



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

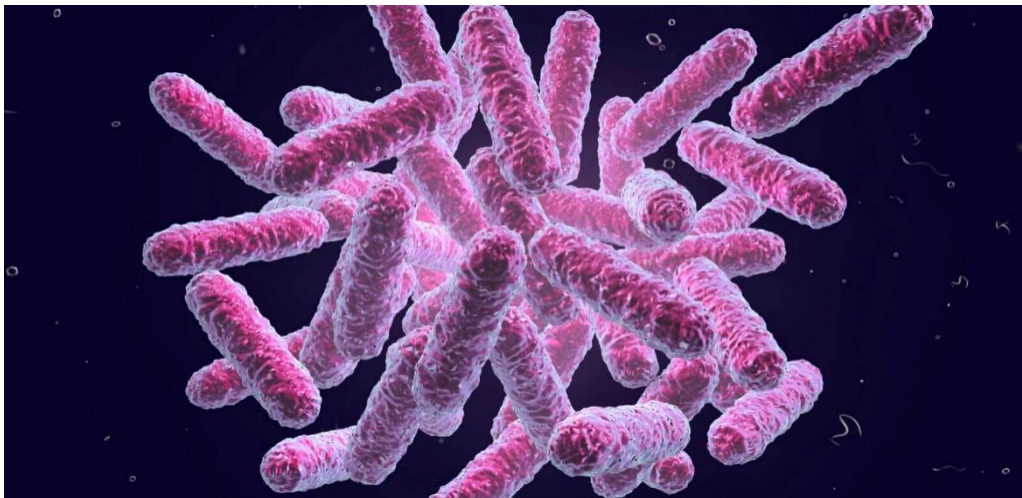
---

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

---

**ΘΕΜΑ**

**ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΣΥΝΑΝΤΑΜΕ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ  
ΚΑΙ Η ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**



Εισηγητές: Τζεμαλή Κεχαγιά, Γεωργία Οικονομοπούλου

Επιβλέπουσα: Ανθμία Μπατρινού– Αικατερίνη , Καθηγήτριας Μικροβιολογίας  
ΠΑΔΑ

ΑΘΗΝΑ 2021

## ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

### 1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Μπατρίνου Ανθιμία

Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων,  
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

### 2. Μέλος της επιτροπής

Στρατή Ειρήνη

Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων,  
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

### 3. Μέλος της επιτροπής

Κυρανά Βασιλική

Μέλος ΕΔΙΠ, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο  
Δυτικής Αττικής

## ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαι ο/η αποκλειστικός/ή συγγραφέας της παρούσας πτυχιακής εργασίας, η οποία δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής, ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν για την συγγραφή της περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί διαχρονικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Γεωργία Οικονομοπούλου

Τζεμαλή Κεχαγιά



## Περίληψη

Τα εντεροβακτήρια είναι η πιο μεγάλη οικογένεια των βακτηρίων. Είναι προαιρετικά αναερόβιοι, αρνητικοί κατά Gram μη σπορογόνοι, ραβδόμορφου σχήματος. Κάποια από τα είδη εντεροβακτηριδίων είναι *Salmonella spp.*, η *Escherichia coli*, η *Yersinia spp.*, η *Shigella spp.* και το *Citrobacter spp.*. Τα εντεροβακτηρίδια είναι ένας δείκτης ποιότητας για τα τρόφιμα. Εντεροβακτήρια συναντάμε σε όλες τις κατηγορίες τροφίμων, γιαυτόν τον λόγο έχουν θεσπιστεί κριτήρια ασφάλειας και υγιεινής για τα τρόφιμα, τα οποία περιέχουν τα όρια ανίχνευσης των βακτηρίων αυτών σε κάθε κατηγορία τροφίμου. Επίσης ο κανονισμός προβλέπει την θέσπιση υποχρεωτικών εργαστηριακών αναλύσεων. Οι μέθοδοι ανίχνευσης εντεροβακτηριδίων διαχωρίζονται σε μικροβιολογικές, βιοχημικές και σε μοριακές, στις οποίες ανήκει και η πιο πρόσφατη και επαναστατική μέθοδος PCR. Τα τελευταία χρόνια την επιστημονική κοινότητα απασχολεί η μικροβιακή αντοχή των βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Οι παράγοντες που καθορίζουν την αντοχή στα αντιβιοτικά είναι χρωμοσωμικοί παράγοντες όπως οι μεταλλάξεις και εξωχρωμοσωμικοί παράγοντες, όπως τα πλασμίδια. Τα εντεροβακτήρια μπορεί να αποκτήσουν αντοχή στα αντιβιοτικά και να είναι ισχυρά παθογόνα. Οι κυριότεροι μηχανισμοί αντοχής των Εντεροβακτηρίων έναντι των β-λακταμικών αντιβιοτικών είναι η μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης και η καταστροφή του αντιβιοτικού από τις β-λακταμάσες. Λόγω της επικινδυνότητας για την ανθρώπινη υγεία, των υπολειμμάτων των αντιβιοτικών στα τρόφιμα, θεσπίστηκαν ανώτατα όρια, για να αυξηθεί η ασφάλεια των τροφίμων.

## Περιεχόμενα

Εισαγωγή .....	σελ. 4
Κεφάλαιο 1 Εντεροβακτήρια .....	σελ 11
1.1 Ορισμός .....	σελ 11
1.2 Δομή Εντεροβακτηρίων.....	σελ 13
1.3 Είδη και στελέχη Εντεροβακτηρίων.....	σελ 18
1.3.1 <i>Escherichia Coli</i> .....	σελ 18
1.3.1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά <i>E.Coli</i> .....	σελ 18
1.3.1.2 Αντιγονική Σύσταση .....	σελ 20
1.3.1.3 Παθογόνος Δράση .....	σελ 23
1.3.2 <i>Salmonella</i> .....	σελ 28
1.3.2.1 Γενικά Χαρακτηριστικά <i>Salmonella</i> .....	σελ 28
1.3.2.2 Μορφολογία.....	σελ 30
1.3.2.3 Παθογένεια .....	σελ 31
1.3.2.4 Πηγές Μόλυνσης .....	σελ 32
1.3.3 <i>Shigella</i> .....	σελ 33
1.3.3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά .....	σελ 33
1.3.3.2 Μορφολογία.....	σελ 33
1.3.4 <i>Yersinia</i> .....	σελ 34
1.3.4.1 Γενικά Χαρακτηριστικά .....	σελ 34
1.3.4.2 Μορφολογία.....	σελ 35
1.3.4.3 Παθογένεια .....	σελ 36
1.3.5 <i>Cronobacter Sakazakii</i> .....	σελ 37
1.3.5.1 Γενικά Χαρακτηριστικά -Ταξινόμηση.....	σελ 37
1.3.5.2 Παθογένεια .....	σελ 38
Κεφάλαιο 2 Εντεροβακτήρια και τρόφιμα .....	σελ 41
2.1 Ψάρια.....	σελ 41
2.2 Λαχανικά και Φρούτα .....	σελ 43
2.3 Γάλα και Γαλακτοκομικά προϊόντα .....	σελ 46
2.4 Κρέας.....	σελ 52
2.5 Μέθοδοι ανίχνευσης των εντεροβακτηρίων στα τρόφιμα.....	σελ 58
2.5.1 Μικροβιολογικές Μέθοδοι .....	σελ 58
2.5.2 Βιοχημικές Μέθοδοι .....	σελ 60

2.5.3 Μοριακές Μέθοδοι .....	σελ 61
Κεφάλαιο 3 Αντιβιοτικά .....	σελ 67
3.1 Αντιβιοτικά .....	σελ 67
3.1.1 Ορισμός.....	σελ 67
3.1.2 Δράση Αντιβιοτικών.....	σελ 67
3.1.3 Κυριότερες Κατηγορίες Αντιβιοτικών....	σελ 73
3.1.4 Β-Λακταμικά Αντιβιοτικά....	σελ 74
3.1.4.1 Πενικιλίνες.....	σελ 75
3.1.4.2 Κεφαλοσπορίνες.....	σελ 78
3.1.4.3 Καρβαπενέμες.....	σελ 80
3.1.4.4 Αμινογλυκοσίνες.....	σελ 81
3.2 Μικροβιακή Αντοχή.....	σελ 82
3.2.1 Γενετικοί παράγοντες που καθορίζουν την αντοχή στα αντιβιοτικά.....	σελ 83
3.3 Κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης.....	σελ 85
Βιβλιογραφία .....	σελ 87

## Εισαγωγή

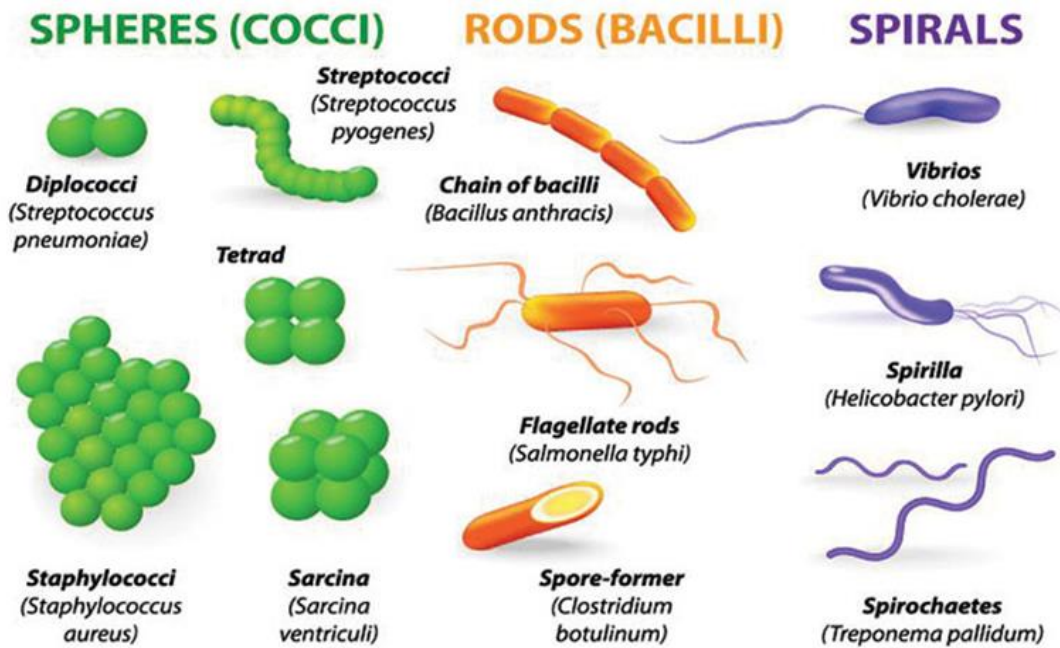
### Γενικά για τα βακτήρια

Οι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί χωρίς πυρήνα ή οργανίδια ανήκουν στο βασίλειο των προκαρυωτικών (Ενιαίοι Οργανισμοί) και ονομάζονται βακτήρια. Το κυτταρόπλασμα περιβάλλεται από ένα άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα αποτελούμενο από υδατάνθρακες και άλλες χημικές ουσίες και η χρώση Gram βασίζεται σε αυτό το τοίχωμα. Τα βακτήρια συνθέτουν DNA, RNA και πρωτεΐνη και μπορούν να αναπαραχθούν ανεξάρτητα, αλλά χρειάζονται τον ξενιστή για να τους παρέχει τροφή και κατάλληλο περιβάλλον. Εκατομμύρια μη παθογόνα βακτήρια ζουν στο ανθρώπινο δέρμα και τους βλεννογόνους. Αυτά είναι κανονική χλωρίδα. Τα βακτήρια που προκαλούν ασθένειες ονομάζονται παθογόνα..Τα βακτήρια αποτελούν μια μεγάλη ενότητα μικροοργανισμών, τα οποία είναι μονοκύτταροι,προκαρυωτική μικροοργανισμοί. Συνήθως σχηματίζουν αθροίσματα,τις αποικίες.

Τα χαρακτηριστικά των βακτηρίων είναι τα εξής :

- **Το σχήμα**
- **Το μέγεθος**
- **Η αναπαραγωγή**
- **Η μετάλλαξη**
- **Η κινητικότητα**
- **Οι απαιτήσεις σε τροφή και οξυγόνο**
- **Και οι απαιτήσεις όσον αφορά τη θερμοκρασία**

**Σχήμα:**Τα βακτήρια χωρίζονται σε σφαιρικά ή ωσειδή βακτήρια και εμφανίζονται ως μεμονωμένα κύτταρα(σωματίδια) ή ζεύγη (διπλόκοκκοι),σφρούς (σταφυλόκοκκος), αλυσίδες(στρεπτόκοκκος) ή κυβικές ομάδες(σαρκίνες).Τα βακτήρια ονομάζονται βάκιλλοι, εκείνα με πιο ελλειπτικά σχήματα ονομάζονται κόκκοι και αυτά που σχηματίζουν αλυσίδες ονομάζονται στρεπτοβάκιλλοι.Τα σπειροειδή βακτήρια είναι άκαμπτα (σπειρύλλια),εύκαμπτα (σπειροχαίτες) ή καμπύλα.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση ειδών βακτηρίων

**Βάση Μέγεθος:** Κατά μέσο όρο, οι βάκιλοι έχουν διάμετρο περίπου 1  $\mu\text{m}$  και μήκος 4  $\mu\text{m}$ . Για μερικές σπείρες, το μέγεθός τους κυμαίνεται από 0,5 έως 1,0 μικρά σε διάμετρο και 10 έως 20 μικρά σε μήκος.

**Αναπαραγωγή:** Ο χωρισμός στα δύο είναι η πιο κοινή μέθοδος αναπαραγωγής, αλλά ορισμένα βακτήρια ανταλλάσσουν γενετικό υλικό με μέλη του ίδιου ή διαφορετικού είδους. Ο ρυθμός αναπαραγωγής επηρεάζεται από τις αλλαγές στη θερμοκρασία, τη διατροφή και το pH. Εάν το περιβάλλον δεν είναι πλέον ευνοϊκό, μερικοί βακίλλοι θα σχηματίσουν σπόρους, οι οποίοι περιέχουν γενετικό υλικό σε συμπιεσμένη μορφή και περιβάλλονται από παχιά τοιχώματα. Οι σπόροι είναι πολύ ανθεκτικοί σε υψηλή θερμοκρασία, ξηρασία και απολυμαντικά. Όταν το περιβάλλον γίνει ξανά ευνοϊκό, οι σπόροι θα βλαστήσουν.

**Κινητικότητα:** Κανένα σωματίδιο δεν μπορεί να μετακινηθεί, αλλά οι περισσότεροι βακίλλοι οι σπειροειδείς μορφές να κινούνται ανεξάρτητα. Η κίνηση εξαρτάται από την ύπαρξη ενός ή περισσότερων μαστιγίων, αυτών των λεπτών τμημάτων που μοιάζουν με μαστίγια, τα οποία λειτουργούν ως έλικες.



**Μετάλλαξη:** Τα βακτήρια, όπως όλα τα έμβια όντα, υφίστανται μεταλλάξεις Το περιβάλλον καθορίζει ποιες μεταλλάξεις είναι ευεργετικές και έχουν αξία επιβίωσης. Προφανώς καλό για τα βακτήρια, αλλά κακό για τους ανθρώπους είναι οι μεταλλάξεις που είναι ανθεκτικές στις δυνητικά θανατηφόρες επιδράσεις των αντιβιοτικών

**Απαιτήσεις σε τροφή και οξυγόνο:.** Τα περισσότερα βακτήρια είναι ετεροτροφικά (απαιτεί οργανική ύλη για τα τρόφιμα). Παράσιτα ονομάζονται όταν τρέφονται από άλλους ζώντες μικροοργανισμούς. Εάν τρέφονται με άψυχη οργανική ύλη, ονομάζονται σαπροφύτες. Αυτότροφα ονομάζονται τα βακτήρια όταν λαμβάνουν ενέργεια από ανόργανες ενώσεις. Τα βακτήρια που απαιτούν οξυγόνο ονομάζονται αερόβια βακτήρια. Αυτά που αναπτύσσονται μόνο έλλειψη οξυγόνου ονομάζονται αναερόβια βακτήρια. Τα βακτήρια που αναπτύσσονται υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες ονομάζονται δυνητικά αναερόβια. Τα περισσότερα από τα βακτήρια που βρίσκονται στο ανθρώπινο έντερο είναι αναερόβια βακτήρια.

**Απαιτήσεις όσον αφορά στη θερμοκρασία:** Αν και ορισμένα βακτήρια ζουν σε πολύ χαμηλές ή πολύ υψηλές θερμοκρασίες, η βέλτιστη θερμοκρασία για τα ανθρώπινα παθογόνα είναι 36 ° έως 38 ° C.

### Δραστηριότητες

**Παραγωγή ενζύμων:** Τα ένζυμα που παράγονται από βακτήρια δρουν σε πολύπλοκα μόρια τροφίμων, χωρίζοντας τα σε απλούστερες ουσίες. Είναι τα κύρια στοιχεία της αποσύνθεσης και της σήψης. Η αποσύνθεση, δηλαδή η αποδόμηση υλικών που περιέχουν άζωτο και άλλων οργανικών υλικών απουσία αέρα, θα προκαλέσει δυσοσμία. Η σήψη είναι η σταδιακή αποικοδόμηση της οργανικής ύλης που εκτίθεται στον αέρα από βακτήρια και μύκητες.

**Παραγωγή τοξινών:** Προσκολλητίνες είναι τα μόρια του κυτταρικού τοιχώματος που προσκολλούν βακτήρια στα κύτταρα του ξενιστή. Μόλις προσκολληθούν, τα βακτήρια παράγουν τοξικές ουσίες που ονομάζονται τοξίνες. Υπάρχουν δύο τύποι τοξινών: εξωτοξίνες, ένζυμα που απελευθερώνονται από τα βακτήρια στο σώμα του ξενιστή και ενδοτοξίνες. Οι ενδοτιξίνες είναι μέρος του κυτταρικού τοιχώματος των gram-αρνητικών βακτηρίων και είναι τοξικά ακόμη και μετά τον κυτταρικό θάνατο. Οι εξωτοξίνες περιλαμβάνουν αιμολυσίνη, λευκοκιδίνη, λεκτίνη και πλασμίνη. Οι ενδοτοξίνες διεγείρουν την παραγωγή κυτοκινών που προκαλούν αγγειοδιαστολή και καταπληξία

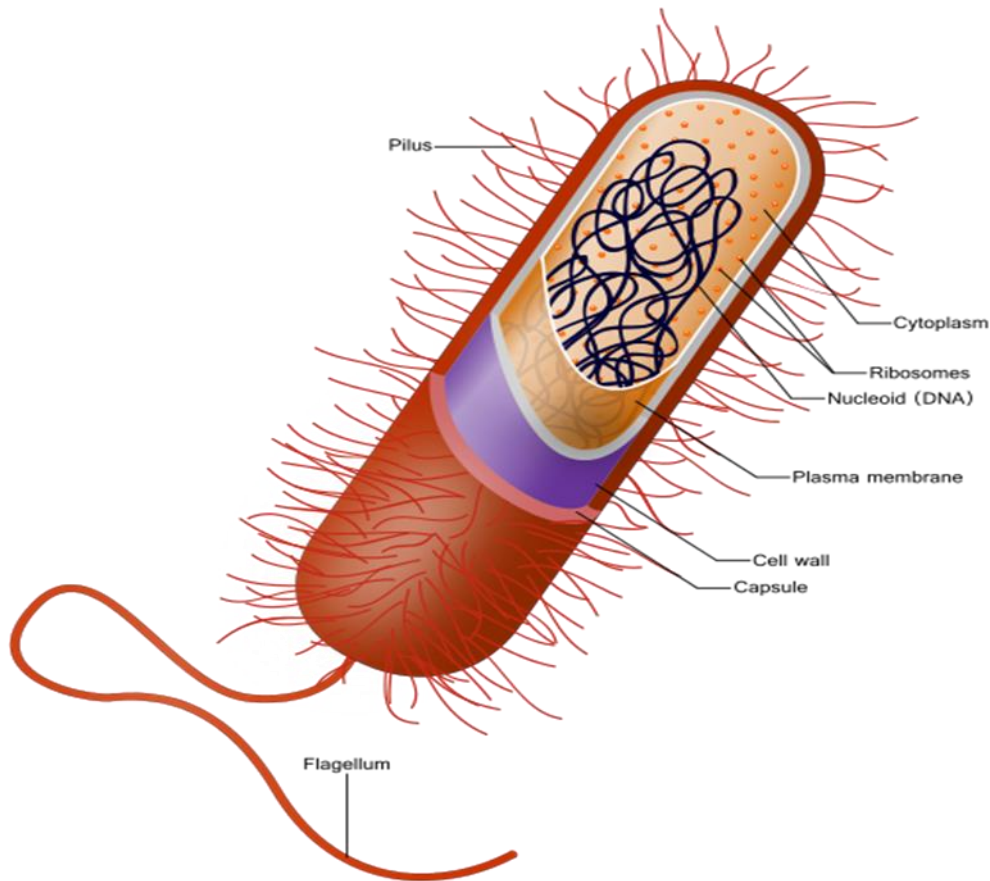
**Αναγνώριση:** Πολλές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό βακτηρίων στο εργαστήριο.

**Καλλιέργεια:** Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε διάφορα μέσα. Μια ορατή αποικία περιέχει εκατομμύρια κύτταρα και μπορεί να φανεί σε λίγες ώρες. Οι αποικίες αποτελούνται συνήθως από τους απογόνους ενός μεμονωμένου κυττάρου. Κάθε τύπος βακτηρίων αναπτύσσεται σε αποικίες με χαρακτηριστικά χρώματα, σχήματα, μεγέθη, υφές, τύπους περιγράμματος ή άκρων και ειδικά χημικά χαρακτηριστικά. Η κυτταρική ομάδα μπορεί στη συνέχεια να εξεταστεί με μικροσκόπιο, συνήθως με χρώση Gram. Επιπλέον, μπορούν να απομονωθούν αποικίες και να χορηγηθούν αντιβιοτικά για να εκτιμηθεί η ευαισθησία τους σε διαφορετικά φάρμακα.

**Χρώση κατά Gram:** Τα θετικά κατά gram βακτήρια απορροφούν τη χρωστική και γίνονται μοβ. Τα gram-αρνητικά βακτήρια μπορούν να αποχρωματιστούν με αλκοόλ και να χρωματιστούν κόκκινα από μια δεύτερη χρωστική ουσία. Τα βακτήρια ανθεκτικά στα οξέα απορροφούν τη χρωστική ουσία, ακόμη και όταν τους χορηγείται οξύ. Τα βακτήρια περιγράφονται συνήθως από το συνδυασμό της αντίδρασής τους στη χρώση Gram και την εμφάνισή τους.

**Ανοσοφθορισμός:** Τα βακτήρια βάφονται με φλουορεσκεΐνη και όταν παρατηρούνται κάτω από μικροσκόπιο, ο φθορισμός είναι κιτρινοπράσινος.

Το γενετικό τους υλικό βρίσκεται συνήθως σε μια συγκεκριμένη περιοχή, την πυρηνική περιοχή. Συνήθως έχουν επιπλέον μικρότερα μόρια γενετικού υλικού γνωστά ως πλασμίδια. Η πλασματική τους μεμβράνη τους περιβάλλεται από κυτταρικά τοιχώματα και ορισμένα βακτήρια έχουν ένα επιπλέον κέλυφος που ονομάζεται κάψουλα. Επίσης, δεν έχουν μεμβρανώδη οργανίδια, αλλά έχουν ριβοσώματα για πρωτεϊνική σύνθεση.



Εικόνα 2. Δομή βακτηρίων

### Ταξινόμηση Βακτηρίων

Η ενότητα αυτή αποτελείται από πολλά μέλη τα οποία φέρουν διάφορα ονόματα και κατατάσσονται σε διάφορες ομάδες. Τα μέλη της κάθε ομάδας βακτηρίων έχουν κοινές ιδιότητες που τα χαρακτηρίζουν και τα διαχωρίζουν από τα μέλη που ανήκουν στις άλλες ομάδες.

Το 1984 κυκλοφόρησε η 8<sup>ο</sup> έκδοση του Bergey's Manual of Determinative Bacteriology στην οποία περιλαμβάνεται η κατάταξη των βακτηρίων με βάση τη μορφολογία, τη χρώση κατά

Gram ,την παθογένεια και το άθροισμα αζωτούχων βάσεων στο DNA. Στην κατάταξη αυτή τα βακτήρια χωρίζονται σε 17 ομάδες αλλά και σε τάξεις, οικογένειες, γένη και είδη.

Πίνακας Bergey Κατάταξη βακτηρίων

ΟΜΑΔΕΣ	ΒΑΚΤΗΡΙΑ
1	Οι Σπειρόχαίτες(Spirochetes) Γένη: <i>Spirochaeta, Treponema, Borrelia</i>
2	Αερόβια/Μικροαερόφιλα,Κινούμενα, Ελικοειδή/Βιμπριοειδή Αρνητικά κατά Gram βακτήρια Γένη: <i>Spirillum, Campylobacter</i>
3	Μη κινούμενα (ή σπανίως κινούμενα), αρνητικά κατά Gram , καμπύλα βακτήρια.
4	Αρνητικά κατά Gram ,αερόβια ραβδία και κόκκοι Οικογένειες: <i>Pseudomonadaceae, Halobacteriaceae, Acetobacteriaceae</i> Γένη: <i>Alcaligenes , Brucella</i>
5	Προαιρετικώς αναερόβια αρνητικά κατά Gram ραβδία Οικογένειες: <i>Enterobacteriaceae, Vibrionaceae</i> Γένη: <i>Zymomonas, , Streptobacillus</i>
6	Αναερόβια, αρνητικά κατά Gram, ευθεία,καμπύλα ή ελικοειδή ραβδία.
7	Αποικοδομούντα τα θειικά και ανάγοντα το θείο βακτήρια Γένη: <i>Desulfovibrio , Desulfomonas</i>
8	Αναερόβιοι αρνητικοί κατά Gram κόκκοι
9	Ρικέττιες και Χλαμύδια
10	Μυκοπλάσματα
11	Ενδοσυμβιωτές
12	Κόκκοι θετικοί κατά Gram Οικογένεια: <i>Micrococcaceae</i> Γένη: <i>Streptococcus ,Leuconostoc ,Pediococcus Sarcina</i>
13	Σποριογόνια θετικά κατά Gram ραβδία και κόκκοι Γένη: <i>Bacillus, Clostridium , Sporosarcina</i>
14	Κανονικά, ασποριογόνια, θετικά κατά Gram ραβδία Γένη: <i>Lactobacillus,Listeria,Brochothrix</i>
15	Ακανόνιστα, ασποριογόνια, θετικά κατά Gram ραβδία Γένη: <i>Corynebacterium,Actinomyces, Bifidobacterium</i>
16	Μυκοβακτήρια Οικογένεια: <i>Mycobacteriaceae</i> Γένος: <i>Mycobacterium</i>
17	Νοκαρδιότυπα(Nocardioforms) Γένη: <i>Nocardia, Rhodococcus, Saccharopolyspora</i>

Από το σύνολο των βακτηρίων μόνο ορισμένα είδη αφορούν τη βιομηχανία τροφίμων και αυτά ανήκουν στις ομάδες: 2,4,5,12,13,14,15 του παραπάνου πίνακα.

