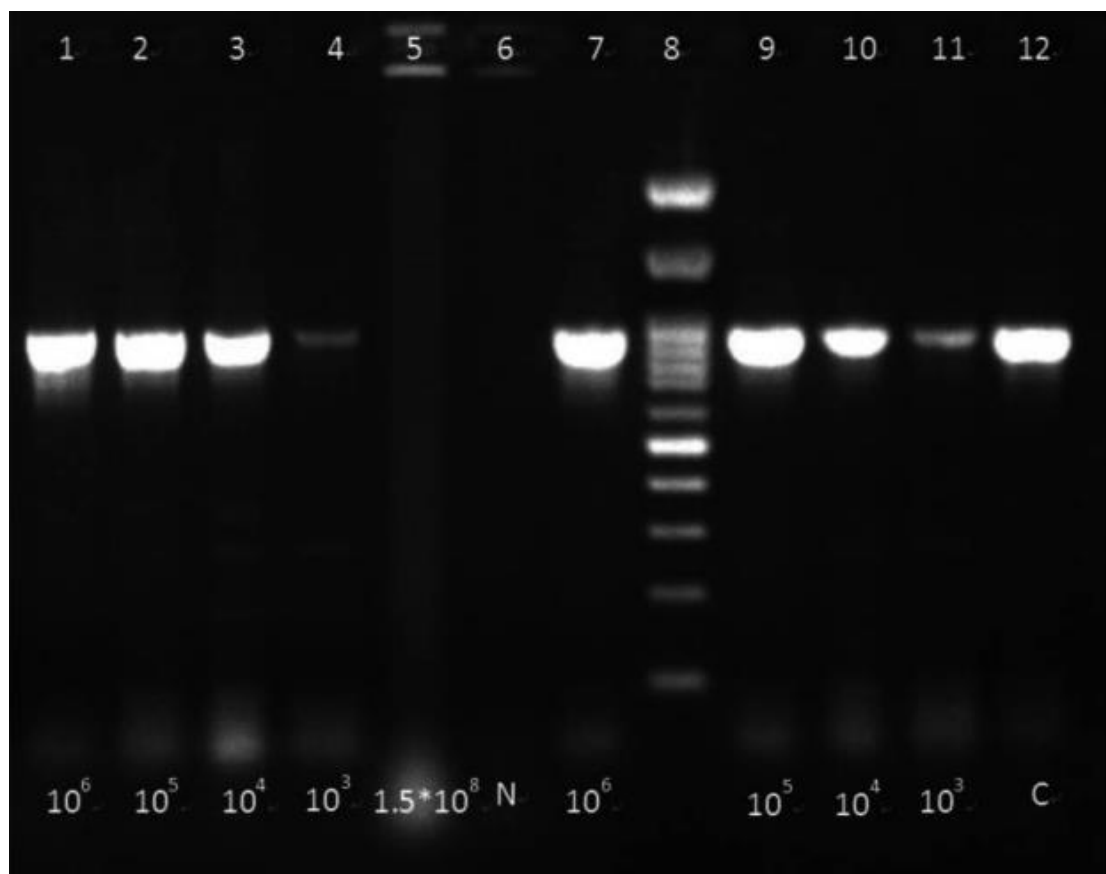
Εικόνα 37 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων νερού που επιμολύνθηκαν με *S. enterica serovar Typhimurium* (1.5×10^7 cfu/mL) και ύστερα απομονώθηκαν με τη μέθοδο 11.

Η εικόνα 37 δείχνει την ανίχνευση *S. Typhimurium* που έχει προστεθεί σε δείγματα νερού ξεκινώντας από μία αρχική συγκέντρωση $1,5 \times 10^7$ cfu/mL, ακολουθούμενη από τμηματικές δεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι μία τελική συγκέντρωση $1,5 \times 10^2$ cfu/mL. Όλα τα δείγματα βρέθηκαν θετικά στα 915 hr. Τα δείγματα που εμφανίζονται είναι τα εξής: 1: *S. Typhimurium* σε νερό ($1,5 \times 10^7$ cfu/mL). 2: *S. Typhimurium* σε νερό ($1,5 \times 10^6$ cfu/mL). 3: *S. Typhimurium* σε νερό ($1,5 \times 10^5$ cfu/mL) 4: *S. Typhimurium* σε νερό ($1,5 \times 10^4$ cfu/mL). 5: *S. Typhimurium* σε νερό ($1,5 \times 10^3$ cfu/mL). 6: *S. Typhimurium* σε νερό ($1,5 \times 10^2$ cfu/mL).



Εικόνα 38 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων τροφίμων που επιμολύνθηκαν με *L. monocytogenes* (1.5 cfu/mL) και ύστερα απομονώθηκαν με τη μέθοδο 11.

Η εικόνα 38 δείχνει την ανίχνευση *L. monocytogenes* σε δείγματα πλήρους γάλακτος και στήθους κοτόπουλου, ξεκινώντας από μία αρχική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^6 \text{ cfu/mL}$, ακολουθούμενη από τμηματικές δεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι την τελική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^3 \text{ cfu/mL}$. Τα δείγματα που παρουσιάζονται είναι τα εξής: 1: *L. monocytogenes* σε γάλα ($1,5 \cdot 10^6 \text{ cfu/mL}$). 2: *L. monocytogenes* σε γάλα ($1,5 \cdot 10^5 \text{ cfu/mL}$). 3: *L. monocytogenes* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^4 \text{ cfu/mL}$). 4: *S. Typhimurium* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^3 \text{ cfu/mL}$). 5: *L. monocytogenes* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^8 \text{ cfu/mL}$). 6: Αρνητικό δείγμα. 7: *L. monocytogenes* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^6 \text{ cfu/mL}$). 8: Σκάλα DNA 100 bp (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). 9: *L. monocytogenes* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^5 \text{ cfu/mL}$). 10: *L. monocytogenes* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^4 \text{ cfu/mL}$). 11: *L. monocytogenes* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^3 \text{ cfu/mL}$). 12: δείγμα ελέγχου. Ενώ τα υπόλοιπα ανιχνεύθηκαν επιτυχώς στα 915 bp, το δείγμα στο πέμπτο τρυβλίο ($1,5 \cdot 10^8 \text{ cfu/mL}$) βρέθηκε αρνητικό. Αυτό συνέβη πιθανώς λόγω αναστολέων που θα μπορούσαν ενδεχομένως να υπάρχουν σε δείγματα με μεγάλες ποσότητες DNA.



Εικόνα 39 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων τροφίμων που επιμολύνθηκαν με *S. enterica* serovar Typhimurium (1.5 cfu/mL) και ύστερα απομονώθηκαν με τη μέθοδο 11.

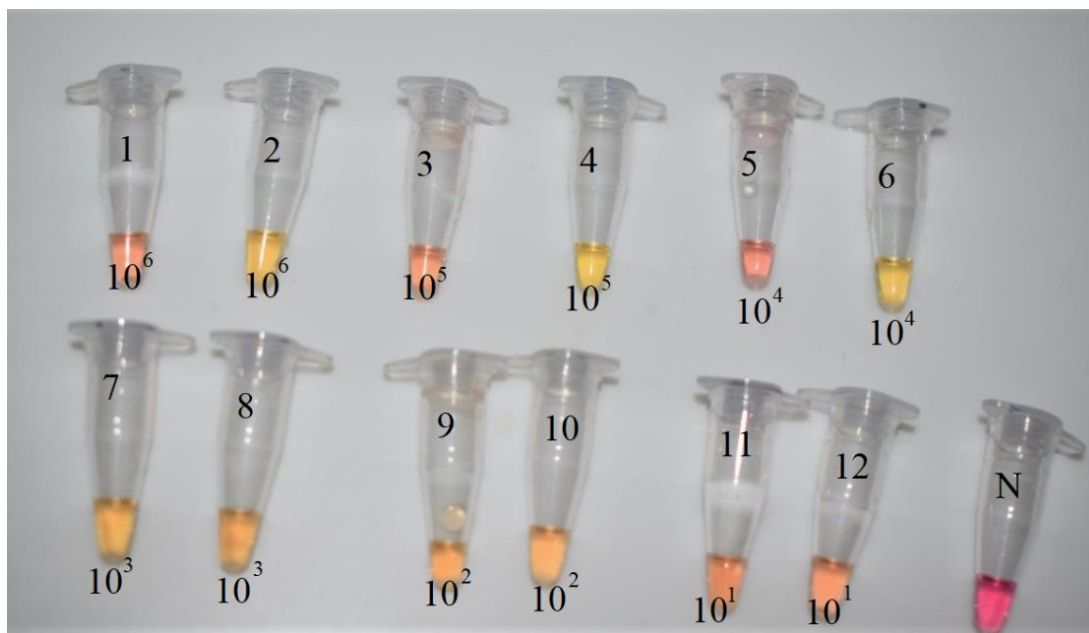
Η εικόνα 39 δείχνει την ανίχνευση *S. Typhimurium* σε δείγματα πλήρους γάλακτος και στήθους κοτόπουλου, ξεκινώντας από μία αρχική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^6 \text{ cfu/mL}$, ακολουθούμενη από τμηματικές δεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι μία τελική συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^3 \text{ cfu/mL}$. Τα δείγματα που παρουσιάζονται είναι τα εξής: 1: *S. Typhimurium* σε γάλα ($1,5 \cdot 10^6 \text{ cfu/mL}$). 2: *S. Typhimurium* σε γάλα ($1,5 \cdot 10^5 \text{ cfu/mL}$). 3: *S. Typhimurium* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^4 \text{ cfu/mL}$). 4: *S. Typhimurium* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^3 \text{ cfu/mL}$) 5: *S. Typhimurium* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^8 \text{ cfu/mL}$). 6: Αρνητικό δείγμα. 7: *S. Typhimurium* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^6 \text{ cfu/mL}$). 8: Σκάλα DNA 100 bp (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). 9: *S. Typhimurium* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^5 \text{ cfu/mL}$). 10: *S. Typhimurium* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^4 \text{ cfu/mL}$). 11: *S. Typhimurium* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^3 \text{ cfu/mL}$). 12: δείγμα ελέγχου. Ενώ τα υπόλοιπα ανιχνεύθηκαν επιτυχώς στα 915 bp, το δείγμα στο πέμπτο τρυβλίο ($1,5 \cdot 10^8 \text{ cfu/mL}$) βρέθηκε αρνητικό. Αυτό συνέβη πιθανώς λόγω αναστολέων που θα μπορούσαν ενδεχομένως να υπάρχουν σε δείγματα με μεγάλες ποσότητες DNA.

4.2. Colorimetric LAMP



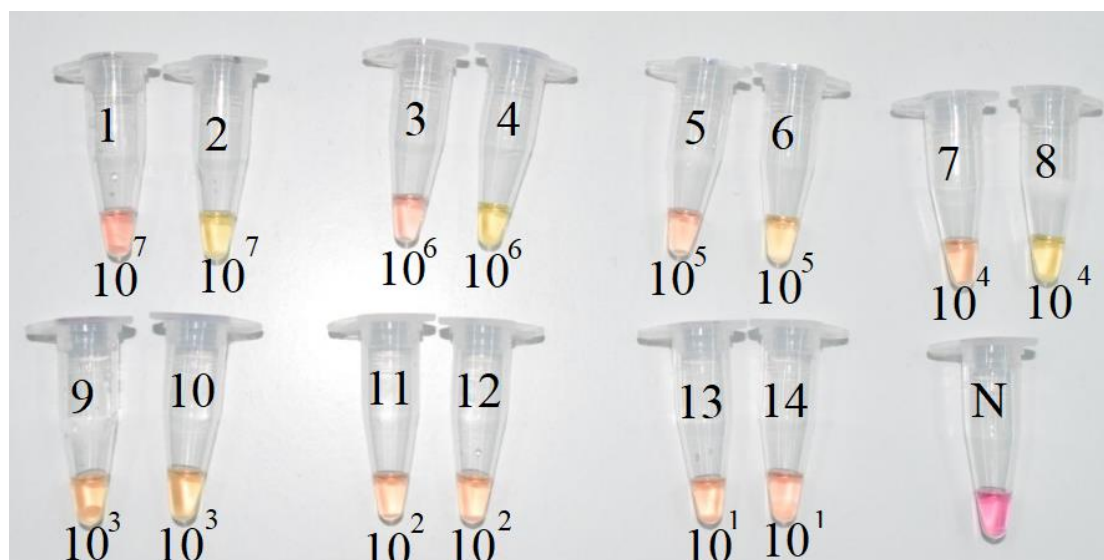
Εικόνα 40 LAMP σε δείγματα μαρουλιού επιμολυσμένα με *S. Typhimurium* σε δυνάδες. Τελευταίο σωληνάκι κοντρόλ.

Τα σωληνάκια είναι παρατεταγμένα από τη συγκέντρωση βακτηρίων 10^6 προς τη 10^1 . Απομόνωση με NucleoSpin[®] Food αριστερά στη δυνάδα και απομόνωση με την in-house τεχνική στα δεξιά. 1: *S. Typhimurium* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 2: *S. Typhimurium* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 3: *S. Typhimurium* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 4: *S. Typhimurium* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 5: *S. Typhimurium* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 6: *S. Typhimurium* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 7: *S. Typhimurium* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL). 8: *S. Typhimurium* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL). 9: *S. Typhimurium* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 10: *S. Typhimurium* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 11: *S. Typhimurium* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^1$ cfu/mL). 12: *S. Typhimurium* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^1$ cfu/mL). 13: Αρνητικό δείγμα.



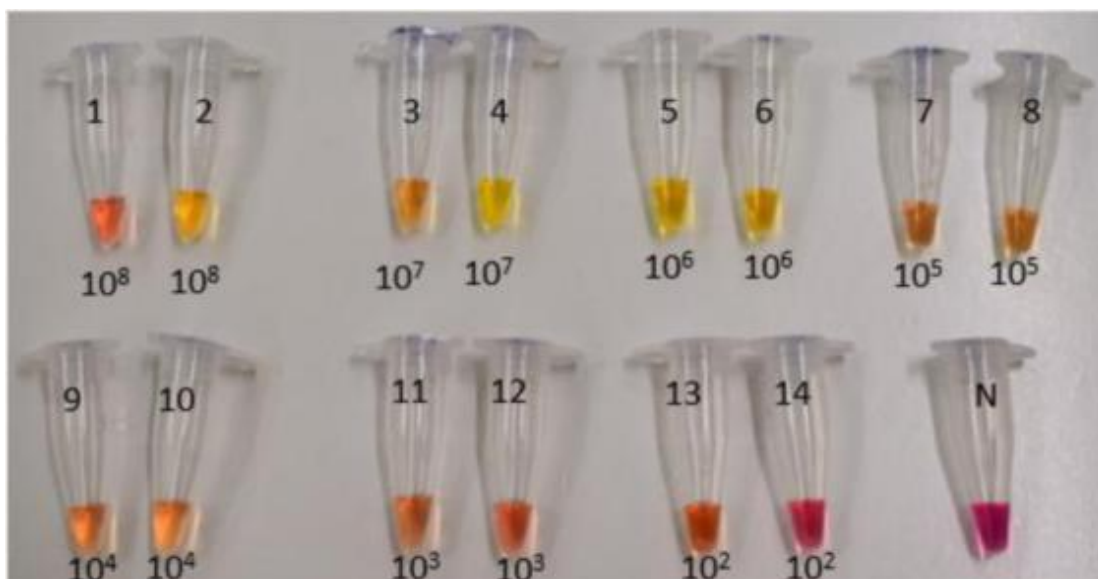
Εικόνα 41 LAMP σε δείγματα μαρουλιού επιμολυσμένα με *L. monocytogenes* σε δυάδες. Τελευταίο σωληνάκι κοντρόλ.

Τα σωληνάκια είναι παρατεταγμένα από τη συγκέντρωση βακτηρίων 10^6 προς τη 10^1 . Απομόνωση με NucleoSpin® Food αριστερά στη δυάδα και απομόνωση με την in-house τεχνική στα δεξιά. 1: *L. monocytogenes* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 2: *L. monocytogenes* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 3: *L. monocytogenes* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 4: *L. monocytogenes* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 5: *L. monocytogenes* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 6: *L. monocytogenes* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 7: *L. monocytogenes* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL). 8: *L. monocytogenes* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL). 9: *L. monocytogenes* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 10: *L. monocytogenes* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 11: *L. monocytogenes* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^1$ cfu/mL). 12: *L. monocytogenes* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^1$ cfu/mL). N: Αρνητικό δείγμα.



Εικόνα 42 LAMP σε δείγματα μαρουλιού επιμολυσμένα με *E. Coli* σε δυάδες. Τελευταίο σωληνάκι κοντρόλ.

Τα σωληνάκια είναι παρατεταμένα από τη συγκέντρωση βακτηρίων 10^6 προς τη 10^1 . Απομόνωση με NucleoSpin® Food αριστερά στη δυάδα και απομόνωση με την in-house τεχνική στα δεξιά. 1: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^7$ cfu/mL). 2: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^7$ cfu/mL). 3: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 4: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 5: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 6: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 7: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 8: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 9: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL). 10: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL). 11: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 12: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 13: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^1$ cfu/mL). 14: *E. Coli* στο μαρούλι ($1,5 \cdot 10^1$ cfu/mL). N: Αρνητικό δείγμα.



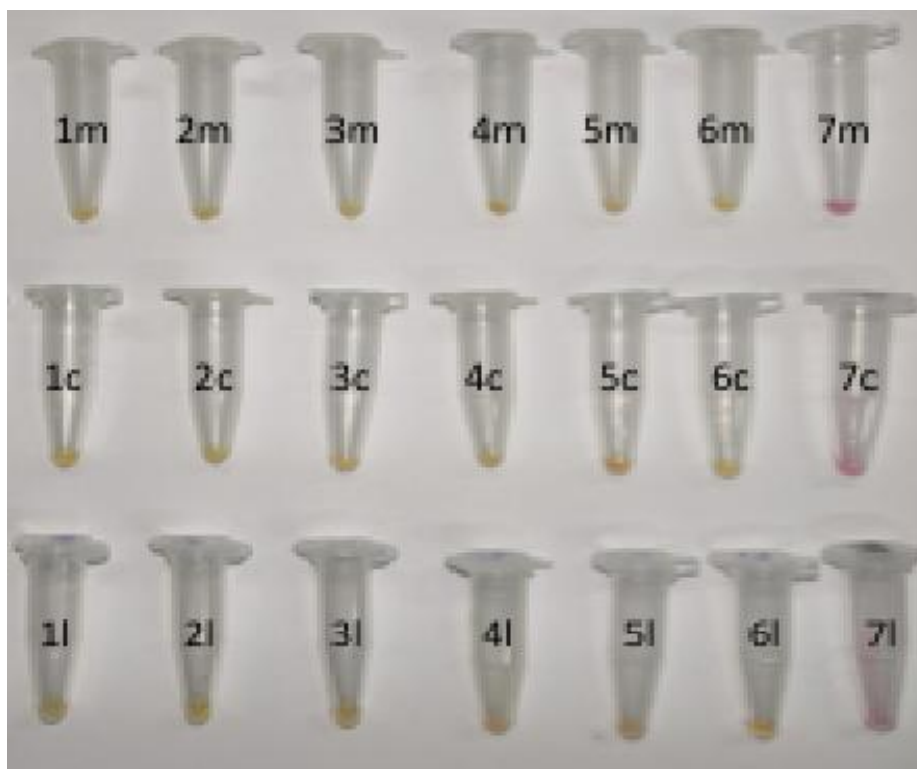
Εικόνα 43 LAMP σε δείγματα τροφίμων επιμολυσμένα με *S. Typhimurium* και *L. monocytogenes* ($1,5 \text{ cfu/mL}$) μετά από εκχύλιση βακτηριακού DNA με τη μέθοδο 4

1: *S. Typhimurium* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^8 \text{ cfu/mL}$). 2: *L. monocytogenes* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^8 \text{ cfu/mL}$). 3: *S. Typhimurium* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^7 \text{ cfu/mL}$). 4: *L. monocytogenes* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^7 \text{ cfu/mL}$). 5: *S. Typhimurium* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^6 \text{ cfu/mL}$). 6: *L. monocytogenes* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^6 \text{ cfu/mL}$). 7: *S. Typhimurium* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^5 \text{ cfu/mL}$). 8: *L. monocytogenes* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^5 \text{ cfu/mL}$). 9: *S. Typhimurium* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^4 \text{ cfu/mL}$). 10: *L. monocytogenes* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^4 \text{ cfu/mL}$). 11: *S. Typhimurium* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^3 \text{ cfu/mL}$). 12: *L. monocytogenes* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^3 \text{ cfu/mL}$). 13: *S. Typhimurium* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^2 \text{ cfu/mL}$). 14: *L. monocytogenes* στο γάλα ($1,5 \cdot 10^2 \text{ cfu/mL}$). 15: Αρνητικό δείγμα.

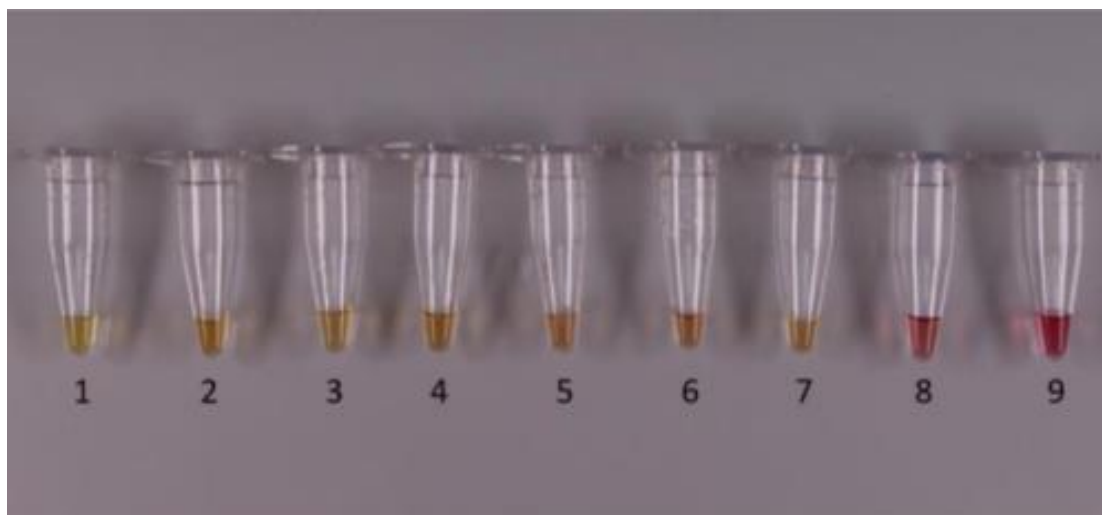


Εικόνα 44 LAMP σε δείγματα τροφίμων επιμολυσμένα με *S. Typhimurium* και *L. monocytogenes* (*1,5 cfu/mL) μετά από εκχύλιση βακτηριακού DNA με τη μέθοδο 4

1: *S. Typhimurium* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^7$ cfu/mL). 2: *L. monocytogenes* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^7$ cfu/mL). 3: *S. Typhimurium* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 4: *L. monocytogenes* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^6$ cfu/mL). 5: *S. Typhimurium* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 6: *L. monocytogenes* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^5$ cfu/mL). 7: *S. Typhimurium* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 8: *L. monocytogenes* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^4$ cfu/mL). 9: *S. Typhimurium* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL). 10: *L. monocytogenes* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^3$ cfu/mL). 11: *S. Typhimurium* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 12: *L. monocytogenes* σε κοτόπουλο ($1,5 \cdot 10^2$ cfu/mL). 13: Αρνητικό δείγμα.



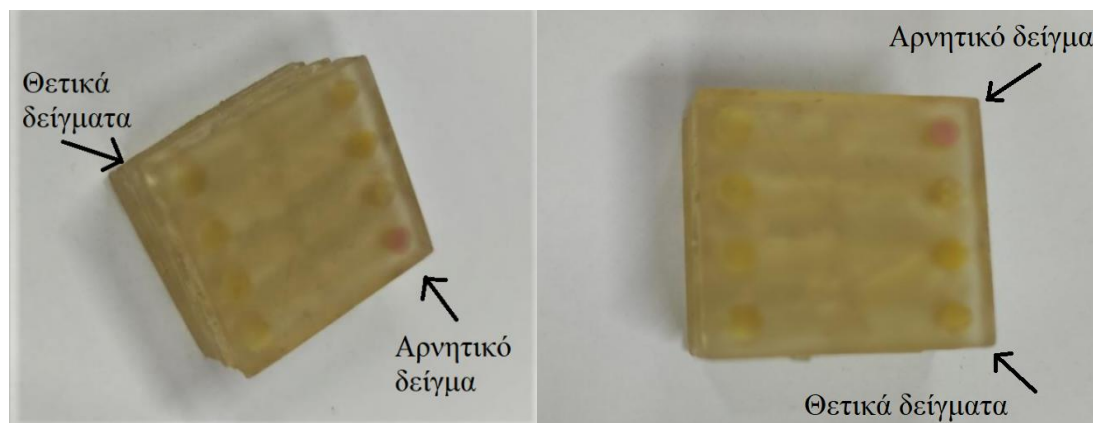
Εικόνα 45 Ανίχνευση της *E. coli* σε εμπλουτισμένα δείγματα τροφίμων με colorimetric LAMP



Εικόνα 46 Ανίχνευση της *L. monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος και κοτόπουλου του εμπορίου.

Η εικόνα 43 δείχνει την ανίχνευση της *L. monocytogenes* σε εμπορικά δείγματα γάλακτος και κοτόπουλου. Από την παραπάνω εικόνα, όλα τα δείγματα τροφίμων 1-6, ήταν θετικά για *L. monocytogenes*. Επιπλέον, το δείγμα ελέγχου (7) ήταν επίσης θετικό για *L. monocytogenes*, ενώ τα δείγματα 8 και 9 βρέθηκαν αρνητικά, όπως αναμενόταν. Η ανίχνευση έδειξε τα ίδια αποτελέσματα με τη μέθοδο PCR-ηλεκτροφόρησης και τη μικροβιολογική ανάλυση, δίνοντας επίσης 100% ακρίβεια. Δείγματα 1-6m: ανίχνευση δεκαπλάσια αραιωμένης κατά σειρά προσθήκης *E. coli* σε δείγματα γάλακτος ξεκινώντας από αρχική συγκέντρωση 10⁶-10¹ cfu/mL. 1-6γ: ανίχνευση δεκαπλάσια αραιωμένου κατά σειρά εμπλουτισμένου *E. coli* σε δείγματα κοτόπουλου ξεκινώντας από αρχική συγκέντρωση 10⁶-10¹ cfu/mL. 1-6l: ανίχνευση δεκαπλάσια αραιωμένου κατά σειρά εμβολιασμένου *E. coli* σε δείγματα μαρουλιού ξεκινώντας από αρχική συγκέντρωση 10⁶-10¹ cfu/mL. 7m, 7c, 7l: αποστειρωμένα δείγματα γάλακτος, κοτόπουλου και μαρουλιού. Όπως φαίνεται στην εικόνα 43, όλα τα θετικά δείγματα παρουσιάζουν διαφορά χρώματος από μωβ σε κίτρινο, ενώ τα αρνητικά δείγματα δεν παρουσιάζουν τέτοια διαφορά. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η μέθοδος είναι πολύ ευαίσθητη και 100% αξιόπιστη. Συγκρίνοντας την παρούσα με παρόμοιες μελέτες που χρησιμοποίησαν αυτές τις μεθοδολογίες για την ταυτοποίηση της *Salmonella Typhimurium* και της *Listeria monocytogenes* σε δείγματα τροφίμων που έχουν προστεθεί (Paratheodorou et al 2021), η παρούσα μελέτη παρουσιάζει παρόμοια αλλά καλύτερα αποτελέσματα. Αυτό δικαιολογείται πιθανώς επειδή στην παρούσα μελέτη μεταφέρθηκε μεγαλύτερος όγκος δείγματος (1500 μ L) στους μικροσωλήνες Eppendorf μετά την ομογενοποίηση με stomacher, ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση και διατήρηση των συμπυκνωμένων

βακτηριακών κυττάρων. Μετά την επιβεβαίωση της ευαισθησίας των μεθόδων, αναλύθηκαν συνολικά 75 δείγματα τροφίμων για πιθανή επιμόλυνση με *E. coli*. Μεταξύ όλων των εμπορικών δειγμάτων τροφίμων 2 από τα 25 (8%) δείγματα γάλακτος, 14 από τα 25 (56%) δείγματα κοτόπουλου και 9 από τα 25 (36%) δείγματα μαρουλιού βρέθηκαν θετικά.



