



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΘΕΜΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΙΩΝ  
ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ**

**ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ**

**A.M. : 15078**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ**

**ΑΘΗΝΑ 2021**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΘΕΜΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΙΩΝ  
ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ**

**ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ**

ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ

ΚΟΝΤΕΛΕΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

#### ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Παπαδόπουλος Αναστάσιος του Παναγιώτη , με αριθμό μητρώου 15078 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

Ο/Η Δηλών/ούσα



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το θέμα της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η ανίχνευση των ιών στα τρόφιμα με μοντέρνες μεθόδους. Οι ιοί έχουν γονιδίωμα, DNA ή RNA και επίσης έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται στις συνθήκες συγκεκριμένων βιότοπων, αλλά δεν έχουν την αυτονομία εκείνη που χαρακτηρίζει τους περισσότερους οργανισμούς. Για να αναπαραχθούν, απαιτούν την παρουσία ενός ξενιστή. Το σύστημα ταξινόμησης Baltimore διαχωρίζει τους ιούς ανάλογα με το γονιδίωμα τους σε δίκλωνο ή μονόκλωνο γενετικό υλικό, DNA ή RNA, θετικό ή αρνητικό με το mRNA να καθορίζεται σαν θετικό. Μία από τις βασικές αιτίες τροφολοιμώξεων είναι οι ιοί, όπως οι εντερικοί ιοί, ο νοροϊός, ο ανθρώπινος ροταϊός, ο ιός της ηπατίτιδας Α και ο ιός της ηπατίτιδας Ε. Μεταδίδονται στον άνθρωπο κυρίως μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού και είναι υπεύθυνοι για ένα μεγάλο αριθμό λοιμώξεων και θανάτων ετησίως. Βρίσκονται σε φρέσκα λαχανικά, δίθυρα οστρακοειδή, μαλακά φρούτα, στο νερό, σαλάτες, χοιρινό κρέας κ.λπ. Είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν μέθοδοι ανίχνευσης των ιών που να χαρακτηρίζονται από ταχύτητα, ακρίβεια και υψηλή ευαισθησία. Ένα πολύ σημαντικό βήμα στην ανίχνευση των ιών είναι η προετοιμασία του δείγματος ώστε να απομονωθούν οι ιοί από τη μήτρα του δείγματος. Οι κυριότερες διαδικασίες που χρησιμοποιούνται είναι η έκλυση και συγκέντρωση των ιικών σωματιδίων με πολυαιθενυλογλυκόλη (PEG), η προσρόφηση και έκλυση ιών με τη χρήση φορτισμένων μεμβρανών ή φίλτρων, τα ανοσομαγνητικά σφαιρίδια, η υπερδιήθηση και η υπερφυγοκέντρωση. Οι πιο αξιόπιστες μέθοδοι ανίχνευσης και με την ευρύτερη εφαρμογή είναι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης των ιών, όπως η PCR, PCR με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR), η PCR σε πραγματικό χρόνο και η RT-PCR. Έχουν επίσης εφαρμοστεί μέθοδοι ανίχνευσης που βασίζονται στους βιοαισθητήρες και τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή, έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνικές ενίσχυσης των νουκλεϊκών οξέων όπως η αλληλουχοεξαρτώμενη ενίσχυση νουκλεϊκού οξέος (Nucleic acid sequence-based amplification – NASBA), NASBA σε πραγματικό χρόνο και η ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου (Loop Mediated Isothermal Amplification – LAMP) ή LAMP με αντίστροφη μεταγραφάση. Μία νέα μέθοδος με καλές προοπτικές και με δυνατότητα ανίχνευσης πολλαπλών ιών είναι ο συνδυασμός πολλαπλής σύνδεσης ολιγονουκλεοτιδίων (MOL) με τεχνολογία PCR και xMAP.

## ABSTRACT

The subject of this thesis is the detection of viruses in food by modern methods. Viruses have a genome, DNA or RNA and also have the ability to adapt to the conditions of specific habitats, but they do not have the autonomy that characterizes most organisms. They require the presence of a host in order to reproduce. The Baltimore classification system divides viruses according to their genome into double-stranded or single-stranded genetic material, DNA or RNA, positive or negative with the mRNA being defined as positive. One of the main causes of foodborne infections are viruses such as enteric viruses, norovirus, human rotavirus, hepatitis A virus and hepatitis E virus. They are transmitted to humans mainly through the fecal-oral route and are responsible for a large number of infections and deaths per year. They are found in fresh vegetables, bivalve shellfish, soft fruits, in water, salads, pork, etc. It is necessary to develop methods for detecting viruses that are characterized by speed, accuracy and high sensitivity. A very important step in virus detection is to prepare the sample to isolate the viruses from the sample matrix. The main processes used are the elution and concentration of viral particles with polyethylene glycol (PEG), the adsorption and elution of viruses using charged membranes or filters, the immunomagnetic beads, the ultrafiltration and the ultracentrifugation. The most reliable and widely used detection methods are molecular virus detection methods, such as PCR, reverse transcriptase PCR (RT-PCR), real-time PCR and RT-PCR. Detection methods based on biosensors and molecularly imprinted polymers have also been applied, and nucleic acid amplification techniques such as nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and real-time (NASBA) real-time Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) or LAMP with reverse transcriptase. A new method with good prospects and the ability to detect multiple viruses is the combination of cross-linking oligonucleotides (MOL) with PCR and xMAP technology.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>8</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....</b>	<b>10</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΙΟΥΣ .....</b>	<b>10</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....</b>	<b>14</b>
<b>ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ.....</b>	<b>14</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....</b>	<b>26</b>
<b>ΙΟΙ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ .....</b>	<b>26</b>
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .....	26
3.2 ΙΟΙ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΤΙΔΑΣ .....	31
3.2.1 <i>ΕΝΤΕΡΙΚΟΙ ΙΟΙ</i> .....	33
3.2.2 <i>ΝΟΡΟΪΟΣ</i> .....	35
3.2.3 <i>ΡΟΤΑΪΟΣ</i> .....	36
2.3 ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Α.....	37
2.4 ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Ε .....	39
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....</b>	<b>41</b>
<b>ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ .....</b>	<b>41</b>
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	41
3.2 ΕΝΤΕΡΙΚΟΙ ΙΟΙ.....	43
4.3 ΝΟΡΟΪΟΣ.....	44
4.4 <i>ΡΟΤΑΪΟΣ</i> .....	44
4.5 ΙΟΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Α .....	45
4.6 ΙΟΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Ε.....	47
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 .....</b>	<b>48</b>
<b>ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ.....</b>	<b>48</b>
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ.....	48

5.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....	49
5.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΙΩΝ.....	51
5.3.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	55
5.3.2 PCR ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗ.....	56
5.3.3 REAL TIME RT-PCR.....	56
5.3.4 MOL-PCR και xMAP.....	57
5.3.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (NASBA) ....	59
5.3.6 ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕΣΩ ΒΡΟΓΧΟΥ (LAMP).....	61
5.3.6 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ .....	63
5.3.7 ΜΟΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ (MPI).....	65
5.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΩΝ .....	68
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>70</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>74</b>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το θέμα της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η ανίχνευση των ιών στα τρόφιμα με μοντέρνες μεθόδους. Χωρίζεται σε πέντε κεφάλαια.

Στο πρώτο κεφάλαιο, δίνονται ορισμένες εισαγωγικές έννοιες για τους ιούς και τη σχέση τους με τα τρόφιμα και τις τροφογενείς λοιμώξεις. Οι ιοί είναι οργανισμοί που για να αναπαραχθούν χρησιμοποιούν τις μεταβολικές ιδιότητες των κυττάρων του οργανισμού που έχουν μολύνει. Έχουν γονιδίωμα, DNA ή RNA και επίσης έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται στις συνθήκες συγκεκριμένων βιότοπων, αλλά δεν έχουν την αυτονομία εκείνη που χαρακτηρίζει τους περισσότερους οργανισμούς,

Στο δεύτερο κεφάλαιο, παρουσιάζεται η ταξινόμηση των ιών, σύμφωνα με τα συστήματα ταξινόμιας που κατά καιρούς έχουν αναπτυχθεί. Ανάμεσα τους διακρίνεται η ταξινόμηση του Baltimore, η οποία αναγνωρίζει κατηγορίες για τους ιούς ανάλογα με τα γονιδιώματα : δίκλωνο ή μονόκλωνο γενετικό υλικό, DNA ή RNA, θετικό ή αρνητικό με το mRNA να καθορίζεται σαν θετικό.

Στο τρίτο και τέταρτο κεφάλαιο, γίνεται μία αναφορά στου ιούς που βρίσκονται στα τρόφιμα και είναι οι υπεύθυνοι για πολλά τροφογενή νοσήματα, όπως οι εντερικοί ιοί, ο νοροϊός, ο ανθρώπινος ροταϊός, ο ιός της ηπατίτιδας Α και ο ιός της ηπατίτιδας Ε. Οι ιοί αυτοί μολύνουν τα τρόφιμα ή το νερό , το οποίο με τη σειρά του μεταφέρει τους ιούς στην τροφική αλυσίδα. Κατά την κατανάλωση των τροφίμων μολύνουν τα κύτταρα του ανθρώπου, πολλαπλασιάζονται στο εσωτερικό του ανθρώπινου οργανισμού, οδηγώντας σε λοίμωξη και αποβάλλονται στα λύματα, όπου από εκεί μπορούν να μολύνουν νερό και θαλάσσιους οργανισμούς και να επανέλθουν στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα. Γίνεται λοιπόν μία αναφορά στην επιδημιολογία και την παθογένεια των ιών αυτών.

Στο πέμπτο κεφάλαιο παρουσιάζονται βιβλιογραφικά οι μέθοδοι ανίχνευσης των ιών. Περιγράφεται πως γίνεται η προετοιμασία του δείγματος ώστε να απομονωθούν οι ιοί από τη μήτρα του δείγματος, περιγράφονται οι μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των ιών. Η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (Enzyme-Linked immunosorbent assay - ELISA), η ηλεκτροφόρηση και η χρωματογραφία είναι μέθοδοι που έχουν προταθεί για την ανίχνευση των ιών. Οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης των ιών, όπως η PCR, PCR με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR), η PCR σε πραγματικό χρόνο και η RT-PCR σε πραγματικό χρόνο θεωρούνται γενικά οι πιο αξιόπιστες μέθοδοι. Οι βιοαισθητήρες και τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή έχουν επίσης εφαρμογή στην ιολογία.. Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν τεχνικές ενίσχυσης των νουκλεϊκών οξέων όπως η αλληλουχοεξαρτώμενη ενίσχυση



νουκλεϊκού οξέος (Nucleic acid sequence-based amplification – NASBA), NASBA σε πραγματικό χρόνο και η ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου (Loop Mediated Isothermal Amplification – LAMP) ή LAMP με αντίστροφη μεταγραφάση. Πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός πολλαπλής σύνδεσης ολιγονουκλεοτιδίων (MOL) με τεχνολογία PCR και xMAP, μία μέθοδος που δίνει τη δυνατότητα για την ανίχνευση πολλαπλών ιών με ακρίβεια και μεγάλη ευαισθησία.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΙΟΥΣ

Τα τελευταία χρόνια, οι ιοί όλο και περισσότερο αναγνωρίζονται σαν σημαντικές αιτίες τροφογενών ασθενειών. Μία κατηγορία εμπλεκόμενων τροφών είναι αυτές που ελάχιστα επεξεργάζονται, όπως δίθυρα μαλάκια και φρέσκα προϊόντα. Αυτά τυπικά μολύνονται από ιούς στο πρωτογενές περιβάλλον παραγωγής. Επιπρόσθετα, πολλά από τα τεκμηριωμένα κρούσματα τροφογενών ιογενών ασθενειών έχουν συνδεθεί με την μόλυνση από έτοιμα, έτοιμα για κατανάλωση τρόφιμα από μολυσμένους χειριστές τροφίμων (FAO/WHO, 2008).

Σε πολλές χώρες οι ιοί θεωρούνται σαν μία συνηθισμένη αιτία τροφογενών ασθενειών, αυτοί σπάνια διαγνώστηκαν, καθώς τα αναλυτικά και διαγνωστικά εργαλεία για τέτοιους ιούς δεν είναι ευρέως διαθέσιμοι. Όμως, έχει γίνει μεγάλη πρόοδος τα τελευταία χρόνια σε όρους μεθοδολογίας που είναι διαθέσιμοι για ανίχνευση και ταυτοποίηση ιών στα τρόφιμα και σε κλινικά δείγματα. Οι εξελίξεις αυτές πρέπει να συμβάλλουν στην βελτίωση της αξιολόγησης της πραγματικής επιβάρυνσης των τροφογενών ασθενειών που συνδέονται με τους ιούς, καθώς και την βελτίωση στρατηγικών για την πρόληψη και τον έλεγχο της μόλυνσης από ιό στα τρόφιμα και των συσχετισμένων ρίσκων (FAO/WHO, 2008).

Οι ιοί είναι πολύ μικροί μικροοργανισμοί, που έχουν εύρος σε μέγεθος από 0,02 έως 0,4 μικρόμετρα σε διάμετρο, ενώ τα βακτήρια γενικά έχουν εύρος σε μέγεθος από 0,5 έως 5 μικρόμετρα. Επιπρόσθετα, άλλες ιδιότητες των ιών μπορεί να ποικίλλουν πολύ, μεταξύ ιών και ακόμα μεταξύ ιών και βακτηρίων. Σε αντίθεση με τα βακτήρια, τα οποία ζουν ελεύθερα, οι ιοί χρησιμοποιούν τα κύτταρα του ξενιστή για να αναπαραχθούν. Οι ιοί ποικίλλουν. Για παράδειγμα, το γονιδίωμα του ιού μπορεί να είναι DNA ή RNA, σε μονόκλωνη ή δίκλωνη μορφή. Το σωματίδιο του ιού μπορεί να ποικίλλει από μια σχετικά απλή δομή αποτελούμενη από μη τυλιγμένο γονιδίωμα με απλό πρωτεϊνικό στρώμα, που είναι η περίπτωση για τους πιο πολλούς τροφογενείς ιούς, μέχρι και μια πιο περίπλοκη δομή αποτελούμενη από ένα τεμαχισμένο γονιδίωμα ενθυλακωμένο σε ένα περίπλοκο πρωτεϊνικό καψίδιο και τυλιγμένο από μια μεμβράνη. Η δομή του σωματιδίου του ιού συνδέεται με την περιβαλλοντική αντίσταση του ιού, με τις πιο περίπλοκες δομές να είναι λιγότερο ανθεκτικές (FAO/WHO, 2008).

Οι ιοί έχουν οριστεί σαν μοριακά γενετικά παράσιτα που χρησιμοποιούν κυτταρικά συστήματα για την αναπαραγωγή τους. Οι ιοί δεν αναπαράγονται ούτε αυτοαναπαράγονται, αλλά αναπαράγονται με έναν παθητικό παρά ενεργητικό τρόπο μέσω των μεταβολικών δραστηριοτήτων των κυττάρων που έχουν μολύνει. Η αναπαραγωγή των ιών συμβαίνει μέσω μιας διαδικασίας αντιγραφής που πραγματοποιήθηκε από τον κυτταρικό μηχανισμό του κυττάρου του ξενιστή, όπου τα κύτταρα αναπαράγονται μέσω μιας διαδικασίας διάσπασης. Οι ιοί θεωρούνται ως βιολογικές οντότητες επειδή έχουν ένα γονιδίωμα και μπορούν να προσαρμοστούν σε συγκεκριμένα κελιά και βιολογικούς βιότοπους. Όμως, οι ιοί δεν έχουν πολλά από τα βασικά χαρακτηριστικά των ζωντανών οργανισμών, όπως την ικανότητα να αιχμαλωτίζουν και να απελευθερώνουν ενέργεια και δεν έχουν την χαρακτηριστική αυτονομία και την ικανότητα αυτοκατασκευής των οργανισμών. Οι πιο πολλοί βιολόγοι αποδέχονται ότι το απλούστερο σύστημα το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ζωντανό είναι ένα κύτταρο και ότι τα υποκυτταρικά συστατικά όπως μακρομόρια ή γονίδια δεν είναι ζωντανά. (Marc & Van Regenmortel, 2011)

Οι ιοί προκαλούν διάφορες αρρώστιες στους ανθρώπους, στα ζώα και στα φυτά. Κάποιοι ιοί προκαλούν συγκεκριμένα είδη ασθενειών, καθώς κάθε ομάδα ιών προσβάλλουν συγκεκριμένα είδη οργανισμών και επίσης έχουν συγκεκριμένες προτιμήσεις κυττάρων. Οι ιοί μπορούν να μεταδοθούν με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα, μπορούν να μεταδοθούν μέσω της αναπνευστικής οδού, το οποίο μπορεί να γίνει όταν ένα μολυσμένο άτομο βήξει ή φταρνιστεί και μεταδοθεί μέσω των σταγονιδίων που βγαίνουν κατά το βήξιμο. Επίσης ένας ιός μπορεί να μεταδοθεί μέσω της σεξουαλικής συνεύρεσης, μέσω της επαφής με μολυσμένα προϊόντα αίματος, μέσω κουνουπιών και μέσω επαφής με μολυσμένα ζώα (FAO/WHO, 2008).

Οι ιοί που πιο συχνά εμπλέκονται στις τροφογενείς λοιμώξεις είναι ο Νοροϊός (NoV) και Ηπατίτιδα Α (HAV), ενώ άλλοι ιοί όπως ο ανθρώπινος ροταϊός (HRV), ο εντεροϊός και η Ηπατίτιδα Ε (HEV) μπορούν επίσης να μεταδοθούν μέσω του φαγητού και πιθανότατα βρίσκονται στη λίστα των ιών που εμπλέκονται στις τροφογενείς λοιμώξεις. Οι ιοί αυτοί μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σχετικά με τα συμπτώματα της μόλυνσης. Δηλαδή στην μία κατηγορία είναι οι ιοί που προκαλούν γαστρεντερίτιδα όπως ο Νοροϊός (NoV) και ο ανθρώπινος ροταϊός (HRV). Στην δεύτερη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται οι ιοί που μεταδίδουν εντερικά ηπατίτιδα όπως η Ηπατίτιδα Α (HAV) και η Ηπατίτιδα Ε (HEV). Και στην τρίτη κατηγορία ανήκουν οι ιοί που αναπαράγονται στο ανθρώπινο έντερο, αλλά μπορούν να προκαλέσουν μολύνσεις μόνο όταν μεταναστεύσουν σε άλλα όργανα όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα. Τέτοιος ιός είναι ο εντεροϊός. Όλοι αυτοί οι ιοί βρίσκονται στα ανθρώπινα

κόπρανα και μπορούν να μολύνουν τους ανθρώπους με κατάποση μέσω της στοματικής οδού (FAO/WHO, 2008).

Κάποια σημαντικά χαρακτηριστικά των ιών στα τρόφιμα, καθώς και οι μολύνσεις και αρρώστιες είναι:

➤ Οι ιοί για να αναπαραχθούν οι ιοί πρέπει να εισέλθουν στα κύτταρα του ζωντανού οργανισμού. Οπότε δεν θα μπορέσουν να αναπαραχθούν ποτέ στα τρόφιμα. Οι ιοί δηλαδή δεν μπορούν να αλλοιώσουν τα τρόφιμα ούτε τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες.

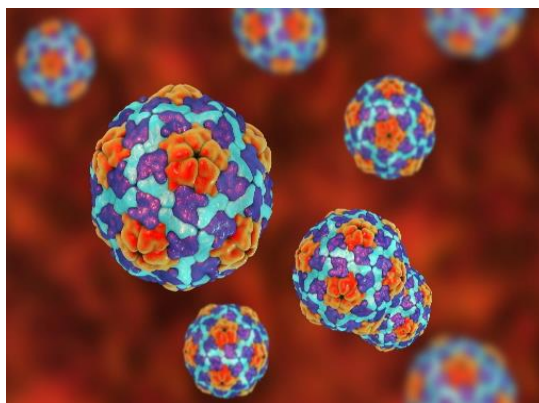
➤ Για να προκληθεί μόλυνση και εν συνεχεία αρρώστιες χρειάζονται λίγα ιικά σωματίδια.

➤ Πολλά σε αριθμό μόρια ιού βρίσκονται στα κόπρανα μολυσμένων ανθρώπων.

➤ Οι ιοί που μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού έχει φανεί να είναι ανθεκτικοί στις συνθήκες του περιβάλλοντος. Οι πιο πολλοί τροφογενείς ιοί είναι αρκετά ανθεκτικοί εκτός του ζωντανού οργανισμού, και επιδεικνύουν αντίσταση σε ακραίες τιμές pH, ξήρανση, ακτινοβολία κτλ.

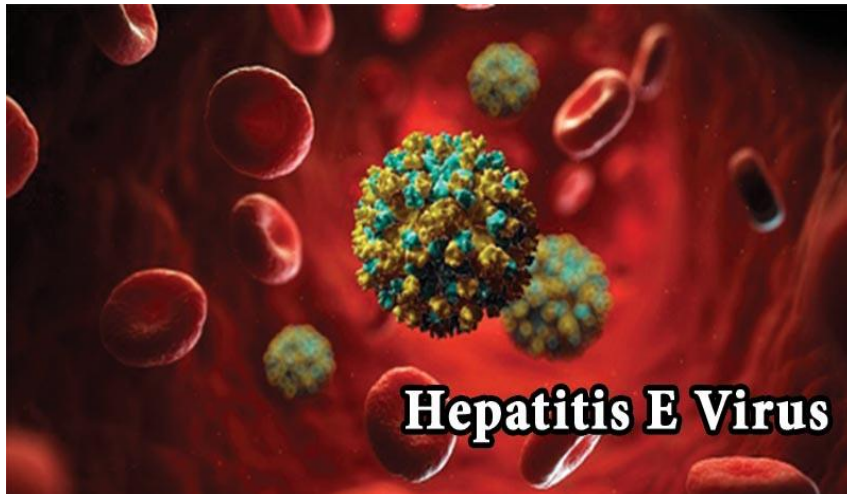
➤ Η μετάδοση των ζωνοσογόνων ιών μέσω του φαγητού είναι σπάνιο για τους ιούς εκτός της Ηπατίτιδας E(HEV), σε αντίθεση με τα βακτήρια όπως για παράδειγμα η Salmonella κτλ.

➤ Ο νοροϊός(NoV) και η Ηπατίτιδα A(HAV) είναι πολύ μολυσματικοί και η μετάδοση μέσω ανθρώπων είναι ο πιο συνηθής τρόπος. Ο δεύτερος πιο συνηθισμένος τρόπος μετάδοσης αυτών των ιών είναι μέσω της μολυσμένης τροφής. Κάποιες φορές η μολυσμένη τροφή μπορεί να είναι το αποτέλεσμα λάθος χειρισμού από χειριστές τροφίμων οι οποίοι άθελα τους μπορεί να μολύνουν το τρόφιμο με κάποια αρρώστια που έχουν οι ίδιοι (FAO/WHO, 2008).



Εικόνα 1: Ηπατίτιδα Α

Πηγή: <https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/home/advisor-channels/hepatitis-advisor/an-increase-in-hepatitis-a-virus-infections-in-the-united-states-2013-2018/>



Εικόνα 2: Ηπατίτιδα Ε

Πηγή: <https://microbenotes.com/hepatitis-e-virus/>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ

Πολλοί φιλόσοφοι ήταν απρόθυμοι να αποδεχτούν ότι τα είδη είναι κατηγορίες επειδή θεωρήθηκαν σαν δήθεν Αριστοτελικοί, παγκόσμιες κατηγορίες, οι οποίες έχουν συνεχείς ιδιότητες που δεν αλλάζουν με τον χρόνο. Από την στιγμή που τα είδη αλλάζουν κατά την διάρκεια της εξέλιξης, δημιουργώντας νέα είδη. Θεώρησαν ότι τα είδη ήταν ιστορικές οντότητες με ένα σαφή εντοπισμό στο διάστημα με ξεκίνημα και με τέλος στον χρόνο και δεν θα μπορούσαν να είναι αφηρημένες κατηγορίες, αμετάβλητα και αιώνια. Αυτή η άποψη ανέδειξε το *biominalist school of thought*, το οποίο θεώρησε τα είδη σαν συγκεκριμένα άτομα παρά σαν αφηρημένες κατηγορίες. Παρά το γεγονός ότι η θέση αυτή των ειδών-ατόμων έχει πολλούς υποστηρικτές, ακόμα παραμένει αμφισβητήσιμο, ένας λόγος για τον οποίο η ιδέα του “ατόμου” είναι τόσο ασαφής όσο η ιδέα των ειδών. Η κύρια αδυναμία της θέσης των ειδών-ατόμων είναι ότι υποστηρίζει ότι οι σεξουαλικοί οργανισμοί δεν μπορούν να σχηματίσουν είδη διότι η ολοκλήρωση των ειδών είναι αδύνατη λόγω της έλλειψης ομάδων γονιδίων. Αυτό κάνει την ιδέα των ειδών ανεφάρμοστη σε μια μεγάλη μερίδα του βιολογικού τομέα. Αν τα είδη εμφανίστηκαν κατά την διάρκεια της εξέλιξης μόνο μετά από σεξουαλική αναπαραγωγή είχε γίνει ευρύτατα διαδεδομένο, το μεγαλύτερο μέρος της ιστορίας της ζωής πάνω στην Γη δεν θα μπορούσε να περιγραφεί σε όρους εξέλιξης ειδών. Αυτό το συμπέρασμα δεν μπορούσε να γίνει αποδεκτό από τους πιο πολλούς βιολόγους (Van Regenmortel, 2011).

Για πολλά χρόνια τα ονόματα των ιογενών τάξεων, οικογενειών, υποοικογενειών και γενών γραφόντουσαν στα ιταλικά με αρχικό κεφαλαίο γράμμα, το οποίο είναι μια διαφορετική τυπογραφία από αυτή που υποστηρίχθηκε από τον Βιολογικό Κώδικα Ονοματολογίας. Ο Διεθνής Κώδικας της Ταξινόμησης των Ιών και Ονοματολογίας τροποποιήθηκε το 1998 και τα ονόματα των ειδών των ιών ήταν ακόμα ιταλικά και με κεφαλαία, παρέχοντας ένα ορατό σημάδι ότι τα είδη ήταν ταξινομικές τάξεις όπως τα γένη και οι οικογένειες. Η Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών (ICTV) αποδέχτηκε την πρόταση ότι τα συνηθισμένα αγγλικά ονόματα των ιών θα έπρεπε να γίνουν τα ονόματα των ειδών αλλά απορρίφθηκε μια δεύτερη πρόταση ότι τα νέα μη-λατινικά διωνυμικά ονόματα θα έπρεπε να εισαχθούν για κάθε είδος. Τέτοια ονόματα έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια στους δείκτες των εκθέσεων της Διεθνούς Επιτροπής για την ταξινόμηση των Ιών (ICTV) και στα δημοσιεύματα της ιολογίας των φυτών και στα βιβλία (Van Regenmortel, 2011).