Τα βακτήρια που βρίσκονται στα τρόφιμα μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την δράση τους σε:

- **Παράγοντες παθογόνου μολύνσεων** : εκδήλωση παθογένειας δια προσβολή του δέκτη ή μέσω τοξίνης
- **Παράγοντες αλλοιώσεων** : ανεπιθύμητες αλλαγές οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, μη παθογενές
- **Παράγοντες ωφελιμιστικής χρήσης** : για την παραγωγή χρήσιμων για τον άνθρωπο προϊόντων του μεταβολισμού τους όπως το γαλακτικό οξύ ( σε τρόφιμα όπως γιαούρτια, τυριά, βουτυρόγαλα, ελιές, τουρσιά,σαλάμι αέρος) προπιονικό οξύ (σε τυριά ελβετικού τύπου Emmenthaler) οξεικό οξύ (ξύδι) κλπ.

Τα βακτήρια ανάλογα με τη χρώση τους κατά Gram διακρίνονται σε:

- Gram(+) αν η τελική χρώση είναι κυανοϊδές και σε
- Gram(-) αν είναι κόκκινη.

Η σύγχρονη βακτηριακή ταξινόμηση βασίζεται στη γονιδιωματική συγγένεια και πρόσφατα αρκετά βακτηριακά είδη έχουν ανακαταταχθεί με βάση τη σύγκριση του γονιδιώματος εντός των ειδών. Ένα από τα αποτελέσματα αυτών των μελετών είναι η ανάπτυξη κατάλληλων γραμμωτών κωδικών DNA ως αξιόπιστης και οικονομικά αποδοτικής μεθόδου για τον εντοπισμό διαφόρων βακτηριακών γενών. Έχουν εντοπιστεί ειδικές για κάθε είδος γονιδιωματικές περιοχές και έχουν σχεδιαστεί μοναδική εκκινητές για 100 διαφορετικά είδη (62 γένη) που περιλαμβάνει 62 παθογόνα και 13 ευκαιριακά παθογόνα βακτηριακά είδη.

Υπάρχει μια βάση δεδομένων <http://slsdb.manipal.edu/bact/> για τα παραπάνω.

# Κεφάλαιο 1

## Εντεροβακτήρια

### 1.1 Ορισμός

Τα εντεροβακτήρια είναι βακτήρια της τάξης των εντεροβακτηρίων , είναι η πιο μεγάλη – ετερογενής οικογένεια μεταξύ των παθογόνων., αποτελούνται απο πενήντα γένη και χωρίζονται σε τουλάχιστον διακόσια είδη τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των Enterobacteriaceae. Η ταξινόμηση τους πραγματοποιείται βάση των βιοχημικών ιδιοτήτων του (Φαινότυπος – Κλινικό εργαστήριο) , της αντιγονικής τους δομής με ένα κοινό αντιγόνο , του DNA υβριδισμού καθώς επίσης και της παθογένεσής τους. Τα εντεροβακτήρια ανήκουν στην ομάδα 5 σύμφωνα με τον πίνακα του Bergey όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε από τον παραπάνω πίνακα . Είναι προαιρετικά αναερόβιοι πράγμα που σημαίνει ότι είναι σε θέση να ευδοκιμήσουν τόσο σε αερόβια όσο και σε αναερόβια περιβάλλοντα , αρνητικοί κατά Gram μη σπορογόνοι, ραβδόμορφου σχήματος. Διαφοροποιούνται σε μικροοργανισμούς που ζυμώνουν τη λακτόζη σε οξέα και διοξειδίο του άνθρακα όπως *Escherichia*, *Klebsiella* και *Enterobacter* και στα εντεροβακτήρια που δεν ζυμώνουν την λακτόζη, όπως *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Serratia* και *Proteus-Providencia*. Έχουν την ιδιότητα να ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη . Γενικά κινούνται με περίτριχες βλεφαρίδες ή είναι ακίνητα και έχουν την τάση να έχουν μήκος 1-5μm. Το όνομα τους το παρέλαβαν από την ελληνική λέξη «έντερο» αφού το φυσικό τους περιβάλλον των συγκεκριμένων οργανισμών είναι τα έντερα των ζώων και των ανθρώπων όπου αποτελούν φυσικό μέρος της χλωρίδας του εντέρου. Στην οικογένεια των εντεροβακτηρίων ανήκουν περισσότερα από 40 γένη και 150 είδη και υποείδη. Η ταξινόμησή τους αρχικά στηρίχθηκε σε βιοχημικά, φαινοτυπικά, λειτουργικά και αντιγονικά χαρακτηριστικά και αποτέλεσε πεδίο έντονης αντιπαράθεσης. Με την πρόοδο όμως στον τομέα της αλληλούχισης γενετικού υλικού, της υβριδοποίησης νουκλεϊκών οξέων και της φυλογενετικής ανάλυσης έγινε δυνατή η καλύτερη ταξινόμηση των μελών της οικογένειας, αποσαφηνίστηκαν οι μεταξύ τους σχέσεις και ανακαλύφθηκαν νέα είδη. Τα εντεροβακτήρια είναι πανταχού παρόντα στη φύση , η παρουσία τους στους εντερικούς σωλήνες των ζώων έχει την ευρεία κατανομή τους στο δαφος , το νερό τα λύματα καθώς επίσης και στα φυτά ως αποτέλεσμα τους καθιστά σχεδόν αναπόφευκτο ότι ορισμένα μέλη της εντεροβακτηρίων (Enterobacteriaceae) θα εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα . Τα είδη των εντεροβακτηριδίων αποτελούν σημαντική αιτία ευκαιριακών λοιμώξεων όπως λοιμώξεις των ματιών του δέρματος , μηνιγγίτιδα , βακτηριαιμία , πνευμονία και λοιμώξεις του ουροποιητικού κ.τ.λ. καθώς και

ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Η εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά έχει περιπλέξει τα θεραπευτικά σχήματα ιδιαίτερα σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα όπου τέτοιοι οργανισμοί έχουν γίνει όλο και πιο συνηθισμένη. Μερικά από τα σημαντικότερα γένη που απασχολούν περισσότερο την Ιατρική επιστήμη είναι: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Yersinia*.

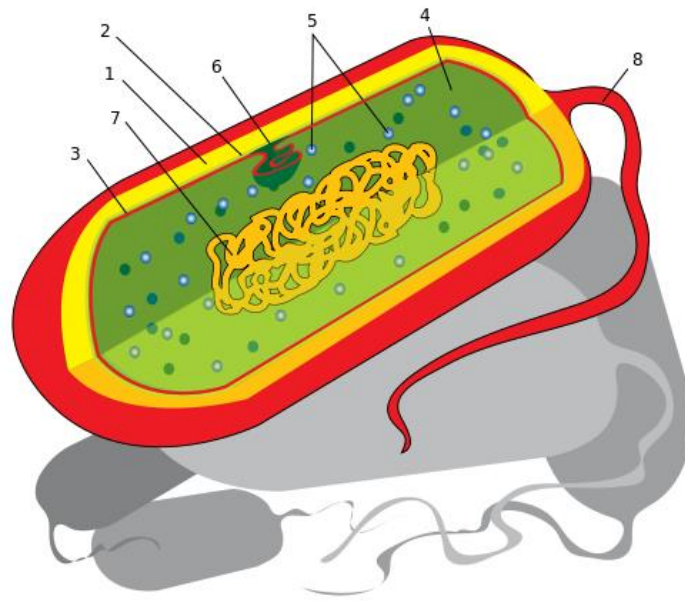
Τα Εντεροβακτηριακά είναι βακτήρια πολύ διαδεδομένα στη φύση, απαντούν στο έδαφος, το νερό και τη βλάστηση και συναντώνται φυσιολογικά στον εντερικό σωλήνα και πιο σπάνια στο αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων. Ωστόσο, στην οικογένεια των εντεροβακτηριακών υπάρχουν και παθογόνα ή ευκαιριακά παθογόνα είδη για τον άνθρωπο που μπορεί να προκαλέσουν κλινικά νοσήματα, όπως είναι οι σηψαιμίες, οι ουρολοιμώξεις και διάφορες εντερικές λοιμώξεις. Οι λοιμώξεις από Εντεροβακτηριακά μπορεί να προέρχονται από κάποιο ζωικό υποδόχο, από ανθρώπινο φορέα ή από ενδογενή διασπορά των μικροοργανισμών που βρίσκονται ως φυσιολογική μικροχλωρίδα σε ευπαθή ξενιστή.



Εικόνα 3. σχήμα *Enterobacteriaceae* 1

## 1.2 Δομή Εντεροβακτηρίων

Τα εντεροβακκτήρια ακολουθούν μία δομή αντίστοιχη με αυτή των Gram αρνητικών βακτηρίων .Το Κύτταρο του βακτηρίου αποτελείται από τα ακόλουθα μέρη :



1. **Κάψουλα.** Η βακτηριακή κάψουλα είναι μια μεγάλη δομή κοινή σε πολλά βακτήρια. Είναι ένα στρώμα πολυσακχαρίτη που βρίσκεται έξω από το περίβλημα του κυττάρου και έτσι θεωρείται μέρος του εξωτερικού περιβλήματος ενός βακτηριακού κυττάρου. Είναι ένα καλά οργανωμένο στρώμα, δεν ξεπλένεται εύκολα και μπορεί να είναι η αιτία διαφόρων ασθενειών.
2. **Κυτταρικό τοίχωμα.** Τα κυτταρικά τοιχώματα των gram-αρνητικών βακτηρίων είναι χημικά και δομικά διαφορετικά από αυτά των gram-θετικών βακτηρίων. Η δομή και η χημική σύνθεση της εξωτερικής μεμβράνης των gram-αρνητικών βακτηρίων είναι οι εξής:



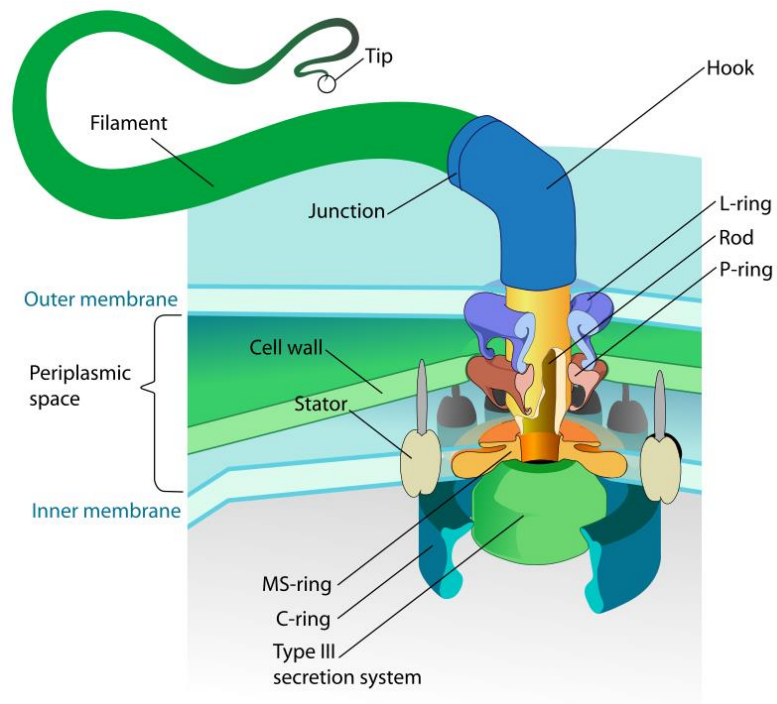
- **Το περίπλασμα ή ο περιπλασματικός χώρος και η πεπτιδογλυκάνη.** Το περίπλασμα καταλαμβάνει το χώρο μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και της εξωτερικής μεμβράνης και το σχήμα είναι σταθερό. Όταν αυτό το στερεό χάνεται για διάφορους λόγους, το μικρόβιο χάνει το σχήμα του και γίνεται σφαιρικό σχήμα, το οποίο ονομάζεται σφαιροπλάστης. Αυτή η πεπτιδογλυκάνη έχει την ίδια χημική δομή με τα Gram-θετικά βακτήρια, εκτός από το ότι ορισμένα αρνητικά κατά Gram περιέχουν N-ακετυλ-μουραμικό οξύ αντί για L-λυσίνη, και το διαμινοπιμελικό οξύ είναι η λυσίνη. Ο πρόδρομος του οξέος δεν βρίσκεται πουθενά αλλού στη φύση. Αλλά ο συνολικός αριθμός μορίων αυξήθηκε. Η Gram-αρνητική πεπτιδογλυκάνη αντιπροσωπεύει μόνο το 5% του συνολικού υλικού του κυτταρικού τοιχώματος και το πάχος του στρώματος είναι 2 nm. Διάφορες ουσίες, πρωτεΐνες και ολιγοσακχαρίτες διαλύονται στο περίπλασμα. Οι πρωτεΐνες είναι κυρίως ένζυμα όπως ένζυμα που αδρανοποιούν αντιβιοτικά, δεσμευτικές πρωτεΐνες και υδρολυτικά ένζυμα όπως η αλκαλική φωσφατάση.
- **Η εξωτερική μεμβράνη.** Η εξωτερική μεμβράνη των gram-αρνητικών μικροοργανισμών έχει μια ποικιλία δομών και βιολογικών λειτουργιών. Είναι ένας παράγοντας στην παθογόνο δράση των μικροοργανισμών και μια πηγή αντιγόνων για την παραγωγή αντισωμάτων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση και την αναγνώριση μικροοργανισμών, ειδικά για την παρασκευή των εμβολίων. Αποτελείται από δύο στρώματα φωσφολιπιδίων-αντι-κρυσταλλικών, και διαφορετικό από άλλες βιολογικές μεμβράνες, το εξωτερικό του στρώμα δεν αποτελείται από φωσφολιπίδια, αλλά αποτελείται από λιποπολυσακχαρίτη, που ονομάζεται LPS (λιποπολυσακχαρίτης). Σε όλη την μεμβράνη υπάρχουν πρωτεϊνικές ομάδες, οι πορίνες. Το LPS αποτελείται από τρεις μοριακές δομές. Στο ένα άκρο είναι ένα φωσφολιπίδιο που περιέχει γλυκοζαμίνη αντί για γλυκερόλη. Είναι το A-λιπίδιο του μορίου του, το οποίο είναι μια τοξική ουσία και είναι η ενδοτοξίνη των gram-αρνητικών μικροοργανισμών. Ο πολυσακχαριδικός πυρήνας βρίσκεται στο μέσο και στην άλλη μεριά το O-αντιγόνο του, η οποία αποτελεί μια πλευρική σακχαριδική. Τα μικρόβια βάση των αντιγονικών διαφορών χωρίζονται σε ορολογικές ομάδες και ορολογικούς τύπους.
- **Οι λιποπρωτεΐνες.** Η πλουσιότερη σε πρωτεΐνες περιοχή είναι οι λιποπρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων. Το καρβοξυλικό τους άκρο ενώνεται με τα αμινοξέα της πεπτιδογλυκάνης ενώ με το αμινικό τους άκρο ενώνεται με τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης. Εξαιτίας της χημικής

δομής της εξωτερικής επιφάνειας, τα Gram αρνητικά βακτήρια είναι αρνητικά φορτισμένα, γεγονός που επηρεάζει τις ικανότητες φαγοκυττάρωσης ή της βλαπτικής δράσης του συμπληρώματος, των πεπτικών ενζύμων των χολικών αλάτων της λυσοζύμης και πολλών αντιβιοτικών.

3. **Κυτταρική μεμβράνη ή κυτταροπλασματική μεμβράνη.** Η κυτταρική μεμβράνη είναι μια βιολογική μεμβράνη που χωρίζει το εσωτερικό όλων των κυττάρων από το εξωτερικό περιβάλλον που προστατεύει το κύτταρο από το περιβάλλον του. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από μια λιπιδική διπλή στιβάδα, συμπεριλαμβανομένης της χοληστερόλης που βρίσκεται μεταξύ φωσφολιπιδίων για να διατηρήσει τη ρευστότητά τους σε διάφορες θερμοκρασίες. Η μεμβράνη περιέχει επίσης πρωτεΐνες μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένων ολοκληρωμένων πρωτεϊνών που διαπερνούν τη μεμβράνη που χρησιμεύουν ως μεταφορείς μεμβράνης και περιφερειακών πρωτεϊνών που προσκολλώνται χαλαρά στην εξωτερική (περιφερειακή) πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, ενεργώντας ως ένζυμα που διαμορφώνουν το κύτταρο. Η κυτταρική μεμβράνη ελέγχει την κίνηση των ουσιών μέσα και έξω από τα κύτταρα και τα οργανίδια. Με αυτόν τον τρόπο, είναι επιλεκτικά διαπερατό σε ιόντα και οργανικά μόρια. Επιπλέον, οι κυτταρικές μεμβράνες εμπλέκονται σε μια ποικιλία κυτταρικών διαδικασιών όπως η προσκόλληση των κυττάρων, η αγωγιμότητα των ιόντων και η σηματοδότηση των κυττάρων και χρησιμεύουν ως η επιφάνεια προσκόλλησης για αρκετές εξωκυτταρικές δομές.
4. **Κυτταρόπλασμα.** Το κυτταρόπλασμα είναι όλο το υλικό μέσα σε ένα προκαρυωτικό κύτταρο, που περικλείεται από την κυτταρική μεμβράνη, εκτός από τον κυτταρικό πυρήνα. Το υλικό μέσα στον πυρήνα και που περιέχεται στην πυρηνική μεμβράνη ονομάζεται νουκλεόπλασμα. Τα κύρια συστατικά του κυτταροπλάσματος είναι η κυτοσόλη, τα οργανίδια (οι εσωτερικές δομές του κυττάρου) και διάφορα κυτταροπλασματικά εγκλείσματα. Το κυτταρόπλασμα είναι περίπου 80% νερό και συνήθως άχρωμο. Οι περισσότερες κυτταρικές δραστηριότητες λαμβάνουν χώρα μέσα στο κυτταρόπλασμα, όπως πολλές μεταβολικές οδοί συμπεριλαμβανομένης της γλυκόλυσης και διαδικασίες όπως η κυτταρική διαίρεση. Η συγκεντρωμένη εσωτερική περιοχή ονομάζεται ενδοπλάσμα και η εξωτερική στιβάδα καλείται κυτταρικός φλοιός

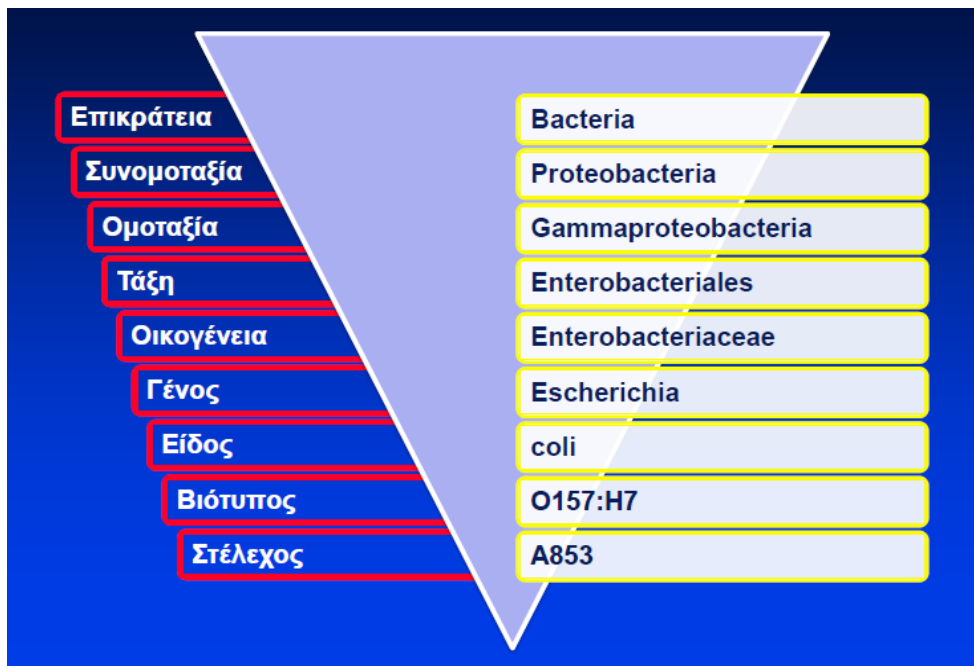
ή έκτοπλάσμα. Η κίνηση των ιόντων ασβεστίου μέσα και έξω από το κυτταρόπλασμα είναι μια δραστηριότητα σηματοδότησης για τις μεταβολικές διεργασίες.

5. **Ριβοσώματα**. Τα ριβοσώματα είναι μακρομόρια, που βρίσκονται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα, και εκτελούν βιολογική πρωτεϊνική σύνθεση (μετάφραση mRNA). Τα ριβοσώματα συνδέουν τα αμινοξέα για να σχηματίσουν αλυσίδες πολυπεπτιδίων. Τα ριβοσώματα αποτελούνται από δύο κύρια συστατικά: τη μικρή και τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από ένα ή περισσότερα μόρια ριβοσωμικού RNA (rRNA) και πολλές ριβοσωμικές πρωτεΐνες (RPs ή r-πρωτεΐνες).
  
6. **Μεσοσώματα**. Τα Μεσοσώματα δεν θεωρούνται μέρος της κανονικής δομής των βακτηριακών κυττάρων.
  
7. **Το νουκλεοειδές** είναι μια ακανόνιστα διαμορφωμένη περιοχή εντός του προκαρυωτικού κυττάρου που περιέχει όλο ή το μεγαλύτερο μέρος του γενετικού υλικού
  
8. **Τα μαστίγια**, τα οποία είναι μία μακρά λεπτή προβολή από το σώμα των πυρίνα του κυττάρου, ο συγκεκριμένος τύπος μαστιγίου βρίσκεται σε βακτήρια όπως το E. coli και η Salmonella και περιστρέφεται σαν έλικα όταν το βακτήριο κολυμπά. Η βακτηριακή κίνηση μπορεί να χωριστεί σε 2 είδη: τρέξιμο, που προκύπτει από αριστερόστροφη περιστροφή της μαστίγας και ανατροπή, από τη δεξιόστροφη περιστροφή της μαστίγας.



### 1.3 Είδη και στελέχη Εντεροβακτηρίων

Η ταξινόμηση γενικά των μικροοργανισμών και των εντεροβακτηρίων πραγματοποιείται βάση της οικογένειας τους, το γένος, το είδος, τον βιότυπο και στέλεχος. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία θα αναπτύξουμε αναλυτικά την *E.Coli*, *Salmonella*, *Y.enterocolitica*, *Shigella* και *Cronobacter Sakazakii*.

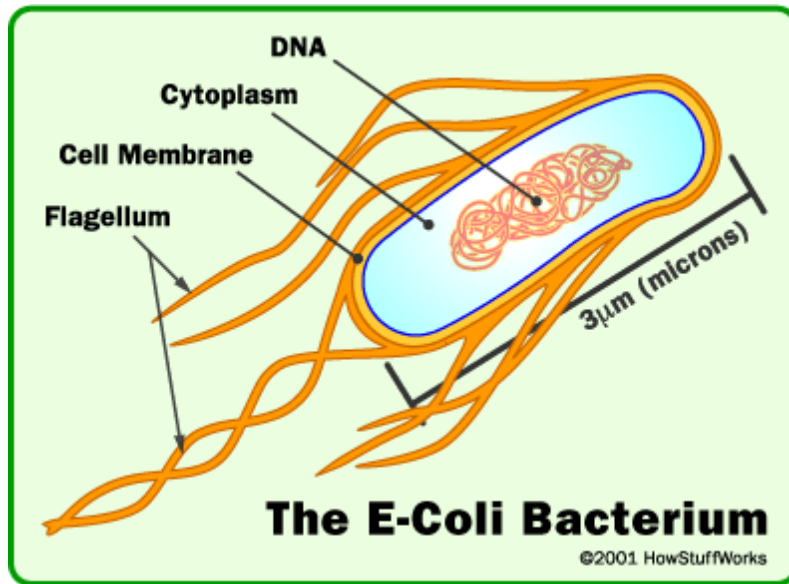


### 1.3.1 Escherichia Coli

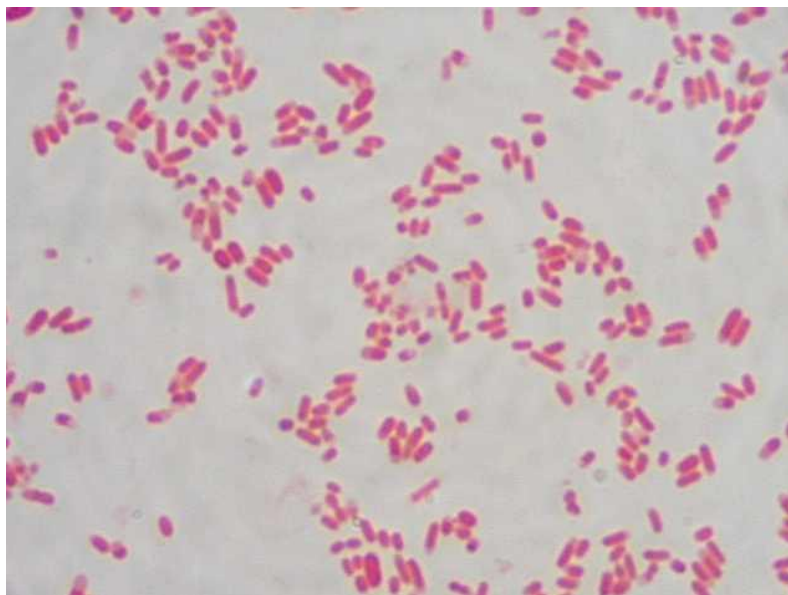
#### 1.3.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά E.Coli

Η *E. coli*, η οποία αποτελεί το σημαντικότερο είδος του γένους *Escherichia* που απομονώνεται από τον άνθρωπο. Ο μικροοργανισμός αυτός προκαλεί ποικίλες παθήσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως γαστρεντερίτιδα, ουρολοιμώξεις, μηνιγγίτιδα και σήψη, μάλιστα πρόκειται για τον κύριο παράγοντα λοιμώξεων του ουροποιητικού σωλήνα σε ασθενείς της κοινότητας.