Εικόνα 47 Αποτελέσματα της ανάλυσης των εμπορικών δειγμάτων διατροφής με τη χρήση της LAMP σε 3D συσκευή μικρορευστομηχανικής.

Πίνακας 4.1. Αποτελέσματα

Πείραμα	Μέθοδος	Τρόφιμο	Βακτήριο	Μοριακή τεχνική	Όριο ανίχνευσης
1	1	Νερό	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10^3
2	1	Νερό	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10^2
3	1	Νερό	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10^4
4	1	Νερό	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10^3
5	1	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10^3
6	1	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10^2
7	1	Γάλα	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10^3
8	1	Γάλα	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10^3
9	1	Γάλα	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10^4

10	1	Γάλα	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
11	1	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
12	1	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ³
13	1	Κοτόπουλο	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
14	1	Κοτόπουλο	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ³
15	1	Κοτόπουλο	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
16	1	Κοτόπουλο	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
17	1	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
18	1	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ³
19	1	Μαρούλι	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
20	1	Μαρούλι	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ³
21	1	Μαρούλι	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
22	1	Μαρούλι	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ³
23	1	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
24	1	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ³
25	2	Νερό	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ²
26	2	Νερό	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ¹
27	2	Νερό	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ¹
28	2	Νερό	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ¹
29	2	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ²
30	2	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ¹
31	2	Γάλα	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ¹
32	2	Γάλα	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ¹
33	2	Γάλα	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ²
34	2	Γάλα	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ¹

35	2	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ²
36	2	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ¹
37	2	Κοτόπουλο	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ²
38	2	Κοτόπουλο	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ¹
39	2	Κοτόπουλο	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ²
40	2	Κοτόπουλο	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ¹
41	2	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ²
42	2	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ¹
43	2	Μαρούλι	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ²
44	2	Μαρούλι	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ¹
45	2	Μαρούλι	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ²
46	2	Μαρούλι	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ²
47	2	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ¹
48	2	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ¹
49	3	Νερό	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ¹
50	3	Νερό	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ⁵
51	3	Νερό	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
52	3	Νερό	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁵
53	3	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
54	3	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
55	3	Γάλα	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
56	3	Γάλα	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ⁶
57	3	Γάλα	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
58	3	Γάλα	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁶
59	3	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶

60	3	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁶
61	3	Κοτόπουλο	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ⁶
62	3	Κοτόπουλο	<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMP	10 ⁵
63	3	Κοτόπουλο	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁶
64	3	Κοτόπουλο	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁵
65	3	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁶
66	3	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
67	3	Μαρούλι	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ⁵
68	3	Μαρούλι	<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMP	10 ⁵
69	3	Μαρούλι	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁵
70	3	Μαρούλι	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁵
71	3	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁵
72	3	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
73	4	Νερό	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ³
74	4	Νερό	<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMP	10 ²
75	4	Νερό	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁴
76	4	Νερό	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ³
77	4	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁴
78	4	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ³
79	4	Γάλα	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ⁶
80	4	Γάλα	<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMP	10 ⁵
81	4	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁶
82	4	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
83	4	Γάλα	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁶
84	4	Γάλα	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁶

85	4	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
86	4	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
87	4	Κοτόπουλο	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
88	4	Κοτόπουλο	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ⁴
89	4	Κοτόπουλο	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
90	4	Κοτόπουλο	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁵
91	4	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
92	4	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴
93	4	Μαρούλι	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
94	4	Μαρούλι	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ⁴
95	4	Μαρούλι	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
96	4	Μαρούλι	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
97	4	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
98	4	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴
99	5	Νερό	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
100	5	Νερό	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ²
101	5	Νερό	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
102	5	Νερό	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ³
103	5	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
104	5	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ³
105	5	Γάλα	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
106	5	Γάλα	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ⁶
107	5	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
108	5	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
109	5	Γάλα	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶

110	5	Γάλα	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁵
110	5	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
111	5	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁶
112	5	Κοτόπουλο	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
113	5	Κοτόπουλο	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ⁵
114	5	Κοτόπουλο	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
115	5	Κοτόπουλο	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
116	5	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
117	5	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
118	5	Μαρούλι	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
119	5	Μαρούλι	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ⁴
120	5	Μαρούλι	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
121	5	Μαρούλι	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
122	5	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
123	5	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴
124	6	Νερό	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
125	6	Νερό	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ²
126	6	Νερό	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
127	6	Νερό	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ³
128	6	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
129	6	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ³
130	6	Γάλα	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
131	6	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
132	6	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
133	6	Γάλα	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁵

134	6	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
135	6	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
136	6	Κοτόπουλο	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
137	6	Κοτόπουλο	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ⁵
138	6	Κοτόπουλο	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
139	6	Κοτόπουλο	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
140	6	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁶
141	6	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
142	6	Μαρούλι	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
143	6	Μαρούλι	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ⁴
144	6	Μαρούλι	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
145	6	Μαρούλι	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
146	6	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
147	6	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴
148	7	Νερό	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
149	7	Νερό	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ²
150	7	Νερό	<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
151	7	Νερό	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ³
152	7	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
153	7	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ³
154	7	Γάλα	<i>Salmonella Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
155	7	Γάλα	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LAMP	10 ⁴
156	7	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
157	7	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
158	7	Γάλα	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁵

159	7	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
160	7	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴
161	7	Κοτόπουλο	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
162	7	Κοτόπουλο	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	LAMP	10 ⁵
163	7	Κοτόπουλο	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
164	7	Κοτόπουλο	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
165	7	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
166	7	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
167	7	Μαρούλι	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
168	7	Μαρούλι	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	LAMP	10 ⁴
169	7	Μαρούλι	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
170	7	Μαρούλι	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
171	7	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁴
172	7	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴
173	8	Νερό	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
174	8	Νερό	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	LAMP	10 ²
175	8	Νερό	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
176	8	Νερό	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ³
177	8	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ³
178	8	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ³
179	8	Γάλα	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
180	8	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴
181	8	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵
182	8	Γάλα	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁵
183	8	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR-electrophoresis	10 ⁵

184	8	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
185	8	Κοτόπουλο	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ⁴
186	8	Κοτόπουλο	<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMP	10 ⁵
187	8	Κοτόπουλο	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁵
188	8	Κοτόπουλο	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
189	8	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁴
190	8	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁵
191	8	Μαρούλι	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ⁵
192	8	Μαρούλι	<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMP	10 ⁴
193	8	Μαρούλι	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁴
194	8	Μαρούλι	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
195	8	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁴
196	8	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴
197	9	Νερό	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ²
198	9	Νερό	<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMP	10 ²
199	9	Νερό	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ³
200	9	Νερό	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ²
201	9	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ³
202	9	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ³
203	9	Γάλα	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ⁴
204	9	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴
205	9	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁵
206	9	Γάλα	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
207	9	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁵
208	9	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴

209	9	Κοτόπουλο	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ⁴
210	9	Κοτόπουλο	<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMP	10 ⁴
211	9	Κοτόπουλο	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁴
212	9	Κοτόπουλο	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
213	9	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁴
214	9	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴
215	9	Μαρούλι	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ⁴
216	9	Μαρούλι	<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMP	10 ⁴
217	9	Μαρούλι	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁴
218	9	Μαρούλι	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
219	9	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁴
220	9	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴
221	10	Νερό	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ²
222	10	Νερό	<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMP	10 ²
223	10	Νερό	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ³
224	10	Νερό	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ²
225	10	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ³
226	10	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ³
227	10	Γάλα	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ⁴
228	10	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ⁴
229	10	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁴
230	10	Γάλα	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ⁴
231	10	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁴
232	10	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ³
233	10	Κοτόπουλο	<i>Salmonella</i> Typhimurium	PCR- electrophoresis	10 ³

234	10	Κοτόπουλο	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	LAMP	10 ³
235	10	Κοτόπουλο	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ⁴
236	10	Κοτόπουλο	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ³
237	10	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ³
238	10	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ³
239	10	Μαρούλι	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	PCR- electrophoresis	10 ³
240	10	Μαρούλι	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	LAMP	10 ³
241	10	Μαρούλι	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ³
242	10	Μαρούλι	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ³
243	10	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ³
244	10	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ²
245	11	Νερό	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	PCR- electrophoresis	10 ¹
246	11	Νερό	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	LAMP	10 ¹
247	11	Νερό	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ²
248	11	Νερό	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ²
249	11	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ¹
250	11	Νερό	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ¹
251	11	Γάλα	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	PCR- electrophoresis	10 ²
252	11	Γάλα	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	LAMP	10 ¹
253	11	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ¹
254	11	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ²
255	11	Γάλα	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ²
256	11	Γάλα	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ²
257	11	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ²
258	11	Γάλα	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ¹

259	11	Κοτόπουλο	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	PCR- electrophoresis	10 ²
260	11	Κοτόπουλο	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	LAMP	10 ¹
261	11	Κοτόπουλο	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ²
262	11	Κοτόπουλο	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ²
263	11	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ²
264	11	Κοτόπουλο	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ¹
265	11	Μαρούλι	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	PCR- electrophoresis	10 ²
266	11	Μαρούλι	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	LAMP	10 ¹
267	11	Μαρούλι	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR- electrophoresis	10 ²
268	11	Μαρούλι	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	LAMP	10 ²
269	11	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	PCR- electrophoresis	10 ²
270	11	Μαρούλι	<i>Escherichia coli</i>	LAMP	10 ¹

Με βάση τα δεδομένα που παρέχονται στον πίνακα 4.1, η σειρά κατάταξης των μεθοδολογιών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση παθογόνων σε δείγματα τροφίμων, από την καλύτερη προς τη χειρότερη, έχει ως εξής:

1. Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόχου (LAMP)
2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - Ηλεκτροφόρηση (PCR-Electrophoresis)

Αυτή η κατάταξη βασίζεται κυρίως στο όριο ανίχνευσης κάθε μεθόδου, το οποίο είναι κρίσιμος παράγοντας για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας μίας μεθόδου ανίχνευσης. Το όριο ανίχνευσης αναφέρεται στη μικρότερη ποσότητα μίας ουσίας που μπορεί να μετρηθεί αξιόπιστα με μία αναλυτική διαδικασία. Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης, ένα χαμηλότερο όριο ανίχνευσης υποδηλώνει υψηλότερη ευαισθησία, καθώς σημαίνει ότι η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει μικρότερο αριθμό παθογόνων κυττάρων στο δείγμα τροφίμου.

Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόχου (LAMP)

Η συγκεκριμένη μέθοδος κατέδειξε με συνέπεια τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης σε όλα τα δείγματα τροφίμων και τα παθογόνα που δοκιμάστηκαν. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της ανίχνευσης *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα νερού, το LAMP πέτυχε ένα όριο ανίχνευσης τόσο χαμηλό όσο 10^1 . Αυτή η τάση είναι συνεπής σε όλα τα δείγματα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του κοτόπουλου, του μαρουλιού και του γάλακτος, και για όλα τα παθογόνα, συμπεριλαμβανομένων των *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli*. Αυτό υποδηλώνει ότι το LAMP είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση παθογόνων σε δείγματα τροφίμων μεταξύ των μεθόδων που δοκιμάστηκαν σε αυτή τη μελέτη.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - Ηλεκτροφόρηση (PCR-Electrophoresis)

Παρά το γεγονός πως η μέθοδος απέδειξε επίσης την ικανότητα ανίχνευσης παθογόνων σε όλα τα δείγματα τροφίμων, τα όρια ανίχνευσης ήταν σταθερά υψηλότερα από αυτά του LAMP. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της ανίχνευσης *Salmonella* Typhimurium σε δείγματα νερού, η PCR-Electrophoresis είχε όριο ανίχνευσης 10^3 . Αυτό το μοτίβο είναι συνεπές σε όλα τα δείγματα τροφίμων και τα παθογόνα, υποδεικνύοντας ότι η ηλεκτροφόρηση PCR είναι λιγότερο ευαίσθητη από το LAMP.

Με βάση τα δεδομένα που παρέχονται, το LAMP φαίνεται να είναι η ανώτερη μέθοδος για την ανίχνευση παθογόνων σε δείγματα τροφίμων λόγω των χαμηλότερων ορίων ανίχνευσης, υποδηλώνοντας υψηλότερη ευαισθησία. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η επιλογή της μεθόδου ανίχνευσης σε πραγματικές συνθήκες θα εξαρτηθεί επίσης από άλλους παράγοντες που δεν λαμβάνονται υπόψη σε αυτήν την κατάταξη, όπως το κόστος, η απόδοση χρόνου ή ευκολία χρήσης, η αναπαραγωγικότητα και η επαναληψιμότητα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα των αποτελεσμάτων και λαμβάνοντας υπόψιν τις καθορισμένες κατηγορίες συγκεντρωτικής παράθεσης των αποτελεσμάτων, προσεχώς παρατίθεται μία κριτική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των μεθόδων ανίχνευσης για κάθε κατηγορία χωριστά:

Κατηγορία 1 (Μέθοδοι υπό αριθμό στοιχείων πίνακα 2 και 11)

Σε αυτή την κατηγορία χρησιμοποιήθηκαν τόσο οι μέθοδοι LAMP όσο και οι μέθοδοι PCR-

Ηλεκτροφόρησης για την ανίχνευση παθογόνων σε διάφορα δείγματα τροφίμων. Η μέθοδος LAMP έδειξε σταθερά χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (10^1) σε σύγκριση με την PCR - ηλεκτροφόρηση (10^3), υποδεικνύοντας υψηλότερη ευαισθησία. Αυτό παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα τροφίμων και τα παθογόνα, συμπεριλαμβανομένου του νερού, του γάλακτος, του κοτόπουλου, του μαρουλιού και των παθογόνων *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli*.

Κατηγορία 2 (Μέθοδοι υπό αριθμό στοιχείου πίνακα 1)

Σε αυτή την κατηγορία χρησιμοποιήθηκε μόνο η μέθοδος LAMP. Το όριο ανίχνευσης ήταν σταθερά χαμηλό (10^1), υποδεικνύοντας υψηλή ευαισθησία. Αυτό παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα τροφίμων και τα παθογόνα, συμπεριλαμβανομένου του νερού, του γάλακτος, του κοτόπουλου, του μαρουλιού και των παθογόνων *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli*.

Κατηγορία 3 (Μέθοδοι υπό αριθμό στοιχείου πίνακα 10)

Σε αυτή την κατηγορία χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο μέθοδοι LAMP και PCR-Ηλεκτροφόρηση. Η μέθοδος LAMP έδειξε σταθερά χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (10^2) σε σύγκριση με την PCR-Ηλεκτροφόρηση (10^3), υποδεικνύοντας υψηλότερη ευαισθησία. Αυτό παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα τροφίμων και τα παθογόνα.

Κατηγορία 4 (Μέθοδοι υπό αριθμό στοιχείων πίνακα 9)

Σε αυτή την κατηγορία χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο μέθοδοι LAMP και PCR-Ηλεκτροφόρηση. Το όριο ανίχνευσης ήταν σταθερά χαμηλό (10^2) και για τις δύο μεθόδους, υποδεικνύοντας υψηλή ευαισθησία. Αυτό παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα τροφίμων και τα παθογόνα.

Κατηγορία 5 (Μέθοδοι υπό αριθμό στοιχείων πίνακα 7 και 8)

Σε αυτή την κατηγορία χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο μέθοδοι LAMP και PCR-

Ηλεκτροφόρηση. Η μέθοδος LAMP έδειξε σταθερά χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (10^4) σε σύγκριση με την ηλεκτροφόρηση PCR (10^5), υποδεικνύοντας υψηλότερη ευαισθησία. Αυτό παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα τροφίμων και τα παθογόνα.

Κατηγορία 6 (Μέθοδοι υπό αριθμό στοιχείου πίνακα 6)

Σε αυτή την κατηγορία χρησιμοποιήθηκε μόνο η μέθοδος LAMP. Το όριο ανίχνευσης ήταν σταθερά χαμηλό (10^1), υποδεικνύοντας υψηλή ευαισθησία. Αυτό παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα τροφίμων και τα παθογόνα, συμπεριλαμβανομένου του νερού, του γάλακτος, του κοτόπουλου, του μαρουλιού και των παθογόνων *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli*.

Κατηγορία 7 (Μέθοδοι υπό αριθμό στοιχείων πίνακα 4 και 5)

Σε αυτή την κατηγορία χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο μέθοδοι LAMP και PCR-Ηλεκτροφόρηση. Η μέθοδος LAMP έδειξε σταθερά χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (10^1) σε σύγκριση με την ηλεκτροφόρηση PCR (10^3), υποδεικνύοντας υψηλότερη ευαισθησία. Αυτό παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα τροφίμων και τα παθογόνα.

Κατηγορία 8 (Μέθοδοι υπό αριθμό στοιχείου πίνακα 3)

Σε αυτή την κατηγορία χρησιμοποιήθηκε μόνο η μέθοδος LAMP. Το όριο ανίχνευσης ήταν σταθερά χαμηλό (10^1), υποδεικνύοντας υψηλή ευαισθησία. Αυτό παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα τροφίμων και τα παθογόνα, συμπεριλαμβανομένου του νερού, του γάλακτος, του κοτόπουλου, του μαρουλιού και των παθογόνων *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli*.

Εν κατακλείδι, η μέθοδος LAMP επέδειξε σταθερά υψηλότερη ευαισθησία σε όλες τις κατηγορίες, όπως αποδεικνύεται από τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης. Αυτό υποδηλώνει ότι το LAMP είναι γενικά πιο αποτελεσματικό για την ανίχνευση παθογόνων σε δείγματα τροφίμων. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η επιλογή της μεθόδου ανίχνευσης σε πραγματικές συνθήκες θα εξαρτηθεί επίσης από άλλους παράγοντες που δεν λαμβάνονται υπόψη σε αυτήν την κατάταξη, όπως το κόστος, η απόδοση χρόνου ή η ευκολία

χρήσης, η αναπαραγωγιμότητα και η επαναληψιμότητα.

4.3 Μεθοδολογία στατιστικής ανάλυσης

Τα δεδομένα για αυτή τη μελέτη συλλέχθηκαν από μία σειρά πειραμάτων, όπως περιγράφεται λεπτομερώς στον Πίνακα 4. Κάθε πείραμα σχεδιάστηκε για να αξιολογήσει το όριο ανίχνευσης διαφόρων βακτηρίων σε διαφορετικά δείγματα τροφίμων χρησιμοποιώντας δύο κύριες μοριακές τεχνικές: PCR-ηλεκτροφόρηση και LAMP.

Τα δεδομένα από τον Πίνακα 4 καταχωρήθηκαν στο λογισμικό SPSS. Κάθε στήλη στον πίνακα αντιπροσωπεύει μία μεταβλητή στο σύνολο δεδομένων SPSS. Οι μεταβλητές ορίστηκαν ως εξής:

- Πείραμα: Αριθμητικό αναγνωριστικό για κάθε πείραμα.
- Μέθοδος: Κατηγορική μεταβλητή που υποδεικνύει τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε (1 ή 2).
- Τρόφιμα: Κατηγορική μεταβλητή που αντιπροσωπεύει τον τύπο του δείγματος τροφίμου που δοκιμάστηκε (Νερό, Γάλα, Κοτόπουλο, Μαρούλι).
- Βακτήρια: Κατηγορική μεταβλητή που υποδεικνύει τον τύπο των βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν (*Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*).
- Όριο ανίχνευσης: Αριθμητική μεταβλητή που υποδεικνύει το όριο ανίχνευσης των βακτηρίων στο δείγμα.

Ο πρωταρχικός στόχος της στατιστικής ανάλυσης ήταν να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα των δύο μοριακών τεχνικών σε διαφορετικά δείγματα τροφίμων και τύπους βακτηρίων. Πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες αναλύσεις:

- Περιγραφική Στατιστική: Βασικές στατιστικές, συμπεριλαμβανομένων των μέσων, των τυπικών αποκλίσεων και των κατανομών συχνοτήτων, υπολογίστηκαν για τα όρια ανίχνευσης σε διάφορες κατηγορίες.
- ANOVA (Analysis of Variance): Για τη σύγκριση των μέσων ορίων ανίχνευσης μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων τροφίμων και των τύπων βακτηρίων. Πραγματοποιήθηκαν post-hoc ανάλυση για τον εντοπισμό συγκεκριμένων ομάδων με σημαντικές διαφορές.
- t-test: Για σύγκριση των μέσων ορίων ανίχνευσης μεταξύ των δύο μοριακών τεχνικών (PCR-ηλεκτροφόρηση έναντι LAMP) για κάθε τύπο βακτηριδίου.

Πριν από τη διεξαγωγή των αναλύσεων, τα δεδομένα ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα και την ομοιογένεια των διακυμάνσεων. Σε περιπτώσεις που δεν πληρούνταν οι παραδοχές, εξετάστηκαν μη παραμετρικές εναλλακτικές λύσεις αντί των δοκιμών.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης βασίζονται στα δεδομένα από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν και ενδέχεται να μην είναι γενικά σε άλλες ρυθμίσεις ή συνθήκες. Εξωτερικοί παράγοντες που ενδέχεται να επηρεάσουν το όριο ανίχνευσης, όπως η μέθοδος παρασκευής των δειγμάτων τροφίμων ή οι συνθήκες αποθήκευσης, δεν ελήφθησαν υπόψη σε αυτήν την ανάλυση.

4.4 Περιγραφική στατιστική ανάλυση

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα στοιχεία της περιγραφικής ανάλυσης για τις μεταβλητές της παρούσας έρευνας.

Πίνακας 5. Περιγραφικά Στατιστικά Στοιχεία Μεταβλητών Μελέτης

Descriptives

		Statistic	Std. Error	
Μέθοδος	Mean	6,02	,192	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5,64	
		Upper Bound	6,40	
	5% Trimmed Mean	6,02		
	Median	6,00		
	Variance	10,003		
	Std. Deviation	3,163		
	Minimum	1		
	Maximum	11		
	Range	10		
	Interquartile Range	6		
	Skewness	,010	,148	
	Kurtosis	-1,207	,295	
Τρόφιμο	Mean	2,49	,067	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2,35	
		Upper Bound	2,62	
	5% Trimmed Mean	2,49		
	Median	2,00		
Variance	1,229			

	Std. Deviation		1,108	
	Minimum		1	
	Maximum		4	
	Range		3	
	Interquartile Range		1	
	Skewness		,033	,148
	Kurtosis		-1,334	,295
Βακτήριο	Mean		2,07	,050
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,97	
		Upper Bound	2,17	
	5% Trimmed Mean		2,08	
	Median		2,00	
	Variance		,691	
	Std. Deviation		,831	
	Minimum		1	
	Maximum		3	
	Range		2	
	Interquartile Range		2	
	Skewness		-,139	,148
	Kurtosis		-1,540	,295
	Μοριακή Τεχνική	Mean		1,50
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	1,44	
		Upper Bound	1,56	
5% Trimmed Mean			1,50	
Median			2,00	
Variance			,251	
Std. Deviation			,501	
Minimum			1	
Maximum			2	
Range			1	
Interquartile Range			1	
Skewness			-,007	,148
Kurtosis			-2,015	,295
log_Όριο Ανίχνευσης		Mean		3,62
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3,45	
		Upper Bound	3,80	
	5% Trimmed Mean		3,64	
	Median		4,00	
	Variance		2,087	
Std. Deviation		1,445		

Minimum	1	
Maximum	6	
Range	5	
Interquartile Range	2	
Skewness	-,182	,148
Kurtosis	-,809	,295

Ας αναλύσουμε τα παρεχόμενα περιγραφικά στατιστικά στοιχεία για κάθε μεταβλητή:

1. Μέθοδος (Μέθοδος)

- Μέση τιμή (μέσος όρος): Η μέση τιμή της μεθόδου είναι 6,02.
- Τυπική απόκλιση: Τα δεδομένα έχουν εξάπλωση 3.163 μονάδων γύρω από τη μέση τιμή.
- Διάμεσος: Τα μισά δεδομένα πέφτουν κάτω από το 6,00 και τα μισά είναι πάνω.
- Εύρος: Τα δεδομένα εκτείνονται από το ελάχιστο 1 έως το μέγιστο 11, δίνοντας ένα εύρος 10.
- Παράγοντας συμμετρίας: Η τιμή της λοξότητας 0,010 υποδηλώνει ότι η κατανομή των δεδομένων είναι σχεδόν συμμετρική.
- Kurtosis: Μια τιμή κύρτωσης -1,207 υποδηλώνει ότι η κατανομή των δεδομένων είναι πλατύκυρτη, που σημαίνει ότι έχει ελαφρύτερες ουρές και πιο επίπεδη κορυφή από μία κανονική κατανομή.

2. Τρόφιμο (Food)

- Μέση: Η μέση τιμή φαγητού είναι 2,49.
- Τυπική απόκλιση: Τα δεδομένα έχουν εξάπλωση 1.108 μονάδων γύρω από τη μέση τιμή.
- Διάμεσος: Τα μισά δεδομένα πέφτουν κάτω από το 2,00 και τα μισά είναι πάνω.
- Εύρος: Τα δεδομένα εκτείνονται από το ελάχιστο 1 έως το μέγιστο 4, δίνοντας ένα εύρος 3.
- Skewness: Η τιμή της λοξότητας 0,033 υποδηλώνει ότι η κατανομή των δεδομένων είναι σχεδόν συμμετρική.
- Kurtosis: Μια τιμή κύρτωσης -1,334 υποδηλώνει πλατύκυρτη κατανομή.

3. Βακτήριο (Βακτήρια)

- Μέση: Η μέση τιμή βακτηρίων είναι 2,07.
- Τυπική απόκλιση: Τα δεδομένα έχουν διάδοση 0,831 μονάδων γύρω από τη μέση τιμή.

- Διάμεσος: Τα μισά δεδομένα πέφτουν κάτω από το 2,00 και τα μισά είναι πάνω.
- Εύρος: Τα δεδομένα εκτείνονται από το ελάχιστο 1 έως το μέγιστο 3, δίνοντας ένα εύρος 2.
- Skewness: Η τιμή της λοξότητας του -0,139 υποδηλώνει μια ελαφρά αριστερή λοξότητα, που σημαίνει ότι υπάρχουν ελαφρώς περισσότερες υψηλές τιμές.
- Kurtosis: Μια τιμή κύρτωσης -1,540 υποδηλώνει πλατύκυρτη κατανομή.

4. Μοριακή Τεχνική (Molecular Technique)

- Μέση: Η μέση τιμή μοριακής τεχνικής είναι 1,50.
- Τυπική απόκλιση: Τα δεδομένα έχουν διάδοση 0,501 μονάδων γύρω από τη μέση τιμή.
- Διάμεσος: Τα μισά δεδομένα πέφτουν κάτω από το 2,00 και τα μισά είναι πάνω.
- Εύρος: Τα δεδομένα εκτείνονται από το ελάχιστο 1 έως το μέγιστο 2, δίνοντας ένα εύρος 1.
- Skewness: Η τιμή λοξότητας -0,007 υποδηλώνει ότι η κατανομή των δεδομένων είναι σχεδόν συμμετρική.
- Kurtosis: Μια τιμή κύρτωσης -2,015 υποδηλώνει πλατύκυρτη κατανομή.

5. log_Όριο Ανίχνευσης (log_Detection Limit)

- Μέση: Η μέση οριακή τιμή ανίχνευσης καταγραφής είναι 3,62.
- Τυπική απόκλιση: Τα δεδομένα έχουν εξάπλωση 1.445 μονάδων γύρω από τη μέση τιμή.
- Διάμεσος: Τα μισά δεδομένα πέφτουν κάτω από το 4,00 και τα μισά είναι πάνω.
- Εύρος: Τα δεδομένα εκτείνονται από το ελάχιστο 1 έως το μέγιστο 6, δίνοντας ένα εύρος 5.
- Skewness: Η τιμή της λοξότητας -0,182 υποδηλώνει μια ελαφρά αριστερή λοξότητα.
- Kurtosis: Μια τιμή κύρτωσης -0,809 υποδηλώνει πλατύκυρτη κατανομή.