Υπάρχουν δύο συστήματα που χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση των οργανισμών: η ταξινόμια του Λινναίου και η ταξινόμια του Αντανσόν. Η πρώτη είναι μια μονοθετική ιεραρχική ταξινόμηση που εφαρμόστηκε από τον Λινναίο στα φυτά και στα ζώα, ενώ η ταξινόμια του Αντανσόν είναι ένα πολυθετικό ιεραρχικό σύστημα που αρχικά προτάθηκε από τον Αντανσόν το 1763. Το 1984 ο Maurin και συνεργάτες του πρότειναν να εφαρμοστεί το σύστημα ταξινόμησης του Λινναίου στους ιούς. Παρά το γεγονός ότι είναι βολικό στη χρήση, το σύστημα αυτό έχει αδυναμίες όταν εφαρμόζεται στην ταξινόμηση των ιών. Πρώτον είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η εγκυρότητα ενός ιδιαίτερου κριτηρίου. Για παράδειγμα, μπορεί να μην είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί ο αριθμός των γονιδιωματικών συστατικών σαν ιεραρχικό κριτήριο. Δεύτερον, δεν υπάρχουν προφανείς λόγοι για κριτήρια προτεραιότητας και κατά συνέπεια είναι δύσκολο να καταταχθούν όλα τα διαθέσιμα κριτήρια. Για παράδειγμα, είναι η φύση του γονιδιώματος (DNA ή RNA) περισσότερο σημαντική από την αίσθηση της ακολουθίας κωδικοποίησης του γονιδιώματος ή το σχήμα των μόριων των ιών; Το σύστημα του Αντανσόν εξετάζει όλα τα διαθέσιμα κριτήρια με τη μία και κάνει πολλές ταξινομήσεις, λαμβάνοντας υπόψη τα κριτήρια διαδοχικώς. Τα κριτήρια που οδηγούν στις ίδιες ταξινομήσεις θεωρούνται συσχετισμένα και επομένως δεν κάνουν διακρίσεις. Ακολούθως, ένα υποσύνολο κριτηρίων εξετάζονται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι όλα τα κριτήρια να μπορούν να καταταχθούν ώστε να γίνει καλύτερη διάκριση των ειδών. Αυτό το σύστημα δεν έχει χρησιμοποιηθεί συχνά στο παρελθόν οφειλόμενο στην εντατικής εργασίας φύση που έχει, αλλά αυτή η κατάσταση έχει αλλάξει σαν αποτέλεσμα της ισχύος και της διαθεσιμότητας της τεχνολογίας των υπολογιστών. Επιπροσθέτως, τα ποιοτικά και ποσοτικά δεδομένα ταυτόχρονα εξετάζονται κατά τη δημιουργία μιας τέτοιας ταξινόμησης. Στην περίπτωση των ιών το 1971 αποφασίστηκε από τον Harrison και συνεργάτες ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν τουλάχιστον 60 χαρακτήρες για την πλήρη περιγραφή του ιού. Για αυτό, ο παράγοντας που περιορίζει την χρήση του συστήματος του Αντανσόν δεν είναι η εντατική εργασία που απαιτείται από την φύση του αλλά η έλλειψη δεδομένων για τους πιο πολλούς από τους ιούς. Επιπρόσθετα, ο αυξανόμενος αριθμός αλληλουχιών νουκλεϊκού οξέος που έχει αναφερθεί, σε συνδυασμό με το κατάλληλο λογισμικό υπολογιστή, επιτρέπει την σύγκριση των ιών για να δημιουργήσουν διαφορετικά φυλογενετικά δέντρα, σύμφωνα με το γονίδιο ή ζεύγος γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν. Όμως, μέχρι σήμερα τίποτα από αυτά παρέχει μια ξεκάθαρη ταξινόμηση όλων των ιών. Μια πολυδιάστατη ταξινόμηση, που παίρνει υπόψη όλα τα κριτήρια που είναι απαραίτητα για να περιγραφούν οι ιοί, πιθανόν να είναι ο πιο κατάλληλος τρόπος για την παρουσίαση μιας ταξινόμησης ιών, αλλά ξανά η έλλειψη δεδομένων για κάποιους ιούς θα αποτρέψει την χρήση αυτού του συστήματος στο προβλεπόμενο μέλλον. Για περίπου 25 χρόνια

η Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών έχει ταξινομήσει τους ιούς ουσιαστικά σε επίπεδα οικογένειας και γένους χρησιμοποιώντας μία μη συστηματική πολυθετική προσέγγιση. Οι ιοί συγκεντρώθηκαν πρώτα σε γένη και μετά σε οικογένειες. Ένα υποσύνολο ειδών, συμπεριλαμβανομένων φυσικοχημικών, δομικών, γονιδιωματικών και βιολογικών κριτηρίων, χρησιμοποιούνται έπειτα για να συγκρίνουν και να κατηγοριοποιήσουν τους ιούς. Αυτό το υποσύνολο των ειδών μπορεί να αλλάξει από μία οικογένεια σε άλλη, σύμφωνα με την διαθεσιμότητα δεδομένων και την σημασία ενός ιδιαίτερου είδους για μια ιδιαίτερη οικογένεια. Είναι φανερό ότι δεν υπάρχει ομοιογένεια σε αυτήν την εκτίμηση κατά την διάρκεια της ταξινόμησης των ιών και ότι οι ιολόγοι ζυγίζουν τα κριτήρια διαφορετικά σε αυτήν την υποκειμενική διαδικασία, το οποίο οδηγεί στην δημιουργία μιας ταξινόμησης χωρίς ομοιογένεια. Ωστόσο, με το πέρασμα του χρόνου μπορούμε να δούμε σταθερότητα της σημερινής ταξινόμησης της Διεθνούς Επιτροπής για την Ταξινόμηση των Ιών σε επίπεδα γένους και οικογένειας. Όταν ακολουθεί, γονιδιωματική οργάνωση και δεδομένα κύκλου αναπαραγωγής, ακολούθως χρησιμοποιούνται για ταξινομικούς σκοπούς, συνήθως επιβεβαιώνουν την πραγματική ταξινόμηση. Είναι επίσης φανερό ότι η ιεραρχική ταξινόμηση πάνω στο οικογενειακό επίπεδο συναντώνται διαμάχες μεταξύ φαινοτυπικών και γονότυπων κριτηρίων και ότι οι ιολόγοι πρέπει να εξετάσουν ολόκληρη την διαδικασία ταξινόμησης με σκοπό την πρόοδο σε αυτήν την κατεύθυνση (Fauquet, 1999).

Η ταξινόμηση των ιών πάντα περιείχε τις κλασσικές ιεραρχικές κατηγορίες της οικογένειας και του γένους. Όμως πήρε πολλά χρόνια πριν οι κατηγορίες των ειδών γίνουν αποδεχτές από τους ιολόγους. Οι ιολόγοι των φυτών εναντιώθηκαν στην ιδέα ότι οι κατηγορίες των ειδών μπορούσαν να εφαρμοστούν στους ιούς διότι υποτίθεται πως ο μόνος θεμιτός ορισμός ειδών ήταν η ιδέα των βιολογικών ειδών η οποία αναπτύχθηκε για τους οργανισμούς που αναπαράγονται με σεξουαλική επαφή, ενώ ήταν μη εφαρμόσιμη για τους ιούς που αναπαράγονται σαν κλώνοι. Κάποιοι ιολόγοι επίσης εναντιώθηκαν στην χρήση των κατηγοριών των ειδών στην ιολογία επειδή φοβήθηκαν ότι η είσοδος των ειδών των ιών θα οδηγούσε αναπόφευκτα σε Λατινικά ονόματα, κάτι με το οποίο ήταν αντίθετοι (Van Regenmortel, 2011).

Η έλλειψη ενός ικανοποιητικού ορισμού της ιδέας των ειδών των ιών ήταν ένας παραπάνω λόγος γιατί πολλοί ιολόγοι ήταν απρόθυμοι να χρησιμοποιήσουν την ιδέα των ειδών. Διάφοροι ορισμοί ειδών είχαν προταθεί ανά τα χρόνια αλλά κανένας δεν κέρδισε την γενική αποδοχή (Van Regenmortel, 2011).

Παραδοσιακά οι ιοί έχουν ταξινομηθεί φαινοτυπικά δηλαδή από την εμφάνιση, το μέγεθος, τον τύπο του γονιδιώματος, τον μηχανισμό της αναπαραγωγής, τον ξενιστή και τις



ασθένειες που προκλήθηκαν. Υπάρχουν δύο βασικά συστήματα ταξινόμησης των ιών που χρησιμοποιούνται. Το ένα σύστημα είναι της Διεθνούς Επιτροπής για την Ταξινόμηση των Ιών (ICTV). Το άλλο σύστημα που χρησιμοποιείται είναι η ταξινόμηση κατά Baltimore (Korsman et al, 2012)

Η **Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών (ICTV)** είναι μια επιτροπή του τμήματος ιολογίας. Η Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών είναι ένας μη κερδοσκοπικός οργανισμός ο οποίος απαρτίζεται από διακεκριμένους ιολόγους οι οποίοι εκπροσωπούν χώρες από όλο τον κόσμο και δουλεύουν με σκοπό τον καθορισμό ονομάτων των ιών και ταξινομικών βαθμίδων μέσα από μια δημοκρατική διαδικασία. Η Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών λειτουργεί με έναν αριθμό επιτροπών, υποεπιτροπών, ομάδων μελέτης αποτελούμενες από περισσότερους από 492 εξέχοντες ιολόγους, με εξειδίκευση στους ιούς που μολύνουν τους ανθρώπους, ζώα, έντομα, πρωτόζωα, αρχαία, βακτήρια, μυκόπλασμα, μύκητες, φύκια, ζύμες και φυτά. Ταξινομικές προτάσεις ξεκίνησαν και διατυπώθηκαν ατομικά ή κατά ομάδες. Αυτές οι προτάσεις αναθεωρήθηκαν και αποδέχθηκαν από τις αντίστοιχες υποεπιτροπές και παρουσιάστηκαν για την έγκριση της εκτελεστικής επιτροπής. Όλες οι αποφάσεις επικυρώθηκαν από την ολομέλεια (τόρα γίνεται και με ταχυδρομική ψηφοφορία) που πραγματοποιήθηκε σε κάθε Ιολογικό Κογκρέσο όπου όλα τα μέλη της Διεθνούς Επιτροπής για την Ταξινόμηση των Ιών και περισσότεροι από 50 εκπρόσωποι εθνικών μικροβιολογικών κοινωνιών που εκπροσωπούν. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν 47 ομάδες μελέτης που δουλεύουν σε συνεννόηση με 6 υποεπιτροπές, δηλαδή, τις υποεπιτροπές των σπονδυλωτών, των ασπόνδυλων, των φυτών, των βακτηρίων, των μυκήτων και των δεδομένων των ιών. Η Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών δεν επιβάλλει ταξινομικούς όρους ή ταξινομικές βαθμίδες αλλά διασφαλίζει ότι όλες οι προτάσεις είναι σύμφωνες με τους κανόνες της Επιτροπής για ομοιογένεια και συνοχή. Η Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών τακτικά δημοσιεύει εκθέσεις περιγράφοντας όλες τις ταξινομικές βαθμίδες των ιών με μια λίστα ταξινομημένων ιών καθώς και περιγραφές οικογενειών ιών και γενών (Fauquet, 1999).



Εικόνα 3: Λογότυπο ICTV

Πηγή: <https://www.microbiologyresearch.org/content/ictv-virus-taxonomy-profiles>

Η ταξινόμηση των ιών είναι ένα πολύ δύσκολο έργο για πολλές οικογένειες ιών, είναι όμως πολύ σημαντική για την μελέτη των ιών. Οι ιοί μπορούν να παρουσιάσουν τεράστιες διαφορές σε επίπεδο γονιδιώματος. Για παράδειγμα, η ταξινόμηση πολλών φάγων γίνεται βασιζόμενοι στην παρουσία, δομή και μήκος της ουράς. Ταυτόχρονα όμως έχει φανεί ότι αυτή η προσέγγιση δεν δείχνει να σχετίζεται με τις γονιδιωματικές πληροφορίες. Αυτό οδηγεί σε μία πολύ δύσκολη κατάσταση στην οποία έχουμε εκατοντάδες μη ταξινομημένους φάγους (Bao et al, 2008).

Η μοριακή ταξινόμηση των ιών που βασίζεται στην αλληλουχία των ιών χρησιμοποιείται αυξανόμενα τα πρόσφατα χρόνια, χάρη στον αυξανόμενο αριθμό ιογενών αλληλουχιών που είναι διαθέσιμα στην δημόσια βάση δεδομένων ακολουθίας. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι σύγκρισης ακολουθιών περιλαμβάνουν ευθυγράμμιση πολλαπλών ακολουθιών και φυλογενετική ανάλυση. Μία άλλη μέθοδος μοριακής ταξινόμησης που τραβάει όλο και περισσότερο την προσοχή των ιολόγων είναι η σύγκριση αλληλουχίας κατά ζεύγη (PASC). Το PASC είναι ένα μοριακό εργαλείο για πολλές οικογένειες ιών. Υπολογίζει τις κατά ζεύγη ταυτότητες της αλληλουχίας των ιών στα πλαίσια μιας οικογένειας ιών επιδεικνύοντας την κατανομή τους. Επίσης βοηθάει στο να καθοριστούν οι διαχωρισμοί σε στελέχη, είδη, γένη και σε επίπεδο υποοικογένειας. Το εργαλείο αυτό έχει με επιτυχία εφαρμοστεί σε πολλές οικογένειες ιών, παρόλο που μπορεί να μην δουλεύει καλά για οικογένειες ιών με πολύ διαφορετικές ακολουθίες. Το PASC στο Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών για τη Βιοτεχνολογία (NCBI) καθιέρωσε κατανομές ταυτότητας για έναν αριθμό οικογενειών ιών. Μία νέα αλληλουχία ιών μπορεί να δοκιμαστεί με το σύστημα μέσα σε λίγα λεπτά για να προταθεί ταξινομική θέση του ιού σε αυτές τις οικογένειες. Αυτό το σύστημα εξαλείφει τις πιθανές αποκλίσεις στα αποτελέσματα που προκλήθηκαν από διαφορετικούς αλγόριθμους και διαφορετικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν από την ιολογική κοινότητα. Τα δεδομένα στο σύστημα μπορούν να ενημερωθούν αυτόματα για να γίνουν αλλαγές στη ταξινόμια των ιών και

για να γίνουν προσθήκες καινούριων αλληλουχιών ιών στη δημόσια βάση δεδομένων. Η διεπαφή του ιστού του εργαλείου το κάνει εύκολο στην πλοήγηση και στην εκτέλεση αναλύσεων (Bao et al, 2008).

**Πλεονεκτήματα PASC συγκρινόμενο με άλλες μεθόδους:** Σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους ταξινόμησης που βασίζονται στις φαινοτυπικές ιδιότητες των ιών, η μέθοδος PASC είναι ένα ποσοτικό εργαλείο. Για αυτές τις οικογένειες ιών που είναι κατάλληλες για αναλύσεις PASC, οριοθετήσεις μπορούν εύκολα να καθοριστούν και νέοι ιοί μπορούν ξεκάθαρα να τοποθετηθούν στη σωστή κατηγορία. Όμως, υπάρχουν φορές που η μέθοδος PASC μόνη δεν μπορεί να δώσει σαφή ταξινόμηση και άλλες ιικές ιδιότητες πρέπει να εξεταστούν. Συγκρινόμενο με άλλη ποσοτική προσέγγιση, φυλογενετική ανάλυση, η μέθοδος PASC είναι λιγότερο υπολογιστικά εντατική και μπορεί εύκολα να εκσυγχρονιστεί με νέα δεδομένα ακολουθίας. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της μεθόδου PASC είναι σχετικά εύκολο να ερμηνευτούν, τα οποία μπορούν δυνητικά να γίνουν από πρόγραμμα υπολογιστή χωρίς ανθρώπινη παρέμβαση. Θα ήταν επομένως δυνατό να στηθεί αυτόματο σύστημα για υψηλή διεκπεραιωτικότητα ταξινόμησης (Bao et al, 2008).

**Περιορισμοί του PASC:** Παρόλο που το σύστημα PASC έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε αρκετές οικογένειες ιών, η προσέγγιση έχει κάποιους περιορισμούς. Πρώτα από όλα, το σύστημα PASC δεν είναι κατάλληλο για οικογένειες ιών των οποίων η τωρινή ταξινόμηση βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην μορφολογία των ιών, όπως οι φάγοι στις οικογένειες Siphoviridae και Podoviridae. Το PASC ολόκληρου του γονιδιώματος μπορεί να μην δουλεύει καλά για οικογένειες ιών με πολύ διαφορετική ακολουθία. Αυτό περιλαμβάνει ιούς με χαμηλές συνολικές ομοιότητες ακολουθίας ή μεγάλες διαφορές σε μεγέθη γονιδιώματος και στην οργάνωση. Για παράδειγμα, στην οικογένεια Herpesviridae, το ποσοστό ταυτότητας μεταξύ διαφορετικών ειδών στο γένος Varicellovirus εκτείνεται από 39% έως 83%, όταν το ποσοστό ταυτότητας μεταξύ ενός ιού στο γένος Simplexvirus και ένα του γένους Varicellovirus, θα μπορούσε να είναι στο ύψος του 54%. Η αλληλεπικάλυψη τέτοιων ταυτοτήτων κάνει απίθανο να προσδιορίσεις τα είδη και τις οριοθετήσεις του γένους για τους ερπητοϊούς. Στην οικογένεια Poxviridae, το μεγαλύτερο γονιδίωμα είναι 3 φορές μεγαλύτερο από το μικρότερο. Οι μεγάλες διαφορές στα μεγέθη των γονιδιωμάτων θα εισάγουν μεγάλα τεχνουργήματα κατά τον υπολογισμό των ταυτοτήτων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μονό γονίδιο ή σύμπλεγμα γονιδίων χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί στην μέθοδο PASC αντί για ολόκληρα γονιδιώματα. Οι αλληλουχίες πρωτεΐνης πολυμεράσης των ευλογοϊών έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση του συστήματος PASC και επιτεύχθηκε ένα καλό αποτέλεσμα. Όμως, δεν μπορεί κάθε μονό γονίδιο να χρησιμοποιηθεί στο σύστημα PASC. Τα γονίδια πρέπει να είναι παρόντα σε όλους

τους ιούς μιας οικογένειας και να είναι πολύ καλά διαφυλαγμένα. Πρέπει να δοκιμαστούν εκτενώς και να γίνουν αποδεκτά από την ερευνητική κοινότητα σαν ένα χρήσιμο ταξινομικό κριτήριο πριν εφαρμοστούν στο σύστημα PASC. Δεύτερον, για αυτές τις οικογένειες των οποίων το σύστημα PASC κατασκευάστηκε με ολόκληρα γονιδιώματα, οι ακολουθίες που πρέπει να δοκιμαστούν στο σύστημα PASC για να προσδιοριστεί η ταξινομική τους θέση πρέπει να είναι πλήρεις αλληλουχίες γονιδιώματος επίσης για να πάρουμε ακριβή πρόβλεψη. Αν και ένα ποσοστό ταυτοτήτων μπορεί να αποκτηθεί όταν ένα μερικό γονιδίωμα χρησιμοποιείται, η αξία θα είναι μικρότερη από αυτή που θα ήταν αν ένα ολοκληρωμένο γονιδίωμα χρησιμοποιούταν εξαιτίας του τρόπου με τον οποίο το ποσοστό ταυτοτήτων μετρείται σε αυτό το σύστημα. Επιπρόσθετα, η αξία αυτή αποκτάται με μία μερική ακολουθία που μπορεί να μην αντανάκλαει την αληθινή ταξινομική θέση αυτού του ιού, αν, για παράδειγμα ο ανασυνδυασμός είναι συχνός και σημαντικός για αυτόν τον ιό. Αυτό θα μειώσει τον αριθμό των ακολουθιών που μπορούν να δοκιμαστούν από το σύστημα PASC (Bao et al, 2008).

Τέλος, είναι σχεδόν αδύνατο να πάρεις πανομοιότυπα αποτελέσματα από το σύστημα PASC όταν διαφορετικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται. Υπάρχουν πολλά προγράμματα ευθυγράμμισης αλληλουχίας κατά ζεύγη διαθέσιμα. Ακόμα και μέσα από ένα μονό πρόγραμμα, παραλλαγή παραμέτρων μπορούν να επηρεάσουν την ευθυγράμμιση. Όταν αποκτηθεί μια ευθυγράμμιση, μπορούν να υπάρξουν διάφοροι τρόποι για να υπολογίσουμε την απόσταση (Bao et al, 2008).

Σε πολλά παραδείγματα οι ιδιότητες των ιών που ανήκουν στο ίδιο γένος συσχετίζονται. Έτσι, η ταξινόμηση κάποιων από αυτών πιθανόν να είναι επαρκής ώστε να επιτρέψουν την ταξινόμηση ενός νέου ιού σε ένα καθιερωμένο γένος. Για παράδειγμα, ένα ιός των φυτών με νηματώδη σωματίδια με 700-850 nm και μεταδίδεται με αφίδες είναι πιθανόν να είναι μέλος του γένους Potyvirus. Η ίδρυση νέων γενών στο μέλλον θα απαιτεί παραπάνω πληροφορίες (Fauquet, 1999).

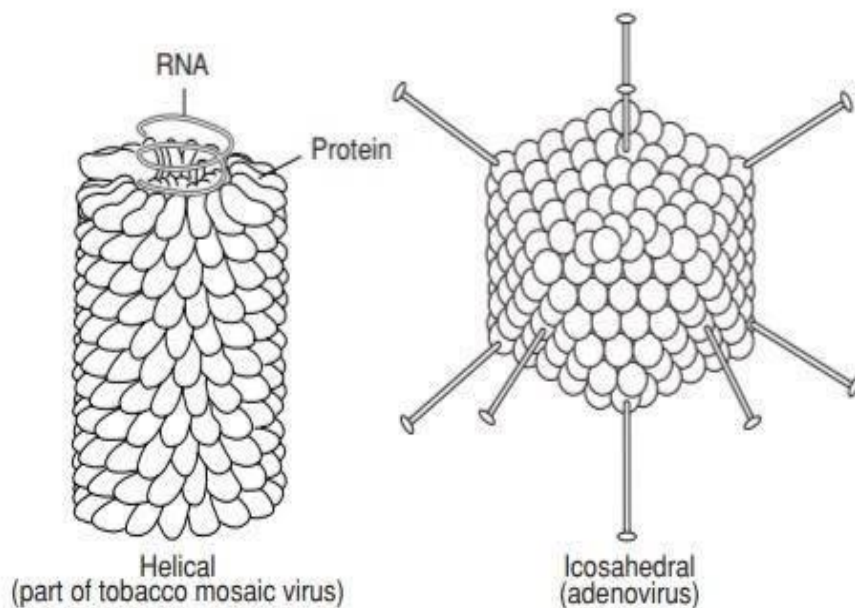
Ένα γενικό σχέδιο της ταξινόμησης των ιών προτάθηκε από τους Lwoff, Horne και Tournier το 1962 και από τους Lwoff και Tournier το 1966, βασισμένοι στα χαρακτηριστικά του σωματιδίου του ιού. Το σύστημα αυτό χωρίστηκε στους ριβοϊούς και δεοξυϊούς, αναλόγως αν το νουκλεϊκό τους οξύ ήταν RNA ή DNA. Μετά χωρίστηκαν σε ελικοειδή και κυβικές κατηγορίες, βασισμένοι στην συμμετρία του νουκλεοκαψιδίου. Έτσι προέκυψαν οι εξής τέσσερις κατηγορίες: Ριβοκυβικοί, Ριβοελικοειδείς, Δεοξυκυβικοί και Δεοξυελικοειδείς. Μια ακόμη κατηγορία, προστέθηκε για ιούς όπως οι συνηθισμένοι φάγοι που έχουν κυβικά κεφάλια

και ελικοειδείς ουρές. Τελικά, το νουκλεοκαψίδιο μπορεί να είναι γυμνό ή τυλιγμένο, δημιουργώντας μια τριτογενής διαίρεση και ορίζοντας εννέα τάξεις (Guttman, 2001).

Το ελικοειδές καψίδιο, το οποίο παραδειγματικά έχει εξηγηθεί σαν ιός μωσαϊκού καπνού, είναι ένα μεγάλο πολυμερές ενός μοναδικού τύπου του πολυπεπτιδίου που είναι κλεισμένο στο RNA σε ένα αυλάκι. Τα πρωτότυπα συναρμολογούνται κατά μήκος του RNA μέχρι να εγκλειστεί πλήρως και έτσι προσδιορίζεται το μήκος του καψιδίου. Αυτός ο τύπος του καψιδίου είναι επομένως, πολύ παρόμοιο με άλλες μεγάλες ελικοειδείς πρωτεϊνικές δομές όπως τα μαστίγια (Guttman, 2001).

Τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια δείχνουν ότι όλα τα κυβικά καψίδια έχουν το σχήμα ενός εικοσάεδρου ή ενός δωδεκάεδρου. Στην πραγματικότητα, η αρχή της δομής ανακαλύφθηκε από τον R. Buckminster Fuller στην προσπάθεια του να φτιάξει εύκολα συναρμολογήσιμα οικοδομήματα. Τα κυβικά καψίδια ποικίλλουν σε αριθμό πρωτομερών. Όλα τα εικοσαεδρά μπορούν να καθοριστούν με έναν αριθμό  $T$ , ο αριθμός του τριγωνισμού, όπου ο αριθμός των υπομονάδων είναι  $20T$ . Η τιμή  $T$  δίνεται από τον κανόνα  $T = Pf^2$ , όπου  $f$  είναι ένας ακέραιος αριθμός και  $P = b^2 + bk + k^2$ , όπου  $b$  και  $k$  είναι δύο οποιοδήποτε ακέραιοι αριθμοί χωρίς κοινό παράγοντα (Guttman, 2001).

Τα σωματίδια ιών διαφορετικών μεγεθών είναι γνωστό ότι έχουν τιμές  $T$ : 1, 3, 4, 7, 9, 16, 25 και 81. Όταν είναι αρνητικά χρωματισμένοι και έχει εξεταστεί από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η επιφάνεια ενός εικοσάεδρου νουκλεοκαψιδίου εκθέτει ξεχωριστές μονάδες που ονομάζονται καψομερή. Αυτοί που είναι στις κορυφές είναι τα πεντόνιο φτιαγμένοι από πέντε πρωτομερή και τα υπόλοιπα είναι τα εξόνια φτιαγμένα από έξι πρωτομερή (Guttman, 2013).



Εικόνα 4: Ελικοειδής και κυβική δομή ιών

Πηγή: <https://microbiologynotes.org/virus-introduction-properties-and-classifications/>

Η ταξινόμηση των ιών συνεχίζει να εξελίσσεται με τις τεχνολογίες που είναι διαθέσιμες για την περιγραφή των ιών. Το πρώτο κύμα των περιγραφών, έγινε πριν το 1940, κατά τις οποίες λαμβάναν υπόψη τα συμπτώματα που προκαλούσαν οι ιογενείς ασθένειες καθώς και τους τρόπους μετάδοσης των ιών. Το δεύτερο κύμα, μεταξύ 1940 και 1970, συγκέντρωσε μια τεράστια ποσότητα πληροφοριών από μελέτες της μορφολογίας των σωματιδίων των ιών (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, δομικά δεδομένα), βιολογίας (ορολογία και ιδιότητες των ιών) και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ιών (φύση και μέγεθος του γονιδιώματος, αριθμός και μέγεθος των πρωτεϊνών). Η επίπτωση των περιγραφών στην ταξινόμηση των ιών έχει ιδιαίτερα επηρεαστεί από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και την αρνητικά στιγματισμένη τεχνική για τα σωματίδια των ιών τις δεκαετίες του 1960 και του 1970. Με αυτή την τεχνική, οι ιοί αναγνωριζόντουσαν μέσω πληροφοριών σχετικά με το μέγεθος, το σχήμα, την δομή. Έτσι η ιολογία προόδευσε ταυτόχρονα για όλους τους ιούς που μολύνουν ζώα, έντομα, φυτά. Από το 1970 η λίστα με τις περιγραφές των ιών περιέχει πληροφορίες σχετικά με το γονιδίωμα και την αναπαραγωγή των ιών καθώς και μοριακές σχέσεις με τους ξενιστές των ιών (Fauquet, 2008).

Το πιο πρόσφατο κύμα ταξινομούσε τους ιούς με την αλληλουχία του γονιδιώματος των ιών. Οι συγκρίσεις της αλληλουχίας του γονιδιώματος γίνονται όλο και περισσότερο επικρατούσες στην ταξινόμηση των ιών το οποίο επεξηγείται από την παρουσία μεγάλου αριθμού φυλογενετικών δέντρων στο όγδοο έκθεση του ICTV(Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών). Κάποιοι επιστήμονες προωθούν την ιδέα της ποσοτικής ταξινόμησης,

στοχεύοντας στο να επιδείξουν ότι η αλληλουχία του γονιδιώματος των ιών περιέχει όλες τις πληροφορίες κωδικοποίησης που απαιτούνται για όλες τις βιολογικές ιδιότητες των ιών. Αυτό έρχεται σε πλήρη συμφωνία με την ιδέα του ορισμού των ειδών των ιών αν κάποιος σκεφτεί ότι η μοναδική αλληλουχία ενός γονιδιώματος περιέχει όλες τις πληροφορίες του ιού για να εκτελέσει όλα τα στάδια του κύκλου αναπαραγωγής με δομικά και μη δομικά γονίδια και όλες τις βιολογικές του λειτουργίες. Ένα καλό παράδειγμα ποσοτικής ταξινόμησης είναι η επαναταξινόμηση των φλαβοϊών από το γένος *Flavivirus* της οικογένειας των τογκαϊών (*Togaviridae*) στην νέα οικογένεια *Flaviviridae* με βάση την αλληλουχία του γονιδιώματος του ιού του κίτρινου πυρετού και με συγκρίσεις με την διάταξη γονιδιακής αλληλουχίας μελών του γένους *Alphavirus* της οικογένειας *Togaviridae*. Άλλο πρόσφατο παράδειγμα είναι η συγχώνευση των γενών του ρινοϊού (*Rhinovirus*) και του εντεροϊού (*Enterovirus*) στην οικογένεια των πικορναϊών (*Picornaviridae*), βασιζόμενοι στο γεγονός ότι τα φυλογενετικά δέντρα και οι συγκρίσεις κατά ζεύγη δεν υποστηρίζουν την συνεχιζόμενη διάκριση μεταξύ των δύο γενών (Fauquet, 2008).