Παρουσιάζει τα γενικά χαρακτηριστικά των Εντεροβακτηριακών, είναι Gram αρνητικό βακτηρίδιο, προαιρετικά αναερόβιο που διασπά τη λακτόζη. Λόγω της ικανότητας του να διασπά τη λακτόζη, αναγνωρίζεται εύκολα κατά την ανάπτυξη σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν λακτόζη και δείκτη π.χ. στο υλικό άγαρ Mac Conkey, το οποίο περιέχει πεπτόνη, χολικά άλατα, λακτόζη και ως δείκτη ουδέτερο ερυθρό, οι αποικίες της *E. coli* έχουν χρώμα ερυθρό. Επιπλέον, περισσότερα από το 90% των *E. coli* είναι θετικά για β-γλυκουρονιδάση που διασπώνται με καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό με 4-methylumbelliferyl-β-glucuronide. Γενικότερα, αναπτύσσεται εύκολα σε κοινά θρεπτικά υλικά και οι αποικίες της είναι κυκλικές, κυρτές και λείες επί του Mac Conkey άγαρ. Υπάρχουν και μερικά στελέχη που παρουσιάζουν β-αιμόλυση επί αιματούχου άγαρ.



Σχέδιο που απεικονίζει τη δομή του βακτηρίου E-Coli



Χρώση κατά Gram της E-Coli.

### 1.3.1.2 Αντιγονική Σύσταση

Ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος, της κάψας, των βλεφαρίδων και μερικές τοξίνες περιέχονται στις αντιγονικές ιδιότητες των μικροβίων.

Οι κύριες ομάδες αντιγόνων που διαχωρίζουν τους μικροοργανισμούς σε οροτύπους είναι οι εξής :

-Αντιγόνα σωματικά ή αντιγόνα –O(160 είδη)

-Αντιγόνα βλεφαρίδων ή αντιγόνα –H(60 είδη)

-Αντιγόνα ελύτρου ή αντιγόνα –K(100 είδη)

Η *E.coli* χωρίζεται σε 160 O-ορότυπους βάσει του σωματικού O αντιγόνου, το οποίο αποτελεί το σακχαριδικό μέρος του τριμερούς λιπο-πολύ-σακχαριδικού(LPS) αντιγόνου και το οποίο βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα της *E.coli* και των άλλων Gram αρνητικών εντεροβακτηριακών. Το υπόλοιπο μόριο του LPS αντιγόνου αποτελείται από το λιπιδικό ή Α-λιπίδιο το οποίο είναι η ενδοτοξίνη. Όλες οι φαρμακολογικές δραστηριότητες της ενδοτοξίνης αποδίδονται στο Α-λιπίδιο.

Το O-αντιγόνο είναι ουσία θερμοανθεκτική. Είναι υπεύθυνο για την παραγωγή αντισωμάτων που προκαλούν συγκόλληση.

Κάποιοι O-ορότυποι είναι υπεύθυνοι για συγκεκριμένες εντερολοιμώξεις, όπως η διάρροια ταξιδιωτών, οι ουρολοιμώξεις, η αιμορραγική κολίτιδα.

Η φλαγελλίνη των βλεφάρων παράγει πρωτεϊνικές ουσίες τα H-αντιγόνα. Η *E.coli* έχει 60 διαφορετικά H-αντιγόνα με συχνότερα τα H1, H12, H11. Οι αντιγονικές διαφορές στο αντιγόνο εξαρτώνται από τα αμινοξέα στο μόριο της φλαγελλίνης.

Τα H-αντιγόνα είναι συγκεκριμένα για κάθε είδος και στέλεχος και δεν εμφανίζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τα H-αντιγόνα των άλλων εντεροβακτηριακών όπως αυτό παρατηρείται με τα O-αντιγόνα. Επίσης δεν υπάρχει μετάπτωση από μια φάση σε άλλη και αποτελεί ιδιότητα μόνιμη χρωμοσωμικά καθορισμένη. Μπορούν να καταστραφούν με τον βρασμό και να σταθεροποιηθούν με την φορμόλη.

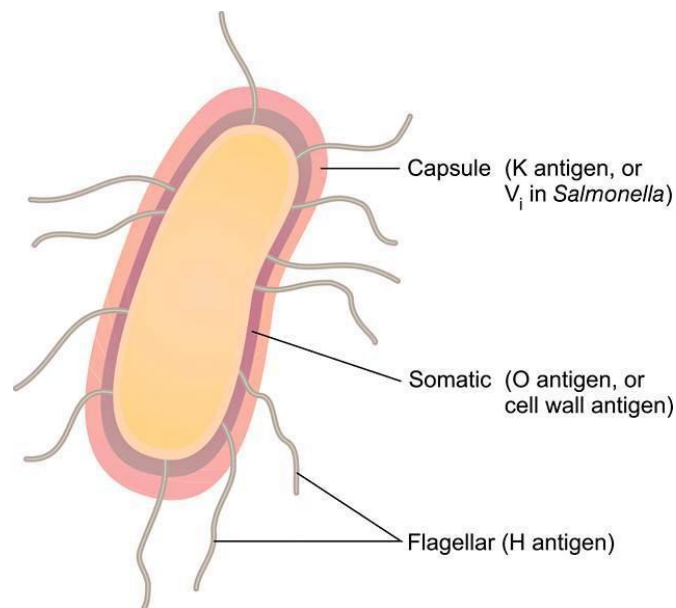
Τα K αντιγόνα είναι πολυσακχαρίδια ποικίλης δομής ή είναι πρωτεϊνικά όπως το K88 της *E.coli*. Πιθανότατα να προέρχεται από την δομή της επιφάνειας της *E.coli*.

Έχουν εντοπιστεί 100 περίπου αντιγονικοί τύποι K αντιγόνων. Τα διάφορα K- αντιγόνα συνδυάζονται με συγκεκριμένα O -αντιγόνα. Επικρατούν λίγοι μόνο συνδυασμοί των 160 O -αντιγόνων, των 60 H -αντιγόνων με τα 100 K- αντιγόνα, στις διάφορες νόσους του ανθρώπου και των ζώων από *E.coli* καθώς και στις διάφορες φυσιολογικές χλωρίδες, αν και στο φυσικό περιβάλλον υπάρχουν πολλοί περισσότεροι

Τα K -αντιγόνα έχουν συνδυαστεί με συγκεκριμένες νόσους ή είναι παράγοντες της παθογόνου δράσης του μικροβίου. Τα πιο γνωστά K –αντιγόνα είναι τα εξής:

- **K1-αντιγόνο.**Ανιχνεύεται στα στελέχη της *E.coli* που απομονώνονται από τα ούρα ασθενών με οξεία πυελονεφρίτιδα.Επίσης K1 αντιγόνα έχουν 80% των *E.coli* που απομονώνονται από την νεογνική μηνιγγίτιδα και από τις σηψαιμίες.Είναι στοιχείο της παθογόνου δράσης της *E.coli* .Εμποδίζει τη μικροβιοκτόνο δράση του ορού και αντιδρά κατά των μηχανισμών της φυσικής άμυνας.Συνδυάζεται με συγκεκριμένους O-ορότυπους.
- **K88-αντιγόνο** .Βρίσκεται στα στελέχη της *E.coli* που προκαλεί στα χοιρινά,εντερίτιδα.Το K99 ανιχνεύεται στα στελέχη που προκαλούν διάρροια στα μωσχάρια.
- **K92-αντιγόνο** .Περιέχει σιαλικό οξύ και έχει αντιγονική ομοιότητα με το αντιγόνο το πολυσακχαριδικό της *Neisseria meningitides* C-ομάδας.

Με τα τρία αυτά αντιγόνα τα O,K και H συντίθεται το αντιγονικό προφίλ των διαφόρων οροτύπων της *E.coli* που γράφεται ως εξής π.χ *E. coli* 026 : K 40 : H12.



Η αντιγονική σύσταση της E-Coli



### **1.3.1.3 Παθογόνος Δράση**

Το κολοβακτηρίδιο συναντάται στη γαστρεντερική οδό του ανθρώπου. Είναι δυνατόν, όμως, να εγκατασταθεί και σε άλλους ιστούς και να καταστεί παθογόνο. Τα περισσότερα κολοβακτηρίδια που προκαλούν γαστρεντερική και εξωεντερική νόσο, το καταφέρνουν επειδή έχουν αποκτήσει συγκεκριμένους λοιμογόνους παράγοντες κωδικοποιημένους στα πλασμίδια, τις νησίδες παθογονικότητας ή στο βακτηριοφάγο DNA. Έτσι μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις των ουροφόρων και χοληφόρων οδών, του περιτοναίου, των μηνίγγων, τραυμάτων ή και μικροβιαμία ιδιαίτερα σε βρέφη, ηλικιωμένους και άτομα των οποίων οι αμυντικοί μηχανισμοί έχουν εξασθενήσει. Η αποτελεσματικότητα της *E. coli* ως παθογόνου μικροοργανισμού φαίνεται από τα παρακάτω γεγονότα:

- i) Είναι το συχνότερο gram αρνητικό βακτηρίδιο που ανιχνεύεται σε περιστατικά σήψης
- ii) Είναι υπεύθυνο για περισσότερο από το 80% των ουρογεννητικών λοιμώξεων της κοινότητας και για μεγάλο ποσοστό των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων
- iii) Είναι σημαντική αιτία γαστρεντερίτιδας στις αναπτυσσόμενες χώρες.

### **Ουρολοίμωξη**

Ένας μεγάλος αριθμός gram αρνητικών βακτηριδίων που προκαλούν ουρολοιμώξεις προέρχονται από το κόλον, μολύνουν την ουρήθρα και την ουροδόχο κύστη και μπορεί να μεταναστεύσουν στον προστάτη ή στους νεφρούς. Ιδιαίτερα μολύνεται το περίνεο και η ουρήθρα των γυναικών, καθώς τα κολοβακτηρίδια εισέρχονται στην ουροδόχο κύστη μέσω μικροτραυματισμών που προκαλούνται από τη σεξουαλική επαφή, όπου και πολλαπλασιάζονται με ταχείς ρυθμούς (10<sup>5</sup> μικρόβια ανά ml ούρων).

Πολλά κολοβακτηρίδια μπορούν να προκαλέσουν ουρολοιμώξεις, όμως στελέχη συγκεκριμένων οροτύπων συνδέονται περισσότερο αιτιολογικά με αυτές τις λοιμώξεις, καθώς διαθέτουν λοιμογόνους παράγοντες, όπως είναι η παραγωγή αιμολυσίνης, ο τύπος και η ποσότητα του αντιγόνου K και η αντοχή στη μικροβιοκτόνο δράση του ορού του αίματος. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η ικανότητά τους να παράγουν προσκολλητίνες, οι οποίες προσδένονται στα κύτταρα που επενδύουν την ουροδόχο κύστη και την ανώτερη ουροφόρο οδό, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την αποβολή των βακτηρίων με τα ούρα. Παρόμοιο ρόλο παίζει και η αιμολυσίνη HlyA, η οποία διαλύει ερυθρά αιμοσφαίρια και άλλους κυτταρικούς τύπους, επιφέροντας την απελευθέρωση κυτταροκινών και τη διέγερση

φλεγμονώδους απόκρισης. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία ειδικών αντισωμάτων έναντι των φίμπριών στον ορό του ανθρώπου προστατεύει από την πρόκληση ουρολοιμώξεων, καθιστώντας τις φίμπριες ένα ακόμη παράγοντα σημαντικό για τον αποικισμό της ουρήθρας.

### **Μηνιγγίτιδα**

Μηνιγγίτιδα είναι η φλεγμονή των προστατευτικών μεμβρανών (μήνιγγες) που περιβάλλουν τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Οι περισσότερες περιπτώσεις μηνιγγίτιδας προκαλούνται από κάποια ιογενή λοίμωξη, αλλά βακτηριακές και μυκητιακές λοιμώξεις μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε αυτήν. Το κολοβακτηρίδιο είναι μία από τις πιο συχνές αιτίες νεογνικής μηνιγγίτιδας. Συγκεκριμένα στελέχη *E. coli* που φέρουν το αντιγόνο K1 του ελύτρου θεωρούνται υπεύθυνα για την πλειονότητα των μηνιγγιτίδων και των μικροβιαμιών. Η λοίμωξη προκαλείται από *E. coli*, το οποίο αποικίζει τον κόλπο της μητέρας και επιμολύνει το αμνιακό υγρό. Τα νεογνά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα, καθώς δεν προστατεύονται από τα ειδικά IgM αντισώματα της μητέρας, τα οποία δεν μπορούν να διαπεράσουν τον πλακούντα.

### **Σηψαιμία**

Όταν οι χημικές ουσίες που κυκλοφορούν στο αίμα με στόχο την παύση της λοίμωξης προκαλούν φλεγμονές σε όλο το σώμα, προκαλείται σηψαιμία. Στη σηψαιμία, παθογόνοι μικροοργανισμοί ή οι τοξίνες τους βρίσκονται στο αίμα. Πρόκειται για μία ασθένεια που προσβάλλει όλους τους ανθρώπους ανεξάρτητα από την ηλικία τους, είναι όμως πιο συχνή στους ηλικιωμένους και στα μη ανοσοϊκανά άτομα, όπως άτομα που βρίσκονται στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας. Τα κυριότερα παθογόνα μικρόβια που προκαλούν τη σηπτική κατάσταση είναι η *E. coli*, η *K. pneumoniae* και η *P. aeruginosa*. Η θνησιμότητα που σχετίζεται με σηψαιμία από το κολοβακτηρίδιο είναι υψηλή σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς ή όταν η πρωταρχική λοίμωξη είναι στην κοιλιά ή στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ).

### **Γαστρεντερίτιδα**

Η γαστρεντερίτιδα χαρακτηρίζεται από φλεγμονή του γαστρεντερικού συστήματος και έχει ως συμπτώματα διάρροια, εμετό, κοιλιακό άλγος και κράμπες. Τα στελέχη της *E. coli* που προκαλούν γαστρεντερίτιδα χωρίζονται σε πέντε ομάδες:

- A) Εντεροπαθογόνα (EPEC)
- B) Εντεροτοξινογόνα (ETEC)
- Γ) Εντεροαιμορραγικά (EHEC)
- Δ) Εντεροδιεισδυτικά (EIEC)
- E) Εντεροσυσσωρευτικά (EAEC)

#### **A) Εντεροπαθογόνα (EPEC)**

Ως EPEC ορίζονται τα βακτήρια *E. coli* που εμπλέκονται επιδημιολογικά ως παθογόνοι μικροοργανισμοί αλλά των οποίων ο μηχανισμός τοξικότητας είναι ανεξάρτητος από την έκκριση των χαρακτηριστικών εντεροτοξινών *E. coli*. Τα συγκεκριμένα κολοβακτηρίδια προσβάλλουν κυρίως βρέφη μικρότερα των 2 ετών και προκαλούν διάρροιες, υδαρείς ή αιματηρές. Η υδαρής διάρροια σχετίζεται με την προσκόλληση των βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου ενώ η αιματηρή διάρροια συνδέεται με την οξεία καταστρεπτική διαδικασία του ιστού. Η λοίμωξη ξεκινά με την προσκόλληση των EPEC στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου με επακόλουθη μείωση του πάχους των μικρολαχνών. Παρατηρείται μετάδοση από άτομο σε άτομο.

#### **B) Εντεροτοξινογόνα (ETEC)**

Τα ETEC δεν αποτελούν μεγάλο ποσοστό από τα είδη που έχουν συσχετιστεί αιτιολογικά με την ασθένεια της γαστρεντερίτιδας. Ο μικροοργανισμός αυτός συχνά προκαλεί διάρροια σε βρέφη σε λιγότερο αναπτυγμένες χώρες και σε επισκέπτες αυτών από τις βιομηχανοποιημένες χώρες. Η προσβολή γίνεται μέσω της κατανάλωσης τροφίμων ή νερού επιμολυσμένων από κόπρανα και δε μεταδίδεται από άτομο σε άτομο. Το συγκεκριμένο κολοβακτηρίδιο προκαλεί εκκριτική διάρροια με παρόμοια, αλλά ηπιότερα συμπτώματα με αυτά της χολέρας. Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν παρατηρούνται ιστολογικές αλλοιώσεις στους βλεννογόνους του εντέρου, ούτε φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

Τα ETEC παράγουν εντεροτοξίνες, τις θερμοευαίσθητες (Labile toxin, LT), τις θερμοανθεκτικές (Heat-stable-toxin-ST) ή και τις δύο. Η παραγωγή των LT καθορίζεται από την ύπαρξη μεταφερόμενων πλασμιδίων στο μικρόβιο και διακρίνεται στις υπομονάδες A και B. Η υπομονάδα A έχει δραστικότητα ριβοσυλοτρανσφεράσης της διφωσφορικής αδενοσίνης

(ADP) και αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη της μεμβράνης (GS), που ελέγχει την αδενυλική κυκλάση, ενώ η υπομονάδα B συνδέεται στη γαγλιοσίδη GM1 των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. Αποτέλεσμα αυτού είναι η αύξηση των επιπέδων της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) που οδηγεί στην αυξημένη απέκκριση ύδατος και χλωρίου και στην ελαττωμένη απορρόφηση νατρίου, προκαλώντας εν τέλει υπερκινητικότητα του εντέρου και διάρροια.

Από την άλλη πλευρά, η θερμοανθεκτική εντεροτοξίνη (ST) είναι ανθεκτική στους 100°C και έχει μικρή αντιγονική δράση. Η παραγωγή της ρυθμίζεται επίσης από την παρουσία μεταφερόμενων πλασμιδίων στο μικρόβιο. Υποδιαιρείται στα πεπτίδια STa και STb, από τα οποία το STa προσδένεται στον διαμεμβρανικό υποδοχέα της γουανυλικής κυκλάσης του εντερικού επιθηλίου αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την έκκριση υγρών από το έντερο.

Τα ETEC για να εκδηλώσουν τη νόσο και να εμφανίσουν τα συμπτώματα της διάρροιας απαιτούν την παραγωγή επιφανειακών παραγόντων ή αλλιώς παραγόντων αποικισμού. Οι παράγοντες αποικισμού είναι τριχίδια (φίμπριες) που αναγνωρίζουν ειδικούς υποδοχείς γλυκοπρωτεϊνών του ξενιστή και διευκολύνουν την προσκόλληση της *E.coli* στο εντερικό επιθήλιο. Πρόκειται επίσης για στοιχεία των οποίων η παραγωγή ελέγχεται από πλασμίδια.

### **Γ) Εντεροαιμοραγικά (EHEC)**

Τα εντεροαιμοραγικά κολοβακτηρίδια ευθύνονται για τις συχνότερες γαστρεντερικές νόσους που εκδηλώνονται στις αναπτυγμένες χώρες. Η προσβολή γίνεται κυρίως μέσω της κατανάλωσης μολυσμένου μοσχαρίσιου κιμά ή άλλων ατελώς ψημένων φαγητών με κρέας, μη παστεριωμένου γάλακτος και χυμών, λαχανικών και αλλαντικών. Η κατάποση μικρής ποσότητας, ακόμη και λιγότερων από 100 βακτηριδίων, μπορεί να οδηγήσει σε λοίμωξη. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο για λόγους πρόληψης το τακτικό πλύσιμο των χεριών, το μαγείρεμα των τροφίμων και το καλό πλύσιμο των λαχανικών που καταναλώνονται ωμά.

Στον άνθρωπο, το συγκεκριμένο κολοβακτηρίδιο προκαλεί κοιλιακό άλγος και σοβαρή διάρροια, συνήθως συνοδευόμενη από αιμορραγία (αιμορραγική κολίτιδα). Στο 5-10% των προσβληθέντων παιδιών κάτω των 10 ετών εμφανίζεται μία επιπλοκή, το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (ΑΟΣ), το οποίο σχετίζεται με οξεία νεφρική ανεπάρκεια, θρομβοκυτταροπενία και μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία προκαλώντας θνησιμότητα στο 3-5% των νοσούντων παιδιών. Το συνηθέστερο EHEC είναι το στέλεχος O157:H7.

### **Δ) Εντεροδιεισδυτικά (EIEC)**

Πρόκειται για στελέχη που συναντώνται σπάνια στις αναπτυγμένες χώρες, προσβάλλουν το επιθήλιο του παχέος εντέρου, το καταστρέφουν και προκαλούν υδαρείς διάρροιες. Για την προσβολή του παχέος εντέρου ευθύνονται τα γονίδια *rln* που μεταφέρονται με πλασμίδια. Τα βακτήρια διαλύουν το φαγοκυτταρικό κενοτόπιο και αναπαράγονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου.

### **E) Εντεροπροσκολλητικά (EAEC)**

Τα εντεροπροσκολλητικά κολοβακτηρίδια ευθύνονται για χρόνια υδαρή διάρροια και αφυδάτωση σε βρέφη λιγότερο αναπτυγμένων χωρών και σε άτομα που ταξιδεύουν σε αυτές τις περιοχές. Επίσης κρούσματα από EAEC έχουν παρατηρηθεί και σε παιδιά από αναπτυγμένες χώρες. Τα συμπτώματα από τα συγκεκριμένα κολοβακτηρίδια είναι δυνατόν να επιφέρουν καθυστέρηση στην ανάπτυξη των παιδιών.

Επιπρόσθετα, τα EAEC συσσωματώνονται και σχηματίζουν μικροαποικίες χρησιμοποιώντας συγκεκριμένες προσκολλητίνες που ονομάζονται συσσωρευτικά τριχίδια προσκόλλησης I (AAF1). Το κολοβακτηρίδιο αρχικά προσκολλάται στην επιφάνεια του εντέρου και στη συνέχεια προωθεί την έκκριση βλέννης και το σχηματισμό ενός βιολογικού υμενίου, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο τα συσσωρευμένα *E. coli* από αντιβιοτικά και φαγοκύτταρα.

Τέλος, στην ομάδα αυτή των κολοβακτηριδίων έχουν συσχετιστεί δύο ομάδες τοξινών: η εντεροπροσκολλητική ανθεκτική στη θερμότητα τοξίνη (EAST) και η τοξίνη που κωδικοποιείται στο πλασμίδιο (PET) που προκαλούν έκκριση υγρών.

## **1.3.2 Salmonella**

### **1.3.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά Salmonella**

Είναι το τρίτο κατά σειρά γένος της οικογένειας των Enterobacteriaceae, και το συχνότερο αίτιο εντερολοιμώξεων στις υγειονομικά προοδευμένες χώρες.

Κατά το Bergey's Manual όλες οι σαλμονέλλες ανήκουν σε ένα είδος το οποίο συνίσταται από πέντε υπογενή I,II,III,IV,V. Σε κάθε υπογένος περιλαμβάνονται κάποιοι βιότυποι ως εξής:

- Υπογένος I :Τυπικές σαλμονέλλες
  - *S.choleraesuis*
  - *S.hirschfeldii*
  - *S.typhi*
  - *S.paratyphi-A*
  - *S.schotmuelleri*
  - *S.typhimurium*
  - *S.enteritidis*
  - *S.gallinarum*
- ΥπογένοςII: Άτυπες σαλμονέλλες
  - *S.salamae*
- ΥπογένοςIII:
  - *S.arizonae*
- ΥπογένοςIV :
  - *S.houtenae*
- ΥπογένοςV : Δουλοσιτόλη ,ONPGκαιKCN (+)
  - *S.bongori*

Κατά την ταξινόμηση κατά Ewing οι σαλμονέλλες ανήκουν στη φυλή *Salmonelleae* με ένα γένος *Salmonella* και ένα είδος τη *S.enterica*. Το είδος αυτό εμφανίζεται με 5 υποειδή τα εξής :

1. *Salmonella enterica subsp.Enterica*
2. *S.enterica subsp.Salamae*
3. *S.enterica subsp.Arizonae* ,*S.enterica subsp.Diarizonae*
4. *S.enterica subsp.Houtenae*
5. *S.enterica subsp.Bongori*

Κατά την ταξινόμηση του CDC στο γένος *Salmonella* ανήκουν οι εξής υποομάδες: Στην 1η υποομάδα ανήκουν στελέχη των οροτύπων *Salmonella serotype choleraesuis*,*Salmonella serotype paratyphi*,*Salmonella serotype gallinarum*,*Salmonella serotype pullorum*.

Στις άλλες υποομάδες ανήκουν τα στελέχη :

- *S.salamae*,
- *S.arizonae* ,
- *S.diarizonae*,
- *S.houtenae* ,
- *S.bongori*
- *S.choleraesuis subsp.indica*.