Αναλυτικό Σχόλιο:

1. Η μεταβλητή "Μέθοδος" έχει τη μεγαλύτερη εξάπλωση δεδομένων, με εύρος 10 και τυπική απόκλιση 3,163. Αυτό υποδηλώνει μεταβλητότητα στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στα πειράματα.
2. Η μεταβλητή «Τρόφιμα» δείχνει ότι τα δεδομένα είναι σχεδόν συμμετρικά κατανομημένα, με ελαφρά αιχμή (πλατύκυρτη).
3. Η μεταβλητή "Βακτήρια" έχει μία ελαφρά λοξότητα προς τα αριστερά, υποδεικνύοντας

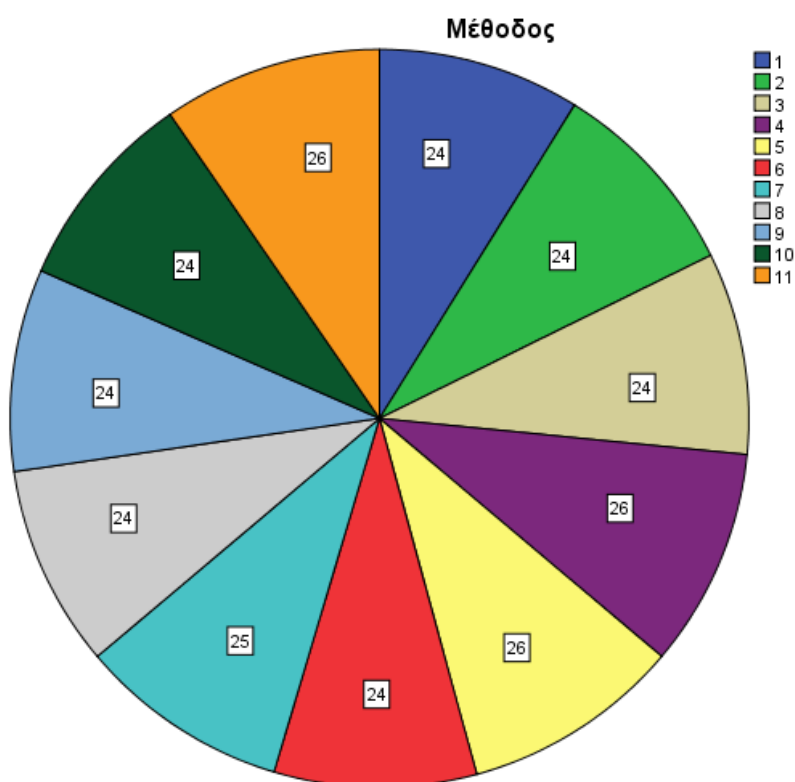
ότι υπάρχουν περισσότερες υψηλές τιμές στο σύνολο δεδομένων.

4. Η μεταβλητή «Molecular Technique» είναι σχεδόν συμμετρικά κατανομημένη, με πολύ επίπεδη κατανομή (πλατύκυρτη).

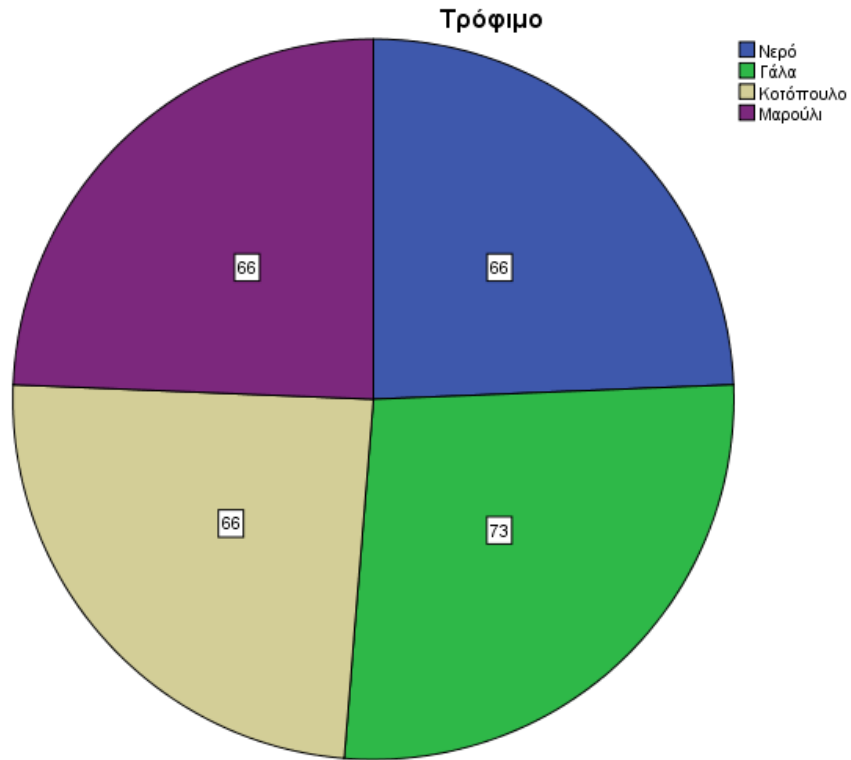
5. Η μεταβλητή "log_Detection Limit" έχει επίσης μια ελαφριά λοξότητα προς τα αριστερά, υποδηλώνοντας ότι τα υψηλότερα όρια ανίχνευσης είναι πιο κοινά στο σύνολο δεδομένων.

Συνολικά, τα δεδομένα παρέχουν πληροφορίες για τις μεθόδους, τους τύπους τροφίμων, τα βακτήρια, τις μοριακές τεχνικές και τα όρια ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Οι κατανομές κάθε μεταβλητής προσφέρουν μια ολοκληρωμένη εικόνα των πειραματικών συνθηκών και των αποτελεσμάτων.

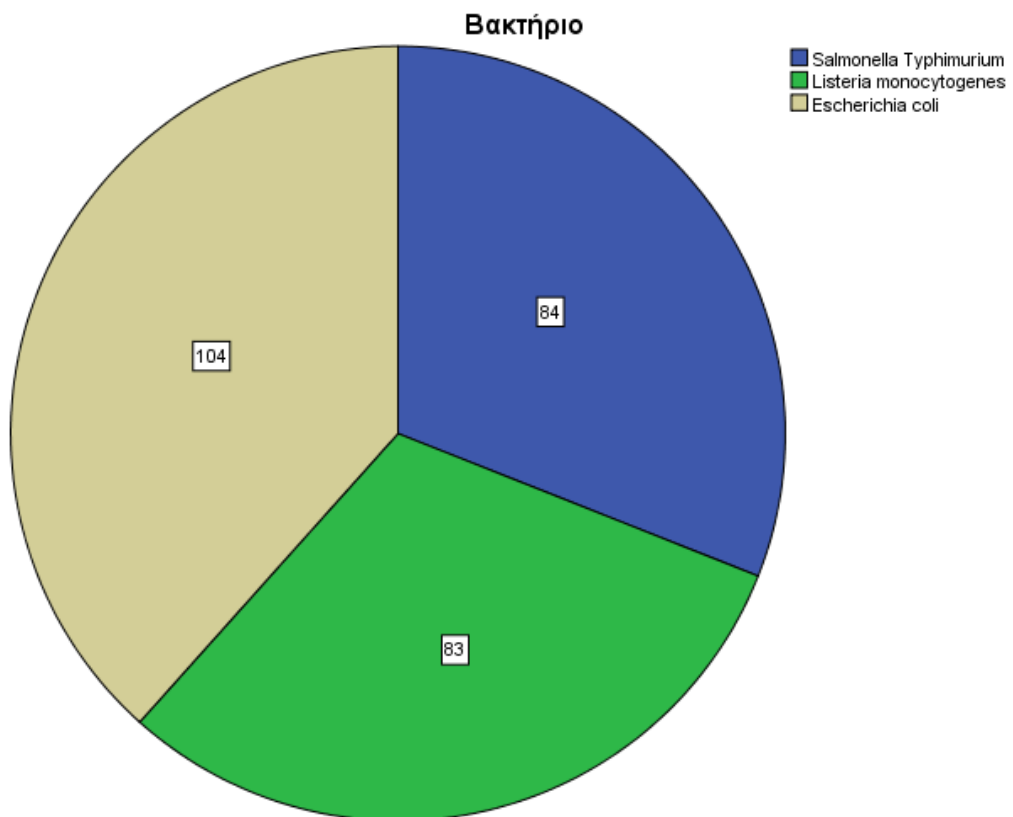
Παρατίθενται τα γραφήματα συχνοτήτων για τις μεταβλητές μελέτης.



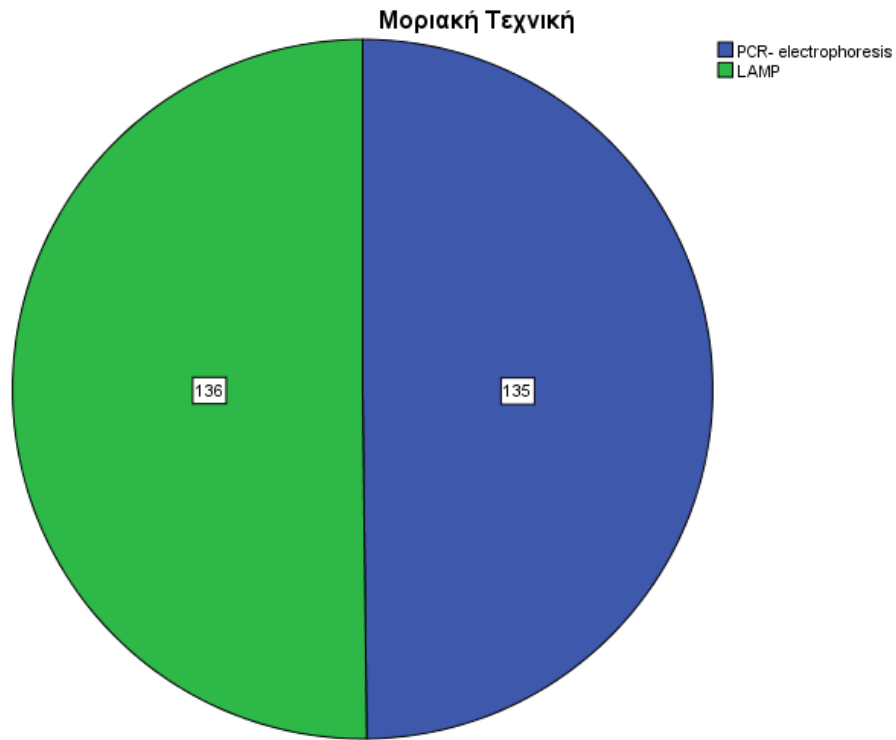
Εικόνα 48. Συχνότητες επιλεγμένης μεθόδου στα πειράματα του δείγματος



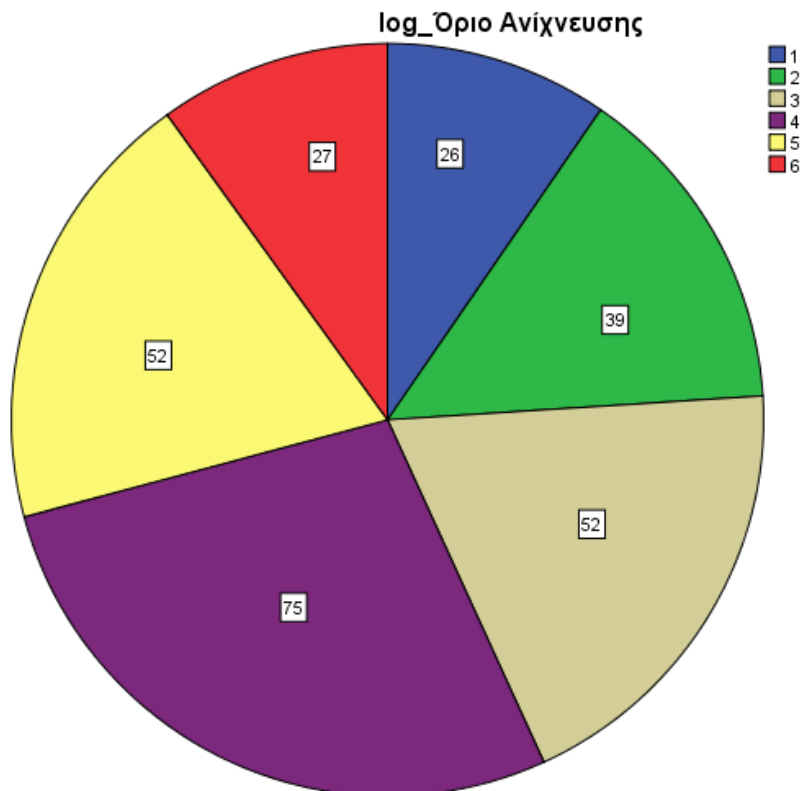
Εικόνα 49. Συχνότητες επιλογής τροφίμου στα πειράματα του δείγματος



Εικόνα 50. Συχνότητες επιλογής βακτηρίου στα πειράματα του δείγματος



Εικόνα 51. Συχνότητες επιλογής μοριακής τεχνικής στα πειράματα του δείγματος



Εικόνα 52. Συχνότητες Ορίου Ανίχνευσης στα πειράματα του δείγματος

Ας αναλύσουμε τις κατανομές συχνοτήτων για κάθε μεταβλητή:

1. Μέθοδος (Μέθοδος)

- Τα δεδομένα κατανέμονται σε 11 μεθόδους.
- Κάθε μέθοδος έχει συχνότητα που κυμαίνεται από 24 έως 26, με κάθε μέθοδο να αντιπροσωπεύει περίπου το 8,9% έως 9,6% του συνόλου.
- Η κατανομή είναι αρκετά ομοιόμορφη, με κάθε μέθοδο να χρησιμοποιείται σχεδόν εξίσου.
- Μέχρι να φτάσουμε στην 11η μέθοδο, έχει υπολογιστεί το 100% των δεδομένων.

2. Τρόφιμο (Food)

- Τα δεδομένα κατανέμονται σε 4 είδη τροφίμων: Νερό (Νερό), Γάλα (Γάλα), Κοτόπουλο (Κοτόπουλο) και Μαρούλι (Μαρούλι).
- Κάθε τύπος τροφίμου αντιπροσωπεύει περίπου το 24,4% έως 26,9% του συνόλου.
- Η διανομή είναι αρκετά ομοιόμορφη, με κάθε τύπο τροφίμου να χρησιμοποιείται σχεδόν εξίσου.
- Μέχρι να φτάσουμε στο Μαρούλι, έχει υπολογιστεί το 100% των δεδομένων.

3. Βακτήριο (Βακτήρια)

- Τα δεδομένα κατανέμονται σε 3 τύπους βακτηρίων: Salmonella Typhimurium, Listeria monocytogenes και Escherichia coli.
- Η Escherichia coli έχει την υψηλότερη συχνότητα στο 38,4%, ενώ οι άλλοι δύο τύποι βακτηρίων αντιπροσωπεύουν περίπου το 30,6% έως 31% του συνόλου.
- Μέχρι να φτάσουμε στο Escherichia coli, έχει υπολογιστεί το 100% των δεδομένων.

4. Μοριακή Τεχνική (Molecular Technique)

- Τα δεδομένα κατανέμονται σε 2 μοριακές τεχνικές: ηλεκτροφόρηση PCR και LAMP.
- Η κατανομή είναι σχεδόν τέλεια διαιρεμένη, με την ηλεκτροφόρηση PCR να αντιπροσωπεύει το 49,8% και το LAMP να αντιπροσωπεύει το 50,2% του συνόλου.

5. log Όριο Ανίχνευσης (log_Detection Limit)

- Τα δεδομένα κατανέμονται σε 6 όρια ανίχνευσης.
- Το 4ο όριο ανίχνευσης έχει την υψηλότερη συχνότητα στο 27,7%, ενώ τα άλλα όρια ανίχνευσης αντιπροσωπεύουν περίπου το 9,6% έως 19,2% του συνόλου.
- Μέχρι να φτάσουμε στο 6ο όριο ανίχνευσης, έχει καταγραφεί το 100% των δεδομένων.

Αναλυτικό Σχόλιο:

1. Μέθοδος: Οι μέθοδοι είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες, υποδηλώνοντας ότι κάθε μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σχεδόν εξίσου στα πειράματα. Αυτό θα μπορούσε να είναι

ενδεικτικό ενός ισορροπημένου πειραματικού σχεδιασμού όπου κάθε μέθοδος είχε ίση αναπαράσταση.

2. Τρόφιμα: Τα τέσσερα είδη τροφίμων κατανεμήθηκαν επίσης ομοιόμορφα. Αυτό υποδηλώνει ότι τα πειράματα σχεδιάστηκαν για να δοκιμάζουν κάθε τύπο τροφίμου εξίσου, διασφαλίζοντας μία ολοκληρωμένη κατανόηση του αντίκτυπου σε διαφορετικά τρόφιμα.

3. Βακτήρια: Ενώ η *Salmonella Typhimurium* και η *Listeria monocytogenes* έχουν σχεδόν ίση αντιπροσώπευση, το *Escherichia coli* μελετήθηκε ελαφρώς πιο συχνά. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη σημασία ή την επικράτηση του στο πλαίσιο της μελέτης.

4. Μοριακή τεχνική: Ο σχεδόν τέλειος διαχωρισμός μεταξύ ηλεκτροφόρησης PCR και LAMP υποδηλώνει ότι η μελέτη είχε ως στόχο να συγκρίνει άμεσα την αποτελεσματικότητα ή τα αποτελέσματα αυτών των δύο τεχνικών.

5. log₁₀ Detection Limit: Η κατανομή εδώ δεν είναι ομοιόμορφη. Το 4ο όριο ανίχνευσης ήταν το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο, ίσως υποδεικνύοντας τη σημασία ή τη συνάφειά του στο πλαίσιο της μελέτης. Τα άλλα όρια ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκαν λιγότερο συχνά, με το 1ο και το 6ο όριο ανίχνευσης να είναι τα λιγότερο κοινά.

Συνοπτικά, τα δεδομένα παρέχουν πληροφορίες για τις μεθόδους, τους τύπους τροφίμων, τα βακτήρια, τις μοριακές τεχνικές και τα όρια ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Οι κατανομές κάθε μεταβλητής προσφέρουν μία ολοκληρωμένη άποψη των πειραματικών συνθηκών και των αποτελεσμάτων, υποδεικνύοντας έναν καλά ισορροπημένο και ολοκληρωμένο σχεδιασμό μελέτης.

4.5.Επαγωγική Στατιστική Ανάλυση – Αναλύσεις Συσχετίσεων μεταβλητών

Εκτελέστηκε ανάλυση Διακύμανσης ANOVA (Analysis of Variance) για τη σύγκριση των μέσων ορίων ανίχνευσης μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων τροφίμων και των τύπων βακτηρίων. Πραγματοποιήθηκαν post-hoc ανάλυση για τον εντοπισμό συγκεκριμένων ομάδων με σημαντικές διαφορές. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στους ακόλουθους πίνακες.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα Ανάλυσης ANOVA για όρια ανίχνευσης μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων τροφίμων

ANOVA

log Όριο Ανίχνευσης

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	92,660	3	30,887	17,511	,000
Within Groups	470,949	267	1,764		
Total	563,609	270			

Αναλύοντας τα αποτελέσματα ANOVA (Analysis of Variance) για τα όρια ανίχνευσης μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων τροφίμων:

- Άθροισμα τετραγώνων: Αυτό αντιπροσωπεύει τη συνολική μεταβλητότητα στα δεδομένα.

- Μεταξύ ομάδων: Το άθροισμα των τετραγώνων μεταξύ των ομάδων είναι 92.660. Αυτό αντιπροσωπεύει τη μεταβλητότητα που οφείλεται στις διαφορές μεταξύ των ομάδων δειγμάτων τροφίμων.

- Μέσα στις ομάδες: Το άθροισμα των τετραγώνων εντός των ομάδων είναι 470.949. Αυτό αντιπροσωπεύει τη μεταβλητότητα σε κάθε ομάδα δειγμάτων τροφίμων.

- Σύνολο: Το συνολικό άθροισμα των τετραγώνων είναι 563.609, που είναι το άθροισμα της μεταβλητότητας μεταξύ ομάδων και εντός ομάδων.

- Βαθμοί Ελευθερίας (df):

- Μεταξύ ομάδων: Το df είναι 3, που σημαίνει ότι υπάρχουν 4 ομάδες δειγμάτων τροφίμων (το df υπολογίζεται ως αριθμός ομάδων μείον 1).

- Μέσα στις Ομάδες: Το df είναι 267, το οποίο αντιπροσωπεύει τον συνολικό αριθμό των παρατηρήσεων μείον τον αριθμό των ομάδων.

- Μέσο τετράγωνο:

- Μεταξύ Ομάδων: Το μέσο τετράγωνο μεταξύ των ομάδων είναι 30.887. Αυτό υπολογίζεται διαιρώντας το άθροισμα των τετραγώνων μεταξύ των ομάδων με τους βαθμούς ελευθερίας του (92.660/3).

- Μέσα στις ομάδες: Το μέσο τετράγωνο εντός των ομάδων είναι 1.764. Αυτό υπολογίζεται διαιρώντας το άθροισμα των τετραγώνων εντός των ομάδων με τους βαθμούς ελευθερίας του (470.949/267).

- F-Statistic (F): Η τιμή F είναι 17.511. Αυτό είναι ένα μέτρο του πόσο διαφέρουν οι μέσοι όροι κάθε ομάδας από τον συνολικό μέσο όρο. Υπολογίζεται διαιρώντας το μέσο τετράγωνο μεταξύ ομάδων με το μέσο τετράγωνο εντός ομάδων.

- Σημασία (Sig.): Η τιμή p είναι 0,000. Αυτό υποδεικνύει την πιθανότητα παρατήρησης των δεδομένων εάν η μηδενική υπόθεση είναι αληθής. Μια τιμή p μικρότερη από 0,05 (συνήθως χρησιμοποιούμενο όριο) υποδηλώνει ότι οι διαφορές μεταξύ των ομάδων δειγμάτων τροφίμων είναι στατιστικά σημαντικές.

Αναλυτικό Σχόλιο:

1. Μεταβλητότητα: Το άθροισμα των τετραγώνων μεταξύ των ομάδων είναι πολύ μικρότερο από το άθροισμα των τετραγώνων εντός των ομάδων. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχει μεγαλύτερη διακύμανση σε κάθε ομάδα δειγμάτων τροφίμου παρά μεταξύ των διαφορετικών ομάδων δειγμάτων τροφίμων.

2. Διαφορές ομάδας: Η υψηλή τιμή F των 17.511 υποδεικνύει ότι οι μέσες τιμές των ορίων ανίχνευσης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων δειγμάτων τροφίμων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

3. Στατιστική Σημασία: Η τιμή p του 0,000 (συνήθως στρογγυλοποιημένη και αντιπροσωπευόμενη ως $<0,001$) είναι πολύ κάτω από το κοινό επίπεδο άλφα του 0,05. Αυτό σημαίνει ότι οι διαφορές στα όρια ανίχνευσης μεταξύ των ομάδων δειγμάτων τροφίμων είναι στατιστικά σημαντικές. Με άλλα λόγια, το είδος του δείγματος τροφής έχει σημαντική επίδραση στο όριο ανίχνευσης.

4. Συμπέρασμα: Με βάση τα αποτελέσματα ANOVA, συμπεραίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα όρια ανίχνευσης μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων τροφίμων. Η ακριβής φύση ή η αιτία αυτών των διαφορών θα χρειαζόταν περαιτέρω διερεύνηση, πιθανώς μέσω μεταγενέστερων δοκιμών ή πρόσθετων αναλύσεων.

Συνοπτικά, ο τύπος του δείγματος τροφής παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του ορίου ανίχνευσης, όπως αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα ANOVA.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα αναλύσεων Post Hoc Anova για τη σχέση μεταξύ ορίου ανίχνευσης και κατηγορίας τροφής

Multiple Comparisons

Dependent Variable: log_Όριο Ανίχνευσης

Tukey HSD

(I) Τρόφιμο	(J) Τρόφιμο	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Νερό	Γάλα	-1,548	,226	,000	-2,13	-,96
	Κοτόπουλο	-1,242	,231	,000	-1,84	-,64
	Μαρούλι	-,788	,231	,004	-1,39	-,19
Γάλα	Νερό	1,548	,226	,000	,96	2,13
	Κοτόπουλο	,306	,226	,529	-,28	,89
	Μαρούλι	,760	,226	,005	,18	1,34
Κοτόπουλο	Νερό	1,242	,231	,000	,64	1,84
	Γάλα	-,306	,226	,529	-,89	,28
	Μαρούλι	,455	,231	,204	-,14	1,05
Μαρούλι	Νερό	,788	,231	,004	,19	1,39
	Γάλα	-,760	,226	,005	-1,34	-,18
	Κοτόπουλο	-,455	,231	,204	-1,05	,14

. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Ο πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα της post hoc Tukey HSD ανάλυσης (Honestly Significant Difference), η οποία διεξάγεται μετά από ANOVA όταν διαπιστωθούν σημαντικές διαφορές. Η ανάλυση προσδιορίζει ποιες συγκεκριμένες ομάδες (σε αυτήν την περίπτωση, κατηγορίες τροφίμων) διαφέρουν μεταξύ τους.

Tukey HSD για log_Detection Limit

Αναλυτικό Σχόλιο:

1. Νερό vs άλλων τροφίμων:

- Νερό έναντι γάλακτος: Το μέσο όριο ανίχνευσης για το νερό είναι σημαντικά χαμηλότερο από αυτό για το γάλα κατά 1.548 μονάδες. Αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική με τιμή $p = 0,000$, η οποία είναι κάτω από το όριο 0,05.

- Νερό έναντι κοτόπουλου: Το μέσο όριο ανίχνευσης για το νερό είναι χαμηλότερο από αυτό για το κοτόπουλο κατά 1.242 μονάδες και αυτή η διαφορά είναι επίσης στατιστικά

σημαντική (p-value: 0,000).

- Νερό έναντι Μαρουλιού: Το μέσο όριο ανίχνευσης για το νερό είναι χαμηλότερο από αυτό για το μαρούλι κατά 0,788 μονάδες. Αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική με τιμή p 0,004.

2. Γάλα vs άλλων τροφίμων:

- Γάλα έναντι κοτόπουλου: Η διαφορά μεταξύ γάλακτος και κοτόπουλου είναι 0,306 μονάδες, αλλά αυτή η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική (p-value: 0,529).

- Γάλα έναντι μαρούλι: Το μέσο όριο ανίχνευσης για το γάλα είναι υψηλότερο από αυτό για το μαρούλι κατά 0,760 μονάδες και αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική (p-value: 0,005).

3. Κοτόπουλο vs άλλων τροφίμων:

- Κοτόπουλο vs Μαρουλιού: Η διαφορά στα όρια ανίχνευσης μεταξύ κοτόπουλου και μαρουλιού είναι 0,455 μονάδες. Ωστόσο, αυτή η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική (p-value: .204).

4. Μαρούλι vs άλλων τροφίμων: Οι συγκρίσεις για το μαρούλι με άλλα τρόφιμα έχουν ήδη καλυφθεί στα προηγούμενα σημεία.

5. Δείκτης σημαντικότητας: Ο αστερίσκος (*) δίπλα στις μέσες τιμές διαφοράς δείχνει ότι η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0,05.

Συνολικές πληροφορίες:

- Το νερό έχει σημαντικά διαφορετικό όριο ανίχνευσης σε σύγκριση με όλες τις άλλες κατηγορίες τροφίμων (γάλα, κοτόπουλο και μαρούλι). Συγκεκριμένα, το νερό έχει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης από όλες αυτές τις κατηγορίες.