Η ταξινόμηση κατά Baltimore χωρίζει τους ιούς σε επτά κατηγορίες βασισμένα στον συνδυασμό ενός τύπου γονιδιώματος και στον μηχανισμό αναπαραγωγής, ειδικά πως το mRNA σχηματίστηκε από το αρχικό γονιδίωμα (Korsman et al, 2012).

Κάθε τύπος ιού έχει γονιδίωμα είτε DNA είτε RNA, αλλά ποτέ και τα δύο. Επίσης, το γονιδίωμα μπορεί να είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο. Τα ιικά νουκλεϊκά οξέα ορίζονται επίσης θετικά ή αρνητικά, όπου ο ιός αγγελιαφόρος RNA καθορίζεται σαν θετικός. Τελικά, κάποιοι ιοί έχουν τεμαχισμένα γονιδιώματα φτιαγμένα από ξεχωριστά μόρια νουκλεϊκού οξέος και ένα ολοκληρωμένο γονιδίωμα απαιτεί όλα τα τμήματα. Σε αυτήν την περίπτωση όμως, μία επιτυχής λοίμωξη μπορεί να οδηγήσει από ταυτόχρονη λοίμωξη από αρκετά σωματίδια ιού που συντελούν όλα τα τμήματα στην ένωση, ακόμα και αν κανένα από τα σωματίδια δεν έχει ολοκληρωμένο γονιδίωμα. Η ταξινόμηση κατά Baltimore αναγνωρίζει κατηγορίες με τα εξής γονιδιώματα:

- **Δίκλωνο DNA.** Οι αγγελιαφόροι μεταγράφονται όπως σε συνηθισμένα κύτταρα.
- **Μονόκλωνο DNA,** είτε θετικό είτε αρνητικό. Το μολυσμένο DNA μετατρέπεται σε δίκλωνο μόριο, το οποίο έπειτα μεταγράφεται ως συνήθως.
- **Δίκλωνο RNA.** Οι αγγελιαφόροι μεταγράφονται από το μολυσμένο γονιδίωμα σαν να ήταν DNA.
- **Μονόκλωνο θετικό RNA.** Αυτό το RNA μπορεί να είναι ένας αγγελιαφόρος και ένα από τα πρώτα προϊόντα του που κατασκευάζεται είναι ένα αντίγραφο RNA ή ένα εξαρτώμενο RNA από RNA πολυμεράση που μετατρέπει κάποια μολυσμένα σκέλη σε ένα δίκλωνο

ενδιάμεσο που ονομάζεται αναπαραγωγική μορφή (RF). Το αρνητικό σκέλος χρησιμοποιείται έπειτα σαν το πρότυπο σκέλος για την μεταγραφή του mRNA και για νέα θετικά γονιδιώματα.

- **Μονόκλωνο αρνητικό RNA.** Αυτό το μολυσμένο γονιδίωμα έπειτα μεταγράφεται σε θετικά mRNAs

- **Μονόκλωνο θετικό RNA.** Αυτό το RNA αρχίζει μια μοναδική διαδικασία ανάμεσα στους ρετροϊούς, όπως ο ιός ανθρώπινης ανοσοεπάρκειας (HIV) και ο ιός σαρκώματος (RSV). Αυτοί έχουν ένα εξαρτώμενο RNA από DNA πολυμεράση (αντίστροφη μεταγραφάση), που μετατρέπει το RNA γονιδίωμα σε δίκλωνο RNA-DNA. Μετά την αφαίρεση σκέλους RNA από την δραστικότητα ριβονουκλεάσης του ίδιου ενζύμου, το παραμένον αρνητικό σκέλος DNA επαναλαμβάνεται για να σχηματίσει δίκλωνο προϊκό DNA. Αυτό το προϊκό DNA μπορεί να σχηματίσει κυκλικό μόριο που ενσωματώνεται στα χρωμοσώματα του ξενιστή, ή μπορεί μετά να μεταγραφεί σε νέα σκέλη RNA, που εξυπηρετεί είτε σαν mRNA ή σαν γονιδιώματα για νέους ιούς. Τα κύτταρα που μολύνονται με αυτόν τον τρόπο, έπειτα αποκτούν τα δικά τους νέα χαρακτηριστικά και μπορεί να μετατραπούν σε καρκινικά κύτταρα (Guttman B., 2013).

Αναμφισβήτητα, η ταξινόμηση κατά Baltimore χρησιμεύει σαν χρυσός κανόνας της ταξινόμησης των ιών. Επιπρόσθετα εκτός από την συνεισφορά του σαν ιολόγος, ο Baltimore έχει επηρεάσει κατά βάθος την διεθνή επιστήμη. Επίσης έχει βασικές συνεισφορές στην ανοσολογία, στην ιολογία, στην έρευνα του καρκίνου, στην βιοτεχνολογία και στην έρευνα του ανασυνδυασμένου DNA, μέσω των επιτευγμάτων του σαν ερευνητής, διαχειριστής, δάσκαλος και δημόσιος δικηγόρος για την επιστήμη και την μηχανική. Μοιράστηκε το βραβείο Νόμπελ το 1975 με το Howard Temin για την ανακάλυψη της αντίστροφης μεταγραφάσης στην ηλικία των 37. Μετέπειτα, συνέχισε να είναι παραγωγικός σαν ερευνητικός επιστήμονας όχι μόνο στην ιολογία αλλά ακόμα και στο πεδίο της ανοσολογίας (Wang-Shick Ryu, 2017).





Εικόνα 5: David Baltimore

Πηγή: <https://www.ibiology.org/speakers/david-baltimore/>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΙΟΙ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

#### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι κύριοι τροφογενείς ιοί σε όρους αριθμών αναγνωρισμένων περιπτώσεων είναι οι νοροϊοί (NoV) και η Ηπατίτιδα Α (HAV). Ο ροταϊός είναι επίσης συνδεδεμένος με τις τροφογενείς λοιμώξεις, με κάποιες μεγάλες εκδηλώσεις που προκαλούνται από ροταϊούς κατηγορίας Β και C και η ηπατίτιδα Ε είναι συνδεδεμένη με ασθένειες που μεταδίδονται με το νερό. Το βάρος των τροφογενών ασθενειών που προκαλούνται από ιογενείς παράγοντες είναι σχετικά ελάχιστα κατανοητό εξαιτίας των περιορισμένων συστημάτων παρακολούθησης και μεθόδων ανίχνευσης. Με βάση το μέσο μετάδοσης, οι ιοί είναι πολύ λιγότερο κατανοητοί από τα περισσότερα βακτηριακά τροφιμογενή παθογόνα. Οι πιο πολλές καταγεγραμμένες εκδηλώσεις τροφογενών λοιμώξεων που συνδέονται με ιούς έχουν σχέση με τρόφιμα που έχουν επεξεργαστεί από μολυσμένους εργαζόμενους μεταξύ της πρωτογενούς παραγωγής (π.χ. στην φάρμα) και της τελικής προετοιμασίας του τροφίμου. Βιομηχανικά επεξεργασμένα τρόφιμα δεν είναι κανονικά συνδεδεμένα με εκδηλώσεις ασθενειών. Υπήρξαν αυξανόμενες καταγραφές δραστηριότητας νοροϊού στην Ευρώπη μέσα στην περίοδο Οκτωβρίου/Νοεμβρίου του 2006 συγκρινόμενα με το 2004 και το 2005. Εννιά από έντεκα αρχές χωρών ανέφεραν: εκδηλώσεις μολύνσεων νοροϊού στην Δανία από κατεψυγμένα βατόμουρα εισαγόμενα από την Πολωνία επηρέασε περισσότερους από χίλιους ανθρώπους. Η αύξηση δραστηριότητας νοροϊού μπορεί να οφείλεται σε βελτιωμένη ευαισθητοποίηση και μεθοδολογία (McClure, 2008).

Οι ιοί που προκαλούν γαστρεντερίτιδα είναι μεταξύ των πιο συνήθων παραγόντων τροφογενών λοιμώξεων, με τους νοροϊούς να είναι το νούμερο ένα σε πολλές βιομηχανικές χώρες. Οι ιοί γαστρεντερίτιδας ανήκουν σε πολλές οικογένειες ιών και περιλαμβάνουν νοροϊούς και σαποϊούς (Οικογένεια Caliciviridae), ροταϊός (Οικογένεια Reoviridae), αδενοϊοί (Adenoviridae) και αστροϊός (Οικογένεια Astroviridae). Οι ιοί της γαστρεντερίτιδας μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού, υπάρχουν στον εμετό και στα κόπρανα και εισέρχονται στο επόμενο θύμα τους στοματικά. Σε άτομα με κλινική ασθένεια, οι ιοί της γαστρεντερίτιδας τυπικά εντοπίζονται σε κόπρανα σε επίπεδα που υπερβαίνουν πολύ τα 10<sup>6</sup> σωματίδια ιού/ml. Παρόλο που το μέσο ποσοστό επίθεσης των ιών της γαστρεντερίτιδας είναι υψηλός (υπερβαίνει το 45%), ασυμπτωματικές μολύνσεις συμβαίνουν και αυτά τα άτομα εκκρίνουν τον ιό. Λόγω της έλλειψης περιβλήματος, αυτοί οι ιοί της γαστρεντερίτιδας είναι

πολύ σταθεροί και μπορούν να παραμείνουν μολυσματικοί στο περιβάλλον, στο νερό και στα τρόφιμα για παρατεταμένες περιόδους. Επομένως, τα τρόφιμα μπορούν να μολυνθούν οπουδήποτε μέσα στην τροφική αλυσίδα. Εμπορεύματα υψηλού κινδύνου είναι φρέσκα προϊόντα, προμηθευμένα σάντουιτς και σαλάτες και δίθυρα οστρακοειδή. Η παρεμπόδιση της μόλυνσης από τον ιό της γαστρεντερίτιδας περιλαμβανόμενης της τροφογενούς μεταδόσεως θα στηριχτεί σε υψηλά πρότυπα προσωπικής και περιβαλλοντικής υγιεινής. Ο στόχος πρέπει να είναι να παρεμποδιστεί η μόλυνση των ειδών διατροφής παρά οι διαδικασίες θεραπείας για να απενεργοποιηθούν οι ιοί που υπάρχουν στα φαγητά ή στο νερό. Στην καθημερινή πρακτική αυτό σημαίνει ότι η γνώση μεταξύ των χειριστών τροφίμων, περιλαμβανόμενων των εποχιακών εργαζομένων, σχετικά με την μετάδοση των εντερικών ιών, με ειδική έμφαση στο ρίσκο της μετάδοσης από ασυμπτωματικά μολυσμένα άτομα και αυτούς που συνεχίζουν να κουβαλάνε τον ιό κατά την ανάρρωση από την ασθένεια (Duizer & Koopmans, 2009).

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα τροφιμογενών λοιμώξεων που παρουσιάστηκαν τις τελευταίες δεκαετίες και αποδείχθηκε ότι οφείλονται σε ιούς που βρέθηκαν σε τρόφιμα που καταναλώθηκαν από ασθενείς.

Πίνακας 1: Παραδείγματα τροφιμογενών λοιμώξεων από ιούς και ανίχνευση

Ιός – Μέθοδος ανίχνευσης	Κατηγορία τροφίμου - πηγή	Παρατηρήσεις	Αναφορά
Norovirus-RT-PCR	Φαγητό delivery	Σημαντικός αριθμός καθηγητών και μαθητών (157 άτομα από τα οποία 46 επιβεβαιώθηκε εργαστηριακά η λοίμωξη με νοροϊό) σε ένα σχολείο στην πόλη Γκουάνγκτζου (Guangzhou) ανέπτυξε ξαφνικά συμπτώματα διάρροιας και εμέτου από 8 -22 Μαρτίου 2018. Ελήφθησαν ορθικά επιχρίσματα ή δείγματα κοπράνων από ασθενείς και προσωπικό που ερχόταν σε επαφή με τα τρόφιμα, από απορρίμματα	Lu et al., 2020

		φαγητού, επιχρίσματα επιφανειών από το εστιατόριο, πόσιμου νερού.	
Norovirus- δεν φέρει πληροφορίες για τη μέθοδο ανίχνευσης	Gerry's Donuts στο Ellington του Κονέκτικατ	Τον Μάιο του 2021 το αρμόδιο Υπουργείο Υγείας έκδοσε προειδοποίηση προς του καταναλωτές να μην καταναλώνουν προϊόντα από το συγκεκριμένο κατάστημα καθώς επιβεβαιώθηκε εργαστηριακά η νόσηση αρκετών πελατών με νοροϊο	North Central District Health Department, 2021
Norovirus I και II - RT-PCR	Δείπνο γαλοπούλας	Στις 16 Μαρτίου 2018, 11 άτομα σε οίκο ευγηρίας (9 φιλοξενούμενοι και 2 νοσηλεύτριες) παρουσίασαν συμπτώματα οξείας γαστρεντερίτιδας. Η επιδημία επεκτάθηκε εντός και εκτός του γηροκομείου, όπου άτομα που συγκατοικούσαν ή έρχονταν σε επαφή νοσούσαν. Ταυτοποίηση ιού σε δείγματα κοπράνων	Parron et al. 2019
HAV – ISO 15216 (RT-PCR)	Παγωμένες φράουλες	Τον Μάρτιο του 1997 συνολικά 153 περιπτώσεις αναφέρθηκαν με ηπατίτιδα Α στον Calhoun County στο Michigan. Τα 151 ήταν μαθητές ή προσωπικό σε 4 διαφορετικές σχολικές μονάδες.	Cook et al., 2021
HAV - ανοσοπροσδιορισμό (ELISA) σε 44 δείγματα ορού αίματος	Νερό	Στα τέλη Οκτωβρίου 2017, στο Kharkiv Oblast σημειώθηκε μία έξαρση ηπατίτιδας Α (366,3 κρούσματα/ 100 000 πληθυσμό)	Karlova et al., 2018

HRV - PCR		Λοίμωξη HRV τύπου C σε 7 βρέφη σε μονάδα εντατικής θεραπείας νεογνών (Royal Hobart Hospital στην Τασμανία της Αυστραλίας) με συμπτώματα άπνοιας όπου απαιτήθηκε αυξημένη υποστήριξη οξυγόνου ή αερισμού. Εργαστηριακά ανιχνεύσιμος ιός για μέσο όρο 4 βδομάδων	Reid et al., 2011
HEV γονότυπος 1 και μικτή λοίμωξη HEV-HAV- ELISA	Νερό	Πόλη Jamshedpur του Τζάρκχαντ από τον Μάρτιο του 2018 έως τον Οκτώβριο του 2018. 584 κλινικά και βιοχημικά τεκμηριωμένα κρούσματα	Mehta et al., 2021
HAV, NoV - RT-PCR	Παγωμένα φρούτα (frozen berries)	Στην ΕΕ τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί αυξημένη κατανάλωση παγωμένων berries. Σε βιβλιογραφική ανασκόπηση για την περίοδο 1983-2013 εντοπίστηκαν 32 ανεξάρτητα περιστατικά μολύνσεων συσχετιζόμενα με αυτά τα τρόφιμα. Τα παθογόνα που εντοπίστηκαν ήταν το HAV, NoV (27 συμβάντα), Shigella sonnei.	Tavoschi et al., 2015
Enterovirus D68 – RT-PCR		Το 2014 ( Αύγουστος ως Οκτώβριος) παρουσίασε μεγάλη έξαρση στη Βόρεια Αμερική. Στις ΗΠΑ επιβεβαιώθηκαν 1153 μολύνσεις σε 49 πολιτείες και προκάλεσε τουλάχιστον 14 θανάτου .Το τμήμα του πληθυσμού που επηρεάστηκε περισσότερο ήταν μαθητές	Messacar et al., 2016
NoV, HaV, εντεροϊό – RT-PCR	Οστρακοειδή	Έλεγχος οστρακοειδών στην Πορτογαλία. Περίπου 2000	Mesquita et al., 2011

		<p>οστακοειδή, οργανώθηκαν σε παρτίδες και συλλέχθηκαν μεταξύ Μαρτίου 2008 και Φεβρουαρίου 2009. Συνολικά, το 67% όλων των παρτίδων που αναλύθηκαν μολύνθηκαν από τουλάχιστον έναν από τους ιούς που μελετήθηκαν, ενώ η ταυτόχρονη παρουσία δύο και τριών ιών ανιχνεύθηκε σε 22% και 6% παρτίδες, αντίστοιχα. Από τους τρεις ιούς, το NoV ανιχνεύθηκε στο 37% των παρτίδων, ακολουθούμενο από EV στο 35% και το HAV στο 33%</p>	
NoV- RT-PCR	<p>Τρόφιμα στρατιωτικής καντίνας</p>	<p>Τον Απρίλιο του 2011, η ιατρική υπηρεσία μίας γαλλικής στρατιωτικής μονάδας αλεξιπτωτιστών ανέφερε στο γαλλικό στρατιωτικό επιδημιολογικό κέντρο ένα ξέσπασμα οξείας γαστρεντερίτιδας στην οποία αρρώστησαν περισσότερα από 100 άτομα. Σαν πιθανή αιτία θεωρήθηκαν τα τρόφιμα της καντίνας της στρατιωτικής βάσης (ζυμαρικά και μερικά ωμά λαχανικά). Ένα δείγμα κοπράνων δοκιμάστηκε από άρρωστο μάγειρα και βρέθηκε θετικό για νοροϊό γονιδιακή ομάδα I με PCR. Ακολουθώντας τα αποτελέσματα της αναλυτικής μελέτης, τα άψητα λαχανικά που σερβίρονται στις 11 Απριλίου δοκιμάστηκαν για νοροϊό.</p>	<p>Mayet et al., 2011</p>

		Ο ίδιος νοροϊός βρέθηκε σε καρότα και σαλάτα που σερβίρονται στο μεσημεριανό γεύμα και στις ντομάτες που σερβίρονται στο δείπνο.	
--	--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

### 3.2 ΙΟΙ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΤΙΔΑΣ

Σε αντίθεση με τους πιο πολλούς μικροβιολογικούς παράγοντες, οι ιοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν στα τρόφιμα και για αυτό το επίπεδο μόλυνσης δεν μπορεί να αυξηθεί κατά την διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης, αλλά εξαιτίας της χαμηλής μολυσματικής δόσης η επιβίωσή τους μπορεί να θεωρηθεί ρίσκο. Πολλές μελέτες υποδεικνύουν ότι η ψύξη ή κατάψυξη φρέσκων προϊόντων και άλλων φαγητών μπορούν να επιτρέψουν την επιβίωση σημαντικού αριθμού ιών πριν την αλλοίωση του τροφίμου. Οι εντερικοί ιοί έχει αναφερθεί ότι μπορούν να αντισταθούν σε όξινες συνθήκες και σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Οι μέθοδοι διατήρησης των τροφίμων που έχουν μεγαλύτερη επίδραση στους μικροοργανισμούς απαιτούνται λόγω: 1) της μακροχρόνιας επιβίωσης των ιών κάτω από αυτές τις συνθήκες και 2) την χαμηλή μολυσματική δόση. Η θέρμανση, η επεξεργασία υψηλής υδροστατικής πίεσης και η ακτινοβολία είναι μέθοδοι διατήρησης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία μικροβιακής απενεργοποίησης. Επειδή η πλειονότητα των ιών που μολύνουν τον άνθρωπο και που βρίσκονται στο φαγητό δεν μπορεί να καλλιεργούνται στο εργαστήριο, τα ποσοστά απενεργοποίησης μπορούν κυρίως να αποκτηθούν από υποκατάστατα ιών. Καλλιεργήσιμα ιικά στελέχη και αντιπροσωπευτικά υποκατάστατα ιών γενικά χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της συμπεριφοράς των στελεχών που συνδέονται με την μόλυνση των ανθρώπων, συνοψίζονται και αναζητείται η καταλληλότητα τους (Baert, 2013).

**Θερμική διαδικασία:** Η επίδραση της θερμικής διαδικασίας στα τρόφιμα προκαλεί απενεργοποίηση της δράσης κάποιων ιών, όπως ο καλισιϊός της γάτας (FCV) και ο καλισιϊός του σκύλου (CaCV) τα ποσοστά απενεργοποίησης τους κυμαίνονται από 37 έως 100 βαθμούς Κελσίου. Παρόμοια θερμικά ποσοστά απενεργοποίησης στους 63 και 72 βαθμούς Κελσίου παρατηρήθηκε για τον καλισιϊό της γάτας (FCV) και για τον νοροϊό του ποντικίου (MNV-1).

Διαφορετικές μειώσεις του καλισιϊού της γάτας (FCV) για τον ίδιο συνδυασμό χρόνου-θερμοκρασίας επιτεύχθηκαν από τους Doultree και Buckow. Η πειραματική ρύθμιση, εναιώρημα ιού 100  $\mu\text{L}$  που θερμάνθηκε σε σωλήνες Sarstedt ή εναιώρημα ιού 10  $\mu\text{L}$  προστέθηκε σε προθερμασμένο μέσο 90  $\mu\text{L}$  σε σωλήνες αντίδρασης 0,2 ml, ήταν πιθανό να είναι υπεύθυνη για τις διαφορές στους ρυθμούς απενεργοποίησης θερμότητας.

**Επεξεργασία υψηλής υδροστατικής πίεσης:** Η επεξεργασία υψηλής υδροστατικής πίεσης έχει εφαρμοστεί σε ακατέργαστα δίθυρα οστρακοειδή, χυμούς φρούτων, μηλίτες, μαρμελάδες και ζελέ, πόσιμο γιαούρτι, smoothies, προϊόντα αβοκάντο, ψιλοκομμένα κρεμμύδια και έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα κρέατος. Η επεξεργασία υψηλής υδροστατικής πίεσης δεν διαταράσσει τους ομοιοπολικούς δεσμούς διατηρώντας την αρχική δομή των πρωτεϊνών και διατηρώντας την εμφάνιση, την γεύση, την υφή και τις θρεπτικές ιδιότητες του μη επεξεργασμένου προϊόντος. Αλλαγές στην τριτογενή δομή, διατηρούμενες από υδρόφοβες και ιονικές αλληλεπιδράσεις, γενικότερα παρουσιάζονται συνήθως για πρωτεΐνες παραπάνω από 200MPa. Αποδείχτηκε για το MNV-1 ότι η δομή του ιού διακόπηκε με επεξεργασία υψηλής υδροστατικής πίεσης χωρίς αποικοδόμηση του ιικού καψιδίου της πρωτεΐνης ή της αντιγονικότητας. Ο Kingsley μελέτησε την αντίσταση του HAV σε πουρέ σμέουρων και σε φέτες πράσινων κρεμμυδιών. Ο ιός HAV εκτέθηκε σε πιέσεις 375 MPa σε 21 βαθμούς Κελσίου για 5 λεπτά και μειώθηκε αντιστοίχως 4,3 και 4,7 log σε πουρέ φράουλας και στα κομμάτια πράσινων κρεμμυδιών. Δομικές και οργανοληπτικές αλλαγές παρατηρήθηκαν για επεξεργασμένα ολόκληρα πράσινα κρεμμύδια και φράουλες, αν και τα κομμάτια πράσινων κρεμμυδιών ή ο πουρές φράουλας μπορεί να γίνουν αποδεκτά από τους καταναλωτές ή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενισχυτικό γεύσης ή ως συστατικά για κρέμα, μαρμελάδες, χυμούς ή smoothies. Η επεξεργασία υψηλής υδροστατικής πίεσης χρησιμοποιήθηκε για την μεταχείριση στρειδιών με πίεση 400 MPa για 1 λεπτό και προκαλεί μείωση 3 log του HAV ενώ ο ιός του ποντικίου (MNV-1) μειώθηκε κατά 4 log. Η επίδραση της επεξεργασίας υψηλής υδροστατικής πίεσης στους πικορναϊούς εκτός του HAV ερευνήθηκε στο μέσο κυτταρικής καλλιέργειας από τον Kingsley. Οι ιοί Aichivirus και coxsackievirus B5 παρέμειναν πλήρως μολυσματικοί εάν εφαρμοστούν για 5 λεπτά σε περιβάλλον θερμοκρασίας, ενώ ο coxsackievirus A9 μειώθηκε κατά 7,6 log κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Όμοια ο ιός της πολιομυελίτιδας βρέθηκε ανθεκτικός σε 600 MPa για 1 h.

**Ακτινοβολία:** Η ακτινοβολία είναι μια άλλη μη θερμική προσέγγιση για την απενεργοποίηση των ιών που βρίσκονται στα τρόφιμα. Θεραπεία υπεριώδους φωτός του μαρουλιού σε δόση 40  $\text{mW s/cm}^2$  πέτυχε μείωση 4.3, 4.0 και 3.5 log αντίστοιχα στους ιούς HAV, aichivirus και ο καλισιϊός της γάτας (FCV). Η απενεργοποίηση ήταν περισσότερο



αποτελεσματική στο μαρούλι και λιγότερο αποτελεσματική στις φράουλες. Οι ιοί ήταν πιθανόν προστατευμένοι από το υπεριώδες φως από τη μήτρα της φράουλας. Μια μείωση 3 log επιτεύχθηκε για τον καλσιϊό της γάτας (FCV), τον καλσιϊό του σκύλου (CaCV) σε μέσο αραιωμένης κυτταρικής καλλιέργειας μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία σε δόση αντίστοιχα, 12, 20 και 65 mW s/cm<sup>2</sup>. Το πρωτεϊνικό φορτίο που υπάρχει στο ιϊκό εναιώρημα δεν επηρεάζει την απενεργοποίηση που λαμβάνεται με κατεργασία με υπεριώδη ακτινοβολία, αν και ο σχετιζόμενος με κύτταρα ηχοϊός 12 είχε περίπου τριπλάσια αντίσταση σε υπεριώδες φως από τους ιούς που ελήφθησαν με λύση κυττάρων κατάψυξης-απόψυξης και επακόλουθη σειριακή διήθηση (φίλτρα πολυανθράκων πόρων 0,2 και 0,08 μm). Μπορεί τα μεγάλα οργανικά σωματίδια (>1 μm) να επηρεάσουν την απενεργοποίηση του ιού με ακτινοβολία UV (Baert L., 2013).

Ο τροφογενής ιός έχει μία πιο πολύπλοκη δομή και είναι λιγότερο ανθεκτική σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ο νοροϊός, η ηπατίτιδα A, η ηπατίτιδα E, που στερούνται ενός περιβλήματος λιπιδίου και που έχουν ένα στρώμα πρωτεΐνης, δεν επηρεάζονται από τα παραδοσιακά μέτρα που παίρνονται για τον έλεγχο των τροφογενών μικροοργανισμών, όπως ψύξη και κατάψυξη. Η επεξεργασία του κρέατος σε μεταβαλλόμενο κλίμα δεν επηρεάζει επίσης την μείωση της μόλυνσης από ιούς (Devi Nelluri , Navya Sree Thota, 2018).

Η μολυσματικότητα του ιού χάνεται όταν στεγνώσει σε επιφάνειες, αλλά συνεχίζεται για 30 ημέρες ή παραπάνω όταν στεγνώσει σε χαρτί, υλικό, πλαστικό, αλουμίνιο και πήλινα σκεύη. Η διάρκεια της επιβίωσης συνδέεται με το είδος της επιφάνειας, την υγρασία του αέρα και την παρουσία ή απουσία οργανικού υλικού και επιπλέον της δομής των ιικών πρωτεϊνών καιιδίου (Devi Nelluri , Navya Sree Thota, 2018).