Τα γένη ,υπογένη ,είδη και υποείδη των σαλμονελλών έχουν τους γενικούς φαινοτυπικούς χαρακτήρες της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*,ήτοι διασπών την γλυκόζη και ανάγουν τα νιτρικά και τους ειδικούς χαρακτήρες του γένους που επιτρέπουν το διαχωρισμό από τα άλλα γένη της οικογένειας.

Οι ειδικοί χαρακτήρες του γένους είναι οι εξής:

- Δεν διασπών τη λακτόζη
- Είναι κινητά βακτήρια
- Παράγουν αέριο από τη διάσπαση της γλυκόζης
- Διασπών τη λυσίνη
- Παράγουν H<sub>2</sub>S

Είδη σαλμονέλων, υποείδη, ορότυποι, και οι συνηθισμένοι βιότοποί τους, σχέδιο Kaufmann-White		
<u>Είδη και υποείδη σαλμονέλων</u>	<u>Αριθμός ορότυπων στα υποείδη</u>	<u>Συνηθισμένος βιότοπος</u>
<i>S. enterica subsp. Enterica</i>	1454	Θερμόαιμα ζώα
<i>S. enterica subsp. Salamae</i>	489	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica subsp. Arizonae</i>	94	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica subsp. Diarizonae</i>	324	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica subsp. Houtenae</i>	70	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica subsp. Indica</i>	12	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. bongori</i>	20	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον

Πίνακας Kaufmann-White

### 1.3.2.2 Μορφολογία

Είναι μικρόβια Gram αρνητικά ,κινούμενα με περίτριχες βλεφαρίδες. Η *S.gallinarum* και η *S.pullorum* είναι τα μόνα είδη που είναι ακίνητα. Είναι αερόβια ,ασπορογόνα, καταλάση θετικά ,οξειδάση αρνητικά, περιέχουν ινίδια και δεν έχουν έλυτρο, εκτός της *S.typhi*. Διασπών τη γλυκόζη με παραγωγή αερίου εκτός από τη *S.typhi* που δεν παράγει αέριο και σπανιότατα μερικοί μεταλλάκτες των άλλων σαλμονελλών. Δεν ζυμώνουν τη λακτόζη και δεν παράγουν β-γαλακτοσιδάση.

### 1.3.2.3 Παθογένεια



Τα πουλερικά και τα προϊόντα πουλερικών είναι η κύρια πηγή μόλυνσης της σαλμονέλας. Οι πτηνοτρόφοι αντιμετωπίζουν αυξανόμενη πίεση από τις αρχές δημόσιας υγείας και τους καταναλωτές σε θέματα ασφάλειας τροφίμων. Τα προϊόντα απομόνωσης σαλμονέλας είναι πιο συνηθισμένα σε πουλερικά και ζωικά προϊόντα παρά σε οποιαδήποτε άλλη ζωική πηγή. Η όλο και μεγαλύτερη ανάπτυξη της σύγχρονης βιομηχανίας προϊόντων πουλερικών έχει οδηγήσει σε περισσότερες και πιο σύνθετες ευκαιρίες για τη διάδοση του γένους *Salmonella*. Η σαλμονέλα θεωρείται ζωνοστός επειδή οι ανθρώπινες ασθένειες προέρχονται από μολυσμένα ζώα. Η μετάδοση γίνεται μέσω οδών απέκκρισης και από του στόματος. Τα προσβεβλημένα ζώα είναι πουλιά, γουρούνια, βοοειδή, πρόβατα, άλογα, τρωκτικά και όλα τα κατοικίδια ζώα. Είναι εύκολο για τη σαλμονέλα να εξαπλωθεί απευθείας από ζώο σε ζώο επειδή μένουν σε μεγάλο αριθμό σε συγκεκριμένους χώρους. Ακόμη και η συμβολή των μολυσμένων ζωοτροφών στην εξάπλωση της νόσου στα ζώα είναι σημαντική.

#### **1.3.2.4 Πηγές Μόλυνσης**

Υπάρχουν πολλές πηγές μόλυνσης από σαλμονέλα στα πτηνά. Τα πουλερικά και πολλά άλλα ζώα είναι συνήθως φορείς, με υψηλότερα ποσοστά μόλυνσης και χαμηλότερο κλινικό ποσοστό. Μπορούν να αποβάλουν τη σαλμονέλα από τα κόπρανα και να σχηματίσουν μια μεγάλη δεξαμενή και πηγή μόλυνσης για άλλα ζώα, ανθρώπους και το περιβάλλον. Τα πουλερικά μολύνονται συχνά μέσω της οριζόντιας μετάδοσης από τα απορρίμματα, τα περιττώματα, την τροφή, το νερό, το χνούδι, τη σκόνη, τα ξύσματα, το άχυρο, τα έντομα, τον εξοπλισμό και άλλα και από την επαφή με άλλους νεοσσούς ή κοτόπουλα, τρωκτικά, κατοικίδια ζώα, άγρια πουλιά, οικόσιτα και άγρια ζώα και με το προσωπικό. Η κάθετη μετάδοση εμφανίζεται όταν μολύνονται τα ωοθυλάκια ή όταν τα αναπτυσσόμενα αυγά μολύνονται στον ωαγωγό.

Η διαχείριση μονάδων πουλερικών μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην εξάπλωση της σαλμονέλας. Πολλοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν την οριζόντια και κάθετη μετάδοση είναι αλληλένδετοι.

### **1.3.3 Shigella**

#### **1.3.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά**

Είναι το δεύτερο γένος της οικογένειας των εντεροβακτηριακών, μετά το γένος *Escherichia* κατά το Bergey's Manual. Κατά την ταξινόμηση του CDC δεν είναι ξεχωριστό είδος αλλά μαζί με την *Escherichia* αποτελούν ένα ενιαίο γένος, των *Escherichia* και *Shigella* γιατί έχουν συγγένεια στη δομή του DNA των κατά 75-100%.

Όλες οι σιγκέλλες έχουν τους ίδιους φαινοτυπικούς χαρακτήρες (καλλιεργητικούς και βιοχημικούς), διαφέρουν μόνο στην αντιγονική δομή. Βάση της διαφοράς αυτής οι σιγκέλλες διαχωρίστηκαν σε είδη ή υποομάδες A,B ,C και D. Όπως και να χαρακτηρισθούν τα 4είδη ή ομάδες φέρουν όνομα είδους και είναι τα εξής.

Η *Shigella dysenteriae* με 10 ορότυπους, η *S.flexneri* με 13 ορότυπους και υποτύπους και υποείδη, η *S.boydii* με 15 οροτύπους και η *S.sonnei* χωρίς αντιγονικές διαφορές των στελεχών της χωρίς δηλαδή οροτύπους.

Όλα τα είδη, υπότυποι και βιότυποι και των 4 ομάδων έχουν στους γενικούς χαρακτήρες της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών και κοινούς ειδικούς φαινοτυπικούς χαρακτήρες. Οι κοινοί αυτοί χαρακτήρες, που επιτρέπουν το διαχωρισμό τους από τα κολοβακτηρίδια, είναι οι εξής: 1)Δεν ζυμώνουν τη λακτόζη. 2)Δεν κινούνται. 3)Δεν διασπούν τη λυσίνη. 4)Δεν παράγουν αέριο από τη διάσπαση της γλυκόζης και άλλων σακχάρων. Από τις σαλμονέλλες διαχωρίζονται από το ότι δεν παράγουν υδρόθειο.

### **1.3.3.2 Μορφολογία**

Οι σιγκέλλες ,ανεξάρτητα του είδους των,έχουν τους ίδιους μορφολογικούς και καλλιεργητικούς χαρακτήρες.Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια μικρά ,κοντύτερα από την *E.coli* και τη *Salmonella*,χωρίς έλυτρο,ακίνητα αερόβια και προαιρετικά αναερόβια. Μερικά στελέχη αναπτύσσουν περιβληματικό αντιγόνο και πολλά αναπτύσσουν ινίδια .Είναι καταλάση θετικά ,οξειδάση αρνητικά.

### **1.3.4 Yersinia**

#### **1.3.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά**

Το γένος *Yersinia* ανήκει στο τελευταίο γένος της οικογένειας των εντεροβακτηριδίων (XIV), σύμφωνα με το Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9η έκδοση).

Υπάρχουν 11 είδη στο γένος *Yersinia*: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, και *Y. ruckeri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. Rohde* και *Y. Aldovae*. Από αυτά, μόνο τα τρία πρώτα αποτελούν παθογόνα στελέχη για τον άνθρωπο, ενώ εντεροπαθογόνα στελέχη, μπορούν να θεωρηθούν μόνο η *Y. enterocolitica* (με μεγαλύτερη συχνότητα επιβεβαιωμένων μολύνσεων σε ανθρώπους) και η *Y. pseudotuberculosis* (πιο σπάνια). Η *Y. pseudotuberculosis* προκαλεί μεσεντερική λεμφαδενίτιδα και σηψαιμία, ενώ συμβάλει στην κλινική εκδήλωση νόσων αυτοάνοσης αιτιολογίας. Η κύρια τοπογραφική εντόπιση της είναι στη Βόρειο-ανατολική Ευρώπη, κυρίως σε Ρωσία και Φινλανδία. Η *Y. pestis* προκαλεί την πανώλη στον άνθρωπο, ενώ δύναται να προσβάλει και αρκετά ζώα. Σε μοριακό επίπεδο, οι *Y. pseudotuberculosis* και *Y. pestis* παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες, και θεωρείται ότι η *Y. pestis* είναι ένα είδος που προήλθε εξελικτικά από την *Y. pseudotuberculosis*. Η *Y. pestis* δεν έχει εμπλακεί σε περιστατικά τροφιμογενούς λοίμωξης και μέχρι σήμερα δεν έχουν καταγραφεί περιστατικά στην Ευρώπη. Η *Y. ruckeri* προσβάλει μόνο τα ψάρια. Η ταξινόμηση της *Y. enterocolitica* στηρίζεται κατά κύριο λόγο στην δυνατότητά της να μεταβολίζει ορισμένα οργανικά συστατικά, ενώ μεταξύ των διάφορων στελεχών της καταγράφεται μεγάλη ετερογένεια. Χωρίζεται σε δύο υπότυπους, το *Y. enterocolitica subsp enterocolitica* και το *Y. enterocolitica subsp palearctica*.

Στον άνθρωπο και μία μεγάλη ομάδα οικόσιτων ζώων, ταξινομείται σε 6 βιότυπους, με βάση τη ζύμωση συγκεκριμένων οργανικών υποστρωμάτων: 1-A, 1-B, 2, 3, 4, και 5. Επίσης, ταξινομείται σε περισσότερους από 57 ορότυπους, με βάση τα σωματικά αντιγόνα O (λιποπολυσακχαριτών ή LPS). Ο προσδιορισμός του βιότυπου παρουσιάζει σημαντική χρησιμότητα στην κλινική διάγνωση. Το 2000 ο Neubauer και οι συνεργάτες του, κατέταξαν τα βακτήρια του είδους *Y. enterocolitica* σε 76 ορολογικές ομάδες.

#### **1.3.4.2 Μορφολογία**

Μορφολογία η *Y. enterocolitica* είναι ένα Gram «-» μη σπορογόνο διεισδυτικό βακτήριο του εντέρου, αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο (Robbins - Browne, 2001). Το μέγεθός του είναι 0,5-3 μm και διαθέτει αποστρογγυλεμένα άκρα. Είναι κοκκοβακτηρίδιο διπολικής χρώσης με κέντρο που έχει πιο ανοιχτό χρωματισμό. Κατά την παρατήρησή του στο μικροσκόπιο, είναι χαρακτηριστική η έντονη κυματοειδής του κίνηση και η ύπαρξη 2-15 περιτρίχιων βλεφαρίδων σε κάθε κύτταρο, σε περίπτωση επώασης στους 25 °C, ενώ στους 37

°C είναι ακίνητο, χωρίς εμφανείς βλεφαρίδες. Το μήκος και το πλάτος των βλεφαρίδων είναι από 2.82-2.85 μm και 0.27-0.29 μm, αντιστοίχως. Επιπλέον, παρατηρείται απουσία ελύτρου. Κατά κύριο λόγο διατάσσεται μεμονωμένα, ενώ έχουν παρατηρηθεί διατάξεις σε σωρούς ή αλυσίδες μικρού μεγέθους. Χαρακτηριστικό του βακτηρίου, είναι το παράδοξο της κίνησης του στους 25 °C και της ακινησίας στους 37 °C, όταν εξετάζεται σε σωληνάριο που περιέχει ημίρρευστο άγαρ. Η *Y. enterocolitica*, όπως όλα τα εντεροβακτηρίδια ζυμώνει τη γλυκόζη με παραγωγή οξέος, με ή χωρίς παραγωγή αερίου, ενώ δεν ζυμώνει τη λακτόζη. Το είδος αυτό έχει αρνητική αντίδραση οξειδάσης, ενώ είναι καταλάση θετικό. Η διάσπαση της ουρίας γίνεται κατά βάση μέσα σε 5 ώρες και η διάσπαση ενισχύεται σε θερμοκρασία των 37°C, ενώ μετά από 24ωρη επώαση, η διάσπαση πραγματοποιείται και είναι ευκρινής και στις δύο θερμοκρασίες, δηλαδή των 25°C και των 37°C. Η ανάπτυξη του μικροβίου γίνεται με βραδείς ρυθμούς και απαιτείται επώαση 48 ωρών προκειμένου να σχηματιστούν αποικίες. Η συμπεριφορά των διαφόρων στελεχών ως προς την παραγωγή οξέος από τα σάκχαρα λιπάση, ξυλόζη, ινδόλη, σορβιτόλη, σουκρόζη και σορβόζη σε σχέση με τις δοκιμές αυτές, οδηγεί στη διάκριση των 330 στελεχών της *Y. enterocolitica* σε 5 βιότυπους. Πιο πρόσφατα, βέβαια, προτάθηκε από τον Wauters και τους συνεργάτες του η διάκριση σε 6 βιοτύπους του παθογόνου *Y. enterocolitica*. Τέλος, τα περισσότερα στελέχη ανάγουν τα νιτρικά άλατα, και στις δύο θερμοκρασίες, με σπάνιες εξαιρέσεις στελεχών του βιότυπου 5. Παραγωγή οξέος προκαλείται από ζύμωση των σακχάρων, όπως η D-γλυκόζη, η D-μανόζη, η D-σελλοβιόζη, και η D-μαννιτόλη, σε χρονικό διάστημα 1-3 ημερών. Αντίθετα, δεν προκαλείται ζύμωση στα σάκχαρα L-ραμνιόζη, D-μελιβιόζη, D-ραφινόζη, ινουλίνη, αδονιτόλη και ερυθριτόλη. Έτσι, με βάση τη ζύμωση επιλεγμένων οργανικών υποστρωμάτων, έχει επικρατήσει η *Y. enterocolitica* να κατατάσσεται στις πέντε βιο-ομάδες: 1A, 1B, 2, 3, 4, και 5.

#### **1.3.4.3 Παθογένεια**

Η παθογένεια της *Y. enterocolitica* χαρακτηρίζεται από τον βιότυπο (παθογόνος ή μη παθογόνος), καθώς οι ορότυποι του βακτηρίου είναι κοινοί σε παθογόνα και μη παθογόνα στελέχη. Βασικό στοιχείο στην εμφάνιση της νοσηρότητας των παθογόνων στελεχών του *Yersinia* είναι η ύπαρξη νοσογόνου πλασμιδίου pYV 70 kb (Cornelis και συν., 1998). Η νοσηρότητα που προκαλούν τα διάφορα παθογόνα στελέχη σχετίζεται με την ύπαρξη των λεγόμενων δεικτών «παθογονικότητας», στους οποίους περιλαμβάνονται η εντεροτοξίνη Yst

(*Yersinia stable toxin*), το Myf αντιγόνο, την Inw πρωτεΐνη εισβολής (invasion), και την Ail συγκολλητίνη. Η Yst είναι μία θερμοάντοχη εντεροτοξίνη (Yst, Yst-a), η παραγωγή της οποίας ελέγχεται από χρωμοσωμικό γονίδιο. Η δομή της εντεροτοξίνης αυτής ομοιάζει με τις εντεροτοξίνες των στελεχών της *Escherichia coli* και των non-O1 οροτύπων του *Vibrio cholerae*. Οι παραγόμενες τοξίνες προσκολλώνται στα κύτταρα του εντέρου και επηρεάζουν την ομοιοστασία απορρόφησης και έκκρισης υγρών και ηλεκτρολυτών, με αποτέλεσμα την διάρροια (Delor και συν., 1990). Η παραγωγή των εντεροτοξινών όπως η Yst πραγματοποιείται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (4 – 37°C) (Robbins-Browne, 2001), με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 25 °C (Schiemann, 1988). Οι τοξίνες αυτές δεν επηρεάζονται σε όξινα περιβάλλοντα, επομένως δεν καταστρέφονται κατά τη διέλευσή τους από τον στόμαχο και προκαλούν την εντερική βλάβη, αν ληφθούν μέσω του στόματος από τρόφιμα στα οποία οι τοξίνες είχαν προσχηματιστεί. Σε τρόφιμα που ενοφθαλμίστηκαν με *Y. enterocolitica* διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη παραγωγή τοξίνης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 25°C.

Επίσης, η νοσηρότητα εξαρτάται και από την ύπαρξη πλασμιδιακών νοσογόνων γονιδίων, όπως τα pYV, yadA, virF . Ο βióτυπος 1-A, στερείται του νοσογόνου πλασμιδίου pYV αλλά και νοσογόνων χρωμοσωμικών καθοριστών και θεωρείται απαθογόνο (Bhagat and Viridi 2011), ή υπό συνθήκες ευκαιριακά παθογόνο, καθώς πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι ορισμένα στελέχη του βióτυπου 1A προκαλούν λοιμώξεις, οι οποίες έχουν παρόμοια κλινικά συμπτώματα με τα στελέχη των υπόλοιπων βióτυπων και πιθανώς οφείλονται στην ύπαρξη άλλων νοσογόνων γονιδίων, όπως το ystB και το hreP (Tennant και άλλοι 2003, Huoninen και άλλοι 2010). Ο βióτυπος 1-A, ανιχνεύεται συχνά στο περιβάλλον, στα τρόφιμα και στα κόπρανα του ανθρώπου και των ζώων, χωρίς όμως να αποικίζει το γαστρεντερικό σωλήνα τους. Επίσης, ο βióτυπος 1A παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ετερογένεια, σε σχέση με τους υπόλοιπους βióτυπους της *Y. enterocolitica* και περιλαμβάνει μία μεγάλη ποικιλία οροτύπων, όπως τους οροτύπους O:5, O:6,30, O:6,31, O:7,8, O:10, αλλά και τα O-άτυπα είδη, που είναι τα πιο συχνά απομονωμένα (Tennant και συν., 2003). Ο βióτυπος 1-B, ανιχνεύεται πολύ σπάνια στην Ευρώπη, είναι πιο συχνός στην Β. Αμερική και στην Ιαπωνία και δεν ανιχνεύεται στο περιβάλλον και στο νερό. Εντούτοις, θεωρείται ο πιο παθογόνος βióτυπος από όλους.

### **1.3.5 Cronobacter Sakazakii**

#### **1.3.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά - Ταξινόμηση**

Το 1980, μελέτες ξεχώρισαν το πρότερα γνωστό ως *Enterobacter cloacae* που σχημάτιζε κίτρινες αποικίες από το *Enterobacter cloacae* και του απέδωσαν το όνομα *Enterobacter sakazakii* και επιλέχθηκε η κατατάξη του στο γένος *Enterobacter*. Το 2007 ωστόσο, περαιτέρω διερεύνηση, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το *Enterobacter sakazakii* δεν κατατάσσεται στο γένος *Enterobacter*, αλλά αποτελεί ξεχωριστή ομάδα μικροοργανισμών με όμοια χαρακτηριστικά και ανήκει στο γένος *Cronobacter*. Πρόκειται για μη σποριογόνα, προαιρετικά αναερόβια Gram-αρνητικά βακτήρια, με σχήμα βάκιλλου και δυνατότητα κίνησης.

### **1.3.5.2 Παθογένεια**

Το *Cronobacter* spp. είναι δυνητικά παθογόνο με σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων. Το *Cronobacter sakazakii* προσβάλλει κυρίως νεογνά. Είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο, σε σχήμα ράβδου και μπορεί να κινηθεί. Επιπλέον, δεν σχηματίζει σπόρους αλλά αναπτύσσεται σε αερόβιο και αναερόβιο περιβάλλον. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι μεταξύ 37°C και 43°C και ο χρόνος πολλαπλασιασμού ανέρχεται στα 40 λεπτά.

Αν και δεν είναι όλα τα στελέχη ικανά να μολύνουν νεογνά, κανένα δεν μπορεί να θεωρηθεί απολύτως ακίνδυνο για την υγεία τους. Τα στελέχη των ειδών *C. sakazakii*, *C. malonaticus* και *C. turicensis* είναι τα μόνα που έχουν ενοχοποιηθεί για λοιμώξεις νεογνών, ειδικά το στέλεχος *C. sakazakii* έχει συνδεθεί με τα περισσότερα περιστατικά νεογνικής

Με αφορμή το θάνατο 2 νεογνών από μηνιγγίτιδα, το 1961 στην Αγγλία έγινε η πρώτη απομόνωση του *Cronobacter* spp. Σήμερα, τα περιστατικά λοιμώξεων από *Cronobacter* είναι αυξημένα σε σχέση με το παρελθόν, παραμένουν όμως αρκετά σπάνια σε σχέση με άλλες μολυσματικές ασθένειες. Ωστόσο, το ετήσιο ποσοστό θνησιμότητας πρόωρων ή ελλιποβαρών νεογνών από λοίμωξη *Cronobacter* ανέρχεται στο 50%. Σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή Μικροβιολογικών Προδιαγραφών για τα Τρόφιμα, το γένος *Cronobacter* θεωρήθηκε ως “σοβαρό κίνδυνο για περιορισμένους πληθυσμούς, απειλητικό για τη ζωή ή με ουσιώδεις χρόνιες επιπτώσεις” .

## Κεφάλαιο 2: Εντεροβακτήρια και τρόφιμα

### 2.1: Ψάρια

Τα θαλασσινά είναι μια καλή πηγή πολλών σημαντικών θρεπτικών συστατικών, όπως πρωτεΐνες, ωμέγα 3 λιπαρά οξέα πολύ μακράς αλυσίδας, βιταμίνη D, βιταμίνη B12, σελήνιο και ιώδιο. Τα θαλασσινά περιλαμβάνουν μαλάκια (π.χ. στρείδια, μύδια και μύδια), ψάρια (π.χ. σολομός και τόνος), θαλάσσια θηλαστικά (π.χ. φώκια και φάλαινες), αυγά ψαριών (αυγοτάραχο) και καρκινοειδή (π.χ., γαρίδες, καβούρια και αστακοί). Στις κυβερνητικές οδηγίες της Νορβηγίας για τρόφιμα και διατροφή, συνιστάται ιδιαίτερα η αυξημένη πρόσληψη ψαριών και άλλων θαλασσινών, ωστόσο η κατανάλωση θαλασσινών δεν είναι απαλλαγμένη από κινδύνους, διότι έχει συμβάλει σε σημαντικό ποσοστό των τροφιμογενών ασθενειών και επιδημιών παγκοσμίως. Χημικά, μέταλλα, τοξίνες και μολυσματικοί παράγοντες έχουν βρεθεί στα θαλασσινά. Οι μολυσματικοί παράγοντες που σχετίζονται με τροφιμογενείς ασθένειες περιλαμβάνουν βακτήρια, ιούς και παράσιτα και οι ασθένειες που προκαλούνται από αυτούς τους παράγοντες κυμαίνονται από ήπια γαστρεντερίτιδα έως απειλητικά για τη ζωή σύνδρομα.

Η μικροβιακή χλωρίδα εντοπίζεται κυρίως στο δέρμα, στην εξωτερική βλέννα, στα βράγχια, στο εντερικό σύστημα των ψαριών και στα εσωτερικά όργανα, όπως νεφροί, ήπαρ, σπλήνα. Ορισμένα είδη θαλασσινών είναι εγγενώς πιο επικίνδυνα από άλλα λόγω πολλών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της φύσης του περιβάλλοντος από το οποίο προέρχονται, του τρόπου διατροφής τους και της περιόδου κατά την οποία αλιεύονται.

Σύμφωνα με το Center for Science in the Public Interest (Ουάσινγκτον), τα ιχθυηρά είναι υπεύθυνα για ένα σημαντικό ποσοστό των τροφιμογενών ασθενειών και επιδημιών τόσο στις Ηνωμένες Πολιτείες όσο και παγκοσμίως, με κύρια αιτία τα βακτήρια σε ποσοστό 54%. Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) απέδειξε την παρουσία σαλμονέλας σε διάφορα ψάρια και οστρακοειδή, συμπεριλαμβανομένων θαλασσινών που προορίζονται για κατανάλωση χωρίς περαιτέρω προετοιμασία κατά τη διανομή, απαιτώντας ελάχιστο μαγείρεμα και οστρακοειδή που τρώγονται ωμά. Οι περισσότερες εστίες μόλυνσης από σαλμονέλα σημειώθηκαν κατά τους θερμότερους μήνες. Επίσης το 2015 αναφέρθηκαν 200 περιστατικά τροφικής δηλητηρίασης ανά 100.000 κατοίκους στην Ταϊλάνδη, με το μεγαλύτερο ποσοστό (48%) να έχει προκληθεί από *Salmonella.spp*, μεταξύ των παθογόνων βακτηρίων που εντοπίστηκαν.

Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2014 στην Ταϊλάνδη (*Silpakorn University Research and Development Institute*), συλλέγοντας 35 δείγματα φρέσκων ψαριών από κεντρικές αγορές θαλασσινών, έδειξε ότι τα περισσότερα δείγματα, σε ποσοστό 89% ήταν

μολυσμένα από εντεροβακτήρια, κυρίως των γένων *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Serratia* και *Yersinia*. Μια ακόμη μελέτη που υλοποιήθηκε στην επαρχία Κωνσταντίνου στην Αλγερία προσπάθησε να εξετάσει τα ποσοστά εμφάνισης εντεροβακτηριδίων σε δείγματα θαλασσινών που συλλέχθηκαν από διαφορετικούς ψαράδες σε διάστημα ενός έτους. Αυτή η μελέτη διαπίστωσε ότι ο αριθμός των κολοβακτηριδίων (ολικών και κοπράνων) τόσο στις σαρδέλες όσο και στις γαρίδες ξεπέρασε κατά πολύ τα ανώτατα όρια που συνιστώνται από τα πρότυπα της Αλγερίας.

Αυτά τα βακτήρια είναι γνωστοί φυσικοί κάτοικοι του εντέρου ανθρώπου και ζώου και η παρουσία τους στο το περιβάλλον προκύπτει από μόλυνση κοπράνων. Έτσι, ο μεγάλος αριθμός κολοβακτηριδίων στα δείγματα θαλασσινών μπορεί να είναι δείκτης συνεχών απορρίψεων λυμάτων στη θάλασσα. Συνεπώς, πρέπει να εφαρμοστούν μέτρα διόρθωσης και ελέγχου για να διασφαλιστεί η ασφαλής ποιότητα των θαλασσινών και να αποφευχθεί η μόλυνσή τους από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η μόλυνση από εντεροβακτήρια μπορεί να προληφθεί με επαρκές μαγείρεμα, σωστή αποθήκευση και επεξεργασία μετά τη αλίευση, αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης κατά το χειρισμό θαλασσινών, παρακολούθηση του νερού αλίευσης για μικροοργανισμούς, απαγόρευση αλίευσης από περιοχές μολυσμένων νερών με λύματα και έλεγχο της απόρριψης λυμάτων στη θάλασσα.

### **Μικροβιολογικά κριτήρια για την ασφάλεια των ψαριών και των θαλασσινών (ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005)**

Στους παρακάτω πίνακες Πίνακα 2.1 και Πίνακας 2.2 δίδονται τα μικροβιολογικά κριτήρια για τα ψάρια και τα θαλασσινά που έχουν υιοθετηθεί από τη Ε.Ε.. Έχουν καθοριστεί κριτήρια για τους κυριότερους παθογόνους μικροοργανισμούς ανάλογα με την φύση του προϊόντος και τη δυνατότητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών αυτών.

#### **Πίνακας 2.1: Κριτήρια ασφάλειας για τα τρόφιμα**

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί/οι τοξίνες και οι μεταβολίτες τους	Πλάνο δειγματοληψίας (1)		Όρια (2)		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς (3)	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
		n	c	m	M		
1.16 Βρασμένα μαλακόστρακα και μαλάκια	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g		EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.17 Ζώντα δίθυρα μαλάκια και ζώντα εχινόδερμα, χιτωνόζωα και γαστερόποδα	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g		EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.25 Ζώντα δίθυρα μαλάκια και ζώντα εχινόδερμα, χιτωνόζωα και γαστερόποδα	<i>E. coli</i> (15)	1 (16)	0	230 MPN/100 g σάρκας και ενδοθωρικού υγρού		ISO TS 16649-3	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους



**Πίνακας 2.2: Κριτήρια υγιεινής κατά τη διάρκεια της διαδικασίας**

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί	Πλάνο δειγματοληψίας (1)		Όρια		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς (2)	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο	Μέτρα σε περίπτωση μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων
		n	c	m	M			
2.4.1. Με κέλυφος και χωρίς κέλυφος προϊόντα βρασμένων μαλακοστράκων και μαλακίων	E. coli	5	2	1 MPN/g	10 MPN/g	ISO TS 16649-3	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής
	Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση	5	2	100 cfu/g	1 000 cfu/g	EN/ISO 6888-1 ή 2	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής

- ❖ n= αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα· c = αριθμός μονάδων δειγματοληψίας με τιμές μεταξύ m και M
- ❖ Τα ανώτερα κριτήρια ισχύουν για τις αναλυτικές διαδικασίες που αναφέρονται στον Κανονισμό.

## 2.2 Λαχανικά και φρούτα

Τα φρέσκα φρούτα και λαχανικά είναι σημαντικά συστατικά μιας υγιεινής και ισορροπημένης διατροφής. η κατανάλωσή τους ενθαρρύνεται σε πολλές χώρες από κυβερνητικές υπηρεσίες υγείας για την προστασία από μια σειρά ασθενειών όπως καρκίνους και καρδιαγγειακές παθήσεις. Ωστόσο, τα φρούτα και τα λαχανικά, και ιδίως τα φυλλώδη λαχανικά που καταναλώνονται ωμά, αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο ως σημαντικά μέσα για τη μετάδοση ανθρώπινων παθογόνων που παραδοσιακά συνδέονταν με τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Παρά την αυξημένη σημασία των νωπών προϊόντων ως φορέα για τους ανθρώπινους παθογόνους παράγοντες, υπάρχει επί του παρόντος περιορισμένη γνώση σχετικά με το που συμβαίνει η μόλυνση στην εφοδιαστική αλυσίδα ή για τον μηχανισμό με τον οποίο οι παθογόνοι παράγοντες αποικίζονται και επιβιώνουν πάνω ή μέσα σε φρούτα και λαχανικά. Τα φρέσκα προϊόντα όπως τα φρούτα και οι σαλάτες καταναλώνονται συχνά ωμά, θέτοντας τους καταναλωτές σε κίνδυνο μόλυνσης από παθογόνους οργανισμούς. Η βιομηχανία νωπών προϊόντων σε πολλές χώρες ανταποκρίθηκε σε αυτό υιοθετώντας διάφορες πρακτικές διαχείρισης κινδύνων που έχουν σχεδιαστεί για να μειώσουν την πιθανότητα μόλυνσης. Ωστόσο, παρά το γεγονός αυτό, ο αριθμός των αναφερόμενων ασθενειών που σχετίζονται με μολυσμένα προϊόντα έχει αυξηθεί στις ΗΠΑ. Το 2007, στην Ευρωπαϊκή Ένωση η *Salmonella* βρέθηκε στο 0,3% περίπου των δειγμάτων φρέσκων φρούτων και λαχανικών.. Σε μια μελέτη γενικών επιδημιών μολυσματικών εντερικών ασθενειών στην Αγγλία και την Ουαλία, που διεξήχθη μεταξύ 1992 και 2006, το 23% των επιδημιών ήταν τροφικής προέλευσης και το 4% των τροφιμογενών εστιών συνδέονταν με παρασκευασμένη σαλάτα.

Το φθινόπωρο του 1991, ένα ξέσπασμα λοιμώξεων *E coli*, στη νοτιοανατολική Μασαχουσέτη έδωσε την ευκαιρία να εντοπιστεί η μετάδοση από ένα φαινομενικά άπιθανο τρόφιμο. Η ασθένεια συσχετίστηκε σημαντικά με την κατανάλωση μιας μάρκας μηλίτη μήλου και οι 16 από 49 τους μάρτυρες ανέφεραν ότι έπιναν μηλίτη την εβδομάδα πριν από την έναρξη

της ασθένειας. Διαπιστώθηκε ότι τα μήλα που είχαν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του συγκεκριμένου μηλίτη δεν είχαν πλυθεί, ο μηλίτης δεν είχε παστεριωθεί και δεν είχαν προστεθεί συντηρητικά στο τελικό προϊόν. Επειδή τα τρόφιμα με pH μικρότερο του 4,6 εμποδίζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση παθογόνων βακτηρίων, ο μηλίτης είχε θεωρηθεί ασφαλές προϊόν προς κατανάλωση. Ωστόσο, ο μηλίτης μπορεί να υποστηρίξει την επιβίωση του είδους σαλμονέλας σε pH 3,6 για 30 ημέρες και του είδους *E coli* σε pH χαμηλότερο του 4,0 για 20 ημέρες στους 8 ° C.

Οι εργαστηριακές μελέτες για την επιβίωση της σαλμονέλας και άλλων βακτηριακών παθογόνων στο χυμό πορτοκαλιού υποστηρίζουν επίσης την υπόθεση ότι οι όξινοι χυμοί μπορούν να είναι φορείς μετάδοσης παθογόνων. Μελέτες για την επιβίωση της σαλμονέλας σε χυμό πορτοκαλιού, χρησιμοποιώντας στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς και χυμό πορτοκαλιού, έδειξαν ότι οι σαλμονέλα επέζησε σε ανιχνεύσιμους αριθμούς έως 27 ημέρες σε pH 3,5, 46 ημέρες σε pH 3,8, 60 ημέρες σε pH 4,1, και 73 ημέρες σε pH 4,4.

Επίσης, η κατανάλωση πεπόνι έχει πρόσφατα συνδεθεί με πολλές μεγάλες εστίες λοιμώξεων στη Βόρεια Αμερική, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για καλύτερη κατανόηση των πρακτικών και των διαδικασιών που μπορεί να συμβάλουν στη μόλυνση. Είκοσι τρεις εστίες σημειώθηκαν μεταξύ 1984 και 2002. 1434 άνθρωποι αρρώστησαν, 42 νοσηλεύτηκαν και δύο πέθαναν σε αυτές τις εστίες. Οι αιτιολογικοί παράγοντες στις εστίες περιλάμβαναν πέντε ορότυπους *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* και νοροϊός.

### **Μικροβιολογικά κριτήρια για την ασφάλεια των φρούτων και των λαχανικών (ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005)**

Στους παρακάτω πίνακες Πίνακα 2.3 και Πίνακας 2.4 δίδονται τα μικροβιολογικά κριτήρια για τα φρούτα και τα λαχανικά που έχουν υιοθετηθεί από τη Ε.Ε.. Έχουν καθοριστεί κριτήρια για τους κυριότερους παθογόνους μικροοργανισμούς ανάλογα με την φύση του προϊόντος και τη δυνατότητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών αυτών.

**Πίνακας 2.3: Κριτήρια ασφάλειας για τα τρόφιμα**

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί/οι τοξίνες και οι μεταβολίτες τους	Πλάνο δειγματοληψίας (1)		Όρια (2)		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς (3)	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
		n	c	m	M		

1.18 Σπόροι με φύτρο (έτοιμοι για κατανάλωση) ►M4 (23) ◄	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.19 Κομμένα φρούτα και λαχανικά (έτοιμα για κατανάλωση)	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.20 Μη παστεριωμένοι χυμοί φρούτων και λαχανικών (έτοιμοι για κατανάλωση)	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

#### **Πίνακας 2.4: Κριτήρια υγιεινής κατά τη διάρκεια της διαδικασίας**

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί	Πλάνο δειγματοληψίας (1)		Όρια		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς (2)	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο	Μέτρα σε περίπτωση μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων
		n	c	m	M			
2.5.1 Κομμένα φρούτα και λαχανικά (έτοιμα προς κατανάλωση)	<i>E. coli</i>	5	2	100 cfu/g	1 000 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	Διαδικασία παρασκευής	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και στην επιλογή των πρώτων υλών
2.5.2 Μη παστεριωμένοι χυμοί φρούτων και λαχανικών (έτοιμοι για κατανάλωση)	<i>E. coli</i>	5	2	100 cfu/g	1 000 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	Διαδικασία παρασκευής	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και στην επιλογή των πρώτων υλών

- ❖ n= αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα· c = αριθμός μονάδων δειγματοληψίας με τιμές μεταξύ m και M
- ❖ Τα ανώτερα κριτήρια ισχύουν για τις αναλυτικές διαδικασίες που αναφέρονται στον Κανονισμό

### **2.3 Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα**

Γάλα, σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν, που προέρχεται από την ολοσχερή και χωρίς διακοπή άμελξη γαλακτοφόρου ζώου, που είναι υγιές, διαβιώνει και διατρέφεται κάτω από υγιεινούς όρους και δεν ευρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν βασικά είδη για τη διατροφή και την υγεία του ανθρώπου. Το γεγονός ότι τα προϊόντα αυτά είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, τα καθιστά κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροβίων. Τα *Enterobacteriaceae* μπορούν να προκαλέσουν ενζυματική διάσπαση πρωτεϊνών ή λιπιδίων, προκαλώντας αλλοίωση που συμβάλλει σε σημαντικές οικονομικές απώλειες. Τα εντεροβακτήρια συμπεριλαμβανομένων των *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, και *Yersinia spp* έχουν ανιχνευθεί συχνά σε επιδημίες που προκαλούνται από γάλα.

#### **Salmonella spp**

Μεταξύ των ειδών της *Salmonella spp*, η *S. enteritis*, *S. Typhimurium* και η *S. dublin* είναι αυτές που έχουν συνδεθεί περισσότερο με λοιμώξεις μετά από την κατανάλωση νωπού γάλακτος ή γαλακτοκομικών προϊόντων. Η *S. enteritis* έχει ενοχοποιηθεί για περιστατικά λοιμώξεων από την κατανάλωση τυριών και παγωτών.

Το 2017, η εταιρία Lactalis ανακάλεσε μεγάλες ποσότητες προϊόντων βρεφικού γάλακτος λόγω της πιθανότητας να έχουν μολυνθεί από *Salmonella*. Προϊόντα της εταιρίας αυτής εξάγονταν σε πολλές χώρες όπως την Βρετανία, την Αλγερία, την Ελλάδα, την Κίνα και τη Γεωργία.

### *Yersinia spp*

Το είδος *Y. enterocolitica* είναι το κυριότερο από το γένος *Yersinia spp*, το οποίο έχει συνδεθεί με τροφικές δηλητηριάσεις από γαλακτοκομικά προϊόντα. Ο μικροοργανισμός αυτός είναι αρκετά διαδεδομένος στην φύση, γεγονός που καθιστά την επιμόλυνση των προϊόντων εύκολη, παρ'όλο που καταστρέφεται με την παστερίωση. Επίσης αν η επιμόλυνση γίνει μετά την παστερίωση, ο μικροοργανισμός μπορεί να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί σε συνθήκες ψυγείου.

### *Escherichia coli*

Όσο αφορά την *E.coli*, συνδέεται με περιστατικά κατανάλωσης νοπού γάλακτος ή προϊόντων τα οποία έχουν επιμολυνθεί μετά την παστερίωση. Οι κύριες πηγές επιμόλυνσης μετά την παστερίωση είναι:

- a. Το προσωπικό που εργάζεται στις βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων και έρχεται σε επαφή με τα τρόφιμα.
- b. Το νερό που χρησιμοποιείται και το οποίο μπορεί να έχει μολυνθεί με κόπρανα και
- c. Οι εγκαταστάσεις των βιομηχανιών, οι οποίες δεν καθαρίζονται και δεν απολυμαίνονται σωστά.

Τέλος, οι κίνδυνοι για τα τυριά από απαστερίωτο γάλα είναι αυξημένοι, διότι το στέλεχος *E.coli* 0157:H7 είναι αρκετά ανθεκτικό σε όξινο περιβάλλον.

### *Cronobacter*

Τα τελευταία χρόνια, την επιστημονική κοινότητα έχει απασχολήσει το είδος *Cronobacter sakazakii*, το οποίο ανήκει στο γένος *Cronobacter*. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του είναι η επιβίωση του για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε αφυδατωμένες τροφές και η πολύ εύκολη ανάπτυξη του μετά την ανασύσταση, γιατί έχει απομονωθεί πολλές φορές από βρεφικές σκόνες. Η επιμόλυνση των βρεφικών τροφών σε μορφή σκόνης μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο, κατά την κατασκευή στο εργοστάσιο, πριν από τη διανομή του

προϊόντος στο λιανικό εμπόριο, μετά το πρώτο άνοιγμα του εργοστασιακού περιέκτη από τον χρήστη. σε οποιοδήποτε στάδιο ανασύστασης μέσω της χρήσης μολυσμένου νερού, σκευών, επιφανειών εργασίας, τη στιγμή της σίτισης (π.χ. χρήση μολυσμένων φιαλών). ή λόγω ακατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης (π.χ. κακή ψύξη ή αποθήκευση για πολύ καιρό σε θερμοκρασία δωματίου). Λόγω της ανασύστασης των προϊόντων αυτών με ζεστό νερό μειώνεται σημαντικά το ποσοστό του μικροοργανισμού, πιστεύεται ότι η φάση παρασκευής μετά την παστερίωση είναι η συγκυρία όπου συμβαίνει συχνά επιμόλυνση. Το 2010, δύο περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας σε βρέφη σημειώθηκαν στο Μεξικό. Αυτό οδήγησε σε περαιτέρω έρευνα, καθώς και στον έλεγχο αν οι τροφές αυτές επανυδατώθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες προετοιμασίας του ΟΗΕ για το σπίτι, δηλαδή στους 70 ° C. Το νερό σε αυτή τη θερμοκρασία σκοτώνει τα κύτταρα του *Cronobacter*. Ωστόσο, το νερό που χρησιμοποιήθηκε στο νοσοκομείο ήταν 45 ° C όταν αναμίχθηκε με την σκόνη. Αν και οι εργαζόμενοι στο νοσοκομείο προσπάθησαν να ακολουθήσουν αυτές τις οδηγίες, αυτή η έρευνα διαπίστωσε ότι όταν αναμίχθηκαν, η θερμοκρασία του νερού πιθανότατα είχε πέσει σε ένα επίπεδο που θα επώαζε τα βακτήρια *Cronobacter* αντί να τα σκότωνε. Διαπιστώθηκε επίσης ότι οι εργαζόμενοι από το νοσοκομείο διατηρούσαν συχνά αποθηκευμένο ανασυσταμένο βρεφικό γάλα σε θερμοκρασία δωματίου για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα, ακόμη και σε γεωγραφικές τοποθεσίες με υψηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος.

### **Μικροβιολογικά κριτήρια για την ασφάλεια του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων**

#### **(ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005)**

Στους παρακάτω πίνακες Πίνακα 2.5 και Πίνακας 2.6 δίδονται τα μικροβιολογικά κριτήρια για το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υιοθετηθεί από τη Ε.Ε.. Έχουν οριστεί κριτήρια για τους κυριότερους παθογόνους μικροοργανισμούς με βάση την φύση του προϊόντος και τη δυνατότητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών αυτών.

#### **Πίνακας 2.5: Κριτήρια ασφάλειας για τα τρόφιμα**

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί/οι τοξίνες και οι μεταβολίτες τους	Πλήνο δειγματοληψίας (1)		Όρια (2)		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς (3)	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
		n	c	m	M		

1.11	Τυριά, βούτυρο και κρέμα από νοπό γάλα ή από γάλα που έχει υποστεί επεξεργασία σε θερμοκρασία χαμηλότερη από της παστερίωσης <sup>(10)</sup>	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.12	Γάλα σε σκόνη και ορός γάλακτος σε σκόνη	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.13	Παγωτό <sup>(11)</sup> , εξαιρουμένων των προϊόντων για τα οποία η διαδικασία παρασκευής ή η σύνθεση του προϊόντος θα εξαλείψει τον κίνδυνο σαλμονέλλας	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.22	Παρασκευάσματα για βρέφη σε σκόνη και τρόφιμα που προορίζονται για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς σε σκόνη για βρέφη ηλικίας κάτω των έξι μηνών	<i>Salmonella</i>	30	0	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.23	Παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας σε σκόνη	<i>Salmonella</i>	30	0	Απουσία σε 25 g	EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.24	Παρασκευάσματα για βρέφη σε σκόνη και τρόφιμα που προορίζονται για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς σε σκόνη για βρέφη ηλικίας κάτω των έξι μηνών <sup>(14)</sup>	<i>Cronobacter</i> spp. ( <i>Enterobacter sakazakii</i> )	30	0	Απουσία σε 10 g	ISO/TS 22964	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

## Πίνακας 2.6: Κριτήρια υγιεινής κατά τη διάρκεια της διαδικασίας

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί	Πλάνο δειγματοληψίας <sup>(1)</sup>		Όρια <sup>(2)</sup>		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς <sup>(3)</sup>	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο	Μέτρα σε περίπτωση μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων	
		n	c	m	M				
2.2.1	Παστεριωμένο γάλα και άλλα παστεριωμένα υγρά γαλακτοκομικά προϊόντα <sup>(4)</sup>	Enterobacteriaceae	5	0	10 cfu/ml		ISO 21528-2	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της θερμικής επεξεργασίας και της πρόληψης της επαναμόλυνσης καθώς και της ποιότητας των πρώτων υλών
2.2.2	Τυριά από γάλα ή ορό γάλακτος που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία	<i>E. coli</i> <sup>(5)</sup>	5	2	100 cfu/g	1 000 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής, τη στιγμή κατά την οποία αναμένεται ο μέγιστος αριθμός <i>E. coli</i> <sup>(6)</sup>	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και στην επιλογή των πρώτων υλών
2.2.6	Βούτυρο και κρέμα από νοπό γάλα ή από γάλα που έχει υποστεί επεξεργασία σε θερμοκρασία χαμηλότερη από της παστερίωσης	<i>E. coli</i> <sup>(5)</sup>	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και στην επιλογή των πρώτων υλών
2.2.7	Γάλα σε σκόνη και ορός γάλακτος σε σκόνη <sup>(4)</sup>	Enterobacteriaceae	5	0	10 cfu/g		ISO 21528-2	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της θερμικής επεξεργασίας και πρόληψη της επαναμόλυνσης
2.2.8	Παγωτό <sup>(8)</sup> και κατεψυγμένα επιδόρπια με βάση το γάλα	Enterobacteriaceae	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	ISO 21528-2	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής
2.2.9	Παρασκευάσματα για βρέφη σε σκόνη και τρόφιμα που προορίζονται για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς σε σκόνη για βρέφη ηλικίας κάτω των έξι μηνών	Enterobacteriaceae	10	0	Απουσία σε 10 g		ISO 21528-1	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης <sup>(9)</sup> .
2.2.10	Παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας σε σκόνη	Enterobacteriaceae	5	0	Απουσία σε 10 g		ISO 21528-1	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης

- ❖  $n$  = αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα ·  $c$  = αριθμός μονάδων δειγματοληψίας με τιμές μεταξύ  $m$  και  $M$
- ❖ Τα ανώτερα κριτήρια ισχύουν για τις αναλυτικές διαδικασίες που παραθέτονται στον Κανονισμό

\*Μόνον παγωτά που περιέχουν συστατικά γάλακτος.

## 2.4 Κρέας.

Η μικροβιολογία του νωπού κρέατος έχει ιδιαίτερι ενδιαφέρον τόσο από την άποψη της δημόσιας υγείας και της προστασίας του καταναλωτή όσο και από την άποψη της εμπορίας.

Το νωπό κρέας είναι ένα καλό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών γιατί:

- Περιέχει αφθονία θρεπτικών συστατικών που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων, των ζυμών και των μυκήτων.
- Έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία ( $a_w \sim 0.99$ ).
- Τέλος, η τιμή του pH κυμαίνεται από 5.0-7.0 ,η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών.

Τα σημαντικότερα παθογόνα που συνδέονται με το κρέας, από την οικογένεια των εντεροβακτηριδίων είναι η *Salmonella ssp*, *E.coli* και *Y. enterocolitica*.

### Επιδημιολογικά στοιχεία

#### *Salmonella ssp*

Οι κυριότερες πηγές *Salmonella ssp* είναι το κρέας και τα αυγά πουλερικών.Ένα από τα σοβαρότερα περιστατικά προσβολής από *Salmonella*, με 200 ανθρώπους να ασθενούν ύστερα από κατανάλωση ωμών πριόντων γαλοπούλας, σημειώθηκε στις ΗΠΑ το 2018. Τον Νοέμβριο του 2018 άλλοι 52 άνθρωποι προσβλήθηκαν από Σαλμονέλλωση σε 26 πολιτείες και στην Ουάσινγκτον, ενώ ένας άνθρωπος έχασε την ζωή του στην Καλιφόρνια. Επίσης, η δημόσια υπηρεσία του Καναδά κατέγραψε άλλα 22 κρούσματα από *Salmonella* την ίδια χρονιά.

Μια ακόμη επιδημία Σαλμονέλλωσης από αυγά, το 2016, προήλθε από πτηνοτροφικές μονάδες στην Πολωνία, από όπου τροφοδοτούνται πολλές χώρες.Η επιδημία εξαπλώθηκε σε χώρες όπως η Κύπρος, η Πορτογαλία και η Βουλγαρία.

### Μικροβιολογικά κριτήρια για την ασφάλεια του κρέατος και των προϊόντων κρέατος (ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005)

Στους παρακάτω πίνακες Πίνακα 2.7 και Πίνακας 2.8 δίδονται τα μικροβιολογικά κριτήρια για το κρέας και τα προϊόντα κρέατος που έχουν υιοθετηθεί από τη Ε.Ε.. Έχουν οριστεί κριτήρια

για τους κυριότερους παθογόνους μικροοργανισμούς με βάση την φύση του προϊόντος και τη δυνατότητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών αυτών.