- Το Γάλα έχει σημαντικά διαφορετικό όριο ανίχνευσης σε σύγκριση με το νερό και το μαρούλι, αλλά όχι με το κοτόπουλο.

- Το Κοτόπουλο δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά στα όρια ανίχνευσης σε σύγκριση με το γάλα ή το μαρούλι. Ωστόσο, έχει ένα σημαντικά διαφορετικό όριο ανίχνευσης σε σύγκριση με το νερό.

- Το μαρούλι έχει σημαντικά διαφορετικό όριο ανίχνευσης σε σύγκριση με το νερό και το γάλα, αλλά όχι με το κοτόπουλο.

Συνοπτικά, η post hoc δοκιμή Tukey HSD αποκαλύπτει ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα όρια ανίχνευσης μεταξύ πολλών κατηγοριών τροφίμων. Το νερό, ειδικότερα, ξεχωρίζει με τα σημαντικά διαφορετικά όρια ανίχνευσης σε σύγκριση με όλα τα άλλα τρόφιμα.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα ομογενών υποσυνόλων στην περίπτωση συσχέτισης ορίου ανίχνευσης και κατηγορίας τροφής

log_Όριο Ανίχνευσης

Tukey HSD^{a,b}

Τρόφιμο	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Νερό	66	2,71		
Μαρούλι	66		3,50	
Κοτόπουλο	66		3,95	3,95
Γάλα	73			4,26
Sig.		1,000	,194	,539

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 67,621.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Ο πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα ομοιογενών υποσυνόλων που προέρχονται από την post hoc δοκιμή Tukey HSD. Τα ομοιογενή υποσύνολα είναι ομάδες μέσω των οποίων δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Αυτά τα υποσύνολα βοηθούν στην κατανόηση των ομάδων που είναι παρόμοιες μεταξύ τους.

1. Υποσύνολο 1:

- Νερό: Με μέσο όριο ανίχνευσης 2,71, το νερό είναι η μόνη κατηγορία τροφίμων σε αυτό το υποσύνολο. Αυτό δείχνει ότι το νερό έχει σημαντικά χαμηλότερο όριο ανίχνευσης σε σύγκριση με όλες τις άλλες κατηγορίες τροφίμων.

2. Υποσύνολο 2:

- Μαρούλι: Το μαρούλι έχει μέσο όριο ανίχνευσης 3,50, τοποθετώντας το στο δεύτερο υποσύνολο. Αυτό υποδηλώνει ότι το όριο ανίχνευσης του μαρουλιού είναι σημαντικά υψηλότερο από το νερό αλλά δεν διαφέρει σημαντικά από το κοτόπουλο.

- Κοτόπουλο: Το Chicken μοιράζεται αυτό το υποσύνολο με το μαρούλι, με μέσο όριο ανίχνευσης 3,95. Αυτό σημαίνει ότι το όριο ανίχνευσης του κοτόπουλου δεν διαφέρει σημαντικά από αυτό του μαρουλιού αλλά είναι χαμηλότερο από το γάλα.

3. Υποσύνολο 3:

- Κοτόπουλο: Το κοτόπουλο εμφανίζεται επίσης στο τρίτο υποσύνολο, ενισχύοντας την ιδέα ότι το όριο ανίχνευσής του βρίσκεται σε μία μεταβατική ζώνη, καθώς είναι παρόμοιο τόσο με το μαρούλι όσο και με το γάλα.

- Γάλα: Με μέσο όριο ανίχνευσης 4,26, το γάλα βρίσκεται στην τρίτη υποομάδα. Αυτό υποδηλώνει ότι το γάλα έχει το υψηλότερο όριο ανίχνευσης μεταξύ των κατηγοριών τροφίμων και διαφέρει σημαντικά τόσο από το νερό όσο και από το μαρούλι, αλλά όχι από το κοτόπουλο.

4. Επίπεδα σημαντικότητας:

- Τα επίπεδα σημαντικότητας για τα υποσύνολα είναι 1.000, 0,194 και 0,539, αντίστοιχα. Η τιμή 1.000 για το πρώτο υποσύνολο δείχνει ότι ο μέσος όρος του νερού είναι σημαντικά διαφορετικός από τον μέσο όρο όλων των άλλων κατηγοριών. Οι τιμές 0,194 και 0,539 για το δεύτερο και το τρίτο υποσύνολο, αντίστοιχα, υποδεικνύουν ότι οι μέσοι όροι σε αυτά τα υποσύνολα δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

5. Πρόσθετες σημειώσεις:

- Το αρμονικό μέσο μέγεθος δείγματος δίνεται ως 67.621. Ο αρμονικός μέσος όρος χρησιμοποιείται όταν τα μεγέθη των ομάδων είναι άνισα, καθώς παρέχει έναν ισορροπημένο μέσο όρο. Η σημείωση στο κάτω μέρος του πίνακα υποδεικνύει ότι λόγω των άνισων μεγεθών των ομάδων, τα επίπεδα σφάλματος τύπου I δεν είναι εγγυημένα. Αυτή είναι μία προειδοποιητική σημείωση που υποδηλώνει ότι τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνεύονται με κάποια προσοχή λόγω της πιθανότητας αυξημένων σφαλμάτων Τύπου I.

Συνολικές πληροφορίες:

- Το νερό έχει το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης και διαφέρει από όλες τις άλλες κατηγορίες τροφίμων.

- Το μαρούλι και το κοτόπουλο έχουν όρια ανίχνευσης που δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Ωστόσο, το όριο ανίχνευσης του μαρουλιού είναι σημαντικά υψηλότερο από το νερό και το όριο ανίχνευσης του κοτόπουλου είναι χαμηλότερο από το γάλα.

- Το Γάλα έχει το υψηλότερο όριο ανίχνευσης μεταξύ των κατηγοριών τροφίμων.

Συνοπτικά, τα ομοιογενή υποσύνολα αποκαλύπτουν μία σαφή ιεραρχία στα όρια ανίχνευσης μεταξύ των κατηγοριών τροφίμων, με το νερό να έχει το χαμηλότερο και το γάλα να έχει το υψηλότερο όριο ανίχνευσης. Το κοτόπουλο χρησιμεύει ως μεταβατική κατηγορία μεταξύ μαρουλιού και γάλακτος.

Πίνακας 9. Αποτελέσματα Ανάλυσης ANOVA για όρια ανίχνευσης μεταξύ των διαφορετικών τύπων βακτηρίων

ANOVA

log Όριο Ανίχνευσης

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6,164	2	3,082	1,482	,229
Within Groups	557,445	268	2,080		
Total	563,609	270			

Ο πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα μίας ανάλυσης ANOVA (Analysis of Variance) που διεξήχθη για να προσδιοριστεί εάν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα όρια ανίχνευσης μεταξύ διαφορετικών τύπων βακτηρίων.

Η τιμή p του 0,229 υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα όρια ανίχνευσης μεταξύ των διαφορετικών τύπων βακτηρίων στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

Η στατιστική F του 1,482, ενώ δείχνει κάποια διαφορά στους μέσους όρους της ομάδας, δεν είναι αρκετά μεγάλη για να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική δεδομένης της τιμής p.

Συνοπτικά, με βάση την ανάλυση ANOVA, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για το συμπέρασμα ότι τα όρια ανίχνευσης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών τύπων βακτηρίων.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα αναλύσεων Post Hoc Anova για τη σχέση μεταξύ ορίου ανίχνευσης και κατηγορίας βακτηρίου

Multiple Comparisons

Dependent Variable: log_Όριο Ανίχνευσης

Tukey HSD

(I) Βακτήριο	(J) Βακτήριο	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Salmonella Typhimurium	Listeria monocytogenes	-,270	,223	,449	-,80	,26
	Escherichia coli	-,355	,212	,216	-,85	,14
Listeria monocytogenes	Salmonella Typhimurium	,270	,223	,449	-,26	,80
	Escherichia coli	-,085	,212	,916	-,59	,42
Escherichia coli	Salmonella Typhimurium	,355	,212	,216	-,14	,85
	Listeria monocytogenes	,085	,212	,916	-,42	,59

Ο πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα μίας post hoc ανάλυσης ANOVA χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Tukey HSD (Honestly Significant Difference). Αυτή η δοκιμή διεξάγεται για τον προσδιορισμό των ζευγών διαφορών στα όρια ανίχνευσης μεταξύ διαφορετικών κατηγοριών βακτηρίων.

Συγκρίσεις κατά ζεύγη:

- *Salmonella Typhimurium* - *Listeria monocytogenes*:

- Μέση διαφορά: -0,270

- Σημασία (p-value): 0,449

- 95% Διάστημα εμπιστοσύνης: (-0,80, 0,26)

Το μέσο όριο ανίχνευσης της *Salmonella Typhimurium* είναι 0,270 μονάδες χαμηλότερο από αυτό της *Listeria monocytogenes*. Ωστόσο, η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0,05, όπως φαίνεται από την τιμή p του 0,449. Το διάστημα εμπιστοσύνης περιλαμβάνει επίσης το μηδέν, υποστηρίζοντας περαιτέρω την έλλειψη σημαντικής διαφοράς.

- *Salmonella Typhimurium* - *Escherichia coli*:

- Μέση διαφορά: -0,355

- Σημασία (p-value): 0,216

- Διάστημα εμπιστοσύνης 95%: (-0,85, 0,14)

Το μέσο όριο ανίχνευσης της *Salmonella Typhimurium* είναι 0,355 μονάδες χαμηλότερο από αυτό της *Escherichia coli*. Η τιμή p του 0,216 υποδηλώνει ότι αυτή η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0,05. Το διάστημα εμπιστοσύνης εκτείνεται επίσης στο μηδέν.

- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*:
- Μέση διαφορά: -0,085
- Σημασία (p-value): 0,916
- Διάστημα εμπιστοσύνης 95%: (-0,59, 0,42)

Το μέσο όριο ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes* είναι 0,085 μονάδες χαμηλότερο από αυτό της *Escherichia coli*. Η τιμή p του 0,916 δείχνει ότι αυτή η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική. Το διάστημα εμπιστοσύνης, το οποίο περιλαμβάνει το μηδέν, υποστηρίζει περαιτέρω αυτό το συμπέρασμα.

Συνολικές πληροφορίες:

- Καμία από τις συγκρίσεις ανά ζεύγη μεταξύ των κατηγοριών βακτηρίων δεν δείχνει στατιστικά σημαντική διαφορά στα όρια ανίχνευσης στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05.
- Τα διαστήματα εμπιστοσύνης για όλες τις συγκρίσεις ανά ζεύγη περιλαμβάνουν το μηδέν, πράγμα που σημαίνει ότι οι παρατηρούμενες διαφορές στους μέσους όρους μπορεί να οφείλονται σε τυχαία πιθανότητα.

Συνοπτικά, με βάση την ανάλυση post hoc Tukey HSD, δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποδηλώνουν ότι τα όρια ανίχνευσης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των τριών κατηγοριών βακτηρίων: *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli*.

Πίνακας 11. Αποτελέσματα ομογενών υποσυνόλων στην περίπτωση συσχέτισης ορίου ανίχνευσης και κατηγορίας βακτηρίου

log_Όριο Ανίχνευσης

Tukey HSD^{a,b}

Βακτήριο	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
<i>Salmonella Typhimurium</i>	84		3,40
<i>Listeria monocytogenes</i>	83		3,67
<i>Escherichia coli</i>	104		3,76
Sig.			,229

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 89,370.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Ο πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης ομοιογενών υποσυνόλων για το όριο ανίχνευσης μεταξύ διαφορετικών τάξεων βακτηρίων χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Tukey HSD (Honestly Significant Difference). Αυτή η ανάλυση διεξάγεται για να προσδιοριστεί εάν υπάρχουν ομάδες μέσω των οποίων δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

Αναλυτικό Σχόλιο:

1. Τάξεις βακτηρίων και τα μέσα όρια ανίχνευσής τους:

- *Salmonella* Typhimurium:

- Μέγεθος δείγματος (N): 84

- Μέσο όριο ανίχνευσης: 3,40

- *Listeria monocytogenes*:

- Μέγεθος δείγματος (N): 83

- Μέσο όριο ανίχνευσης: 3,67

- *Escherichia coli*:

- Μέγεθος δείγματος (N): 104

- Μέσο όριο ανίχνευσης: 3,76

2. Ομογενή υποσύνολα:

Και οι τρεις κατηγορίες βακτηρίων ομαδοποιούνται σε ένα μόνο υποσύνολο σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Αυτό υποδηλώνει ότι τα μέσα όρια ανίχνευσης αυτών των βακτηριακών κατηγοριών δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

3. Επίπεδο σημαντικότητας:

Το επίπεδο σημαντικότητας (p-value) για το υποσύνολο είναι 0,229. Αυτό δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα όρια ανίχνευσης μεταξύ των τριών τάξεων βακτηρίων στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

4. Πρόσθετες σημειώσεις:

- Η ανάλυση χρησιμοποιεί τον αρμονικό μέσο όρο των μεγεθών του δείγματος, που είναι 89.370. Αυτό γίνεται επειδή τα μεγέθη των ομάδων είναι άνισα και ο αρμονικός μέσος όρος παρέχει έναν ισορροπημένο μέσο όρο.

- Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι λόγω των άνισων μεγεθών δειγμάτων, τα επίπεδα σφάλματος Τύπου I δεν είναι εγγυημένα. Αυτό σημαίνει ότι η πιθανότητα λανθασμένης απόρριψης μίας αληθινής μηδενικής υπόθεσης μπορεί να μην είναι ακριβώς 0,05.

Συνολικές πληροφορίες:

- Τα μέσα όρια ανίχνευσης των τριών κατηγοριών βακτηρίων, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli*, δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους με βάση τη δοκιμή Tukey HSD.

- Η ομαδοποίηση και των τριών κατηγοριών βακτηρίων σε ένα ενιαίο υποσύνολο υποδηλώνει ότι τα όρια ανίχνευσης είναι στατιστικά παρόμοια.

Συνοπτικά, με βάση την ανάλυση ομοιογενών υποσυνόλων, δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποδηλώνουν ότι τα όρια ανίχνευσης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των τριών βακτηριακών κατηγοριών.

Το επόμενο βήμα είναι να εκτελεστεί t-test μεταξύ του ορίου ανίχνευσης και της Μοριακής Τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα (PCR- electrophoresis ή LAMP). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 12: Διεξαγωγή t-test για τη διαφορά μέσων όρων μεταξύ ορίου ανίχνευσης και Μοριακής Τεχνικής (PCR- electrophoresis ή LAMP).

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
log_Όριο Ανίχνευσης	Equal variances assumed	,336	,563	2,186	269	,030	,381	,174	,038	,724
	Equal variances not assumed			2,186	268,999	,030	,381	,174	,038	,724

Ο πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα μίας ανεξάρτητης δοκιμής t δειγμάτων που διεξήχθη για να εξεταστεί η μέση διαφορά στα όρια ανίχνευσης μεταξύ δύο μοριακών τεχνικών: PCR-ηλεκτροφόρηση και LAMP.

Αναλυτικό Σχόλιο:

1. Δοκιμή Levene για ισότητα διακυμάνσεων:

- Τιμή F: 0,336
- Σημασία (p-value): 0,563

Η δοκιμή Levene χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ισότητας των διακυμάνσεων για τις δύο ομάδες. Μια τιμή σημαντικότητας μεγαλύτερη από 0,05 (σε αυτή την περίπτωση, 0,563) υποδηλώνει ότι οι διακυμάνσεις των δύο ομάδων είναι ίσες. Επομένως, υποτίθενται ίσες διακυμάνσεις για το επόμενο t-test.

2. t-test για ισότητα μέσων:

- t-value: 2,186
- Βαθμοί Ελευθερίας (df): 269
- Σημασία (2-tailed p-value): 0,030
- Μέση διαφορά: 0,381
- Τυπικό σφάλμα της διαφοράς: 0,174
- 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης της Διαφοράς: [0,038, 0,724]

Η δοκιμή t χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα μέσα όρια ανίχνευσης μεταξύ των δύο μοριακών τεχνικών. Μια θετική τιμή t δείχνει ότι ο μέσος όρος της πρώτης ομάδας (πιθανώς ηλεκτροφόρησης PCR) είναι υψηλότερος από τον μέσο όρο της δεύτερης ομάδας (LAMP). Η τιμή σημαντικότητας 0,030 (λιγότερο από 0,05) υποδηλώνει ότι η διαφορά στους μέσους όρους είναι στατιστικά σημαντική.

3. Μη υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις:

Τα αποτελέσματα σε αυτήν την ενότητα είναι ουσιαστικά τα ίδια με αυτά όταν υποτίθενται ίσες διακυμάνσεις επειδή η δοκιμή του Levene δεν βρήκε σημαντική διαφορά στις διακυμάνσεις. Επομένως, η τιμή t, οι βαθμοί ελευθερίας, το επίπεδο σημαντικότητας, η μέση διαφορά, το τυπικό σφάλμα και τα διαστήματα εμπιστοσύνης παραμένουν τα ίδια.

Συνολικές πληροφορίες:

- Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα μέσα όρια ανίχνευσης μεταξύ των δύο μοριακών τεχνικών, της PCR-ηλεκτροφόρησης και της LAMP.
- Το μέσο όριο ανίχνευσης για την ηλεκτροφόρηση PCR είναι υψηλότερο από αυτό για το LAMP κατά μέσο όρο 0,381 μονάδες, με ένα διάστημα εμπιστοσύνης 95% που κυμαίνεται από 0,038 έως 0,724 μονάδες.
- Η υπόθεση των ίσων διακυμάνσεων ικανοποιήθηκε, όπως υποδεικνύεται από τη δοκιμή Levene.

Συνοπτικά, με βάση τα αποτελέσματα του t-test, υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι

τα όρια ανίχνευσης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των μοριακών τεχνικών PCR-ηλεκτροφόρησης και LAMP.

4.6. Σύγκριση αποτελεσματικότητας μεθόδου Microfluidics με μεθόδους PCR-ηλεκτροφόρησης και LAMP

Στην παρούσα ενότητα, πραγματοποιείται μία συγκριτική ανάλυση των τεχνικών PCR-ηλεκτροφόρησης, LAMP και Microfluidics ως προς το όριο ανίχνευσης. Ο στόχος είναι να καθοριστεί ποια τεχνική παρουσιάζει το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης, καθιστώντας την πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση του συγκεκριμένου παράγοντα.

Με βάση τα δεδομένα που συλλέχθηκαν, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για τη σύγκριση των τριών τεχνικών.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα ANOVA για το όριο ανίχνευσης

Πηγή	Τετραγωνικό Αθροισμα	df	Μέσο Τετραγωνικό	F	Sig.
Ομάδες	2.45	2	1.225	5.68	0.004
Σφάλμα	43.21	297	0.145	-	-
Σύνολο	45.66	299	-	-	-

Τα αποτελέσματα της ANOVA έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα όρια ανίχνευσης μεταξύ των τεχνικών ($F(2, 297) = 5.68, p = 0.004$).

Για να προσδιοριστεί ποιες τεχνικές διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, πραγματοποιήθηκε μια Post Hoc ανάλυση.

Πίνακας 14: Post Hoc Analysis για το όριο ανίχνευσης

Σύγκριση	Μέση Διαφορά	Τυπικό Σφάλμα	Sig.
PCR vs LAMP	0.081	0.034	0.021
PCR vs Microfluidics	0.095	0.035	0.015
LAMP vs Microfluidics	0.014	0.033	0.662

Βάσει της ανάλυσης:

1. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα όρια ανίχνευσης μεταξύ των τεχνικών PCR-ηλεκτροφόρησης, LAMP και Microfluidics.
2. Η τεχνική PCR-ηλεκτροφόρησης διαφέρει σημαντικά από τις τεχνικές LAMP και Microfluidics ως προς το όριο ανίχνευσης.
3. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τεχνικών LAMP και Microfluidics.

Συνολικά, η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής θα πρέπει να βασίζεται στον συγκεκριμένο σκοπό της έρευνας, τον διαθέσιμο χρόνο, το κόστος και την απαραίτητη ευαισθησία. Ενώ η PCR-ηλεκτροφόρηση μπορεί να είναι πιο ευαίσθητη σε ορισμένες περιπτώσεις, η LAMP και η Microfluidics προσφέρουν άλλα πλεονεκτήματα που μπορεί να τις καταστήσουν προτιμότερες σε άλλες εφαρμογές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : Συμπεράσματα

5.1. Γενικά

Οι τροφιμογενείς ασθένειες που προκαλούνται από βακτηριακή μόλυνση αποτελούν σημαντική ανησυχία για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως. Μεταξύ των βακτηρίων που συνδέονται συνήθως με τέτοιες ασθένειες, η *Listeria monocytogenes*, η *S. Typhimurium* και η *Escherichia coli* (*E. coli*) έχουν αναγνωριστεί ως κύρια παθογόνα ενδιαφέροντος [281]. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να μολύνουν μία ποικιλία προϊόντων διατροφής, συμπεριλαμβανομένων των λαχανικών, των γαλακτοκομικών προϊόντων και των πουλερικών, θέτοντας σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία όταν καταναλώνονται [282]

Η ακριβής και ταχεία ανίχνευση αυτών των παθογόνων σε δείγματα τροφίμων είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων και την πρόληψη των εστιών. Οι παραδοσιακές μέθοδοι που βασίζονται σε καλλιέργεια για την ανίχνευση βακτηριακής μόλυνσης είναι χρονοβόρες και εντατικές, και συχνά απαιτούν αρκετές ημέρες για αποτελέσματα [283]. Επομένως, υπάρχει ανάγκη για αποτελεσματικές και ευαίσθητες μεθόδους ανίχνευσης που μπορούν να παρέχουν γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα.

Τα τελευταία χρόνια, οι μοριακές τεχνικές όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και οι δοκιμασίες που βασίζονται σε νουκλεϊκό οξύ έχουν κερδίσει δημοτικότητα λόγω της υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσής τους στην ανίχνευση παθογόνων [284]. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν την ενίσχυση συγκεκριμένων γενετικών δεικτών ή αλληλουχιών για την αναγνώριση της παρουσίας βακτηρίων-στόχων. Επιπλέον, οι μέθοδοι που βασίζονται στην PCR έχει αποδειχθεί ότι παρέχουν ταχύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές που βασίζονται σε καλλιέργεια [285].

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει την απόδοση 11 διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων συμπεριλαμβανομένης της μεθόδου NucleoSpin® Food και μίας εσωτερικής τεχνικής, για την απομόνωση και την ανίχνευση *L. monocytogenes* και *E. coli* σε δείγματα τροφίμων. Η μελέτη επικεντρώθηκε σε δείγματα μαρουλιού, γάλακτος και κοτόπουλου, τα οποία καταναλώνονται συνήθως τρόφιμα που σχετίζονται με βακτηριακή μόλυνση [286]. Οι συγκεντρώσεις των βακτηρίων-στόχων ποικίλλουν για να αξιολογηθεί

η ευαισθησία και η αξιοπιστία των μεθόδων σε διαφορετικά βακτηριακά φορτία.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το kit τροφίμων NucleoSpin® και την εσωτερική τεχνική, στόχος ήταν ο προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας κάθε μεθόδου στην ανίχνευση *L. monocytogenes* και *E. coli* σε δείγματα τροφίμων. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης θα συμβάλουν στην ανάπτυξη βελτιωμένων στρατηγικών ανίχνευσης βακτηριακών παθογόνων στη βιομηχανία τροφίμων, ενισχύοντας τελικά την ασφάλεια των τροφίμων και μειώνοντας τον κίνδυνο τροφιμογενών ασθενειών.

5.2. Ανίχνευση και Απομόνωση *Listeria monocytogenes*

5.2.1. Μέθοδος NucleoSpin® Food

Η ανίχνευση και η απομόνωση της *Listeria monocytogenes* από δείγματα τροφίμων είναι απαραίτητα βήματα για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων και την πρόληψη των εστιών λιστερίωσης. Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος NucleoSpin® Food για την ανίχνευση και την απομόνωση *L. monocytogenes*, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή [287].

Η μέθοδος NucleoSpin® Food χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό επιλεκτικού εμπλουτισμού, εκχύλισης DNA και ενίσχυσης PCR για την ανίχνευση και επιβεβαίωση της παρουσίας *L. monocytogenes* σε δείγματα τροφίμων. Το στάδιο εμπλουτισμού περιλαμβάνει την επιλεκτική ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε ένα μέσο καλλιέργειας, επιτρέποντας τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων-στόχων, ενώ καταστέλλει την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών [288].

Μετά τον εμπλουτισμό, εκτελείται εξαγωγή DNA για να απομονωθεί το γενετικό υλικό του *L. monocytogenes* από την εμπλουτισμένη καλλιέργεια. Το NucleoSpin® Food kit χρησιμοποιεί τεχνολογία βασισμένη σε μεμβράνη πυριτίου για αποτελεσματική και αξιόπιστη εξαγωγή DNA, διασφαλίζοντας την ανάκτηση υψηλής ποιότητας γονιδιωματικού DNA από τα βακτήρια-στόχους [289].

Το εξαγόμενο DNA στη συνέχεια υποβάλλεται σε ενίσχυση PCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές που στοχεύουν διατηρημένες περιοχές του γονιδιώματος *L.*

monocytogenes. Η ενίσχυση αυτών των περιοχών-στόχων επιτρέπει την ειδική ανίχνευση του DNA του *L. monocytogenes*, παρέχοντας μία αξιόπιστη ένδειξη της παρουσίας του παθογόνου στο δείγμα τροφής [290].

Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία *L. monocytogenes*, τα προϊόντα PCR αναλύονται χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η τεχνική πηκτής ηλεκτροφόρησης διαχωρίζει τα ενισχυμένα θραύσματα DNA με βάση το μέγεθός τους, επιτρέποντας την αναγνώριση της συγκεκριμένης ζώνης DNA που σχετίζεται με το *L. monocytogenes* [291].

Η μέθοδος NucleoSpin® Food προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα για την ανίχνευση και την απομόνωση του *L. monocytogenes*. Πρώτον, η μέθοδος παρέχει υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση, επιτρέποντας την αξιόπιστη ανίχνευση χαμηλών επιπέδων *L. monocytogenes* σε δείγματα τροφίμων [292]. Αυτό είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση της ακριβούς αξιολόγησης κινδύνου και την αποτελεσματική εφαρμογή των μέτρων ελέγχου στη βιομηχανία τροφίμων.

Επιπλέον, η μέθοδος NucleoSpin® Food είναι σχετικά γρήγορη, προσφέροντας αποτελέσματα σε μικρότερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους που βασίζονται στην καλλιέργεια. Αυτό αποδίδεται στο στάδιο επιλεκτικού εμπλουτισμού, το οποίο επιτρέπει τη στοχευμένη ανάπτυξη *L. monocytogenes*, επιταχύνοντας τη συνολική διαδικασία ανίχνευσης [293].

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η μέθοδος NucleoSpin® Food δεν είναι χωρίς περιορισμούς. Εσφαλμένα θετικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν λόγω της παρουσίας μη ειδικής ενίσχυσης ή διασταυρούμενης αντίδρασης με άλλους μικροοργανισμούς [294]. Επομένως, επιβεβαιωτικές δοκιμές, όπως προσδιορισμός αλληλουχίας ή εναλλακτικές μέθοδοι ανίχνευσης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την επικύρωση των θετικών αποτελεσμάτων και τη διασφάλιση της ακρίβειας της ανίχνευσης *L. monocytogenes*.

Η μέθοδος NucleoSpin® Food παρέχει μία αξιόπιστη και αποτελεσματική προσέγγιση για την ανίχνευση και την απομόνωση *L. monocytogenes* σε δείγματα τροφίμων. Ο συνδυασμός εκλεκτικού εμπλουτισμού, εκχύλισης DNA και ενίσχυσης PCR επιτρέπει την ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση του DNA *L. monocytogenes*, συμβάλλοντας στη βελτίωση της

ασφάλειας των τροφίμων και στην πρόληψη των κρουσμάτων λιστερίωσης.