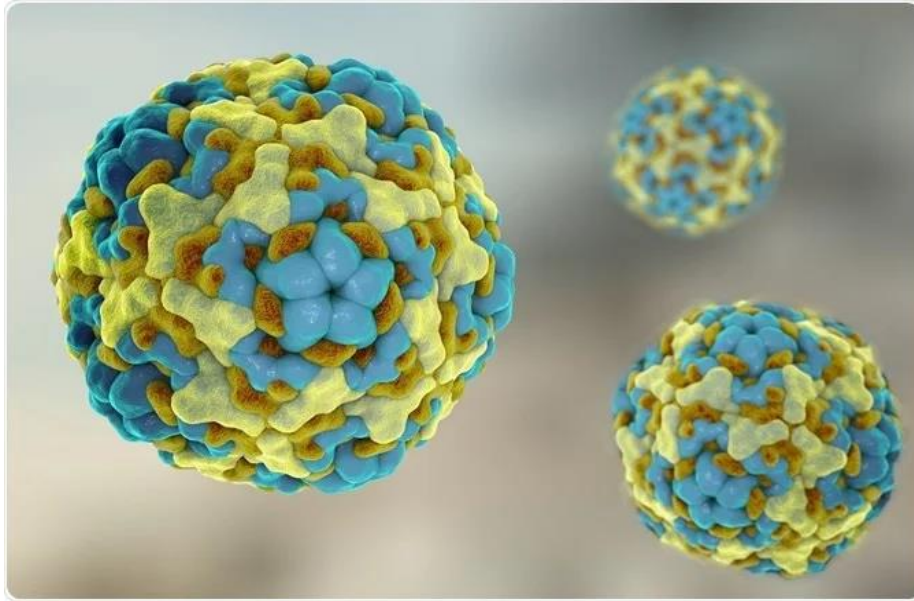
Εκτός από τη θεραπεία με εξαιρετικά υψηλές θερμοκρασίες, καμία στρατηγική δεν θα απενεργοποιούσε εντελώς >3 log της τροφογενούς μόλυνσης και αν τα τρόφιμα μολυνθούν κατά την διάρκεια της προετοιμασίας τότε η μόλυνση παραμένει αρκετά δυναμική ώστε στο τέλος να μολύνει. Το υπεριώδες φως είναι μια βιώσιμη και καθαρή συσκευή για τον έλεγχο της μόλυνσης που προκαλείται από τα τρόφιμα, αλλά έχει μειονεκτήματα λόγω της απουσίας της διείσδυσης στη μήτρα του κρέατος (Devi Nelluri , Navya Sree Thota, 2018).

### 3.2.1 ENΤΕΡΙΚΟΙ ΙΟΙ

Οι εντερικοί ιοί αναπαράγονται μόνο εντός του ανθρώπου ξενιστή και όλα ακολουθούν την διαδρομή μετάδοσης μέσω των κοπράνων ή την διαδρομή μέσω του στόματος. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των εντερικών ιών είναι η άνεση με την οποία μεταδίδεται από

άνθρωπο σε άνθρωπο και η χαμηλή μολυσματική δόση (<20 σωματίδια) που απαιτείται για να προκαλέσει ασθένεια. Οι εντερικοί ιοί είναι επίσης πολύ σταθεροί με αντιστάσεις σε περιβαλλοντικές πιέσεις συγκρινόμενες με αυτές που σχετίζονται με τα βακτηριακά ενδοσπόρια. Οι περισσότερες από τις τροφογενείς ασθένειες που σχετίζονται με τους εντερικούς ιούς είναι ότι είναι βραχύβιοι και δεν είναι απειλητικοί για την ζωή. Ο εντοπισμός πηγών εντερικών ιών είναι δύσκολος λόγω της έλλειψης συνήθων τεχνικών ανίχνευσης συνδυαζόμενες με το γεγονός ότι πολύ λίγες περιπτώσεις ιογενών τροφικών ασθενειών που έχουν αναφερθεί στην πραγματικότητα ( Warriner K., 2005).

Οι άνθρωποι εντερικοί ιοί αποτελούν σημαντική απειλή για την υγεία στο υδάτινο περιβάλλον καθώς μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού. Ανθρώπινες δραστηριότητες όπως ελαττωματικά σηπτικά συστήματα, αγροτική απορροή, αστική απορροή, αποχέτευση λυμάτων και η άμεση παράνομη απόρριψη λυμάτων από τα αγγεία είναι δραστηριότητες με τις οποίες οι εντερικοί ιοί εισάγονται στο περιβάλλον. Υπάρχουν περίπου 140 εντερικοί ιοί που έχουν βρεθεί σε ανθρώπινα απόβλητα και τουλάχιστον το 10% του πληθυσμού μπορεί να αποβάλλει τέτοιους ιούς ανά πάσα στιγμή. Εντερικοί ιοί μπορούν να μεταφερθούν σε όλο το περιβάλλον προσκολλώντας σε σωματίδια σε υπόγεια ύδατα, νερά εκβολών, θαλασσινό νερό και ποτάμια, εκβολές ποταμών και αερολύματα που εκπέμπονται από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Οι εντερικοί ιοί μπορούν να πάρουν πολλές διαδρομές όπως ποτάμια, λίμνες, λύματα, απορροή εδάφους, εκβολές ποταμών και υπόγεια ύδατα. Οι άνθρωποι μπορεί να εκτεθούν σε εντερικούς ιούς μέσω διαφόρων τρόπων: καλλιέργειες που καλλιεργούνται σε εκτάσεις αρδευόμενες με λύματα ή γονιμοποιούνται με λύματα ή γονιμοποιούνται με λύματα, όστρακα που καλλιεργούνται σε μολυσμένο νερό και μολυσμένο πόσιμο νερό. Σε μια μελέτη ξεσπάσματος ασθένειας μεταξύ του 1946 και 1980, ελλείψεις συστήματος νερού που συνέβαλαν σε αυτά τα ξεσπάσματα κατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε κύριους τίτλους: 1) χρήση μολυσμένων επιφανειακών υδάτων που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία, 2) χρήση μολυσμένων υπόγειων υδάτων που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία, 3) ανεπαρκής ή διακοπή της αντιμετώπισης, 4) προβλήματα δικτύου διανομής και 5) διάφορα. Ανεπάρκειες στην επεξεργασία και στην διανομή νερού συνέβαλε σε περισσότερο από το 80% των εστιών (Woods , Burkhardt, 2013).



Εικόνα 5: Εντεροϊός

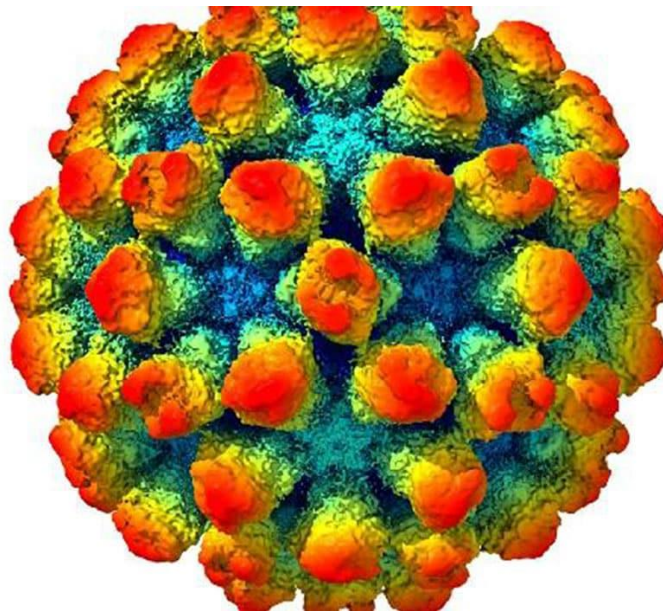
Πηγή: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Enterovirus-71-Structure.aspx>

### 3.2.2 ΝΟΡΟΪΟΣ

Ο νοροϊός, θεωρείται ως ο πρώτος μη βακτηριακός παράγοντας μολύνσεων γαστρεντερίτιδας παγκοσμίως και επίσης υπάρχουν αποδείξεις πως εμπλέκεται σε κρούσματα στο γάλα και στα γαλακτοκομικά, αν και ως επί το πλείστον συνδέεται με την κατανάλωση άλλων προϊόντων διατροφής. Δεδομένου ότι δεν απαιτείται ειδοποίηση μόλυνσης από νοροϊό μπορεί κανείς να υποθέσει ότι οι αναφερόμενες και δημοσιευμένες περιπτώσεις υποτιμούν σε μεγάλο βαθμό το πραγματικό βάρος της ασθένειας. Ωστόσο τα κρούσματα που σχετίζονται με την γαστρεντερίτιδα δίνουν μια ασαφή ένδειξη της εξάπλωσης και συχνότητα εμφάνισης του παθογόνου. Ίσως ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί το πρόσφατο εύρημα ότι τα ανθρώπινα στελέχη νοροϊού μπορούν να βρεθούν σε βοοειδή και να απομονωθούν από τα κόπρανα (Griffiths M.W., Walkling-Ribeiro M., 2012).

Ο νοροϊός είναι ο σημαντικότερος εντερικός ιός που συναντάται στα τρόφιμα και εκτιμάται ότι προκαλεί περισσότερα κρούσματα τροφογενών ασθενειών από άλλα συνδυασμένα παθογόνα. Όσον αφορά την ταξινόμηση, υπάρχουν τέσσερις γονοτυπικές ομάδες εντός του γένους του νοροϊού, με τα G II και III να είναι τα πιο σημαντικά για τους ανθρώπους. Το GII έχει βρεθεί πως έχει ποικίλη συχνότητα στα γουρούνια με ποσοστό επικράτησης μεταξύ των κοπαδιών έως και 87%. Ο νοροϊός έχει βρεθεί επίσης ότι έχει χαμηλή συχνότητα και επίπεδα στο λιανικό κρέας, γεγονός που υποδηλώνει αμελητέο κίνδυνο για την ασφάλεια των

τροφίμων. Επομένως σε σχέση με τα πιο παραδοσιακά μέσα για τον νοροϊό όπως τα θαλασσινά, τα φρέσκα προϊόντα και το νερό, ο ρόλος του κρέατος ή των προϊόντων κρέατος θεωρείται χαμηλός (Warriner & Namvar, 2017).



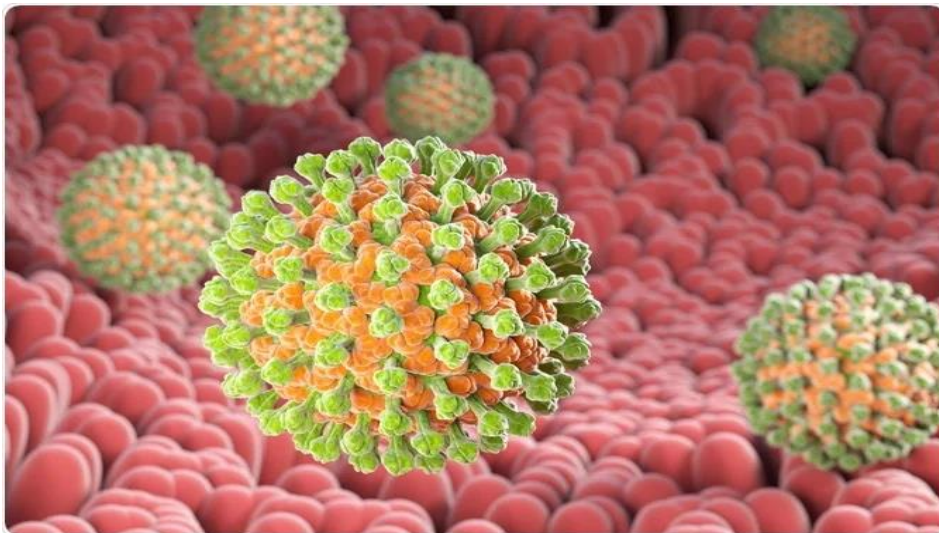
Εικόνα 6: νοροϊός

Πηγή: <https://www.techexplorist.com/detailed-visualization-strain-norovirus/31247/>

### 3.2.3 ΡΟΤΑΪΟΣ

Ο ροταϊός είναι η πιο συνηθισμένη αιτία σοβαρής γαστρεντερίτιδας σε μικρά παιδιά παγκοσμίως, με αποτέλεσμα περίπου 2 εκατομμύρια νοσηλείες και 453,000 θανάτους κάθε χρόνο σε παιδιά ηλικίας κάτω των πέντε ετών. Οι περισσότεροι από τους θανάτους αυτούς συμβαίνουν στην Αφρική και την Ασία, όπου η θεραπεία επανυδάτωσης δεν είναι άμεσα διαθέσιμη. Η θνησιμότητα λόγω ροταϊού σε ανεπτυγμένα συστήματα είναι πολύ χαμηλότερη, αλλά η χρήση της υγειονομικής περίθαλψης και το κόστος εξακολουθούν να είναι σημαντικά. Για παράδειγμα, πριν από την εισαγωγή του εμβολιασμού ροταϊού στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2006, εκτιμάται ότι υπήρχαν 55.000-70.000 νοσηλείες, 205.000-272.000 επισκέψεις σε τμήματα έκτακτης ανάγκης και σχεδόν μισή ώρα εκατομμύρια επισκέψεις εξωτερικών ασθενών που σχετίζονται με γαστρεντερίτιδα ροταϊού πραγματοποιήθηκαν ετησίως, με αποτέλεσμα ένα συνολικό κόστος για την κοινωνία περίπου 893 εκατομμυρίων δολλαρίων, εκ των οποίων 319 εκατομμύρια δολάρια ήταν άμεσες δαπάνες για το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής. Παρά τις διαφορές στην υγιεινή και την

ασφαλή τροφή και νερό, η συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων από ροταϊό είναι παρόμοια τόσο στις αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες και η πρώιμη έκθεση σε ροταϊό είναι καθολική. Αυτό υποδηλώνει ότι η εξάπλωση από άτομο σε άτομο είναι ο πιο σημαντικός τρόπος μετάδοσης και η μολυσμένη τροφή και το νερό έχει δευτερεύων ρόλο. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, ο ροταϊός αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 1% όλων των τροφογενών ασθενειών, προκαλώντας περίπου 15.433 επεισόδια γαστρεντερίτιδας και 348 νοσηλείες ετησίως. Στην Αυστραλία πιστεύεται ότι περίπου το 2% της νόσου του ροταϊού είναι τροφογενής, προκαλώντας περίπου 4700 επεισόδια γαστρεντερίτιδας και 70 νοσηλείες ετησίως. Το 1995, η συχνότητα εμφάνισης τροφογενούς νόσου ροταϊού στην Αγγλία εκτιμήθηκε ότι ήταν 2,5 ασθένειες ανά 1000 άτομα-έτη, με περίπου 8979 περιπτώσεις, 1497 επισκέψεις γενικού ιατρού, 46 νοσηλείες και 4 θάνατοι λόγω τροφογενών ασθενειών από ροταϊούς που εμφανίστηκαν στη χώρα αυτή το 2000. Το οικονομικό βάρος της τροφογενούς ασθένειας που σχετίζεται με τον ροταϊό έχει εκτιμηθεί πρόσφατα για τις Ηνωμένες Πολιτείες. Το 2010, η τροφογενής ασθένεια του ροταϊού κόστισε κατά μέσο όρο 1154 δολάρια ανά επεισόδιο σε άμεσες δαπάνες υγειονομικής περίθαλψης και απώλεια παραγωγικότητας, που ισοδυναμεί με ένα συνολικό κόστος 18 εκατομμυρίων δολλαρίων (Gastañaduy et al, 2013).



Εικόνα 7: Ροταϊός

Πηγή: <https://www.news-medical.net/health/Rotavirus-Transmission.aspx>

## 2.3 ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Α

Η λοίμωξη από ηπατίτιδα Α είναι μία από τις πιο συχνά αναφερόμενες ασθένειες που μπορούν να προληφθούν από εμβόλια στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. Χαρακτηρίζεται

από πυρετό, αδιαθεσία, ίκτερο και ναυτία που προκαλείται από τον ιό της ηπατίτιδας Α (HAV) και είναι παρόμοια με την ηπατίτιδα που προκαλείται από άλλα ιογενή παθογόνα. Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις ηπατίτιδας Α είναι αυτοπεριορισμένες, φλεγμονώδης ηπατίτιδα που οδηγεί σε θάνατο μπορεί να συμβεί. Διαδεδομένος εμβολιασμός ρουτίνας κατά της ηπατίτιδας Α είχε ως αποτέλεσμα μια σημαντική μείωση των λοιμώξεων από ηπατίτιδα Α, με μείωση των προηγούμενων φυλετικών ή εθνικών και γεωγραφικών ανισοτήτων (Blumberg, 2012).

Ο ιός της ηπατίτιδας Α (HAV) είναι ένας μη τυλιγμένος ιός σε εικοσαεδρικό σχήμα που αναπαράγεται στο κυτόπλασμα. Το γονιδίωμα αποτελείται από μονόκλωνο RNA που αποκωδικοποιεί πληροφορίες για 11 μεμονωμένες πρωτεΐνες. Υπάρχουν 4 στενά συνδεδεμένοι γονότυποι από ανθρώπινα HAV στελέχη αλλά μόνο ένας σημαντικός ορότυπος (Blumberg, 2012).

Περίπου 1,5 εκατομμύρια κλινικά περιστατικά από ηπατίτιδα Α συμβαίνουν κάθε χρόνο παγκοσμίως και ο επιπολασμός των αντισωμάτων(που δείχνει προηγούμενη ασθένεια) στον πληθυσμό μπορεί να ποικίλλει από 15% έως σχεδόν 100% σε συγκεκριμένες χώρες. Οι σκανδιναβικές χώρες δείχνουν το χαμηλότερο επιπολασμό της μόλυνσης, περίπου 15%. Σε άλλες περιοχές της Ευρώπης, της Αυστραλίας, της Ιαπωνίας και των Ηνωμένων Πολιτειών ο οροεπιπολασμός αντισωμάτων έναντι HAV είναι 30% έως 70% σε ενήλικες (Blumberg, 2012).

Ο ιός της ηπατίτιδας Α συνήθως συστέλλεται μέσω της κατάποσης. Η κύρια θέση αντιγραφής είναι το ήπαρ και ο ιός χύνεται στη χολή με επακόλουθη διέλευση στα έντερα και κόπρανα. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση του ιού στα κόπρανα οπότε και η περίοδος μεγαλύτερης μολυσματικότητας, εμφανίζεται κατά την διάρκεια των 2 εβδομάδων πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων. Τα μολυσμένα κόπρανα οδηγούν σε μετάδοση σε άλλους, είτε με κατάποση μολυσμένου νερού είτε φαγητό ή επαφή από άτομο σε άτομο. Ένα ξέσπασμα λοιμώξεων από ηπατίτιδα Α μπορεί να προκληθεί από συνδυασμό αυτών των παραγόντων. Για παράδειγμα, μολυσμένα τρόφιμα μπορεί να μολύνουν σε ένα εστιατόριο τους πελάτες και τους υπαλλήλους, οι οποίοι στην συνέχεια θα αποτελέσουν την πηγή περαιτέρω μετάδοσης στις μεγαλύτερες κοινότητες τους(Blumberg, 2012).

Τα παιδιά διατρέχουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης. Αυτό συμβαίνει διότι τα παιδιά έχουν περιορισμένη επάρκεια στις προσωπικές συνήθειες υγιεινή και τουαλέτας και λόγω της τάσης τους να εξερευνούν το περιβάλλον με το στόμα τους. Επειδή τα περισσότερα μολυσμένα παιδιά έχουν ασυμπτωματική ή μη αναγνωρισμένη λοίμωξη, μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στις εκδηλώσεις της κοινότητας (Blumberg, 2012).

Οι επιδημίες που μπορεί να εμφανιστούν σε τοπικό ή εθνικό επίπεδο, συχνά σχετίζονται με τροφιμογενείς εστίες. Με συχνότερα διεθνή ταξίδια και παγκόσμια παραγωγή τροφίμων, η

ηπατίτιδα Α μπορεί εύκολα να εξαπλωθεί πέρα από τις περιοχές γνωστής υψηλής ενδημίας σε οποιαδήποτε περιοχή του κόσμου. Σε κοινότητες με υψηλά ποσοστά ηπατίτιδας Α, οι περισσότεροι άνθρωποι έχουν μολυνθεί πριν φτάσουν στην νεανική ενηλικίωση. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, κοινότητες με υψηλά ποσοστά μόλυνσης συμπεριλαμβανομένων των Ιθαγενών της Αλάσκας, Ινδιάνων και συγκεκριμένων Ισπανόφωνων, μεταναστών και θρησκευτικών κοινοτήτων, τα υψηλά ποσοστά μόλυνσης τα πρόσφατα χρόνια έχουν μειωθεί, εξαιτίας των εκτεταμένων εμβολιασμών. Σε κοινότητες με χαμηλά ποσοστά ηπατίτιδας Α, οι περισσότερες λοιμώξεις συμβαίνουν σε παιδιά σχολικής ηλικίας, εφήβους και νεαρές ηλικίας (Blumberg, 2012).

## 2.4 ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Ε

Η ηπατίτιδα Ε είναι η κύρια αίτια οξείας ηπατίτιδας που μεταδίδεται στο νερό στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η ασθένεια είναι ενδημική σε τμήματα του κόσμου με κακή υγιεινή, όπου εμφανίζονται μεγάλες εκδηλώσεις. Το πρώτο αναφερόμενο κρούσμα ηπατίτιδας Ε συνέβη στο Δελχί της Ινδίας το 1955 και 1956, όμως δεν αναγνωρίστηκε ως τέτοιο μέχρι την δεκαετία του 1990, όταν οι εξελίξεις στην μοριακή διάγνωση και την ανοσοδιαγνωστική κατέστησαν δυνατό τον προσδιορισμό του ιικού παράγοντα. Στις ανεπτυγμένες χώρες, η ασθένεια αρχικά θεωρήθηκε ότι σχετίζεται μόνο με ταξίδια σε ενδημικές περιοχές. Τρόποι μετάδοσης ηπατίτιδας Ε σε ανεπτυγμένες χώρες είναι ακόμη ασαφείς, αλλά αρκετές περιπτώσεις τροφογενούς μετάδοσης έχουν αναφερθεί (Cook et al, 2014).

Η μολυσματική δόση του ιού της ηπατίτιδας Ε (HEV) είναι προς το παρόν άγνωστη. Μετά την είσοδο του ιού μέσω της στοματικής οδού, ο ιός διέρχεται μέσω του εντερικού σωλήνα όπου και πιθανόν αναπαράγεται. Ο ιός στη συνέχεια περνά στο ήπαρ και μετά την αναπαραγωγή απελευθερώνεται στη χολή και στο αίμα με μηχανισμούς που δεν είναι κατανοητοί. Η αναπαραγωγή του ιού της ηπατίτιδας Ε στο ήπαρ έχει ως αποτέλεσμα βλάβη σε αυτό το όργανο, αλλά η παθογένεση και οι μηχανισμοί βλάβης στο ήπαρ από τον ιό της ηπατίτιδας Ε δεν έχουν εξηγηθεί ακόμη. Ωστόσο ανοσοποιητικοί μηχανισμοί πιθανότατα εμπλέκονται (Cook et al, 2014).

Ο πιο κοινός τρόπος μετάδοσης ηπατίτιδας Ε είναι η κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού, ενώ η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο είναι σπάνια. Η εμφάνιση ηπατίτιδας Ε είναι υψηλότερη στην κεντρική και νοτιοανατολική Ασία, την βόρεια και δυτική Αφρική και στο Μεξικό, περιοχές όπου η μόλυνση των υδάτων είναι συχνή και ο οροεπιπολασμός σε πληθυσμούς από ενδημικές περιοχές κυμαίνονται μεταξύ 3% και 26% (Cook et al, 2014).

Υπήρξαν μερικές αναφορές τροφογενών εκδηλώσεων από ηπατίτιδα Ε. Όμως πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση μολυσμένων και άψητων κρεάτων από μολυσμένους χοίρους, αγριόχοιρους και ελάφια μπορεί να είναι παράγοντας κινδύνου για την απόκτηση αυτής της ασθένειας. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση μη ψημένου ήπατος χοίρου και κρέατος αγριόχοιρου μπορεί να ήταν η αιτία ορισμένων περιπτώσεων ηπατίτιδας Ε στην Ιαπωνία. Το συκώτι του αγριόχοιρου τρώγεται συχνά ωμό στην Ιαπωνία και αυτό έχει συνδεθεί με ορισμένες περιπτώσεις ηπατίτιδας Ε. Στο Μπαλί, ωμό κρέας χοίρων ή φρέσκο αίμα χοίρου καταναλώνεται και η οροθετικότητα στον ιό της ηπατίτιδας Ε είναι σχετικά υψηλή στον ανθρώπινο πληθυσμό. Σε περιστατικό ηπατίτιδας Ε στο Ηνωμένο Βασίλειο, το οποίο προκλήθηκε από στέλεχος του ιού της ηπατίτιδας το οποίο ήταν πολύ παρόμοιο με τα στελέχη των χοίρων, ο ασθενής παραδέχτηκε την κατανάλωση προϊόντων ωμού χοιρινού κρέατος, παρόλο που δεν ήταν αυτή η αιτία της μόλυνσης. Πρόσφατα η κατανάλωση οστρακοειδών έχει αναφερθεί ως πιθανή αιτία εκδήλωσης του ιού της ηπατίτιδας Ε σε ένα κρουαζιερόπλοιο, τα οποία οστρακοειδή πιθανόν να έχουν μολυνθεί από διήθηση μολυσμένου νερού. Η κατανάλωση άψητων οστρακοειδών έχει επίσης αποδειχθεί ως πιθανός παράγοντας απόκτησης της λοίμωξης σε άλλες μελέτες (Cook et al, 2014).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

#### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο όρος παθογένεια συσχετίζεται με τον μηχανισμό με τον οποίο διάφοροι παράγοντες όπως μικροοργανισμοί ή τοξίνες, μπορούν να προκαλέσουν κάποια νόσο ή πάθηση σε έναν οργανισμό. Στη συγκεκριμένη εργασία, εξετάζεται η παθογένεια των ιών που βρίσκονται στα διάφορα τρόφιμα που καταναλώνει ο άνθρωπος. Το νερό θεωρείται σημαντικό καθώς μπορεί να οδηγήσει στην μετάδοση των ιών στους ανθρώπους τόσο μέσω της άμεσης κατανάλωσης πόσιμου νερού όσο και έμμεσα, όταν χρησιμοποιείται ως συστατικό των τροφίμων (πχ στο ανασυσταμένο γάλα), στην παραγωγή (π.χ. νερό άρδευσης), στην επεξεργασία (πλύσιμο), στη μεταφορά (πχ συσκευασία πάγου) ή στο τελικό παρασκεύασμα (FAO/WHO, 2008).

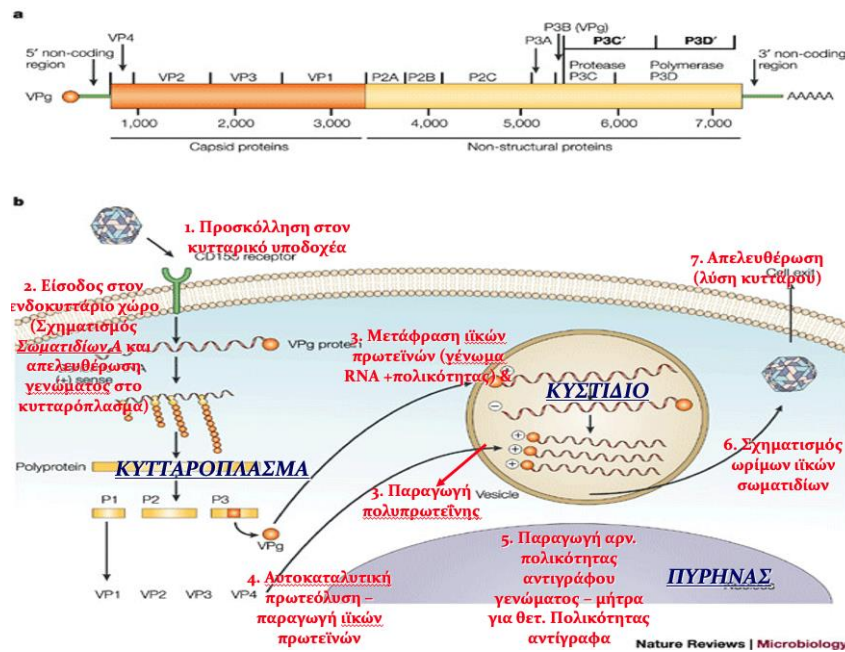
Οι ιοί είναι πολύ μικροί οργανισμοί με μήκος που κυμαίνεται από 0,02μm ως 0,4 μm σε διάμετρο. Οι ιοί χρησιμοποιούν τους ξενιστές για να πολλαπλασιαστούν. Έχουν σημαντικές διαφορές στις δομικές και βιολογικές ιδιότητες τους. Εκτός από το μέγεθος, διαφοροποιούνται ως προς το γονιδίωμα του ιού (DNA ή RNA, δίκλωνο ή μονόκλωνο μόριο), , η δομή του μπορεί να είναι απλή: δηλαδή να περιλαμβάνει ένα γονιδίωμα μέσα σε μία πρωτεϊνική επικάλυψη, όπως συμβαίνει με τους περισσότερους ιούς που μεταδίδονται μέσω της τροφής, ως μία αρκετά πιο πολύπλοκη δομή που αποτελείται από ένα τμηματοποιημένο γονιδίωμα, εγκλεισμένο σε ένα σύνθετο καψίδιο πρωτεΐνης το οποίο περιβάλλεται από μεμβράνη. Όσο πιο σύνθετη δομή διαθέτει ο ιός, τόσο λιγότερο ανθεκτικός είναι (FAO/WHO, 2008).