### **Πίνακας 2.7: Κριτήρια ασφάλειας για τα τρόφιμα**

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί/οι τοξίνες και οι μεταβολίτες τους	Πλάνο δειγματοληψίας (1)		Όρια (2)		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς (3)	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
		n	c	m	M		
1.4 Κιμάς και παρασκευάσματα κρέατος που προορίζονται να καταναλωθούν ωμά	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g		EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.5 Κιμάς και παρασκευάσματα κρέατος από κρέας πουλερικών που προορίζονται να καταναλωθούν μαγειρευμένα	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g		EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.6 Κιμάς και παρασκευάσματα κρέατος από κρέας ειδών εκτός από πουλερικά που προορίζονται να καταναλωθούν μαγειρευμένα	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 10 g		EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.7 Μηχανικός διαχωρισμένο κρέας (ΜΔΚ) (9)	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 10 g		EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.8 Προϊόντα κρέατος που προορίζονται να καταναλωθούν ωμά, εξαιρουμένων των προϊόντων για τα οποία η διαδικασία παρασκευής ή η σύνθεση του προϊόντος θα εξαλείψει τον κίνδυνο σαλμονέλλας	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g		EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.9 Προϊόντα κρέατος από κρέας πουλερικών που προορίζονται να καταναλωθούν μαγειρευμένα	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g		EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.10 Ζελατίνη και κολλαγόνο	<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g		EN/ISO 6579	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

### **Πίνακας 2.8: Κριτήρια υγιεινής κατά τη διάρκεια της διαδικασίας**

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί	Πλάνο δειγματοληψίας (1)		Όρια (2)		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς (3)	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο	Μέτρα σε περίπτωση μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων
		n	c	m	M			



2.1.1 Σφάγια βοοειδών, προβάτων, αγών και αλόγων (*)	Μέτρηση αερόβιων αποικιών			μέση ημερήσια λογαριθμική τιμή 3,5 log cfu/cm <sup>2</sup>	μέση ημερήσια λογαριθμική τιμή 5,0 log cfu/cm <sup>2</sup>	ISO 4833	Σφάγια μετά τον καθαρισμό αλλά πριν από την ψύξη	Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή και επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας
	Enterobacteriaceae			μέση ημερήσια λογαριθμική τιμή 1,5 log cfu/cm <sup>2</sup>	μέση ημερήσια λογαριθμική τιμή 2,5 log cfu/cm <sup>2</sup>	ISO 21528-2	Σφάγια μετά τον καθαρισμό αλλά πριν από την ψύξη	Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή και επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας
2.1.2 Σφάγια χοίρων (*)	Μέτρηση αερόβιων αποικιών			μέση ημερήσια λογαριθμική τιμή 4,0 log cfu/cm <sup>2</sup>	μέση ημερήσια λογαριθμική τιμή 5,0 log cfu/cm <sup>2</sup>	ISO 4833	Σφάγια μετά τον καθαρισμό αλλά πριν από την ψύξη	Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή και επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας
	Enterobacteriaceae			μέση ημερήσια λογαριθμική τιμή 2,0 log cfu/cm <sup>2</sup>	μέση ημερήσια λογαριθμική τιμή 3,0 log cfu/cm <sup>2</sup>	ISO 21528-2	Σφάγια μετά τον καθαρισμό αλλά πριν από την ψύξη	Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή και επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας
2.1.3 Σφάγια βοοειδών, προβάτων, αγών και αλόγων	<i>Salmonella</i>	50 (*)	2 (*)	Απουσία στην επιφάνεια που υποβάλλεται σε έλεγχο ανά σφάγιο		EN/ISO 6579	Σφάγια μετά τον καθαρισμό αλλά πριν από την ψύξη	Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή, επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας και της καταγωγής των ζώων
2.1.4 Σφάγια χοίρων	<i>Σαλμονέλια</i>	50 (*)	3 (*)	Απουσία στην επιφάνεια που υποβάλλεται σε έλεγχο ανά σφάγιο		EN/ISO 6579	Σφάγια μετά τον καθαρισμό αλλά πριν από την ψύξη	Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή, επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας και της καταγωγής των ζώων, καθώς και των μέτρων βιοασφάλειας στις εκμεταλλεύσεις καταγωγής
2.1.5 Σφάγια πουλερικών από κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής και από γαλοπούλες	<i>Salmonella</i> spp. (10)	50 (*)	7 (*) Από 1.1.2012, c = 5 για τα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής Από 1.1.2013, c = 5 για τις γαλοπούλες	Απουσία σε 25 g ομαδοποιημένου δείγματος δέρματος λαϊμού		EN/ISO 6579 (για την ανίχνευση)	Σφάγια μετά την ψύξη	Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή και επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας, της καταγωγής των ζώων και των μέτρων βιοασφάλειας στις εκμεταλλεύσεις καταγωγής
2.1.6 Κιμάς	Μέτρηση αερόβιων αποικιών (*)	5	2	5 × 10 <sup>5</sup> cfu/g	5 × 10 <sup>6</sup> cfu/g	ISO 4833	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Βελτίωση στην υγιεινή της παραγωγής καθώς και στην επιλογή ή/και την καταγωγή των πρώτων υλών
	<i>E. coli</i> (*)	5	2	50 cfu/g	500 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Βελτίωση στην υγιεινή της παραγωγής καθώς και στην επιλογή ή/και την καταγωγή των πρώτων υλών
2.1.7 Μηχανικώς διαχωρισμένο κρέας (ΜΔΚ) (*)	Μέτρηση αερόβιων αποικιών	5	2	5 × 10 <sup>5</sup> cfu/g	5 × 10 <sup>6</sup> cfu/g	ISO 4833	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Βελτίωση στην υγιεινή της παραγωγής καθώς και στην επιλογή ή/και την καταγωγή των πρώτων υλών
	<i>E. coli</i> (*)	5	2	50 cfu/g	500 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Βελτίωση στην υγιεινή της παραγωγής καθώς και στην επιλογή ή/και την καταγωγή των πρώτων υλών
2.1.8 Παρασκευάσματα κρέατος	<i>E. coli</i> (*)	5	2	500 cfu/g ή cm <sup>2</sup>	5 000 cfu/g ή cm <sup>2</sup>	ISO 16649-1 ή 2	Τέλος της διαδικασίας παρασκευής	Βελτίωση στην υγιεινή της παραγωγής καθώς και στην επιλογή ή/και την καταγωγή των πρώτων υλών

✦ n= αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα: c = αριθμός μονάδων δειγματοληψίας με τιμές μεταξύ n και M

✦ Τα παραπάνω κριτήρια ισχύουν για τις αναλυτικές διαδικασίες που αναφέρονται στον Κανονισμό

\* Τα όρια (n και M) ισχύουν μόνο για δείγματα που λαμβάνονται με την καταστρεπτική μέθοδο. Η μέση ημερήσια λογαριθμική τιμή υπολογίζεται λαμβάνοντας πρώτα τη λογαριθμική τιμή του κάθε επιμέρους αποτελέσματος δοκιμής και στη συνέχεια υπολογίζοντας τη μέση τιμή των εν λόγω λογαριθμικών τιμών.

## 2.5 Μέθοδοι ανίχνευσης των εντεροβακτηρίων στα τρόφιμα

Οι σύγχρονες τάσεις στο τομέα της τεχνολογίας τροφίμων απαιτούν τη διασφάλιση της υγιεινής και της ποιότητας αυτών. Ο κανονισμός προβλέπει την θέσπιση μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα καθώς και την υποχρεωτική εργαστηριακή ανάλυση των τροφίμων σε κάθε εταιρία τροφίμων. Εκτός από τον κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, η μη έγκαιρη ανίχνευση μικροοργανισμών μπορεί επίσης να έχει σημαντικές οικονομικές συνέπειες λόγω της ανάκλησης προϊόντων. Ειδικά στα ευαίσθητα προϊόντα, η ταχεία ανίχνευση της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών θεωρείται απαραίτητη, διότι σε αυτή την περίπτωση, η διανομή και η εμπορία εξαρτώνται άμεσα από αυτό.

Αν και οι παραδοσιακές μικροβιολογικές μέθοδοι για τον έλεγχο της ποιότητας των τροφίμων εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα, χρειάζεται πολύς χρόνος για να ολοκληρωθούν και να επαναληφθούν τα βήματα εμπλουτισμού δειγμάτων. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, αντικαταστάθηκαν από «γρήγορες» τεχνικές, οι οποίες παρέχουν αποτελέσματα σε λεπτά ή ώρες, ενώ παράλληλα έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι μπορούν να χωριστούν σε: **α) ανοσολογικές, β) μοριακές και γ) στα βιοχημικά kits ταυτοποίησης** των μικροοργανισμών και σε εξειδικευμένα υποστρώματα και μέσα.

### 2.5.1 Μικροβιολογικές μέθοδοι

Βήματα για την ανίχνευση μικροβίων: **α) προεμπλουτισμός** των δειγμάτων σε ένα μη εκλεκτικό μέσο για την διόρθωση των τραυματισμένων κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους, **β) εμπλουτισμό σε ένα εκλεκτικό μέσο**, εφόσον πρόκειται να αυξηθούν τα επίπεδα του οργανισμού-στόχου και παράλληλα να διακοπεί η ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιούνται ως εκλεκτικό παράγοντα, τα αντιβιοτικά, οι χρωστικές, τα απορρυπαντικά, τα ανόργανα και οργανικά χημικά, **γ) επίστρωση σε στερεά διαφορικά μέσα**, τα οποία συνήθως περιέχουν και εκλεκτικούς παράγοντες και **δ) εφαρμογή βιοχημικών, ορολογικών ή μοριακών τεστ** για την ταυτοποίηση και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των στελεχών.

Συγκεκριμένα για την *Salmonella* χρησιμοποιούνται τα συγκεκριμένα βήματα, τα οποία συνιστώνται από τους οργανισμούς ISO, AOACI, USDA και FDA. Το κύριο χρησιμοποιούμενο **υπόστρωμα Lactose Broth** (Ζωμός Λακτόζης). Επιπλέον, διάφορες επιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να προστεθούν στο μέσο προεμπλουτισμού για να

διευκολυνθεί η ανάκτηση των στελεχών *Salmonella* από τρόφιμα με υψηλή συγκέντρωση λίπους, ενώ οι θερμοκρασίες επώασης είναι συνήθως 35-37 οC για 18-24 h. Τα 3 εκλεκτικά μέσα που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι: **το Rappaport Vassiliadis (RV)**, **το Selenite cystine (SC)** και **το τετραθειονικό (TT)**. Το καθένα μέσο περιέχει διάφορους εκλεκτικούς παράγοντες. Τις περισσότερες φορές, χρησιμοποιούνται 2 εκλεκτικά μέσα, ενώ για τρόφιμα, με υψηλό ποσοστό μικροβίων, η εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών βοηθάει την ανάκτηση της *Salmonella* από τα τρόφιμα. Η επίστρωση γίνεται σε τριβλία που περιέχουν εκλεκτικούς παράγοντες, πηγή άνθρακα, πρωτεϊνών, μία χρωστικήδείκτη, ένα δείκτη υδροθείου και ανόργανα άλατα. Τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα μέσα είναι τα: **xylose lysine desoxycholate (XLD)**, **hektoen enteric agar (HE)**, **xylose lysine tergitol (XLT-4)**, **bismuth sulphate agar (BS)**, **brilliant green agar (BG)**. Επίσης, για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των στελεχών *Salmonella* τα πιο συνηθισμένα μέσα άγαρ είναι: **το TSI (Triple Sugar Iron)** και **το LI (Lysine Iron Agar)**. Στην φάση επιβεβαίωσης και ταυτοποίησης οι βιοχημικές δοκιμές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του γένους *Salmonella* είναι:

- a) **Δοκιμή παραγωγής οξέος** (από την αποικοδόμηση της γλυκόζης) /αποτέλεσμα θετικό
- b) **Δοκιμή παραγωγής αερίου** (από την αποικοδόμηση της γλυκόζης)/ αποτέλεσμα θετικό
- c) **Δοκιμή παραγωγής υδροθείου** /αποτέλεσμα θετικό
- d) **Δοκιμή αποικοδόμησης της λακτόζης**/ αποτέλεσμα αρνητικό
- e) **Δοκιμή αποικοδόμησης σακχαρόζης** / αποτέλεσμα αρνητικό
- f) **Δοκιμή διάσπασης της ουρίας**/ αποτέλεσμα αρνητικό
- g) **Δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της λυσίνης**/ αποτέλεσμα θετικό
- h) **Αντίδραση β-γαλακτοσιδάσης**/ αποτέλεσμα αρνητικό
- i) **Δοκιμή Voges – Proskauer**/ αποτέλεσμα αρνητικό

Τέλος, τα στελέχη μπορούν να χαρακτηριστούν ορολογικά, προσδιορίζοντας την αντιγονική τους σύσταση μέσω ανοσοσυγκόλλησης με τους αντίστοιχους ορούς, με **αντι- O ορό**, **αντι- Vi ορό** και **αντι- H ορό**. Τα αποτελέσματα των ορολογικών δοκιμών θεωρούνται θετικά αν παρατηρηθεί οροσυγκόλληση. Μόνο οι καλλιέργειες που έδωσαν, τα χαρακτηριστικά για τις σαλμονέλλες βιοχημικά αποτελέσματα μαζί με θετικό αποτέλεσμα στις ορολογικές δοκιμές, θεωρούνται σαλμονέλλες.

### **2.5.2 Βιοχημικές μέθοδοι**

Τα τελευταία χρόνια για τον γρήγορο βιοχημικό χαρακτηρισμό των στελεχών χρησιμοποιούνται διαγνωστικές δοκιμασίες που υπάρχουν στο εμπόριο και έχουν υψηλά επίπεδα ακρίβειας.

Assay name	Format	Manufacturer	Target bacteria
API <sup>®</sup>	Biochemical	bioMérieux	<i>Enterobacteriaceae, Listeria, Staphylococcus, Campylobacter, nonfermenting bacteria, anaerobic bacteria</i>
Micro-ID <sup>®</sup>	Biochemical	REMEL	<i>Enterobacteriaceae, Listeria</i>
Enterotube II	Biochemical	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae</i>
BBL Crystal	Biochemical	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, nonfermenting bacteria, anaerobic bacteria</i>

Πίνακας 2.9 Βιοχημικές δοκιμές ταυτοποίησης παθογόνων στα τρόφιμα (Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007).

Παράδειγμα για την ανίχνευση της *Salmonella* χρησιμοποιούνται το **API20E**, στο οποίο περιέχονται 20 κύριες βιοχημικές δοκιμασίες, το EnterotubeII που περιέχει 12 βιοχημικές δοκιμασίες και το MICRO-ID που περιέχει 15 βιοχημικές δοκιμασίες απαραίτητες για τη διάκριση των στελεχών της οικογένειας *Enterobacteriaceae*.

Επιπλέον, στο εμπόριο υπάρχουν και εκλεκτικά θρεπτικά υλικά που περιέχουν χρωμογόνα ή φθορίζοντα υποστρώματα, βοηθώντας την ανίχνευση και την καταμέτρηση των παθογόνων βακτηρίων. Παράδειγμα είναι το υλικό που περιέχει το φθορίζον **υπόστρωμα MUG**, το οποίο υδρολύεται από το ένζυμο β-γλυκουρονιδάση (GUD), απελευθερώνοντας ένα φθορίζον προϊόν το οποίο ανιχνεύεται με UV μέσα σε 4-24 ώρες. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται αποτελεσματικά για την ανίχνευση της *E. Coli*, *Salmonella* και *Shigella*

Επίσης, η **καταμέτρηση των επιπέδων του ATP** με τη βοήθεια του ενζύμου λουσιφεράση είναι ένας χρήσιμος δείκτης για τον έλεγχο της ύπαρξης βακτηρίων στα τρόφιμα. Στο εμπόριο υπάρχουν πολλά kit για την μέτρηση των επιπέδων του ATP, ενώ δεν χρειάζονται κάποιο στάδιο εμπλουτισμού και χρειάζεται μόνο λίγα λεπτά για τα αποτελέσματα. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί οι οποίοι είναι το pH, η θερμοκρασία και η παρουσία αναστολέων της λουσιφεράσης.

Τέλος, για την καταμέτρηση και την ταυτοποίηση της *Salmonella*, των κολοβακτηριδίων και της *E. coli O157:H7* εφαρμόζεται η **τεχνική HGMF (ISO-grid, Hydrophobic Grid Membrane Filter)**. Τα δείγματα τροφίμων φιλτράρονται για την απομάκρυνση σωματιδίων και συγκρατείται ο μικροοργανισμός στόχος για να τοποθετηθεί στο κατάλληλο άγαρ.

### 2.5.3 Μοριακές μέθοδοι

Οι μοριακές τεχνικές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα έχουν κάνει επανάσταση στην τεχνολογία τροφίμων διότι βασίζονται στις ανακαλύψεις της μοριακής βιολογίας. Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα: **i) οι μέθοδοι υβριδισμού και ii) η PCR.** Ως στόχος των μοριακών μεθόδων επιλέγονται γονίδια που έχουν να κάνουν με την μολυσματικότητα, που σχετίζονται με μολυσματικά πλασμίδια, όπως στην περίπτωση του *Y. Enterocolitica*, γονίδια που κωδικοποιούν ειδικά ένζυμα, αλλά και γονίδια που κωδικοποιούν εξωτερικές μεμβρανικές αντιγονικές ή βλεφαριδικές πρωτεΐνες. Τέλος, η χρήση αλληλουχιών με υψηλό αριθμό αντιγράφων έχουν μεγάλη ευαισθησία ανίχνευσης.

#### **A. Μέθοδοι υβριδισμού**

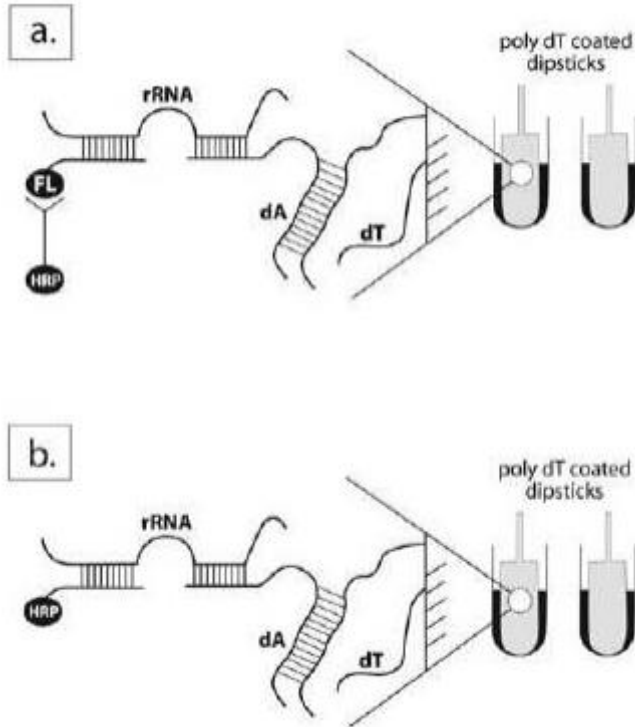
Οι κύριες μέθοδοι υβριδισμού με ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα περιλαμβάνουν: **i) Υβριδοποίηση αποικιών (colony hybridization), ii) υβριδισμός με αντικατάσταση αλυσίδας και iii) sandwich υβριδισμός.**

**i) Υβριδοποίηση αποικιών (Colony hybridization):** Τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται σε τριβλία και μεταφέρονται σε μεμβράνη nylon. Στην συνέχεια, υποβάλλονται σε αλκαλική ή θερμική επεξεργασία ή σε ακτινοβολία, για να λυθούν τα κύτταρα και να γίνει η αποδιαταξή του DNA. Έπειτα, το μονόκλωνο DNA συγκρτεείται στη μεμβράνη μέσω χρήσης UV ή θέρμανσης και τέλος προστίθεται ο σημασμένος με ραδιοϊσότοπα ή με διγοξυγενίνη ή βιοτίνη ιχνηθέτης. Τέλος με την βοήθεια του DNA-στόχου γίνεται ο υβριδισμός και γίνεται η ανίχνευση.

**ii) Υβριδισμός με αντικατάσταση αλυσίδας:** Ένας ιχνηθέτης σύλληψης ο οποίος έχει αλληλουχία συμπληρωματική της αλληλουχίας-στόχου δεσμεύεται σε μία στερεή επιφάνεια και ένας σημασμένος μικρού μεγέθους ιχνηθέτης υβριδίζεται με αυτόν.

**iii) Sandwich υβριδισμός:** Γίνεται εμπλουτισμός των δειγμάτων τροφίμων, λύση των βακτηριακών κυττάρων, απελευθέρωση του rRNA και προσθήκη των ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών. Την ίδια στιγμή εισάγεται και μία πλαστική στερεή φάση dipstick, η οποία φέρει polydT, ώστε να δεσμεύεται με την polyA ουρά του capture probe. Ο μη δεσμευμένος ιχνηθέτης απομακρύνεται με ξέπλυμα και η στερεή φάση τοποθετείται σε διάλυμα που περιέχει αντιφλουορεσκεΐνη-HRP. Ακολουθεί ξέπλυμα και προσθήκη του υποστρώματος για την

χρωματομετρική ανίχνευση. Το εμπορικά διαθέσιμο kit GENE-TRAK 2ης γενιάς βασίζεται ακριβώς στην τεχνική sandwich υβριδισμού και στην ενζυμο-μεσολαβούμενη χρωματομετρική ανίχνευση.



Εικόνα 1: Sandwich υβριδισμός: a) Έμμεσο σύστημα ανίχνευσης χρησιμοποιώντας το σύμπλοκο αντι-φλουορεσκεΐνη-HRP, b) Απευθείας ανίχνευση με τη χρήση τεχνητέτη σημασμένου με HRP στο 5' άκρο του (Mozola M.A. 2006)

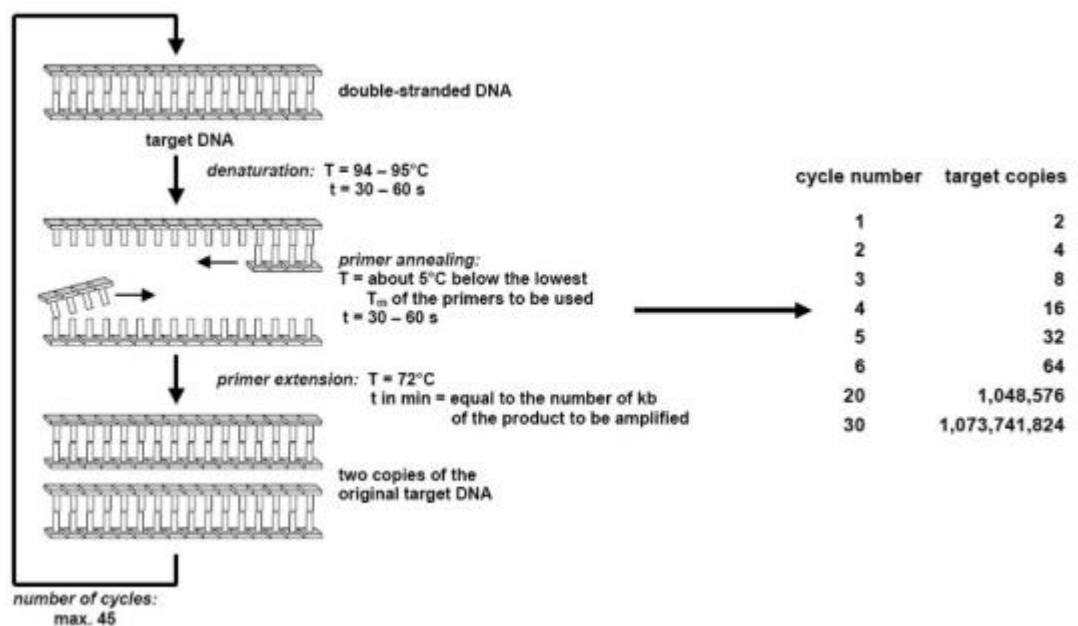
Όλες οι μέθοδοι υβριδισμού απαιτούν τον προεμπλουτισμό των δειγμάτων και τα αποτελεσμά τους δίνονται μετά από ~42-48 h. Το GENETRAK έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων, όπως τα *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, *Campylobacter* και *Y. enterocolitica*. Ενδεικτικά, έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της *Salmonella* σε 1100 δείγματα τροφίμων, καταφέροντας 97,7% ευαισθησία και 100% εξειδίκευση.

## B. Μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος αυτή είναι μια από τις πιο πρόσφατες και επαναστατικές τεχνικές του DNA. Γενικότερα, η PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για την ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών στο τελευταίο στάδιο των μικροβιολογικών μεθόδων, είτε για την ανίχνευση των βακτηρίων στα τρόφιμα απευθείας ή μετά από επώαση των δειγμάτων σε ένα κατάλληλο μέσο εμπλουτισμού. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιέχει 25-35 κύκλους ο καθένας εκ των οποίων

περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε διαφορετικές θερμοκρασίες με βάση τα ακόλουθα στάδια:

- 1. Αποδιάταξη (Denaturation):** Στους 95°C, το δείγμα θερμαίνεται για 5 min, για να αποδιαταχθούν τα δίκλιωνα μόρια DNA και να δημιουργηθούν οι μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν στους εκκινητές.
- 2. Υβριδοποίηση (Annealing):** Με την θερμοκρασία να μειώνεται στους 50-65 °C, οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA. Ανάλογα με τις αλληλουχίες, οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι που εφαρμόζονται διαφοροποιούνται.
- 3. Επέκταση (Extension):** Η θερμοκρασία είναι 72 °C, η οποία είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση, έτσι ώστε να εκτελεστεί η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο χρόνος επώασης εξαρτάται από το μήκος του DNA –στόχου. Τέλος, για να δοθεί χρόνος στην πολυμεράση να ολοκληρώσει την προέκταση όλων των προϊόντων, ο χρόνος προέκτασης του τελικού κύκλου διαρκεί 10min. Το τελικό αποτέλεσμα μίας αντίδρασης PCR μετά από n κύκλους είναι η παραγωγή θεωρητικά 2n δίκλωνων μορίων DNA που είναι πιστά αντίγραφα της αλληλουχίας DNA που περικλείεται μεταξύ των εκκινητών



Εικόνα 2: Polymerase Chain Reaction (PCR)

Η ηλεκτροφόρηση είναι ο πιο απλός τρόπος προσδιορισμού των προϊόντων της PCR, η συγκεντρωσή της έχει να κάνει με το μέγεθος του DNA-στόχου

Η PCR έχει υψηλή ευαισθησία, η οποία καθορίζεται από τις συνθήκες αντίδρασης, τη σύσταση των τροφίμων και τη μέθοδο ανίχνευσης των PCR-προϊόντων και υψηλότερη εξειδίκευση, η οποία εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητικών μορίων και τη θερμοκρασία υβριδισμού, σε σχέση με τις μικροβιολογικές μεθόδους.