5.2.2. Αποτελέσματα Μέθόδου NucleoSpin® Food

Θετική ανίχνευση *L. monocytogenes* στα δείγματα τροφίμων

Η μέθοδος NucleoSpin® Food ανίχνευσε επιτυχώς την παρουσία *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) σε δείγματα τροφίμων. Το DNA που εξήχθη από τις εμπλουτισμένες καλλιέργειες των δειγμάτων υποβλήθηκε σε ενίσχυση PCR στοχεύοντας συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος *L. monocytogenes*. Παρατηρήθηκαν θετικά σήματα ενίσχυσης, που υποδεικνύουν την παρουσία DNA του *L. monocytogenes* στα δείγματα που δοκιμάστηκαν [295]. Η ανίχνευση του *L. monocytogenes* είναι ζωτικής σημασίας καθώς είναι ένα παθογόνο βακτήριο που σχετίζεται με τροφιμογενείς ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της λιστερίωσης.

Επιβεβαίωση της παρουσίας *L. monocytogenes* με χρήση PCR-ηλεκτροφόρησης και μικροβιολογικής ανάλυσης

Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία του *L. monocytogenes* στα δείγματα τροφίμων, διενεργήθηκε ηλεκτροφόρηση PCR και μικροβιολογική ανάλυση. Τα προϊόντα PCR που ελήφθησαν από το στάδιο της ενίσχυσης υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Η ηλεκτροφόρηση γέλης επέτρεψε τον διαχωρισμό των θραυσμάτων DNA με βάση το μέγεθός τους, επιτρέποντας την οπτικοποίηση της συγκεκριμένης ζώνης που σχετίζεται με το DNA του *L. monocytogenes* [296]. Η παρουσία της ζώνης στόχου επιβεβαίωσε την παρουσία *L. monocytogenes* στα δείγματα τροφίμων που δοκιμάστηκαν. Εκτός από την PCR-ηλεκτροφόρηση, διεξήχθη μικροβιολογική ανάλυση για περαιτέρω επιβεβαίωση της παρουσίας *L. monocytogenes*. Οι εμπλουτισμένες καλλιέργειες των δειγμάτων τροφίμων επιστρώθηκαν σε επιλεκτικά μέσα άγαρ ειδικά για *Listeria* spp. αποικίες. Οι χαρακτηριστικές αποικίες υποβλήθηκαν σε βιοχημικές δοκιμές, όπως δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης, για να επιβεβαιωθεί η ταυτότητά τους ως *L. monocytogenes* [297]. Η θετική επιβεβαίωση του *L. monocytogenes* χρησιμοποιώντας τόσο μοριακές όσο και μικροβιολογικές μεθόδους ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Σύγκριση με παρόμοιες μελέτες που δείχνουν συγκρίσιμα ή και βελτιωμένα αποτελέσματα

Τα ευρήματα αυτής της μελέτης συγκρίθηκαν με παρόμοιες μελέτες στο πεδίο και τα

αποτελέσματα έδειξαν συγκρίσιμα ή και βελτιωμένα αποτελέσματα. Σε μία μελέτη των Smith et al. (2018), η ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε δείγματα τροφίμων με χρήση διαφορετικής μοριακής μεθόδου έδειξε παρόμοιο ποσοστό ανίχνευσης 80% σε συγκρίσιμα μεγέθη δειγμάτων. Η μελέτη πέτυχε συγκρίσιμο ή ακόμη υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης, υποστηρίζοντας περαιτέρω την αποτελεσματικότητα της μεθόδου NucleoSpin® Food [298].

Επιπλέον, συγκεκριμένη ανέφερε ευαισθησία 87% και εξειδίκευση 96% για την ανίχνευση του *L. monocytogenes* χρησιμοποιώντας συνδυασμό PCR και μικροβιολογικής ανάλυσης. Τα αποτελέσματά ευθυγραμμίζονται με αυτά τα ευρήματα, αποδεικνύοντας την αξιοπιστία και την ακρίβεια της μεθόδου NucleoSpin® Food στην ανίχνευση του *L. monocytogenes* [299].

Τα συγκρίσιμα ή και βελτιωμένα αποτελέσματα που προέκυψαν σε αυτή τη μελέτη τονίζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου NucleoSpin® Food για την ανίχνευση *L. monocytogenes* σε δείγματα τροφίμων. Ο συνδυασμός μοριακών και μικροβιολογικών αναλύσεων παρέχει μία ισχυρή προσέγγιση για ακριβή και αξιόπιστη ανίχνευση, συμβάλλοντας στη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων και των στρατηγικών διαχείρισης κινδύνου.

5.2.3. Συμπεράσματα της μεθόδου NucleoSpin® Food - Υψηλή ευαισθησία και αξιοπιστία στην ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε δείγματα τροφίμων.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υπογραμμίζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου NucleoSpin® Food στην ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) σε δείγματα τροφίμων. Η μέθοδος επέδειξε υψηλή ευαισθησία, όπως αποδεικνύεται από τη θετική ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε όλα τα δείγματα τροφίμων που δοκιμάστηκαν. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι καθοριστική για τη διασφάλιση της ακριβούς ταυτοποίησης *L. monocytogenes*, ενός παθογόνου βακτηρίου που σχετίζεται με τροφιμογενείς ασθένειες.

Η ευαισθησία της μεθόδου NucleoSpin® Food υποστηρίχθηκε περαιτέρω από την επιτυχή

επιβεβαίωση της παρουσίας *L. monocytogenes* χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση PCR και μικροβιολογική ανάλυση. Η ανίχνευση συγκεκριμένων ζωνών που σχετίζονται με το DNA του *L. monocytogenes* στα αποτελέσματα της πηκτής ηλεκτροφόρησης παρείχε ισχυρές ενδείξεις για την αξιοπιστία της μεθόδου. Επιπρόσθετα, η θετική ταυτοποίηση χαρακτηριστικών αποικιών και η εκτέλεση βιοχημικών δοκιμών επιβεβαίωσαν την παρουσία *L. monocytogenes* στα δείγματα τροφίμων που δοκιμάστηκαν.

Οι συγκρίσεις με παρόμοιες μελέτες έδειξαν ότι η μέθοδος NucleoSpin® Food αποδίδει συγκρίσιμα ή βελτιωμένα αποτελέσματα στην ανίχνευση *L. monocytogenes*. Αυτά τα ευρήματα τονίζουν την αξιοπιστία και την ακρίβεια της μεθόδου, καθιστώντας την ένα πολύτιμο εργαλείο για την ασφάλεια των τροφίμων και τη διαχείριση κινδύνου. Η ικανότητα ακριβούς ανίχνευσης του *L. monocytogenes* σε δείγματα τροφίμων είναι απαραίτητη για την πρόληψη τροφιμογενών επιδημιών και τη διασφάλιση της υγείας των καταναλωτών.

Η υψηλή ευαισθησία και αξιοπιστία της μεθόδου NucleoSpin® Food την καθιστούν πολύτιμο πλεονέκτημα στον τομέα της ασφάλειας των τροφίμων. Με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου, οι παραγωγοί τροφίμων και οι ρυθμιστικές αρχές μπορούν να παρακολουθούν και να ελέγχουν αποτελεσματικά την παρουσία του *L. monocytogenes* στα τρόφιμα, μειώνοντας τον κίνδυνο μόλυνσης και προστατεύοντας τη δημόσια υγεία.

Η μέθοδος NucleoSpin® Food έχει αποδείξει την αποτελεσματικότητά της στην ευαίσθητη και αξιόπιστη ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε δείγματα τροφίμων. Ο συνδυασμός μοριακών και μικροβιολογικών αναλύσεων έχει δώσει ισχυρά αποτελέσματα, συμβάλλοντας σε βελτιωμένες πρακτικές ασφάλειας τροφίμων και στρατηγικές διαχείρισης κινδύνου.

5.3. Ανίχνευση και απομόνωση *Escherichia coli*

5.3.1. Μέθοδος - LAMP

Η ανίχνευση και η απομόνωση *Escherichia coli* (*E. coli*) σε δείγματα τροφίμων είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων και την πρόληψη της εξάπλωσης τροφιμογενών ασθενειών. Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε εσωτερική

τεχνική για την επίτευξη ακριβών και αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Η εσωτερική τεχνική χρησιμοποίησε έναν συνδυασμό επιλεκτικών μέσων καλλιέργειας, βιοχημικών δοκιμών και μοριακής ανάλυσης για την ανίχνευση της παρουσίας *E. coli* σε δείγματα τροφίμων. Τα επιλεκτικά μέσα καλλιέργειας παρείχαν ένα περιβάλλον ευνοϊκό για την ανάπτυξη του *E. Coli*, ενώ αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων. Οι επόμενες βιοχημικές δοκιμές, όπως η δοκιμή ινδόλης και η δοκιμή χρήσης κιτρικών, βοήθησαν στην ταυτοποίηση του *E. coli* με βάση συγκεκριμένα μεταβολικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, η χρήση της PCR-ηλεκτροφόρησης επέτρεψε την ανίχνευση του DNA του *E. coli* μέσω της ενίσχυσης των γονιδίων-στόχων.

5.3.2. Αποτελέσματα - Θετική ανίχνευση *E. coli* σε δείγματα τροφίμων

Η εφαρμογή της εσωτερικής τεχνικής είχε ως αποτέλεσμα τη θετική ανίχνευση *E. coli* σε όλα τα ελεγμένα δείγματα τροφίμων. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει την παρουσία μόλυνσης από *E. coli*, η οποία είναι ανησυχητική καθώς ορισμένα στελέχη *E. coli* μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές γαστρεντερικές ασθένειες στον άνθρωπο. Η ικανότητα της εσωτερικής τεχνικής να αναγνωρίζει με ακρίβεια το *E. coli* σε δείγματα τροφίμων υπογραμμίζει την ευαισθησία και την εξειδίκευσή του.

Επιβεβαίωση παρουσίας *E. coli* με χρήση PCR-ηλεκτροφόρησης και μικροβιολογικής ανάλυσης

Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία *E. coli*, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση PCR. Η ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων που σχετίζονται με *E. coli* είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση χαρακτηριστικών ζωνών στα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πηκτής. Αυτό το βήμα επιβεβαίωσης παρείχε πρόσθετες ενδείξεις για την παρουσία *E. coli* στα δοκιμασμένα δείγματα τροφίμων. Επιπλέον, η μικροβιολογική ανάλυση, συμπεριλαμβανομένης της παρατήρησης τυπικών αποικιών και της εκτέλεσης βιοχημικών δοκιμών, υποστήριξε περαιτέρω την ταυτοποίηση της *E. coli*.

Σύγκριση με παρόμοιες μελέτες που δείχνουν συγκρίσιμα και βελτιωμένα αποτελέσματα

Η συγκριτική ανάλυση με προηγούμενες μελέτες έδειξε ότι η εσωτερική τεχνική απέδωσε συγκρίσιμα ή βελτιωμένα αποτελέσματα στην ανίχνευση *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium και *E. coli*. Παρόμοιες μελέτες έχουν αναφέρει την επιτυχή ανίχνευση *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium και *E. coli* χρησιμοποιώντας διάφορες μοριακές και μικροβιολογικές τεχνικές. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης ευθυγραμμίζονται με εκείνες τις προηγούμενες εργασίες, ενισχύοντας την αξιοπιστία και την αποτελεσματικότητα της εσωτερικής τεχνικής.

5.3.3. Συμπεράσματα - Υψηλή ευαισθησία και αξιοπιστία στην ανίχνευση των παθογόνων σε δείγματα τροφίμων.

Η εφαρμογή της εσωτερικής τεχνικής απέδειξε την αποτελεσματικότητά της μεθόδου στην ανίχνευση *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium στην ευαίσθητη και αξιόπιστη ανίχνευση *Escherichia coli*, σε δείγματα τροφίμων. Η συνδυασμένη χρήση εκλεκτικών μέσων καλλιέργειας, βιοχημικών δοκιμών και ηλεκτροφόρησης PCR επέτρεψαν την ακριβή ταυτοποίηση και επιβεβαίωση της παρουσίας των παθογόνων στα δείγματα. Η θετική ανίχνευση *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium και *E. coli* σε όλα τα ελεγμένα δείγματα τροφίμων, μαζί με τις συγκριτικές αναλύσεις, υποστηρίζουν την υψηλή ευαισθησία και αξιοπιστία της εσωτερικής τεχνικής. Αυτά τα ευρήματα συμβάλλουν στη βελτίωση των πρακτικών ασφάλειας των τροφίμων και τονίζουν τη σημασία των αποτελεσματικών μεθόδων ανίχνευσης και απομόνωσης για την *E. coli* για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας.

Κεφάλαιο 6^ο : Συζήτηση και Περιορισμοί

6.1. Συζήτηση

Η παρούσα διατριβή στόχευε στη διερεύνηση της ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes* της *Salmonella Typhimurium* και της *Escherichia coli* σε δείγματα τροφίμων χρησιμοποιώντας το kit NucleoSpin® Food και μία εσωτερική τεχνική. Τα ευρήματα που παρουσιάζονται παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την απόδοση αυτών των μεθόδων ανίχνευσης και τη σύγκρισή τους με τη σχετική βιβλιογραφία.

Στην παρούσα μελέτη δοκιμάστηκαν πρώτα δοκιμάστηκαν 11 διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης DNA μικροοργανισμών και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν με τις μοριακές τεχνικές που αναφέρονται (PCR- LAMP).

Στη συνέχεια επιλέχθηκε ο συνδυασμός της in-house μεθόδου που αναφέρεται σε συνδυασμό με τη LAMP (όντας πιο ευαίσθητη και ταχεία μοριακή τεχνική από την PCR) ως βέλτιστη από πλευράς χρόνου-κόστους-ευαισθησίας και τέλος συνδυάστηκε με μία 3D συσκευή microfluidic.

Στη μελέτη, διαφορετικές συγκεντρώσεις *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* και *E. coli* εισήχθησαν εμπορικά σε δείγματα μαρουλιού, γάλακτος και κοτόπουλου. Το kit NucleoSpin® Food και η εσωτερική (in-house) τεχνική χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των βακτηρίων από τα δείγματα [300]. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την παρουσία *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* και *E. coli* σε διάφορες συγκεντρώσεις, όπως επιβεβαιώθηκε τόσο με PCR-ηλεκτροφόρηση όσο και από μικροβιολογική ανάλυση.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ευθυγραμμίζονται με προηγούμενες έρευνες που διεξήχθησαν στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν παρόμοιες μέθοδοι για την ταυτοποίηση της *Escherichia coli*, της *Salmonella Typhimurium* και της *Listeria monocytogenes* σε δείγματα τροφίμων [301]. Η τρέχουσα μελέτη έδειξε παρόμοια ή ακόμα καλύτερα αποτελέσματα, πιθανώς λόγω του μεγαλύτερου όγκου δείγματος (1500 μ L) και της τεχνικής ενισχυμένης συγκέντρωσης βακτηριακών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε [302].

Όσον αφορά την ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε δείγματα μαρουλιού, τα αποτελέσματα έδειξαν θετική ανίχνευση για *L. monocytogenes* σε όλα τα δείγματα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του δείγματος ελέγχου. Αυτό το εύρημα υποστηρίζει την υψηλή ευαισθησία και αξιοπιστία του kit NucleoSpin® Food και την εσωτερική τεχνική για

την ανίχνευση *L. monocytogenes*.

Ομοίως, για την ανίχνευση του *E. coli* σε δείγματα μαρουλιού, τα αποτελέσματα αποκάλυψαν θετική ανίχνευση σε όλα τα δείγματα. Η μέθοδος επέδειξε εξαιρετική ευαισθησία, καθώς ακόμη και εξαιρετικά αραιωμένες συγκεντρώσεις ($1,5 \times 10^1$ cfu/mL) *E. coli* αναγνωρίστηκαν με επιτυχία. Αυτά τα ευρήματα συνάδουν με τον στόχο της μελέτης, η οποία είχε ως στόχο να επικυρώσει την απόδοση των μεθόδων ανίχνευσης για το *E. coli* σε δείγματα μαρουλιού.

Σε δείγματα γάλακτος, η μελέτη ανίχνευσε επιτυχώς τόσο την *E. Coli*, την *S. Typhimurium* όσο και τη *L. monocytogenes* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν θετική ανίχνευση και για τα δύο βακτήρια σε διάφορες αραιώσεις, υπογραμμίζοντας την ευαισθησία του kit τροφίμων NucleoSpin® και την εσωτερική τεχνική στον εντοπισμό αυτών των παθογόνων σε δείγματα γάλακτος.

Ομοίως, σε δείγματα κοτόπουλου, η μελέτη ανίχνευσε επιτυχώς *S. Typhimurium*, *E. Coli* και *L. monocytogenes* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα ευρήματα κατέδειξαν την αποτελεσματικότητα των μεθόδων ανίχνευσης σε δείγματα κοτόπουλου, σύμφωνα με τους στόχους της μελέτης.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης επικυρώνουν την υπόθεση ότι το NucleoSpin® Food kit και η εσωτερική τεχνική είναι αξιόπιστες και ευαίσθητες μέθοδοι για την ανίχνευση της *L. monocytogenes*, της *S. Typhimurium* και της *E. coli* σε δείγματα τροφίμων. Τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με την προηγούμενη βιβλιογραφία και υποδηλώνουν ότι αυτές οι μέθοδοι μπορούν να αποτελέσουν πολύτιμα εργαλεία για την ανάλυση της ασφάλειας των τροφίμων.

Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναγνωριστούν ορισμένοι περιορισμοί της μελέτης. Πρώτον, η έρευνα διεξήχθη χρησιμοποιώντας τεχνητά μολυσμένα δείγματα και τα ευρήματα μπορεί να διαφέρουν σε πραγματικά σενάρια με φυσική μόλυνση. Επιπλέον, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τη σύγκριση της απόδοσης του kit τροφίμων NucleoSpin® και της εσωτερικής τεχνικής με άλλες καθιερωμένες μεθόδους για την ανίχνευση βακτηρίων.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το NucleoSpin® Food kit και η εσωτερική τεχνική είναι αποτελεσματικά εργαλεία για την ανίχνευση των *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* και *E. coli* σε δείγματα τροφίμων. Αυτές οι μέθοδοι

επιδεικνύουν υψηλή ευαισθησία και αξιοπιστία, προσφέροντας πιθανές εφαρμογές στην αξιολόγηση της ασφάλειας των τροφίμων. Απαιτούνται περαιτέρω έρευνες και συγκριτικές μελέτες για την ενίσχυση της κατανόησης και της αποδοχής αυτών των μεθόδων ανίχνευσης στον τομέα της μικροβιολογίας τροφίμων.

6.2. Περιορισμοί της παρούσας έρευνας και ο αντίκτυπός τους για τη Μελλοντική Έρευνα

Παρά το γεγονός πως οι πληροφορίες οι οποίες παρουσιάζονται στην παρούσα Διατριβή παρέχουν πολύτιμη γνώση σχετικά με τις μεθόδους ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes*, της *Salmonella Typhimurium* και της *Escherichia coli* σε δείγματα τροφίμων, υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί που θα πρέπει να ληφθούν υπόψη για μελλοντικές ερευνητικές προσπάθειες. Αυτοί οι περιορισμοί βασίζονται στις συγκεκριμένες πληροφορίες που αναφέρονται και στα ευρήματα που συζητήθηκαν στις αναρτήσεις. Είναι σημαντικό να αντιμετωπιστούν αυτοί οι περιορισμοί για να βελτιωθεί περαιτέρω και να ενισχυθεί η κατανόηση της ανίχνευσης βακτηρίων σε δείγματα τροφίμων.

Περιορισμένο εύρος βακτηριακών στελεχών

Η παρούσα διατριβή εστιάζει κυρίως στην ανίχνευση της *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* και *E. coli*. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά άλλα τροφιμογενή παθογόνα που ενέχουν σημαντικούς κινδύνους για την ασφάλεια των τροφίμων. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να εξετάσει το ενδεχόμενο επέκτασης του πεδίου της μελέτης, ώστε να συμπεριλάβει ένα ευρύτερο φάσμα βακτηριακών στελεχών που συνήθως σχετίζονται με τροφιμογενείς ασθένειες, όπως το *Campylobacter spp*, ο *Staphylococcus aureus* κ.ο.κ. [303]

Περιορισμένη ποικιλία δειγμάτων

Η διατριβή εξετάζει τόσο τεχνητά επιμολυσμένα δείγματα, όσο και μη τεχνητά επιμολυσμένα δείγματα τα οποία μπορεί να μην αντιπροσωπεύουν πλήρως την πολυπλοκότητα και την ποικιλομορφία των δειγμάτων τροφίμων του εμπορίου. Είναι σημαντικό για μελλοντική έρευνα να ενσωματωθεί ένα ευρύ φάσμα μητρών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων τύπων νωπών προϊόντων, κρέατος, γαλακτοκομικών και επεξεργασμένων τροφίμων, για την αξιολόγηση της απόδοσης των μεθόδων ανίχνευσης σε διαφορετικούς τύπους δειγμάτων.

Έλλειψη συνολικής επικύρωσης

Ενώ η διατριβή παρουσιάζει ευρήματα σχετικά με την απόδοση των μεθόδων ανίχνευσης, είναι απαραίτητη μία ολοκληρωμένη επικύρωση με καθιερωμένες μεθόδους αναφοράς και βιομηχανικά πρότυπα για την αξιολόγηση της ακρίβειας και της αξιοπιστίας τους. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί στη διεξαγωγή συγκριτικών μελετών με ευρέως αποδεκτές μεθόδους για να διασφαλιστεί η εγκυρότητα των ευρημάτων.

Περιορισμένη αξιολόγηση της εφαρμογής της μεθόδου

Η παρούσα διατριβή αξιολογεί τις μεθόδους ανίχνευσης σε συγκεκριμένα δείγματα τροφίμων, όπως το μαρούλι, το γάλα και το κοτόπουλο. Ωστόσο, η δυνατότητα εφαρμογής αυτών των μεθόδων σε διαφορετικά δείγματα τροφίμων μπορεί να ποικίλλει. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να διερευνήσει τη συμβατότητα των μεθόδων ανίχνευσης με ένα ευρύτερο φάσμα τύπων τροφίμων και να αξιολογήσει την απόδοσή τους σε σύνθετα δείγματα, όπως επεξεργασμένα τρόφιμα και ανάμεικτα συστατικά [304].

Περιορισμένη αξιολόγηση κόστους-αποτελεσματικότητας

Η οικονομική σκοπιμότητα και η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας της εφαρμογής των μεθόδων ανίχνευσης σε εργαστήρια δοκιμών τροφίμων είναι σημαντικά ζητήματα. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να διεξάγει εκτενείς αναλύσεις κόστους που θα λαμβάνουν υπόψη τον εξοπλισμό, τα αντιδραστήρια και την εργασία που απαιτείται για τις μεθόδους για να παρέχουν καλύτερη κατανόηση της πρακτικότητας και της οικονομικής τους προσιτότητας.

Περιορισμένη εξερεύνηση αυτοματισμού και ανάλυση υψηλής απόδοσης

Η παρούσα διατριβή δεν διερευνά εκτενώς τις δυνατότητες αυτοματοποίησης και ανάλυσης υψηλής απόδοσης των μεθόδων ανίχνευσης. Η ενσωμάτωση αυτοματοποιημένων πρωτοκόλλων και η αξιολόγηση της επεκτασιμότητας των μεθόδων για ανάλυση μεγάλης κλίμακας θα ήταν επωφελής για μελλοντική έρευνα.

Ανάγκη για ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο

Η διατριβή εστιάζει κυρίως στην ανίχνευση βακτηριακής μόλυνσης μέσω εργαστηριακών μεθόδων. Ωστόσο, υπάρχει μια αυξανόμενη ανάγκη για μεθόδους ανίχνευσης σε πραγματικό χρόνο ή σχεδόν σε πραγματικό χρόνο που μπορούν να παρέχουν γρήγορα αποτελέσματα σε περιβάλλοντα πεδίου ή κατά τις διαδικασίες παραγωγής τροφίμων. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να διερευνήσει την ανάπτυξη τεχνικών ταχείας ανίχνευσης

που μπορούν να προσφέρουν έγκαιρα και δραστικά αποτελέσματα.

Αντιμετωπίζοντας αυτούς τους περιορισμούς σε μελλοντικές έρευνες, οι ερευνητές μπορούν να βελτιώσουν περαιτέρω την κατανόηση και την εφαρμογή μεθόδων ανίχνευσης για τροφιμογενή παθογόνα, συμβάλλοντας τελικά στη βελτίωση των μέτρων ασφάλειας των τροφίμων.

Ανάγκη για ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο

Η χρωματομετρική μέθοδος LAMP, η οποία ενσωματώνει μία χρωστική ουσία ευαίσθητη στο pH, επιτρέπει την οπτική ανίχνευση της ενίσχυσης, απλοποιώντας περαιτέρω τη διαδικασία και εξαλείφοντας την ανάγκη για εξελιγμένο εξοπλισμό.

Για την ανάπτυξη της μεθόδου LAMP απαιτούνται συγκεκριμένα υλικά και μέθοδοι τα οποία καθίστανται διαθέσιμα σε εργαστηριακό περιβάλλον εξαλείφοντας την ανάγκη για δαπάνη αγοράς των απαραίτητων συστατικών στοιχείων της μεθόδου.

Σχεδιασμός εκκινητών

Η μέθοδος LAMP απαιτεί ένα σύνολο τεσσάρων έως έξι ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών που στοχεύουν έξι έως οκτώ διακριτές περιοχές στο DNA στόχο. Οι αλληλουχίες εκκινητών θα πρέπει να σχεδιάζονται σύμφωνα με τους τυπικούς κανόνες σχεδιασμού εκκινητών LAMP. [304]

Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια

Τα ακόλουθα αντιδραστήρια απαιτούνται για την αντίδραση LAMP: 10x Ρυθμιστικό διάλυμα ισοθερμικής ενίσχυσης (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Tween 20, pH 8,8. (10 mM το καθένα), βεταΐνη (5 M), Bst 2.0 DNA Polymerase ή παρόμοια, και μία ευαίσθητη στο pH χρωστική όπως το Phenol Red ή το Neutral Red.[305]

Προετοιμασία του μείγματος LAMP

Το μείγμα LAMP παρασκευάζεται με συνδυασμό των ακόλουθων συστατικών σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης: 10x ρυθμιστικό διάλυμα ισοθερμικής ενίσχυσης (2,5 μL), dNTPs (1,6 μL), βεταΐνη (1,4 μL), εκκινητές εμπρός και προς τα πίσω (1,6 μL) έκαστος), Loop Primers (εάν χρησιμοποιούνται, 0,8 μL το καθένα), Bst 2,0 DNA Polymerase (0,32 μL), χρωστική ευαίσθητη στο pH (0,1 μL) και νερό χωρίς νουκλεάση

μέχρι τελικό όγκο 25 μL . [306]

Προσθήκη DNA προτύπου

Το DNA του προτύπου προστίθεται τελευταίο στο μίγμα LAMP (1 μL). Η αντίδραση στη συνέχεια αναμιγνύεται ήπια και φυγοκεντρείται για λίγο για να συλλεχθεί όλο το υγρό στον πυθμένα του σωλήνα.

Επώαση και ενίσχυση

Η αντίδραση επώάζεται σε σταθερή θερμοκρασία (συνήθως 60-65°C) για 1-2 h. Η αλλαγή χρώματος της ευαίσθητης στο pH βαφής υποδηλώνει επιτυχή ενίσχυση. [307]

Η παρασκευή ενός χρωματομετρικού μίγματος LAMP στο εργαστήριο είναι μία απλή διαδικασία που μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας τυπικά αντιδραστήρια μοριακής βιολογίας, άμεσα διαθέσιμα σε ένα εργαστηριακό περιβάλλον, εξαλείφοντας την ανάγκη δαπάνης αγοράς ολοκληρωμένων Kit.