Οι ιοί προκαλούν ένα ευρύ φάσμα ασθενειών σε φυτά ζώα και ανθρώπους και μπορούν να μεταδοθούν με διάφορους τρόπους, όπως μέσω της αναπνευστικής οδού, μέσω σεξουαλικής επαφής, μέσω της επαφής με μολυσμένα προϊόντα ή μολυσμένα ζώα (ζωονοσογόνοι ιοί) κ.λπ. Οι ιοί που εμπλέκονται συχνότερα με τις τροφιμογενείς λοιμώξεις , όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι κυρίως οι νοροϊοί και η ηπατίτιδα Α. Ωστόσο και άλλοι ιοί μπορούν να μεταδοθούν μέσω των τροφίμων, όπως είναι ο ροταϊός, η ιός της ηπατίτιδας Ε, ο αστροϊός, οι εντεροϊοί, οι αδενοϊοί . Με βάση τα συμπτώματα της λοίμωξης, ομαδοποιούνται στις ομάδα των ιών που προκαλούν γαστρεντερετίδα, στην ομάδα των εντερικά μεταδιδόμενης ηπατίτιδας και μία τρίτη ομάδα που αναπαράγεται στο ανθρώπινο έντερο, αλλά προκαλεί ασθένεια μόνο μετά τη μετανάστευσή της σε άλλα όργανα του ανθρώπινου σώματος, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα (π.χ. εντεροϊό) (FAO/WHO, 2008).

Οι τροφές που περιέχουν ιούς για να προκαλέσουν λοίμωξη και ασθένεια απαιτείται (FAO/WHO, 2008).:

- Οι ιοί να εισέλθουν σε ζωντανά κύτταρα για να μπορέσουν να αναπαραχθούν. Σε αντίθεση με τα βακτήρια, δεν πολλαπλασιάζονται μέσα στα τρόφιμα. Κατά συνέπεια, δε θα προκαλέσουν αλλοίωση του προϊόντος και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Άρα, δεν είναι δυνατόν η παρουσία των ιών σε ένα τρόφιμο να γίνει αντιληπτή με τις ανθρώπινες αισθήσεις.
- Απαιτείται ένας μικρός αριθμός ιικών σωματιδίων, μόλις 1 ως 100 σωματίδια, ώστε να μολυνθεί το άτομο και να εκδηλωθεί η ασθένεια.
- Στα κόπρανα των μολυσμένων ατόμων ο αριθμός των ιικών σωματιδίων είναι υψηλός. Συχνά υπερβαίνει τα  $10^7$  σωματίδια ανά γραμμάρια κόπρανα σε περιπτώσεις κλινικής νόσου με ως  $10^{11}$  σωματίδια ανά γραμμάρια κόπρανα στην περίπτωση του ανθρώπινου ροταϊού
- Οι ιοί που μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού έχει αποδειχθεί ότι είναι ανθεκτικοί και παραμένουν στο περιβάλλον. Οι περισσότεροι ιογενείς ιοί δεν έχουν περίβλημα και ως εκ τούτου είναι αρκετά ανθεκτικοί έξω από τον ξενιστή, ενώ παρουσιάζουν αντίσταση σε ακραίο pH (οξύ ή αλκαλικό), σε συνθήκες ξήρανσης, σε έκθεση στην ακτινοβολία κ.λπ.
- Η μετάδοση ζωνοσογόνων ιών μέσω τροφής, όπως είναι συνηθισμένο για πολλά βακτηριακά παθογόνα, π.χ. *Salmonella* and *Campylobacter* spp., είναι ασυνήθιστο για ιούς, με εξαίρεση τον ιό της ηπατίτιδας Ε.
- Οι νοροϊοί και ο ιός της ηπατίτιδας Α είναι πολύ μολυσματικά και η εξάπλωση από άτομο σε άτομο είναι η πιο κοινή οδός μετάδοσης. Η δευτερογενής εξάπλωση αυτών των ιών μετά την εισαγωγή, για παράδειγμα, μέσω της μόλυνσης από τα τρόφιμα, είναι συχνή και συχνά οδηγεί σε μεγαλύτερες παρατεταμένες εστίες. Επιπλέον, η μόλυνση από τα τρόφιμα μπορεί να είναι αποτέλεσμα χειριστών τροφίμων που οι ίδιοι έχουν προσβληθεί από τους ιούς και παραμένουν στη γραμμή παραγωγής τροφίμων, μεταδίδοντας έτσι εν γνώσει τους τις μολύνσεις τους στα τρόφιμα.

### 3.2 ΕΝΤΕΡΙΚΟΙ ΙΟΙ



Εικόνα 8: Κύκλος ζωής εντεροϊών

Πηγή: ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»<sup>1</sup>

Η κατανάλωση ψαριών και βρώσιμων μαλακίων ελοχεύει ένα βαθμό κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία λόγω της ικανότητάς τους να φιλτράρουν, να συσσωρεύουν και να συγκεντρώνουν τα παθογόνα που υπάρχουν στο νερό. Τα λαχανικά και οι καρποί φρούτων, εάν ποτίζονται με μολυσμένο νερό, μπορούν να διατηρήσουν μικροβιακούς παράγοντες στις επιφάνειές τους, συμπεριλαμβανομένων των εντερικών ιών και, επομένως, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της μόλυνσης του περιβάλλοντος και των τροφίμων. Οι εντεροϊοί συχνά σχετίζονται με τα ανθρώπινα λύματα, με τα οποία μεταφέρονται στον υδροφόρο ορίζοντα (Purpari et al., 2019). Μολύνουν και καταφέρνουν να επιβιώσουν σε υφάλμυρα νερά και στη θάλασσα, εισέρχονται στον πεπτικό σωλήνα των θαλασσινών και οστρακοειδών, όπου φιλοξενούνται για ημέρες ή εβδομάδες. Τα οστρακοειδή τρώγονται συνήθως χωρίς να αφαιρεθεί ο πεπτικός σωλήνας, ωμά ή ελαφρώς μαγειρεμένα, και η ήπια θέρμανση συχνά δεν είναι επαρκής να απενεργοποιήσει τους ιούς (Bintsis, 2017)

<sup>1</sup> Βλ.

[https://www.google.gr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwja9bGbsIPxAhWo\\_7sIHU48DJ0QFjABegQIBRAE&url=https%3A%2F%2Fclass.uoa.gr%2Fmodules%2Fdocument%2Ffile.php%2FMED736%2F%25CE%259C%25CE%2591%25CE%2598%25CE%2597%25CE%259C%25CE%2591%25CE%25A4%25CE%2591%2520%25CE%2591%25CE%259C%25CE%25A6%25CE%2599%25CE%2598%25CE%2595%25CE%2591%25CE%25A4%25CE%25A1%25CE%259F%25CE%25A5%2FPICORNAVIRIDAE-siafakas.ppt&usg=AOvVaw25eqtl3ey98pW-lAyjOjps](https://www.google.gr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwja9bGbsIPxAhWo_7sIHU48DJ0QFjABegQIBRAE&url=https%3A%2F%2Fclass.uoa.gr%2Fmodules%2Fdocument%2Ffile.php%2FMED736%2F%25CE%259C%25CE%2591%25CE%2598%25CE%2597%25CE%259C%25CE%2591%25CE%25A4%25CE%2591%2520%25CE%2591%25CE%259C%25CE%25A6%25CE%2599%25CE%2598%25CE%2595%25CE%2591%25CE%25A4%25CE%25A1%25CE%259F%25CE%25A5%2FPICORNAVIRIDAE-siafakas.ppt&usg=AOvVaw25eqtl3ey98pW-lAyjOjps)

Οι εντεροϊοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερα είδη (Purpari et al., 2019):

- coxsackievirus A9
- coxsackievirus B1–6 και τους περισσότερους από τους echovirus
- hEV C όπου περιλαμβάνει τον ιό πολιομυελίτιδας 1-3
- ορισμένα στελέχη coxsackievirus A.

Οι εντεροϊοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο μετά την είσοδο στον οργανισμό πολλαπλασιάζονται στις βλεννογόνους του στόματος, του φάρυγγα και του εντέρου. Είναι χαρακτηριστικό ότι στην πλειοψηφία τους επιβιώνουν το πολύ όξινο pH του στομάχου. Στη συνέχεια μπορούν να προσβάλλουν το λεμφικό σύστημα και σε σπάνιες περιπτώσεις μπορούν να δημιουργήσουν προσβολή του Κεντρικού Νευρικού συστήματος (Purpari et al., 2019).

#### 4.3 ΝΟΡΟΪΟΣ

Οι μολύνσεις με νοροϊό μπορεί να συμβούν σε όλη τη διάρκεια του χρόνου και προκαλούν ασθένεια σε άτομα όλων των ηλικιών. Η ασθένεια συνολικά είναι σχετικά ήπια, αλλά μπορεί να εξελιχθεί σε πιο σοβαρή ασθένεια και να οδηγήσει σε θάνατο όταν μολυνθούν άτομα που ανήκουν στις ομάδες κινδύνου όπως οι ηλικιωμένοι ή τα άτομα με υποκείμενο νόσημα. Αν κάποιος εξετάσει τις λοιμώξεις από νοροϊό που σχετίζονται με την υγιεινομική περίθαλψη και όχι με τροφική λοίμωξη, θα παρατηρήσει ότι παρουσιάζουν καθαρές εποχιακές κορυφές, κυρίως τον χειμώνα στην Ευρώπη, την Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία, την Ιαπωνία και τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Όπου είναι διαθέσιμα, τα δεδομένα, οι νοροϊοί αποτελούν μία από τις κύριες εστίες τροφιμογενών νοσημάτων και έχουν συσχετιστεί με ένα ευρύ φάσμα ειδών διατροφής. Τρεις κύριες εστίες μόλυνσης διακρίνονται (FAO/WHO, 2008):

- (i) εστίες που προκαλούνται από μολυσμένους χειριστές τροφίμων
- (ii) εστίες λόγω μολυσμένων δίθυρων μαλακίων
- (iii) εστίες που οφείλονται σε μολυσμένα προϊόντα (μούρα, κρεμμύδια)

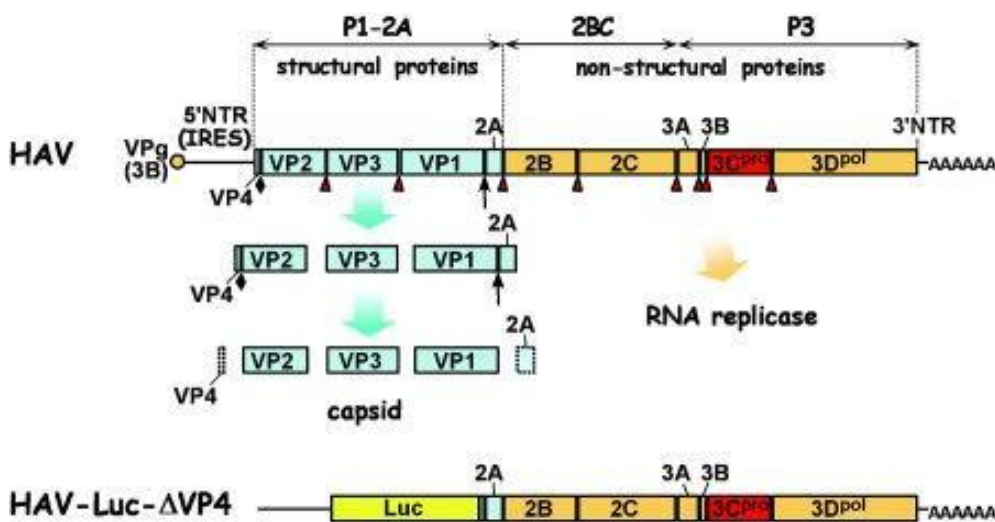
#### 4.4 ΡΟΤΑΪΟΣ

Οι ροταϊοί (Rotaviruses) έχουν δίκλωνο RNA. Ο ανθρώπινος ροταϊός είναι, όπως αναφέρθηκε, η κύρια αιτία την ιογενή γαστρεντερίτιδα σε βρέφη και παιδιά, σε παγκόσμιο επίπεδο. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, η διάρροια που προκαλεί η γαστρεντερίτιδα οδηγεί σε

ταχεία αφυδάτωση, η οποία οδηγεί στο θάνατο μικρών παιδιών. Αιτία της ταχείας αφυδάτωσης θεωρείται μία ιογενής τοξίνη που απαιτεί επιθετική θεραπεία. Ο ροταϊός μεταδίδεται κυρίως από άτομο σε άτομο, αλλά σε περιοχές όπου οι συνθήκες υγιεινής δεν είναι καλές, η μεταφορά μέσω νερού και τροφής διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (FAO/WHO, 2008).

#### 4.5 ΙΟΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Α

Ο ιός της ηπατίτιδας Α ανήκει στην οικογένεια Picornaviridae και το γένος Hepatovirus. Το γενετικό υλικό του ιού είναι μονόκλωνο RNA που αποτελείται από 7500 νουκλεοτίδια (nt) και κατά το στάδιο της μεταγραφής παράγει 11 πρωτεΐνες δομικές και μη δομικές. Γενικά, ο ιός της ηπατίτιδας έχει 6 γονότυπος από τους οποίους οι 4 γονότυποι (I, II, III, IV) έχουν βρεθεί στον άνθρωπο. Ωστόσο, υπάρχει ένας μόνο ορότυπος. Δεν έχει έλυτρο, και περιβάλλεται από καψίδιο το οποίο παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην έκθεση σε απορρυπαντικά, οξέα και υψηλή θερμοκρασία (Χατζηγιάννη, 2017).



Εικόνα 9: Ιός ηπατίτιδας.

Πηγή: Χατζηγιάννη, 2017

Η συχνότητα εμφάνισης λοίμωξης HAV ποικίλλει σημαντικά μεταξύ και εντός των χωρών. Στις περισσότερες αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η λοίμωξη από ηπατίτιδα Α είναι ενδημική, η πλειονότητα των ατόμων μολύνονται στην πρώιμη παιδική ηλικία, όταν η λοίμωξη είναι γενικά ασυμπτωματική. Σχεδόν όλοι οι ενήλικες έχουν ανοσία. Στις ανεπτυγμένες χώρες,

ωστόσο, οι λοιμώξεις από ΗΑV είναι λιγότερο συχνές ως αποτέλεσμα βελτιωμένου βιοτικού επιπέδου. Πολύ λίγα άτομα έχουν μολυνθεί στην πρόιμη παιδική ηλικία και η πλειονότητα των ενηλίκων παραμένει ευαίσθητη σε λοίμωξη από ηπατίτιδα Α. Αργότερα στη ζωή, η λοίμωξη ΗΑV μπορεί να οδηγήσει σε πιο σοβαρή έκβαση της νόσου. Ως αποτέλεσμα, ο πιθανός κίνδυνος εκδήλωσης ηπατίτιδας Α αυξάνεται σε αυτές τις περιοχές (FAO/WHO, 2009).

Στον παρακάτω πίνακα, είναι ο αριθμός των δηλωμένων κρουσμάτων με ηπατίτιδα Α στην Ελλάδα. Συνολικά για την περίοδο 2004-2019 τα δηλωθέντα κρούσματα ήταν 1955 και ο μέσος ετήσιος αριθμός τους ήταν 122 (ΕΟΔΥ, 2020).

Πίνακας 2: Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων και επίπτωση της ηπατίτιδας Α στην Ελλάδα για τη χρονική περίοδο 2004-2019

Έτος	Αριθμός κρουσμάτων	Ετήσια επίπτωση (ανά 100000 πληθυσμού)
2004	52	0,48
2005	160	1,46
2006	120	1,09
2007	282	2,56
2008	119	1,08
2009	89	0,80
2010	58	0,52
2011	41	0,37
2012	74	0,67
2013	165	1,50
2014	86	0,79
2015	62	0,57
2016	214	1,98
2017	294	2,73
2018	110	1,01
2019	29	0,27
<b>Σύνολο</b>	<b>1955</b>	<b>1,12</b>

Πηγή: Επιδημιολογικά δεδομένα για την περίοδο 2004-2019

#### 4.6 ΙΟΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Ε

Ο ιός της ηπατίτιδας Ε είναι από καιρό γνωστός ως ενδημική ασθένεια σε περιοχές με κακές συνθήκες υγιεινής, προκαλώντας οξεία αυτοπεριοριζόμενη ηπατίτιδα. Σε έγκυες γυναίκες, η ασθένεια είναι συχνά σοβαρή, με υψηλό κίνδυνο θνησιμότητας. Η ηπατίτιδα Ε αναγνωρίζεται ως η κύρια αιτία της ιογενούς ηπατίτιδας στους ανθρώπους στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η μετάδοση σε περιοχές με υψηλό ενδημικό επίπεδο είναι γενικά μέσω μολυσμένου νερού με κόπρανα και έχουν τεκμηριωθεί μεγάλες εκδηλώσεις. Επίσης, η ηπατίτιδα Ε έχει θεωρηθεί ασθένεια που σχετίζεται με το ταξίδι στις ανεπτυγμένες χώρες. Ωστόσο, υπάρχουν τώρα αυξανόμενες ενδείξεις για τοπικά λαμβανόμενες λοιμώξεις από την ηπατίτιδα Ε σε ανθρώπους στις χώρες αυτές. Πρόσφατα, μια παραλλαγή του ιού που ανακαλύφθηκε σε χοίρους παγκοσμίως έχει συνδεθεί με περιπτώσεις λοιμώξεων από την ηπατίτιδα Ε σε ανθρώπους χωρίς ιστορικό ταξιδιών στο εξωτερικό. Έχει τεκμηριωθεί η μετάδοση μέσω τροφής μέσω κατανάλωσης ωμού ή μη ψημένου κρέατος, αλλά δεν είναι σαφές πόσο σημαντικός είναι αυτός ο τρόπος μετάδοσης στην επιδημιολογία (FAO/WHO, 2008).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

#### 5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

Η μικροβιολογική παρακολούθηση της ασφάλειας των τροφίμων και των υδάτινων πόρων επί του παρόντος επικεντρώνεται κυρίως στη βακτηριακή μόλυνση και όχι στους ιούς. Επομένως, παρά την αυξανόμενη προσοχή στην ασφάλεια των τροφίμων, οι ιοί που μεταδίδονται με τροφή ή το νερό προκαλούν εκατοντάδες χιλιάδες θανάτους κάθε χρόνο. Οι πιο ευάλωτοι πληθυσμοί πλήττονται περισσότερο, δηλαδή μικρά παιδιά, ηλικιωμένοι και ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Hrdy et al., 2021).

Τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease and Prevention – CDC) των ΗΠΑ, διενήργησαν λεπτομερή ανάλυση των επιδημιών γαστρεντερίτιδας για την περίοδο 2009-2012. Το 48% των εστιών που προέρχονταν από τροφή αναφέρθηκε ότι οφείλονταν σε νοροϊό. Οι συνηθέστερες κατηγορίες τροφίμων που αποτέλεσαν εστία μόλυνσης ήταν τα πράσινα φύλλα, τα φρέσκα φρούτα και τα οστρακοειδή. Ωστόσο, οποιοδήποτε φαγητό μπορεί να αποτελέσει εστία. Τα μολυσμένα ακατέργαστα συστατικά ή τα φρέσκα προϊόντα μπορούν να προέρχονται ακόμη και από πολύ απομακρυσμένες περιοχές, αυξάνοντας έτσι τον δυνητικό κίνδυνο οι μολύνσεις να εξαπλωθούν σε όλο τον κλάδο της τεχνολογίας τροφίμων (Bosch et al, 2018).

Οι αναλυτικές μέθοδοι για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των ιών στα τρόφιμα αλλά και στο περιβάλλον περιλαμβάνουν τρία κύρια στάδια (Mattison & Bidawid, 2009):

1. Προετοιμασία του δείγματος
2. Ανίχνευση
3. Ταυτοποίηση

Γίνεται προσπάθεια να ενσωματωθούν αυτά τα τρία βήματα σε μία ταχεία δοκιμή και να αλλάξουν τη φύση των δοκιμών ιολογίας τροφίμων.



## 5.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η προετοιμασία των δειγμάτων είναι το πιο δύσκολο πρόβλημα στην ιολογία των τροφίμων. Είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των ιογενών σωματιδίων από το μητρικό υλικό στο οποίο βρίσκονται. Μια μέθοδος διαχωρισμού πρέπει να συγκεντρώνει χαμηλά επίπεδα ιικών σωματιδίων και να εξαλείφει τυχόν ανασταλτικές ουσίες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την αναλυτική διαδικασία (Mattison & Bidawid, 2009).

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές διαδικασίες που έχουν δοκιμαστεί ώστε να απομονωθούν και να συγκεντρωθούν οι ιοί από τα δείγματα τροφίμων, ώστε στη συνέχεια όταν οδηγηθούν στο σύστημα ανίχνευσης να μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση και η καταμέτρησή τους. Τα πιο συνηθισμένα από αυτά είναι: έκλυση και συγκέντρωση των ιών με πολυαιθενυλογλυκόλη (PEG), προσρόφηση και έκλυση με τη βοήθεια φορτισμένων φίλτρων, έκλυση και συγκέντρωση με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια, έκλυση και συγκέντρωση με υπερφυγοκέντρης, έκλυση και συγκέντρωση με υπερδιήθηση. Κάθε φορά η μέθοδος που επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί υπαγορεύεται από τον τύπο του δείγματος (Mattison & Bidawid, 2009).

**Έκλυση και συγκέντρωση των ιικών σωματιδίων με πολυαιθενυλογλυκόλη (PEG):** Πρόκειται για μία απλή και με χαμηλό κόστος διαδικασία που έχει χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικούς ιούς και σε μεγάλη ποικιλία δειγμάτων. Παρέχει καλύτερα όρια ανίχνευσης από τις υπόλοιπες μεθόδους απομόνωσης των ιών σε λιπαρά και πρωτεϊνούχα τρόφιμα. Η πολυαιθενυλογλυκόλη είναι ένα μη ιοντικό, υδατοδιαλυτό πολυμερές. Η προσθήκη επαρκούς ποσότητας πολυαιθενυλογλυκόλης σε ένα δείγμα προκαλεί καθίζηση των ιικών σωματιδίων και άλλων πρωτεϊνικών μορίων στο έκλουσμα. Έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση εντεροϊών, του ιού της πολιομυελίτιδας, των ροταϊών, του ιού της ηπατίτιδας και των νοροϊών σε δείγματα νερού, λυμάτων και κοπράνων, εκλουσμάτα φρούτων και λαχανικών. Οι σημαντικότερες εφαρμογές αυτής της μεθόδου είναι στην επεξεργασία δύσκολων δειγμάτων, όπως σαλάτα ζυμαρικών, κρέας, κρέμα σαντυγί και οστρακοειδή. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μεγάλη περίοδος αναμονής μέχρι να ολοκληρωθεί η κατακρήμνιση των ιών στο διάλυμα (Mattison & Bidawid, 2009).

**Προσρόφηση και έκλυση ιών με τη χρήση φορτισμένων μεμβρανών ή φίλτρων** είναι μία διαδικασία που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για πολλά χρόνια για τη συγκέντρωση των εντεροϊών, του ιού της πολιομυελίτιδας, των ροταϊών, του ιού της ηπατίτιδας, των νοροϊών, των αδενοϊών και των αστροϊών σε δείγματα νερού, λυμάτων, σε νερό ξηπλύματος από

μολυσμένα μαρούλια, φράουλες και άλλα μαλακά φρούτα, τυριά και άλλες εστίες μόλυνσης. Ένα πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί ταυτόχρονα για την απομόνωση από το τρόφιμο βακτηρίων, ιών και παρασίτων από δείγματα νερού. Το μειονέκτημα που έχει είναι ότι απαιτεί διαυγασμένα υγρά ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί . (Mattison & Bidawid, 2009).

**Τα ανοσομαγνητικά σφαιρίδια (magnetic beads)** είναι μία διαδικασία που στηρίζεται, όπως λέει και το όνομα τους, σε μαγνητικά σφαιρίδια τα οποία επικαλύπτονται από αντισώματα ή από άλλα μόρια που επιτρέπουν την ική σύνδεση. Τα σύμπλοκα των σφαιριδίων- ιών που σχηματίζονται μπορούν να διαχωριστούν μαγνητικά από το δείγμα και μετά από έκπλυση να δώσουν συμπυκνωμένα και καθαρισμένα ιικά σωματίδια. Ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση εντεροϊών, ροταϊών, ηπατίτιδας και νοροϊών σε νερό, μαρούλι, πράσινα κρεμμύδια, φράουλες, οστρακοειδή και λύματα. Έχουν αναπτυχθεί συστήματα με χρήση κατιονικών σφαιριδίων για την αποτελεσματική απομόνωση ροταϊών και ηπατίτιδας από φρούτα, λαχανικά, κρέατα και ψημένα προϊόντα. Τα μαγνητικά σφαιρίδια δεν είναι μία καθολική λύση, με υψηλότερο κόστος από τις άλλες μεθόδους απομόνωσης των ιών από τα τρόφιμα, αλλά έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να διαχωριστούν εύκολα από ένα αριθμό τροφίμων, και έτσι δεν απαιτείται προετοιμασία του δείγματος με αποτέλεσμα ο χρόνος επεξεργασίας να μειώνεται σημαντικά (Mattison & Bidawid, 2009)

**Η υπερδιήθηση (ultrafiltration) και η υπερφυγοκέντρωση (ultracentrifugati)** είναι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και συγκέντρωση των ιών από δείγματα με βάση το μέγεθος των σωματιδίων (Mattison & Bidawid, 2009).

Η **υπερδιήθηση** στηρίζεται στο διαχωρισμό των σωματιδίων ανάλογα με τον χώρο που καταλαμβάνουν, δηλαδή τον όγκο τους, ενώ η υπερφυγοκέντρωση διαχωρίζει τα σωματίδια ανάλογα με τη μάζα τους. Η υπερδιήθηση έχει χρησιμοποιηθεί για την προετοιμασία εκχυλισμάτων εντεροϊών, ιού της πολιομυελίτιδας και ροταϊών σε κρέας και οστρακοειδή. Σε πιο περιορισμένη κλίμακα, εφαρμόστηκε στην εκχύλιση του ιού της ηπατίτιδας Α και νοροϊών σε φρούτα και σε λύματα από το πλύσιμο λαχανικών. Η μέθοδος αυτή έχει το μειονέκτημα ότι μαζί με τους ιούς απομονώνονται και ορισμένες ενώσεις ή μικροοργανισμούς που δρουν ανασταλτικά στα επόμενα βήματα ανίχνευσης. Είναι, λοιπόν, μία διαδικασία που έχει καλύτερη εφαρμογή σε δείγματα νερού και σε λύματα. Το πλεονέκτημα που παρουσιάζουν οι διαδικασίες υπερδιήθησης είναι ότι, εκτός από τους ιούς, μπορούν να απομονωθούν από το δείγμα και άλλες τάξεις παθογόνων, όπως ιοί, βακτήρια, παράσιτα. Εναλλακτικά, η υπερδιήθηση μπορεί

να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με μία άλλη μέθοδο, σαν δευτερεύον στάδιο απομόνωσης των ικών σωματιδίων (Mattison & Bidawid, 2009).

Η **υπερφυγοκέντρωση** είναι μία μέθοδος για την οποία έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα για την απομόνωση των νοροϊών και της ηπατίτιδας Α από μαλακά φρούτα, κρέας και οστρακοειδή. Ωστόσο, η εφαρμογή της είναι περιορισμένη στα τρόφιμα, καθώς μαζί με τα ιικά σωματίδια απομακρύνονται από τη μάζα των τροφίμων και το σύνολο σχεδόν των στερεών συστατικών. Ανάμεσα στα συστατικά αυτά συχνά βρίσκονται και ορισμένοι ανασταλτικοί παράγοντες που μπορούν να παρέμβουν στην αποτελεσματικότητα των επόμενων σταδίων ανίχνευσης των ιών. Είναι μία τεχνική που η εφαρμογή της δεν προτείνεται ούτε ως δευτερεύουσα επεξεργασία, εκτός εάν το εξεταζόμενο παρασκεύασμα έχει απαλλαχθεί πλήρως από τους ανασταλτικούς και τους παρεμποδιστικούς παράγοντες. Επίσης, σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι απαιτείται ένας εξαιρετικά εξειδικευμένος και ακριβός εξοπλισμός (Mattison & Bidawid, 2009).