Step of analysis	Microbiology	PCR
Enrichment	Non-selective pre-enrichment in liquid media (16–20 h) followed by selective enrichment in liquid media (24–48 h) or rapid enrichment (16 h, some methods only)	Rapid enrichment (16 h)
Isolation/identification	Isolation of bacterial colonies on selective solid media (24 h) followed by identification by biochemical tests (24–48 h)	Sample purification, target amplification and detection (8 h)
Result	After 3–6 days	After 24 h

Πίνακας 2.10: Σύγκριση των μικροβιολογικών μεθόδων και της PCR για την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα (Robinson R.K. et al. 1999).

Η μέθοδος PCR επιτρέπει την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων απευθείας στα τρόφιμα ή μετά από εμπλουτισμό και δίνει αποτελέσματα μέσα σε 12-14 ώρες. Εφαρμόστηκε με μεγάλη επιτυχία στην ανίχνευση πολλών μικροοργανισμών όπως η *E. Coli*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*

## Κεφάλαιο 3:

### Ανθεκτικότητα των Εντεροβακτηρίων στα Αντιβιοτικά

#### 3.1 Αντιβιοτικά

##### 3.1.1 Ορισμός

Τα αντιβιοτικά ή αντιμικροβιακά φάρμακα είναι ουσίες που δρουν σε ζωντανούς μικροοργανισμούς, συγκεκριμένα βακτήρια, μύκητες, ιούς και παράσιτα και προκαλούν τη θανάτωσή τους ή ακόμη και την αναστολή της ανάπτυξής τους. Σκοπός τους είναι η θεραπεία των ανθρώπων, των ζώων, ακόμα και των φυτών από λοιμώξεις. Κάθε αντιβιοτικό έχει ένα



περιορισμένο και καλά καθορισμένο εύρος δράσης. Τα αντιμικροβιακά φάρμακα, ανάλογα τη δράση τους, διακρίνονται μεταξύ άλλων σε:

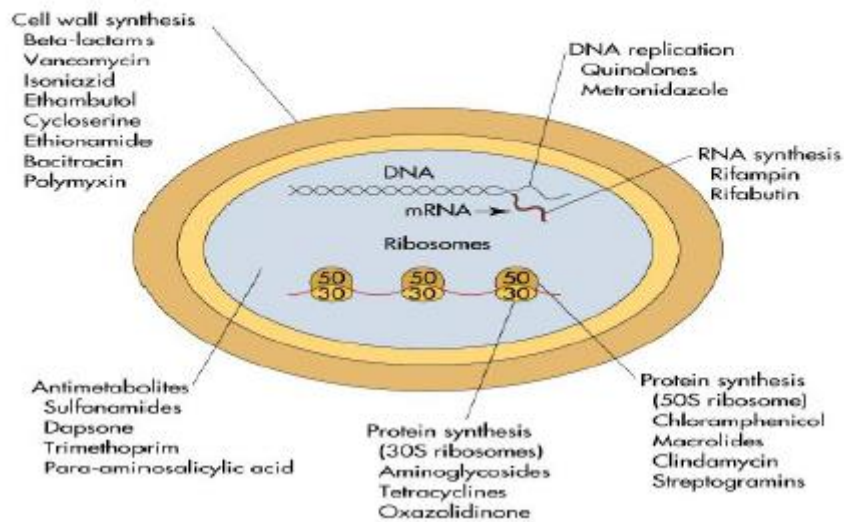
- Αντιβακτηριακά : Δρουν ενάντια σε λοιμώξεις που προκαλούν τα βακτήρια και συχνά δηλώνονται με τον όρο αντιβιοτικά.
- Αντιμυκοβακτηριακά : Αντιβακτηριακά με εξειδικευμένη δράση για την αντιμετώπιση μυκοβακτηριακών λοιμώξεων, όπως της φυματίωσης .
- Αντικατά: Αντιμετωπίζουν τις λοιμώξεις που οφείλονται σε ιούς, όπως ο ιός της γρίπης, ο ιός του έρπητα ή το HIV.
- Αντιπαρασιτικά : Χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση των παρασιτικών λοιμώξεων όπως για παράδειγμα η ελονοσία.

### **3.1.2 Δράση Αντιβιοτικών**

Τα αντιβακτηριακά αντιβιοτικά μπορούν να χωριστούν σε αντιβιοτικά "στενού φάσματος" με βάση τις επιδράσεις τους, τα οποία στοχεύουν συγκεκριμένους τύπους βακτηρίων, όπως gram-θετικά ή gram-αρνητικά βακτήρια, ενώ τα αντιβιοτικά ευρέως φάσματος επηρεάζουν ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων. Η αποτελεσματικότητα των μεμονωμένων αντιβιοτικών ποικίλλει ανάλογα με το σημείο μόλυνσης, την ικανότητα του αντιβιοτικού να φτάσει στο σημείο της λοίμωξης και την ικανότητα αδρανοποίησης ή καταστροφής των βακτηρίων από το αντιβιοτικό. Ορισμένα αντιβιοτικά σκοτώνουν τα βακτήρια, καταστρέφουν ορισμένα μέρη τους, όπως τις μεμβράνες και τα κυτταρικά τοιχώματά τους, ή επηρεάζουν τον αναπνευστικό τους κύκλο, ενώ άλλα εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων.

**Κύριοι μηχανισμοί δράσεις (Βιολογικός στόχος των αντιβιοτικών).** Ο βιολογικός στόχος εξαρτάται από τον μηχανισμό με τον οποίο δρα ένα αντιβιοτικό στο βακτηριακό κύτταρο.

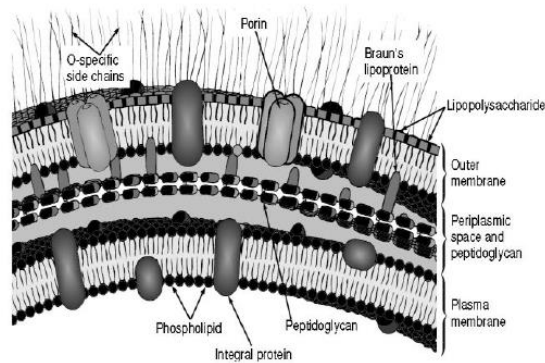
## ΣΤΟΧΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ



Έτσι, σε επίπεδο κυττάρου, ένα αντιμικροβιακό φάρμακο μπορεί να συμμετάσχει στην:

- i. **Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος:** Τα αντιβιοτικά αυτά παρεμβαίνουν στην σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και εμφανίζουν εκλεκτική τοξικότητα γιατί το κύτταρο του ξενιστή (ευκαρυωτικό κύτταρο) δεν έχει κυτταρικό τοίχωμα.

Τα βακτήρια διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται το μουκοπεπτίδιο το 50-90% του ξηρού βάρους του κυτταρικού τοιχώματος στα Gram-θετικά βακτήρια και το 5-10% του κυτταρικού τοιχώματος στα Gram-αρνητικά βακτήρια (μυρεινή). Σε όλα τα βακτήρια η παρουσία του μουκοπεπτιδίου είναι στενά συνυφασμένη με την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Το μουκοπεπτίδιο συντίθεται σε τρία στάδια. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες) η βανκομυκίνη, η νοβοβοκίνη, η βακιτρακίνη και η κυκλοσερίνη δρουν σε διάφορα στάδια βιοσυνθέσεως αυτού του κυτταρικού τοιχώματος. Η κυκλοσερίνη προσβάλλει το πρώτο στάδιο συνθέσεως εμποδίζοντας το σχηματισμό D-αλανίνης από την L-σερίνη. Αντίθετα οι πενικιλίνες και οι κεφαλοσπορίνες δρουν στο τελευταίο στάδιο. Αναστέλλουν την γεφύρωση των πεπτιδικών αλύσεων των προσαρτημένων στο μουραμικό οξύ, λόγω του ότι είναι ουσίες παρόμοιας χημικής σύστασης με το διπεπτίδιο της D-αλανίνης. Έτσι, τα βακτήρια χάνουν την ωσμωτική προστασία που τους παρέχει το κυτταρικό τους τοίχωμα, το οποίο δεν σχηματίζεται, και απορροφούν νερό από το περιβάλλον και λύνονται.

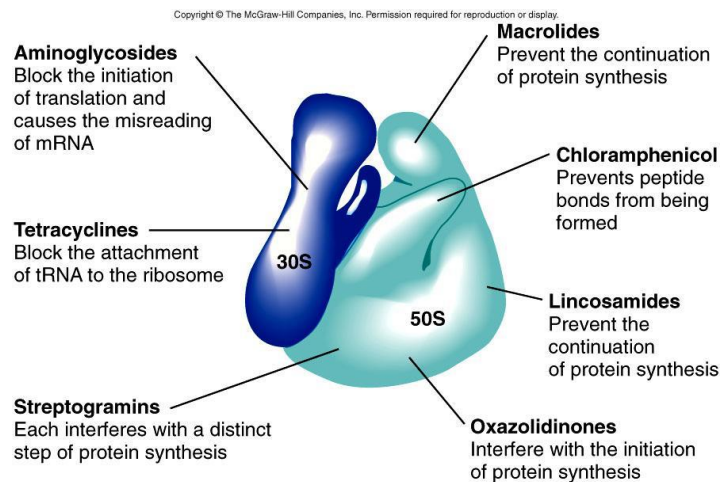


**ii. Αλλαγή στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης.** Η διαταραχή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί στην καταστροφή του μικροβιακού κυττάρου, καθώς η κυτταρική μεμβράνη ελέγχει τη διαβίβαση διαφόρων μορίων από και προς το κυτταρόπλασμα μέσω της παθητικής διάχυσης και της ενεργού μεταφοράς. Η λειτουργία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι σπουδαία για την μεταφορά στο κύτταρο των απαραίτητων ουσιών και για την αναστολή της εισόδου των βλαβερών ουσιών. Η πολυμυξίνη και η κολιστίνη διαφοροποιούν τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης, και ενώνονται μόνο με την κυτταρική μεμβράνη του μικροοργανισμού και όχι του κυττάρου ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, εισέρχονται μεταξύ των λιπιδίων και των πρωτεϊνικών συστατικών της μεμβράνης και την παραμορφώνουν με συνέπεια ζωτικοί μεταβολίτες να εξέρχονται του κυττάρου με αποτέλεσμα τον θάνατό του δηλαδή προκαλείται μετατροπή στη διαπερατότητα της μεμβράνης σε βαθμό που δεν μπορούν να επιβιώσουν τα βακτήρια. Η δράση τους περιορίζεται σε Gram-αρνητικά βακτήρια και φαίνεται ότι η ευαισθησία αυτών σχετίζεται με το ποσό των φωσφολιπιδίων που περιέχουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη τους. Άλλα αντιπροσωπευτικά φάρμακα είναι η τυροτριχίνη, η νυστατίνη και η αμφοτερικίνη Β.

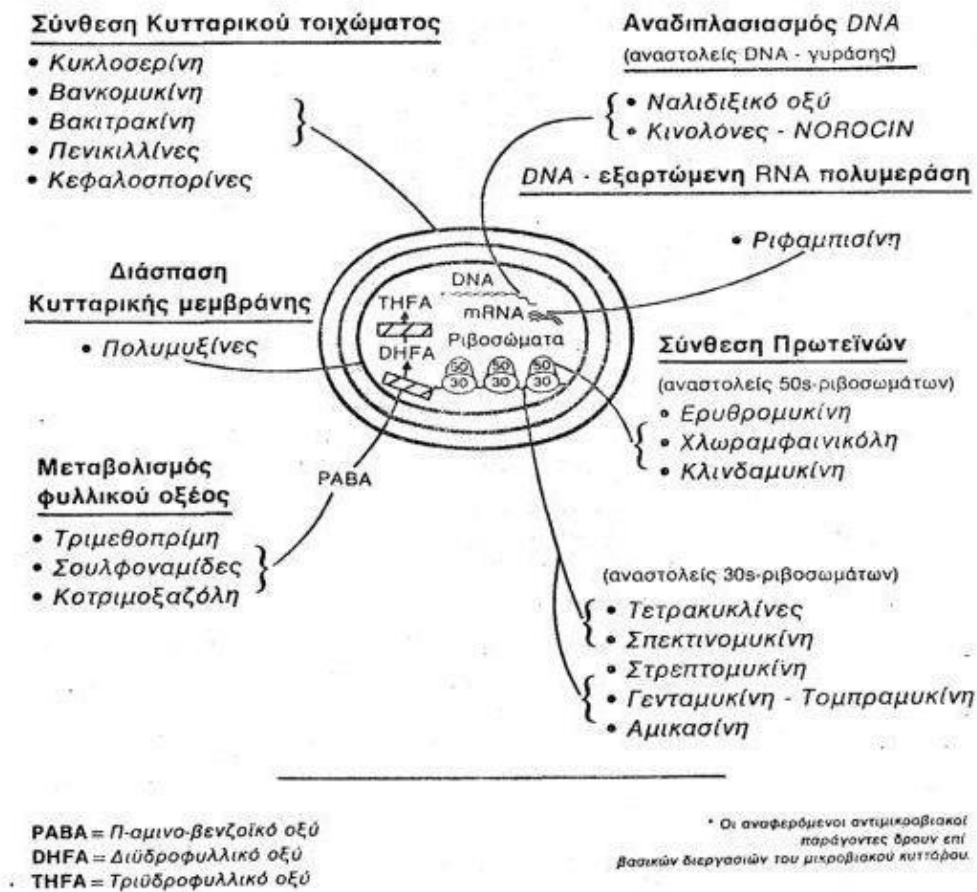
**iii. Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης:** Σταματούν την πρωτεϊνοσύνθεση μέσα στο κύτταρο είτε εμποδίζουν τη σύνθεση του RNA ή του DNA, είτε δρουν στα ριβοσώματα και αναστέλλουν εκεί την πρωτεϊνική σύνθεση.

Πιο συγκεκριμένα, οι αμινογλυκοσίδες διασπούν τον φυσιολογικό κύκλο της ριβοσωματικής λειτουργίας επεμβαίνοντας τουλάχιστον μερικώς στα πρώτα βήματα της πρωτεϊνικής σύνθεσης που συμβαίνει στο ριβόσωμα. Μη φυσιολογικά συμπλέγματα ουσιών γνωστών ως μονοσώματα της στρεπτομυκίνης αθροίζονται τότε εντός του κυττάρου. Οι αμινογλυκοσίδες επίσης προκαλούν λανθασμένη ανάγνωση γενετικών πληροφοριών που τις μεταφέρει το mRNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση λανθασμένων πρωτεϊνών και καταλήγει στο θάνατο του κυττάρου.

Η δράση των τετρακυκλινών είναι το βακτηριακό ριβόσωμα. Όταν οι τετρακυκλίνες φτάσουν εντός του κυττάρου αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση σαν τις αμινογλυκοσίδες. Κατά αυτόν τον τρόπο εμποδίζουν το ακετυλ-transfer-RNA να φτάσει στη θέση υποδοχής που βρίσκεται στο σύμπλεγμα mRNA ριβόσωμα. Ως αποτέλεσμα εμποδίζεται η περαιτέρω επιμήκυνση της πρωτεϊνικής αλυσίδας



- iv. **Αναστολή σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων:** Τα αντιβιοτικά αυτά εμποδίζουν ουσιώδες μεταβολικές λειτουργίες μέσα στο κυτταρόπλασμα των μικροβίων (σουλφοναμίδες). Εμφανίζουν εκλεκτική τοξικότητα γιατί η μεταβολική διεργασία που αναστέλλεται είναι ουσιώδης μόνο για το μικροοργανισμό και όχι το ξενιστή.
- v. **Μεταβολισμός φυλλικού οξέος .** Οι σουλφοναμίδες αναστέλλουν την διυδροφυλλικής συνθέτασης και σταματούν την σύνθεση του φυλλικού οξέος. Είναι ανταγωνιστές του παρα-αμινοβενζοϊκού οξέος, το οποίο αποτελεί βασικό μεταβολίτη των μικροβίων, καθώς είναι απαραίτητο για τη σύνθεση φυλλικού οξέος. Ο μικροοργανισμός εξαντλεί τα αποθέματα του σε φυλλικό οξύ κατά τη διαίρεση του και το μεταβολισμό και τέλος παύει να πολλαπλασιάζεται .



Η δράση των αντιβιοτικών στο μικροβιακό κύτταρο

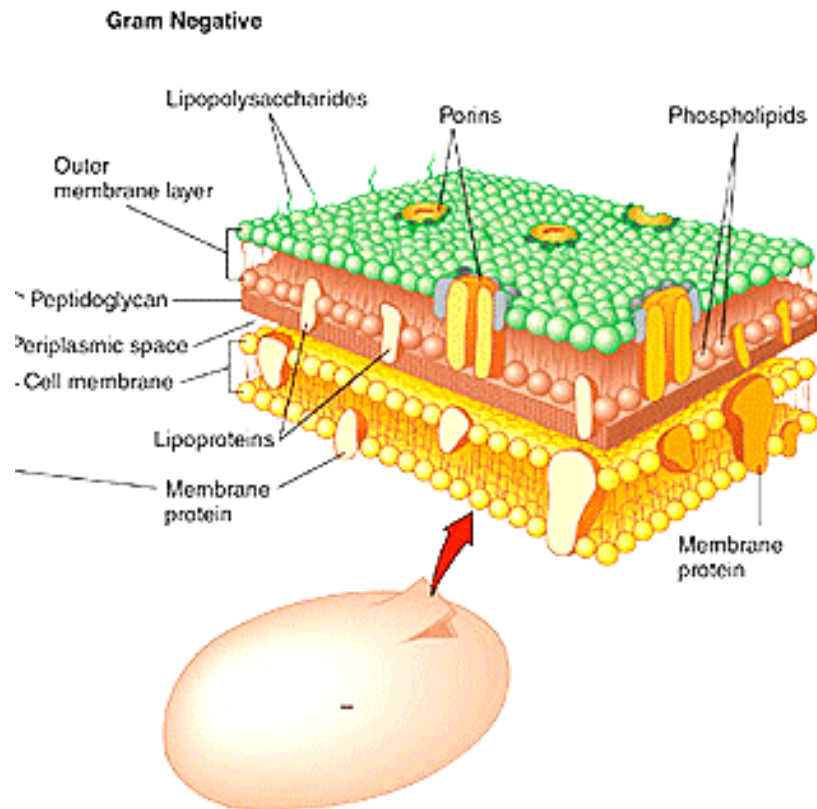
### 3.1.3 Κυριότερες Κατηγορίες Αντιβιοτικών

Κάθε κατηγορία αντιβιοτικών είναι μία ομάδα φαρμάκων, που έχουν παρόμοιες χημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες. οι κυριότερες κατηγορίες αντιβιοτικών είναι:

**β- ΛΑΚΤΑΜΕΣ.** Οι β-λακτάμες χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες: τις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες. Χρησιμοποιούνται ευρέως και είναι από τις πιο παλιές κατηγορίες αντιβιοτικών.

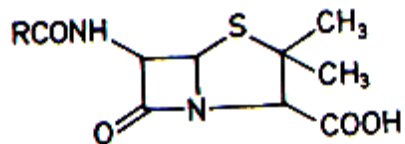
**Μηχανισμός δράσης :** Από τον προηγούμενο αιώνα ήταν γνωστό ότι τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά παρεμβαίνουν στην διαμόρφωση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί βασικό δομικό στοιχείο του βακτηριακού κυττάρου, που προστατεύει την κυτταροπλασματική μεμβράνη από ωσμωτική ρήξη. Είναι κατασκευασμένο από πολυμερές πεπτιδογλυκάνη (PG), το οποίο αποτελείται από μόρια γλυκάνης που σχηματίζουν αλυσίδες με πεπτίδια συνδεδεμένα μεταξύ τους. Το

πεπτίδιο συνδέεται με την παρακείμενη αλυσίδα γλυκάνη για να σχηματίσει την κύρια δομή του κυτταρικού τοιχώματος. Η β-λακτάμη διαταράσσει τη βιογένεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (PG) απενεργοποιώντας τα ένζυμα PBPs.

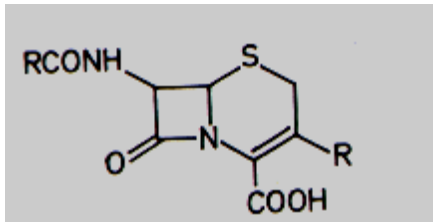


### 3.1.4 β-Λακταμικά Αντιβιοτικά

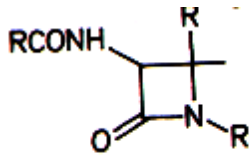
#### 1. Πενικιλίνες



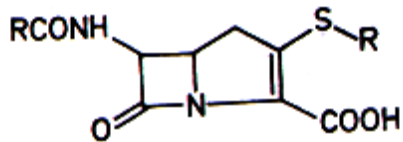
#### 2. Κεφαλοσπορίνες



### 3. Μονοβακτάμες



### 4. Καρβαπενέμες



#### 3.1.4.1 Πενικιλίνες

Οι πενικιλίνες είναι περισσότερο δραστικά αντιβιοτικά και λιγότερο τοξικά. Οι κύριοι μικροοργανισμοί που δρούν οι πενικιλίνες είναι:

- Gram θετικών κόκκων, δυνητικώς αναερόβιων
- Gram θετικά βακτηρίδια
- Αυστηρώς αναερόβιων κόκκων
- Gram αρνητικών κόκκων

Οι πενικιλίνες δρούν αναστέλλοντας την σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, η οποία είναι απαραίτητο συστατικό για το μικροβιακό τοίχωμα. Η δράση των αντιβιοτικών αυτών εξαρτάται από την συνδεσή τους με τις δεσμευτικές πρωτεΐνες των πενικιλινών, οι οποίες είναι ένζυμα που εδρεύουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

Οι πενικιλίνες θα μπορούσαν να χωριστούν σε τέσσερις υποκατηγορίες:

1. **Φυσικές πενικιλίνες:** η δράση τους είναι ευρεία καθώς χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση τόσο Gram- θετικών όσο και Gram-αρνητικών βακτηρίων όπως στρεπτόκοκκοι, πνευμονιόκοκκοι, εντερόκοκκοι και μηνιγγιτιδόκοκκοι επεκτείνεται όμως και στις σπειροχαίτες αλλά και εναντίον πολλών αναερόβιων όπως οι πεπτοστρεπτόκοκκοι, τα κλωστρίδια και οι ακτινομύκητες.

#### Gram-θετικά

- *Streptococcus spp*
- *S. aureus* (συχνή αντοχή)
- *S. pneumoniae* (αντοχή)
- *Enterococcus spp*
- *Corynebacterium diphtheriae*

- *Listeria monocytogenes*

- *Bacillus anthracis*

#### Gram-αρνητικά

- *Neisseria spp*
- *Moraxella catarrhalis* (ανθεκτικά)

#### Αναερόβια

- Πεπτοστρεπτόκοκκος
- Πεπτόκοκκος
- *Fusobacterium*
- *Bacteroides spp*
- *Clostridium spp*

#### Σπειροχαίτες

- *Treponema pallidum*
- *Borrelia spp*
- *Lepstospira spp*
- *Spirillum minus*

#### Αντιμικροβικό φάσμα πενικιλινών

2. **Οι αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες:** χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η μεθικιλίνη, η κλοξακιλλίνη κ.α οι οποίες χρησιμοποιούνται στην θεραπεία λοιμώξεων που προέρχονται από σταφυλοκόκκους, οι οποίοι παράγουν β-λακταμάση και αυτό γιατί αυτοί οι σταφυλόκοκκοι που είναι ανθεκτικοί στην μεθικιλίνη (MRSA) έχουν αλλάξει τον υποδοχέα τους PBP και έχουν αποκτήσει αντοχή απέναντι στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Ως φάρμακο επιλογής σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται η βανκομυκίνη.



3. **Αμινοπενικιλίνες:** έχουν ευρύ φάσμα δραστηριότητας όπως και οι φυσικές πενικιλίνες εναντίον Gram- αρνητικών βακτηρίων όπως η *E.Coli*, η *Salmonella enteric*, η *Shigella spp*, ο *Proteus marabillis*, το *Elicobacter pylori* και ο *Haemophilus influenzae*. Είναι ακόμη πιο δραστικές από τις φυσικές πενικιλίνες και ενάντια των εντεροκόκκων και της λιστέριας .

Τα κύρια αντιπροσωπευτικά αντιβιοτικά είναι η αμοξικιλίνη και η αμπικιλίνη. Λόγω όμως της αντιβιοαντοχής που αναπτύχθηκε με το πέρασμα του χρόνου η χορήγησή τους γίνεται σε συνδυασμό με κάποιους αναστολείς των β-λακταμασών όπως η σουλβακτάμη και το κλαβουλανικό οξύ. Χορηγούνται σε περιπτώσεις αναπνευστικών λοιμώξεων, λοιμώξεων του ουροποιητικού, του γυναικολογικού αναπαραγωγικού συστήματος και του ήπατος .

4. **Αντι-ψευδομοναδικές πενικιλίνες:** οι κυριότερες πενικιλίνες αυτής της κατηγορίας είναι καρβενικιλίνη, η τρικακιλλίνη, η αζλοκιλλίνη, η μεζλοκιλλίνη και η πιπερακιλλίνη. Χορηγούνται μόνο ενδοφλεβίως και κυρίως σε περιπτώσεις λοιμώξεων που έχουν προκύψει από παθογόνα εντατικών μονάδων, ενώ για λόγους αντιβιοαντοχής χορηγούνται μαζί με αναστολείς των β-λακταμασών όπως τρικακιλλίνη και κλαβουλανικό οξύ, πιπερακιλλίνη και ταζοβακτάμη .