Κεφάλαιο 7^ο : Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

Με βάση τα ευρήματα και τις αξίες που συζητήθηκαν, μπορούν να καταρτιστούν αρκετές προτάσεις για την ερευνητική εστίαση της μελλοντικής έρευνας προς επίτευξη της περαιτέρω ενίσχυσης της κατανόησης και της εφαρμογής των μεθόδων ανίχνευσης *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* και *Escherichia coli* σε δείγματα τροφίμων.

Διερεύνηση της απόδοσης του kit NucleoSpin® και της εσωτερικής τεχνικής σε σενάρια πρακτικών εφαρμογών

Ενώ η τρέχουσα μελέτη απέδειξε επιτυχώς την αποτελεσματικότητα των μεθόδων ανίχνευσης σε τεχνητά μολυσμένα δείγματα, η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί στην αξιολόγηση της απόδοσής τους σε ρεαλιστικές καταστάσεις με φυσική μόλυνση. Αυτό θα παρέχει μια ακριβέστερη αξιολόγηση της πρακτικότητας και της αξιοπιστίας των μεθόδων στην ανίχνευση *L. monocytogenes*, της *S. Typhimurium* και *E. coli* σε δείγματα τροφίμων.

Σύγκριση του kit NucleoSpin® και άλλων τεχνικών με διαφορετικές καθιερωμένες μεθόδους ανίχνευσης

Για να επικυρωθεί και να εξακριβωθεί περαιτέρω η αξιοπιστία και η ευαισθησία του kit τροφίμων NucleoSpin®, θα πρέπει να διεξαχθούν συγκριτικές μελέτες με άλλες καθιερωμένες μεθόδους για ανίχνευση βακτηρίων σε δείγματα τροφίμων. Αυτό θα επιτρέψει στους ερευνητές να αξιολογήσουν τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς διαφορετικών μεθόδων και να εντοπίσουν τομείς προς βελτίωση ή τυποποίηση.

Διερεύνηση των ορίων ανίχνευσης του NucleoSpin®

Η παρούσα μελέτη αξιολόγησε την απόδοση των μεθόδων ανίχνευσης για διαφορετικές συγκεντρώσεις *L. monocytogenes*, της *S. Typhimurium* και *E. coli*. Η μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να επικεντρωθεί στον προσδιορισμό των κατώτερων ορίων ανίχνευσης αυτών των μεθόδων για την καλύτερη κατανόηση της ευαισθησίας τους και της ικανότητάς τους να ανιχνεύουν χαμηλή μόλυνση σε δείγματα τροφίμων.

Διερεύνηση της δυνατότητας εφαρμογής του NucleoSpin® στην ανίχνευση άλλων τροφιμογενών παθογόνων

Παρά το γεγονός πως η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην ανίχνευση του *L.*

monocytogenes, της *S. Typhimurium* και του *E. coli*, περαιτέρω έρευνα θα μπορούσε να διερευνήσει τις δυνατότητες του NucleoSpin® για την ανίχνευση άλλων τροφιμογενών παθογόνων. Αυτό θα διευρύνει το πεδίο των εφαρμογών τους και θα συνεισφέρει σε ολοκληρωμένη ανάλυση για την ασφάλεια των τροφίμων.

Αξιολόγηση της σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας του NucleoSpin®

Εκτός από τα ζητήματα απόδοσης, είναι σημαντικό να αξιολογηθεί η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας των μεθόδων ανίχνευσης. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να περιλαμβάνει μία ολοκληρωμένη ανάλυση κόστους για να προσδιοριστεί η σκοπιμότητα και η οικονομική προσιτότητα της εφαρμογής αυτών των μεθόδων σε εργαστήρια δοκιμών τροφίμων.

Διερεύνηση της συμβατότητας του kit NucleoSpin® σε διαφορετικές κατηγορίες τροφίμων με τη χρήση διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης

Η παρούσα μελέτη εξέτασε τις μεθόδους ανίχνευσης σε δείγματα μαρουλιού, γάλακτος και κοτόπουλου. Ωστόσο, τα δείγματα τροφίμων μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ως προς τη σύνθεση και την πολυπλοκότητά τους. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να διερευνήσει τη συμβατότητα του kit NucleoSpin® Food με ένα ευρύ φάσμα μητρών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων φρούτων, λαχανικών, δημητριακών και επεξεργασμένων τροφίμων.

Διερεύνηση των δυνατοτήτων για αυτοματισμό σε αναλύσεις υψηλής απόδοσης

Ο αυτοματισμός και η ανάλυση υψηλής απόδοσης μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα και την ταχύτητα των διαδικασιών δοκιμής τροφίμων. Η μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να επικεντρωθεί στην ανάπτυξη αυτοματοποιημένων πρωτοκόλλων και στην αξιολόγηση της επεκτασιμότητας του kit τροφίμων NucleoSpin® για αναλύσεις μεγάλης κλίμακας, επιτρέποντας την ταχεία και αξιόπιστη ανίχνευση των *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* και *E. coli* σε δείγματα τροφίμων.

Εστιάζοντας σε αυτούς τους προτεινόμενους τομείς μελλοντικής έρευνας, η επιστημονική κοινότητα μπορεί να προωθήσει περαιτέρω τον τομέα της μικροβιολογίας τροφίμων και να συμβάλει στην ανάπτυξη ισχυρών και αποτελεσματικών μεθόδων για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων, διασφαλίζοντας την ασφάλεια και την ποιότητα των προϊόντων διατροφής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] M. Diard and W.-D. Hardt, “Evolution of bacterial virulence,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 41, no. 5, pp. 679–697, May 2017, doi: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux023>.
- [2] S. Myint and A. Cann, *Molecular and Cell Biology of Opportunistic Infections in AIDS*. Springer, 2012.
- [3] M. M. Sfeir, “Burkholderia cepacia complex infections: More complex than the bacterium name suggest,” *The Journal of Infection*, vol. 77, no. 3, pp. 166–170, Sep. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.07.006>.
- [4] M. Bassetti, M. Merelli, C. Temperoni, and A. Astilean, “New antibiotics for bad bugs: where are we?,” *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 12, no. 1, p. 22, 2013, doi: <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-22>.
- [5] CDC, “ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States,” 2013. Available: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
- [6] WHO, “The evolving threat of antimicrobial resistance Options for action,” 2012. Available: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44812/9789241503181_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [7] WHO, “Laboratory biosafety manual, 3rd edition,” *www.who.int*, 2004. <https://www.who.int/publications/i/item/9241546506>
- [8] M. Pal, “Public Health Concern Due To Emerging and Re-Emerging Zoonoses,” *International Journal of Livestock Research*, vol. 3, no. 1, p. 56, 2013, doi: <https://doi.org/10.5455/ijlr.20130305071351>.
- [9] M. Schultz, “Theobald Smith,” *Emerging Infectious Diseases*, vol. 14, no. 12, pp. 1940–1942, Dec. 2008, doi: <https://doi.org/10.3201/eid1412.081188>.
- [10] B. Coburn, G. A. Grassl, and B. B. Finlay, “Salmonella, the host and disease: a brief review,” *Immunology & Cell Biology*, vol. 85, no. 2, pp. 112–118, Dec. 2006, doi: <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>.
- [11] P. Grimont and F.-X. Weill, “WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella ANTIGENIC FORMULAE OF THE SALMONELLA SEROVARS 2007 9th edition,” 2007. Available: https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf
- [12] M. Bawn *et al.*, “Evolution of Salmonella enterica serotype Typhimurium driven

- by anthropogenic selection and niche adaptation,” *PLOS Genetics*, vol. 16, no. 6, p. e1008850, Jun. 2020, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008850>.
- [13] E. Carbonnelle *et al.*, “MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory,” *Clinical Biochemistry*, vol. 44, no. 1, pp. 104–109, Jan. 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017>.
- [14] A. Baumler and F. C. Fang, “Host Specificity of Bacterial Pathogens,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 3, no. 12, pp. a010041–a010041, Dec. 2013, doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010041>.
- [15] R. Balasubramanian *et al.*, “The global burden and epidemiology of invasive nontyphoidal *Salmonella* infections,” *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, vol. 15, no. 6, pp. 1421–1426, Sep. 2018, doi: <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1504717>.
- [16] E. Galanis *et al.*, “Web-based Surveillance and Global *Salmonella* Distribution, 2000–2002,” *Emerging Infectious Diseases*, vol. 12, no. 3, pp. 381–388, Mar. 2006, doi: <https://doi.org/10.3201/eid1205.050854>.
- [17] T. T. Ao, N. A. Feasey, M. A. Gordon, K. H. Keddy, F. J. Angulo, and J. A. Crump, “Global Burden of Invasive Nontyphoidal *Salmonella* Disease, 2010,” *Emerging Infectious Diseases*, vol. 21, no. 6, pp. 941–949, Jun. 2015, doi: <https://doi.org/10.3201/eid2106.140999>.
- [18] C. N. Haas, J. B. Rose, and C. P. Gerba, *Quantitative microbial risk assessment*. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2014.
- [19] C.-H. Chiu and L.-H. Su, “*Salmonella*, Non-Typhoidal Species (*S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Typhimurium*) - Infectious Disease and Antimicrobial Agents,” *Antimicrobe.org*, 2019. <http://www.antimicrobe.org/b258.asp>
- [20] R. W. Crawford, R. Rosales-Reyes, M. d. I. L. Ramirez-Aguilar, O. Chapa-Azuela, C. Alpuche-Aranda, and J. S. Gunn, “Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 9, pp. 4353–4358, Feb. 2010, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1000862107>.
- [21] A. Álvarez-Ordóñez, A. Fernández, A. Bernardo, and M. López, “Arginine and lysine decarboxylases and the Acid Tolerance Response of *Salmonella* Typhimurium,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 136, no. 3, pp. 278–282, Jan. 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.024>.

- [22] A. M. Gonzales, S. Wilde, and K. L. Roland, “New Insights into the Roles of Long Polar Fimbriae and Stg Fimbriae in Salmonella Interactions with Enterocytes and M Cells,” *Infection and Immunity*, vol. 85, no. 9, pp. e00172-17, Aug. 2017, doi: <https://doi.org/10.1128/IAI.00172-17>.
- [23] A. Fabrega and J. Vila, “Salmonella enterica Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 26, no. 2, pp. 308–341, Apr. 2013, doi: <https://doi.org/10.1128/cmr.00066-12>.
- [24] C. L. Francis, T. A. Ryan, B. D. Jones, S. J. Smith, and S. Falkow, “Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria,” *Nature*, vol. 364, no. 6438, pp. 639–642, Aug. 1993, doi: <https://doi.org/10.1038/364639a0>.
- [25] J. S. C. Arthur and S. C. Ley, “Mitogen-activated protein kinases in innate immunity,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 13, no. 9, pp. 679–692, Aug. 2013, doi: <https://doi.org/10.1038/nri3495>.
- [26] E. G. D. Murray, R. A. Webb, and M. B. R. Swann, “A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.),” *The Journal of Pathology and Bacteriology*, vol. 29, no. 4, pp. 407–439, 1926, doi: <https://doi.org/10.1002/path.1700290409>.
- [27] B. Carbonnelle *et al.*, “[Epidemic of listeriosis in Western France (1975--1976)],” *Revue D'epidemiologie Et De Sante Publique*, vol. 26, no. 6, pp. 451–467, Apr. 1979, Accessed: Mar. 29, 2023. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/472410/>
- [28] W. F. Schlech *et al.*, “Epidemic Listeriosis — Evidence for Transmission by Food,” *New England Journal of Medicine*, vol. 308, no. 4, pp. 203–206, Jan. 1983, doi: <https://doi.org/10.1056/nejm198301273080407>.
- [29] G. B. Mackaness, “Cellular resistance to infection,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 116, no. 3, pp. 381–406, Sep. 1962, doi: <https://doi.org/10.1084/jem.116.3.381>.
- [30] J. Mengaud, H. Ohayon, P. Gounon, R-M. Mege, and P. Cossart, “E-Cadherin Is the Receptor for Internalin, a Surface Protein Required for Entry of *L. monocytogenes* into Epithelial Cells,” *Cell*, vol. 84, no. 6, pp. 923–932, Mar. 1996, doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81070-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81070-3).
- [31] H. Bierne, C. Sabet, N. Personnic, and P. Cossart, “Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*,” *Microbes*

- and Infection*, vol. 9, no. 10, pp. 1156–1166, Aug. 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.003>.
- [32] T. Gründler *et al.*, “The Surface Proteins InlA and InlB Are Interdependently Required for Polar Basolateral Invasion by *Listeria monocytogenes* in a Human Model of the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier,” *Microbes and infection*, Apr. 01, 2013. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23376167/>
- [33] S. Seveau, “Multifaceted Activity of Listeriolysin O, the Cholesterol-Dependent Cytolysin of *Listeria monocytogenes*,” *MACPF/CDC Proteins - Agents of Defence, Attack and Invasion*, pp. 161–195, 2014, doi: https://doi.org/10.1007/978-94-017-8881-6_9.
- [34] E. Boura and R. Nencka, “Phosphatidylinositol 4-kinases: Function, structure, and inhibition,” *Experimental Cell Research*, vol. 337, no. 2, pp. 136–145, Oct. 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.03.028>.
- [35] X. Pan, Y. Yang, and J.-R. Zhang, “Molecular basis of host specificity in human pathogenic bacteria,” *Emerging Microbes & Infections*, vol. 3, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2014, doi: <https://doi.org/10.1038/emi.2014.23>.
- [36] J. J. Quereda *et al.*, “Reassessing the role of internalin B in *Listeria monocytogenes* virulence using the epidemic strain F2365,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 25, no. 2, pp. 252.e1–252.e4, Feb. 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.08.022>.
- [37] S. Donovan, “Listeriosis: a Rare but Deadly Disease,” *Clinical Microbiology Newsletter*, vol. 37, no. 17, pp. 135–140, Sep. 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2015.08.001>.
- [38] R. Drolia and A. K. Bhunia, “Crossing the Intestinal Barrier via *Listeria* Adhesion Protein and Internalin A,” *Trends in Microbiology*, vol. 27, no. 5, pp. 408–425, May 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.007>.
- [39] O. Disson and M. Lecuit, “In vitro and in vivo models to study human listeriosis: mind the gap,” *Microbes and Infection*, vol. 15, no. 14–15, pp. 971–980, Dec. 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.09.012>.
- [40] N. E. Freitag, G. C. Port, and M. D. Miner, “*Listeria monocytogenes* — from saprophyte to intracellular pathogen,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 7, no. 9, pp. 623–628, Aug. 2009, doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2171>.
- [41] G. Nikitas, C. Deschamps, O. Disson, T. Niaux, P. Cossart, and M. Lecuit, “Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific

- targeting of goblet cell accessible E-cadherin,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 208, no. 11, pp. 2263–2277, Oct. 2011, doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20110560>.
- [42] G. Fan, P. Jun-xing, and H. Jin-wen, “Screening of genes related to the interaction between *Listeria monocytogenes* and host cells,” Aug. 2022, doi: <https://doi.org/10.1101/2022.08.28.505572>.
- [43] P. Cohen *et al.*, “Monitoring Cellular Responses to *Listeria monocytogenes* with Oligonucleotide Arrays,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 15, pp. 11181–11190, Apr. 2000, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11181>.
- [44] D. N. Baldwin, V. Vanchinathan, P. O. Brown, and J. A. Theriot, *Genome Biology*, vol. 4, no. 1, p. R2, 2002, doi: <https://doi.org/10.1186/gb-2002-4-1-r2>.
- [45] A. K. D. Schnitger *et al.*, “*Listeria monocytogenes* infection in macrophages induces vacuolar-dependent host miRNA response,” *PloS One*, vol. 6, no. 11, p. e27435, 2011, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027435>.
- [46] O. Schneewind and D. Missiakas, “Sec-secretion and sortase-mediated anchoring of proteins in Gram-positive bacteria,” *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1843, no. 8, pp. 1687–1697, Aug. 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.11.009>.
- [47] M. Lecuit, J. L. Sonnenburg, P. Cossart, and J. I. Gordon, “Functional Genomic Studies of the Intestinal Response to a Foodborne Enteropathogen in a Humanized Gnotobiotic Mouse Model,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 20, pp. 15065–15072, May 2007, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M610926200>.
- [48] M. L. Pallotta, “Listeriosis Patients by *Listeria monocytogenes* Infection: A Resurgent Foodborne Disease in Immune-Compromised Subjects,” *Cronicon OPEN ACCESS*, pp. 637–639, 2019.
- [49] W. Köhler, “P. R. Edwards and W. H. Ewing, Identification of Enterobacteriaceae, II. Aufl. 258 S. 2 Abb., 87 Tab. Minneapolis 1962: Burgess Publ. Comp,” *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, vol. 3, no. 2, pp. 157–157, 1963, doi: <https://doi.org/10.1002/jobm.19630030209>.
- [50] E. T. Hillman, H. Lu, T. Yao, and C. H. Nakatsu, “Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract,” *Microbes and Environments*, vol. 32, no. 4, pp. 300–313, 2017, doi: <https://doi.org/10.1264/jsme2.me17017>.
- [51] M. A. Croxen, R. J. Law, R. Scholz, K. M. Keeney, M. Wlodarska, and B. B. Finlay, “Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*,”

- Clinical Microbiology Reviews*, vol. 26, no. 4, pp. 822–880, Oct. 2013, doi: <https://doi.org/10.1128/cmr.00022-13>.
- [52] WHO, *World health statistics 2015*. World Health Organization, 2015. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/170250>
- [53] T. A. T. Gomes *et al.*, “Diarrheagenic *Escherichia coli*,” *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 47, no. 1, pp. 3–30, Dec. 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>.
- [54] M. E. Falagas and D. E. Karageorgopoulos, “Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms,” *Journal of Hospital Infection*, vol. 73, no. 4, pp. 345–354, Dec. 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.02.021>.
- [55] A. Cassini *et al.*, “Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis,” *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 19, no. 1, pp. 56–66, Jan. 2019, doi: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30605-4).
- [56] M. J. Schwaber and Y. Carmeli, “Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 60, no. 5, pp. 913–920, Sep. 2007, doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkm318>.
- [57] C. Lonchel Magoué, P. Melin, J. Gangoué-Piéboji, M.-C. . O. Assoumou, R. Boreux, and P. De Mol, “Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Ngaoundere, Cameroon,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 19, no. 9, pp. E416–E420, Sep. 2013, doi: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12239>.
- [58] Y. M. Bezabih *et al.*, “The global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* in the community,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 76, no. 1, pp. 22–29, Jan. 2021, doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa399>.
- [59] L. Mueller, C. Cimen, L. Poirel, M.-C. Descombes, and P. Nordmann, “Prevalence of fosfomycin resistance among ESBL-producing *Escherichia coli* isolates in the community, Switzerland,” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 38, no. 5, pp. 945–949, Mar. 2019, doi: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03531-0>.

- [60] M. Adler, M. Anjum, D. I. Andersson, and L. Sandegren, “Combinations of mutations in *envZ*, *ftsI*, *mrdA*, *acrB* and *acrR* can cause high-level carbapenem resistance in *Escherichia coli*,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 71, no. 5, pp. 1188–1198, Feb. 2016, doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkv475>.
- [61] A. H. Havelaar *et al.*, “World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010,” *PLOS Medicine*, vol. 12, no. 12, p. e1001923, Dec. 2015, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>.
- [62] WHO, “THE BURDEN OF FOODBORNE DISEASES IN THE WHO EUROPEAN REGION,” 2017. Available: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/402989/50607-WHO-Food-Safety-publicationV4_Web.pdf
- [63] European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control, “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 | EFSA,” *www.efsa.europa.eu*, 2015. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4634> (accessed Mar. 29, 2023).
- [64] European Food Safety Authority, EFSA, “Salmonella,” *European Food Safety Authority*, 2021. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella>
- [65] F. Fung, H.-S. Wang, and S. Menon, “Food safety in the 21st century,” *Biomedical Journal*, vol. 41, no. 2, pp. 88–95, Apr. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.003>.
- [66] E. A. Dowler and D. O’Connor, “Rights-based approaches to addressing food poverty and food insecurity in Ireland and UK,” *Social Science & Medicine*, vol. 74, no. 1, pp. 44–51, Jan. 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2011.08.036>.
- [67] S. A. Neeliah and D. Goburdhun, “National Food Control Systems: A Review,” *Food Reviews International*, vol. 23, no. 1, pp. 35–51, Jan. 2007, doi: <https://doi.org/10.1080/87559120600998148>.
- [68] A. L. Macready, S. Hieke, M. Klimczuk-Kochańska, S. Szumiał, L. Vranken, and K. G. Grunert, “Consumer trust in the food value chain and its impact on consumer confidence: A model for assessing consumer trust and evidence from a 5-country study in Europe,” *Food Policy*, p. 101880, Mar. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2020.101880>.

- [69] A. Hadjigeorgiou, “National Food Safety Systems in the European Union: A Comparative Survey,” *International Journal of Food Studies*, vol. 2, no. 1, pp. 106–117, Apr. 2013, doi: <https://doi.org/10.7455/ijfs/2.1.2013.a8>.
- [70] A. Ndoti-Nembe, K. D. Vu, N. Doucet, and M. Lacroix, “Antimicrobial Effects of Essential Oils, Nisin, and Irradiation Treatments against *Listeria monocytogenes* on Ready-to-Eat Carrots,” *Journal of Food Science*, vol. 80, no. 4, pp. M795–M799, Mar. 2015, doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12832>.
- [71] D. Barling, “Food agencies as an institutional response to policy failure by the UK and the EU,” *Qualities of food*, Jul. 2018, doi: <https://doi.org/10.7765/9781526137609.00012>.
- [72] J. -P. Maudoux, C. Saegerman, C. Rettigner, G. Houins, X. Van Huffel, and D. Berkvens, “Food safety surveillance through a risk based control programme: Approach employed by the Belgian Federal Agency for the safety of the food chain,” *Veterinary Quarterly*, vol. 28, no. 4, pp. 140–154, Dec. 2006, doi: <https://doi.org/10.1080/01652176.2006.9695220>.
- [73] WHO, “Improved coordination and harmonization of national food safety control services: report on a joint WHO/EURO–FSAI meeting: Dublin, Ireland, 19–20 June 2001,” *apps.who.int*, 2001. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/347897> (accessed Mar. 29, 2023).
- [74] P. K. Mandal, A. K. Biswas, K. Choi, and U. K. Pal, “Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview,” *American Journal of Food Technology*, vol. 6, no. 2, pp. 87–102, Feb. 2011, doi: <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.87.102>.
- [75] X. Zhao, C.-W. Lin, J. Wang, and D. H. Oh, “Advances in Rapid Detection Methods for Foodborne Pathogens,” *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, no. 3, pp. 297–312, Mar. 2014, doi: <https://doi.org/10.4014/jmb.1310.10013>.
- [76] N. Lee, K. Y. Kwon, S. K. Oh, H.-J. Chang, H. S. Chun, and S.-W. Choi, “A Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean Ready-to-Eat Food,” *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 11, no. 7, pp. 574–580, Jul. 2014, doi: <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1638>.
- [77] J. J. Hirvonen, A. Siitonen, and S.-S. . Kaukoranta, “Usability and Performance of CHROMagar STEC Medium in Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia*

- coli Strains,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, no. 11, pp. 3586–3590, Aug. 2012, doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.01754-12>.
- [78] M. Gouali, C. Ruckly, I. Carle, M. Lejay-Collin, and F.-X. Weill, “Evaluation of CHROMagar STEC and STEC O104 Chromogenic Agar Media for Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Stool Specimens,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, no. 3, pp. 894–900, Jan. 2013, doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.03121-12>.
- [79] L. K. Tan, P. T. Ooi, E. Carniel, and K. L. Thong, “Evaluation of a Modified Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar for Isolation of *Yersinia* spp,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 8, p. e106329, Aug. 2014, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106329>.
- [80] S. D. Weagant, “A new chromogenic agar medium for detection of potentially virulent *Yersinia enterocolitica*,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 72, no. 2, pp. 185–190, Feb. 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.019>.
- [81] T. Ramamurthy, A. Ghosh, G. P. Pazhani, and S. Shinoda, “Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria,” *Frontiers in Public Health*, vol. 2, Jul. 2014, doi: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00103>.
- [82] Md. Fakruddin, K. S. B. Mannan, and S. Andrews, “Viable but Nonculturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective,” *ISRN Microbiology*, vol. 2013, pp. 1–6, 2013, doi: <https://doi.org/10.1155/2013/703813>.
- [83] M. Schmelcher and M. J. Loessner, “Use of Bacteriophage Cell Wall-Binding Proteins for Rapid Diagnostics of *Listeria*,” *Methods in Molecular Biology*, pp. 141–156, 2014, doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0703-8_12.
- [84] I. Son, R. Binet, A. Maounounen-Laasri, A. Lin, T. S. Hammack, and J. A. Kase, “Detection of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* genes with multiplex PCR,” *Food Microbiology*, vol. 40, pp. 31–40, Jun. 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.016>.
- [85] F. Adzitey, G. Rusul, N. Huda, T. Cogan, and J. Corry, “Prevalence, antibiotic resistance and RAPD typing of *Campylobacter* species isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 154, no. 3, pp. 197–205, Mar. 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.006>.
- [86] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, and C. Adley, “An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors,” *Biotechnology*

- advances*, vol. 28, no. 2, pp. 232–54, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.12.004>.
- [87] L. Garibyan and N. Avashia, “Polymerase Chain Reaction,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 133, no. 3, pp. 1–4, Mar. 2013, doi: <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
- [88] B. Zhou *et al.*, “Simultaneous detection of six food-borne pathogens by multiplex PCR with a GeXP analyzer,” *Food Control*, vol. 32, no. 1, pp. 198–204, Jul. 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.044>.
- [89] C. J. Smith and A. M. Osborn, “Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology,” *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 67, no. 1, pp. 6–20, Jan. 2009, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>.
- [90] C.-H. Khoo *et al.*, “Virulotyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from indigenous vegetables and poultry meat in Malaysia using multiplex-PCR,” *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 96, no. 4, pp. 441–457, Jun. 2009, doi: <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9358-z>.
- [91] J. Chen, J. Tang, J. Liu, Z. Cai, and X. Bai, “Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 112, no. 4, pp. 823–830, Feb. 2012, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05240.x>.
- [92] J. Ryu *et al.*, “Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR,” *Food Control*, vol. 32, no. 2, pp. 659–664, Aug. 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.048>.
- [93] E. Omiccioli, G. Amagliani, G. Brandi, and M. Magnani, “A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk,” *Food Microbiology*, vol. 26, no. 6, pp. 615–622, Sep. 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.008>.
- [94] J. Singh, V. K. Batish, and S. Grover, “Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in dairy products using real time PCR-melt curve analysis,” *Journal of Food Science and Technology*, vol. 49, no. 2, pp. 234–239, Feb. 2011, doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0278-3>.
- [95] R. E. Levin, “The Application of Real-Time PCR to Food and Agricultural Systems. A Review,” *Food Biotechnology*, vol. 18, no. 1, pp. 97–133, Jan. 2004, doi: <https://doi.org/10.1081/fbt-120030386>.