Η ιολογία στα τρόφιμα περιορίζεται από τη ποιότητα της επεξεργασίας του δείγματος. Η πιο συνηθισμένη δυσκολία που παρουσιάζεται κατά τις μεθόδους προετοιμασίας των δειγμάτων είναι η συλλογή των ικών σωματιδίων χωρίς την ταυτόχρονη αύξηση των ανασταλτικών ουσιών. Όταν υπάρχουν υποψίες ότι τα τρόφιμα έχουν υψηλό ιικό τίτλο, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί εκχύλιση του ικού υλικού χωρίς να απαιτούνται στάδια απομόνωσης και συλλογής, όπως για παράδειγμα στα οστρακοειδή. Σε αυτή την προκαταρκτική φάση της ανίχνευσης, οι μέθοδοι μπορούν να είναι χρονοβόρες, να απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό ή αντιδραστήρια, ακόμη και να αποδώσουν αναξιόπιστα αποτελέσματα λόγω κατώτερης ποιότητας δείγματος. (Mattison & Bidawid, 2009).

### 5.3 ANIXNEYΣH IΩN

Υπάρχει διαθέσιμο ένα ευρύ φάσμα μεθόδων ανίχνευσης των ιών στα τρόφιμα. Η ανάπτυξη των ιών σε κυτταρική καλλιέργεια και στη συνέχεια η καταμέτρησή τους σε κατάλληλη πλάκα, επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του ιού, αλλά οι συνθήκες υπό τις οποίες πολλά εντερικά παθογόνα μπορούν να ανιχνευθούν, δεν είναι γνωστά. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία και η μικροσκοπία ανοσοηλεκτρονίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά ώστε να δημιουργήσουν μία άμεση οπτική εικόνα των ικών σωματιδίων. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτοί μειονεκτούν καθώς έχουν χαμηλή ευαισθησία και έχουν καλύτερα

αποτελέσματα όταν εφαρμόζονται σε κλινικές δοκιμές, όπου η συγκέντρωση των ιών σε κάθε δείγμα είναι πιο μεγάλη. Η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (Enzyme-Linked immunosorbent assay - ELISA), η ηλεκτροφόρηση και η χρωματογραφία είναι μέθοδοι που έχουν προταθεί για την ανίχνευση των ιών. Ωστόσο, έχουν μικρή ευαισθησία καθώς απαιτούν την παρουσία στο δείγμα ενός σημαντικά μεγάλου αριθμού σωματιδίων, περίπου 100 000 ιούς/ml. Οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης των ιών στοχεύουν είτε στο γονιδίωμα νουκλεϊκού οξέος (DNA ή RNA) είτε στη πρωτεΐνη του καψιδίου του ιού. Αν και δεν μπορούν να διακρίνουν μολυσματικά σωματίδια από μη μολυσματικά, η PCR, PCR με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR), η PCR σε πραγματικό χρόνο και η RT-PCR σε πραγματικό χρόνο θεωρούνται γενικά οι πιο αξιόπιστες μέθοδοι για την ανίχνευση ιών, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της εξειδίκευσής τους. Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν τεχνικές ενίσχυσης των νουκλεϊκών οξέων όπως η αλληλουχοεξααρτώμενη ενίσχυση νουκλεϊκού οξέος (Nucleic acid sequence-based amplification – NASBA), NASBA σε πραγματικό χρόνο και η ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου (Loop Mediated Isothermal Amplification – LAMP) ή LAMP με αντίστροφη μεταγραφάση (Mattison & Bidawid, 2009).

Η επιστημονική έρευνα έχει εστιάσει στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων στην ιολογία τροφίμων αλλά και περιβάλλοντος που είναι ταχείες τεχνικές. Ο στόχος είναι η παροχή ευαίσθητων και εξειδικευμένων μεθόδων που παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την ταυτοποίηση σε πραγματικό χρόνο, δηλαδή σε λιγότερο από μία ημέρα. Για παράδειγμα έχει χρησιμοποιηθεί η κυτταρομετρία ροής με τη χρήση ειδικών σφαιριδίων.

Στον παρακάτω πίνακα, διακρίνονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των κυριότερων διαθέσιμων μεθόδων για την ανίχνευση των ιών στα τρόφιμα που δημιουργούν προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία (Bosch et al, 2018).

Πίνακας 3: Μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα διαφόρων μεθόδων ανάλυσης ιών στα τρόφιμα

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
<b>ISO/CEN μέθοδος</b>	Ανιχνεύει σημαντικούς ιούς σε συγκεκριμένα τρόφιμα	Οι βελτιώσεις των μεθόδων έχουν ένα πέρας
	Υψηλή αξιοπιστία, λόγω της χρήσης ελέγχων και λεπτομερή περιγραφή του τρόπου ερμηνείας των αποτελεσμάτων	Δεν μπορούν να εξετάσουν επεξεργασμένα τρόφιμα

	Η διεθνής αναγνώριση μίας μεθόδου ISO αυξάνει την αποδοχή και εφαρμογή της μεθόδου στα εργαστήρια	Ο υψηλός αριθμός ελέγχων αυξάνει το κόστος
	Συγκρίνονται και αξιολογούνται αποτελέσματα από διαφορετικά εργαστήρια	Οι εμπορικοί έλεγχοι πρέπει να είναι πάντοτε διαθέσιμοι
	Διευκολύνει τη διαπίστευση των εργαστηρίων για τη δοκιμή ιών	Αν οι ιοί είναι σε χαμηλά επίπεδα, μπορεί να μην ανιχνευθούν σε ορισμένα τρόφιμα
		Δεν είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ μολυσματικών και μη μολυσματικών σωματιδίων.
		Παρουσιάζει πολυπλοκότητα
<b>Ποσοτικός προσδιορισμός RT-qPCR και επιβεβαίωση</b>	Κατά τον τακτικό ποσοτικό προσδιορισμό παρέχονται δεδομένα σχετικά με τα βασικά επίπεδα ιών στα τρόφιμα και ενημερώνει την εφαρμογή για τα αποδεκτά επίπεδα	Ο ποσοτικός προσδιορισμός με RT-qPCR είναι ευαίσθητος στους αναστολείς και έχει αναξιόπιστη ακρίβεια για χαμηλά επίπεδα ιών
	Η συστηματική επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων RT-qPCR με αλληλουχία παρέχει πληροφορίες για την επιδημιολογία του στελέχους του ιού	Η επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων RT-qPCR είναι δύσκολη λόγω χαμηλής ευαισθησίας
		Ποσοτικός υπολογισμός και αύξηση κόστους
		Χρονοβόρα διαδικασία
<b>Μοριακή ανίχνευση ιού σε άθικτα καψίδια ιού (για</b>	Ανιχνεύει τη ποσότητα πραγματικά μολυσματικών σωματιδίων του ιού	Απαιτεί την ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος αντιδραστηρίων
		Χρειάζεται προσεκτική αξιολόγηση των πρωτοκόλλων ανάλογα με

<b>παράδειγμα απταμερή)</b>		τον τύπο του ιού και τους πίνακες
		Πρέπει να περιλαμβάνονται μολυσματικοί και μη μολυσματικοί έλεγχοι
		Αυξάνει το κόστος σε σύγκριση με τη τυπική μέθοδο PCR
<b>Ανίχνευση μολυσματικών ιών</b>	Επιτρέπει την ανίχνευση μολυσματικών ιών	Οι εντερικοί ιοί άγριου τύπου είναι γενικά δύσκολο να καλλιεργηθούν
	ICC-RT-PCR	Ένα απλό σύστημα καλλιέργεια για νοροϊούς πρέπει να βελτιστοποιηθεί
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από την κυτταρική καλλιέργεια μόνο</li> <li>Ανιχνεύει μολυσματικούς ιούς που δεν εμφανίζουν κυτταροπαθογόνο δράση</li> <li>Μειώνει το χρόνο για ανάλυση σε σύγκριση με την κυτταρική καλλιέργεια μόνο</li> </ul>	Η καλλιέργεια αυξάνει το κόστος και το χρόνο που απαιτείται για τη διάγνωση
		Το ICC-RT-PCR δεν είναι ποσοτική μέθοδος , εκτός αν χρησιμοποιείται ως δοκιμή πιθανού αριθμού (MNM)
<b>Νέες τεχνολογίες</b>	Ψηφιακή PCR: <ul style="list-style-type: none"> <li>Είναι λιγότερο ευαίσθητη στους αναστολείς στις μήτρες τροφίμων</li> <li>Παρέχει ακριβέστερη ποσοτικοποίηση ανεξάρτητα από τις τυπικές καμπύλες</li> </ul>	Αυξημένο κόστος και προετοιμασία δείγματος
	Η αλληλουχία επόμενης γενιά μπορεί να ανιχνεύσει νέους ιούς και νέα στελέχη ιών	Απουσία τυποποιημένης προσέγγισης για αλληλουχία επόμενης γενιάς

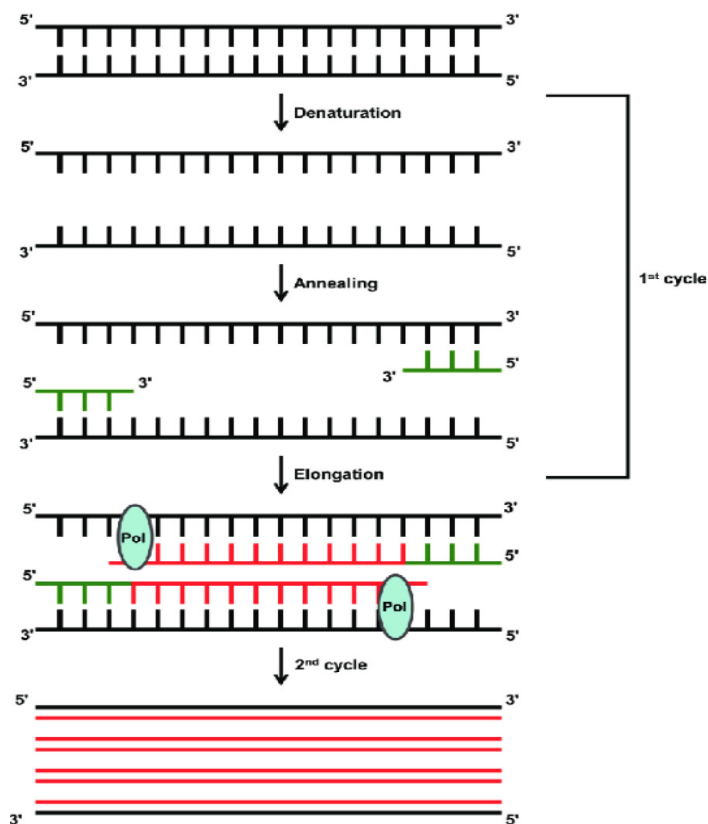
Πηγή: Βασισμένο Bosch et al, 2018

### 5.3.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία τεχνική που εκτελείται σε κύκλους τριών σταδίων (Κυριαζής et al., 2014):

1. Αποδιάταξη DNA. Η διπλή έλικα του DNA – στόχου αποδιατάσσεται
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο- στόχο
3. Επιμήκυνση. Το ένζυμο DNA πολυμεράση επιμηκώνει τις αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'-3' χρησιμοποιώντας ως μήτρα το μόριο στόχο, όπου έχουν προσδεθεί οι εκκινητές.

Στο τέλος του κάθε κύκλου η ποσότητα των προϊόντων της PCR ουσιαστικά διπλασιάζεται. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται μέσα σε ένα θερμικό κυκλοποιητή και ολοκληρώνεται μετά από 30-50 κύκλους. Η αύξηση των αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου είναι εκθετική (Κυριαζής et al., 2014).



Εικόνα 10: PCR – Εκτέλεση ενός κύκλου

Πηγή: [https://www.researchgate.net/figure/Phases-of-the-Polymerase-Chain-Reaction-PCR\\_fig2\\_259633179](https://www.researchgate.net/figure/Phases-of-the-Polymerase-Chain-Reaction-PCR_fig2_259633179)

### 5.3.2 PCR ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗ

Η PCR με αντίστροφη μεταγραφάση είναι μία μέθοδος η οποία οδηγεί σε ενίσχυση των αλληλουχιών RNA. Σε αυτή τη μέθοδο τα μόρια RNA, με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, μετατρέπονται σε συμπληρωματικό DNA και στη συνέχεια υποβάλλονται στη απλή PCR διαδικασία (Κυριαζής et al., 2014).

### 5.3.3 REAL TIME RT-PCR

Στο σύστημα PCR real time χρησιμοποιείται κάποιος ιχνηθέτης ή κάποια φθορίζουσα χρωστική ουσία. Οι χρωστικές αυτές ουσίες όσο είναι σε ελεύθερη μορφή στο διάλυμα, δεν φθορίζουν ή φθορίζουν ελάχιστα. Όταν όμως δεσμευτούν στο δίκλωνο μόριο του DNA, παρατηρείται φθορισμός, ο οποίος επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του DNA μέσα σε ένα μεγάλο δυναμικό εύρος (Κυριαζής et al., 2014).

Η μέθοδος ποιοτικής ανίχνευσης των ιών της ηπατίτιδας και του νοροϊού σε τρόφιμα που προτείνεται από τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (International Organization for Standardization – ISO) είναι η ISO 15216 -2: 2019 και βασίζεται στην RT-PCR σε πραγματικό χρόνο. Εφαρμόζεται και έχει επικυρωθεί για την ανίχνευση των συγκεκριμένων ιών στα εξής δείγματα τροφίμων: μαλακά φρούτα (φράουλες, σμέουρα, σταφίδες), φύλλα, στέλεχος και βολβός των λαχανικών, στο εμφιαλωμένο νερό και στα δίθυρα μαλάκια<sup>2</sup>. Τα κίνητρα που οδήγησαν τον ISO στην διαμόρφωση αυτής της τεχνικής είναι (ISO, 2019):

- Ο ιός της ηπατίτιδας A (HAV) και ο νοροϊός είναι οι κύριοι παράγοντες που προκαλούν ιογενείς ασθένειες στον άνθρωπο
- Δεν υπάρχει συνήθη μέθοδο καλλιέργειας για τους νοροϊούς, ενώ οι μέθοδοι για την ηπατίτιδα A είναι ακατάλληλες για να εφαρμοστούν στα τρόφιμα

Για να μην υπάρξει ψευδώς αρνητική ερμηνεία ή υποτίμηση της ποσότητας του ιού, υπάρχουν ειδικά πρωτόκολλα που περιγράφουν την εκχύλιση των σωματιδιακών ιών από το τρόφιμο και τη συγκέντρωσή τους στο εκχύλισμα. Μία κοινή μέθοδος εκχύλισης RNA

---

<sup>2</sup> Δίθυρα μαλάκια : Ανήκουν στην τάξη Pecercyoda, η οποία πριν ονομαζόταν Bivalvia ή Lamellibranchia. Είναι όστρακα της θάλασσας ή του γλυκού νερού, με πλευρικά συμπιεσμένο σώμα, κέλυφος που φέρει δύο πλευρικές θυρίδες κα βράγχια για την αναπνοή , όπως είναι τα μύδια, τα κυδώνια, τα στρείδια, τα χνένια, οι γυαλιστερές, οι αχιβάδες,...βλ. [http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Alievmata/egxeiridio\\_ZDM\\_150719.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Alievmata/egxeiridio_ZDM_150719.pdf)



βασίζεται στη διάσπαση του καψιδίου του ιού, χρησιμοποιώντας χαοτροπικό αντιδραστήριο και στη συνέχεια ακολουθεί προσρόφηση των μορίων RNA σε σωματίδια silica (Bosch et al, 2018).

Η έκδοση αυτή συνεπάγεται την ακύρωση και την αντικατάσταση της ISO/ TS 15216-2:2013. Δεν επικυρώνεται για ανίχνευση ιών στόχων σε άλλα τρόφιμα ή για την ανίχνευση άλλων ιών στα τρόφιμα (ISO, 2019):

Οι Li et al, (2018) διεξήγαγαν μία πολυετή έρευνα για τον νοροϊό και την ηπατίτιδα A σε 2.015 δείγματα κατεψυγμένων φρούτων που συνέλεξαν από την Nestlé και την PROFEL (Ευρωπαϊκή Ένωση Μεταποιητών Οπωροκηπευτικών) για τη χρονική περίοδο 2009- 2016. Θετικά βρέθηκαν επτά από τα δείγματα που αναλύθηκαν, αριθμός που αντιστοιχεί σε επιπολασμό 0,3%. Ένα σύνολο από 632 δείγματα φρούτων, που είχαν προηγουμένως εξεταστεί για νοροϊό και ηπατίτιδα A, εξετάστηκαν και για την παρουσία ανθρώπινου αδενοϊού. Σκοπός αυτού του ελέγχου ήταν να εκτιμηθεί η πιθανή χρήση του ανθρώπινου αδενοϊού (HAdV) ως «ιός δείκτης» μόλυνσης από ανθρώπινα κόπρανα. Καταγράφηκαν έξι θετικά δείγματα ανθρώπινου αδενοϊού, που αντιστοιχούσαν σε επιπολασμό 0,9%. Κανένα από τα δείγματα που δεικνύουν την παρουσία παθογόνων ιών (NoV και HAV) δεν ήταν θετικά για HAdV (Li et al, 2018).

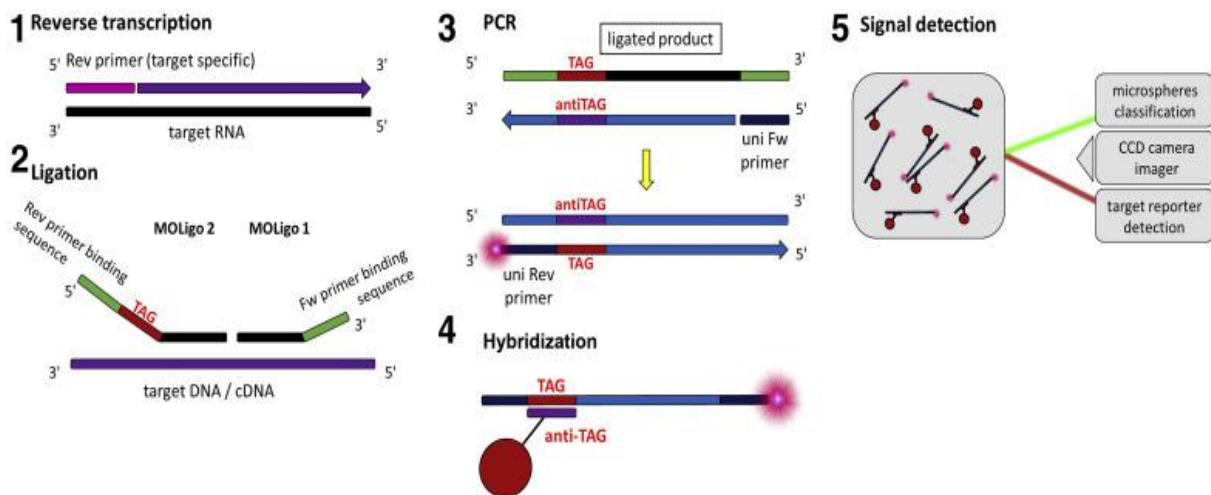
Η εξέταση των δειγμάτων για νοροϊό και ηπατίτιδα A έγινε με βάση μία μέθοδο PCR σε πραγματικό χρόνο με βάση το πρωτόκολλο του ISO / TS 15216: 2013. Εν συντομία, η εκχύλιση του ιού έγινε με έκλουση με ανάδευση ακολουθούμενη από καθίζηση με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) / χλωριούχο νάτριο (NaCl). Το RNA του ιού εκχυλίστηκε με κατάλληλη διαταραχή θειοκυανικής γουανιδίνης και βασισμένη στην προσρόφηση μέθοδο πυριτίας. Υπάρχουν πολλές επιλογές εμπορικών κιτ ή / και αυτόματων οργάνων που διατίθενται στην αγορά για εξαγωγή RNA. Ένας αριθμός προσδιορισμών RT-PCR σε πραγματικό χρόνο που στοχεύουν στην ανίχνευση ιού που μεταδίδεται μέσω τροφής (ως δοκιμές singleplex ή multiplex) είναι επί του παρόντος διαθέσιμες στο εμπόριο ως κατάλληλα έτοιμα προς χρήση κιτ (Li et al, 2018).

#### 5.3.4 MOL-PCR και xMAP

Οι ιοί που αναφέρεται ότι έχουν πιο συχνά παθογόνο δράση και βρίσκονται στα τρόφιμα και το νερό, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι ο νοροϊός (NoV), ο ιός της ηπατίτιδας A (HAV), ο

ιός της ηπατίτιδας E (HEV), οι αδενοϊοί 40/41 (AdV) και οι ροταϊοί (RV). Η συμβατική ταυτοποίηση των ιών στα τρόφιμα ή το νερό είναι η ποσοτική PCR ή η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο. Οι μέθοδοι αυτοί όμως έχουν περιορισμένη δυνατότητα πολυπλεξίας. Συνήθως μπορούν να ανιχνευθούν τρεις ως τέσσερις αλληλουχίες γενετικού υλικού -στόχου (Hrdy et al., 2021).

Επειδή οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις στις μεθόδους ανίχνευσης εστιάζονται σε γρήγορη και ακριβή ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε μια τεχνολογία ταχείας πολυπλεξίας, η οποία μπορεί να ανιχνεύσει ένα ευρύ φάσμα παθογόνων ιών που συνδέονται με μόλυνση από τρόφιμα ή νερό. Έχει δημιουργηθεί από τους Hrdy et al, (2021) ένα νέο ημιποσοτικό σύστημα πολλαπλών μαγνητικών σφαιριδίων, για ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών στόχων σε μία αντίδραση. Χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός πολλαπλής σύνδεσης ολιγονουκλεοτιδίων (MOL) με τεχνολογία PCR και πολυπλεξίας xMAP (Luminex Corporation, Austin, TX) για τη δημιουργία ενός συστήματος ανίχνευσης που περιλαμβάνει τους πιο κοινούς ιογενείς παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για γαστρεντερικά προβλήματα στους ανθρώπους. Το σύστημα περιλαμβάνει τους αδενοϊούς 40/41 (AdV), τον ροταϊό A (RVA), τον νοροϊό (NoV), τον ιό της ηπατίτιδας E (HEV), τον ιό της ηπατίτιδας A (HAV) και έναν στόχο για εξωτερικό έλεγχο του συστήματος. Για την αξιολόγηση του συστήματος ανίχνευσης, πραγματοποιήθηκαν διεργαστηριακές δοκιμές δακτυλίου σε τέσσερα ανεξάρτητα εργαστήρια. Η αναλυτική ειδικότητα της συγκεκριμένης μεθόδου δοκιμάστηκε σε μια ομάδα παθογόνων παραγόντων και βιολογικών δειγμάτων με ποσοτική PCR ως μέθοδο αναφοράς. Επιτεύχθηκε το όριο ανίχνευσης (αναλυτική ευαισθησία)  $5 \times 10^0$  (AdV, HEV και RVA) και  $5 \times 10^1$  (HAV και NoV) ισοδυνάμων γονιδιώματος ανά αντίδραση. Αυτή η αξιόπιστη, ευαίσθητη και γρήγορη τεχνολογία πολυπλεξίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την τακτική παρακολούθηση και διαχείριση ιών σε τρόφιμα και νερό για την πρόληψη τροφογενών και μεταδοτικών ασθενειών (Hrdy et al., 2021).



Εικόνα 11: Διάγραμμα ροής της ανάλυσης  
 Πηγή : Hrdy et al., 2021

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής της ανάλυσης PCR και xMAP. Τα βασικά βήματα της είναι (Hrdy et al., 2021):

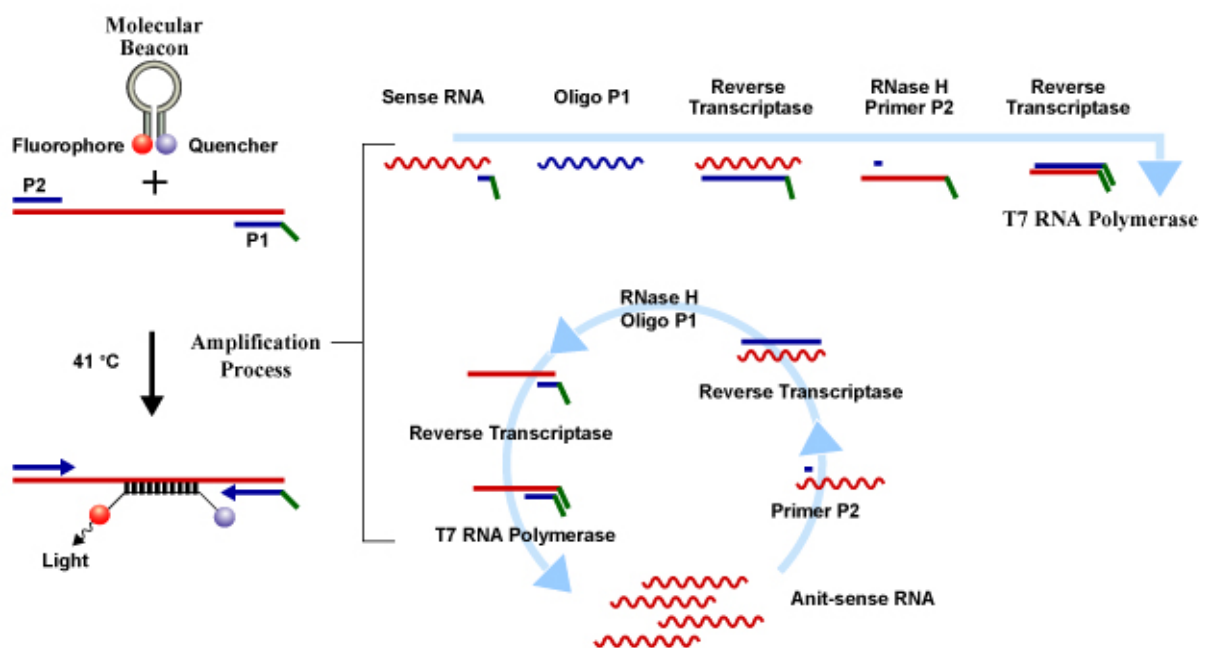
1. Αντίστροφη μεταγραφή: μετατροπή στόχων RNA σε cDNA χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους εκκινητές.
2. Απολίπωση: ειδικοί ανιχνευτές (MOLigo 1 και MOLigo 2) συνδέονται μεταξύ τους παρουσία DNA-cDNA στόχου.
3. PCR: ενίσχυση των προϊόντων απολίπωσης με γενικούς εκκινητές.
4. Υβριδισμός: υβριδισμός των ενισχυμένων προϊόντων σε μαγνητικά μικροσφαιρίδια
5. Ανίχνευση σήματος: ταξινόμηση των μαγνητικών μικροσφαιριδίων και ανάγνωση του σήματος των δεσμευμένων προϊόντων φθορισμού.