#### **3.1.4.2 Κεφαλοσπορίνες**

Οι **κεφαλοσπορίνες** έχουν ευρύ φάσμα δραστηριότητας καθώς το φάσμα τους περιλαμβάνει περιλαμβάνει Gram θετικούς κόκκους που παράγουν β-λακταμάση και πολλά Gram αρνητικά βακτήρια. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι δρουν και εναντίον μικροβίων που παράγουν πενικιλλάση. . Δρουν παρεμποδίζοντας την σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης. Οι κεφαλοσπορίνες προέρχονται φυσικά από τον μύκητα μούχλας *Acremonium chrysogenum* ως κεφαλοσπορίνη-C. Ως εκ τούτου οι κεφαλοσπορίνες είναι ημισυνθετικά φαρμακευτικά.

Τα αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας διαιρούνται σε τέσσερις υποομάδες, οι οποίες καλούνται γενεές. Ο διαχωρισμός έχει να κάνει με το εύρος της αντιμικροβιακής δράσης του

και όχι με την χρονολογική σύνθεσή τους ή τη χρονολογία εισαγωγής τους στο εμπόριο. Μεταβαίνοντας από την πρώτη στην τέταρτη γενεά παρατηρείται μείωση της δραστικότητας κατά των Gram-θετικών και αύξηση της δραστικότητας κατά των Gram- αρνητικών βακτηρίων.

Πιο συγκεκριμένα οι γενεές των κεφαλοσπορινών περιλαμβάνουν τις εξής κατηγορίες:

- 1) 1<sup>ης</sup> γενεάς κεφαλοσπορίνες
- 2) 2<sup>ης</sup> γενεάς κεφαλοσπορίνες
- 3) 3<sup>ης</sup> γενεάς κεφαλοσπορίνες
- 4) 4<sup>ης</sup> γενεάς κεφαλοσπορίνες

Οι κεφαλοσπορίνες της 4<sup>ης</sup> γενεάς είναι αποτελεσματικές τόσο κατά των Gram-θετικών όσο και των Gram- αρνητικών βακτηρίων. Μπορούν να ανθίστανται σε κάποιες β-λακταμάσες αλλά η δραστικότητά τους έναντι των σταφυλοκόκκων δεν είναι καλύτερη από αυτήν της κεφαλοτίνης ενώ η δραστικότητα εναντίον της *Ps. Aeruginosa* δεν είναι καλύτερη από αυτήν της κεφταζιδίμης. Χαρακτηριστικά αντιβιοτικά είναι η κεφπιρόμη και η κεφεπίμη. Χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις νοσοκομειακής σήψης άγνωστης προέλευσης όταν η κάλυψη ευρέος φάσματος παθογόνων είναι απαραίτητη.

#### Φάσμα κεφαλοσπορινών 4ης γενεάς

- Gram-θετικό.
  - *S. pyogenes*, *S. viridans*, *S. pneumoniae*.
  - *S. aureus* (μέτρια δραστικότητα)
- Gram – αρνητικό.
  - *Enterobacteriaceae*.
    - *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus spp.*

### **3.1.4.3 Καρβαπενέμες**

Οι **καρβαπενέμες** είναι β-λακτάμης αντιβιοτικά με ευρύ φάσμα δράσης. Είναι φυσικά αντιβιοτικά που παράγονται από στρεπτομύκητες. Λόγω της δομής τους είναι πολύ ανθεκτικές κατά των περισσότερων β-λακταμασών με εξαίρεση των β-λακταμασών της *Stenotrophomonas maltophilia* και στελεχών *Bacteroides*, ενώ υδρολύονται επιπλέον και από τις διπεπτιδάσες του νεφρού. Από χημικής άποψης περιέχουν β-λακταμικό δακτύλιο με την διαφορά ότι έχουν ένα άτομο άνθρακα στην τέταρτη θέση του δακτυλίου της θειζολιδίνης .

Ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει την διακοπή της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης οπότε και εμποδίζεται η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος από τα βακτήρια. Το πρώτο μέλος της οικογένειας των καρβαπενέμων είναι η θειεναμυκίνη που παράγωγό της είναι η ιμιπενέμη. Άλλοι εκπρόσωποι είναι η ερταπενέμη, η μεροπενέμη, και η δοριπενέμη. Οι καρβαπενέμες θεωρούνται «αντιβιοτικά εσχάτου ανάγκης» .

Οι καρβαπενέμες χρησιμοποιούνται για την θεραπεία σοβαρών νοσοκομειακών λοιμώξεων, όπως δύναται να προκληθούν π.χ. από το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*. Η χρήση τους διευρύνεται από την καταπολέμηση σηψαιμίας, αναπνευστικών λοιμώξεων μέχρι οστικών και λοιμώξεων του ουροποιητικού, που προκαλούνται από πνευμονιόκοκκο, εντερόκοκκο, σταφυλόκοκκο, λιστέρια και β-αιμολυτικό στρεπτόκοκκο.

### **3.1.3.4 Αμινογλυκοσίδες**

Η κατηγορία αυτή συνίσταται από αμινοσάκχαρα όπως αμινοεξόζες και αμινοπεντόζες και ένα άγλυκο μέρος, τον δακτύλιο 2-δεοξυ πρεπταμίνης. Στην θέση 5 του δακτυλίου της 2-δεοξυ πρεπταμίνης φέρουν ένα υδροξύλιο ενώ στις θέσεις 4 και 6 συνδέονται με αμινοσάκχαρα. Οι υπόλοιπες θέσεις του δακτυλίου φέρουν ελεύθερες αμινομάδες, οι οποίες είναι απαραίτητες για την πρόσδεσή τους στις ριβοσωμικές υπομονάδες, σημείο του κυττάρου όπου στοχεύουν προκειμένου να παρεμποδίσουν την διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης και να οδηγήσουν το βακτηριακό κύτταρο σε θάνατο. Σε αυτές τις ελεύθερες αμινομάδες εστιάζουν τα βακτηριακά κύτταρα για να τις τροποποιήσουν και να αδρανοποιηθεί η μικροβιοκτόνος δράση των αμινογλυκοσιδών. Για τον λόγο αυτό διαθέτουν ένζυμα ακετυλιωτικά των αμινομάδων, φωσφορυλιωτικά των υδροξυλίων και αδενυλιωτικά των υδροξυλίων.

Οι νεώτερες αμινογλυκοσίδες έχουν ευρύτερο φάσμα δραστηριότητας από τις παλαιότερες αμινογλυκοσίδες. Διακόπτουν την πρωτεϊνοσύνθεση, μέσω μη αντιστρεπτής

σύνδεσής τους με την 30S υπομονάδα των ριβοσωμάτων. Προκαλούν αλλαγή της διαμόρφωσης των ριβοσωμάτων, με αποτέλεσμα τα t-RNA να γίνονται ανίκανα να αναγνωρίσουν την αντίστοιχη κωδική μονάδα του m-RNA, έτσι ώστε τελικά να έχουμε αναστολή της μεταφράσεως. Επιπλέον, προκαλούν και ελευθέρωση του m-RNA από τα ριβοσώματα, και σε αυτό οφείλεται η κατεξοχήν βακτηριοκτόνος δράση των φαρμάκων αυτών. Δρουν εναντίον Gram θετικών και Gram αρνητικών μικροοργανισμών. Με εξαίρεση τη Streptomycin, όπου έχουμε ανάπτυξη χρωμοσωμικής αντοχής, τα περισσότερα των ανθεκτικών βακτηρίων στις άλλες αμινογλυκοσίδες αναπτύσσουν αντοχή με τη σύνθεση ειδικών ενζύμων, που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες έτσι ώστε να χάνουν τη βιολογική τους δράση. Τα περισσότερα γονίδια ανιχνεύθηκαν σε Gram αρνητικά βακτήρια. Αυτά τα ένζυμα ανάλογα με τον τύπο της τροποποίησης που προσφέρουν ταξινομούνται σε αμινογλυκοσιδικές ακετυλοτρανσφεράσες (AAC), αμινογλυκοσιδικές αδενοτρανσφεράσες ή νουκλεοτιδυλοτρανσφεράσες (ANT) και αμινογλυκοσιδικές φωσφοτρανσφεράσες (APH).

#### Αντιμικροβιακό φάσμα αμινογλυκοσιδών

- Gram-θετικά αερόβια.
  - *S. aureus & coagulase-negative staph.*
  - *viridans streptococci.*
  - *Enterococcus sp.*
  
- Gram-αρνητικά αερόβια.
  - *E. coli, K. pneumoniae, Proteus sp.*
  - *Acinetobacter, Citrobacter, Enterobacter sp.*
  - *Brucella spp, Yersinia pestis, Francisella tularensis.*
  - *Morganella, Providencia, Serratia, Salmonella, Shigella.*

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι παρενέργειες αυτών των αντιβιοτικών ουσιών μπορεί να είναι ιδιαίτερος σοβαρές καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε νεφρική ανεπάρκεια, σε νευρομυϊκό αποκλεισμό και σε μη-αναστρέψιμη απώλεια της ακοής, μετά από μερικές μέρες χρήσης.

### **3.2 Μικροβιακή Αντοχή**

Η Μικροβιακή Αντοχή στα αντιβιοτικά θεωρείται η ικανότητα ενός μικροβίου να επιβιώνει και να αναπτύσσεται παρουσία των αντιβιοτικών. Τότε θεωρείται ότι το μικρόβιο είναι ανθεκτικό σε κάποιο αντιβιοτικό του φάσματος του. Η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά απασχολεί σε σημαντικό βαθμό την κλινική κοινότητα τη σημερινή εποχή αλλά δεν αποτελεί ένα νέο φαινόμενο. Συγκεκριμένα, τη δεκαετία του 1940 η χρήση της πενικιλίνης και αργότερα η ανάπτυξη αποτελεσματικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων έφερε επανάσταση στο χώρο της υγείας και μείωσε δραστικά τη θνησιμότητα που οφειλόταν σε μικροβιακές μολύνσεις. Παράλληλα, όμως, οδήγησε σε μία κλινική αποτυχία λόγω της αντοχής που ανέπτυξαν ραγδαία κάποια βακτήρια.

#### **3.2.1 Γενετικοί παράγοντες που καθορίζουν την αντοχή στα αντιβιοτικά**

##### **Χρωμοσωμικοί παράγοντες: Μεταλλάξεις**

Ο ρυθμός που συμβαίνουν αυτόματες μεταλλάξεις στους βακτηριακούς πληθυσμούς είναι πολύ χαμηλός για κάθε ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Όμως, αν αναλογιστούμε το γεγονός ότι σε μια εστία λοίμωξης υπάρχουν πολλά βακτηριακά κύτταρα, τότε η πιθανότητα να συμβεί μία μετάλλαξη που θα μετατρέπει το βακτήριο από ευαίσθητο σε ανθεκτικό για κάποιο αντιβιοτικό είναι αρκετά μεγάλη. Η ύπαρξη, όμως, λίγων μεταλλαγμένων στελεχών δεν επαρκεί για να προκαλέσει αντοχή, παρά μόνο ένα εξελικτικό πλεονέκτημα έναντι των μη μεταλλαγμένων στελεχών υπό την παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού. Με τη δράση του αντιβιοτικού θα μειωθεί αρκετά ο βακτηριακός πληθυσμός και έτσι θα μπορέσει το ανοσιακό σύστημα να αντιμετωπίσει τα μεταλλαγμένα στελέχη που δεν θανατώθηκαν από το αντιβιοτικό. Ωστόσο, αυτό δεν μπορεί να συμβεί αν μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού είναι ανθεκτικό στο αντιβιοτικό.

##### **Γονιδιακή ενίσχυση**

Τα τελευταία χρόνια γίνεται συσχέτιση της γονιδιακής αντιγραφής και ενίσχυσης με την εμφάνιση αντοχής σε φάρμακα. Ειδικότερα, υποστηρίζεται ότι η θεραπεία με αντιβιοτικά μπορεί να επιφέρει την αύξηση του αριθμού των αντιγράφων γονιδίων αντίστασης στα αντιβιοτικά που προϋπάρχουν στο μικροοργανισμό. Τέτοια γονίδια μπορεί να είναι αυτά που ελέγχουν τη λειτουργία ενζύμων καταστροφής των αντιβιοτικών και των αντλιών εκροής.

### **Εξωχρωμοσωμικοί παράγοντες: Πλασμίδια**

Πλασμίδια είναι δίκλιωνα, κυκλικά μόρια DNA σε διάφορα μεγέθη που περιέχουν μικρό ποσοστό της γενετικής πληροφορίας και αποτελούν το 1 - 2% του βακτηριακού DNA. Τα πλασμίδια αντιγράφονται ανεξάρτητα από το κύριο DNA. Μεταξύ των γονιδίων που περιέχονται στα πλασμίδια υπάρχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (γονίδια r) και γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά γενετικού υλικού από ένα βακτήριο σε άλλο. Τα πλασμίδια έχουν τη δυνατότητα να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό τόσο μεταξύ τους όσο και με το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου, καθώς και να μεταφέρονται από ένα βακτήριο σε άλλο. Με τον τρόπο αυτό μετασχηματίζουν το βακτήριο στο οποίο εισέρχονται και του προσδίδουν καινούργιες ιδιότητες.

### **Μεταφορά γονιδίων αντοχής μεταξύ στοιχείων του ίδιου βακτηρίου**

#### **A) Τρανσποζόνια**

Πρόκειται για μεταθετά γενετικά στοιχεία τα οποία μπορούν ανεξάρτητα να μετακινηθούν από μια γενετική μονάδα σε μια άλλη, εξαιτίας της τρανσποζάσης που κωδικοποιούν. Τα τρανσποζόνια μπορεί να φέρουν ένα ή περισσότερα γονίδια αντοχής και να μεταφερθούν μέσω ενός πλασμιδίου σε διαφορετικό είδος βακτηρίου, όπου μπορεί να μεταφερθούν στο χρωμόσωμα του νέου βακτηρίου ή στα ενδογενή πλασμίδια.

#### **B) «Κασέτες γονιδίων» (gene cassettes) και ιντεγκρόνια (integrons)**

Τα ιντεγκρόνια είναι μεταθετά γενετικά στοιχεία ικανά να αναγνωρίζουν και να ενσωματώνουν γονιδιακές κασέτες. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί μεταφορά στοιχείων αντοχής μεταξύ γενετικών στοιχείων του ίδιου του βακτηρίου ή και μεταξύ άλλων βακτηρίων.

Μεταφορά γονιδίων αντοχής μεταξύ άλλων βακτηρίων

Η μεταφορά γονιδίων αντοχής έναντι αντιβιοτικών μπορεί να συμβεί ανάμεσα σε βακτήρια του ίδιου ή διαφορετικού είδους. Υπάρχουν τρεις βασικοί μηχανισμοί: η σύζευξη, η μεταγωγή και η μεταμόρφωση.

Η αντοχή των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά αποτελεί κίνδυνο για την δημόσια υγεία και είναι αποτέλεσμα της συχνής έκθεσης στα αντιβιοτικά. Παρουσία αντιβιοτικών, μεμονωμένοι οργανισμοί μέσα μία ή περισσότερες αποικίες βακτηρίων μπορούν να φέρουν επωφελείς μεταλλάξεις που καθιστούν τα αντιβιοτικά αναποτελεσματικά και παρέχοντας, με αυτό τον τρόπο, πλεονέκτημα επιβίωσης στο μεταλλαγμένο στέλεχος. Οι επωφελείς μεταλλάξεις μπορούν να μεταφερθούν μέσω ανταλλαγής πλασμιδίων εντός της βακτηριακής αποικίας με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό του χαρακτηριστικού της αντίστασης

### **3.2.2 Μηχανισμοί αντοχής των Εντεροβακτηριακών στη δράση β-λακταμικών αντιβιοτικών**

Οι βασικότεροι μηχανισμοί αντοχής των Εντεροβακτηριακών έναντι των β-λακταμικών αντιβιοτικών είναι οι εξής:

A) Μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης. Η παρεμπόδιση της διέλευσης από την εξωτερική μεμβράνη είναι το πρώτο εμπόδιο των αντιβιοτικών στην πορεία προς το βακτηριακό κύτταρο. Στην *E. coli* αλλά και στα περισσότερα gram αρνητικά βακτηρίδια, οι β-λακτάμες διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη μέσω διαύλων που σχηματίζονται από τις πρωτεΐνες πορίνες. Οι μεταλλάξεις που επιφέρουν μειωμένη έκφραση ή δομικές αλλαγές των πορινών προκαλούν μειωμένη διεισδυτικότητα και κατ' επέκταση αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

B) Καταστροφή του αντιβιοτικού από τις β-λακταμάσες .

Οι β-λακταμάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση (υδρόλυση) του αμιδικού δεσμού της πενικιλίνης και των άλλων βλακταμικών αντιβιοτικών μέσω της σύνδεσης του ενζύμου στο λακταμικό δακτύλιο μέσω της σερίνης. Οι β-λακταμάσες στα gram αρνητικά βακτηρίδια εκκρίνονται στον περιπλασματικό χώρο όπου και βρίσκονται σε στρατηγικά σημεία. Σχεδόν όλα τα Εντεροβακτηριακά παράγουν μία κεφαλοσπορινάση που κωδικοποιείται από το βακτηριακό χρωμόσωμα.

### **3.3 Κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης**

Μέτρα για τον έλεγχο των καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα, κατάλογος των ανώτατων ορίων καταλοίπων καθώς και μια συλλογή αναλυτικών μεθόδων που είναι κατάλληλες για την υποστήριξη των ανώτατων ορίων, θεσπίστηκαν από την Επιτροπή του Codex Alimentarius, μια από τις κυριότερες διεθνείς οργανώσεις για την ασφάλεια των τροφίμων.

Η πρόταση καταλληλότητας των αναλυτικών μεθόδων ξεχωρίζει από την προσέγγιση της Ε.Ε, η οποία θεσπίζει τις απαιτήσεις αλλά δεν προτείνει ειδικές προσεγγίσεις. Με τη νομοθετική απαγόρευση, Κανονισμός 1831/2003 Ε.Κ., οι χλωρες τις Ε.Ε. δεν χρησιμοποιούν τα αντιμικροβιακά φάρμακα ως αυξητικοί παράγοντες σε αντίθεση με άλλες χώρες ,παραδείγματος χάρι οι ΗΠΑ που εξακολουθεί να χρησιμοποιεί αντιμικροβιακά φάρμακα στην εκτροφή των παραγωγικών ζώων.

Η μεγάλη συγκέντρωση υπολειμμάτων αντιβιοτικών αποτελεί κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών και σ'ορισμένα άτομα προκαλεί αλλεργικές και θέτει σε κίνδυνο το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης, η μεγάλη συγκέντρωση υπολειμμάτων αντιβιοτικών οδηγεί στην εμφάνιση βακτηριακών στελεχών ανθεκτικά στα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην ιατρική.

Η Ε.Ε. για να αντιμετωπίσει αυτά τα προβλήματα ψήφισε ένα σύνολο πολιτικών μέτρων καθώς και τα ανώτατα όρια καταλοίπων για ορισμένα αντιμικροβιακά και ένα σύστημα ειδοποιήσεων.

Στο παράρτημα του Κανονισμού της Επιστροφής 37/2010 αναφέρονται ο πλήρης κατάλογος των δδραστικών ουσιών και τα ανώτατα όρια καταλοίπων.

### **Συμπέρασμα**

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στον ανεπτυγμένο κόσμο για πάνω από 50 χρόνια και αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο της θεραπείας μολυσματικών ασθενειών. Όμως, παράλληλα με την ανακάλυψή τους ήρθε και η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Για τον λόγο αυτό, την τελευταία δεκαετία παρατηρείται σταθερή ανάπτυξη της ανησυχίας στην επιστημονική κοινότητα και στο ευρύ κοινό όσον αφορά την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων απέναντι στην δράση των αντιβιοτικών. Στην κορυφή του καταλόγου βρίσκονται βακτήρια της ομάδας των Gram-αρνητικών μικροβίων, όπως το κολοβακτηρίδιο *E.coli* που μπορεί να προκαλέσουν θανατηφόρες μολύνσεις του αίματος και πνευμονίες στους αδύναμους ασθενείς που νοσηλεύονται σε νοσοκομεία.



## **Βιβλιογραφία**

<https://www.iatronet.gr>

<http://estia.hua.gr/file/lib/default/data/8851/theFile9>

<https://www.nicd.ac.za/diseases-a-z-index/enterobacteriaceae/>

<https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Enterobacteriaceae>

<https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/infectious-diseases/enterobacteriaceae/>

[https://www.3m.com/3M/en\\_US/food-safetyus/resources/microorganisms/enterobacteriaceae/](https://www.3m.com/3M/en_US/food-safetyus/resources/microorganisms/enterobacteriaceae/)

<https://www.slideshare.net/doctorrao/enterobacteriaceae-identification>

<https://www.britannica.com/science/Enterobacter>

<https://www.cdc.gov/flu/about/professionals/antigenic.htm>

<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mBio.01914-20>

<https://rupress.org/jem/article/118/4/565/21529/SEPARATION-CHARACTERIZATION-AND-BIOLOGICAL>

<https://science.umd.edu/classroom/bsci424/pathogendescriptions/Enterobacteriaceae.htm>

<https://eclass.duth.gr/modules/document/file.php/OPE01170/%CE%A4%CE%95%CE%A7%CE%9D%CE%9F%CE%9B%CE%9F%CE%93%CE%99%CE%91%20%CE%A8%CE%91%CE%A1%CE%99%CE%A9%CE%9D.pdf>

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2018.1479453>

<https://europepmc.org/article/med/16440036>

<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/CMR.00059-09>

<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2015.00056/full>

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2015.00072/full>

<https://meridian.allenpress.com/jfp/article/74/12/2177/172363/Two-Cases-of-Hemorrhagic-Diarrhea-Caused-by>

<http://dspace.aua.gr/xmlui/bitstream/handle/10329/112/%CE%9A%CE%B1%CF%81%CE%B1%CE%BC%CF%80%CE%AD%CF%81%CE%B7%20%CE%92%CE%B1%CF%83%CE%B9%CE%BB%CE%B9%CE%BA%CE%AE.pdf?sequence=1>

<https://core.ac.uk/download/pdf/132823396.pdf>

[http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/images/9/9d/%CE%9A%CE%B1%CE%BD\\_%28%CE%95%CE%95%29\\_2073-05.pdf](http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/images/9/9d/%CE%9A%CE%B1%CE%BD_%28%CE%95%CE%95%29_2073-05.pdf)

Brenner DJ. Family I Enterobacteriaceae. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore 1984

Ewing WH. Identification of Enterobacteriaceae 4th ed. New York, Elsevier 1986.

Farmer JJ, Kelly M. Enterobacteriaceae. In Manual of clinical Microbiology. Amer Society Microbiol 1991.

Duffey P, Kaniz J, Lee J, Hill W, Kokka R. Salmonella serogroup C2 and C3 identified by agglutination using an immunoglobulin G3(k) monoclonal antibody (32-1-E3) reactive with a somatic factor 8-like polysaccharide antigen. J Clin Microbiol 1992, 30

Sack BR, Sack DA. Immunologic methods for the diagnosis of infections by Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. In Manual of Clinical Laboratory Immunology. 4th Edition ASM, 1992.

Ewing W. The nomenclature of Salmonella its usage and definitions for the three species Can J Microbiol 1972.

Neidhardt F. The bacterial cell structure for growth, survival and colonization in JC Sherris (editor) Medical Microbiology Elsevier 1990.

Yan, Q.Q., et al. (2012) “*Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium”, J Appl Microbiol,

Zain, S.N.M. (2009) “Biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* on three different materials of infant feeding tube”, (Master dissertation), Retrieved from Massey University, Palmerston North, New Zealand

Zhu, S. (2013) “Effect of microbiologically active substances in powdered infant formula on the growth and detection of *Cronobacter* spp.”, Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor Nutritional Sciences

Noriega, F.R., Kotloff, K.L., Martin, M.A. and Schwalbe, R.S. (1990) “Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula”, *Pediatr Infect Dis*,

*Escherichia coli* O157:H7 requires colonizing partner to adhere and persist in a capillary flow cell”, *Environ Sci Technol*,

Giaouris, E., Chorianopoulos, N. and Nychas, G.J.E. (2005) “Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements”, *J Food Prot*,

Αρσένη Α. *Enterobacteriaceae* III. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων 1994.

Ewing WH. *Identification of Enterobacteriaceae* 4th ed. New York, Elsevier 1986.

Brenner DJ. Family I *Enterobacteriaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore 1984.

Farmer JJ III Davis B, Hickman-Brenner et al. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol*.

Ryan K. *Enterobacteriaceae*. In *Sherris Medical Microbiology*, Elsevier 1990.

Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A. *Enterobacteriaceae* in: (ed) *Medical Microbiology* Third edition, by Mosby Inc, Missouri, 1998,  
Gray LD. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*. In: Murray PR,

Kharsany A. B. M., Hoosens A. A., Kiepla P., Kirby P., and Sturm A. W. Phylogenetic analysis of *Calymatobacterium granulomatis* based on rRNA gene sequences. 1999. *J. Med. Microbiol.* 48

Abbott S. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas*, and other *Enterobacteriaceae*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edition 2003.

Le Minor L. Genus III *Salmonella*. In *Bergey's Manual* 4th ed. Williams & Wilkins 1984.

Le Minor L, Veron M, Popoff M. *Taxonomie de Salmonella*. *Ann Microbiol* 1982.

Bouvet P, JeanJean S. Evaluation of two colored Latex kits ,the Wellcolex colour Salmonella test and the Wellcolex colour shigella test for serological grouping of Salmonella and Shigella species. J Clin Microbiol 1992.

Καποτάς ΝΜ: Εμφάνιση αντοχής των Gram-αρνητικών βακτηρίων στα νεότερα μη υδρολύμενα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Μεταπτυχιακή διατριβή ανίχνευση εντεροπαθογόνων βακτηρίων σε επεξεργασμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης με μοριακές μεθόδους Βαΐου Μαρία λάρισα 2010