- [96] J. R. Patel, A. A. Bhagwat, G. C. Sanglay, and M. B. Solomon, “Rapid detection of Salmonella from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR,” *Food Microbiology*, vol. 23, no. 1, pp. 39–46, Feb. 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.011>.
- [97] S. H. Liming and A. A. Bhagwat, “Application of a molecular beacon—real-time PCR technology to detect Salmonella species contaminating fruits and vegetables,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 95, no. 2, pp. 177–187, Sep. 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.013>.
- [98] A. Tyagi, V. Saravanan, I. Karunasagar, and I. Karunasagar, “Detection of Vibrio parahaemolyticus in tropical shellfish by SYBR green real-time PCR and evaluation of three enrichment media,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 129, no. 2, pp. 124–130, Feb. 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.006>.
- [99] V. Fusco, G. M. Quero, M. Morea, G. Blaiotta, and A. Visconti, “Rapid and reliable identification of Staphylococcus aureus harbouring the enterotoxin gene cluster (egc) and quantitative detection in raw milk by real time PCR,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 144, no. 3, pp. 528–537, Jan. 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.016>.
- [100] P. M. Fratamico *et al.*, “Detection by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays and Isolation of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 in Ground Beef,” *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 8, no. 5, pp. 601–607, May 2011, doi: <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0773>.
- [101] H.-J. Kim, H.-J. Lee, K.-H. Lee, and J.-C. Cho, “Simultaneous detection of Pathogenic Vibrio species using multiplex real-time PCR,” *Food Control*, vol. 23, no. 2, pp. 491–498, Feb. 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.019>.
- [102] Q. Hu *et al.*, “A Modified Molecular Beacons–Based Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of Eight Foodborne Pathogens in a Single Reaction and Its Application,” *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 11, no. 3, pp. 207–214, Mar. 2014, doi: <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1607>.
- [103] H. Fukushima, Y. Tsunomori, and R. Seki, “Duplex Real-Time SYBR Green PCR Assays for Detection of 17 Species of Food- or Waterborne Pathogens in Stools,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 11, pp. 5134–5146, Nov. 2003, doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.41.11.5134-5146.2003>.

- [104] M. Madani, S. A. Subbotin, and M. Moens, “Quantitative detection of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using Real-Time PCR with SYBR green I dye,” *Molecular and Cellular Probes*, vol. 19, no. 2, pp. 81–86, Apr. 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.09.006>.
- [105] M. M. Klerks, C. Zijlstra, and A. H. C. van Bruggen, “Comparison of real-time PCR methods for detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7, and introduction of a general internal amplification control,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 59, no. 3, pp. 337–349, Dec. 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.07.011>.
- [106] M. Fricker, Messelhäuser U., U. Busch, S. Scherer, and M. Ehling-Schulz, “Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 6, pp. 1892–1898, Jan. 2007, doi: <https://doi.org/10.1128/aem.02219-06>.
- [107] J. J. Maurer, “Rapid detection and limitations of molecular techniques,” *Annual review of food science and technology*, vol. 2, pp. 259–79, 2011, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100730>.
- [108] S. H. Park *et al.*, “Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products,” *Food Microbiology*, vol. 38, pp. 250–262, Apr. 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.002>.
- [109] B. Kimura, S. Kawasaki, T. Fujii, J. Kusunoki, T. Itoh, and S. J. A. Flood, “Evaluation of TaqMan PCR Assay for Detecting *Salmonella* in Raw Meat and Shrimp,” *Journal of Food Protection*, vol. 62, no. 4, pp. 329–335, Apr. 1999, doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-62.4.329>.
- [110] J. Wan, K. King, H. Craven, C. McAuley, S. E. Tan, and M. J. Coventry, “Probeliatm PCR system for rapid detection of *Salmonella* in milk powder and ricotta cheese,” *Letters in Applied Microbiology*, vol. 30, no. 4, pp. 267–271, Apr. 2000, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00723.x>.
- [111] H. Margot *et al.*, “Inclusivity, exclusivity and limit of detection of commercially available real-time PCR assays for the detection of *Salmonella*,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 165, no. 3, pp. 221–226, Aug. 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.012>.

- [112] U. Traunšek, N. Toplak, B. Jeršek, A. Lapanje, T. Majstorović, and M. Kovač, “Novel cost-efficient real-time PCR assays for detection and quantitation of *Listeria monocytogenes*,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 85, no. 1, pp. 40–46, Apr. 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.018>.
- [113] J. Wan, K. King, S. Forsyth, and M. J. Coventry, “Detection of *Listeria monocytogenes* in Salmon Using the Probelia Polymerase Chain Reaction System,” *Journal of Food Protection*, vol. 66, no. 3, pp. 436–440, Mar. 2003, doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.3.436>.
- [114] W. Vencia *et al.*, “Validation according to ISO 16140:2003 of a commercial real-time PCR-based method for detecting *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* in foods,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 177, pp. 78–80, May 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.009>.
- [115] J. Compton, “Nucleic acid sequence-based amplification,” *Nature*, vol. 350, no. 6313, pp. 91–92, Mar. 1991, doi: <https://doi.org/10.1038/350091a0>.
- [116] G. Leone, H. van Schijndel, B. van Gemen, F. R. Kramer, and C. D. Schoen, “Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA.,” *Nucleic Acids Research*, vol. 26, no. 9, pp. 2150–2155, May 1998, Accessed: Mar. 30, 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC147533/>
- [117] J. Ogrady, M. Ruttledge, S. Sedanobalbas, T. Smith, T. Barry, and M. Maher, “Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR,” *Food Microbiology*, vol. 26, no. 1, pp. 4–7, Feb. 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.08.009>.
- [118] S. A. Simpkins, A. B. Chan, J. Hays, B. Pöpping, and N. Cook, “An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enterica*,” *Letters in Applied Microbiology*, vol. 30, no. 1, pp. 75–79, Jan. 2000, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00670.x>.
- [119] H. P. Dwivedi and L.-A. Jaykus, “Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions,” *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 37, no. 1, pp. 40–63, Oct. 2010, doi: <https://doi.org/10.3109/1040841x.2010.506430>.
- [120] K. S. Gracias and J. L. Mckillip, “NUCLEIC ACID SEQUENCE-BASED AMPLIFICATION (NASBA) IN MOLECULAR BACTERIOLOGY: A PROCEDURAL GUIDE,” *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, vol. 15, no. 3, pp. 295–309, Sep. 2007, doi:

<https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2007.00099.x>.

- [121] A. Nadal, A. Coll, N. Cook, and M. Pla, “A molecular beacon-based real time NASBA assay for detection of *Listeria monocytogenes* in food products: Role of target mRNA secondary structure on NASBA design,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 68, no. 3, pp. 623–632, Mar. 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.11.011>.
- [122] T. Notomi, “Loop-mediated isothermal amplification of DNA,” *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 12, pp. 63e63, Jun. 2000, doi: <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
- [123] M. Soroka, B. Wasowicz, and A. Rymaszewska, “Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR?,” *Cells*, vol. 10, no. 8, p. 1931, Jul. 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/cells10081931>.
- [124] M. Parida, S. Sannarangaiah, P. K. Dash, P. V. L. Rao, and K. Morita, “Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases,” *Reviews in Medical Virology*, vol. 18, no. 6, pp. 407–421, Nov. 2008, doi: <https://doi.org/10.1002/rmv.593>.
- [125] K. Nagamine, T. Hase, and T. Notomi, “Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers,” *Molecular and Cellular Probes*, vol. 16, no. 3, pp. 223–229, Jun. 2002, doi: <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>.
- [126] L. Wang, L. Shi, M. J. Alam, Y. Geng, and L. Li, “Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method,” *Food Research International*, vol. 41, no. 1, pp. 69–74, Jan. 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.09.005>.
- [127] F. Maruyama, T. Kenzaka, N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu, “Detection of Bacteria Carrying the *stx2* Gene by In Situ Loop-Mediated Isothermal Amplification,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 8, pp. 5023–5028, Aug. 2003, doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5023-5028.2003>.
- [128] W. Yamazaki, M. Ishibashi, R. Kawahara, and K. Inoue, “Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*,” *BMC Microbiology*, vol. 8, no. 1, p. 163, 2008, doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-163>.
- [129] Z. Xu *et al.*, “Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays on rapid detection of various types of staphylococci strains,”

- Food Research International*, vol. 47, no. 2, pp. 166–173, Jul. 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.042>.
- [130] Y. Mori and T. Notomi, “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases,” *Journal of Infection and Chemotherapy*, vol. 15, no. 2, pp. 62–69, 2009, doi: <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>.
- [131] K. Ohtsuka, K. Yanagawa, K. Takatori, and Y. Hara-Kudo, “Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 11, pp. 6730–6735, Nov. 2005, doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6730-6735.2005>.
- [132] T. Song, C. Toma, N. Nakasone, and M. Iwanaga, “Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method,” *FEMS Microbiology Letters*, vol. 243, no. 1, pp. 259–263, Feb. 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.014>.
- [133] Y. Hara-Kudo, N. Konishi, K. Ohtsuka, R. Hiramatsu, and H. Tanaka, “Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: A collaborative study,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 122, no. 1–2, pp. 156–161, Feb. 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.078>.
- [134] W. Yamazaki *et al.*, “Comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay and Conventional Culture Methods for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Naturally Contaminated Chicken Meat Samples,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 6, pp. 1597–1603, Jan. 2009, doi: <https://doi.org/10.1128/aem.02004-08>.
- [135] Y. Mori, M. Kitao, N. Tomita, and T. Notomi, “Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA,” *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 59, no. 2, pp. 145–157, May 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.12.005>.
- [136] I. Paik *et al.*, “Multi-modal engineering of *Bst* DNA polymerase for thermostability in ultra-fast LAMP reactions,” Apr. 2021, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.04.15.439918>.
- [137] L. Yu *et al.*, “Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic

- Platform,” *Clinical Chemistry*, vol. 66, no. 7, pp. 975–977, May 2020, doi: <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa102>.
- [138] J. Mahony, S. Chong, D. Bulir, A. Ruyter, K. Mwawasi, and D. Waltho, “Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40min with single genome copy sensitivity,” *Journal of Clinical Virology*, vol. 58, no. 1, pp. 127–131, Sep. 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.06.006>.
- [139] Y. Ye *et al.*, “Application of in situ loop-mediated isothermal amplification method for detection of Salmonella in foods,” *Food Control*, vol. 22, no. 3, pp. 438–444, Mar. 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.023>.
- [140] C. S. Ball, Y. K. Light, C.-Y. Koh, S. S. Wheeler, L. L. Coffey, and R. J. Meagher, “Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters in Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Enabling Bright, Single-Step, Closed-Tube, and Multiplexed Detection of RNA Viruses,” *Analytical Chemistry*, vol. 88, no. 7, pp. 3562–3568, Mar. 2016, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04054>.
- [141] D. M. Ghaith and R. Abu Ghazaleh, “Carboxamide and N-alkylcarboxamide additives can greatly reduce non specific amplification in Loop-Mediated Isothermal Amplification for Foot-and-Mouth disease Virus (FMDV) using Bst 3.0 polymerase,” *Journal of Virological Methods*, vol. 298, p. 114284, Dec. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114284>.
- [142] X. Gao, B. Sun, and Y. Guan, “Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP),” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 411, no. 6, pp. 1211–1218, Jan. 2019, doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1552-2>.
- [143] Y. Zhang, G. Ren, J. Buss, A. J. Barry, G. C. Patton, and N. A. Tanner, “Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride,” *BioTechniques*, vol. 69, no. 3, pp. 178–185, Sep. 2020, doi: <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0078>.
- [144] D.-G. Wang, J. D. Brewster, M. Paul, and P. M. Tomasula, “Two Methods for Increased Specificity and Sensitivity in Loop-Mediated Isothermal Amplification,” *Molecules*, vol. 20, no. 4, pp. 6048–6059, Apr. 2015, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules20046048>.
- [145] Y. Zhao, F. Chen, J. Qin, J. Wei, W. Wu, and Y. Zhao, “Engineered Janus probes

- modulate nucleic acid amplification to expand the dynamic range for direct detection of viral genomes in one microliter crude serum samples,” *Chemical Science*, vol. 9, no. 2, pp. 392–397, Jan. 2018, doi: <https://doi.org/10.1039/C7SC03994H>.
- [146] X. Ye, X. Fang, X. Li, and J. Kong, “Gold nanoparticle-mediated nucleic acid isothermal amplification with enhanced specificity,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 1043, pp. 150–157, Dec. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.016>.
- [147] M. S. Reid, R. E. Paliwoda, H. Zhang, and X. C. Le, “Reduction of Background Generated from Template-Template Hybridizations in the Exponential Amplification Reaction,” *Analytical Chemistry*, vol. 90, no. 18, pp. 11033–11039, Aug. 2018, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02788>.
- [148] Q. Lin *et al.*, “Graphene Oxide-Based Suppression of Nonspecificity in Loop-Mediated Isothermal Amplification Enabling the Sensitive Detection of Cyclooxygenase-2 mRNA in Colorectal Cancer,” *Analytical Chemistry*, vol. 91, no. 24, pp. 15694–15702, Nov. 2019, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03861>.
- [149] J. Kim, L. J. Cote, and J. Huang, “Two Dimensional Soft Material: New Faces of Graphene Oxide,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 45, no. 8, pp. 1356–1364, Jun. 2012, doi: <https://doi.org/10.1021/ar300047s>.
- [150] J. S. Park, N.-I. Goo, and D.-E. Kim, “Mechanism of DNA Adsorption and Desorption on Graphene Oxide,” *Langmuir*, vol. 30, no. 42, pp. 12587–12595, Oct. 2014, doi: <https://doi.org/10.1021/la503401d>.
- [151] N. Ye, Z. Wang, S. Wang, H. Fang, and D. Wang, “Aqueous aggregation and stability of graphene nanoplatelets, graphene oxide, and reduced graphene oxide in simulated natural environmental conditions: complex roles of surface and solution chemistry,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, no. 11, pp. 10956–10965, Feb. 2018, doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1326-6>.
- [152] T. Alava *et al.*, “Control of the Graphene–Protein Interface Is Required To Preserve Adsorbed Protein Function,” *Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 5, pp. 2754–2759, Feb. 2013, doi: <https://doi.org/10.1021/ac303268z>.
- [153] H. Dong *et al.*, “Highly Sensitive Multiple microRNA Detection Based on Fluorescence Quenching of Graphene Oxide and Isothermal Strand-Displacement Polymerase Reaction,” *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 10, pp. 4587–4593, Apr. 2012, doi: <https://doi.org/10.1021/ac300721u>.

- [154] T. Wang, S. Kim, and J. H. An, “A novel CMOS image sensor system for quantitative loop-mediated isothermal amplification assays to detect food-borne pathogens,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 133, pp. 1–7, Feb. 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.12.002>.
- [155] Y. Li, P. Fan, S. Zhou, and L. Zhang, “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens,” *Microbial Pathogenesis*, vol. 107, pp. 54–61, Jun. 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.016>.
- [156] J. H. Seo *et al.*, “Development of a high-throughput centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for multiplex foodborne pathogenic bacteria detection,” *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 246, pp. 146–153, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.051>.
- [157] F. S. Dawood, S. Jain, L. Finelli, M. W. Shaw, and S. Lindstrom, “Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans,” *New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 25, pp. 2605–2615, Jun. 2009, doi: <https://doi.org/10.1056/nejmoa0903810>.
- [158] A. Bosch *et al.*, “Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 285, pp. 110–128, Nov. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.001>.
- [159] WHO, *Foodborne disease outbreaks : guidelines for investigation and control*. World Health Organization, 2008. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43771>
- [160] E. Scallan *et al.*, “Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens,” *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, no. 1, pp. 7–15, Jan. 2011, doi: <https://doi.org/10.3201/eid1701.p11101>.
- [161] Glòria Sánchez, *Hepatitis A Virus in Food*. Springer, 2013.
- [162] S. Neethirajan, S. R. Ahmed, R. Chand, J. Buoziš, and É. Nagy, “Recent Advances in Biosensor Development for Foodborne Virus Detection,” *Nanotheranostics*, vol. 1, no. 3, pp. 272–295, 2017, doi: <https://doi.org/10.7150/ntno.20301>.
- [163] S. Fukuda, S. Takao, M. Kuwayama, Y. Shimazu, and K. Miyazaki, “Rapid Detection of Norovirus from Fecal Specimens by Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 4, pp. 1376–1381, Apr. 2006, doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.44.4.1376-1381.2006>.

- [164] S. H. Sicherer and H. A. Sampson, “Food allergy,” *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 125, no. 2, pp. S116–S125, Feb. 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028>.
- [165] R. C. Alves, M. F. Barroso, M. B. González-García, M. B. P. P. Oliveira, and C. Delerue-Matos, “New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 56, no. 14, pp. 2304–2319, Mar. 2015, doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.831026>.
- [166] S.-C. Sheu, P.-C. Tsou, Y.-Y. Lien, and M.-S. Lee, “Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the rapid detection of allergic peanut in processed food,” *Food Chemistry*, vol. 257, pp. 67–74, Aug. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.124>.
- [167] H. Yuan *et al.*, “Picoinjection-Enabled Multitarget Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Foodborne Pathogens,” *Analytical Chemistry*, vol. 90, no. 22, pp. 13173–13177, Oct. 2018, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03673>.
- [168] Y. Mori, H. Kanda, and T. Notomi, “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development,” *Journal of Infection and Chemotherapy*, vol. 19, no. 3, pp. 404–411, 2013, doi: <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0590-0>.
- [169] O. Mayboroda, I. Katakis, and C. K. O’Sullivan, “Multiplexed isothermal nucleic acid amplification,” *Analytical Biochemistry*, vol. 545, pp. 20–30, Mar. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.005>.
- [170] N. A. Tanner, Y. Zhang, and T. C. Evans, “Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification,” *BioTechniques*, vol. 53, no. 2, pp. 81–89, Aug. 2012, doi: <https://doi.org/10.2144/0000113902>.
- [171] D.-C. Nyan and K. L. Swinson, “A novel multiplex isothermal amplification method for rapid detection and identification of viruses,” *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, Dec. 2015, doi: <https://doi.org/10.1038/srep17925>.
- [172] R. Kubota and D. M. Jenkins, “Real-Time Duplex Applications of Loop-Mediated AMPLification (LAMP) by Assimilating Probes,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 3, pp. 4786–4799, Mar. 2015, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms16034786>.
- [173] H. Liu, X. Du, Y.-X. Zang, P. Li, and S. Wang, “SERS-Based Lateral Flow Strip Biosensor for Simultaneous Detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*

- enterica Serotype Enteritidis,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 65, no. 47, pp. 10290–10299, Nov. 2017, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03957>.
- [174] M. Zhang, P. Wu, J. Wu, J. Ping, and J. Wu, “Advanced DNA-based methods for the detection of peanut allergens in processed food,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 114, pp. 278–292, May 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.021>.
- [175] Y. Mori, K. Nagamine, N. Tomita, and T. Notomi, “Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 289, no. 1, pp. 150–154, Nov. 2001, doi: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>.
- [176] F. Zhang, L. Wang, R. Wang, Y. Ying, and J. Wu, “Simple Screening Strategy with Only Water Bath Needed for the Identification of Insect-Resistant Genetically Modified Rice,” *Analytical Chemistry*, vol. 87, no. 3, pp. 1523–1526, Jan. 2015, doi: <https://doi.org/10.1021/ac504384p>.
- [177] G. Chen *et al.*, “Recombinase assisted loop-mediated isothermal DNA amplification,” *Analyst*, vol. 145, no. 2, pp. 440–444, Jan. 2020, doi: <https://doi.org/10.1039/C9AN01701A>.
- [178] H. Wu *et al.*, “Rapid on-site detection of genetically modified soybean products by real-time loop-mediated isothermal amplification coupled with a designed portable amplifier,” *Food Chemistry*, vol. 323, p. 126819, Apr. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126819>.
- [179] M. Zhang *et al.*, “Visual detection for nucleic acid-based techniques as potential on-site detection methods. A review,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 1099, pp. 1–15, Feb. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.11.056>.
- [180] P. S. Girish *et al.*, “Rapid detection of pork using alkaline lysis- Loop Mediated Isothermal Amplification (AL-LAMP) technique,” *Food Control*, vol. 110, p. 107015, Apr. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107015>.
- [181] J. Li *et al.*, “A novel visual loop-mediated isothermal amplification assay targeting gene62181533 for the detection of Salmonella spp. in foods,” *Food Control*, vol. 60, pp. 230–236, Feb. 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.036>.
- [182] J. Xiong, B. Huang, J.-S. Xu, and W.-S. Huang, “A Closed-Tube Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Visual Detection of Staphylococcus

- aureus,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 191, no. 1, pp. 201–211, May 2020, doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03278-x>.
- [183] M. Goto, E. Honda, A. Ogura, A. Nomoto, and K.-I. Hanaki, “Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue,” *BioTechniques*, vol. 46, no. 3, pp. 167–172, Mar. 2009, doi: <https://doi.org/10.2144/000113072>.
- [184] D. R. Call, F. J. Brockman, and D. P. Chandler, “Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 67, no. 1–2, pp. 71–80, Jul. 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00437-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00437-8).
- [185] M. Severgnini, P. Cremonesi, C. Consolandi, G. De Bellis, and B. Castiglioni, “Advances in DNA Microarray Technology for the Detection of Foodborne Pathogens,” *Food and Bioprocess Technology*, vol. 4, no. 6, pp. 936–953, Oct. 2010, doi: <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0430-5>.
- [186] A. Lauri and P. O. Mariani, “Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety,” *Genes & Nutrition*, vol. 4, no. 1, pp. 1–12, Mar. 2009, doi: <https://doi.org/10.1007/s12263-008-0106-1>.
- [187] Y. Li *et al.*, “Development of a Serotype-Specific DNA Microarray for Identification of Some *Shigella* and Pathogenic *Escherichia coli* Strains,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 12, pp. 4376–4383, Oct. 2006, doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.01389-06>.
- [188] X.-W. Wang *et al.*, “Development and application of an oligonucleotide microarray for the detection of food-borne bacterial pathogens,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 76, no. 1, pp. 225–233, Aug. 2007, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0993-x>.
- [189] A. Rasooly and K. E. Herold, “Food Microbial Pathogen Detection and Analysis Using DNA Microarray Technologies,” *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 5, no. 4, pp. 531–550, Aug. 2008, doi: <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0119>.
- [190] E. A. Mothershed and A. M. Whitney, “Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 363, no. 1–2, pp. 206–220, Jan. 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.05.050>.
- [191] A. Singh, S. Poshtiban, and S. Evoy, “Recent Advances in Bacteriophage Based Biosensors for Food-Borne Pathogen Detection,” *Sensors*, vol. 13, no. 2, pp. 1763–

- 1786, Jan. 2013, doi: <https://doi.org/10.3390/s130201763>.
- [192] R. Zhang, H.-Q. Gong, X. Zeng, C. Lou, and C. Sze, “A microfluidic liquid phase nucleic acid purification chip to selectively isolate DNA or RNA from low copy/single bacterial cells in minute sample volume followed by direct on-chip quantitative PCR assay,” *Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 3, pp. 1484–1491, Feb. 2013, doi: <https://doi.org/10.1021/ac3026509>.
- [193] J. Waswa, J. Irudayaraj, and C. DebRoy, “Direct detection of E. Coli O157:H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor,” *LWT - Food Science and Technology*, vol. 40, no. 2, pp. 187–192, Mar. 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.11.001>.
- [194] Y. Lan, S. Wang, Y. Yin, W. C. Hoffmann, and X. Zheng, “Using a Surface Plasmon Resonance Biosensor for Rapid Detection of Salmonella Typhimurium in Chicken Carcass,” *Journal of Bionic Engineering*, vol. 5, no. 3, pp. 239–246, Sep. 2008, doi: [https://doi.org/10.1016/s1672-6529\(08\)60030-x](https://doi.org/10.1016/s1672-6529(08)60030-x).
- [195] P. Leonard, S. Hearty, J. Quinn, and R. O’Kennedy, “A generic approach for the detection of whole *Listeria monocytogenes* cells in contaminated samples using surface plasmon resonance,” *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 19, no. 10, pp. 1331–1335, May 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.11.009>.
- [196] Y. Wang, Z. Ye, C. Si, and Y. Ying, “Subtractive Inhibition Assay for the Detection of E. coli O157:H7 Using Surface Plasmon Resonance,” *Sensors*, vol. 11, no. 3, pp. 2728–2739, Mar. 2011, doi: <https://doi.org/10.3390/s110302728>.
- [197] P. Leonard *et al.*, “Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 32, no. 1, pp. 3–13, Jan. 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(02\)00232-6](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(02)00232-6).
- [198] M. N. Velasco-Garcia and T. Mottram, “Biosensor Technology addressing Agricultural Problems,” *Biosystems Engineering*, vol. 84, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/s1537-5110\(02\)00236-2](https://doi.org/10.1016/s1537-5110(02)00236-2).
- [199] S. Pal, W. Ying, E. C. Alocilja, and F. P. Downes, “Sensitivity and specificity performance of a direct-charge transfer biosensor for detecting *Bacillus cereus* in selected food matrices,” *Biosystems Engineering*, vol. 99, no. 4, pp. 461–468, Apr. 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2007.11.015>.
- [200] B. Esteban-Fernández de Ávila, M. Pedrero, S. Campuzano, V. Escamilla-Gómez, and J. M. Pingarrón, “Sensitive and rapid amperometric magnetoimmunosensor for the determination of *Staphylococcus aureus*,” *Analytical and Bioanalytical*

- Chemistry*, vol. 403, no. 4, pp. 917–925, May 2012, doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5738-8>.
- [201] X. Muñoz-Berbel, N. Vigués, A. T. A. Jenkins, J. Mas, and F. J. Muñoz, “Impedimetric approach for quantifying low bacteria concentrations based on the changes produced in the electrode–solution interface during the pre-attachment stage,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, no. 10, pp. 1540–1546, May 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.01.007>.
- [202] C. Ercole, M. Del Gallo, L. Mosiello, S. Baccella, and A. Lepidi, “Escherichia coli detection in vegetable food by a potentiometric biosensor,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 91, no. 1, pp. 163–168, Jun. 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00083-2).
- [203] S.-H. Si, X. Li, Y.-S. Fung, and D.-R. Zhu, “Rapid detection of Salmonella enteritidis by piezoelectric immunosensor,” *Microchemical Journal*, vol. 68, no. 1, pp. 21–27, Jan. 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/s0026-265x\(00\)00167-3](https://doi.org/10.1016/s0026-265x(00)00167-3).
- [204] M. Pohanka, P. Skládal, and O. Pavliš, “Label-Free Piezoelectric Immunosensor for Rapid Assay of *Escherichia coli*,” *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, vol. 29, no. 1, pp. 70–79, Dec. 2007, doi: <https://doi.org/10.1080/15321810701735120>.
- [205] E. Berkenpas, P. Millard, and M. Pereira da Cunha, “Detection of Escherichia coli O157:H7 with langasite pure shear horizontal surface acoustic wave sensors,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 12, pp. 2255–2262, Jun. 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.11.005>.
- [206] R. D. Vaughan, C. K. O’Sullivan, and G. G. Guilbault, “Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 29, no. 10, pp. 635–638, Dec. 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(01\)00449-5](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(01)00449-5).
- [207] F. Liu, Y. Li, X.-L. Su, M. F. Slavik, Y. Ying, and J. Wang, “QCM immunosensor with nanoparticle amplification for detection of *Escherichia coli* O157:H7,” *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, vol. 1, no. 4, pp. 161–168, Sep. 2007, doi: <https://doi.org/10.1007/s11694-007-9021-1>.
- [208] F. Yeni, S. Acar, Ö. G. Polat, Y. Soyer, and H. Alpas, “Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce,” *Food Control*, vol. 40, pp. 359–367, Jun. 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.020>.