### 5.3.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (NASBA)

Η μέθοδος αλληλουχοεξαρτώμενης ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος (nucleic acid sequence-based amplification – NASBA) ενισχύει τις αλληλουχίες του RNA και αποτελεί μία χρήσιμη μέθοδο ανίχνευσης των μικροβιακών παθογόνων σε δείγματα τροφίμων. Χρησιμοποιεί για την ανίχνευση του RNA τρία ένζυμα: την αντίστροφη μεταγραφάση, την RNA-seH, και την T7 RNA πολυμεράση, τα οποία δρουν από κοινού για την ενίσχυση αλληλουχιών από ένα αρχικό μονόκλωνο πρότυπο RNA. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές είναι συμπληρωματικοί προς τις αλληλουχίες του RNA-στόχου και ενσωματώνονται στην αντίδραση. Ένας εκκινητής περιέχει επίσης μια αλληλουχία αναγνώρισης για την T7 RNA πολυμεράση. Η αντίδραση περιέχει τόσο dNTP όσο και NTP. Ο πρώτος εκκινητής συνδέεται με το RNA, επιτρέποντας στην αντίστροφη

μεταγραφή να σχηματίσει ένα συμπληρωματικό κλώνο DNA. Στη συνέχεια, η RNase χωνεύει το RNA και ο δεύτερος εκκινητής συνδέεται με το cDNA, επιτρέποντας στην αντίστροφη τρανσκριπτάση να σχηματίσει ένα αντίγραφο δίκλωνου cDNA της αρχικής αλληλουχίας. Αυτό το δίκλωνο DNA στη συνέχεια δρα ως ένα είδος μίνι «γονιδίου», το οποίο μεταγράφεται από το πολυμερές T7 RNA για να παράγει χιλιάδες μεταγραφές RNA που στη συνέχεια κυκλώνουν την αντίδραση. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε μία μόνο θερμοκρασία, συνήθως 41 °C. Σε αυτή τη θερμοκρασία, το γονιδιωματικό DNA από τον μικροοργανισμό στόχο παραμένει δίκλωνο και δεν γίνεται υπόστρωμα για ενίσχυση. Αυτό εξαλείφει την αναγκαιότητα θεραπείας DNase, η οποία απαιτείται κατά τη χρήση RT-PCR για ανίχνευση RNA, και προσφέρει επίσης τη δυνατότητα ειδικής ανίχνευσης βιώσιμων κυττάρων. Το προϊόν μιας αντίδρασης NASBA είναι κυρίως μονόκλωνο RNA. Αυτό μπορεί να ανιχνευθεί με ηλεκτροφόρηση ακολουθούμενη από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, αλλά για να διασφαλιστεί η ειδικότητα του προϊόντος, συνήθως χρησιμοποιείται ένα επιβεβαιωτικό στάδιο, που γενικά περιλαμβάνει τον υβριδισμό του ανιχνευτή (Cook, 2003).

Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί στα τρόφιμα για την ανίχνευση του ιού της Ηπατίτιδας A και των ροταϊών (Cook, 2003)

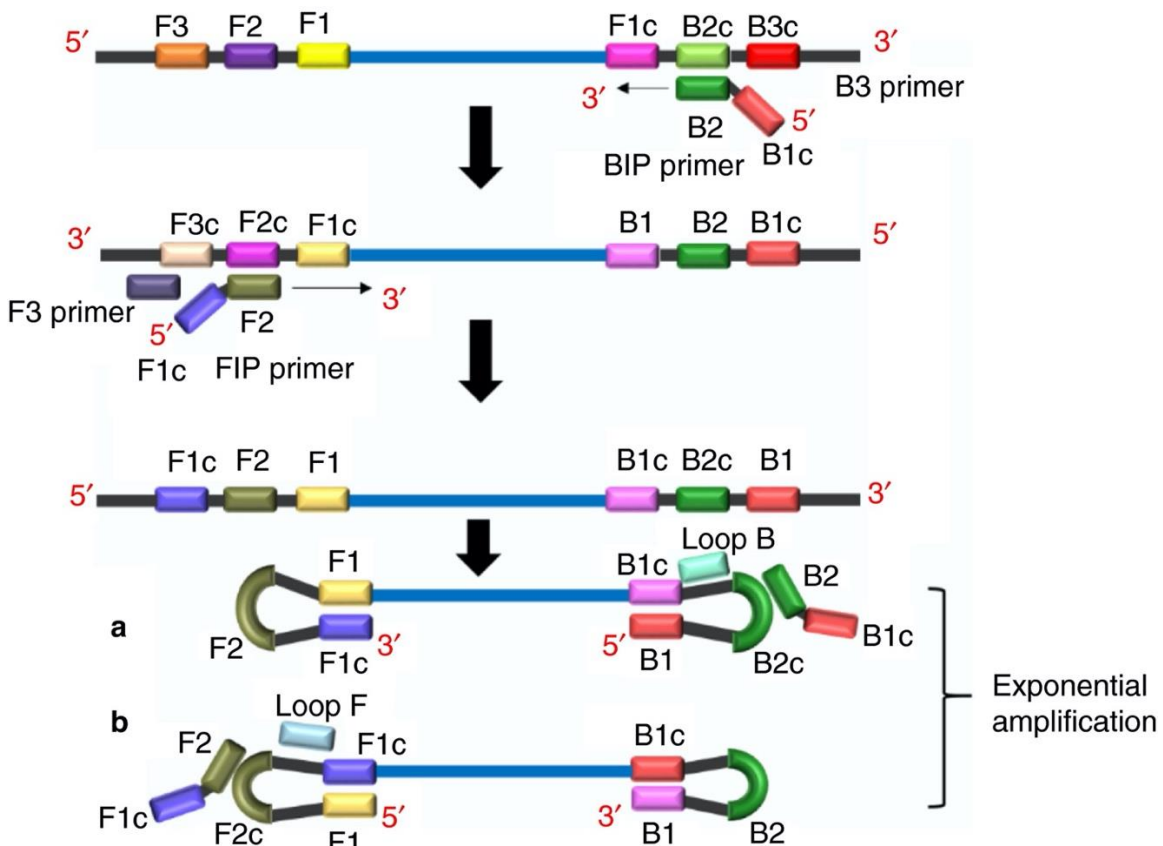


Εικόνα 12: Μηχανισμός λειτουργίας NASBA

Πηγή: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/NASBA.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/NASBA.html)

### 5.3.6 ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕΣΩ ΒΡΟΓΧΟΥ (LAMP)

Η ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (Loop-mediated isothermal amplification - LAMP) χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του DNA και παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση, αποτελεσματικότητα και ταχύτητα υπό ισοθερμικές συνθήκες. Για την εκτέλεση της μεθόδου αυτής χρησιμοποιούνται μια πολυμεράση DNA με δραστικότητα κλώνου υψηλής μετατόπισης και ένα σύνολο ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών για ενίσχυση των στοχευμένων κλώνων DNA. Μετά την πρώτη του ανακάλυψη από τους Notomi et al. (2000 Nucleic Acids Res 28: E63), το LAMP αναπτύχθηκε περαιτέρω με την πάροδο των ετών και συνδυάστηκε με άλλες μοριακές προσεγγίσεις, όπως αντίστροφη μεταγραφή και πολλαπλασιαστική ενίσχυση για την ανίχνευση μολυσματικών ασθενειών που προκαλούνται από μικροοργανισμούς σε ανθρώπους, ζώα και φυτά. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν διαθέσιμες ποικιλίες μεθόδων ανίχνευσης LAMP, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης χρωματομετρίας και φθορισμού, της παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση μετρητή θολερότητας και της ανίχνευσης χρησιμοποιώντας συσκευή πλευρικής ροής. Εκτός από αυτό, είχε επίσης αναφερθεί εμπορευματοποίηση της τεχνικής LAMP όπως λυοφιλισμένη μορφή κιτ αντιδραστηρίων LAMP και σετ εκκινητών LAMP για ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών ( Wong et al., 2017).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής LAMP

Πηγή: Wong et al., 2017

Οι Ziros et al.(2015) σε μελέτη που διεξήγαγαν ανίχνευσαν αδενοϊούς με τη μέθοδο LAMP. Προσπάθησαν να αναπτύξουν μία τεχνική ανίχνευσης απλή, οικονομική, εξειδικευμένη, ακριβείας και ενός βήματος και τα αποτελέσματα ήταν αισιόδοξα. Χρησιμοποίησαν κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα και ήταν σε θέση να λάβουν αποτελέσματα σε 60 λεπτά σε ισοθερμικές συνθήκες στους 69°C. Τα όρια ανίχνευσης για τα γονιδιώματα hAdV ήταν μεταξύ 50 και 100 αντίγραφα / αντίδραση για hAdV40 και hAdV41, και δεν βρέθηκαν διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους επιλεγμένους ιούς. Η μέθοδος LAMP δείχνει να έχει το δυναμικό να χρησιμοποιηθεί για επιτόπιους διαγνωστικούς ελέγχους σε πραγματικό χρόνο, με τη χρήση απλών φορητών συσκευών χαμηλής ισχύος (Ziros et al., 2015)

Επίσης, αναπτύχθηκαν μέθοδοι αντίστροφης μεταγραφής LAMP (RT-LAMP). Οι Chen et al (2014) ανέπτυξαν μία μεθοδολογία RT-LAMP ενός σωλήνα, για ταχεία ανίχνευση του ιού της ηπατίτιδας E. Το επισημασμένο με βιοτίνη dCTP προστέθηκε στο μείγμα της αντίδρασης και ενσωματώθηκε στο συντεθέν δίκλωνο μόριο. Στο μίγμα των αντιδράσεων προστέθηκαν επίσης, νανοσωματίδια που είχαν επικάλυψη χρυσού στρεπταβιδίνης. Παρουσία του ιού της ηπατίτιδας E , τα νανοσωματίδια αυτά συσσωματώθηκαν με το προκύπτον DNA βρόχο βλαστού και το διάλυμα άλλαξε χρώμα σε μπλε ή μωβ. Αυτή η τεχνική RT-LAMP ενός σταδίου σε συνδυασμό με τη στρατηγική χρωματομετρικής σήμανσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανίχνευση ιών ηπατίτιδας E σε σύγκριση με τις υπάρχουσες παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης. Αυτή η μέθοδος είναι ιδιαίτερα προτεινόμενη λόγω της απλότητας, της ταχύτητάς της και της υψηλής ευαισθησίας της, καθώς και ενός ορίου ανίχνευσης σχεδόν  $10^1$  αντιγράφων RNA (Chen et al., 2014).

Ο νοροϊός είναι ένας από τους σημαντικούς ιογενείς τύπους που προκαλούν συχνά μολυσματικές μολύνσεις. Γι 'αυτό, αναπτύχθηκε ο προσδιορισμός RT-LAMP, ο οποίος έδειξε εξαιρετική εξειδίκευση και υψηλή εκλεκτικότητα λόγω των έξι εκκινητών, όπου δύο εκκινητές βρόχου αναγνώρισαν οκτώ περιοχές στην αλληλουχία στόχο του ιού. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτός ο προσδιορισμός μείωσε το χρόνο ενίσχυσης της ανάλυσης εντός 60 ή 90 λεπτών (Laksmi & Kim, 2021).

### 5.3.6 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Η ασφάλεια των τροφίμων είναι μία παγκόσμια πρόκληση για την ανθρώπινη υγεία και απαιτεί ταχεία, ευαίσθητη, αποτελεσματική και φθηνή ανίχνευση των μολυσματικών τροφίμων. Οι βιοαισθητήρες έχουν μελετηθεί εδώ και καιρό ως μέρος μίας λύσης, αν και η έρευνα που έχει διεξαχθεί δεν είναι επαρκής (Griesche & Baeumner, 2020).

Σύμφωνα με τη διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) ως βιοαισθητήρας ορίζεται η αναλυτική διάταξη που χρησιμοποιεί συγκεκριμένες βιοχημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται με τη δράση απομονωμένων ενζύμων, ανοσοσυστημάτων, ιστών, οργανιδίων ή ολόκληρων κυττάρων, κατάλληλων για την ανίχνευση χημικών ενώσεων, συνήθως με ηλεκτρικά, θερμικά ή οπτικά σήματα. Εκτός από τους βιοαισθητήρες που ακολουθούν τον ορισμό IUPAC, υπάρχουν και οι βιοανιχνευτές (biobrobes) (Griesche & Baeumner, 2020).

Ως στοιχεία – μόρια βιοαναγνώρισης σε έναν βιοαισθητήρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν:

- **Αντισώματα.** Τα αντισώματα είναι ένα κοινό χρησιμοποιούμενο στοιχείο αναγνώρισης σε ανοσο-προσδιορισμούς για τον διαχωρισμό του επιθυμητού αναλυτή από τη μήτρα δείγματος με ειδική σύνδεση. Τα αντισώματα δεσμεύονται σταθερά μόνο με τα αντιγόνα που έχουν τη σωστή διαμόρφωση. Η δέσμευση αυτή αντιγόνου-αντισώματος προκαλεί μία μεταβολή, φυσικοχημικής φύσεως, η οποία γίνεται αντιληπτή από τον ιχνηθέτη και έτσι δημιουργείται ένα σήμα. Τα αντισώματα χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση μολυσματικών τροφίμων από διαφόρων ειδών μικροοργανισμούς (βακτήρια και ιούς), μυκοτοξίνες, κτηνιατρικά φάρμακα και αλλεργιογόνα (Griesche & Baeumner, 2020).
- **Απταμερή.** Το απταμερές είναι μία μονόκλωνη αλληλουχία γενετικού υλικού, η οποία εξειδικεύεται στον εντοπισμό ενός αναλυτή. Αποτελεί μία εναλλακτική λύση στα αντισώματα, μικρότερου οικονομικού κόστους καθώς παράγονται χωρίς να βασίζονται σε ζώα ή ζωικά κύτταρα. Τα απταμερή, επίσης, έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής, είναι σταθερά μόρια κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες και μπορούν να υποστούν τροποποίηση με ευελιξία όταν χρειάζεται ώστε να βελτιωθεί η λειτουργικότητά τους. Είναι κατάλληλα για την ανίχνευση για την επιλογή και την ανίχνευση μυκοτοξινών και χρησιμοποιούνται επίσης σε δοκιμασίες για την ανίχνευση μικροοργανισμών, κτηνιατρικών φαρμάκων και φυτοφαρμάκων (Griesche & Baeumner, 2020).

- **Νουκλεϊκά οξέα** . Τα νουκλεϊκά οξέα χρησιμοποιούνται ευρέως ως ειδικά στοιχεία βιοαναγνώρισης σε παραδοσιακούς προσδιορισμούς υβριδισμού DNA. Στο πεδίο της ασφάλειας των τροφίμων, η χρήση της ανάλυσης DNA είναι σπάνια και αυτό οφείλεται εν μέρει στην ανάγκη επιπρόσθετων σταδίων προετοιμασίας δείγματος τα οποία δεν είναι απαραίτητα με τη χρήση αντισωμάτων ή απταμερών. Ωστόσο είναι μία ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης που έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση γεωργικών παθογόνων, όπως ιών, μυκήτων ή διαφόρων ειδών βακτηρίων, ή η ταυτοποίηση ξένων ειδών σε περίπτωση νοθείας τροφίμων (Griesche & Baeumner, 2020).
- **Ένζυμα** :Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται ευρέως στους ανοσο-προδιορισμούς. Βασίζονται στην κατάλυση χημικών αντιδράσεων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό έγχρωμων ενώσεων ή ενώσεων που φθορίζουν ή ηλεκτροχημικά ενεργών μορίων. Τα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν στοιχεία βιοαναγνώρισης ειδικού στόχου για την άμεση ανίχνευση ενός ενζυματικού υποστρώματος. Μπορούν, ωστόσο, με την παρακολούθηση της δραστηριότητας του ενζύμου, να χρησιμοποιηθούν για την μη ειδική ανίχνευση πολυάριθμων ανασταλτικών παραγόντων (Griesche & Baeumner, 2020).
- **Βακτηριοφάγοι**. Οι βακτηριοφάγοι είναι οι ιοί που επιμολύνουν και αναπαράγονται στα βακτήρια. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοαναγνωριστικό στοιχείο για την ανίχνευση βακτηριακών κυττάρων, σύμφωνα με την ειδική δέσμευση τους στους υποδοχείς των κυττάρων αυτών. Επίσης, μπορούν να κάνουν διάκριση μεταξύ νεκρών και ζωντανών βακτηριακών κυττάρων, ένα χαρακτηριστικό που συχνά λείπει από τους προσδιορισμούς που βασίζονται σε αντισώματα (Griesche & Baeumner, 2020).

Τα ιικά σωματίδια που ανιχνεύονται με τις μοριακές μεθόδους ανίχνευσης δεν αντιπροσωπεύουν απαραίτητα μολυσματικά σωματίδια. Οι ιοί για να είναι μολυσματικοί και, κατά συνέπεια, για να αναπτύξουν παθογένεια χρειάζονται ένα άθικτο καψίδιο (Bosch et al., 2018).

Τα απταμερή νουκλεϊκού οξέος είναι μικρές αλληλουχίες ssDNA ή ssRNA που παρουσιάζουν συγγένεια δέσμευσης με ένα μόριο στόχο, όπως είναι οι ιοί. Μόλις προσδιοριστεί η κατάλληλη αλληλουχία, συγκριτικά με άλλες μεθόδους αναγνώρισης παρουσιάζουν πλεονεκτήματα, όπως είναι η ευκολία παραγωγής, αναγέννησης και σταθερότητας (Escudero-Abarca et al, 2014).

Οι Escudero-Abarca et al (2014) χρησιμοποίησαν επιτυχώς απταμερή ssDNA για την ανίχνευση ορισμένων στελεχών νοροϊών σε εναιωρήματα ανθρώπινων κοπράνων που



προέρχονται από μολυσματικές εστίες, αλλά και σε ορισμένα αντιπροσωπευτικά τρόφιμα, όπως σε μαρούλι.

Τα απταμερή μπορεί να εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση ανάλογα με τον σχεδιασμό τους και για την ταυτόχρονη αναγνώριση διαφορετικών ικών στελεχών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα πάνελ διαφορετικών απταμερών. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν τη τρισδιάστατη δομή καψιδίου, γεγονός που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δείξει την παρουσία πλήρων ιογενών σωματιδίων (Bosch et al., 2018).

Μία τεχνική που μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των μολυσματικών ικών σωματιδίων είναι οι ανταποκριτές νανοσωματιδίων φάγου σε προσδιορισμούς με τεχνολογία πλευρικής ροής (Bosch et al, 2018).

Με βάση τη δέσμευση νοροϊών με αντιγόνο ομάδων ιστο-αίματος, οι γλυκάνες έχουν προταθεί ως εργαλεία για την αξιολόγηση της ακεραιότητας των καψιδίων. Μετά την επεξεργασία του δείγματος με νοροϊό με χλώριο, θερμότητας ή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), η επιλεκτική δέσμευση του ιού σε γλυκάνες έδειξε μείωση τριών λογαριθμικών κύκλων στους τίτλους του γονιδιώματος, αποδεικνύοντας έτσι την ικανότητα των γλυκανών να στοχεύουν συγκεκριμένα σε μη κατεστραμμένο καψίδια (Bosch et al, 2018).

#### 5.3.7 ΜΟΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ (MPI)

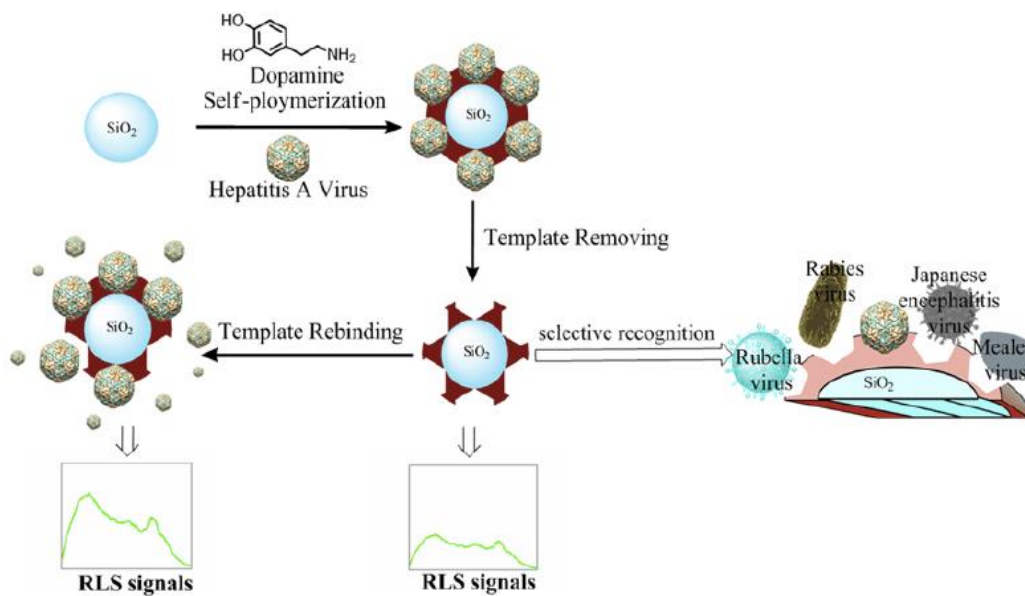
Τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (Molecularly imprinted polymers – MPI) έχουν πολλές εφαρμογές στα πεδία : ανίχνευσης, ανίχνευσης / ταυτοποίησης του ιού, προσδιορισμό δομής των πρωτεϊνών, φαρμακευτικών προϊόντων, τεχνητά/ βιομιμητικά αντισώματα και καλλιέργεια κυττάρων. Οι συμβατικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανάλυση/ ανίχνευση ιογενών λοιμώξεων και παθογόνων ιών, όπως η αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η ELISA και η απομόνωση του ιού, συχνά είναι χρονοβόρες διαδικασίες με υψηλό κόστος, χαμηλή επιλεκτικότητα και εξειδίκευση, ψευδώς αρνητικά ή θετικά αποτελέσματα. Τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIP) είναι μία πολλά υποσχόμενη τεχνική αναγνώρισης και εντοπισμού των ιών με υψηλή επιλεκτικότητα στόχου, υψηλή ευαισθησία, με δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης και αυτοματισμού, αλλά και χαμηλό κόστος. Η αξιοπιστία των MIP είναι επίσης ένα σημαντικό πλεονέκτημα που παρουσιάζουν, καθώς υπάρχει ένα ελάχιστο περιθώριο για ψευδώς αρνητικά ή ψευδώς θετικά αποτελέσματα, γεγονός που είναι πολύ σημαντικό για τον έλεγχο των επιδημικών και πανδημικών ιογενών λοιμώξεων. Ωστόσο, κατά τη διαδικασία αποτύπωσης ιών, κρίσιμοι παράγοντες όπως το μέγεθος του στόχου, η

διαλυτότητα, η ευθραυστότητα και η πολυπλοκότητα της σύνθεσης του δείγματος πρέπει να εξεταστούν αναλυτικά και να αξιολογηθούν συστηματικά (Soufi et al., 2021).

Η χρήση MIPs έναντι ιών μπορεί να θεωρηθεί ως πολλά υποσχόμενη και φθηνή εναλλακτική τεχνική για τις επί του παρόντος εφαρμοζόμενες κλασικές προσεγγίσεις απομάκρυνσης ιών από ένα δείγμα, όπως είναι η υπερδιήθηση και υπερφυγοκέντρηση που είναι χρονοβόρες και δαπανηρές διαδικασίες. Τα MIP μπορούν να κατασκευαστούν για εξαιρετικά εξειδικευμένη και επιλεκτική αφαίρεση παθογόνων (Soufi et al., 2021).

Κατά την ανίχνευση των παθογόνων ιών, τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIP) δείχνουν ότι έχουν καλή αντοχή σε χημικο-βιολογική απενεργοποίηση ή βλάβη. Τα νανοσωματίδια ειδικού στόχου – MIP μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοαισθητήρες για την αναγνώριση παθογόνων ιών, τοξινών μυκήτων και βακτηρίων (Soufi et al., 2021).

Η τεχνική αυτή ανίχνευσης έχει χρησιμοποιηθεί για τους ιούς της ηπατίτιδας Α. Οι Yang et al. (2017) κατασκεύασαν ένα αισθητήρα σκέδασης φωτός, κατάλληλο για τη διάκριση και την αναγνώριση ακόμη και ιχνών ποσοτήτων της ηπατίτιδας Α. Η κατασκευή του αισθητήρα βασίστηκε σε ένα πολυμερές με μοριακά αποτυπωμένο τον ιό της ηπατίτιδας Α. Ως στοιχείο αναγνώρισης έχει χρησιμοποιηθεί πολυντοπαμίνη (polydopamide – PDA), στην οποία βρίσκεται το αποτύπωμα του ιού και βρίσκεται εξωτερικά, ως επίστρωση, νανοσωματιδίων οξειδίου του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ), με αποτελεσματική μέθοδο σύνθεσης ενός σταδίου. Ο στόχος ιός συλλέγεται επιλεκτικά από τις πολυμερικές μεμβράνες που φέρουν το αποτύπωμα, και έτσι αυξάνει η ένταση της σκέδασης του φωτός (εικόνα). Κατά την έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα απλό φασματοφωτόμετρο φθορισμού για τη μέτρηση των αλλαγών της έντασης. Η ενισχυμένη ένταση ήταν ανάλογη με τη συγκέντρωση του ιού ηπατίτιδας Α, στην περιοχή 0,04-6,0  $\text{nmol L}^{-1}$  με χαμηλό όριο ανίχνευσης,  $\text{LOD} = 8,6 \text{ pmol L}^{-1}$ . Αυτός ο αισθητήρας βασίζεται στην απλότητα, την αξιοσημείωτη βιοσυμβατότητα, την οικονομική αποδοτικότητα, τη φιλική συμπεριφορά προς το περιβάλλον και την μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση θα μπορούσε να ανιχνεύσει άμεσα. Τα υλικά που είναι εμπνευσμένα από την πολυντοπαμίνη έχουν δείξει υψηλή βιοσυμβατότητα και κυτταροσυμβατότητα, υδροφιλικότητα (Yang et al., 2017).



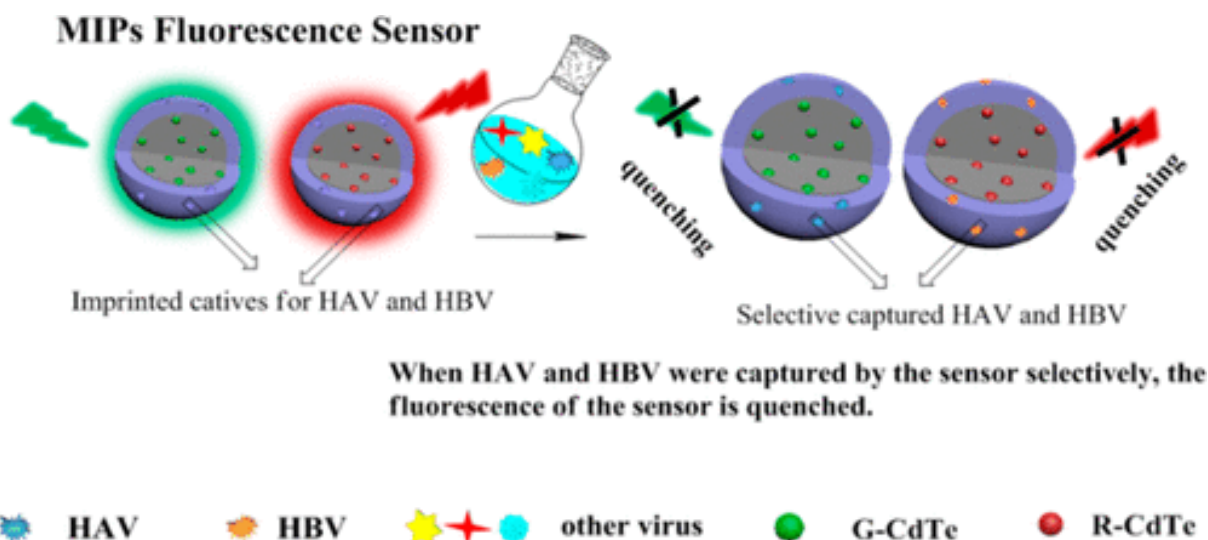
Εικόνα 14: Στο παραπάνω σχήμα, εξωτερικά του νανοσωματίδιου SiO<sub>2</sub> δημιουργείται μία στρώση πολυτοπαμίνης, που φέρει το αποτύπωμα του ιού. Δεσμεύει επιλεκτικά τον ιό ηπατίτιδας A και η σκέδαση του φωτός αλλάζει

Πηγή: (Yang et al., 2017).

Σε μια μετέπειτα μελέτη των Luo et al., (2020) για την επιλεκτική ανίχνευση και τον προσδιορισμό του ιού της ηπατίτιδας A (εντός 20 λεπτών), κατασκευάστηκαν νανοανιχνευτές (nanoprobes) MIP από μεθακρυλικό διμεθυλαμινοαιθύλιο, ένα πολυμερές που αποκρίνεται στο pH (για τη ρύθμιση του pH) και από το υλικό lanovisier-101 (MIL-101). Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδο σκέδασης φωτός υπό συντονισμό. Το εφαρμοζόμενο ευαίσθητο στο pH πολυμερές θα μπορούσε να επιταχύνει την απελευθέρωση / σύλληψη του ιού (γραμμική συγκέντρωση = 0,02-2,0 nmol L<sup>-1</sup>, LOD = 0,1 pmol L<sup>-1</sup>) (Luo et al, 2020).

Οι πολυλειτουργικοί αισθητήρες MIP είναι πολλά υποσχόμενοι για έναν ή πολλαπλό προσδιορισμό παθογόνων ιών. Οι ιοί της ηπατίτιδας A και B ανιχνεύθηκαν οπτικά σε μία μελέτη των Luo et al, (2019), χρησιμοποιώντας ένα πολυλειτουργικό αισθητήρα με μοριακά αποτυπώματα των ιών της ηπατίτιδας A και B. Εφαρμόστηκε το κόκκινο και το πράσινο χρώμα κβαντικών κουκκίδων, ώστε να πετύχουν την οπτική ανίχνευση των ιών, οι οποίες ποικίλλουν ανάλογα με τη συγκέντρωση της στοχευμένης ουσίας (εικόνα). Συγκεκριμένα, μετά τον συνδυασμό χηλίωσης μετάλλων και υδρόφιλων μονομερών, η μη ειδική σύνδεση μειώθηκε με αποτέλεσμα να ενισχυθεί η ειδικότητα της απορρόφησης. Οι εξεταζόμενοι ιοί θα μπορούσαν να ανιχνευθούν με μεγάλη ευαισθησία και επιλεκτικά (ο συντελεστής αποτύπωσης = 3,70 για

την ηπατίτιδα Α). Εκτός αυτού, η σχετική LOD για ιούς ηπατίτιδας Α και Β ήταν 3,4 και 5,3 pmol L<sup>-1</sup> αντίστοιχα, σε διάρκεια 20 λεπτών.



Εικόνα 15: Οι έγχρωμες κόκκινες και πράσινες κβαντικές κουκκίδες, προστέθηκαν στο δείγμα. Όταν στις θέσεις αποτύπωσης επιλεκτικά επικάθισαν οι επιλεγμένοι ιοί, η απορρόφηση μειώθηκε.

Πηγή: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.9b04001?goto=supporting-info>

## 5.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΩΝ

Ο προσδιορισμός του ορότυπου<sup>3</sup> είναι μία κοινή μέθοδος χαρακτηρισμού και ταξινόμησης αρκετών μικροοργανισμών, ωστόσο δε θεωρείται κατάλληλος για τους εντερικά μολυσματικούς ιούς. Η ηπατίτιδα Α και η ηπατίτιδα Ε έχουν από έναν ορότυπο, αλλά πολλαπλούς γονότυπους που δεν μπορούν να διακριθούν εύκολα. Οι νοροϊοί έχουν πολλούς ορότυπους και γονότυπους με αλληλεπικαλυπτόμενη και διασταυρούμενη αντιδραστικότητα και η οροτυπική ταξινόμηση αυτών των στελεχών είναι εξαιρετικά περίπλοκη. Η ανάλυση της γενετικής ακολουθίας είναι η τυπική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ορότυπου αυτών των ιών (Mattison & Bidawid, 2009).

Η ανάλυση ακολουθίας παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες για τον γονότυπο, αλλά δεν είναι όλα τα εργαστήρια εξοπλισμένα για την εκτέλεση αντιδράσεων αλληλουχίας. Επιπλέον, μπορεί να είναι χρονοβόρα διαδικασία να προσδιοριστεί η αλληλουχία πολλών απομονωμένων ιών και η αλληλουχία δεν μπορεί να ερμηνευθεί από ένα μη καθαρισμένο μείγμα γενετικά

<sup>3</sup> Ορότυπος: στελέχη που ανήκουν στο ίδιο είδος και έχουν διαφορετική αντιγονική σύσταση

σχετικών στελεχών. Η τεχνολογία μικρο-συστοιχίας τσιπ μπορεί να παρέχει μια γρήγορη μέθοδο για τη λήψη πληροφοριών γονότυπου χωρίς κλωνοποίηση και αλληλουχία προϊόντων PCR. Αυτά μπορεί να είναι τόσο απλά όσο μια μεμβράνη με μορφή στυπώματος γραμμής ή τόσο περίπλοκη όσο εκατοντάδες ανιχνευτές σε μια διαφάνεια. Άλλα συστήματα που έχουν δοκιμαστεί σε εντερικά μολυσματικούς ιούς είναι συστοιχίες που ενσωματώνουν ενζυματική ενίσχυση των αλληλουχιών στόχων στην επιφάνεια διαφάνειας και γενικές συστοιχίες ετικετών που δεσμεύουν αλληλουχίες από τα σετ εκκινήτων ενίσχυσης (Mattison & Bidawid, 2009).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι ιοί είναι πολύ μικροί μικροοργανισμοί οι οποίοι δεν ζουν ελεύθεροι αλλά χρησιμοποιούν τα κύτταρα του ξενιστή για να αναπαραχθούν και έχουν οριστεί ως μοριακά γενετικά παράσιτα. Οι ιοί ποικίλλουν με βάση το μέγεθος με εύρος τιμών 0,02-0,4 μικρόμετρα, με βάση το γονιδίωμα που μπορεί να είναι DNA ή RNA και με βάση την δομή του σωματιδίου του ιού. Οι ιοί μπορούν να μολύνουν και να προκαλέσουν αρρώστιες στους ανθρώπους, στα ζώα και στα φυτά. Οι ιοί οι οποίοι συνδέονται συνήθως με τις τροφογενείς λοιμώξεις είναι ο Νοροϊός (NoV), η Ηπατίτιδα Α (HAV), ο ανθρώπινος ροταϊός (HRV), ο εντεροϊός και η Ηπατίτιδα Ε (HEV).

Υπάρχουν δυο συστήματα ταξινόμησης των οργανισμών, η ταξινομία του Λινναίου και η ταξινομία του Αντάνσον. Το πρώτο είναι μια μονοθετική ιεραρχική ταξινόμηση ενώ το δεύτερο μια πολυθετική ιεραρχική ταξινόμηση και επίσης η ταξινομία του Λινναίου προτάθηκε από τον Marglin και τους συνεργάτες του για την ταξινόμηση των ιών αλλά έχει πολλές αδυναμίες στην εφαρμογή του στην ταξινόμηση των ιών. Τα βασικά συστήματα ταξινόμησης των ιών είναι δύο. Το ένα σύστημα είναι της Διεθνούς Επιτροπής Ταξινόμησης των Ιών (ICTV) και το άλλο σύστημα είναι η ταξινόμηση κατά Baltimore. Η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV) λειτουργεί με έναν αριθμό επιτροπών, υποεπιτροπών και ομάδων μελέτης που αποτελείται από περισσότερους από 492 εξέχοντες ιολόγους. Η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης για την Ταξινόμηση των Ιών (ICTV) τακτικά δημοσιεύει εκθέσεις περιγράφοντας όλες τις ταξινομικές βαθμίδες των ιών με λίστα ταξινομημένων ιών καθώς και περιγραφές οικογενειών ιών και γενών. Η ταξινόμηση κατά Baltimore χωρίζει τους ιούς σε επτά κατηγορίες βασισμένα στον συνδυασμό ενός τύπου γονιδιώματος και στον μηχανισμό αναπαραγωγής.

Οι ιοί που βρίσκονται στα τρόφιμα για να προκαλέσουν λοίμωξη πρέπει να εισέλθουν στα ζωντανά κύτταρα, ακόμη και σε μικρό βαθμό. Στα κόπρανα των μολυσμένων ατόμων βρίσκονται σε μεγάλη αναλογία και τα λύματα μολύνουν τα ύδατα, άρα και τους οργανισμούς που ζουν ή τρέφονται από αυτά, τα φυτά τα οποία ποτίζονται με μολυσμένα νερά. Η κατανάλωση ψαριών και βρώσιμων μαλακίων ελοχεύει ένα βαθμό κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία λόγω της ικανότητάς τους να φιλτράρουν, να συσσωρεύουν και να συγκεντρώνουν τα παθογόνα που υπάρχουν στο νερό. Τα λαχανικά και οι καρποί φρούτων, εάν ποτίζονται με μολυσμένο νερό, μπορούν να διατηρήσουν μικροβιακούς παράγοντες στις επιφάνειές τους.

Η μικροβιολογική παρακολούθηση της ασφάλειας των τροφίμων και των υδάτινων πόρων επί του παρόντος επικεντρώνεται κυρίως στη βακτηριακή μόλυνση και όχι στους ιούς.

Επομένως, παρά την αυξανόμενη προσοχή στην ασφάλεια των τροφίμων, οι ιοί που μεταδίδονται με τροφή ή το νερό προκαλούν εκατοντάδες χιλιάδες θανάτους κάθε χρόνο. Οι πιο ευάλωτοι πληθυσμοί πλήττονται περισσότερο, δηλαδή μικρά παιδιά, ηλικιωμένοι και ανοσοκατεσταλμένα άτομα.

Οι αναλυτικές μέθοδοι για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των ιών στα τρόφιμα αλλά και στο περιβάλλον την προετοιμασία του δείγματος, την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των ιών.

Το πιο δύσκολο στάδιο είναι η προετοιμασία των δειγμάτων ώστε να διαχωριστούν τα ιικά σωματίδια από τη μάζα των τροφίμων. Η ανίχνευση των ιών συνήθως απαιτεί να έχουν απομονωθεί οι ιοί από το τρόφιμο και από ανασταλτικούς παράγοντες που μπορεί να αλλοιώσουν το αποτέλεσμα. Οι πιο συνηθισμένες διαδικασίες είναι:

- 1.** Έκλυση και συγκέντρωση των ιών με πολυαιθελνογλυκόλη ( PEG). Έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση εντεροϊών, του ιού της πολιομυελίτιδας, των ροταϊών, του ιού της ηπατίτιδας και των νοροϊών σε δείγματα νερού, λυμάτων και κοπράνων, εκλούσματα φρούτων και λαχανικών. Οι σημαντικότερες εφαρμογές αυτής της μεθόδου είναι στην επεξεργασία δύσκολων δειγμάτων, όπως σαλάτα ζυμαρικών, κρέας, κρέμα σαντυγί και οστρακοειδή.
- 2.** Προσρόφηση και έκλυση με τη βοήθεια φορτισμένων φίλτρων. έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για πολλά χρόνια για τη συγκέντρωση των εντεροϊών, του ιού της πολιομυελίτιδας, των ροταϊών, του ιού της ηπατίτιδας, των νοροϊών, των αδενοϊών και των αστροϊών σε δείγματα νερού, λυμάτων, σε νερό ξεπλύματος από μολυσμένα μαρούλια, φράουλες και άλλα μαλακά φρούτα, τυριά και άλλες εστίες μόλυνσης
- 3.** Έκλυση και συγκέντρωση με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια. Έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση εντεροϊών, ροταϊών, ηπατίτιδας και νοροϊών σε νερό, μαρούλι, πράσινα κρεμμύδια, φράουλες, οστρακοειδή και λύματα. Έχουν αναπτυχθεί συστήματα με χρήση κατιονικών σφαιριδίων για την αποτελεσματική απομόνωση ροταϊών και ηπατίτιδας από φρούτα, λαχανικά, κρέατα και ψημένα προϊόντα.
- 4.** Έκλυση και συγκέντρωση με υπερφυγοκέντρωση. Η υπερδιήθηση έχει χρησιμοποιηθεί για την προετοιμασία εκχυλισμάτων εντεροϊών, ιού της πολιομυελίτιδας και ροταϊών σε κρέας και οστρακοειδή. Σε πιο περιορισμένη κλίμακα, εφαρμόστηκε στην εκχύλιση του ιού της ηπατίτιδας Α και νοροϊών σε φρούτα και σε λύματα από το πλύσιμο λαχανικών.
- 5.** Έκλυση και συγκέντρωση με υπερδιήθηση. Έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα για την απομόνωση των νοροϊών και της ηπατίτιδας Α από μαλακά φρούτα, κρέας και

οστρακοειδή. Ωστόσο, η εφαρμογή της είναι περιορισμένη στα τρόφιμα, καθώς μαζί με τα ικά σωματίδια απομακρύνονται από τη μάζα των τροφίμων και το σύνολο σχεδόν των στερεών συστατικών.

Η ανίχνευση των ιών στα τρόφιμα είναι μία διαδικασία απαραίτητη για την πρόληψη των ιογενών τροφογενών νοσημάτων. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι ανίχνευσης των ιών στα τρόφιμα. Κάθε μία μέθοδος παρουσιάζει συγκριτικά με τις υπόλοιπες σημαντική διαφοροποίηση ως προς την ταχύτητα και το χρόνο εκτέλεσης, την ευαισθησία ανίχνευσης, την εξειδίκευση, τη λειτουργική απλότητα και το οικονομικό κόστος. Ευρέως χρησιμοποιούμενες και πιο αξιόπιστες θεωρούνται οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης: PCR, PCR με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR), η PCR σε πραγματικό χρόνο και η RT-PCR σε πραγματικό χρόνο.

Η μέθοδος ποιοτικής ανίχνευσης των ιών της ηπατίτιδας και του νοροϊού σε τρόφιμα που προτείνεται από τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (International Organization for Standardization – ISO) είναι η ISO 15216 -2: 2019 και βασίζεται στην RT-PCR σε πραγματικό χρόνο. Εφαρμόζεται και έχει επικυρωθεί για την ανίχνευση των συγκεκριμένων ιών στα εξής δείγματα τροφίμων: μαλακά φρούτα (φράουλες, σμέουρα, σταφίδες), φύλλα, στέλεχος και βολβός των λαχανικών, στο εμφιαλωμένο νερό και στα δίθυρα μαλάκια.

Μία νέα μέθοδος συνδυάζει τη πολλαπλή σύνδεση νουκλεοτιδίων (MOL) με τεχνολογία PCR και μέθοδο πολυπλεξίας xMAP. Το σύστημα περιλαμβάνει τους αδενοϊούς 40/41 (AdV), τον ροταϊό A (RVA), τον νοροϊό (NoV), τον ιό της ηπατίτιδας E (HEV), τον ιό της ηπατίτιδας A (HAV) και έναν στόχο για εξωτερικό έλεγχο του συστήματος, οι οποίοι ανιχνεύονται ταυτόχρονα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα τρόφιμα για την πρόληψη από τροφογενή νοσήματα που προκαλούνται από τους ανωτέρω ιούς.

Η μέθοδος αλληλουχοεξαρτώμενης ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος (nucleic acid sequence-based amplification – NASBA) ενισχύει τις αλληλουχίες του RNA και αποτελεί μία χρήσιμη μέθοδο ανίχνευσης των μικροβιακών παθογόνων σε δείγματα τροφίμων. Έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ιού της ηπατίτιδας A και των ροταϊών.

Η ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (Loop-mediated isothermal amplification - LAMP) χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του DNA και παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση, αποτελεσματικότητα και ταχύτητα υπό ισοθερμικές συνθήκες. Επίσης, αναπτύχθηκαν μέθοδοι αντίστροφης μεταγραφής LAMP (RT-LAMP) για ταχεία ανίχνευση του ιού της ηπατίτιδας E και του νοροϊού.

Για την ανίχνευση των ιών στα τρόφιμα έχουν χρησιμοποιηθεί και βιοαισθητήρες, οι οποίοι παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να ανιχνεύσουν τα μολυσματικά ικά σωματίδια, δίνοντας μία πιο ακριβή κλίμακα για τη μολυσματική ικανότητα κάθε δείγματος. Τα



απταμερή νουκλεϊκού οξέος είναι μικρές αλληλουχίες ssDNA ή ssRNA που παρουσιάζουν συγγένεια δέσμησης με ένα μόριο στόχο, όπως είναι οι ιοί. Ερευνητικά χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση νοροϊών σε φυλλώδη πράσινα λαχανικά.

Τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIP) είναι μία πολλά υποσχόμενη τεχνική αναγνώρισης και εντοπισμού των ιών με υψηλή επιλεκτικότητα στόχου, υψηλή ευαισθησία, με δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης και αυτοματισμού, αλλά και χαμηλό κόστος. Τα νανοσωματίδια ειδικού στόχου – MIP μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοαισθητήρες για την αναγνώριση παθογόνων ιών, τοξινών μυκήτων και βακτηρίων

Είναι σημαντικό να συνεχιστεί από την επιστημονική κοινότητα η αναζήτηση καλύτερων μεθόδων ανίχνευσης των ιών στα τρόφιμα, οι οποίες θα πραγματοποιούνται αν είναι δυνατόν σε ένα στάδιο και θα παρουσιάζουν ευαισθησία, ταχύτητα, εξειδίκευση, οικονομία στο βέλτιστο βαθμό.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Baert L.**, (2013), 12 - Foodborne virus inactivation by thermal and non-thermal processes, *Viruses in food and water*, 237-260, <https://doi.org/10.1533/9780857098870.3.237>
- **Bao Y., Kapustin Y., Tatusova T.**, (2008), Virus Classification by Pairwise Sequence Comparison (PASC), *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*, 342-348, <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00710-X>
- **Bintsis T.** (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3 (3): 529-563: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6604998/>
- **Blumberg D.A.**, (2012), 14 - Hepatitis A Infection and Prevention, *Netter's Infectious Diseases*, 60-64, <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0126-5.00014-8>
- **Bosch A., Gkogka El., Le Guyader F.S., Loisy-Hamon F., Lee A., van Lieshout L., Marthi B., Myrmel M., Sansom A., Schultz A.C., Winkler A., Zuber S., Phister T.** (2018). Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *International Journal of Food Microbiology*. 285 : 110-128 : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160518303064>
- **Chen Q., Yuan I., Wan J., Chen Y., Du C.** (2014). Colorimetric detection of hepatitis E virus based on reverse transcription loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay. *Journal of Virological Methods*, 197 :29-33: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24269797/>
- **Cook N.** (2003). The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 53 (2) :165-174 : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701203000228>
- **Cook N., Martelli F., van der Poel W.H.M., Ruggeri F.M.**, (2014), Viruses: Hepatitis E Virus, *Encyclopedia of Food Safety*, 205-207, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00127-X>
- **Cook N., Vickers-Smith L., D'Agostino M.** (2021). Detection of Hepatitis A Virus in Strawberries Implicated in an Outbreak in the USA in 1997. *Food and Environmental Virology* : <https://link.springer.com/article/10.1007/s12560-021-09480-2#citeas>
- **Duizer E., Koopmans M.**, (2009), 32 - Gastroenteritis viruses, *Foodborne Pathogens (Second Edition)*, 1161-1192, <https://doi.org/10.1533/9781845696337.3.1161>

• **ΕΟΔΥ** (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας). (2020). Επιδημιολογικά δεδομένα για την Ηπατίτιδα Α στην Ελλάδα 2004-2019 (Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων). Διατίθεται online [22/5/2021] : <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/05/ipatitida-a-2004-2019-gr.pdf>

• **Escudero-Abarca B.I., Suh S.H. Moorre M.D., Dwivedi H.P., Jaykus L.A.** (2014). Selection, characterization and application of nucleic acid aptamers for the capture and detection of human norovirus strains. *PLoS One*, 9 (9):e106805 : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4156411/>

• **Fauquet C.M.**, (1999), TAXONOMY, CLASSIFICATION AND NOMENCLATURE OF VIRUSES, *Encyclopedia of Virology (Second Edition)*, 1730-1756, <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0277>

• **Fauquet C.M.** (2008). Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*, 9-23 : <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00509-4>

• **FAO/WHO** (Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization). (2008). Viruses in food: scientific advice to support risk management activities. *Microbiological Risk Assessment Series*, 13 : 1-58. Available at [20/05/2021]: <http://www.fao.org/3/i0451e/i0451e.pdf>

• **Gastañaduy P.A., Hall A.J., Parashar U.D.**, (2013), Chapter 21 – Rotavirus, *Foodborne Infections and Intoxications (Fourth Edition)*, 303-311, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416041-5.00021-4>

• **Griesche C. & Baeumner A.J.** (2020). Biosensors to support sustainable agriculture and food safety. *Trends in Analytical Chemistry*, 128 : 115906 : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993620301357>

• **Griffiths M.W., Walkling-Ribeiro M.**, (2012), 7 - Microbial decontamination of milk and dairy products, *Microbial Decontamination in the Food Industry*, 190-238, <https://doi.org/10.1533/9780857095756.1.190>

• **Guttman B.**, (2013). Virus, *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, 291-294, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01626-0>

• **Guyader F.S., Le Saux J.C., Ambert-Balay k., Krol J. Serais O., Parnaudeau S., Giraudon H., Delmas G., Pommepuy M., Pothier p., Atmar R.L.** (2008). Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-

related gastroenteritis outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (12): 4011-4017: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18842942/>

• **Hrdy J., Vasickova P., Nesvadbova M., Novotny J., Mati T., Kralik P.** (2021). MOL-PCR and xMAP Technology: A Multiplex System for Fast Detection of Food and Waterborne Viruses. *The Journal of Molecular Diagnostics.*, 23 (6):765-776 : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525157821000866>

• **ISO.** (2019). ISO 15216-2:2019 Microbiology of the food chain- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real- time RT-RCP – Part 2: Method for detection. Available at [09/06/2021] : <https://www.iso.org/standard/74263.html>

• **Karlova T., Chumachenko T., Mahota I.** (2018). Epidemiological Assessment of Hepatitis A outbreak in the village A of Kharkiv Oblast. In BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium. April 16-20, 2018: 40: <http://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/19741/1/1.pdf>

• **Korsman S.N.J, van Zyl G.U., Nutt L., Anderson, M.I. Preiser W.,** (2012), Classification of Viruses, *Virology*, 6-9, <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-07367-0.00003-3>

• **Κυριαζής Ι.Δ., Καμπούρης Μ.Ε., Πουλάς Κ., Πατρινός Γ.Π.,** (2014). Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μικροοργανισμών. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*, 31 (1): 23-40: <https://www.mednet.gr/archives/2014-1/pdf/23.pdf>

• **Lakshmi B.A. & Kim S.** (2021).Chapter 27- Recent trends in the utilization of LAMP for the diagnosis of viruses, bacteria, and allergens in food. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 2: 291-297 : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128214060000278>

• **Li D., Butot S., Zuber S., PROFEL, Uyttendaele M.** (2018). Monitoring of foodborne viruses in berries and considerations on the use of RT-PCR methods in surveillance. *Food Control*, 89: 235-240 : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713518300707>

• **Luo L., Zhang F., Gong H., Chen C. Cai C.** (2019). Visual Simultaneous Detection of Hepatitis A and B Viruses Based on a Multifunctional Molecularly Imprinted Fluorescence Sensor. *Analytical Chemistry*, 91 (24): 15748-15756: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.9b04001?goto=supporting-info>

• **Lu Y., Ma M., Wang H., Wang D., Chen C., Jing Q., Geng J., Li T., Zhang Z., Yang Z.** (2020). An outbreak of norovirus-related acute gastroenteritis associated with delivery food

in Guangzhou, southern China. *BMC Public Health*, 20 (25): 1-7:  
<https://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-019-8117-y>

• **Mattison K. & Bidawid S.** (2009). Analytical Methods for Food and Environmental Viruses. *Food and Environmental Virology*, 1 (): 107-122:  
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12560-009-9017-6>

• **Mayet A., Andreo V., Bedubourg G., Victorion S., Plantec J.Y., Soullie B., Meynard J.B., Dedieu J.J., Polveche P.Y., Migliani R.** (2011). Food-borne outbreak of norovirus infection in a French military parachuting unit, April 2011. *Eurosurveillance*, 16 (30):  
<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.16.30.19930-en?crawler=true>

• **Mehta N., Gupta M., Mishra M., Singh S.K.** (2021). Hepatitis E Genotype 1 Outbreak in Jharkhand India: A Descriptive Analysis. *Infectious Disorders – Drug Targets*. 21 (1): 99-104: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31957617/>

• **Messacar K. Abzug M.J., Dominguez S.R.** (2016). 2014 outbreak of enterovirus D68 in North America. *Journal of Medical Virology*, 88 (5): 739-745:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26489019/>

• **Mesquita J.R., Vaz L., Cerqueira S., Castilho F., Santos R., Silvia M., Manso C., Romalde J.L., Nascimento M.S.J.** (2011). Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. *Food Microbiology*, 28 (5): 936-941: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002011000189>

• **McClure P.** (2008). Emerging pathogens of concern in in-pack heat-processed foods, *In-Pack Processed Foods*, 229-250, <https://doi.org/10.1533/9781845694692.3.229>

• **Nelluri D.K.D., Thota N.S.,** (2018), Chapter 9 - Challenges in Emerging Food-Borne Diseases, *Food Safety and Preservation*, 231-268, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814956-0.00009-3>

• **North Central District Health Department.** (2021). Press Release. Available online [10/07/2021] : <http://www.ncdhd.org/files/FBI%205-14-2021.pdf>

• **Parron I., Alvarez J., Jane M., Sanchez T.C., Razquin E., Guix S., Camps G., Perez C., Dominguez A.** (2019). A foodborne norovirus outbreak in a nursing home and spread to staff and their household contacts. *Ediemiology & Infection*, 147: e225:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6625192/>

• **Purpari G., Macaluso G. Di Bella S., Gucciardi G., Mira F., Marco P.D., Lastra A., Petersen E., La Rosa G., Guercio A.** (2019). Molecular characterization of human enteric

viruses in food, water samples, and surface swabs in Sicily. *International Journal of Infectious Diseases*. 80: 66-72 : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971219300025>

• **Reid A.B, Anderson T.L., Cooley L., Williamson J, Mcgregor A.R.** (2011). An Outbreak of Human Rhinovirus Species C Infection in a Neonatal Intensive Care Unit. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 30 (12): 1096-1095: [https://journals.lww.com/pidj/Fulltext/2011/12000/An\\_Outbreak\\_of\\_Human\\_Rhinovirus\\_Species\\_C.18.aspx](https://journals.lww.com/pidj/Fulltext/2011/12000/An_Outbreak_of_Human_Rhinovirus_Species_C.18.aspx)

• **Soufi C.J., Irvani S., Varma R.** (2021). Molecularly imprinted polymers for the detection of viruses: challenges and opportunities. *Analyst*. 146: 3087-3100 : <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/an/d1an00149c#!divAbstract>

• **Tavoschi L., Severi e., Niskanen T., Boalaert F., Rizzi V., Liebana E., Gomes Dias J., Nichols G., Takkinene J., Coulombier D.** Food-borne diseases associated with frozen berries consumption: a historical perspective, European Union, 1983 to 2013. *Eurosurveillance*, 20 (9): [https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2015.20.29.21193;jsessionid=LmJu9O8fPib90OqojQJtXn8f.i-0b3d9850f4681504f-ecdcLive#html\\_fulltext](https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2015.20.29.21193;jsessionid=LmJu9O8fPib90OqojQJtXn8f.i-0b3d9850f4681504f-ecdcLive#html_fulltext)

• **Van Regenmortel M.H.V,** (2011), 1-Virus Species, *Genetics and Evolution of infectious disease*, 3-19, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384890-1.00001-7>

• **Wang-Shick R.,** (2017), Chapter 1 - Discovery and Classification, *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*, 3-20, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00001-1>

• **Warriner K.,** (2005), 1 - Pathogens in vegetables, *Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables*, 3-43, <https://doi.org/10.1533/9781845690243.1.3>

• **Warriner K., Namvar A.,** (2017), Chapter 9 - Current Challenges in Enhancing the Microbiological Safety of Raw Meat, *New Aspects of Meat Quality*, 191-222, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100593-4.00010-2>

• **WHO** (World Health Organization). Virus in food

• **Wong Y.-P., Othman S., Lau Y.L., Radu S., Chee H.Y.** (2017). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*. 124 (3):626-643 : <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.13647>

• **Woods J.W., Burkhardt W. Ill,** (2013) 14 - Preventing and controlling viral contamination of shellfish, *Viruses in Food and Water*, 281-292, <https://doi.org/10.1533/9780857098870.3.281>

• **Yang B., Gong H., Chen C., Chen X., Cai C.** (2017). A virus resonance light scattering sensor based on mussel- inspired molecularly imprinted polymers for high sensitive and high selective detection of Hepatitis A Virus. *Biosens Bioelectron.* 87 : 679-685 : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27631682/>

• **Χατζηγιάννη Α.** (2017). 23. Ιοί Ηπατίτιδας Α, Β, Δ και Ε. για το μάθημα Ιατρική-Μικροβιολογία ΙΙ (Ιατρική Μικροβιολογία). Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Διατίθεται στο διαδίκτυο [02/06/2021]: <https://eclass.uoa.gr/modules/document/index.php?course=MED736&openDir=/53a143d4D1zC>

• **Zhang F., Luo L., Gong H., Chen C. Cai C.** (2020). Molecular imprinting resonance light scattering nanoprobe based on pH-responsive metal-organic framework for determination of hepatitis A Virus. *Microchimica Acta*, 187 (2) :140 : <https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-020-4122-1>

• **Ziros P.G., Kokkinos P.A., Allard A., Vantarakis A.** (2015). Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of Adenovirus 40 and 41. *Food and Environmental Virology*, 7 (3): 276-285 : <https://link.springer.com/article/10.1007/s12560-015-9182-8>