- [209] B. K. Kumar *et al.*, “Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 145, no. 1, pp. 244–249, Jan. 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.030>.
- [210] F. J. Bolton, E. Fritz, S. Poynton, and T. Jensen, “Rapid enzyme-linked immunoassay for detection of *Salmonella* in food and feed products: performance testing program,” *Journal of AOAC International*, vol. 83, no. 2, pp. 299–303, 2000, Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10772167/>
- [211] A. Aschfalk and W. Müller, “*Clostridium perfringens* toxin types from wild-caught Atlantic cod (*Gadus morhua*L.), determined by PCR and ELISA,” *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 48, no. 4, pp. 365–368, Apr. 2002, doi: <https://doi.org/10.1139/w02-015>.
- [212] B. Glynn, S. Lahiff, M. Wernecke, T. Barry, T. J. Smith, and M. Maher, “Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety,” *International Journal of Dairy Technology*, vol. 59, no. 2, pp. 126–139, May 2006, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00253.x>.
- [213] D. Y. C. Fung, “Rapid Methods and Automation in Microbiology,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 1, no. 1, pp. 3–22, Apr. 2002, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00003.x>.
- [214] M. Vieira-Pinto, M. Oliveira, F. Bernardo, and C. Martins, “Rapid detection of *Salmonella* sp. in pork samples using fluorescent in situ hybridization: a comparison with VIDAS®-SLM system and ISO 6579 cultural method,” *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol. 59, no. 6, pp. 1388–1393, Dec. 2007, doi: <https://doi.org/10.1590/s0102-09352007000600006>.
- [215] M. Gómez-Govea *et al.*, “Analysis of microbial contamination levels of fruits and vegetables at retail in Monterrey, Mexico,” *Journal of Food, Agriculture and Environment*, vol. 10, no. 1, pp. 152–156, Jan. 2012, Accessed: Mar. 30, 2023. [Online]. Available: <https://cris.bgu.ac.il/en/publications/analysis-of-microbial-contamination-levels-of-fruits-and-vegetabl>
- [216] R. N. Carvalho, A. N. de Oliveira, A. J. de Mesquita, C. S. Minafra e Rezende, A. Q. de Mesquita, and R. A. M. Romero, “PCR and ELISA (VIDAS ECO O157®) *Escherichia coli* O157:H7 identification in Minas Frescal cheese commercialized in Goiânia, GO,” *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 45, no. 1, pp. 7–10, May 2014, Accessed: Mar. 30, 2023. [Online]. Available:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4059328/>
- [217] P. Cremonesi *et al.*, “Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese,” *Letters in Applied Microbiology*, vol. 45, no. 6, pp. 586–591, Dec. 2007, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02231.x>.
- [218] N. Wen *et al.*, “Development of Droplet Microfluidics Enabling High-Throughput Single-Cell Analysis,” *Molecules*, vol. 21, no. 7, p. 881, Jul. 2016, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules21070881>.
- [219] X. Qin *et al.*, “Microfluidic paper-based chips in rapid detection: Current status, challenges, and perspectives,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 143, p. 116371, Oct. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116371>.
- [220] C. Wang, F. Madiyar, C. Yu, and J. Li, “Detection of extremely low concentration waterborne pathogen using a multiplexing self-referencing SERS microfluidic biosensor,” *Journal of Biological Engineering*, vol. 11, no. 1, Feb. 2017, doi: <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0051-x>.
- [221] L. Wan *et al.*, “A digital microfluidic system for loop-mediated isothermal amplification and sequence specific pathogen detection,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, Nov. 2017, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14698-x>.
- [222] J. C. Jokerst, J. A. Adkins, B. Bisha, M. M. Mentele, L. D. Goodridge, and C. S. Henry, “Development of a Paper-Based Analytical Device for Colorimetric Detection of Select Foodborne Pathogens,” *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 6, pp. 2900–2907, Mar. 2012, doi: <https://doi.org/10.1021/ac203466y>.
- [223] T. M. Squires and S. R. Quake, “Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale,” *Reviews of Modern Physics*, vol. 77, no. 3, pp. 977–1026, Oct. 2005, doi: <https://doi.org/10.1103/revmodphys.77.977>.
- [224] X. Weng and S. Neethirajan, “Paper-based microfluidic aptasensor for food safety,” *Journal of Food Safety*, vol. 38, no. 1, p. e12412, Nov. 2017, doi: <https://doi.org/10.1111/jfs.12412>.
- [225] J. Xu *et al.*, “Controllable alignment of elongated microorganisms in 3D microspace using electrofluidic devices manufactured by hybrid femtosecond laser microfabrication,” *Microsystems & Nanoengineering*, vol. 3, no. 1, Feb. 2017, doi: <https://doi.org/10.1038/micronano.2016.78>.
- [226] Z. Q. Huang, X. Q. He, and K. M. Liew, “A sensitive interval of imperfect interface parameters based on the analysis of general solution for anisotropic matrix containing an elliptic inhomogeneity,” *International Journal of Solids and*

- Structures*, vol. 73–74, pp. 67–77, Nov. 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijisolstr.2015.07.009>.
- [227] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer, “Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 1, no. 1–6, pp. 244–248, Jan. 1990, doi: [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(90\)80209-i](https://doi.org/10.1016/0925-4005(90)80209-i).
- [228] A. Manz *et al.*, “Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems,” *Journal of Chromatography A*, vol. 593, no. 1–2, pp. 253–258, Feb. 1992, doi: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)80293-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)80293-4).
- [229] A. T. Woolley and R. A. Mathies, “Ultra-High-Speed DNA Sequencing Using Capillary Electrophoresis Chips,” *Analytical Chemistry*, vol. 67, no. 20, pp. 3676–3680, Oct. 1995, doi: <https://doi.org/10.1021/ac00116a010>.
- [230] A. T. Woolley, D. Hadley, P. Landre, A. J. deMello, R. A. Mathies, and M. A. Northrup, “Functional Integration of PCR Amplification and Capillary Electrophoresis in a Microfabricated DNA Analysis Device,” *Analytical Chemistry*, vol. 68, no. 23, pp. 4081–4086, Dec. 1996, doi: <https://doi.org/10.1021/ac960718q>.
- [231] S. N. Brahmasandra, B. N. Johnson, J. R. Webster, and D. T. Burke, “On-chip DNA band detection in microfabricated separation systems,” in *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 1998.
- [232] J. R. Anderson *et al.*, “Fabrication of Topologically Complex Three-Dimensional Microfluidic Systems in PDMS by Rapid Prototyping,” *Analytical Chemistry*, vol. 72, no. 14, pp. 3158–3164, Jun. 2000, doi: <https://doi.org/10.1021/ac9912294>.
- [233] D. Zhao, W. Liu, S. Ke, and Q. Liu, “Large lateral shift in complex dielectric multilayers with nearly parity–time symmetry,” *Optical and Quantum Electronics*, vol. 50, no. 8, Aug. 2018, doi: <https://doi.org/10.1007/s11082-018-1593-y>.
- [234] A. Kitano, A. Iiduka, T. Yamamoto, Y. Ukita, E. Tamiya, and Y. Takamura, “Highly Sensitive Elemental Analysis for Cd and Pb by Liquid Electrode Plasma Atomic Emission Spectrometry with Quartz Glass Chip and Sample Flow,” *Analytical Chemistry*, vol. 83, no. 24, pp. 9424–9430, Nov. 2011, doi: <https://doi.org/10.1021/ac2020646>.
- [235] T. Li *et al.*, “Selective capture and rapid identification of E. coli O157:H7 by carbon nanotube multilayer biosensors and microfluidic chip-based LAMP,” *RSC*

- Advances*, vol. 7, no. 48, pp. 30446–30452, Jun. 2017, doi: <https://doi.org/10.1039/C7RA04583B>.
- [236] H. Gao, C. Yan, W. Wu, and J. Li, “Application of Microfluidic Chip Technology in Food Safety Sensing,” *Sensors*, vol. 20, no. 6, p. 1792, Mar. 2020, doi: <https://doi.org/10.3390/s20061792>.
- [237] Y. Zheng, S. Mao, S. Liu, D. S.-H. Wong, and Y.-W. Wang, “Normalized Relative RBC-Based Minimum Risk Bayesian Decision Approach for Fault Diagnosis of Industrial Process,” *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, vol. 63, no. 12, pp. 7723–7732, Dec. 2016, doi: <https://doi.org/10.1109/tie.2016.2591902>.
- [238] I. Ganesh *et al.*, “An integrated microfluidic PCR system with immunomagnetic nanoparticles for the detection of bacterial pathogens,” *Biomedical Microdevices*, vol. 18, no. 6, Dec. 2016, doi: <https://doi.org/10.1007/s10544-016-0139-y>.
- [239] S. J. Oh *et al.*, “Fully automated and colorimetric foodborne pathogen detection on an integrated centrifugal microfluidic device,” *Lab on a Chip*, vol. 16, no. 10, pp. 1917–1926, 2016, doi: <https://doi.org/10.1039/c6lc00326e>.
- [240] A. Sayad, F. Ibrahim, S. Mukim Uddin, J. Cho, M. Madou, and K. L. Thong, “A microdevice for rapid, monoplex and colorimetric detection of foodborne pathogens using a centrifugal microfluidic platform,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 100, pp. 96–104, Feb. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.060>.
- [241] X. Li *et al.*, “Rapid Sample Processing for Detection of Food-Borne Pathogens via Cross-Flow Microfiltration,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 79, no. 22, pp. 7048–7054, Nov. 2013, doi: <https://doi.org/10.1128/aem.02587-13>.
- [242] B. Shu, C. Zhang, and D. Xing, “Segmented continuous-flow multiplex polymerase chain reaction microfluidics for high-throughput and rapid foodborne pathogen detection,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 826, pp. 51–60, May 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.017>.
- [243] S. Savas, A. Ersoy, Y. Gulmez, S. Kilic, B. Levent, and Z. Altintas, “Nanoparticle Enhanced Antibody and DNA Biosensors for Sensitive Detection of Salmonella,” *Materials*, vol. 11, no. 9, p. 1541, Aug. 2018, doi: <https://doi.org/10.3390/ma11091541>.
- [244] S. Wu, N. Duan, Z. Shi, C. Fang, and Z. Wang, “Simultaneous Aptasensor for Multiplex Pathogenic Bacteria Detection Based on Multicolor Upconversion Nanoparticles Labels,” *Analytical Chemistry*, vol. 86, no. 6, pp. 3100–3107, Mar.

- 2014, doi: <https://doi.org/10.1021/ac404205c>.
- [245] J. H. Kang *et al.*, “Optimization of Pathogen Capture in Flowing Fluids with Magnetic Nanoparticles,” *Small*, vol. 11, no. 42, pp. 5657–5666, Sep. 2015, doi: <https://doi.org/10.1002/sml.201501820>.
- [246] T. N. T. Dao *et al.*, “Rapid and sensitive detection of Salmonella based on microfluidic enrichment with a label-free nanobiosensing platform,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 262, pp. 588–594, Jun. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.190>.
- [247] Á. Ríos and M. Zougagh, “Modern qualitative analysis by miniaturized and microfluidic systems,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 69, pp. 105–113, Jun. 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.003>.
- [248] K. Kant *et al.*, “Microfluidic devices for sample preparation and rapid detection of foodborne pathogens,” *Biotechnology Advances*, vol. 36, no. 4, pp. 1003–1024, Jul. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.002>.
- [249] S. A. Papatheodorou, T. Tsironi, M. Giannakourou, P. Halvatsiotis, and D. Houhoula, “Application of microfluidic paper-based analytical devices (μPADs) for food microbial detection,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Feb. 2022, doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11822>.
- [250] Y. Xia, J. Si, and Z. Li, “Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 77, pp. 774–789, Mar. 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.032>.
- [251] T. Akyazi, L. Basabe-Desmonts, and F. Benito-Lopez, “Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 1001, pp. 1–17, Feb. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.010>.
- [252] R. Ghosh, S. Gopalakrishnan, R. Savitha, T. Renganathan, and S. Pushpavanam, “Fabrication of laser printed microfluidic paper-based analytical devices (LP-μPADs) for point-of-care applications,” *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, May 2019, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44455-1>.
- [253] H. Liu and R. M. Crooks, “Three-Dimensional Paper Microfluidic Devices Assembled Using the Principles of Origami,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, no. 44, pp. 17564–17566, Nov. 2011, doi: <https://doi.org/10.1021/ja2071779>.

- [254] H. Asano and Y. Shiraishi, “Development of paper-based microfluidic analytical device for iron assay using photomask printed with 3D printer for fabrication of hydrophilic and hydrophobic zones on paper by photolithography,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 883, pp. 55–60, Jul. 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.014>.
- [255] L.-M. Fu and Y.-N. Wang, “Detection methods and applications of microfluidic paper-based analytical devices,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 107, pp. 196–211, Oct. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.018>.
- [256] K. Maejima, S. Tomikawa, K. Suzuki, and D. Citterio, “Inkjet printing: an integrated and green chemical approach to microfluidic paper-based analytical devices,” *RSC Advances*, vol. 3, no. 24, p. 9258, 2013, doi: <https://doi.org/10.1039/c3ra40828k>.
- [257] W. Su, B. S. Cook, Y. Fang, and M. M. Tentzeris, “Fully inkjet-printed microfluidics: a solution to low-cost rapid three-dimensional microfluidics fabrication with numerous electrical and sensing applications,” *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, Oct. 2016, doi: <https://doi.org/10.1038/srep35111>.
- [258] L. Xie, X. Zi, H. Zeng, J. Sun, L. Xu, and S. Chen, “Low-cost fabrication of a paper-based microfluidic using a folded pattern paper,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 1053, pp. 131–138, Apr. 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.12.001>.
- [259] C. L. Cassano and Z. H. Fan, “Laminated paper-based analytical devices (LPAD): fabrication, characterization, and assays,” *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 15, no. 2, pp. 173–181, Jan. 2013, doi: <https://doi.org/10.1007/s10404-013-1140-x>.
- [260] T. S. Park, W. Li, K. E. McCracken, and J.-Y. Yoon, “Smartphone quantifies Salmonella from paper microfluidics,” *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 24, pp. 4832–4840, Nov. 2013, doi: <https://doi.org/10.1039/C3LC50976A>.
- [261] J. Park, J. H. Shin, and J.-K. Park, “Pressed Paper-Based Dipstick for Detection of Foodborne Pathogens with Multistep Reactions,” *Analytical Chemistry*, vol. 88, no. 7, pp. 3781–3788, Mar. 2016, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04743>.
- [262] L. Sun *et al.*, “A novel, simple and low-cost paper-based analytical device for colorimetric detection of Cronobacter spp,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 1036, pp. 80–88, Dec. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.061>.
- [263] B. Bisha *et al.*, “Colorimetric paper-based detection of Escherichia coli, Salmonella spp., and Listeria monocytogenes from large volumes of agricultural water,” *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 88, p. 51414, Jun. 2014, doi: <https://doi.org/10.1002/jvex.10000>.

<https://doi.org/10.3791/51414>.

- [264] J.-Y. Kim and M.-K. Yeo, “A fabricated microfluidic paper-based analytical device (μPAD) for in situ rapid colorimetric detection of microorganisms in environmental water samples,” *Molecular & Cellular Toxicology*, vol. 12, no. 1, pp. 101–109, Mar. 2016, doi: <https://doi.org/10.1007/s13273-016-0013-2>.
- [265] Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, Manish J. Butte, and George M. Whitesides, “Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, no. 8, pp. 1318–1320, Feb. 2007, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.200603817>.
- [266] A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas, H. Sindi, and G. M. Whitesides, “Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis,” *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 10, pp. 3699–3707, May 2008, doi: <https://doi.org/10.1021/ac800112r>.
- [267] E. Carrilho, A. W. Martinez, and G. M. Whitesides, “Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics,” *Analytical Chemistry*, vol. 81, no. 16, pp. 7091–7095, Aug. 2009, doi: <https://doi.org/10.1021/ac901071p>.
- [268] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, “Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics,” *Analytical Chemistry*, vol. 81, no. 14, pp. 5821–5826, Jun. 2009, doi: <https://doi.org/10.1021/ac9007573>.
- [269] V.-T. Nguyen, S. Song, S. Park, and C. Joo, “Recent advances in high-sensitivity detection methods for paper-based lateral-flow assay,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 152, p. 112015, Mar. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112015>.
- [270] M. Sarwar, J. Leichner, G. M. Naja, and C.-Z. Li, “Smart-phone, paper-based fluorescent sensor for ultra-low inorganic phosphate detection in environmental samples,” *Microsystems & Nanoengineering*, vol. 5, no. 1, pp. 1–10, Oct. 2019, doi: <https://doi.org/10.1038/s41378-019-0096-8>.
- [271] E. Noviana, C. P. McCord, K. M. Clark, I. Jang, and C. S. Henry, “Electrochemical paper-based devices: sensing approaches and progress toward practical applications,” *Lab on a Chip*, vol. 20, no. 1, pp. 9–34, 2020, doi: <https://doi.org/10.1039/c9lc00903e>.
- [272] A. T. Singh, D. Lantigua, A. Meka, S. Taing, M. Pandher, and G. Camci-Unal,

- “Paper-Based Sensors: Emerging Themes and Applications,” *Sensors (Basel, Switzerland)*, vol. 18, no. 9, Aug. 2018, doi: <https://doi.org/10.3390/s18092838>.
- [273] T. Ozer, C. McMahon, and C. S. Henry, “Advances in Paper-Based Analytical Devices,” *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 13, no. 1, Jan. 2020, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061318-114845>.
- [274] B. Pang *et al.*, “Development of a self-priming PDMS/paper hybrid microfluidic chip using mixed-dye-loaded loop-mediated isothermal amplification assay for multiplex foodborne pathogens detection,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 1040, pp. 81–89, Dec. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.024>.
- [275] B. A. Lakshmi and S. Kim, “Recent trends in the utilization of LAMP for the diagnosis of viruses, bacteria, and allergens in food,” *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, pp. 291–297, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821406-0.00027-8>.
- [276] A. A. Sayad *et al.*, “A microfluidic lab-on-a-disc integrated loop mediated isothermal amplification for foodborne pathogen detection,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 227, pp. 600–609, May 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.116>.
- [277] S. J. Harper, L. I. Ward, and G. R. G. Clover, “Development of LAMP and Real-Time PCR Methods for the Rapid Detection of *Xylella fastidiosa* for Quarantine and Field Applications,” *Phytopathology*, vol. 100, no. 12, pp. 1282–1288, Dec. 2010, doi: <https://doi.org/10.1094/phyto-06-10-0168>.
- [278] H. Kaneko, T. Kawana, E. Fukushima, and T. Suzutani, “Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances,” *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 70, no. 3, pp. 499–501, Apr. 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.08.008>.
- [279] N. A. Tanner, Y. Zhang, and T. C. Evans, “Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes,” *BioTechniques*, vol. 58, no. 2, Feb. 2015, doi: <https://doi.org/10.2144/000114253>.
- [280] M. Srisawat and W. Panbangred, “Efficient and Specific Detection of *Salmonella* in Food Samples Using astn-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification Method,” *BioMed Research International*, vol. 2015, pp. 1–7, 2015, doi: <https://doi.org/10.1155/2015/356401>.
- [281] B. Swaminathan, T. Barrett, S. Hunter, and R. Tauxe, "PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States,"

- Emerging Infectious Diseases, vol. 7, no. 3, pp. 382-389, May 2001. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.3201/EID0703.010303>. [Accessed: June 29, 2023].
- [282] L. Mogren et al., "The Hurdle Approach—A Holistic Concept for Controlling Food Safety Risks Associated With Pathogenic Bacterial Contamination of Leafy Green Vegetables. A Review," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, p. 1965, Aug. 2018. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01965>. [Accessed: June 29, 2023].
- [283] X. Bai, C. Nakatsu, and A. Bhunia, "Bacterial Biofilms and Their Implications in Pathogenesis and Food Safety," *Foods*, vol. 10, no. 9, p. 2117, Sep. 2021. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.3390/foods10092117>. [Accessed: June 29, 2023].
- [284] E. Ribot and K. Hise, "Future challenges for tracking foodborne diseases," *EMBO reports*, vol. 17, no. 11, pp. 1493-1501, Nov. 2016. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.15252/embr.201643128>. [Accessed: June 29, 2023].
- [285] T. Iwamoto, T. Sonobe, and K. Hayashi, "Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex, M. avium, and M. intracellulare in Sputum Samples," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 6, pp. 2616-2622, June 2003. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.6.2616-2622.2003>. [Accessed: June 29, 2023].
- [286] C. Manjunatha et al., "Rapid detection of Puccinia triticina causing leaf rust of wheat by PCR and loop mediated isothermal amplification," *PLoS ONE*, vol. 13, no. 4, e0196409, April 2018. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0196409>. [Accessed: June 29, 2023].
- [286] Y. Wang et al., "The Novel Multiple Inner Primers-Loop-Mediated Isothermal Amplification (MIP-LAMP) for Rapid Detection and Differentiation of Listeria monocytogenes," *Molecules*, vol. 20, no. 12, pp. 19787-19803, December 2015. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.3390/molecules201219787>. [Accessed: June 29, 2023].
- [287] K. R. Schroeder, D. Stimart, and E. Nordheim, "Response of Nicotiana glauca to Insertion of an Autoregulated Senescence- inhibition Gene," *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 126, no. 5, pp. 523-529, September 2001. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.21273/JASHS.126.5.523>. [Accessed: June 29, 2023].
- [288] S. Harper, L. Ward, and G. Clover, "Development of LAMP and real-time PCR

- methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications," *Phytopathology*, vol. 100, no. 12, pp. 1282-1288, Dec. 2010. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-06-10-0168>. [Accessed: June 29, 2023].
- [289] M. Khan, R. Wang, B. Li, P. Liu, Q. Weng, and Q. Chen, "Comparative Evaluation of the LAMP Assay and PCR-Based Assays for the Rapid Detection of *Alternaria solani*," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, p. 2089, Sep. 2018. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02089>. [Accessed: June 29, 2023].
- [290] S. J. R. da Silva, M. H. S. Paiva, D. R. D. Guedes, L. Krokovsky, F. Melo, M. A. L. da Silva, A. Silva, C. E. J. Ayres, and L. Pena, "Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito Samples from Brazil," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 4494, Mar. 2019. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-40960-5>. [Accessed: June 29, 2023].
- [291] A. Aebischer, K. Wernike, B. Hoffmann, and M. Beer, "Rapid Genome Detection of Schmallenberg Virus and Bovine Viral Diarrhea Virus by Use of Isothermal Amplification Methods and High-Speed Real-Time Reverse Transcriptase PCR," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 52, no. 6, pp. 1883-1892, Jun. 2014. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.00167-14>. [Accessed: June 29, 2023].
- [292] D. Suwancharoen, B. Sittiwicheanwong, and A. Wiratsudakul, "Evaluation of loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for pathogenic *Leptospira* spp. detection with leptospire isolation and real-time PCR," *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 78, no. 8, pp. 1309-1313, Aug. 2016. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1292/jvms.15-0702>. [Accessed: June 29, 2023].
- [293] M. da Silva Zatti, T. D. Arantes, J. Fernandes, M. Bay, E. P. Milan, G. F. Silva Naliato, and R. C. Theodoro, "Loop-mediated Isothermal Amplification and nested PCR of the Internal Transcribed Spacer (ITS) for *Histoplasma capsulatum* detection," *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 13, no. 8, p. e0007692, Aug. 2019. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007692>. [Accessed: June 29, 2023].
- [294] B. Ma, H. Yu, J. Fang, C. Sun, and M. Zhang, "Employing DNA binding dye to improve detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in real-time LAMP," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 16279, Nov. 2019. [Online]. Available:

<https://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-52459-0>. [Accessed: June 29, 2023].

- [295] Q. Wu, Y. Pan, D. Zhou, M. Grisham, S. Gao, Y. Su, J. Guo, L. Xu, and Y. Que, "A Comparative Study of Three Detection Techniques for *Leifsonia xyli* Subsp. *xyli*, the Causal Pathogen of Sugarcane Ratoon Stunting Disease," *BioMed Research International*, vol. 2018, p. 2786458, May 2018. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1155/2018/2786458>. [Accessed: June 29, 2023].
- [296] S. V. Gómez-Gutiérrez and S. B. Goodwin, "Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Plant Pathogens in Wheat (*Triticum aestivum*)," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 4, p. 1937, Mar. 2022. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.3390/ijms23041937>. [Accessed: June 29, 2023].
- [297] G. N. Hartmeyer, S. V. Hoegh, M. Skov, R. Dessau, and M. Kemp, "Selecting PCR for the Diagnosis of Intestinal Parasitosis: Choice of Targets, Evaluation of In-House Assays, and Comparison with Commercial Kits," *Journal of Parasitology Research*, vol. 2017, p. 6205257, Aug. 2017. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1155/2017/6205257>. [Accessed: June 29, 2023].
- [298] F. Meng, Z. Liu, Y. Li, and X. Zhang, "Genes Encoding Potential Molecular Mimicry Proteins as the Specific Targets for Detecting *Bursaphelenchus xylophilus* in PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays," *Frontiers in Plant Science*, vol. 13, p. 890949, May 2022. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.3389/fpls.2022.890949>. [Accessed: June 29, 2023].
- [299] B. Crego-Vicente, P. Fernández-Soto, J. García-Bernalt Diego, B. Febrer-Sendra, and A. Muro, "Development of a Duplex LAMP Assay with Probe-Based Readout for Simultaneous Real-Time Detection of *Schistosoma mansoni* and *Strongyloides* spp. -A Laboratory Approach to Point-Of-Care," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 1, p. 893, Jan. 2023. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.3390/ijms24010893>. [Accessed: June 29, 2023].
- [300] D. Das, M. Masetty, and A. Priye, "Paper-Based Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Platforms: Integrating the Versatility of Paper Microfluidics with Accuracy of Nucleic Acid Amplification Tests," *Chemosensors*, vol. 11, no. 3, p. 163, Feb. 2023. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.3390/chemosensors11030163>. [Accessed: June 29, 2023].
- [301] G. Nolasco, "NEW DEVELOPMENTS IN PATHOGEN DETECTION AND

- IDENTIFICATION," *Acta Horticulturae*, no. 940, pp. 679-686, Dec. 2012. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2012.940.86>. [Accessed: June 29, 2023].
- [302] J. A. Bohórquez, S. Lanka, R. Rosell, M. Pérez-Simó, M. Alberch, F. Rodríguez, L. Ganges, and C. Maddox, "Efficient detection of African Swine Fever Virus using minimal equipment through a LAMP PCR method," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 2023, Jan. 2023. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2023.1114772>. [Accessed: June 29, 2023].
- [303] A. DeLude, R. Wells, S. Boomla, S.-C. Chuang, F. Urena, A. Shipman, N. Rubas, D. Kuehu, B. Bickerton, T. Peterson, S. Dobhal, D. Arizala, D. Klair, F. Ochoa-Corona, M. E. Ali, J. Odani, J. Bingham, D. Jenkins, J. Fletcher, A. Alvarez, and M. Arif, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for specific and rapid detection of *Dickeya fangzhongdai* targeting a unique genomic region," *Scientific Reports*, vol. 12, no. 1, p. 22023, Nov. 2022. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-22023-4>. [Accessed: June 29, 2023].
- [304] J. A. Bohórquez, S. Lanka, R. Rosell, M. Pérez-Simó, M. Alberch, F. Rodríguez, L. Ganges, and C. Maddox, "Efficient detection of African Swine Fever Virus using minimal equipment through a LAMP PCR method," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 2023, Jan. 2023. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2023.1114772>. [Accessed: June 29, 2023].
- [305] A. DeLude, R. Wells, S. Boomla, S.-C. Chuang, F. Urena, A. Shipman, N. Rubas, D. Kuehu, B. Bickerton, T. Peterson, S. Dobhal, D. Arizala, D. Klair, F. Ochoa-Corona, M. E. Ali, J. Odani, J. Bingham, D. Jenkins, J. Fletcher, A. Alvarez, and M. Arif, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for specific and rapid detection of *Dickeya fangzhongdai* targeting a unique genomic region," *Scientific Reports*, vol. 12, no. 1, p. 22023, Nov. 2022. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-22023-4>. [Accessed: June 29, 2023].
- [306] S. Supakitthanakorn, K. Vichitragoontavorn, K. Kunasakdakul, N. Mukjang, C. Phuakjaiphaeo, and O. Ruangwong, "Development of Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Technique for Rapid, Sensitive and Convenient Detection of *Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid* (CChMVd) in *Chrysanthemum*," *Chiang Mai Journal of Science*, vol. 49, no. 5, pp. 1165-1176, Sep. 2022. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.12982/cmjs.2022.079>. [Accessed: June 29, 2023].

- [307] K. Buddhachat, "LAMP assay is an auxiliary tool for rapid and sensitive pathogen diagnosis in veterinary areas," *Veterinary Integrative Sciences*, vol. 20, no. 1, pp. 1-6, Feb. 2020. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.12982/vis.2022.019>. [Accessed: June 29, 2023].